UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA - EEL

MARIANA ANDRÉ GONÇALVES TIBURCIO

**Estudo da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de
arroz empregando células de *Candida guilliermondii* permeabilizadas
com Triton X-100**

Lorena
2018

MARIANA ANDRÉ GONÇALVES TIBURCIO

Estudo da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz empregando células de *Candida guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100

Dissertação apresentada à Escolha de Engenharia de Lorena na Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Prof^a Dr^a: Inês Conceição Roberto

Versão Original

Lorena

2018

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.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Tiburcio, Mariana André Gonçalves

Estudo da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz empregando células de *Candida guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100 / Mariana André Gonçalves Tiburcio; orientadora Inês Conceição Roberto - Versão Original. - Lorena, 2018. 142 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2018

1. Hidrolisado hemicelulósico. 2. *Candida guilliermondii*. 3. Biotransformação. 4. Xilitol. 5. Permeabilização celular. I. Título. II. Roberto, Inês Conceição, orient.

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Nilcineia e Janio, por todo apoio.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Nilcineia e Janio, por todo apoio, amor e incentivo ao longo desta jornada. Vocês foram essenciais para esta conquista, sem vocês eu não teria chegado até aqui. Amo vocês.

Ao meu irmão, Leandro, e minha cunhada, Katiuscia, por sempre me incentivarem e acreditarem em mim. Amo vocês.

À minha amiga de longa data, Karine, muito obrigada por todo apoio, incentivo e amizade.

À professora Inês pela enorme oportunidade, orientação e por todo aprendizado que me proporcionou ao longo deste mestrado.

Às companheiras de laboratório, Daiana e Isabela, por toda amizade, paciência e ensinamento nos momentos em que eu mais precisei. Serei eternamente grata a vocês. Daiana, muito obrigada pela amizade, apoio e estadia.

Ao Neuracy, pelo apoio e incentivo.

A Deus, por ter me dado a oportunidade de vivenciar esta etapa tão importante e que me proporcionou tanto amadurecimento e aprendizado.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

TIBURCIO, M. A. G. **Estudo da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz empregando células de *Candida guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100.** 2018. 142 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz empregando células de *Candida guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100. Para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico foram realizadas etapas de pré-tratamento da palha de arroz sob condições previamente otimizadas pelo grupo de pesquisa, incluindo um tratamento alcalino seguido de tratamento com ácido diluído. Inicialmente, foi avaliado o efeito do meio de permeabilização celular (meio semi-definido ou hidrolisado hemicelulósico) sobre a biotransformação de xilose em xilitol empregando hidrolisado hemicelulósico. Numa segunda etapa, foi avaliado o efeito de tampão fosfato de potássio e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre o processo de biotransformação empregando hidrolisado não detoxificado e detoxificado com carvão ativado através de um planejamento experimental 2^2 . As condições de biotransformação foram mantidas a 35 °C, pH 6,8, com uma suspensão celular de 10-12 g/L. Neste estudo ficou demonstrado que a biotransformação do hidrolisado empregando células permeabilizadas em meio semi-definido, mostrou uma produtividade volumétrica em xilitol ($Q_P = 1,86 \text{ g/L.h}$) de 34,8 % superior à obtida com células permeabilizadas no próprio hidrolisado ($Q_P = 1,38 \text{ g/L.h}$), enquanto os fatores de conversão de xilose em xilitol foram semelhantes ($\sim 0,57 \text{ g/g}$) independente do meio de permeabilização. Foi observado que a adição de tampão fosfato de potássio e/ou $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ao hidrolisado hemicelulósico (não detoxificado e detoxificado) não promoveu qualquer efeito sobre a biotransformação de xilose em xilitol, obtendo-se em média uma produtividade volumétrica de 2,0 g/L.h e um fator de conversão de 0,57 g/g. O impacto da permeabilização celular com Triton X-100 sobre a biotransformação de xilose em xilitol empregando hidrolisado hemicelulósico não detoxificado e sem qualquer adição de sais foi de um aumento de 40 % na produtividade volumétrica e de 32 % no fator de conversão de xilose em xilitol. As células permeabilizadas com Triton X-100 também mostraram elevada estabilidade. Os valores de produtividade volumétrica e fator de conversão de xilose em xilitol foram mantidos em 4 ciclos de 15 horas cada em bateladas repetidas, os quais apresentaram em média 1,93 g/L.h e 0,59 g/g, respectivamente. Estes resultados mostram que a permeabilização celular é uma potencial estratégia para a biotransformação de xilose em xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, pois além de aumentar os parâmetros da biotransformação, não promoveu queda da viabilidade celular e permitiu o reuso das células.

Palavras-chave: Hidrolisado hemicelulósico. *Candida guilliermondii*. Biotransformação. Xilitol. Permeabilização celular.

ABSTRACT

TIBURCIO, M. A. G. **Study of xylitol production from hemicellulosic rice straw hydrolyzate using *Candida guilliermondii* cells permeabilized with Triton X-100.** 2018. 142 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

The present study aimed to evaluate the production of xylitol from hemicellulosic rice straw hydrolyzate using *Candida guilliermondii* cells permeabilized with Triton X-100. To obtain the hemicellulosic hydrolyzate, pre-treatment steps were performed on rice straw under conditions previously optimized by the research group, including an alkaline treatment followed by diluted acid treatment. Initially, the effect of the cellular permeabilization medium (semi-defined medium or hemicellulosic hydrolyzate) on the biotransformation of xylose in xylitol using a hemicellulosic hydrolyzate was evaluated. In a second step, the effect of potassium phosphate buffer and $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ on the biotransformation process was evaluated using non-detoxified hydrolyzate and detoxified with activated charcoal through an experimental design 2^2 . The biotransformation conditions were maintained at 35 °C, pH 6,8, with a cell suspension of 10-12 g/L. In this study, it was demonstrated that in the biotransformation of xylitol in xylitol by cells permeabilized in semi-defined medium using hemicellulosic hydrolyzate, the volumetric productivity in xylitol ($Q_P = 1,86 \text{ g/L.h}$) was 34,8% higher than that obtained with cells permeabilized in hydroxylate ($Q_P = 1,38 \text{ g/L.h}$), while xylose conversion factors in xylitol were similar ($\sim 0,57 \text{ g/g}$) independent of the permeabilization medium. It was observed that the addition of potassium phosphate buffer and / or $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ to the hemicellulosic (non-detoxified and detoxified) hydrolyzate did not have any effect on the biotransformation of xylitol into xylitol, obtaining, on average, a volumetric productivity of 2,0 g/L.h and a conversion factor of 0,57 g/g. The impact of cell permeabilization with Triton X-100 on xylose biotransformation in xylitol using non-detoxified hemicellulosic hydrolyzate and without any addition of salts was a 40% increase in volumetric productivity and 32% in xylose conversion factor in xylitol. Cells permeabilized with Triton X-100 also showed high stability. The values of volumetric productivity and conversion factor of xylose in xylitol were maintained in 4 cycles of 15 hours each in repeated batch, which presented, on average, 1,93 g/L.h and 0,59 g/g, respectively. These results show that cellular permeabilization is a potential strategy for the biotransformation of xylitol in xylitol from hemicellulosic rice straw hydrolyzate, since in addition to increasing the parameters of biotransformation, it did not promote a decrease in cell viability and allowed reuse of the cells.

Keywords: Hemicellulosic hydrolyzate. *Candida guilliermondii*. Biotransformation. Xylitol. Cell permeability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da celulose, hemicelulose e lignina na biomassa vegetal.....	23
Figura 2 - Esquema ilustrativo da desconstrução de biomassa lignocelulósica após pré-tratamento (celulose representado em verde, hemicelulose em preto, lignina em marrom, proteínas em círculos).....	24
Figura 3 - O uso de biomassa lignocelulósica em um conceito de biorrefinaria ao invés do uso de petróleo para a geração de energia e produtos químicos.....	31
Figura 4 - Estrutura química do xilitol.....	33
Figura 5 - Doçura de adoçantes polióis.....	35
Figura 6 - Calor de solução de polióis em comparação com a sacarose.....	36
Figura 7 - Solubilidade de xilitol e sacarose.....	36
Figura 8 - Aplicação de xilitol em diversos setores.....	42
Figura 9 - Principais características para a produção de xilitol por rota química e biotecnológica.....	44
Figura 10 - Metabolismo de xilose, glicose e arabinose em microrganismos.....	46
Figura 11 - Produção enzimática de xilitol com a etapa de regeneração de NADPH pela enzima glicose desidrogenase.....	50
Figura 12 - Célula de levedura permeabilizada.....	51
Figura 13 - Estágios da solubilização de membranas biológicas.....	52
Figura 14 - Estratégias para melhorar a bioconversão de arabitól em xilitol por <i>G. oxydans</i>	54
Figura 15 - Esquema das etapas que compõem o estudo.....	66
Figura 16 - Esquema das etapas de biotransformação em meio definido e em hidrolisado hemicelulósico.....	73
Figura 17: Curva padrão obtida do cultivo em meio semi-definido suplementado com extrato de levedura.....	77
Figura 18: Curva padrão obtida do cultivo em meio semi-definido suplementado com extrato de farelo de arroz.....	77
Figura 19: Curva padrão obtida do cultivo em hidrolisado hemicelulósico suplementado com extrato de levedura.....	78

Figura 20: Curva padrão obtida do cultivo em hidrolisado hemicelulósico suplementado com extrato de farelo de arroz.....	78
Figura 21: Curva padrão obtida do cultivo em hidrolisado hemicelulósico sem suplementação.....	79
Figura 22: Concentração celular, consumo de xilose e produção de xitol ao longo do cultivo de células de <i>Candida guilliermondii</i> em meio suplementado com extrato de farelo de arroz (—●—) e extrato de levedura (—■—).....	86
Figura 23 - Produção de arabitól por células de <i>Candida guilliermondii</i> cultivadas em meio suplementado com extrato de levedura.....	87
Figura 24 - Imagem microscópica das células de <i>Candida guilliermondii</i> em meio suplementado com extrato de levedura (esquerda) ou extrato de farelo de arroz (direita) após 48 horas de cultivo.....	89
Figura 25 - Perfil de decantação das células de <i>Candida guilliermondii</i> em meio suplementado com extrato de farelo de arroz (EFA) ou extrato de levedura (EL) após 5 horas.....	90
Figura 26 – Células totais/mL e viabilidade celular (%) em meio semi-definido suplementado com extrato de farelo de arroz (—●—) ou extrato de levedura (—■—).....	91
Figura 27: Concentração celular, consumo de xilose e produção de xitol em hidrolisado hemicelulósico suplementado com extrato de farelo de arroz (—●—), extrato de levedura (—■—) ou sem suplementação (—◆—).....	94
Figura 28 - Imagem das células cultivadas em hidrolisado suplementado com extrato de farelo de arroz (EFA), extrato de levedura (EL) e sem suplementação após 72 horas.....	95
Figura 29: Variação das células totais e da viabilidade celular durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico suplementado com extrato de farelo de arroz (—●—) ou extrato de levedura (—■—) ou sem suplementação (—◆—).....	96
Figura 30 - Esquema das etapas realizadas para a biotransformação em meio definido e em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por células de <i>C. guilliermondii</i> permeabilizadas com Triton X-100.....	98
Figura 31 - Concentração celular, consumo de xilose e produção de xitol durante os ensaios de biotransformação em meio definido e em hidrolisado por células de <i>C. guilliermondii</i> permeabilizadas com Triton X-100.....	99
Figura 32 - Concentração celular, consumo de xilose e produção de xitol nos ensaios de biotransformação de xilose em xitol por <i>C. guilliermondii</i> permeabilizada com Triton X-100 empregando hidrolisado hemicelulósico conforme o planejamento experimental.....	108
Figura 33 - Gráfico de Pareto para a estimativa dos efeitos da suplementação de tampão fosfato de potássio e $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ sobre os parâmetros ($Y_{P/S}$ e Q_P) da biotransformação de xilose em xitol por <i>C. guilliermondii</i> permeabilizada com Triton X-100 empregando hidrolisado hemicelulósico.....	110

Figura 34 - Coloração do hidrolisado hemicelulósico não detoxificado e detoxificado com carvão ativado (CA) contendo células de <i>C. guilliermondii</i>	113
Figura 35 - Concentração celular, consumo de xilose e produção de xilitol durante os ensaios de biotransformação de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i> permeabilizada com Triton X-100 empregando hidrolisado hemicelulósico detoxificado com carvão ativado conforme o planejamento experimental.....	114
Figura 36 - Gráfico de Pareto para a estimativa dos efeitos da suplementação de tampão fosfato de potássio e $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ sobre os parâmetros (Q_P e $Y_{P/S}$) da biotransformação de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i> permeabilizada com Triton X-100 empregando hidrolisado hemicelulósico detoxificado com carvão ativado (HD).....	116
Figura 37 - Comparação dos parâmetros relacionados a produção de xilitol ($Y_{P/S}$ e Q_P) nos ensaios de biotransformação em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz detoxificado com carvão ativado (HD) e não detoxificado (HND) e em meio definido (MD).....	117
Figura 38 – Concentração celular, consumo de xilose e produção de xilitol durante a biotransformação de xilose em xilitol em hidrolisado por células não permeabilizadas (—■—) e permeabilizadas com Triton X-100 (—●—).....	122
Figura 39 - Produção de xilitol, consumo de xilose e viabilidade celular ao longo de 4 ciclos de reutilização de células de <i>C. guilliermondii</i> permeabilizadas com Triton X-100 durante a biotransformação em hidrolisado hemicelulósico.....	124
Figura 40 - Produtividade volumétrica (Q_P) e fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$) após 4 ciclos de reutilização de células de <i>C. guilliermondii</i> permeabilizadas com Triton X-100 durante a biotransformação em hidrolisado hemicelulósico.....	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação dos resultados de produção de xilitol a partir de diversos substratos sintéticos empregando diferentes condições de processo.....	57
Tabela 2 - Estudos relacionados a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.....	64
Tabela 3 - Planejamento experimental dos ensaios de produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não detoxificado e detoxificado com carvão ativado.....	75
Tabela 4 - Composição química da fração sólida da palha de arroz <i>in natura</i> , após desacetilação e após a hidrólise ácida (HA).....	83
Tabela 5 - Composição do hidrolisado hemicelulósico da palha <i>in natura</i> (HHPIN), palha desacetilada (HHPD), palha desacetilada concentrado (HHPDC) e palha desacetilada concentrado detoxificado com carvão ativado (HHPDCD) obtido pelo pré-tratamento com ácido diluído.....	84
Tabela 6 - Consumo de xilose, produção de xilitol, produção de biomassa celular, YP/S e YX/S a partir de células de <i>Candida guilliermondii</i> cultivadas em meio semi-definido suplementado com extrato de levedura (EL) ou extrato de farelo de arroz (EFA).....	92
Tabela 7 - Parâmetros do cultivo de células de <i>Candida guilliermondii</i> em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e em meio semi-definido.....	97
Tabela 8 – Concentração celular, consumo de xilose, produção de xilitol e formação de subprodutos, fator de conversão de xilose em xilitol, produtividade volumétrica, pH _{final} e viabilidade celular nos diferentes ensaios de biotransformação após 17 horas.....	101
Tabela 9 - Matriz de planejamento experimental utilizada para avaliar o efeito do tampão fosfato de potássio e MgCl ₂ .6H ₂ O sobre a biotransformação de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i> permeabilizada com Triton X-100 empregando hidrolisado hemicelulósico.....	107
Tabela 10 - Produtividade volumétrica e fator de conversão de xilose em xilitol nos ensaios de biotransformação em hidrolisado hemicelulósico por <i>C. guilliermondii</i> permeabilizada com Triton X-100 em meio semi-definido.....	109
Tabela 11 - Matriz de planejamento experimental utilizada para avaliar o efeito do tampão fosfato de potássio e MgCl ₂ .6H ₂ O sobre a biotransformação de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i> permeabilizada com Triton X-100 empregando hidrolisado hemicelulósico detoxificado com carvão ativado.....	112
Tabela 12 - Produtividade volumétrica e fator de conversão de xilose em xilitol nos ensaios de biotransformação em hidrolisado hemicelulósico detoxificado com carvão ativado por <i>C. guilliermondii</i> permeabilizada com Triton X-100 em meio semi-definido.....	115

Tabela 13 - Consumo de xilose, produção de xilitol e subprodutos, fator de conversão de substrato em células, viabilidade celular e variação do pH nos ensaios de biotransformação em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com células não permeabilizadas e permeabilizadas com Triton X-100 após 15 horas.....123

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISAO DA LITERATURA.....	21
2.1 Biomassa lignocelulósica: Palha de arroz.....	21
2.1.1 Celulose.....	21
2.1.2 Hemicelulose.....	21
2.1.3 Lignina	22
2.2 Pré-tratamento da biomassa lignocelulósica.....	23
2.3 Disponibilidade e aplicação da palha de arroz em biorrefinaria.....	29
2.4 Xilitol.....	33
2.4.1 Aspectos gerais.....	33
2.4.2 Propriedades organolépticas.....	34
2.4.1.2 Doçura.....	34
2.4.3 Propriedades físicas e químicas.....	35
2.4.3.1 Calor de solução e solubilidade.....	35
2.4.3.2 Estabilidade e Viscosidade.....	37
2.4.3.3 Atividade de água.....	37
2.4.4 Propriedades fisiológicas.....	38
2.4.4.1 Tolerância.....	38
2.4.4.2 Valor calórico.....	38
2.4.4.3 Benefícios para a saúde.....	39
2.4.4.3.1 Saúde bucal.....	39
2.4.4.3.2 Baixa resposta glicêmica.....	39
2.4.4.3.3 Efeito Prebiótico.....	40
2.4.4.3.4 Efeito de saciedade.....	40
2.4.4.3.5 Prevenção da otite média aguda e infecções respiratórias.....	41
2.4.4.3.6 Osteoporose.....	41
2.4.5 Aplicações.....	42
2.4.6 Seguridade e status regulatórios.....	42
2.4.7 Formas de produção.....	43
2.4.7.1 Via química.....	43
2.4.7.2 Via Biotecnológica.....	44

2.4.7.2.1 Processo fermentativo.....	44
2.4.7.2.2 Processo enzimático.....	48
2.4.7.2.3 Biotransformação	51
2.5 Produção de xilitol por leveduras em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz: Aspectos nutricionais e ambientais.....	57
3 OBJETIVOS.....	65
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	66
4.1 Obtenção da matéria-prima.....	67
4.2 Pré-tratamento e obtenção do hidrolisado hemicelulósico.....	67
4.2.1 Tratamento alcalino (desacetilação)	67
4.2.2 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico.....	68
4.2.3 Caracterização da palha de arroz.....	68
4.2.2 Microrganismo.....	71
4.4 Preparo do Inóculo e Condições de cultivo.....	71
4.5 Permeabilização das células de <i>Candida guilliermondii</i> com Triton X-100.....	72
4.6 Efeito do meio de permeabilização celular sobre a biotransformação de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i>	73
4.7 Efeito do tampão fosfato de potássio e do $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ sobre a biotransformação de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i> em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.....	74
4.8 Reutilização das células permeabilizadas.....	75
4.9 Métodos analíticos.....	76
4.9.1 Determinação do teor de umidade da palha de arroz.....	76
4.9.2 Determinação da concentração celular.....	76
4.9.3 Determinação da concentração de açúcares, ácido acético e xilitol.....	79
4.9.4 Determinação da viabilidade celular.....	79
4.10 Metodologia de análise dos resultados.....	80
4.10.1 Parâmetros de cultivo e biotransformação.....	80
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
5.1 Caracterização da palha de arroz.....	82
5.2 Avaliação do cultivo de <i>Candida guilliermondii</i> em meio semi-definido e em hidrolisado hemicelulósico suplementado com extrato de levedura ou extrato de farelo de arroz.....	85

5.3 Efeito do meio de permeabilização celular sobre a biotransformação de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i>	98
5.4 Efeito do tampão fosfato de potássio e do $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ sobre a biotransformação de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i> em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.....	106
5.5 Reciclo de <i>Candida guilliermondii</i> em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.....	124
6 CONCLUSÕES.....	127
REFERÊNCIAS	129

1 INTRODUÇÃO

A palha de arroz é um dos resíduos lignocelulósicos mais abundantes em todo o mundo, onde sua produção mundial aumentou de forma constante, de 200 milhões de toneladas em 1960 para 740 milhões de toneladas em 2014. Dessa maneira, o uso desta biomassa para a geração de biocombustíveis e outros produtos de alto valor agregado, como o xilitol, constitui uma abordagem sustentável e econômica dentro do conceito de biorrefinarias. Para a obtenção de xilitol, etapas de pré-tratamento da biomassa lignocelulósica que visem a separação da fração rica em pentoses (hemicelulose) das demais frações (celulose e lignina) são necessárias para a obtenção da corrente de xilose que será convertida a xilitol por ação de microrganismos ou suas enzimas.

O xilitol é um poliál que apresenta diversas propriedades, como doçura semelhante à sacarose, estabilidade química, baixo valor calórico e baixa resposta glicêmica, sendo atualmente aplicado em diversos setores, como o setor alimentício, farmacêutico, cosmético e produtos de higiene bucal. Recentemente, o xilitol foi considerado um dos 12 principais produtos químicos de valor agregado produzidos a partir de biomassa lignocelulósica, sendo utilizado desde a década de 1960 como aditivo alimentar e agente adoçante. Atualmente, a produção em larga escala do xilitol é através da via química, onde este poliál é obtido pela hidrogenação da xilose derivada principalmente de hidrolisado hemicelulósico de madeira na presença de um catalisador de níquel em alta pressão de hidrogênio e a temperatura elevada. Devido aos baixos rendimentos (50-60 %), alto aporte energético e o uso de catalisador tóxico nesta via, outras formas de produção vêm sendo estudadas, como a via biotecnológica. Esta se baseia no uso de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) ou enzimas destes microrganismos, sendo empregado a xilose pura comercial ou hidrolisado hemicelulósico rico em xilose como fonte de carbono.

A fermentação é uma das tecnologias de processo para a produção de xilitol mais estudadas, a qual utiliza as vias do metabolismo microbiano, ocorrendo normalmente elevados tempos de reação e a necessidade de suplementação nutricional do meio. Em contrapartida, o processo de biotransformação com células permeabilizadas emerge como uma interessante estratégia para a produção de xilitol, o qual ocorre em uma única etapa de reação enzimática e sem a necessidade de suplementação nutricional. Adicionalmente, a permeabilização das células faz com que a absorção de substrato e a liberação de produto ocorram mais facilmente, devido a redução da barreira de permeabilidade da

parede/membrana celular. Neste sistema, as enzimas das células permeabilizadas estão naturalmente protegidas no interior das células e cercadas pelos componentes intracelulares, sendo ativas e estáveis por longos períodos de tempo, o que constitui uma abordagem econômica quando comparado a processos enzimáticos que necessitam do isolamento e purificação da enzima de interesse. Adicionalmente, o sistema de biotransformação baseia-se na ação de enzimas e cofatores que estão naturalmente imobilizados dentro das células, e, portanto, diferentemente do sistema enzimático, não requer a adição de cofatores e cosubstratos essenciais para a eficiência do processo. Apesar das diversas vantagens da biotransformação com células permeabilizadas, os estudos relacionados a esta tecnologia de processo ainda são escassos.

Diante disto e visando contribuir para as pesquisas relacionadas a produção de xilitol a partir de resíduos agro-industriais, este presente trabalho tem como objetivo avaliar a biotransformação de xilose em xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz empregando células de *Candida guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biomassa lignocelulósica: Palha de arroz

A palha de arroz compreende o resíduo deixado no campo após a colheita dos grãos e constitui o principal resíduo da colheita do arroz, com uma produção de 1 a 1,5 quilograma por quilograma de arroz colhido (BINOD et al. 2010). A palha de arroz é uma biomassa lignocelulósica, sendo composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina juntamente com pequenas quantidades de outros componentes, como grupos acetil e minerais (ISIKGOR; BECER, 2015).

2.1.1 Celulose

As moléculas de celulose são polímeros rígidos e longos bem definidos, constituídos exclusivamente por moléculas de D-glicose unidos por ligações β 1-4 (Figura 1). A unidade de repetição da celulose é o dissacarídeo celobiose, com extensas redes intramoleculares e intermoleculares de ligação de hidrogênio unidas firmemente às unidades de glicose (KLEMM et al. 2005). Conforme demonstrado por Ruel et al. (2012), a estrutura da celulose em estado sólido é representada por áreas de alta ordem (região cristalina) e de baixa ordem (região amorfa). As microfibrilas de celulose se empacotam em redes cristalinas estreitamente ligadas, onde apenas uma fração das cadeias na superfície da microfibrila (região amorfa), é acessível ao processo de biodegradação. Dessa maneira, a região cristalina constitui uma das barreiras ao ataque por fungos e outros microrganismos. As reações e propriedades da celulose são determinadas por interações intermoleculares, reações de reticulação, comprimentos de cadeia e pela distribuição dos grupos funcionais nas unidades repetitivas e ao longo das cadeias do polímero (KLEMM et al. 2005).

2.1.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um polímero heterogêneo com variações em sua composição química de acordo com a cultura vegetal. Sua estrutura é aleatória, amorfa e ramificada,

composta por diferentes unidades de monossacarídeos de 5 carbonos (xilose, arabinose) e 6 carbonos (manose, glicose e galactose), conforme demonstrado na Figura 1. Além de açúcares, a hemicelulose também pode apresentar ácidos urônicos e cumarinas, e cerca de 70 % das moléculas de xilose presentes neste heteropolímero são acetiladas. As hemiceluloses estão inseridas nas paredes celulares dos vegetais para formar uma rede complexa de ligações covalentes que proporciona força estrutural e ligação de fibras de celulose em microfibrilas e interligação com a lignina. Em hemiceluloses de culturas de monocotiledôneas (embrião composto por um cotilédono), como o arroz, a xilose é o açúcar majoritário (SAHA, 2003; SELLER; ULVSKOV, 2010; POL et al. 2014; ISIKGOR; BECER, 2015; MAITY, 2015).

2.1.3 Lignina

A lignina é um polímero amorfo, com uma estrutura tridimensional complexa, sendo resultado do acoplamento oxidativo de unidades de fenilpropano, em que seus precursores são três álcoois aromáticos, denominados álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (BURANOV; MAZZA, 2008). Os respectivos constituintes aromáticos destes álcoois no polímero são denominados de porções de p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) (Figura 1). O p-hidroxifenil (H) é o constituinte aromático (fenólico) mais abundante em lignina de culturas monocotiledôneas (BURANOV; MAZZA, 2008; POL et al. 2014).

A lignina fornece rigidez, transporte interno de água e nutrientes e proteção contra ataques de microrganismos, sendo um componente importante da parede celular do vegetal. Devido a estrutura química complexa e heterogênea da lignina, ela também é apresentada como uma barreira à degradação química (ABDEL-HAMID et al. 2013).

Figura 1 - Distribuição da celulose, hemicelulose e lignina na biomassa vegetal.

Fonte: Adaptado de Isikgor e Becer, (2015).

2.2 Pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica

Diversos obstáculos estão associados à utilização de materiais lignocelulósicos, incluindo sua enorme recalcitrância devido à complexa arquitetura físico-química da parede celular vegetal, e aos subprodutos gerados durante o pré-tratamento (KUMAR; SHARMA 2017). Devido à complexidade estrutural da biomassa lignocelulósica a qual camadas de

lignina recobrem densamente os polímeros de carboidratos (celulose e hemicelulose), a principal finalidade do pré-tratamento é reduzir as barreiras físicas e químicas inerentes na estrutura da biomassa (Figura 2), de modo a facilitar o acesso químico ou enzimático à celulose e hemicelulose para obtenção de açúcares fermentescíveis (BINOD et al. 2010).

Figura 2 - Esquema ilustrativo da desconstrução de biomassa lignocelulósica após pré-tratamento (celulose representado em verde, hemicelulose em preto, lignina em marrom, proteínas em círculos).

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

De acordo com Sun e Cheng (2002), um método de pré-tratamento além de facilitar o acesso de catalisadores aos polímeros de carboidratos (celulose e hemicelulose) também deve ser capaz de:

- (a) Minimizar a geração de compostos inibitórios ao metabolismo microbiano ou hidrólise enzimática;
- (b) Evitar grandes perdas de açúcares nas frações celulósica e hemicelulósica;
- (c) Permitir a recuperação de lignina e outros compostos para conversão adicional em outros produtos de alto valor;
- (d) Minimizar o uso de energia;
- (e) Utilizar um catalisador de baixo custo e/ou permitir sua reciclagem.

Os métodos de pré-tratamento de biomassa vegetal são baseados no tipo de tratamento envolvido, sendo classificados como biológicos, físicos, químicos e físico-químicos (SUN; CHENG, 2002). Cada método de pré-tratamento causa um efeito específico nas frações celulósica, hemicelulósica e na lignina. Dessa maneira, a escolha do método deve ser baseada no tipo de matéria-prima utilizada e no objetivo do processo (ALVIRA et al. 2010).

O pré-tratamento biológico utiliza microrganismos (geralmente fungos) que são capazes de degradar o material vegetal. Dentre estes, tem sido apontado o grupo dos basidiomicetos como os que degradam a biomassa mais rapidamente. Neste grupo estão os fungos de decomposição parda (ex: *Gloeophyllum trabeum*) e branca (ex: *Ceriporiopsis subvermispora*). O mecanismo de ação dos fungos é baseado no sistema hidrolítico (enzimas hidrolases) que degrada os polissacarídeos e no sistema oxidativo, que degrada lignina. Fungos de decomposição branca degradam principalmente celulose e lignina, enquanto os de decomposição parda degradam principalmente celulose (SÁNCHEZ, 2009; SUN e CHENG, 2002). Fungos de decomposição branca, principalmente *Ceriporiopsis subvermispora*, são os mais estudados e efetivos para a degradação do material vegetal (LIU et al. 2017; AKIN et al. 1995).

Três espécies de basidiomicetos (*Laetiporus sulphureus*, *Pleurotus ostreatus* e *Ceriporiopsis subvermispora*) foram utilizadas para o pré-tratamento biológico do bagaço de cana-de-açúcar e posterior etapa de hidrólise enzimática conforme descrito por Machado e Ferraz, (2017). *L. sulphureus* (basidiomiceto de decomposição parda) promoveu degradação preferencial de glucana e xilana com desprezível remoção de lignina, *P. ostreatus* (basidiomiceto de decomposição branca) degradou todos os componentes do bagaço de cana-de-açúcar de forma similar, com perda de 8,4 % de glucana, 15,7 % de xilana e 11,1 % de lignina, e por fim, *C. subvermispora* (basidiomiceto de decomposição branca) promoveu grande remoção de lignina (48 %) e xilana (47 %), preservando maior parte de glucana após 60 dias de tratamento e aumentando significativamente a digestibilidade da celulose. Após a hidrólise enzimática durante 72 h, foi recuperado cerca de 22 g de glicose em 100 g de bagaço de cana-de-açúcar tratado com *C. subvermispora* durante 60 dias, enquanto em material não tratado, foi recuperado apenas 10 g de glicose em 100 g de bagaço. Dessa maneira, os autores concluíram que o tratamento do bagaço com *C. subvermispora* promoveu resultados positivos sobre o bagaço de cana-de-açúcar.

Taniguchi et al. (2005) promoveram o tratamento biológico de palha de arroz com 4 fungos de decomposição branca (*Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Ceriporiopsis subvermispora* e *Pleurotus ostreatus*). Neste estudo, *P. ostreatus* promoveu a degradação seletiva da lignina sem afetar a fração polissacarídica, e após 60 dias de tratamento, este fungo promoveu 25 % de perda de peso total da palha de arroz e 41 % de degradação da lignina.

No que se refere aos métodos físico-químicos de pré-tratamento, explosão a vapor e sulfito alcalino têm sido amplamente utilizados para promover a desconstrução da biomassa

lignocelulósica. Explosão a vapor é um tratamento que pode ser catalisado ou não por ácido, em que o material é submetido a um vapor pressurizado por determinado período de tempo, seguido de uma rápida depressurização. Dessa maneira, engloba efeitos mecânicos (súbita depressurização que causa separação das fibras) com efeitos químicos (hidrólise de grupos acetil presentes na hemicelulose) (ALVIRA et al. 2010). De acordo com Oliva et al. (2003), as principais desvantagens do pré-tratamento por explosão a vapor são a degradação parcial da hemicelulose e a geração de inibidores (produtos de degradação dos açúcares) que podem afetar as etapas seguintes de hidrólise e fermentação.

Chen et al. (2011) estudaram o pré-tratamento da palha de arroz por explosão a vapor utilizando diferentes concentrações de ácido sulfúrico (1 a 15 % p/p) como catalisador. As condições operacionais ótimas para a primeira etapa de tratamento foi a 165 °C por 2 minutos com 2 % (p/p) de H_2SO_4 e para a segunda etapa (explosão a vapor) foi realizada a 180 °C durante 2 minutos. Estas condições promoveram a combinação mais favorável considerando um processo integrado. Conforme demonstrado neste estudo, este tratamento em geral tende a solubilizar principalmente a fração hemicelulósica, enquanto celulose e lignina permanecem em maior parte na fibra. Os teores de glucana, xilana e lignina obtidos nos resíduos pré-tratados com explosão a vapor catalisada por ácido 3% (p/p) foram de 53,4, 1,2 e 26,3 % respectivamente, a partir de 44,3 % de sólidos recuperados. Adicionalmente, após 72 h de hidrólise enzimática foi convertida 72,5 % de celulose em glicose no tratamento por explosão a vapor catalisada por ácido 3 % (p/p), enquanto no tratamento com explosão a vapor não catalisada por ácido, apenas 34,6 % de celulose foi convertida em glicose, a partir de 80 % de sólidos recuperados. Em relação aos inibidores, as concentrações de furfural e ácido acético foram menores que 1 g/L em concentrações de ácido abaixo de 3 % (p/p). Por outro lado, as concentrações de furfural e ácido acético atingiram 3,5 g/L com concentração de ácido superior a 3 % (p/p). Os autores concluíram que a utilização integrada do tratamento com ácido diluído (3 % p/p) juntamente com explosão a vapor para desconstruir a fibra mostra vantagens atraentes para a utilização da palha de arroz para produção de etanol.

O tratamento com sulfito alcalino juntamente com processos mecânicos tem sido apontado como um método eficiente para a desconstrução da parede celular da biomassa, devido a elevada remoção de lignina (MENDES et al. 2013; MIRANDA, 2016; YANG et al. 2013). O método se baseia no uso de solução de NaOH e Na_2SO_3 e os sólidos são desfibrilados em refinador de discos.

Mendes et al. (2013) estudaram o pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com sulfito alcalino, utilizando NaOH (0,5 % m/v) e Na_2SO_3 (1% m/v) a 120 °C. Após o tempo

de 30 ou 120 minutos, os sólidos foram lavados com água até pH neutro e desfibrilados em refinador de discos. Este tratamento promoveu uma remoção de 53 % de lignina e 30 % de hemicelulose. O bagaço não tratado apresentou 145 % de retenção de água, enquanto o bagaço tratado com sulfito alcalino apresentou 210 % de retenção de água, havendo um aumento da largura das fibras, de 10,4 para 30 μm , respectivamente. Segundo os autores, esta alteração na fibra caracteriza aumento da área superficial, sendo responsável por um aumento da eficiência de hidrólise enzimática da celulose, que atingiu 92 % com o bagaço pré-tratado por 120 minutos, enquanto após 30 minutos de tratamento a eficiência de hidrólise foi de apenas 64 %. Dessa maneira, o tratamento com sulfito alcalino (120 minutos) foi capaz de remover parcialmente a lignina e promover aumento da área superficial da fibra, beneficiando a eficiência de hidrólise enzimática da celulose.

Miranda (2016) também realizou o tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com sulfito alcalino nas mesmas condições descritas por Mendes et al. (2013), com uma solução de sulfito alcalino contendo 0,5 % m/v de NaOH e 1 % m/v de Na_2SO_3 a 121 °C por 120 minutos. Este tratamento promoveu remoção parcial de lignina (45 % m/m) e baixos níveis de remoção de celulose (5,6 %) e hemicelulose (14 %). Através do efeito de diversas enzimas na hidrólise enzimática do bagaço, os maiores valores de conversão da celulose e xilana com o extrato de enzimas Cellubrix suplementado com β -glicosidase foi na carga de 18 FPU/g de biomassa no bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, promovendo rendimento de conversão de cerca de 74 % de celulose e 71 % de xilana após 48 h. Dessa maneira, a autora concluiu que o pré-tratamento com sulfito alcalino não gerou perdas consideráveis das frações polissacarídicas e apresentou maior efeito na remoção de lignina, adicionalmente, a hidrólise enzimática foi favorecida de acordo com a carga e o tipo de enzimas utilizadas.

A maior recuperação da hemicelulose pode se dar pelo tratamento com ácido diluído, sendo o único tratamento capaz de separar eficientemente a fração líquida (hidrolisado hemicelulósico), a qual é rica em açúcares pentoses, especialmente xilose, da fração sólida, constituída de celulose e lignina (JÖNSSON; MARTÍN, 2015). Neste pré-tratamento são utilizados ácidos como catalisador, sendo mais utilizado o H_2SO_4 , a concentrações de 0,5 – 1,6 % (p/p) e temperaturas entre 121-190 °C (HSU et al. 2010; ROBERTO et al. 2003; CASTRO et al. 2016). Utilizar o método de pré-tratamento com ácido diluído tem sido reportado como uma estratégia promissora para estudos que necessitam da liberação de pentoses (fração hemicelulósica) de forma separada da fração celulósica, para geração de produtos (ZAHED et al. 2015; LIN et al. 2012; HSU et al. 2010).

Os efeitos das concentrações do catalisador H_2SO_4 e tempos de reação do tratamento com ácido diluído para a geração de açúcares e formação de subprodutos (furfural, HMF e ácido acético) a partir de palha de arroz foram estudados por Roberto et al. (2003). A metodologia de superfície de resposta foi adotada para otimizar as condições de hidrólise com o objetivo de atingir alta seletividade de xilose. O tratamento foi realizado com temperatura de 121 °C, com concentração de H_2SO_4 de 1 % (p/v) e tempo de reação de 27 minutos, promovendo um rendimento de xilose de 77 %.

O pré-tratamento de biomassa lignocelulósica com ácido diluído é um processo de baixo custo e simples, que melhora eficientemente o acesso das enzimas ao material vegetal. Porém, mesmo em condições brandas, a hidrólise com ácido diluído não é totalmente seletiva e, portanto, vários compostos de degradação são solubilizados no licor hemicelulósico (JONSSON et al. 2013). Dentre estes compostos, encontram-se o ácido acético (gerados a partir do rompimento dos grupos acetil), compostos fenólicos (gerados a partir da degradação da lignina), furfural (gerado a partir da degradação de açúcares da hemicelulose). Estes compostos quando solubilizados no licor hemicelulósico podem inibir o metabolismo microbiano em diferentes graus (SHUAI et al. 2010).

Estudos recentes têm demonstrado que a utilização de um tratamento alcalino brando anterior a etapa de pré-tratamento com ácido diluído promove a desacetilação da xilana, devido a remoção de grupos acetil, tendo como consequência uma menor concentração de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico (CASTRO et al. 2016; MOYA et al. 2016). Este pré-tratamento alcalino brando geralmente utiliza hidróxido de sódio, hidróxido de potássio ou hidróxido de cálcio como catalisador e é realizado a temperaturas mais baixas, entre 50 e 70 °C (KUMAR et al. 2017). Os reagentes alcalinos degradam as ligações ésteres entre lignina e hemicelulose, levando a uma modificação estrutural da lignina e solvatação da hemicelulose (CHENG et al. 2010; KUMAR et al. 2017).

Castro et al. (2016) estudaram o efeito do tratamento alcalino (desacetilação) sobre a modificação estrutural da palha de arroz. Neste estudo, a melhor condição de desacetilação foi a uma temperatura de 70 °C, 80 mg NaOH/g biomassa, promovendo remoção de 42,7 % de lignina, 59,4 % de cinzas, grande remoção de grupos acetil (98,8 %) e baixa perda de glucana (1,2 %) e hemicelulose (7,2 %). Adicionalmente, foi demonstrado que este tratamento promoveu aumento da digestibilidade da celulose, gerando uma maior conversão enzimática de celulose em glicose e aumentando a produção de etanol por sacarificação e fermentação simultânea. Os autores afirmaram que a etapa de desacetilação melhorou a qualidade do hidrolisado hemicelulósico obtido após o tratamento com ácido diluído,

diminuindo a concentração de inibidores. A produção de etanol (20 g/L) a partir deste hidrolisado (70 g/L de xilose inicial) apresentou uma produtividade de 0,3 g/L.h, enquanto a produção de etanol a partir de hidrolisado *in natura* foi de 6 g/L com uma produtividade de apenas 0,06 g/L.h.

Moya et al. (2016) promoveram um tratamento alcalino brando (desacetilação) da poda de oliveira anterior ao tratamento com ácido oxálico diluído, de modo a reduzir grupos acetil e romper parcialmente a estrutura de lignina. A maior remoção de grupos acetil foi obtida nas condições de desacetilação de 0,8 % p/v NaOH, 60 min a 60 °C. Posteriormente, foi realizada a fermentação do hidrolisado hemicelulósico obtido após o tratamento com ácido oxálico. A maior concentração de etanol (6,2 g/dm³) obtida durante a fermentação por *Pichia stipitis* foi obtida pelo tratamento da biomassa nas condições de 150 °C e 75 mM de ácido oxálico, enquanto em hidrolisado não desacetilado, não ocorreu produção de etanol durante a fermentação. Dessa maneira, os autores puderam concluir que a etapa de desacetilação favoreceu a fermentação em hidrolisado hemicelulósico, sendo considerada uma etapa promissora para remoção de ácido acético e rompimento parcial de lignina.

2.3 Disponibilidade e aplicação da palha de arroz em biorrefinaria

A palha de arroz é um dos resíduos lignocelulósicos mais abundantes em todo o mundo (KIM e DALE, 2004; RANJAN et al. 2013). De acordo com Castro et al. (2016), sua constituição é de 35,2 % de celulose, 23,8 % de hemicelulose, 17,5 % de lignina (solúvel e insolúvel) e 23,4 % de outros, como grupos acetil, cinzas e extrativos. Destaca-se que para cada 1 quilograma de arroz colhido, são gerados de 1 a 1,5 quilograma de palha de arroz (BINOD et al. 2010), o que mostra a grande disponibilidade deste resíduo para a geração de energia e produtos de alto valor agregado.

A produção mundial de palha de arroz aumentou de forma constante, de cerca de 200 milhões de toneladas em 1960 para mais de 740 milhões de toneladas em 2014. Dessa maneira, uma vez que o arroz é um alimento básico importante para muitos países, a utilização do resíduo de palha de arroz para geração de biocombustíveis e produtos químicos seria uma abordagem muito econômica (PARK; KIM; SEO, 2014; ABRAHAM et al. 2016).

Nos últimos anos o conceito de biorrefinaria vem sendo cada vez mais explorado, tendo como intuito integrar processos tradicionais e modernos para a transformação de

matérias-primas lignocelulósicas em uma variedade de produtos químicos e energia (ABRAHAM et al. 2016). Além da redução do impacto ambiental, as biorrefinarias irão contribuir positivamente para economia mundial (WERPY; PETERSEN et al. 2004; EIMEKAWY et al. 2013). A rentabilidade de uma biorrefinaria pode ser apoiada pela obtenção de produtos de alto valor agregado juntamente com a produção de biocombustíveis (ZHANG, 2008).

A palha de arroz apresenta enorme aplicação e de acordo com o Comitê Consultivo Técnico de Pesquisa e Desenvolvimento de Biomassa, a biomassa deverá fornecer 5 % de energia aos EUA até 2030, sendo 20 % de combustíveis de transporte e 25 % de produtos químicos a partir de biomassa, mostrando o grande interesse mundial na utilização de biomassa lignocelulósica para geração de biocombustíveis e outros produtos de interesse (PERLACK et al. 2005; MAITY, 2015).

As tradicionais refinarias utilizam matérias-primas não renováveis, enquanto as biorrefinarias utilizam matéria-prima renovável, seguida de etapas como pré-tratamento do material lignocelulósico, hidrólise e fermentação para a geração de etanol e outros produtos de valor agregado, como xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico obtido após o pré-tratamento (Figura 3). A produção econômica de biocombustíveis líquidos a partir de biomassa é um grande desafio. Dessa maneira, a geração de produtos de alto valor agregado pode melhorar os atrativos financeiros. É importante citar que a avaliação cuidadosa da seleção de produtos, disponibilidade de estoque de alimentação, localização e tamanho da planta industrial são fatores determinantes para a economia de uma biorrefinaria (ABRAHAM et al. 2016).

Moralez-Rodriguez et al. (2016) realizaram uma análise de viabilidade da produção simultânea de bioetanol e xilitol a partir de materiais lignocelulósicos e demonstraram que a produção de xilitol a partir dos fluxos de resíduos do processo de produção de bioetanol representa uma oportunidade para avaliar uma plataforma de biorrefinaria, devido ao alto valor agregado do xilitol.

No que se refere a palha de arroz, estudos mostram que é uma matéria-prima em potencial para a geração de diversos produtos, como etanol, biogás, ácidos hidroxinâmicos e xilitol. Por exemplo, Ko et al. (2009) estudaram a produção de etanol por *S. cerevisiae* a partir de palha de arroz pré-tratada com solução de amônia. A melhor condição de pré-tratamento obtida foi com uma concentração de 21 % (p/p) de solução de amônia a 69 °C durante 10 h. Nestas condições, a maior parte de glucanas e xilanas do material foi preservada e parte da lignina foi removida, aumentando o acesso de enzimas às frações

polissacarídicas. Após a hidrólise enzimática, 26 g de glicose foi obtida a partir de 100 g de palha de arroz pré-tratada, o que correspondeu a um rendimento de 71,1 % do máximo teórico. Adicionalmente, sacarificação e fermentação simultânea (SSF) foi realizada utilizando *S. cerevisiae*, obtendo uma concentração de etanol de 12,7 g/L e um rendimento de 83,1 % do máximo teórico de produção de etanol.

Figura 3 - O uso de biomassa lignocelulósica em um conceito de biorrefinaria ao invés do uso de petróleo para a geração de energia e produtos químicos.

Fonte: Adaptado de ElMekawy et al. (2013).

Além do etanol, a palha de arroz foi descrita como matéria-prima para a produção de biogás (MUSTAFA et al. 2017). Neste estudo foi avaliado o pré-tratamento físico da palha de arroz (moagem) seguida de tratamento biológico (incubação com fungo *Pleurotus ostreatus*), gerando uma remoção de 30,4 % da lignina. Posteriormente foi realizada a digestão anaeróbica em estado sólido (37 °C), gerando um aumento de 165 % no rendimento de metano (biogás) em comparação com a palha de arroz não tratada.

Li et al. (2015) analisaram a recuperação de ácidos hidroxinâmicos (antioxidantes) de alto valor agregado, a partir da palha de arroz pré-tratada com NaOH (0,5 M) durante 2 h a 120 °C. O pré-tratamento alcalino foi capaz de causar a degradação da lignina, e liberação de ácidos hidroxinâmicos (ácidos ferúlico e p-cumárico) no hidrolisado, que foram separados dos aldeídos por nanofiltração, onde retenções de ácidos hidroxinâmicos elevados (92-94 %) foram obtidas.

A produção de xitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz foi avaliada por Silva e Roberto (2001a) usando células de *Candida guilliermondii* previamente adaptadas em hidrolisado. A maior produção de xitol obtida foi de 50 g/L a partir de 90 g/L de xilose inicial, gerando um fator de conversão de xilose em xitol de 0,67 g/g e uma produtividade de 0,41 g/L.h. As células não adaptadas produziram apenas 17 g/L de xitol, com uma produtividade de 0,14 g/L.h e um fator de conversão de 0,35 g/g. Estes resultados demonstraram que a adaptação das células em hidrolisado promoveu resultados muito superiores quando comparado às células não adaptadas, sendo uma alternativa aos métodos de detoxificação utilizados para remoção de compostos inibitórios.

A produção de xitol por células de *Candida mogi* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz foi avaliada por Mayerhoff et al. (1998). A influência do nível de aeração, pH inicial, concentração inicial de células e tempo de fermentação foram avaliados durante a produção deste poliál. Neste estudo, foi utilizado um delineamento experimental multifatorial para avaliar a influência de todos estes fatores. De acordo com a análise estatística, foi concluído que a aeração e o pH inicial afetaram significativamente o consumo de xilose, fator de conversão de xilose em xitol e produtividade volumétrica em xitol. Com base nesta metodologia, o valor máximo de fator de conversão de xilose em xitol foi de 0,71 g/g (com pH inicial de 6,2 e 60 mL de meio em frasco de 125 mL) e a produtividade volumétrica em xitol de 0,46 g/L.h (com pH inicial de 6,4 e 20 mL de meio em frasco de 125 mL).

Um processo de biorrefinaria robusto e econômico para a co-produção contínua de etanol e xitol a partir de palha de arroz em um biorreator de tanque agitado acoplado a uma unidade de microfiltração foi desenvolvido por Zahed et al. (2015). Para a produção de xitol, foi utilizada *Candida tropicalis* NCIM3119, e para a produção de etanol foi utilizado *Saccharomyces cerevisiae*. Ambas as cepas foram adicionadas em 3 L de uma mistura contendo hidrolisado hemicelulósico concentrado e detoxificado (75 g/L de glicose e 40 g/L de xilose), extrato de levedura (10 g/L) e sulfato de amônio (5 g/L). Esta mistura foi transferida para o biorreator, e após 150 h de co-cultura contínua (30 °C, pH 5,0, 300 rpm), uma produção de 31 g/L de xitol foi obtida ($Y_{P/S} = 0,78$ g/g). Adicionalmente, foi produzido 55 g/L de etanol ($Y_{P/S} = 0,70$ g/g). No sistema em batelada única, as maiores produções de xitol e etanol foram de 26,5 g/L (0,58 g/g) e 31,5 g/L (0,42 g/g), respectivamente. Dessa maneira, os autores concluíram que a co-cultura contínua é capaz de promover maiores produções de etanol e xitol quando comparado aos cultivos em batelada única, e é uma

estratégia que reduziria os custos gerais de produção, devido a produção simultânea de etanol e xilitol.

De acordo com o Departamento de Energia dos Estados Unidos (US-DOE), o xilitol é considerado um produto de alto valor agregado em que sua produção poderia ser integrada com a produção de biocombustíveis em determinada biorrefinaria. Especificamente, o xilitol foi recentemente considerado um dos 12 principais produtos químicos de valor agregado produzidos a partir de biomassa (WERPY; PETERSON, 2004).

2.4 Xilitol

2.4.1 Aspectos gerais

O xilitol é um açúcar-álcool ou poliól de cinco carbonos (Figura 4) que tem sido utilizado como aditivo alimentar e agente adoçante desde a década de 1960 (ZACHARIS, 2012). É um constituinte natural de diversos frutos e vegetais (MAKINEN; SODERLING, 1980; WASHUETT et al. 1973), e embora esteja em pequenas quantidades, o xilitol sempre esteve presente na dieta do homem moderno.

Figura 4 - Estrutura química do xilitol.

Fonte: Zacharis, (2012).

O xilitol é um intermediário no metabolismo de carboidratos no fígado de mamíferos, sendo que o corpo humano adulto é capaz de produzir cerca de 5-15 g por dia de xilitol. (TOUSTER, 1974; YLIKAHRI, 1979; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998). Este poliól foi descoberto e relatado primeiramente em 1891 por Emil Fisher, um químico alemão que recebeu o prêmio Nobel (FISCHER; STAHEL, 1891). Com o desenvolvimento da

produção industrial de xilitol, pesquisadores da Faculdade de Odontologia de Turku, na Finlândia, começaram a investigar o uso de xilitol como substituinte do açúcar em alimentos para a redução de cáries (SCHEININ et al. 1975). Devido aos resultados positivos desta pesquisa, houve um maior interesse sobre os benefícios do xilitol na redução de cáries dentais, gerando diversas pesquisas em todo o mundo (ISOGANGAS et al. 1993; LYNCH e MILGROM, 2003; LY et al. 2006). Estas pesquisas mostraram que de fato o xilitol apresenta características que beneficiam a saúde bucal. Adicionalmente, este açúcar-álcool foi considerado um adoçante ideal para ser utilizado na dieta de pacientes com diabetes (BASSLER, 1978; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

O xilitol é produzido normalmente a partir de xilana, que é um polímero de xilose presente na fração hemicelulósica em uma grande variedade de biomassas vegetais (AMINOFF et al. 1978). Para a produção industrial, as matérias-primas mais utilizadas são materiais lignocelulósicos sob a forma de aparas de madeira e milho, os quais possuem normalmente 20-35 % de xilana. A produção de xilitol é baseada na via química ou biotecnológica, as quais são baseadas na hidrólise de xilana em xilose (AMINOFF et al. 1978; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998; ZACHARIS, 2012).

2.4.2 Propriedades organolépticas

2.4.2.1 Doçura

A doçura é um fator importante da determinação do apelo de qualquer produto que não contenha açúcar, sendo considerado um ponto determinante na percepção do sabor e da qualidade do produto pelos consumidores. O xilitol é considerado o mais doce entre os polióis (Figura 5), sendo o único que exibe uma intensidade de doçura equivalente à sacarose. Além disso, o xilitol apresenta grande semelhança com a sacarose em relação a aparência visual (LEE, 1977; MUNTUN; BIRCH, 1985; GODSWILL, 2017).

Figura 5 - Doçura de adoçantes polióis.

Fonte: Adaptado de Zacharis, (2012).

2.4.3 Propriedades físicas e químicas

O xilitol apresenta diversas características, como um calor de solução muito negativo, alta solubilidade, estabilidade (química), baixa viscosidade e efeito conservante em alimentos. Estas características serão detalhadas nos próximos tópicos.

2.4.3.1 Calor de solução e solubilidade

O xilitol gera um efeito de resfriamento agradável à medida que se dissolve na boca. Isto ocorre devido ao calor de solução ser muito negativo (-160 kJ/kg), fazendo com que ele absorva a energia do seu ambiente enquanto se dissolve, gerando uma queda da temperatura ao seu redor. De acordo com a Figura 6 é possível observar que o xilitol apresenta um calor de solução muito mais negativo quando comparado à sacarose. Dessa maneira, os produtos feitos com xilitol, tais como balas e gomas de mascar, promovem a percepção do resfriamento após o seu consumo, realçando o efeito refrescante de menta, o que tem sido apontado como vantagem sobre o açúcar e outros edulcorantes polióis no que diz respeito ao sabor (PEPPER; OLINGER, 1988; ZACHARIS, 2012).

Figura 6 - Calor de solução de polióis em comparação com a sacarose.

Fonte: Adaptado de Zacharis, (2012).

Em edulcorantes com um calor muito negativo de solução, a solubilidade exerce uma grande influência sobre a percepção da doçura e resfriamento. O xilitol é um poliól de cinco carbonos que apresenta cinco grupos hidroxila, sendo facilmente solúvel em soluções aquosas. A solubilidade do xilitol é semelhante à sacarose em temperatura ambiente e superior a temperaturas elevadas, conforme demonstrado na Figura 7 (ZACHARIS, 2012).

Figura 7 - Solubilidade de xilitol e sacarose.

Fonte: Adaptado Zacharis, (2012).

2.4.3.2 Estabilidade e Viscosidade

O xilitol, assim como outros edulcorantes polióis, não contém grupos redutores em sua estrutura, e, portanto, não participam das reações com aminoácidos (reações de Maillard), sendo considerado um composto não reativo. Dessa maneira, o xilitol não sofre reações de escurecimento não enzimático, que provocam diminuição do valor nutricional de proteínas. O ponto de ebulição do xilitol é de 216 °C e a caramelização do xilitol só ocorrerá se for aquecida a temperaturas próximas ao ponto de ebulição durante vários minutos. Adicionalmente, a estabilidade do xilitol não é afetada pelo pH, podendo ser utilizado em uma ampla gama de pHs (AMINOFF et al. 1978; ZACHARIS, 2012).

A viscosidade de um edulcorante pode ter uma grande influência sobre fatores relacionados à fabricação, textura e sensação na boca de determinado produto (alimentício ou não). O xilitol, por ser um açúcar álcool monossacarídeo, apresenta uma menor viscosidade em solução em qualquer temperatura ou concentração quando comparado à sacarose. Sendo assim, pode ser necessário compensar esta menor viscosidade através da redução do teor de umidade e/ou aumentando a quantidade de componentes de alta massa molar ou agentes gelificantes. Por outro lado, a baixa viscosidade do xilitol pode ajudar a reduzir esta propriedade em preparações que contenham componentes de alta massa molar (ZACHARIS, 2012).

2.4.3.4 Atividade de água

A atividade de água de um produto é a relação entre a pressão de vapor do produto e a pressão de vapor da água pura nas mesmas condições. A atividade de água afeta a atividade enzimática, reações com aminoácidos (reações de Maillard), oxidação de lipídeos, atividade microbiana e a textura, sendo que estes fatores juntos influenciam na conservação do produto alimentício. O xilitol apresenta uma baixa massa molar, o que faz com que ele exerça uma pressão osmótica mais elevada, gerando uma atividade de água inferior às soluções equivalentes de sacarose. Isso significa que o xilitol exerce um maior efeito conservante em solução do que a sacarose, tornando este poliól um adoçante particularmente útil para aumentar sólidos e, portanto, a estabilidade microbiana de líquidos (ZACHARIS, 2012).

2.4.4 Propriedades fisiológicas

2.4.4.1 Tolerância

O xilitol, assim como todos os polióis e carboidratos que são lentamente metabolizados quando consumidos em grandes doses, pode causar determinados efeitos colaterais gastrointestinais. A tolerância ao xilitol está relacionada com a sua absorção e digestibilidade limitadas no intestino delgado, dando origem a sintomas como flatulência, inchaço, e em casos mais severos, diarreia. Entretanto, estes sintomas são transitórios e facilmente reversíveis quando o consumo é suspenso. A sensibilidade individual, modo de ingestão, dieta diária e adaptação prévia ao xilitol são fatores que influenciam na tolerância gastrointestinal para o xilitol. O processo denominado adaptação, representa o aumento da tolerância após exposição repetida ao xilitol, sendo este processo observado com a maioria dos polióis, mostrando que após um determinado período adequado de consumo, as doses de polióis podem ser aumentadas sem risco de efeitos colaterais indesejáveis (ZACHARIS, 2012).

2.4.4.2 Valor calórico

O xilitol é transportado pelo trato gastrointestinal através de difusão passiva, em que apenas 25-50 % de xilitol ingerido é realmente absorvida. A porção de xilitol absorvida estará energeticamente disponível para o hospedeiro em aproximadamente 4 kcal/g, enquanto a porção não absorvida (50-75 %) é quase completamente fermentada pelos microrganismos do intestino, gerando a formação de ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs), como acetato e butirato (SALYERS; LEEDLE, 1983; CUMMINGS, 1981).

2.4.4.3 Benefícios para a saúde

2.4.4.3.1 Saúde bucal

Normalmente, bactérias do gênero *Streptococcus* estão presentes na cavidade bucal de humanos, onde o xilitol é considerado uma fonte de carbono para estas bactérias. Estas produzem exopolissacarídeos adesivos, componentes que formam a matriz da placa dentária. Em bactérias, a primeira reação do metabolismo de xilitol é a geração da molécula xilitol-5-fosfato, em que as bactérias não conseguem metabolizar, causando um efeito inibitório no metabolismo intracelular. Em alguns casos, esse mecanismo pode resultar na formação de vacúolos intracelulares, membranas celulares degradadas e até resultar em autólise (SCHEIE; FIJERSKOV, 1998). Sendo assim, o consumo de xilitol pode reduzir a formação da placa dentária, fazendo com que práticas de mastigação e higiene bucal sejam facilitadas.

2.4.4.3.2 Baixa resposta glicêmica

Diabetes mellitus tipo 2 é uma doença caracterizada por apresentar diversos distúrbios metabólicos resultantes de defeitos na ação e/ou secreção da insulina. Estes distúrbios metabólicos apresentam em comum a hiperglicemia (KAHN; COOPER; PRATO, 2014).

Resposta glicêmica (RGR) está relacionada ao efeito dos carboidratos disponíveis e não disponíveis no produto, enquanto índice glicêmico está relacionado apenas ao carboidrato disponível no produto. Carboidratos de baixa resposta glicêmica relativa e baixo índice glicêmico são quebrados muito lentamente após a ingestão, liberando glicose gradualmente na corrente sanguínea. Por outro lado, os carboidratos com alta RGR e alto índice glicêmico são rapidamente discriminados, causando um aumento imediato da glicemia e concomitante resposta de insulina (FOSTER-POWELL et al. 2002; ZACHARIS, 2012).

O xilitol apresenta uma resposta glicêmica relativa considerada muito baixa (RGR = 8) quando comparada à glicose (RGR = 100). Isto faz com que o xilitol seja ainda mais adequado para ser utilizado como adoçante por indivíduos com diabetes. Após a ingestão de

xilitol, as respostas de glicose no sangue e insulina sérica são significativamente menores do que as que acompanham a ingestão de glicose ou sacarose (TONG et al. 1987; NATAH et al. 1997). Isto mostra que a conversão de xilitol em glicose, que ocorre no fígado, acontece de forma lenta, não afetando a concentração de glicose no sangue (ZACHARIS, 2012).

2.4.4.3.3 Efeito Prebiótico

Prebióticos são ingredientes alimentícios não digeríveis que afetam de forma benéfica o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de espécies bacterianas residentes no cólon, influenciando a saúde e bem-estar do hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995). O xilitol é parcialmente absorvido no intestino superior, sendo que apenas cerca de 50 % da dose ingerida seguirá para o intestino inferior, onde estará disponível para a fermentação microbiana (LIVESEY, 1992). De acordo com Makelainen et al. (2007), o xilitol é capaz de influenciar a microflora intestinal em seres humanos, estimulando o crescimento de bactérias benéficas, as quais através da fermentação produzem ácidos graxos de cadeia curta (SCFAs) e reduzem o pH. Younes et al. (1996) afirmaram que o pH intestinal reduzido pode ajudar na absorção de íons cálcio e diminuição na absorção de amônia nociva no cólon. Dessa maneira, o xilitol promove melhorias na função epitelial e gera diminuição no risco de doenças no cólon oferecendo um efeito prebiótico.

2.4.4.3.4 Efeito de saciedade

Shafer et al. (1987) estudaram os efeitos de saciedade do consumo de soluções de xilitol anterior às refeições. Neste estudo, após a ingestão de 25 g de xilitol em humanos, foi possível observar que o esvaziamento gástrico foi significativamente prolongado (de 58 min do controle para 91 min após o uso de xilitol). A ingestão de alimentos após o consumo de 25 g de xilitol em água levou a uma ingestão calórica reduzida de 25 % (de 920 kcal do controle para 690 kcal após o uso de xilitol). Dessa maneira, o xilitol é capaz de promover saciedade, podendo estar presente em alimentos menos calóricos e com baixos índices glicêmicos (ZACHARIS, 2012).

2.4.4.3.5 Prevenção da otite média aguda e infecções respiratórias

O xilitol tem sido apontado como um composto importante na prevenção da otite média aguda (OMA), que constitui uma inflamação da membrana timpânica, causada por uma infecção bacteriana e gerando acumulação de líquido por trás do tímpano. Sintomas de OMA são frequentemente associados ou precedidos de nariz entupido ou tosse. Kontiokari et al. (1995) estudaram *in vitro* o efeito de xilitol sobre bactérias otopatogênicas, em que 5 % de xilitol adicionado ao meio promoveu uma redução acentuada (72 %) no crescimento de bactérias otopatogênicas, principalmente *Streptococcus pneumoniae*, após 2 h de incubação. O padrão de inibição do crescimento foi semelhante ao efeito anticariogênico observado em *S. mutans*.

Pacientes com infecções respiratórias geralmente apresentam congestionamento nasal, dificuldade em respirar e problemas pulmonares. Dessa maneira, é recomendado manter as vias aéreas limpas através de irrigação nasal. Zabner et al. (2000) estudaram o efeito da aplicação de xilitol (5 % em água) e solução salina (0,9 % NaCl) na região nasal em adultos humanos por 4 dias. Neste estudo o uso de xilitol promoveu uma redução da carga bacteriana de 82,2 % maior do que o uso de solução salina. Adicionalmente, Tapiainen et al. (2001) demonstraram que o xilitol (5 % em água) foi capaz de causar inibição do crescimento de bactérias patogênicas (*Streptococcus pneumoniae*) causadoras da sinusite e de infecções respiratórias.

2.4.4.3.6 Osteoporose

Osteoporose é uma doença caracterizada pela fragilidade e mudanças na microarquitetura óssea, como a redução da massa e densidade do tecido ósseo (KANIS et al. 1994). Mattila et al. (1999) estudaram os efeitos da suplementação de 5, 10 e 20 % de xilitol sobre aspectos como propriedades biomecânicas e arquitetura histológica em ossos longos de ratos. Neste estudo foi observado um aumento do volume ósseo conforme aumentava o conteúdo de xilitol, assim como a melhora no módulo de elasticidade ao cisalhamento no fêmur, melhorando assim propriedades biomecânicas. Adicionalmente, Mattila et al. (1998) estudaram o efeito da suplementação de xilitol sobre propriedades biomecânicas em ossos de ratos fêmeas que tiveram os ovários removidos. Neste estudo foi concluído que a

suplementação de 10 % de xilitol restringiu a redução da densidade óssea causada pela remoção dos ovários em ratos. Ainda não existem estudos realizados em humanos.

2.4.5 Aplicações

Diante das diversas propriedades do xilitol, este composto apresenta-se como um edulcorante ou aditivo de extrema versatilidade, podendo ter diversas aplicações industriais, como os setores alimentícios, farmacêuticos, cosméticos e em produtos de higiene pessoal (Figura 7). Na indústria de alimentos o xilitol pode ser utilizado como adoçante ou conservante em gomas de mascar, chocolates, produtos lácteos e sobremesas congeladas. Na indústria farmacêutica, o xilitol tem aplicação em spray nasal e como adoçante ou excipiente na formulação de xaropes, tônicos e vitaminas. Adicionalmente também é utilizado na formulação de pastas de dente e como agente umectante (previne a perda de umidade) e hidratante (RAO et al. 2016; RAFQUL; SAKINAH et al. 2013).

Figura 8 - Aplicação de xilitol em diversos setores.

Fonte: Própria autoria.

2.4.6 Segurança e status regulatórios

O xilitol é classificado pelo principal órgão internacional responsável por administrar alimentos e medicamentos (Food and Drug Administration - FDA) como uma substância

atóxica, sendo um aditivo do tipo GRAS (Generally Recognized as Safe) com sua incorporação em alimentos legalmente permitida. De acordo com a literatura, o xilitol é uma substância bem tolerada, porém, uma ingestão de doses maiores que 60 g por dia pode causar efeito laxativo (CULBERT et al. 1986). Entretanto, a Organização Mundial da Saúde (OMS) não estabeleceu um limite para a ingestão diária deste poliól.

Atualmente, o xilitol é aprovado para uso em mais de 50 países nos setores alimentícios, farmacêuticos, cosméticos e produtos de higiene bucal, sendo utilizado com segurança na indústria de alimentos a mais de 30 anos (ZACHARIS, 2012; RARQUL; SAKINAH, 2013).

2.4.7 Formas de produção

2.4.7.1 Via química

A produção convencional em larga escala de xilitol é baseada na via química (Figura 9). Nesta via, o xilitol é obtido pela hidrogenação da xilose derivada principalmente de hidrolisado hemicelulósico de madeira na presença de um catalisador de níquel (Raney) em alta pressão de hidrogênio (> 20 bar) a temperatura elevada (> 100 °C). Nesta reação o grupo aldeído do carbono 1 da xilose é convertido a um grupo álcool formando o xilitol.

A síntese química de xilitol inicia-se com a extração de xilose da hemicelulose por hidrólise ácida do material vegetal, seguido pela utilização de carvão ativado para remoção de cor e posterior purificação para se obter um hidrolisado rico em xilose que passará pela etapa de hidrogenação da xilose para geração de xilitol. A solução de xilitol gerada necessita passar por uma etapa de purificação adicional por cromatografia de troca iônica, para remoção de sais e produtos de degradação. Finalmente, ocorre a concentração da solução e posterior cristalização para obtenção do xilitol puro. Este processo químico é caracterizado pelo baixo rendimento (50-60 %), alto aporte energético e não ‘amigável ambientalmente’ (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998; PARK et al. 2014).

2.4.7.2 Via Biotecnológica

Devido a questões ambientais, a via biotecnológica de produção de xilitol está sendo cada vez mais explorada nos últimos anos (Figura 9). Esta via se baseia no uso de microrganismos (bactérias, fungos e leveduras) ou enzimas destes microrganismos, sendo empregado a xilose pura comercial ou hidrolisado hemicelulósico rico em xilose como fonte de carbono (RAFQUL; SAKINAH, 2013; DASGUPTA et al. 2017). No que se refere ao uso de microrganismos, os processos podem ser fermentativos (CORTEZ; ROBERTO, 2006; SIRISANSANYAKUL et al. 2013) enzimáticos (NIDETZKY, 1996; BRANCO; SILVA, 2010), ou por biotransformação (CORTEZ; MUSSATTO; ROBERTO, 2016; SHIN et al. 2016; RAKICKA et al. 2016).

Figura 9 - Principais características para a produção de xilitol por rota química e biotecnológica.

Fonte: Adaptado de Dasgupta et al. (2017).

2.4.7.2.1 Processo fermentativo

O termo fermentação é utilizado para descrever um processo biológico que utiliza vias do metabolismo de células microbianas (ex: leveduras, bactérias e fungos filamentosos) para converter determinada fonte de carbono em molécula orgânica (PAULOVÁ;

PATÁKOVÁ; BRANYIK, 2013). A produção de xilitol por via fermentativa pode ser realizada por estes três tipos de microrganismo, sendo as leveduras as mais estudadas, devido as melhores produtividades e fatores de conversão de xilose em xilitol, enquanto os resultados obtidos por fungos filamentosos (KANG et al. 2016) e bactérias (RANGASWAMY e AGBLEVOR, 2002) são bastante inferiores, sendo menos estudados.

Os estudos relacionados com a produção de xilitol a partir de fungos filamentosos são ainda escassos e caracterizados por baixas conversões. Kang et al. (2016) avaliaram a produção de xilitol a partir de fungo *Aspergillus niger* PY11 em meio sintético contendo 30 g/L de xilose, a 30 °C e 200 rpm. A produção de xilitol obtida neste estudo foi de apenas 1,14 g/L, gerando um fator de conversão de xilose em xilitol de 0,10 g/g após 96 h de fermentação em batelada, obtendo um consumo de xilose inicial de 44,94 %.

No que se refere a produção de xilitol por leveduras, um dos primeiros estudos visando a seleção destes microrganismos foi descrito por Barbosa et al. (1988). Neste trabalho, quarenta e quatro cepas de leveduras de cinco gêneros (*Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia* e *Pachysolen*) foram avaliadas quanto a capacidade de converter xilose em xilitol, sendo observado que as espécies de *Candida guilliermondii* e *Candida tropicalis* foram as melhores produtoras de xilitol. Especificamente, a levedura *C. guilliermondii* FTI20037 em meio sintético contendo 104 g/L de xilose inicial e 5 g/L de uréia, gerou 77,2 g/L de xilitol ($Q_P = 0,95$ g/L.h e $Y_{P/S} = 0,74$ g/g) a 30 °C em frascos erlenmeyer de 250 mL. Neste estudo os autores também analisaram o efeito de fontes de nitrogênio sobre a conversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, mostrando que a maior produção deste poliól ocorreu com o uso combinado de ureia (5 g/L) e extrato de levedura (1 g/L).

As espécies de *Candida* podem absorver xilose através de 2 tipos de transportadores: um transportador de difusão facilitada e um transportador de próton do tipo simporte. Com a xilose no interior da célula, xilose é reduzida em xilitol através da enzima xilose redutase (XR) dependente de NADPH. O xilitol pode ser excretado da célula ou oxidado à xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH) com a participação de NAD^+ (Figura 10). A xilulose é então fosforilada para xilulose-5-fosfato através da xilulose quinase (XYLB) com a utilização de ATP, e finalmente a xilulose-5-fosfato é metabolizada através da via das pentoses fosfato (BARBOSA et al. 1988; JEFFRIES, 1983; WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998).

Xilose e arabinose (pentoses) são metabolizados pela via das pentoses fosfato (PPP), para a geração de gliceraldeído-3-fosfato. Esta via consiste de uma fase oxidativa (converte

hexoses em pentoses) e uma fase não oxidativa (pentoses são convertidas em hexoses e trioses). A via das pentoses-fosfato também produz ribose-5-fosfato utilizada para a síntese de ácidos nucleicos e histidina, e de eritrose-4-fosfato necessário para a síntese de aminoácidos aromáticos. O gliceraldeído-3-fosfato e a frutose-6-fosfato são produtos da fase não oxidativa da via das pentoses fosfato e são considerados pontos de integração, pois ambos podem ser convertidos para piruvato na via Embden-Meyerhof-Parnas. O piruvato pode ser descarboxilado e reduzido a etanol ou pode entrar no ciclo do ácido tricarboxílico (ARORA; BEHERA; KUMAR, 2015; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

Figura 10 - Metabolismo de xilose, glicose e arabinose em microrganismos.

Fonte: Adaptado de Arora, Behera e Kumar (2015).

Nota: **ARAA**: L-arabinose isomerase

XR: xilose redutase

XDH: xilitol desidrogenase

XI: xilose isomerase

XYLB: xilulose quinase

TKL: transcetolase

TAL: transaldolase

GK: glucoquinase

PDC: piruvato desidrogenase

ARAD: L-ribulose-5-fosfato 4-epimerase.

A partir da seleção de *Candida guilliermondii* por Barbosa et al. (1988), muitos outros trabalhos foram realizados visando o estudo de fatores que afetam a produção de xilitol por leveduras, incluindo o efeito da concentração inicial de xilose, taxa de agitação/suprimento de oxigênio, temperatura, pH e outros.

Sirisansanyakul et al. (2013) analisaram a influência da concentração inicial de xilose, composição do meio e taxa de agitação na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida magnoliae* TISTR 5663. Neste estudo, após três bateladas alimentadas repetidas (750 h), com 5 alimentações de xilose na concentração de 60 g/L em cada batelada e uma taxa de agitação de 300 rpm, a produção final de xilitol atingiu 280 g/L, $Y_{P/S} = 0,72$ g/g.

O efeito da concentração de tampão fosfato na produção de xilitol por células de *Candida guilliermondii* em meio sintético (85 g/L de xilose inicial) foi estudado por Cortez e Roberto (2006). Os autores constataram que o meio tamponado (600mmol/L) favoreceu a produção de xilitol, obtendo um fator de conversão de xilose em xilitol de 0,75 g/g e uma produtividade volumétrica de 0,66 g/L.h, enquanto em meio não tamponado, o fator de conversão foi de 0,52 g/g e a produtividade volumétrica decaiu para 0,44 g/L.h. Os autores concluíram que o meio tamponado favoreceu os parâmetros relacionados à produção de xilitol devido ao efeito osmótico e ao controle do pH.

Para contornar os efeitos de três inibidores potenciais (ácido acético, siringaldeído e ácido ferúlico) na bioconversão de xilose em xilitol por células de *Candida guilliermondii*, Pereira, Mussatto e Roberto (2011) também utilizaram a estratégia de tamponar o meio semi-definido com KH_2PO_4 . Neste estudo, os autores concluíram que ácido acético, siringaldeído e ácido ferúlico afetaram o crescimento celular na bioconversão de xilose em xilitol. No entanto, para ambos os meios (tamponado e não tamponado) o impacto dos inibidores foi menor em meio tamponado com KH_2PO_4 , favorecendo a produção de biomassa celular, fator de conversão e produtividade volumétrica na bioconversão de xilose para xilitol, podendo ser um artifício para superar a inibição causada por ácido acético, siringaldeído ou ácido ferúlico em hidrolisados hemicelulósicos.

Alguns estudos vêm explorando a modificação genética em microrganismos para a produção de xilitol através de processo fermentativo. Por exemplo, a partir da manipulação de DNA recombinante em uma estirpe de *E. coli*, os genes que codificam as enzimas xilose redutase, β -glucosidase, xilosidase e xilanase foram expressos em *Saccharomyces cerevisiae*, gerando uma produção de 5,8 g/L de xilitol, com 79,5 % do rendimento teórico de xilose a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz na presença de inibidores (GUIRIMAND et al. 2015).

A produção contínua de xilitol a partir de meio sintético por células de *Candida guilliermondii* em biorreator de tanque agitado foi estudada por Faria et al. (2002). As fermentações foram realizadas contendo o mesmo meio utilizado para preparo do inóculo (3,0 g/L de extrato de levedura; 5,0 g/L de peptona) com as concentrações dos nutrientes aumentadas proporcionalmente a concentração inicial de xilose, onde as células foram recicladas por membranas planas de ultrafiltração. O procedimento para fermentação contínua consistiu de um cultivo inicial em batelada com concentração inicial de xilose de 80 g/L (que foi mantido até a concentração de xilose atingir 2,0 g/L). O sistema foi continuamente alimentado com meio contendo uma concentração de 50 g/L de xilose a 30 °C e pH 6,0 e uma taxa de diluição de 0,03 h⁻¹. Os melhores resultados obtidos neste sistema contínuo de produção de xilitol num biorreator foi uma produtividade volumétrica em xilitol de 1,14 g/L.h e um fator de conversão de xilose em xilitol de 0,79 g/g após 103 h de fermentação (onde o estado estacionário foi atingido após 25 h e mantido por 78 h).

2.4.7.2.2 Processo enzimático

A produção de xilitol a partir de xilose através da tecnologia de enzimas é uma abordagem alternativa às tradicionais formas de produção de xilitol. Entretanto, por ser uma tecnologia custosa, poucos estudos relacionados a produção de xilitol utilizando processo enzimático tem sido reportado (RAFQUIL; SAKINAH, 2012). Nidetzky et al. (1996) otimizaram a produção de xilitol a partir de xilose pela enzima xilose redutase (XR) de *Candida tenuis* juntamente com glicose desidrogenase de *Bacillus cereus* para regeneração de NADH em um reator enzimático. Neste sistema, a conversão de xilose em xilitol apresentou um rendimento de 96 %, com uma produtividade volumétrica de 3,33 g/L.h, a partir de uma concentração inicial de xilose de 300 g/L. Através deste estudo, os autores afirmaram que a produção de xilitol a partir da enzima xilose redutase purificada gera melhores produtividades quando comparada com o processo fermentativo, uma vez que as reações paralelas e limitações de transferência de massa que ocorrem na fermentação podem ser evitadas com o processo enzimático.

A produção de xilose catalisada por enzimas a partir de palha de trigo e posterior bioconversão de xilose em xilitol por uma solução bruta contendo xilose redutase (XR) de *Candida guilliermondii* foi estudada por Walsh et al. (2018). As células foram cultivadas em

meio contendo 5 g/L de extrato de levedura, 5 g/L de peptona, 20 g/L de xilose, 3 g/L K_2HPO_4 e 1 g/L de $MgSO_4$, a 30 °C, 150 rpm durante 24 h. Após etapas de rompimento e centrifugação, o sobrenadante foi utilizado como extrato bruto de xilose redutase. A produção enzimática de xilitol foi realizada pela incubação deste extrato bruto em hidrolisado enzimático de palha de trigo (23,9 mg de xilose) em frascos Erlenmeyer contendo tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) e NADPH (10 mM). As condições ótimas para a síntese de xilitol usando o extrato bruto de xilose redutase foi a uma temperatura de 30 °C, pH 7,0, 8 horas de reação com 7,92 U de xilose redutase. Nestas condições, foi obtido 21 mg de xilitol, o que corresponde a um rendimento de 86,6 %.

A otimização da produção enzimática de xilitol foi estudada por Branco; Santos; Silva (2011a). Neste estudo foi aplicada uma análise estatística juntamente com a metodologia de superfície de resposta para determinar um modelo capaz de explicar a produção de xilitol em função da concentração de xilose inicial e NADPH. Todos os ensaios foram realizados com temperatura de 25 °C e pH 7,0. Inicialmente foi realizada a preparação do extrato pré-purificado da enzima xilose redutase, que ocorreu em 3 etapas: o cultivo de *Candida guilliermondii*, ruptura das células e pré-purificação por micelas reversas. Inicialmente, foi demonstrado pelas resoluções matemáticas, que a maior produtividade volumétrica em xilitol ($Q_P = 1,68$ g/L.h) seria obtida com uma concentração inicial de xilose de 0,34 M e 1,80 mM de NADPH. No entanto, os autores afirmaram que um dos maiores contribuintes para o custo total do processo é o custo da coenzima NADPH. Dessa maneira, para a economia do processo, os autores consideraram uma região ampla que compreendia valores de produtividade de 1,60 g/L.h até 1,68 g/L.h. Com o intuito de reduzir a concentração da coenzima NADPH, os autores selecionaram a produtividade de 1,60 g/L.h para a etapa de otimização. As resoluções matemáticas e gráficas demonstraram que para atingir esta produtividade, seria necessário o uso de uma concentração de 1,20 mM de NADPH e uma concentração inicial de xilose de 0,34 M. Portanto, foi realizada ensaios nestas condições (0,34 M = 51 g/L de xilose, 1,20 mM de NADPH, 25 °C, pH 7,0), promovendo uma produção de xilitol de 18 g/L ($Q_P = 0,75$ g/L.h). Entretanto, o consumo de xilose foi de apenas 40 %, apresentando alta concentração de xilose residual (30 g/L) após 24 h de processo. Em outro trabalho, estes mesmos autores avaliaram a produção enzimática de xilitol utilizando diferentes concentrações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar no meio de reação comercial (BRANCO; SANTOS; SILVA, 2011b). Neste estudo, foi utilizada a mesma metodologia para a preparação do extrato pré-purificado de xilose redutase, porém, foi adicionada a enzima glicose desidrogenase para a regeneração de

NADPH (Figura 11). Os ensaios foram realizados em módulo adaptado (BIOFLO III) a temperatura de 25 °C e pH 7,0, concentração inicial de xilose de 18,6 g/L e concentração inicial de glicose de 5,6 g/L, 0,2 mM de NADPH e atividade volumétrica de xilose redutase e glicose desidrogenase de 0,2 U/mL. A produção enzimática de xilitol foi avaliada em meio de reação contendo 20 a 100 % v/v de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, sendo xilose e glicose comercial adicionadas quando necessárias para atingir as concentrações mencionadas de 18,6 e 5,6 g/L, respectivamente. Os meios de reação contendo 20 e 40 % v/v de hidrolisado promoveram resultados semelhantes aos obtidos em meio sintético (controle), sendo que com 40 % v/v de hidrolisado obteve-se uma produção de 25,2 mM (3,83 g/L) de xilitol após 12 h de reação, com um consumo de xilose de 21 % ($Q_P = 0,32$ g/L.h). Estes parâmetros decaíram para 0,28 g/L.h e 0,26 g/L.h nas proporções de 80 e 100 % v/v de hidrolisado, respectivamente. Os autores concluíram que apesar do hidrolisado conter compostos derivados da hidrólise do material lignocelulósico que são inibitórios ao metabolismo de microrganismos, a atividade das enzimas no meio contendo hidrolisado (20 a 100 % v/v) foi mantida até o final da reação. Dessa maneira, os autores afirmaram que novos estudos devem ser direcionados a produção enzimática de xilitol em hidrolisado hemicelulósico.

Figura 11 - Produção enzimática de xilitol com a etapa de regeneração de NADPH pela enzima glicose desidrogenase.

Fonte: Adaptado de Branco, Santos e Silva (2011b).

2.4.7.2.3 Biotransformação

Biotransformação emprega células microbianas em crescimento ou em repouso (íntegras ou permeabilizadas), para a obtenção de determinado produto em poucas etapas. As enzimas de células permeabilizadas envolvidas no processo de biotransformação são ativas e estáveis por longos períodos de tempo, por estarem naturalmente imobilizadas no interior das células e cercadas pelos componentes intracelulares (CÁNOVAS; IBORRA, 2005).

A permeabilização das células pode ser realizada por processos químicos (surfactantes) ou físicos (ex: congelamento e descongelamento), sendo o uso de surfactantes o mais empregado. As moléculas de surfactantes são anfifílicas, ou seja, possuem uma porção polar (hidrofílica) e uma porção apolar (hidrofóbica). Dentre os agentes tensoativos (surfactantes), existe uma determinada classificação baseada na carga da porção hidrofílica (polar), em que podem ser carregados (aniônicos ou catiônicos) ou neutros (zwiterionicos ou não-iônicos). Surfactantes neutros geralmente não promovem desnaturação de proteínas, enquanto os surfactantes iônicos promovem isto em baixas concentrações (OTZEN, 2011). Dessa maneira, os surfactantes não-iônicos têm sido utilizados para a permeabilização de células para aumentar atividade de enzimas (KAUR; SATYNARAYANA, 2010), aumentar a produção de determinada molécula (CORTEZ; MUSSATTO; ROBERTO, 2016; RAKICKA et al. 2016; SHIN et al. 2016). A adição destes surfactantes causa aumento da atividade enzimática (Figura 10), na quantidade de produtos de biossíntese e assimilação de substrato (RAKICKA et al. 2016; CORTEZ; ROBERTO, 2012; SHIN et al. 2016).

Figura 12 - Célula de levedura permeabilizada.

Fonte: Wachtmeister e Rother (2016).

Quando os surfactantes estão em baixas concentrações, os monômeros de surfactantes dispersos no meio aquoso simplesmente se ligam a membrana, de forma a mimetizar a bicamada lipídica (Figura 13 - B). A medida que a concentração do surfactante é elevada para um valor igual ou maior que uma concentração crítica, denominada concentração micelar crítica (CMC), ocorre a saturação da bicamada com estes compostos, de modo que eles se autoassociam para formar agregados termodinamicamente estáveis e não covalentes, denominadas micelas. Nestas condições, haverá um sistema totalmente heterogêneo, com a presença de micelas constituídas por surfactantes e micelas mistas (surfactante e proteína; surfactante e lipídeo). Dependendo das condições de tratamento empregadas, os surfactantes são capazes de solubilizar proteínas de membrana sem alterar a função (KALIPATNAPU; CHATTOPADHYAY, 2005).

Figura 13 - Estágios da solubilização de membranas biológicas.

Fonte: Kalipatnapu e Chattopadhyay, (2005).

Triton X-100 é um surfactante pertencente a classe dos não-iônicos, sendo caracterizado por sua capacidade de solubilizar proteínas de membrana com retenção de função. Este surfactante tem sido bastante utilizado para permeabilização celular, sendo capaz de produzir apenas interações hidrofóbicas e melhor para quebrar interações entre lipídeos e entre lipídeos e proteínas, do que entre apenas proteínas, sendo então, um tensoativo não-desnaturante (KALIPATNAPU; CHATTOPADHYAY, 2005).

Kaur e Satyanarayana, (2010) estudaram a permeabilização de células de *Pichia anomala* com diversos surfactantes (Triton X-100, DMSO, SDS, Tween 80, CTAB) e

eluentes (tolueno, acetona, butanol, benzeno, etanol), com o objetivo de escolher o melhor tratamento para promover aumento da atividade de enzimas fitases. Neste estudo o tratamento com Triton X-100 promoveu os melhores resultados quando comparado aos outros surfactantes e eluentes. O tratamento de células com 5 % de Triton X-100 durante 30 min promoveu um aumento de 15 % na atividade de fitases.

Shin et al. (2016) estudaram a produção de D-tagatose (edulcorante) a partir de D-galactose por células recombinantes de *Corynebacterium glutamicum* que expressam isomerase D-Galactose de *Geobacillus thermodenitrificans*. Neste estudo as células foram ressuspendidas em soluções contendo 2 a 5 % (v/v) de Tween 20, Tween 40, Tween 80, Span 20 ou Span 80 ou 0,5 a 1 % (v/v) de Triton X-100. Os ensaios de permeabilização foram realizados em tampão HEPPS 50 mM (pH 8,5), contendo 15,6 g/L de células e 18 g/L de D-galactose a 60 °C, por 20 minutos. Neste estudo as células permeabilizadas com Triton X-100 (1 % p/v) apresentaram uma maior atividade produtora de D-tagatose quando comparada com os outros surfactantes, atingindo uma atividade de 2,1 vezes maior do que as células não permeabilizadas. Os ensaios de produção de D-tagatose foram realizados em tampão HEPPS 50 mM (pH 8,5), contendo 300 g/L de D-galactose, 160 g/L de células, 55 °C por 3 h. As células permeabilizadas com 1 % (p/v) de Triton X-100 no primeiro lote das reações em batelada repetida, produziram 144 g/L de D-tagatose após 3 h, com uma conversão de 48 % (p/p) e uma produtividade volumétrica de 48 g/L.h. Os autores puderam concluir que a permeabilização das células com Triton X-100 promoveu aumento na atividade de produção de D-tagatose devido ao aumento na transferência de substrato e produto através da membrana e que a produção de D-tagatose utilizando um hospedeiro GRAS (*Corynebacterium glutamicum*) pode ser um processo de produção economicamente viável.

O efeito dos surfactantes (Triton X-100, Span20 e Tween 80) sobre a produção de eritritol a partir de glicerol por células de *Yarrowia lipolytica* Wratistavia K1 foi avaliado por Rakicka et al. (2016). Para a definição do melhor surfactante, os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer, onde a adição de Span20 na concentração de 0,25 g/L ao meio foi a que promoveu os melhores resultados ($Q_p = 0,95$ g/L.h e $Y_{P/S} = 0,46$ g/g) quando comparado aos outros surfactantes. Após a definição do melhor agente permeabilizante, foram realizados ensaios em batelada alimentada em meio contendo 300 g/L de glicerol, 5g/L $(NH_4)_2SO_4$, 0,22 g/L KH_2PO_4 , 1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/L extrato de levedura e 25 g/L NaCl. O surfactante Span20 foi adicionado ao meio, promovendo uma produção de 142 g/L de eritritol após 5 dias ($Q_p = 1,1$ g/L.h e $Y_{P/S} = 0,47$ g/g), sendo uma produção 15 % maior do que o meio sem o surfactante. Dessa maneira, os autores concluíram que a adição de

determinados surfactantes ao meio promove aumento da permeabilidade da membrana celular e afeta a quantidade de metabólitos excretados pelas células.

O arabitol tem sido relatado na literatura como um substrato potencial para a produção de xilitol, podendo ser utilizado por microrganismos do tipo *Gluconobacter* sp., capazes de converter arabitol a xilulose e posteriormente para xilitol (LI et al. 2016; QI et al. 2017). Li et al. (2016) estudaram a produção de xilitol por biotransformação através de células recombinantes de *Gluconobacter oxydans* com maior expressão das enzimas-chave da via das pentoses fosfato (PPP), glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) e 6-fosfogluconato desidrogenase (6PGDH). Inicialmente, realizaram a biotransformação em frascos Erlenmeyer, onde o meio continha apenas 30 g/L de D-arabitol como fonte de carbono e as células foram incubadas a 30 °C. Neste meio, ocorreu a primeira reação (oxidação de D-arabitol para D-xilulose) a 220 rpm durante 7 h. Após a adição de 5 % (p/v) de glicose, a velocidade de agitação foi modificada para 50 rpm, para ocorrer a redução de D-xilulose para xilitol durante 50 h. A adição de glicose como co-substrato tem como objetivo regenerar cofatores (NADPH e NADH). A enzima G6PDH é a primeira enzima da via PPP e específica para NADP como coenzima, enquanto a enzima 6PGDH é a segunda enzima da via PPP e específica para NADH. Células de *G. oxydans* recombinantes com maior expressão destas enzimas poderiam possivelmente produzir altos teores de NADH e NADPH durante o metabolismo, pois G6PDH produz NADPH e 6PGDH produz NADH sob condições fisiológicas conforme demonstrado na Figura 14.

Figura 14 - Estratégias para melhorar a bioconversão de arabitol em xilitol por *G. oxydans*.

Fonte: Li et al. (2016).

Nota: **ArDH**: arabitol desidrogenase;

XDH: xilitol desidrogenase;

NDTH: nicotinamida dinucleotídeo transidrogenase.

Ainda no estudo de Li et al. (2016), os resultados mostraram que *G. oxydans* PZ (superexpressão da enzima G6PDH) produziu 18,8 g/L de xilitol após 48 h, com um fator de conversão de 0,63 g/g, enquanto as células *G. oxydans* PG (superexpressão da enzima 6PGDH) produziram 14,6 g/L de xilitol e um fator de conversão de 0,49 g/g. Estes valores foram muito superiores aos obtidos com as células naturais de *G. oxydans* (7,5 g/L de xilitol, $Y_{P/S} = 0,25$ g/g), demonstrando que a modificação genética de ambas as células (PZ e PG) favoreceu a produção de xilitol quando comparado as células naturais. Neste estudo também foi avaliada a atividade das enzimas G6PDH e 6PGDH nas linhagens recombinantes e natural. A atividade da G6PDH em *G. oxydans* PZ foi cerca de 4,25 vezes maior do que em células *G. oxydans* PG e células naturais. Enquanto a atividade da enzima 6PGDH foi 2 vezes maior em *G. oxydans* PG quando comparado as células *G. oxydans* PZ e 2,2 vezes maior do que em células naturais. No entanto, não foi observado aumento na atividade da enzima xilitol desidrogenase entre as cepas. Os autores também analisaram o número de moles de xilitol formado por mol de coenzima, onde em células *G. oxydans* PZ, o número de moles de xilitol formado por mol de $NADP^+/NAD^+$ foi de $1,15 \pm 0,20 \times 10^4$ mol/mol, sendo o maior valor quando comparado as células PG ($7,70 \pm 0,16$) $\times 10^3$ mol/mol e células naturais (1180 mol/mol). Os autores puderam concluir que a superexpressão de G6PDH ou 6PGDH em células de *G. oxydans* melhoraram a produção de xilitol a partir de arabitól.

A produção de xilitol a partir de lactose foi relatada na literatura por Toyoda e Ohtaguchi (2009). Neste estudo, a produção de xilitol a partir de lactose foi realizada em três etapas: (1) conversão de lactose a D-arabitól por *Kluyeromyces lactis* NBRC 1903, (2) oxidação de D-arabitól para D-xilulose por *Gluconobacter oxydans*, (3) redução de D-xilulose para xilitol por *Candida shehatae* na presença de etanol. Segundo os autores, a adição de etanol na terceira etapa tem um alto potencial para gerar NADH, uma vez que a oxidação de etanol em acetaldeído promove a geração desta coenzima, a qual é necessária para a conversão de xilulose para xilitol. Para a produção de D-arabitól a partir de lactose, inicialmente as células de *Kluyeromyces lactis* NBRC 1903 foram crescidas em meio sintético contendo lactose (555 mmol), 68,4 mmol de glutamina e 3,4 g/L de base nitrogenada de levedura (YNB) em biorreator de 2 L. Após 48 h, as células foram recolhidas por centrifugação, concentradas e transferidas para o biorreator de coluna de bolhas que continha 90 mmol/L de arabitól e 300 mmol/L de lactose, que após 6 h foi inserida mais solução de lactose (atingindo uma concentração de 500 mmol/L), gerando uma produção de 174 mmol/L de arabitól após 42 h ($Q_P = 2,16$ mmol/L.h). Posteriormente, para a produção de xilulose, as células de *G. oxydans* em fase estacionária na concentração de 6,3 g/L foram

inoculadas em meio contendo 197 mmol/L de arabitol. Nesta etapa, foi produzido 191 mmol/L de xilulose após 6 h. Finalmente, a etapa de produção de xilitol a partir de xilulose foi realizada em frasco cilíndrico com *Candida shehatae* na presença de etanol, com uma concentração inicial de células em fase estacionária de 4 g/L. O meio contendo 3 g/L de extrato de levedura, 163 mmol/L de xilulose (equivale a 24,5 g/L), 37,9 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,06 mmol/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3,8 mmol/L de KH_2PO_4 e 9,76 mmol/L K_2HPO_4 foi utilizado para a produção de xilitol por células de *Candida shehatae* com adição de etanol numa concentração de 169 mmol/L. Neste experimento, foi produzido 3,5 g/L de xilitol e apresentou 10 g/L de xilulose residual, com uma produtividade volumétrica de 0,08 g/L.h, após 42,9 h de reação, atingindo um fator de conversão de 0,24 g/g, demonstrando neste estudo uma possibilidade para a produção de xilitol a partir de lactose.

Devido às limitações recorrentes na produção de xilitol por via fermentativa, como reações paralelas e problemas de transferência de massa e por via enzimática, como etapas de purificação de enzimas e alto custo da coenzima NADPH, Cortez, Mussatto e Roberto (2016) estudaram a produção de xilitol usando as enzimas necessárias a este processo estando envolvidas no próprio aparato celular, processo denominado de biotransformação. O meio de biotransformação foi composto por 57 g/L de xilose, 1,0 g/L de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ solubilizado em tampão fosfato de potássio 0,1M. Para a realização da produção de xilitol por biotransformação, foram utilizadas células de *Candida guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100, de modo a permeabilizar a membrana das células sem interferir na viabilidade celular, tendo como objetivo facilitar a absorção de substrato e liberação de produto. Através do estudo da temperatura e pH, foi demonstrado que a temperatura de 35 °C e pH 6,5 gerou uma produção de 42 g/L de xilitol após 16 h de biotransformação, o que corresponde a um fator de conversão de xilose em xilitol de 0,80 g/g e uma produtividade volumétrica em xilitol de 2,65 g/L.h. Adicionalmente, foi demonstrado que as células permeabilizadas mantiveram a assimilação de xilose em cerca de 90 % e produziram cerca de 40 g/L de xilitol durante 3 ciclos de 16 h cada. Os autores relataram que estes resultados são altamente relevantes quando comparados a produção de xilitol por tecnologia enzimática ou processo fermentativo. Entretanto, estudos relacionados aos processos de biotransformação com células permeabilizadas em hidrolisados hemicelulósicos de biomassa lignocelulósica ainda não foram reportados.

A Tabela 1 sumariza os parâmetros de processo de produção de xilitol obtidos a partir de substratos sintéticos dos estudos citados acima.

Tabela 1 - Comparação dos resultados de produção de xilitol a partir de diversos substratos sintéticos empregando diferentes condições de processo.

Processo	Substrato (g/L)	Microrganismos ou enzimas	Q _p (g/L.h)	Y _{p/s} (g/g)	Referências
Biotransformação	60,0	<i>Candida guilliermondii</i>	2,65	0,80	Cortez, Mussatto e Roberto (2016)
Biotransformação	30,0	<i>Gluconobacter oxydans</i> PZ recombinante	0,39	0,64	Li et al. (2016)
Biotransformação	24,5	<i>Candida shehatae</i>	0,08	0,24	Toyoda e Ohtaguchi (2009)
Fermentação (batelada)	85,0	<i>Candida guilliermondii</i>	0,66	0,75	Cortez e Roberto (2006)
Fermentação (batelada alimentada repetida)	60,0	<i>Candida magnoliae</i>	1,15	0,70	Sirisansaneeyakul et al. (2013)
Fermentação (sistema contínuo)	50,0	<i>Candida guilliermondii</i>	1,14	0,79	Faria et al. (2002)
Enzimático	0,024	Xilose redutase	0,003	0,87	Walsh et al. (2018)
Enzimático	51,0	Xilose redutase	1,58	0,86	Branco, Santos e Silva (2011a)

Fonte: Autoria própria.

2.5 Produção de xilitol por leveduras em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz: Aspectos nutricionais e ambientais

Os hidrolisados hemicelulósicos têm sido frequentemente utilizados para o desenvolvimento de um bioprocesso tecnicamente e economicamente viável para a geração

de xilitol. Estes hidrolisados podem ser obtidos por uma variedade de pré-tratamentos, onde os resultados do processo variam de acordo com o tipo de matéria-prima e as condições operacionais empregadas (Klinke et al. 2004). Conforme relatado por Castro et al. (2016) o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz é composto por 19,2 g/L de xilose, 2,1 g/L de glicose, 5,2 g/L de arabinose e por diversos subprodutos que podem ser inibitórios ao metabolismo dos microrganismos, como 5-hidroximetilfurfural 100 mg/L, furfural 282 mg/L, ácido furoico 49,2 mg/L, vanilina 72,7 mg/L, ácido p-cumárico 135,3 mg/L e ácido ferúlico 27 mg/L. Adicionalmente, Silva et al. (2013) demonstraram que o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz também apresenta em sua constituição diversos minerais (sulfato, K, Fe, Mn, Mg, fosfato, Cr, Al, Na, Ca, Zn, Cu). Dessa maneira, a bioconversão de xilose em xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico é dependente não apenas da capacidade produtiva dos microrganismos combinado aos aspectos nutricionais (concentração inicial de xilose, composição nutricional do meio) e ambientais (temperatura, pH, taxa de agitação/transferência de oxigênio), mas também de sua tolerância a diversos compostos inibidores presentes nos hidrolisados (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Devido a presença de compostos inibidores em hidrolisados hemicelulósicos, e a fim de aumentar os parâmetros voltados a produção de determinado produto, como o xilitol, a otimização das condições de pré-tratamento como também a realização de métodos de detoxificação para a remoção eficiente de inibidores anterior a etapa de fermentação/biotransformação tem sido reportada na literatura (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000; JÖNSSON et al. 2013). Dentre os métodos químicos de detoxificação, a combinação do ajuste de pH para induzir a precipitação e/ou instabilidade dos compostos tóxicos e a adsorção destes compostos no carvão ativo tem sido bastante utilizada (MUSSATO; ROBERTO, 2001; MUSSATO; SANTOS; ROBERTO, 2004; HERNÁNDEZ-PEREZ et al. 2016).

Silva e Roberto (2001a) avaliaram a produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz empregando células de *Candida guilliermondii* previamente adaptadas neste hidrolisado. A maior produção de xilitol obtida foi de 50 g/L a partir de 90 g/L de xilose inicial, com um fator de conversão de xilose em xilitol de 0,67 g/g e uma produtividade de 0,41 g/L.h, enquanto células não adaptadas produziram apenas 17 g/L de xilitol, com um fator de conversão de 0,35 g/g e uma produtividade de 0,14 g/L.h. Estes resultados demonstraram que a adaptação das células em hidrolisado promoveu resultados muito superiores quando comparado às células não adaptadas, sendo uma alternativa aos métodos de detoxificação utilizados para remoção de compostos inibitórios.

O efeito da velocidade de agitação (200, 300 e 500 rev/min) na produção de xilitol com alta concentração de xilose inicial (85 g/L) em batelada a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por células de *Candida guilliermondii* foi avaliado por Mussatto e Roberto (2003). Neste estudo, a bioconversão de xilose em xilitol foi afetada pela velocidade de agitação/transferência de oxigênio, sendo o maior rendimento de xilitol (0,84 g/g) e produtividade ($Q_P = 0,17$ g/L.h) obtidos com uma velocidade de agitação de 300 rev/min. O hidrolisado hemicelulósico utilizado neste estudo não foi detoxificado e apresentava elevada concentração inicial de xilose. Dessa maneira, os autores concluíram que a presença de diversos compostos inibitórios e a complexidade do hidrolisado dificultaram a produção de xilitol a partir de xilose, sendo a detoxificação uma estratégia interessante para melhorar estes resultados.

Em outro trabalho utilizando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando a produção de xilitol por *Candida guilliermondii* FTI20037 foi avaliada, bem como a atividade de enzimas importantes para o metabolismo, como a xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XD) e glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD). Os maiores resultados ($Q_P = 0,40$ g/L.h e $Y_{P/S} = 0,60$ g/g) foram obtidos quando a relação de G6PD/XR foi elevada (2,5). Sendo assim, os autores concluíram que a atividade volumétrica de XR deve ser elevada, mas a relação G6PD/XR foi considerada como um dos parâmetros chave para otimizar a produção de xilitol, devido a ação de G6PD na geração de NADPH, sendo fundamental para este processo (GURPILHARES et al. 2009).

A produção de xilitol por células de *Candida subtropicalis* imobilizadas em filmes finos de hidrogel poliacrílico a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz tratado com carvão ativo foi estudada por Liaw et al. (2008). Diferentes concentrações iniciais de xilose (80 a 200 g/L) foram avaliadas, onde concentração inicial de 100 g/L foi a que promoveu o maior fator de conversão de xilose em xilitol (0,65 g/g) após 180 h, gerando uma produtividade de 0,33 g/L.h, enquanto a concentração inicial de 200 g/L de xilose foi a que gerou o menor fator de conversão de xilose em xilitol, 0,40 g/g. Adicionalmente, no teste de durabilidade dos filmes finos de hidrogel poliacrílico, foi demonstrado que a atividade fermentativa das células foi mantida até 40 dias de batelada repetida, com um fator de conversão de xilose em xilitol de 0,70 g/g. Dessa maneira, os autores concluíram que uma concentração inicial de xilose maior que 100 g/L promoveu uma menor produção de xilitol devido a maior presença de furfurais residuais (inibidores) e que a imobilização das células pode ser uma estratégia promissora e durável.

O efeito da concentração inicial do inóculo na produção de xilitol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz foi estudado por Roberto, Sato e Mancilha (1996a). Neste estudo foi demonstrado que a concentração inicial do inóculo afetou consideravelmente a produção de xilitol. O uso de uma concentração inicial de inóculo de 0,9 g/L promoveu uma produção máxima de xilitol de 40,5 g/L a partir de 79,3 g/L de xilose inicial, com um fator de conversão máximo de xilose em xilitol de 0,71 g/g, e produtividade volumétrica em xilitol de 0,56 g/L.h. Adicionalmente, foi demonstrado que a produção de xilitol aumentou conforme aumentava a concentração inicial de inóculo, mas a partir de uma dada concentração (1,78 e 2,48 g/L), o consumo de xilose foi reduzido em 15 %, sendo possivelmente um reflexo à baixa disponibilidade de oxigênio, pois uma maior concentração de células tende a reduzir o nível de oxigênio no meio, podendo afetar a absorção de xilose pela via das pentoses.

O efeito combinado da concentração inicial de xilose e da concentração inicial de inóculo na produção de xilitol por células de *Candida guilliermondii* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz sem qualquer suplementação nutricional foi avaliado por Silva e Roberto (2001b). Neste estudo foi utilizada uma metodologia de superfície de resposta, na qual a concentração inicial ideal de xilose foi de 82 g/L e um nível de inóculo de 3 g/L. Nestas condições, foi obtida uma produção de xilitol de 52 g/L após 96 h de fermentação em frascos Erlenmeyer (30 °C, 250 rpm), atingindo uma produtividade volumétrica de 0,54 g/L.h e um fator de conversão de xilose em xilitol de 0,65 g/g.

O efeito do pH e da fonte de nitrogênio (ureia ou sulfato de amônio) na produção de xilitol por células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz foi avaliado por Roberto, Sato e Mancilha (1996b). Neste estudo foi verificado que o pH, a fonte de nitrogênio e a interação de ambos afetou significativamente a produção de xilitol. A partir de uma concentração inicial de xilose de 79,3 g/L e uma concentração inicial de inóculo de 0,5 g/L, a melhor produtividade volumétrica em xilitol ($Q_P = 0,51$ g/L.h) e o melhor fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S} = 0,68$ g/g) foi obtido com um pH = 5,3 e com o hidrolisado hemicelulósico suplementado com sulfato de amônio após 72 h.

Um processo de biorrefinaria robusto e econômico para a co-produção contínua de etanol e xilitol a partir de palha de arroz em um biorreator de tanque agitado acoplado a uma unidade de microfiltração foi desenvolvido por Zahed et al. (2015). Para a produção de xilitol, foi utilizada *Candida tropicalis* NCIM3119, e para a produção de etanol foi utilizado *Saccharomyces cerevisiae*. Ambas as cepas foram adicionadas em 3 L de uma mistura contendo hidrolisado hemicelulósico concentrado e detoxificado (75 g/L d glicose e 40 g/L

de xilose), extrato de levedura (10 g/L) e sulfato de diamônio (5 g/L). Esta mistura foi transferida para o biorreator, e após 150 h de co-cultura contínua (30 °C, pH 5,0, 300 rpm), uma produção de 31 g/L de xilitol foi obtida ($Y_{P/S} = 0,78$ g/g). Adicionalmente, foi produzido 55 g/L de etanol ($Y_{P/S} = 0,70$ g/g). No sistema em batelada única, as maiores produções de xilitol e etanol foram de 26,5 g/L (0,58 g/g) e 31,5 g/L (0,42 g/g), respectivamente. Dessa maneira, os autores concluíram que a co-cultura contínua é capaz de promover maiores produções de etanol e xilitol quando comparado aos cultivos em batelada única, e é uma estratégia que reduziria os custos gerais de produção, devido a produção simultânea de etanol e xilitol.

Uma condição otimizada da produção de xilitol por células de *Candida guilliermondii* a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz foi demonstrada por Silva et al. (2006) em biorreator de bancada. Células de *Candida guilliermondii* foram crescidas em hidrolisado hemicelulósico e, após 45 h, foi produzido 45,4 g/L de xilitol (a partir de 82,5 g/L de xilose inicial), obtendo uma produtividade volumétrica em xilitol de 1,01 g/L.h e um fator de conversão de xilose em xilitol de 0,58 g/g. Enquanto em frascos Erlenmeyer, a produção de xilitol foi de 51,4 g/L após 96 h, com uma produtividade volumétrica em xilitol de 0,54 g/L.h e um fator de conversão de xilose em xilitol de 0,59 g/g. Dessa maneira, a fermentação em biorreator de bancada permitiu aumentar em cerca de 90% a produtividade volumétrica em xilitol quando comparado aos resultados obtidos em frascos Erlenmeyer, mostrando a importância de um estudo detalhado que relacione a transferência de oxigênio, concentração inicial de xilose e concentração inicial de inóculo para otimizar a fermentação em biorreator.

Métodos de detoxificação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz foram estudados por Baek e Kown (2007) para melhorar a produção de xilitol por células de *Candida mogii*. Neste estudo, o hidrolisado foi tratado com 6 diferentes métodos de detoxificação, (N) neutralização do pH para 5,5 com $\text{Ca}(\text{OH})_2$; (U) aumento do pH para 8-10 com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ seguido de redução do pH para 5,5 com H_2SO_4 – chamado de ultra alcalinização; (NC) neutralização e adsorção com carvão ativo; (NR) neutralização e adsorção com resinas de troca iônica; (UC) ultra alcalinização e adsorção com carvão ativo; (UR) ultra alcalinização e adsorção com resinas de troca iônica. A análise dos parâmetros cinéticos na produção de xilitol por fermentação foi avaliada. A maior produção de xilitol foi de 27,4 g/L ($Y_{P/S} = 0,53$ g/g e $Q_P = 0,38$ g/L.h) a partir de 57,7 g/L de xilose inicial em hidrolisado tratado com ultra alcalinização e adsorção com carvão ativo. Os tratamentos contendo ultra alcalinização (UC e UR) geraram as maiores produções de xilitol, com 27,4

g/L de xilitol no hidrolisado tratado com ultra alcalinização e carvão ativo (UC) e 23,2 g/L de xilitol no tratamento com ultra alcalinização e resinas de troca iônica (UR). Adicionalmente, os ensaios UC e UR apresentaram uma remoção de 44 e 51 % de compostos fenólicos, enquanto os ensaios NC e NR, apresentaram uma remoção de 26 e 37 % de compostos fenólicos, respectivamente. Dessa maneira, este estudo demonstrou que a ultra alcalinização foi mais eficaz que a neutralização para o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, devido a maior remoção de compostos fenólicos.

Uma condição experimental ótima para o tratamento de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com carvão ativado para a produção de xilitol foi determinada por Mussatto e Roberto (2004). Neste estudo, a combinação ótima de pH, temperatura e velocidade de agitação (pH 2,0, 150 rpm, 45 °C durante 60 minutos) promoveu uma remoção de 25,8 % de produtos de degradação da lignina, com uma produtividade volumétrica em xilitol de 0,57 g/L.h e um $Y_{P/S} = 0,72$ g/g, mostrando que o método de detoxificação do hidrolisado promoveu aumento de sua fermentabilidade.

O tratamento de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com carvão ativado foi estudado por Mussatto e Roberto (2001). Neste estudo foram avaliadas 4 formas de tratamento do hidrolisado (90 g/L de xilose inicial): OT: aumento do pH para 8 com NaOH seguido de redução do pH para 6,5 com H_2SO_4 ; 2: OT + carvão ativo (razão hidrolisado:carvão de 120 g/g); 3: OT + carvão atiado (40 g/g); 4: OT + carvão ativado (24 g/g). Os melhores resultados foram obtidos com o tratamento 3, que removeu 27 % de compostos fenólicos e houve uma produção de 59 g/L de xilitol ($Y_{P/S} = 0,72$ g/g e $Q_P = 0,61$ g/L.h) após 96 h, bem próximos aos obtidos em meio semi-definido ($Y_{P/S} = 0,70$ g/g; $Q_P = 0,62$ g/L.h). O tratamento OT foi capaz de remover 18 % de compostos fenólicos, o que pode ser justificado pelo fato do ajuste do pH ter promovido a precipitação de alguns compostos tóxicos, incluindo os fenólicos. Os autores puderam concluir que a adsorção com carvão ativo é um bom método para superar a inibição de microrganismos causada por compostos tóxicos presentes nos hidrolisados.

O efeito do tratamento com carvão ativado de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz foi estudado por Liaw et al. (2008) na produção de xilitol por células de *Candida subtropicalis* imobilizadas em filmes finos de hidrogel poliacrílico. Antes do tratamento com carvão ativo, foi observada uma acentuada inibição, de modo que a partir de 100 g/L de xilose inicial, apenas 20 g/L de xilose foi consumida e nenhum xilitol havia sido produzido após 180 h. Após o tratamento do hidrolisado com carvão ativado, cerca de 90 % de xilose inicial foi consumida e houve uma produção de cerca de 60 g/L de xilitol (atingindo um fator

de conversão de xilose em xilitol de 0,65 g/g), mostrando que o tratamento com carvão ativo promoveu grande melhora na produção de xilitol devido à redução de compostos inibitórios no hidrolisado hemicelulósico.

A Tabela 2 sumariza os parâmetros de processo de produção de xilitol obtidos a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz dos estudos citados acima.

Tabela 2 - Estudos relacionados a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.

Microrganismo	Concentração de Xilose Inicial (g/L)	Concentração Celular Inicial (g/L)	Xilitol (g/L)	Y_{P/S} (g/g)	Q_P (g/l.h)	Tipo de reator	Referência
<i>Candida guilliermondii</i> FTI20037	79,3	0,90	40,5	0,71	0,56	Frasco Erlenmeyer	Roberto, Sato e Mancilha, (1996a)
<i>Candida guilliermondii</i> FTI20037	79,3	0,50	36,9	0,68	0,51	Frasco Erlenmeyer	Robert, Sato e Mancilha (1996b)
<i>Candida guilliermondii</i> FTI20037	90,0	2,50	59,0	0,72	0,61	Frasco Erlenmeyer	Mussatto e Roberto (2001)
<i>Candida guilliermondii</i> FTI20037	82,0	3,0	52,0	0,65	0,54	Frasco Erlenmeyer	Silva e Roberto (2001b)
<i>Candida guilliermondii</i> FTI20037	85,0	3,0	12,0	0,84	0,17	Biorreator de tanque agitado	Mussatto e Roberto (2003)
<i>Candida guilliermondii</i> FTI20037	82,5	3,10	45,4	0,58	1,01	Biorreator de tanque agitado	Silva et al. (2006)
<i>Candida mogii</i>	57,7	2,50	27,4	0,53	0,38	Frasco Erlenmeyer	Baek e Kown (2007)
* <i>Candida subtropicalis</i> WF79	100	**11,5	66,0	0,65	0,33	Frasco Erlenmeyer	Liaw et al. (2008)
<i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037	66,10	3,0	38,5	0,60	0,40	Frasco Erlenmeyer	Gurpilhares et al. (2009)
<i>Candida tropicalis</i> NCIM 3119	40,0	20	31,0	0,78	0,21	Biorreator de tanque agitado	Zahed et al. (2015)

Fonte: Autoria própria.

Nota: (*): células imobilizadas. (**): mg de célula/g de filme.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar o potencial biocatalítico de células de *Candida guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100 na produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Para atingir o objetivo do trabalho, as seguintes etapas deverão ser cumpridas:

Obtenção e caracterização química da palha de arroz e do hidrolisado hemicelulósico e posterior concentração do hidrolisado para aumentar a concentração de xilose no licor;

Avaliação do crescimento de células de *Candida guilliermondii* em meio semi-definido e em hidrolisado hemicelulósico com extrato de levedura ou extrato de farelo de arroz;

Estabelecimento de um planejamento experimental para avaliar o efeito do tampão fosfato de potássio (KH_2SO_4 e K_2HSO_4) e do $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre a biotransformação de xilose em xilitol por células de *Candida guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não detoxificado e detoxificado com carvão ativado;

Estudo da permeabilização de *C. guilliermondii* com Triton X-100 sobre a biotransformação de xilose em xilitol empregando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz;

Avaliação do bioprocesso em batelada repetida empregando o hidrolisado nas condições previamente definidas;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fermentação I do Departamento de Biotecnologia - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL/USP).

Figura 15 - Esquema das etapas que compõem o estudo.

Fonte: Autoria própria.

4.1 Obtenção da matéria-prima

A palha de arroz foi obtida de plantação nas proximidades da cidade de Lorena, no estado de São Paulo. Esta biomassa foi exposta ao sol para reduzir a umidade até cerca de 10 %. Posteriormente, a palha de arroz foi moída em moinho de martelo (BEMEDETTI – dupla 270), pesada, ensacada e estocada até as etapas de pré-tratamentos. O material obtido após a moagem foi caracterizado quimicamente de acordo com o protocolo padrão do *National Renewable Energy Laboratory* (SLUITER et al. 2012) e armazenado até a realização dos pré-tratamentos.

4.2 Pré-tratamento e obtenção do hidrolisado hemicelulósico

Foram realizados dois pré-tratamentos sequenciais da palha de arroz, em que primeiramente foi feito o tratamento alcalino (desacetilação) e posteriormente o processo de hidrólise com ácido diluído.

4.2.1 Pré-tratamento alcalino (desacetilação)

Em uma primeira etapa do pré-tratamento, a palha de arroz passou por um tratamento alcalino com o objetivo de remover os grupos acetil (desacetilação). Nesta etapa foram utilizadas condições ótimas obtidas por Castro e colaboradores (2016). Dessa maneira, a desacetilação da palha foi realizada na temperatura de 70 °C empregando 45 minutos com uma solução de NaOH (0,8 % m/v) com uma proporção sólido: líquido de 1:10, o que corresponde a uma carga de 80 mg de NaOH por grama de biomassa. Os experimentos foram realizados em reator de aço inoxidável de 50 L aquecido por resistência elétrica e agitado por rotação no seu próprio eixo (2 rpm). No final da reação, o reator foi arrefecido até à temperatura ambiente, e a fração sólida recuperada por centrifugação. Os sólidos recuperados (palha de arroz desacetilada) foram lavados com água de torneira para remoção do excesso de NaOH até que a água de lavagem atingisse um pH próximo a 7,0, e secos ao sol até atingir 10 % de umidade, sendo depois caracterizados para determinar as alterações da composição da biomassa (SLUITER et al. 2012).

4.2.2 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico

Numa segunda etapa, a palha de arroz desacetilada foi tratada com ácido sulfúrico diluído para a obtenção da fração hemicelulósica. Nesta etapa foram utilizadas condições ótimas definidas por Ferreira, (2017). As reações foram realizadas em reator de aço inox com painel de controle de volume máximo de trabalho de 80 L, empregando 0,85 % (m/v) de H_2SO_4 , proporção sólido:líquido de 1:10, 150 °C durante 10 minutos. A fração sólida foi separada, lavada com água até que o líquido atingisse um pH neutro. Os sólidos obtidos foram então caracterizados quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina, de acordo com Sluiter et al. (2012), enquanto a fração líquida (hidrolisado hemicelulósico) foi concentrada para aumentar a concentração de xilose e caracterizada quanto aos teores de açúcares e ácido acético para posteriormente ser usada nas etapas de cultivo e biotransformação.

4.2.3 Caracterização do material lignocelulósico

Após a realização do pré-tratamento e da hidrólise ácida da palha de arroz, foram avaliados parâmetros através da caracterização química das frações (celulose, hemicelulose, lignina solúvel e insolúvel, cinzas e extrativos), em todas as etapas (palha *in natura*, após a desacetilação e após o tratamento com ácido diluído) baseada na metodologia padrão do *National Renewable Energy Laboratory* (NREL) (SLUITER et al. 2012).

Inicialmente, foi pesado 0,3 g de cada palha de arroz tratada em tubos de ensaio. Posteriormente, estes tubos com palha de arroz foram colocados em banho-maria a 30 °C e adicionado 3 mL de H_2SO_4 (72 % p/p). A reação foi realizada por 1 hora em banho-maria e a cada 10 minutos o conteúdo foi misturado com bastão de vidro. Após 1 hora, os tubos foram retirados e adicionado 84 mL de água destilada, e posterior transferência para frascos de 250 mL. Estes frascos foram autoclavados a 121 °C durante 1 hora para promover a hidrólise completa dos oligômeros restantes. Posteriormente, o conteúdo dos frascos foi filtrado em cadinhos de vidro com filtro, os quais foram anteriormente tarados e pesados após 30 minutos em dissecador a vácuo. Após filtração, o conteúdo líquido foi transferido para balões de 100 mL, e 1mL de cada balão foi transferido para balões de 25 mL para a

leitura da absorbância no espectrofotômetro (205 nm) para análise de lignina solúvel de acordo com a equação (1):

$$\% \text{ Lignina solúvel} = \frac{C(\text{lignina solúvel}) \times 0,5}{m_A} \times 100 \quad (1)$$

Onde: $C_{\text{lignina solúvel}}$ = concentração de lignina solúvel (g/L); m_A = massa da amostra seca. A concentração de lignina solúvel foi determinada pela equação 2:

$$C_{\text{Lignina solúvel}} = [(4,187 \times 10^{-2} \times (A_{\text{hid280}} - A_{\text{PD280}}))] - 3,279 \times 10^{-4} \quad (2)$$

Onde: A_{hid280} = absorbância do hidrolisado alcalinizado a 280nm (com a correção da diluição); A_{PD280} = absorbância dos produtos de degradação de açúcares. Sendo a absorbância dos produtos de degradação de açúcares (A_{PD280}) representada pela equação 3:

$$A_{\text{PD280}} = (C_{\text{Furf}} \times \epsilon_{\text{Furf}}) + (C_{\text{HMF}} \times \epsilon_{\text{HMF}}) \quad (3)$$

Onde: C_{Furf} e C_{HMF} concentração de furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente, no hidrolisado (g/l); ϵ_{Furf} = absorvidade do furfural (146,85 L/g.cm); ϵ_{HMF} = absorvidade do hidroximetilfurfural (114 L/g.cm).

O conteúdo restante dos balões de 100 mL foi filtrado com uma seringa com filtro de membrana para análise por técnicas de cromatografia líquida para obtenção do conteúdo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, as quais foram utilizadas para o cálculo da porcentagem de celulose, hemicelulose e grupos acetil presentes na amostra de acordo com as equações 4, 5 e 6, respectivamente.

$$\% \text{ Celulose} = \frac{C_{\text{gli}} \times 0,5 \times F_C \times F_{\text{PH}}}{m_A} \times 100 \quad (4)$$

$$\% \text{ Hemicelulose} = \frac{(C_{\text{xil}} + C_{\text{ara}}) \times 0,5 \times F_C \times F_{\text{PH}}}{m_A} \times 100 \quad (5)$$

$$\% \text{ Grupos acetil} = \frac{C_{\text{acet}} \times F_c}{m_A} \times 100 \quad (6)$$

Onde F_c = fator de conversão (0,9 para celulose, 0,88 para hemicelulose e 0,72 para grupos acetil); F_{PH} = fator de perda de hidrólise (1,055 para celulose e 1,155 para hemicelulose); C_{gli} , C_{xil} , C_{ara} e C_{acet} (concentração em g/L de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, respectivamente).

O material sólido retido no filtro dos cadinhos foi lavado com água destilada e posteriormente colocado na estufa a 100 °C para secagem. Após isto, estes cadinhos foram colocados em dissecador a vácuo por 30 minutos e depois pesados para análise de lignina insolúvel. Sendo assim, a relação entre a massa do resíduo e a massa inicial da amostra foi utilizada para determinar a porcentagem de lignina insolúvel presente nas amostras (equação 7).

$$\% \text{ Lignina insolúvel} = \frac{m_R - m_C}{m_A} \times 100 \quad (7)$$

Onde m_A = massa da amostra seca (g); m_R = massa do resíduo de lignina; m_C = massa de cinzas após calcinação (g).

Para a análise de cinzas, o conteúdo sólido retido no filtro dos cadinhos de vidro (número 3) foi transferido para cadinhos de porcelana que estavam na estufa a 100 °C durante 24 horas e que foram resfriados durante 30 minutos a vácuo. Os cadinhos de porcelana foram pesados vazios e com o conteúdo sólido. Então, estes cadinhos de porcelana com o material sólido foram colocados na mufla (QUIMIS) durante 3 horas a 575 °C. Para a análise de cinzas totais, outros cadinhos de porcelana vazios que estavam na estufa a 100 °C foram pesados após resfriamento no dissecador a vácuo e posteriormente a palha de arroz que não passou pelas etapas de caracterização foi colocada nestes cadinhos de porcelana para pesagem, e por fim foram colocados na mufla durante 3 horas a 575 °C. O teor de cinzas foi então determinado pela equação 8.

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{m_{CT}}{m_A} \times 100 \quad (8)$$

Onde m_{CT} = massa de cinzas totais após calcinação (g); m_A = massa da amostra analisada seca (g).

4.3 Microrganismo

Para os ensaios de produção de xilitol foi utilizada a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 obtida da coleção de culturas do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos do Departamento de Biotecnologia da EEL-USP, a qual foi previamente selecionada para a produção de xilitol por Barbosa et al. (1988). A cultura foi repicada em tubos de ensaio contendo ágar extrato de malte inclinado e conservada em geladeira a 4 °C.

4.4 Preparo do inóculo e Condições de cultivo

Para o preparo do inóculo, em condições assépticas, o conteúdo de um tubo com ágar extrato de malte com a levedura *Candida guilliermondii* recém repicada (24 horas antes) foi transferido com o auxílio de uma alça para um tubo contendo 5 mL de água destilada esterilizada. Aliquotas de 1 mL da suspensão obtida foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio.

Para o cultivo das células em meio semi-definido foi utilizado um meio composto por xilose (30 g/L), glicose (1,5 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (3 g/L) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g/L), suplementado com extrato de levedura (3 g/L) ou extrato de farelo de arroz (20 % v/v). Para o preparo destes meios, foram utilizadas soluções concentradas de cada componente. As soluções concentradas de glicose (150 g/L) e xilose (400 g/L) foram autoclavadas a 112 °C por 15 minutos e os outros componentes, extrato de levedura (100 g/L); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (70 g/L); $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (10 g/L) e suspensão de farelo de arroz (10 % p/v), a 121 °C por 20 minutos.

O extrato de farelo de arroz foi obtido após centrifugação da suspensão a 2000 xg por 20 minutos, onde o sobrenadante (fração líquida) corresponde ao extrato de farelo de arroz. Os outros componentes foram então misturados assepticamente para se obter a concentração desejada de cada nutriente no meio de cultivo.

Para o cultivo das células em hidrolisado hemicelulósico que foi obtido e concentrado conforme descrito no tópico 4.2.2, o pH deste hidrolisado foi ajustado para 5,5 com NaOH 10 M e posteriormente centrifugado. Foi analisada a suplementação do hidrolisado com extrato de levedura (3 g/L) ou extrato de farelo de arroz (20 % v/v) na presença dos mesmos sais utilizados na descrição acima do meio semi-definido.

Todos os ensaios de crescimento de células de *Candida guilliermondii* foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio (semi-definido ou hidrolisado), a 30 °C e 200 rpm em shaker TE-420 TECNAL. Foram retiradas alíquotas de 1,2 mL a cada 5 horas para determinação da concentração celular, concentração de açúcares, produção de metabólitos, pH e viabilidade celular. Para a determinação da concentração celular, um volume de 0,2 a 0,3 mL das alíquotas retiradas a cada 5 horas foram diluídas em balão volumétrico conforme o necessário para analisar a D.O a 600 nm em espectrofotômetro U-1800 Hitachi, e a concentração celular foi calculada de acordo com a curva padrão obtida e descrita no item 4.9.2. Já para a determinação da concentração de açúcares, produção de metabólitos e viabilidade celular, as alíquotas retiradas a cada 5 horas foram centrifugadas, o sobrenadante utilizado para analisar o consumo de açúcares e produção de metabólitos, conforme a metodologia descrita no item 4.9.3. Os pellets de células foram ressuspensos em água destilada esterilizada para analisar a viabilidade celular, conforme descrito no item 4.9.4. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

4.5 Permeabilização das células de *Candida guilliermondii* com Triton X-100

Esta etapa foi realizada conforme o protocolo de permeabilização celular descrito por Cortez, Mussatto e Roberto (2016). Para isto, as células de *Candida guilliermondii* foram cultivadas em meio semi-definido suplementado com extrato de farelo de arroz ou em hidrolisado hemicelulósico contendo 30 g/L de xilose e sem qualquer suplementação sob agitação de 200 rpm e 30 °C em shaker TE-420 TECNAL. Após as células atingirem a fase estacionária (24 horas em meio semi-definido e 54 horas em hidrolisado), o Triton X-100, previamente esterilizado a 112 °C durante 15 minutos, foi adicionado diretamente ao meio de cultivo, utilizando uma razão de célula:surfactante de 1:0,9 g/g. Após o tempo de 50 minutos, as células foram separadas por centrifugação (5600 x g durante 20 min), lavadas duas vezes com tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,9), concentradas até atingir uma concentração celular de 10 a 12 g/L e mantidas na mesma solução tampão até a etapa de biotransformação.

Para o preparo da solução tampão fosfato de potássio (pH 6,9) foi pesado 14,7 g de K_2HPO_4 e 2,86 g de KH_2PO_4 para 1 litro de solução na concentração de 0,1 M. Posteriormente, a solução foi autoclavada a 121 °C durante 20 minutos.

4.6 Efeito do meio de permeabilização celular sobre a biotransformação de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*

As células de *Candida guilliermondii* permeabilizadas em meio semi-definido ou em hidrolisado (item 4.5) foram utilizadas como biocatalisador para a biotransformação de xilose em xilitol empregando meio definido tamponado (pH 6,9) contendo xilose como única fonte de carbono e suplementado com $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g/L) conforme descrito por Cortez, Mussatto e Roberto (2016). Para a realização destes ensaios, as células permeabilizadas foram concentradas para atingir 10-12 g/L e mantidas em tampão fosfato de potássio. Posteriormente, as células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e as células transferidas para o meio de biotransformação (meio definido ou hidrolisado), conforme esquematizado na Figura 16.

Adicionalmente, as células permeabilizadas em meio semi-definido ou em hidrolisado (item 4.5), também foram utilizadas como biocatalisador para a biotransformação de xilose em xilitol, empregando hidrolisado hemicelulósico concentrado contendo 60 g/L de xilose. Para a realização destes ensaios, o pH do hidrolisado foi corrigido para 6,8-7,0 com NaOH 10 M e posteriormente, centrifugado para ser utilizado nas etapas de biotransformação.

Figura 16 - Esquema das etapas de biotransformação em meio definido e em hidrolisado hemicelulósico.

Fonte: Autoria própria.

Todos os ensaios de biotransformação foram realizados em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 25 mL de meio (semi-definido ou hidrolisado), incubados num agitador rotativo a 200 rpm durante 21 horas a 35 °C em shaker MAXQ 7000 – Thermo Scientific. Nos tempos de 0, 4, 15, 17 e 21 horas foram retiradas alíquotas de 1 mL para analisar a concentração de açúcares, produção de xilitol, pH, concentração e viabilidade celular. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.7 Efeito do tampão fosfato de potássio e do $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre a biotransformação de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz

Para avaliar o efeito da adição de tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4 e KH_2PO_4 – 0,1 M) e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g/L), sobre a biotransformação em hidrolisado hemicelulósico (não detoxificado e detoxificado com carvão ativado) por células permeabilizadas em meio semi-definido, utilizou-se um planejamento experimental 2^2 com 3 pontos centrais, conforme mostrado na Tabela 3.

O tratamento do hidrolisado com carvão ativado foi baseado na metodologia descrita por Mussatto, Santos e Roberto (2004). Os experimentos de adsorção com carvão ativado foram realizados em frascos Erlenmeyer contendo 1,92 g de carvão ativado em 50 mL de hidrolisado, o que corresponde a uma relação carvão:hidrolisado de 25 g/kg. Os frascos foram mantidos em agitador rotatório (shaker MAXQ 7000 – Thermo Scientific) a 150 rpm e 45 °C durante 60 minutos. Posteriormente o carvão ativado foi removido por centrifugação (1100 xg por 15 minutos).

Para os ensaios de biotransformação em hidrolisado não detoxificado e detoxificado com carvão ativado, o pH foi corrigido para 6,8-7,0 através da adição de NaOH 10 M e posteriormente, centrifugado para remoção de sólidos. Já nos hidrolisados que serão suplementados com sais (K_2HPO_4 e KH_2PO_4) do tampão fosfato de potássio, o pH foi corrigido para 6,0 pela adição de NaOH 10 M. Posteriormente, foi adicionado os sais (K_2HPO_4 e KH_2PO_4) que foram previamente pesados para se obter uma concentração de 0,1 M no meio. Caso fosse necessário, colocou-se mais NaOH 10 M para atingir o pH desejado (6,8-7,0). Deixou-se agitando com agitador magnético durante 3 horas para garantir que o

pH não decaísse. Após este tempo, o hidrolisado foi novamente centrifugado e pronto para uso na etapa de biotransformação.

Tabela 3 - Planejamento experimental dos ensaios de produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não detoxificado e detoxificado com carvão ativado.

Ensaio	Hidrolisado não detoxificado		Hidrolisado detoxificado	
	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	MgCl ₂ .6H ₂ O	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄	MgCl ₂ .6H ₂ O
	(0,1 M)	(1,0 g/L)	(0,1 M)	(1,0 g/L)
1	-	-	-	-
2	+	-	+	-
3	-	+	-	+
4	+	+	+	+
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0

Fonte: Autoria própria.

Para os ensaios de biotransformação em hidrolisado (não detoxificado e detoxificado com carvão ativado) contendo MgCl₂.6H₂O, uma solução concentrada de MgCl₂.6H₂O (50 g/L) foi preparada e esterilizada a 121 °C durante 20 minutos. Posteriormente, foi adicionado MgCl₂.6H₂O ao hidrolisado de forma a se obter uma concentração de 1,0 g/L no meio.

Todos os ensaios de biotransformação foram realizados em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 25 mL de hidrolisado hemicelulósico (não detoxificado e detoxificado com carvão ativado), incubados num agitador rotativo a 200 rpm durante 21 horas a 35 °C e com uma concentração celular de cerca de 10-12 g/L conforme descrito por Cortez, Mussatto e Roberto (2016). Nos tempos de 0, 4, 15, 17 e 21 horas de biotransformação foram retiradas alíquotas de 1 mL para analisar a concentração de açúcares, produção de xilitol, pH, concentração e viabilidade celular.

4.8 Reutilização das células permeabilizadas

Para estes ensaios foram utilizadas células de *Candida guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100 em meio semi-definido. A biotransformação foi conduzida em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz sem tratamento com carvão

ativado e sem adição de tampão fosfato de potássio e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ empregando 10-12 g/L de células. A cada ciclo de 15 horas, as células foram recolhidas por centrifugação (5600 xg, 10 °C, 20 min), lavadas duas vezes com tampão fosfato de potássio 0,1 M e depois transferidas para novo meio reacional a base de hidrolisado. Estas etapas foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 25 mL de hidrolisado, que foram incubados num agitador rotativo a 200 rpm e 35 °C (MAXQ 7000 – Thermo Scientific). No tempo inicial e final (0 h e 15 h) de cada ciclo de biotransformação foram retiradas alíquotas de 1 mL para análise da concentração de açúcares, produção de xilitol, pH, concentração de biomassa e viabilidade celular. Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

4.9 Métodos analíticos

4.9.1 Determinação do teor de umidade da palha de arroz

O teor de umidade da palha de arroz foi determinado através de secagem de amostra da palha em estufa a 105 °C até o peso ficar constante. O valor em percentagem foi calculado dividindo-se a diferença entre o peso inicial e o peso final da amostra pelo peso inicial, multiplicando-se o resultado por 100.

4.9.2 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada através de uma curva de calibração que correlaciona absorbância (densidade óptica) com a massa seca de células, utilizando o espectrofotômetro (U-1800 Hitachi). Para a realização da curva, após os cultivos, o conteúdo foi centrifugado (2000 xg por 20 min) de modo a descartar o sobrenadante (meio de cultivo) e o pellet lavado 3 vezes com água destilada autoclavada e finalmente ressuspenso também em água destilada autoclavada para se obter uma suspensão celular homogênea concentrada. A partir desta suspensão, foram realizadas diversas diluições que foram submetidas a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 600 nm, utilizando-se água destilada como branco. A massa seca foi obtida a partir de alíquotas de 4 mL desta suspensão concentrada colocadas em cadinhos de porcelana que foram secas em estufa a 105 °C por 24 horas.

Curva padrão nos diferentes meios de cultivo está mostrado nas Figuras 17, 18, 19, 20 e 21.

Figura 17 - Curva padrão obtida do cultivo em meio semi-definido suplementado com extrato de levedura.

Fonte: Autoria própria.

Figura 18 - Curva padrão obtida do cultivo em meio semi-definido suplementado com extrato de farelo de arroz.

Fonte: Autoria própria.

Figura 19 - Curva padrão obtida do cultivo em hidrolisado hemicelulósico suplementado com extrato de levedura.

Fonte: Autoria própria.

Figura 20 - Curva padrão obtida do cultivo em hidrolisado hemicelulósico suplementado com extrato de farelo de arroz.

Fonte: Autoria própria.

Figura 21 - Curva padrão obtida do cultivo em hidrolisado hemicelulósico sem suplementação.

Fonte: Autoria própria.

4.9.3 Determinação da concentração de açúcares, ácido acético e xilitol

As concentrações de xilose, glicose, arabinose, ácido acético e xilitol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), em equipamento Waters com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) com ácido sulfúrico 0,01 N como eluente, fluxo de 0,6 mL/min, e volume de amostra de 20 µL. As amostras foram diluídas com água deionizada conforme o necessário e posteriormente filtradas com uma seringa com filtro de membrana e transferidas para vials para serem injetadas no cromatógrafo.

4.9.4 Determinação da viabilidade celular

Para a análise da viabilidade celular, foi utilizada a técnica de coloração por azul de metileno e posterior contagem de células na câmara de Neubauer. Após a retirada de amostras durante o cultivo celular, estas foram diluídas de acordo com a necessidade, e transferidas para um tubo de ensaio para a mistura com a solução de azul de metileno-citrato de sódio na proporção 1:1. Após este procedimento, foi aguardado 5 minutos e

homogeneizada a mistura. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur uma pequena fração do conteúdo foi transferida para a câmara de Neubauer. Foi utilizado microscópio óptico (Coleman NI8T) para contagem de células, sendo contado 1 quadrículo (4x4) em cada quadrado externo e um quadrículo (4x4) do quadrado central.

- Viabilidade celular:

$$Viabilidade (\%) = \left(\frac{Nv}{Nv + Nnv} \right) \times 100 \quad (1)$$

Nv = Número de células viáveis

Nnv = Número de células não viáveis

- Número de células totais/mL

$$Número\ de\ células\ totais / mL = \left(\frac{Nm}{V} \right) \times diluição \quad (2)$$

Nm = média do número total de células nos 5 quadrículos

V = volume da câmara de Neubauer = 25×10^4 mL

4.10 Metodologia de análise dos resultados

4.10.1 Parâmetros de cultivo e biotransformação

- Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$)

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_i}{(S1_i - S1_f) + (S2_i - S2_f)} \quad (3)$$

Onde:

X_i e X_f = concentração inicial e final de células (g/L);

$S1_i$ e $S1_f$ = concentração inicial e final de glicose (g/L) e

$S2_i$ e $S2_f$ = concentração inicial e final de xilose (g/L).

- Fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$)

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_{2i} - S_{2f}} \quad (4)$$

Onde:

P_i e P_f = concentração inicial e final de xilitol (g/L) e

S_{2i} e S_{2f} = concentração inicial e final de xilose (g/L).

- Produtividade volumétrica em xilitol (g/L.h)

$$Q_p = \frac{\Delta P}{t} = \frac{P_f - P_i}{t} \quad (5)$$

Onde:

P_i e P_f = concentração inicial e final de xilitol (g/L) e

t = tempo de reação (h).

- Eficiência do bioprocesso (%)

$$\eta = \frac{Y_{p/s}}{Y'_{p/s}} \times 100 \quad (6)$$

η = Eficiência do bioprocesso (%).

$Y_{P/S}$ = fator de conversão de xilose em xilitol (g/g)

$Y'_{P/S}$ = fator de conversão de xilose em xilitol teórico (0,917 g/g)

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização da palha de arroz

Os resultados de composição da palha de arroz nas diferentes etapas de seu processamento são mostrados na Tabela 4. Inicialmente, a palha de arroz *in natura* foi tratada com NaOH sob as condições previamente otimizadas por Castro e colaboradores (2016). Este tratamento teve como principal objetivo promover uma desacetilação dos grupos acetil, os quais normalmente são solubilizados na fração hemicelulósica após a hidrólise ácida na forma de ácido acético. Após a desacetilação, foi recuperado 70 % de sólidos, com um conteúdo de grupos acetil muito inferior quando comparado a palha *in natura*, mostrando que o tratamento alcalino promoveu uma redução de mais de 80 % de grupos acetil, e consequentemente uma menor solubilização de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico após hidrólise ácida. Em relação a celulose e hemicelulose, nota-se que a composição destas frações (g/100g) é maior que a da palha *in natura*. Isto ocorre devido a perda de outros componentes, que por proporção faz aumentar o conteúdo destas frações, mas considerando a porcentagem de sólidos recuperados (70 %), foi obtido 29,5 g de celulose e 16,7 g de hemicelulose, mostrando que estas frações foram em maior parte preservadas. Ainda na Tabela 5, nota-se que o conteúdo de cinzas, o qual corresponde aos minerais da palha de arroz, foi reduzido após o tratamento alcalino (cerca de 30 %), mas após a hidrólise ácida da palha desacetilada não houve perda de cinzas.

Com relação a fração sólida obtida após a hidrólise ácida, nota-se uma relação de cerca de 9,9 entre celulose e hemicelulose, enquanto esta relação na palha de arroz apenas desacetilada, foi de cerca de 1,8. Isto mostra que após a hidrólise ácida da palha desacetilada, grande parte da hemicelulose foi solubilizada no hidrolisado (fração líquida). O conteúdo de lignina total foi aumentado em 1,55 vezes após a hidrólise ácida quando comparado a palha desacetilada.

Tabela 4 - Composição química da fração sólida da palha de arroz *in natura*, após desacetilação e após a hidrólise ácida (HA).

Composição (g/100g)	<i>In natura</i>	Desacetilada	HA
Celulose	34,6	42,1	58,2
Hemicelulose	22,0	23,9	5,9
Xilana	19,3	20,5	5,9
Arabinana	2,7	3,4	nd
Grupos acetil	2,5	0,4	nd
Lignina total	15,5	12,5	19,4
Lignina insolúvel	12,9	10,9	18,3
Lignina solúvel	2,6	1,5	1,1
Cinzas	13,9	9,6	9,7
Outros	11,5	11,4	6,8
Total	100	100	100
Sólidos recuperados (%)	100	70	41,1

Fonte: Autoria própria.

Nota: nd: não detectado.

A composição da fração líquida (hidrolisado hemicelulósico) obtida após o tratamento com ácido diluído da palha de arroz desacetilada está mostrada na Tabela 5. Com base nos teores de xilose e arabinose obtidos, a eficiência de hidrólise da hemicelulose foi de 94,4 %, mostrando que o tratamento ácido da palha de arroz desacetilada nas condições utilizadas no presente trabalho foi efetivo para recuperação de pentoses da hemicelulose. Castro et al. (2016) obtiveram uma eficiência de hidrólise da hemicelulose de 76 % a partir da palha de arroz desacetilada, com um tratamento com ácido diluído nas condições otimizadas de 1 % (p/v) H₂SO₄, a 121 °C, durante 85 minutos. Isto mostra que o uso das condições do tratamento com ácido diluído (0,85 % p/v, 150 °C, 10 minutos) usadas neste presente trabalho promoveu uma maior eficiência de hidrólise da hemicelulose. O hidrolisado hemicelulósico obtido por Castro et al. (2016), apresentou uma concentração de 368,9 mg/L de furfural (produto de degradação de pentoses), enquanto no hidrolisado deste presente estudo não foi detectado furfural, demonstrando a não ocorrência de degradação de pentoses, como a xilose.

Ainda na Tabela 5, nota-se que o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz apresentou baixo nível de ácido acético (< 0,01 g/L), confirmando a eficiência de remoção de grupos acetil na etapa de desacetilação. Moya et al. (2016) estudaram a desacetilação da biomassa de podas de oliveira, em que as condições otimizadas (60 °C, 0,8 % NaOH, 60

minutos) seguida de hidrólise com ácido oxálico em diversas condições, promoveu um hidrolisado com baixo conteúdo de ácido acético, não excedendo 0,33 g/L, enquanto em hidrolisado não desacetilado, a concentração de ácido acético apresentou uma variação de 0,85 a 3,3 g/L, demonstrando a grande importância da etapa de desacetilação na redução de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico.

Tabela 5 - Composição do hidrolisado hemicelulósico da palha *in natura* (HH_{PIN}), palha desacetilada (HH_{PD}), palha desacetilada concentrado (HH_{PDC}) e palha desacetilada concentrado detoxificado com carvão ativado (HH_{PDCD}) obtido pelo pré-tratamento com ácido diluído.

Componentes	HH _{PIN}	HH _{PD}	HH _{PDC}	HH _{PDCD}
<u>Açúcares (g/L)</u>				
Glicose	3,6 ± 0,18	3,1 ± 0,15	9,8 ± 0,40	8,70 ± 0,07
Xilose	19,5 ± 1,75	20,9 ± 0,30	65,1 ± 1,20	57,70 ± 0,86
Arabinose	3,3 ± 0,35	4,8 ± 0,20	14,2 ± 0,90	13,80 ± 0,10
<u>Ácidos fracos (g/L)</u>				
Ácido acético	1,35 ± 0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,01
<u>Fenólicos (mg/L)</u>				
Álcool vanilil	97,9 ± 7,80	94,9 ± 4,80	132,5 ± 14,90	0,60 ± 0,02
Ácido vanílico	36,5 ± 2,80	13,9 ± 2,20	43,6 ± 0,50	0,02 ± 0,001
Ácido p-cumárico	20,3 ± 1,30	3,4 ± 0,09	12,84 ± 0,40	0,27 ± 0,01
Vanilina	17,2 ± 2,20	-	11,4 ± 0,40	-
<u>Furanos (mg/L)</u>				
5-HMF	55,1 ± 2,90	18,6 ± 1,90	67,5 ± 5,30	1,98 ± 0,03
Furfural	2,9 ± 0,90	-	4,7 ± 0,03	0,36 ± 0,01

Fonte: Autoria própria.

Diversos estudos mostram que o ácido acético pode causar efeito inibitório no metabolismo de leveduras como *Candida guilliermondii* (FELIPE et al. 1995; SILVA et al. 2004) e *Saccharomyces cerevisiae* (LINDBERG et al. 2013). No estudo realizado por Felipe et al. (1995) empregando células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 para a produção de xilitol a partir de xilose, ficou demonstrado que o aumento da concentração de ácido acético até 1,0 g/L favoreceu os parâmetros relacionados a produção de xilitol, apresentando valores máximos de $Y_{P/S} = 0,82$ g/g e $Q_P = 0,57$ g/L.h. Os menores consumos de xilose ocorreram em concentrações mais elevadas de ácido acético (6 g/L e 12 g/L) no meio, e houve uma

redução de 50 % na produção de xilitol em meio contendo 12 g/L de ácido acético, mostrando que este ácido em altas concentrações apresenta certa toxicidade para esta levedura. Sendo assim, a remoção de grupos acetil a partir da biomassa lignocelulósica é uma forma de contribuir para a redução do grau de inibição dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos por hidrólise ácida.

Em relação aos compostos fenólicos analisados no hidrolisado hemicelulósico (Tabela 4), verificou-se que a maioria dos compostos tiveram seus níveis aumentados após a concentração do hidrolisado, porém em proporções menores do que o fator de concentração ($f = 3$), o que demonstra uma possível perda por volatilidade ou degradação. Nota-se ainda que o nível de 5-HMF foi praticamente aumentado no mesmo fator de concentração aplicado. De acordo com Mussatto e Roberto (2004), a concentração de hidrolisado hemicelulósico por evaporação à vácuo, além de ser utilizado para aumentar a concentração de açúcares, é também considerado um método de detoxificação física, onde compostos voláteis são reduzidos. Porém, este procedimento pode aumentar os níveis de compostos não voláteis, tais como 5-HMF, o que poderia aumentar a toxicidade do hidrolisado.

5.2 Avaliação do cultivo de *Candida guilliermondii* em meio semi-definido e em hidrolisado hemicelulósico suplementado com extrato de levedura ou extrato de farelo de arroz

Para efeito de comparação, nesta etapa foi avaliado o cultivo de *Candida guilliermondii* em meio semi-definido, constituído de xilose e sais minerais suplementado com extrato de levedura (3 g/L) ou extrato de farelo de arroz (20 % v/v). Os dados obtidos quanto a concentração celular, consumo de xilose e produção de xilitol em função do tempo estão mostrados na Figura 22.

Figura 22 - Concentração celular, consumo de xilose e produção de xilitol ao longo do cultivo de células de *Candida guilliermondii* em meio suplementado com extrato de farelo de arroz (●) e extrato de levedura (■).

Fonte: Autoria própria.

É possível analisar na Figura 22 que após 48 horas a concentração celular obtida em meio suplementado com extrato de farelo de arroz (EFA) foi cerca de 4 vezes superior quando comparado ao meio suplementado com extrato de levedura (EL). É possível analisar uma concentração celular de $2,99 \text{ g/L} \pm 0,21$ e de $0,75 \text{ g/L} \pm 0,08$ em meio contendo extrato de farelo de arroz e extrato de levedura, respectivamente. Nota-se ainda que as células cultivadas em meio suplementado com extrato de farelo de arroz foram capazes de consumir toda o conteúdo de xilose após 48 horas, enquanto em meio suplementado com extrato de levedura o máximo consumo (78,8 %) ocorreu após 96 horas, mostrando que a composição do extrato de farelo de arroz favoreceu o consumo de xilose. Com relação a produção de xilitol, nota-se uma diferença ainda mais expressiva entre os dois meios, sendo observada uma produção de cerca de 10 vezes superior em meio suplementado com extrato de farelo de arroz, onde as células produziram $17,25 \text{ g/L} \pm 1,46$ de xilitol, enquanto as células em meio suplementado com extrato de levedura produziram apenas $1,66 \text{ g/L} \pm 0,02$ após 48 horas de cultivo.

Além da baixa produção de xilitol, o meio suplementado com extrato de levedura apresentou grande produção de arabitól (Figura 23). Isto provavelmente foi resultado de algum desvio de metabolismo. De acordo com Gong et al. (1983), leveduras do gênero *Candida* são capazes de utilizar xilose como substrato para geração de xilitol, que pode ser convertido a xilulose e a partir deste gerar arabitól, fazendo com que a produção de xilitol seja reduzida. Entretanto, este desvio do metabolismo pode ter sido resultado da menor disponibilidade de um determinado nutriente quando o meio foi suplementado com extrato de levedura.

Figura 23 - Produção de arabitól por células de *Candida guilliermondii* cultivadas em meio suplementado com extrato de levedura.

Fonte: Autoria própria.

O favorecimento da produção de biomassa no meio suplementado com extrato de farelo de arroz mostra que as características nutricionais deste extrato são mais adequadas para o crescimento destas células. O extrato de farelo de arroz e o extrato de levedura são fontes de nitrogênio ricas em vitaminas e minerais essenciais para o metabolismo e crescimento celular. O farelo de arroz é composto por 13 % de proteína, 45 % de carboidratos, 13 % de lipídeos, 14 % de fibras e 16 % de cinzas, levando em consideração 91 % de matéria seca, e baixíssimo teor de cálcio, 0,03 % (MILLER; CHURCHILL, 1986; LIMA et al. 2000). Já o extrato de levedura contém cerca de 50 % de proteína, 22,2 % de carboidratos, 11,7 % de cinzas, 0,4 % de lipídeos, 2,95 % de fibras e 0,12 % de cálcio considerando matéria seca (YAMADA et al. 2003; VILELA et al. 2000). Além destes componentes, pode também ocorrer variação dos níveis de vitaminas e minerais presentes em farelo de arroz e extrato de levedura, sendo que cada microrganismo se adapta de uma forma diferente a cada uma destas fontes de nitrogênio.

Outra possível justificativa para o favorecimento do crescimento de células de *Candida guilliermondii* em meio suplementado com extrato de farelo de arroz é a presença de biotina no farelo de arroz. De acordo com Calbon et al. (2008), o farelo de arroz é composto por diversas vitaminas, incluindo alta concentração de biotina (60 µg/100g). Esta é uma vitamina que atua como cofator e na síntese de certas enzimas (AHMAD et al. 1962). De acordo com Lee et al. (1987) a biotina tem um papel importante no crescimento de células de *Candida guilliermondii*. Estes autores demonstraram que a limitação de biotina (< 0,25 µg/L) reduz o crescimento, a taxa de utilização de xilose e a produção de xilitol por *Candida guilliermondii*. Em outro estudo, Dunwell et al. (1961), constataram que a deficiência de biotina no meio causa mudanças na síntese de polissacarídeos de parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

Ainda com relação ao crescimento das células de *Candida guilliermondii* nos diferentes meios, foi constatado que em meio suplementado com extrato de levedura ocorreu alto índice de floculação das células (Figura 24), o que pode ser atribuído ao diferente aspecto nutricional deste meio.

Figura 24 - Imagem microscópica das células de *Candida guilliermondii* em meio suplementado com extrato de levedura (esquerda) ou extrato de farelo de arroz (direita) após 48 horas de cultivo.

Fonte: Autoria própria.

O mecanismo de floculação é baseado na interação de proteínas Flo com resíduos de manose de parede celular de células vizinhas, em que o cálcio é fundamental para as células se agregarem devido a sua função de tornar ativa a conformação de proteínas Flo (GOSENS et al. 2015). Soares (2010) afirmou que a floculação é influenciada por diversos fatores, como presença de cátions, pH, temperatura, oxigênio, açúcares, etanol, idade do inóculo, densidade celular e agitação mecânica. Uma das possibilidades para a ocorrência da floculação nas células de *Candida guilliermondii* em meio suplementado com extrato de levedura, é o fato deste meio apresentar mais cálcio em sua constituição do que o extrato de farelo de arroz, e isto juntamente com o cálcio adicionado ao meio (CaCl_2 0,1g/L) ter favorecido esse mecanismo de agregação. Adicionalmente, Soares (2010) afirmou que a presença de açúcares no meio afeta a floculação, podendo influenciar nas interações célula-célula na superfície celular e na regulação dos genes Flo. No primeiro caso, os açúcares competem com os receptores de floculação (açúcares da parede celular de levedura) para as proteínas Flo, reduzindo a ocorrência de floculação, e no segundo caso os açúcares podem afetar a expressão das proteínas Flo. No presente estudo, a presença e/ou ausência de determinada vitamina e/ou mineral no meio com extrato de levedura também pode ter favorecido o fenômeno de floculação.

Células que floculam tendem a decantar mais rapidamente do que células que não floculam, dessa maneira, a Figura 25 demonstra que após 5 horas as células em meio suplementado com extrato de levedura estavam decantadas, uma vez que o sobrenadante estava límpido, enquanto as células cultivadas em meio suplementado com extrato de farelo de arroz ainda estavam bem distribuídas sem demonstrar total decantação.

Figura 25 - Perfil de decantação das células de *Candida guilliermondii* em meio suplementado com extrato de farelo de arroz (EFA) ou extrato de levedura (EL) após 5 horas.

Fonte: Autoria própria.

Além da concentração celular, o número de células totais/mL também foi analisado através da contagem de células na câmara de Neubauer, conforme mostrado na Figura 26. Nesta Figura é possível observar que após 48 h de cultivo, $1,45 \times 10^8$ células totais/mL estavam presentes no meio suplementado com extrato de farelo de arroz, enquanto em meio suplementado com extrato de levedura foi obtido $0,4 \times 10^8$ células totais/mL. Isto mostra que o meio suplementado com extrato de farelo de arroz apresentou um valor 3,5x maior que o meio suplementado com extrato de levedura, sendo esta diferença semelhante a obtida em termos de concentração celular, que foi de 4 vezes. Adicionalmente, foi possível notar que após 48 h, mesmo após todo o consumo de xilose, o número de células totais/mL aumentou no meio suplementado com extrato de farelo de arroz, mostrando a provável presença de fontes de carbono neste extrato. Em termos de viabilidade celular (%), ambos os cultivos apresentaram semelhança, com uma viabilidade de cerca de 98 % ao longo de todo o cultivo. Isto mostra que as características nutricionais de ambos os meios favoreceram a viabilidade celular. Entretanto, o extrato de farelo de arroz parece apresentar uma constituição mais adequada para o crescimento das células de *Candida guilliermondii*.

Figura 26 - Células totais/mL e viabilidade celular (%) em meio semi-definido suplementado com extrato de farelo de arroz (●) ou extrato de levedura (■).

Fonte: Autoria própria.

Silva et al. (2014) e Hernández-Pérez et al. (2016) prepararam o inóculo de células de *Candida guilliermondii* utilizando meio com xilose (30 g/L); extrato de farelo de arroz (20 g/L); (NH₄)₂SO₄ (3 g/L) e CaCl₂·2H₂O (0,1 g/L) anterior a etapa de fermentação em hidrolisado hemicelulósico, mostrando que o meio semi-definido suplementado com extrato de farelo de arroz tem sido utilizado em estudos com *Candida guilliermondii*.

O meio suplementado com extrato de farelo de arroz pode ser uma estratégia promissora para promover o crescimento celular para posterior uso na etapa de biotransformação, além de ser considerado uma fonte de nitrogênio menos custosa quando comparado a outras fontes, como o extrato de levedura e peptona (MILESSI et al. 2013; ANANDA et al. 2011). Após as análises sobre o crescimento celular em meio semi-definido,

ficou demonstrado que as células em meio suplementado com extrato de farelo de arroz atingiram uma concentração celular de $2,99 \text{ g/L} \pm 0,21$ e um total consumo de xilose após 48 horas de cultivo.

A Tabela 6 sumariza os resultados obtidos em meio semi-definido (adicionado de sais e suplementado com extrato de levedura ou extrato de farelo de arroz) após 48 horas de cultivo.

Tabela 6 - Consumo de xilose, produção de xilitol, produção de biomassa celular, $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$ a partir de células de *Candida guilliermondii* cultivadas em meio semi-definido suplementado com extrato de levedura (EL) ou extrato de farelo de arroz (EFA).

<i>Meio</i>	<i>Consumo de xilose (%)</i>	<i>Xilitol (g/L)</i>	<i>Biomassa celular (g/L)</i>	<i>$Y_{P/S}$ (g/g)</i>	<i>$Y_{X/S}$ (g/g)</i>
EFA	100 ± 0	$17,25 \pm 1,46$	$2,99 \pm 0,21$	$0,52 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,02$
EL	$41,73 \pm 0,23$	$1,66 \pm 0,02$	$0,75 \pm 0,08$	$0,13 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0,01$

Fonte: Autoria própria.

Com base nos resultados apresentados, é possível concluir que o meio semi-definido suplementado com extrato de farelo de arroz é mais adequado do que o extrato de levedura para o cultivo de *Candida guilliermondii*. Além disso, o meio suplementado com extrato de levedura induziu a floculação das células e produção de arabitól, o que demonstra uma alteração morfológica e um desvio de metabolismo. Mais especificamente, o meio suplementado com extrato de farelo de arroz apresentou uma biomassa celular de 4 vezes superior ao meio suplementado com extrato de levedura após 48 horas de cultivo. Adicionalmente, o meio suplementado com extrato de farelo de arroz apresentou um $Y_{X/S}$ em torno de 1,50 vezes maior que o meio suplementado com extrato de levedura. Dessa maneira, o meio semi-definido suplementado com extrato de farelo de arroz foi selecionado para as etapas referentes a permeabilização. Conforme demonstrado o perfil de concentração celular em função do tempo neste meio semi-definido, as células de *C. guilliermondii* atingiram um consumo maior que 50 % de xilose após 24 h de cultivo. Dessa maneira, o tempo de 24 h foi estabelecido para a adição de Triton X-100 para a permeabilização celular, durante 50 minutos.

Para efeito de comparação com o meio semi-definido, também foi avaliado o cultivo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz adicionado dos mesmos sais e suplementado com as mesmas fontes de nitrogênio (extrato de levedura ou extrato de farelo de arroz). Adicionalmente, também foi avaliado o hidrolisado sem qualquer suplementação.

Na Figura 27 está demonstrada a concentração celular, consumo de xilose e produção de xilitol em função do tempo. Nota-se que após 54 horas de cultivo, o hidrolisado hemicelulósico suplementado com extrato de farelo de arroz apresentou uma concentração celular de $2,83 \text{ g/L} \pm 0,03$, enquanto em hidrolisado hemicelulósico suplementado com extrato de levedura foi atingido $2,00 \text{ g/L} \pm 0,29$ e o hidrolisado sem suplementação $1,72 \text{ g/L} \pm 0,39$ de concentração celular. Estes resultados revelam que similar ao meio semi-definido, a suplementação com extrato de farelo de arroz favoreceu o crescimento de *Candida guilliermondii* em relação a suplementação com extrato de levedura. Porém, a variação na concentração final de biomassa foi menor (cerca de 1,4 vezes). É importante ainda observar que a concentração final de biomassa no hidrolisado com extrato de levedura foi igual ao obtido no hidrolisado hemicelulósico sem suplementação, sugerindo que o hidrolisado já contém nutrientes necessários para o crescimento das células e que a suplementação com extrato de levedura não mostrou qualquer efeito positivo.

Células cultivadas em hidrolisado hemicelulósico suplementado com extrato de farelo de arroz ou extrato de levedura mostraram um consumo total de xilose após 54 horas de cultivo, enquanto em hidrolisado sem suplementação o consumo desta pentose foi de apenas 53,25 %. Em relação a produção de xilitol, nota-se que no hidrolisado não suplementado a produção foi cerca de 5,7 vezes inferior em relação aos outros hidrolisados, sugerindo que a suplementação nutricional é relevante para a síntese deste poliál.

Figura 27 - Concentração celular, consumo de xilose e produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico suplementado com extrato de farelo de arroz (—●—), extrato de levedura (—■—) ou sem suplementação (—◆—).

Fonte: Autoria própria.

A Figura 28 contém as imagens das células visualizadas em microscópio no aumento de 40x. Foi possível observar que após 72 horas de cultivo, as células de *Candida guilliermondii* apresentaram uma forma e tamanho semelhante nos diferentes hidrolisados (suplementado ou não).

Figura 28 - Imagem das células cultivadas em hidrolisado suplementado com extrato de farelo de arroz (EFA), extrato de levedura (EL) e sem suplementação após 72 horas.

Fonte: Autoria própria.

Além da concentração celular, o número de células totais/mL durante o cultivo também foi avaliado, mostrando que o hidrolisado suplementado com extrato de farelo de arroz apresentou $5,2 \times 10^8$ células totais/mL, enquanto o hidrolisado suplementado com extrato de levedura obteve $4,3 \times 10^8$, e o sem suplementação, $4,0 \times 10^8$ células totais/mL após 52 horas de cultivo (Figura 29). Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos para a concentração celular, em que o hidrolisado suplementado com extrato de levedura e o sem suplementação apresentaram valores similares de biomassa final, reforçando o fato de que o extrato de levedura não favoreceu o crescimento celular.

Em relação a viabilidade celular (Figura 29), foi possível observar que independentemente da suplementação nutricional dos hidrolisados hemicelulósicos, as células se mantiveram viáveis (na faixa de 99 %) durante todo o período de 72 horas.

Figura 29 - Variação das células totais e da viabilidade celular durante o cultivo em hidrolisado hemicelulósico suplementado com extrato de farelo de arroz (●) ou extrato de levedura (■) ou sem suplementação (◆).

Fonte: Autoria própria.

Para uma análise comparativa dos resultados obtidos no cultivo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico após 54 horas (suplementado ou não) e em meio semi-definido após 48 horas (suplementado), os dados foram sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7 - Parâmetros do cultivo de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e em meio semi-definido.

<i>Meio</i>	<i>t_f</i> (h)	<i>Consumo de xilose</i> (%)	<i>Xilitol</i> (g/L)	<i>Biomassa celular</i> (g/L)	<i>Y_{P/S}</i> (g/g)	<i>Y_{X/S}</i> (g/g)
HH(EFA)	54	100 ± 0	11,75 ± 0,22	2,83 ± 0,03	0,41 ± 0,01	0,08 ± 0,01
HH(EL)	54	100 ± 0,01	10,67 ± 0,15	2,00 ± 0,29	0,36 ± 0,01	0,06 ± 0,02
HH(NS)	54	53,25 ± 5,45	1,93 ± 0,43	1,72 ± 0,39	0,19 ± 0,01	0,08 ± 0,01
SD(EFA)	48	100 ± 0	17,25 ± 1,46	2,99 ± 0,21	0,52 ± 0,01	0,09 ± 0,02
SD(EL)	48	41,73 ± 0,23	1,66 ± 0,02	0,75 ± 0,08	0,13 ± 0,01	0,06 ± 0,01

Fonte: Autoria própria.

Nota: HH: hidrolisado hemicelulósico;

SD: meio semi-definido;

EFA: extrato de farelo de arroz;

EL: extrato de levedura;

NS: não suplementado;

t_f: tempo final.

É possível constatar na Tabela 7 que o hidrolisado hemicelulósico adicionado dos mesmos sais utilizados no meio semi-definido e suplementado com extrato de farelo de arroz foi o que gerou maior concentração celular (2,83 g/L) quando comparado aos outros hidrolisados. No entanto, os maiores valores de fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) foram observados em hidrolisado suplementado com extrato de farelo de arroz e hidrolisado sem suplementação. Sendo assim, o hidrolisado sem qualquer suplementação será utilizado nos ensaios referentes a permeabilização. Conforme demonstrado na Tabela 7, as células de *C. guilliermondii* atingiram um consumo maior que 50 % de xilose após 54 h de cultivo em hidrolisado hemicelulósico sem suplementação. Dessa maneira, este tempo foi selecionado para a adição de Triton X-100 para a permeabilização celular durante 50 minutos.

5.3 Efeito do meio de permeabilização celular sobre a biotransformação de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*

Após a adição de Triton X-100 no tempo de 24 horas para meio semi-definido e 54 horas para hidrolisado hemicelulósico, as células foram mantidas nas condições de cultivo por mais 50 minutos para sua permeabilização. Ao final do processo, as células permeabilizadas foram concentradas e transferidas para meio de biotransformação (meio definido ou hidrolisado hemicelulósico) conforme mostrado na Figura 30. Para esta etapa de biotransformação, os meios (definido ou hidrolisado hemicelulósico) continham 60 g/L de xilose, porém, o meio definido foi adicionado de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,0 g/L) e tampão fosfato de potássio (0,1 M). O ensaio E1 de biotransformação mostrado na Figura 25 seguiu o protocolo experimental definido por Cortez, Mussatto e Roberto (2016) e os resultados foram utilizados como referência.

Figura 30 - Esquema das etapas realizadas para a biotransformação em meio definido e em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 31 mostra os perfis de concentração celular, consumo de xilose e produção de xilitol nos diferentes ensaios de biotransformação.

Figura 31 - Concentração celular, consumo de xilose e produção de xilitol durante os ensaios de biotransformação em meio definido e em hidrolisado por células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100.

Fonte: Autoria própria.

É possível observar na Figura 31 que a concentração celular em todos os ensaios apresentou pouca variação ao longo do tempo. Porém, as maiores variações ocorreram quando a biotransformação foi realizada em hidrolisado hemicelulósico (ensaios E2 e E4), independente do meio de permeabilização, mostrando que o hidrolisado, por apresentar uma constituição rica em termos de nutrientes, favoreceu o crescimento celular quando comparado com o meio definido de biotransformação.

Com relação ao consumo de xilose ao longo do tempo, é possível observar perfis semelhantes de assimilação desta fonte de carbono apenas nos ensaios E1 e E2, os quais foram conduzidos com células permeabilizadas em meio semi-definido. Nestes ensaios, o consumo total desta pentose ocorreu com 17 horas de biotransformação, enquanto nos ensaios realizados com células permeabilizadas em hidrolisado (E3 e E4), neste mesmo tempo foi observado um residual de xilose de $8,62 \pm 0,16$ e $13,63 \text{ g/L} \pm 1,50$, respectivamente.

É possível observar ainda na Figura 31, que a produção de xilitol variou de 23,74 a 41,02 g/L, onde a maior produção ocorreu no ensaio de biotransformação em meio definido (E1) seguido do ensaio de biotransformação em hidrolisado hemicelulósico (E2), sendo ambos realizados por células permeabilizadas em meio semi-definido. Os menores níveis de xilitol ocorreram nos ensaios de biotransformação a partir de células permeabilizadas em hidrolisado hemicelulósico (E3 e E4). Vale destacar que os resultados de produção de xilitol obtidos no ensaio E1 ($41,02 \text{ g/L} \pm 0,70$ após 17 horas), foram semelhantes aos obtidos por Cortez, Mussatto e Roberto (2016) (42 g/L após 16 horas), revelando assim a reprodutibilidade do processo.

Com base nestes dados, é possível afirmar que o meio de permeabilização das células afeta o perfil de utilização do substrato e produção de xilitol durante a biotransformação, e para melhor analisar este efeito a Tabela 8 sumariza os resultados da biotransformação nos diferentes ensaios.

Tabela 8 - Concentração celular, consumo de xilose, produção de xilitol e formação de subprodutos, fator de conversão de xilose em xilitol, produtividade volumétrica, pH_{final} e viabilidade celular nos diferentes ensaios de biotransformação após 17 horas.

Ensaio	Concentração celular (g/L)	Consumo De Xilose (%)	Xilitol (g/L)	Subprodutos (g/L)		Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/L.h)	Viabilidade (%)	pH _{final} (ΔpH)
				Etanol	Glicerol				
E1	10,74 (± 0,60)	100	41,02 (± 0,70)	1,81 (± 0,04)	0	0,69 (± 0,02)	2,39 (± 0,04)	98,80 (± 1,70)	6,72 (0,12)
E2	12,63 (± 1,15)	96,01 (± 1,03)	32,58 (± 0,24)	6,43 (± 0,46)	5,35 (± 0,01)	0,58 (± 0,01)	1,86 (± 0,01)	97,87 (± 1,48)	5,48 (1,22)
E3	10,32 (± 0,28)	82,80 (± 0,34)	29,43 (± 0,82)	0,75 (± 0,05)	0	0,71 (± 0,02)	1,73 (± 0,04)	99,09 (± 1,29)	6,70 (0,13)
E4	12,62 (± 0,37)	75,30 (± 2,70)	23,74 (± 0,11)	4,42 (± 0,02)	5,26 (± 0,12)	0,56 (± 0,01)	1,38 (± 0,01)	99,10 (± 1,27)	6,20 (0,63)

Fonte: Autoria própria.

Nota: A média da concentração celular inicial de todos os ensaios foi de 10,43 g/L ± 0,62 e a média da concentração inicial do pH de todos os ensaios foi de 6,8 ± 0,07;

E1: biotransformação em meio definido por células permeabilizadas em meio semi-definido;

E2: biotransformação em hidrolisado por células permeabilizadas em meio semi-definido;

E3: biotransformação em meio definido por células permeabilizadas em hidrolisado;

E4: biotransformação em hidrolisado por células permeabilizadas em hidrolisado.

Nota-se na Tabela 8 que após 17 horas a concentração celular em todos os ensaios apresentou uma variação de 5,09 a 15,57 %, ocorrendo de forma mais pronunciada nos ensaios de biotransformação em hidrolisado (E2 e E4). Estes ensaios apresentaram formação de subprodutos (etanol e glicerol) bastante superior quando comparado aos ensaios de biotransformação em meio definido (E1 e E3), mostrando que nestes meios de biotransformação, células de *C. guilliermondii* utilizaram o substrato para crescimento celular e formação de subprodutos metabólitos, devido possivelmente a elevada qualidade nutricional do hidrolisado hemicelulósico. Adicionalmente, os mesmos ensaios que apresentaram maior produção de subprodutos metabólitos (E2 e E4), também mostraram maior variação do pH quando comparado às biotransformações em meio definido (E1 e E3).

O hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, além de açúcares, apresenta em sua constituição fontes de nitrogênio. Segundo Carneiro et al. (2011), este hidrolisado concentrado 7 vezes contém uma concentração considerável de nitrogênio total (2,80 g/L), sendo em sua maioria constituída por nitrogênio orgânico, os quais foram possivelmente provenientes de aminoácidos liberados durante a etapa de hidrólise da palha de arroz. Adicionalmente, Silva et al. (2011) mostraram que o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz apresenta além de açúcares, diversos minerais, como sulfato, potássio, ferro, manganês, magnésio, fosfato, cromo, alumínio, sódio, cálcio, zinco e cobre. Sendo assim, esta composição do hidrolisado pode ter afetado o processo de biotransformação de xilose em xilitol, devido a ocorrência do metabolismo celular para o crescimento e formação de subprodutos metabólitos (etanol e glicerol). Conforme descrito por Hahn-Hagerdal et al. (1994), toda a xilose metabolizada pela célula é encaminhada pela via das pentoses fosfato (PPP). A xilose ao entrar nesta via passa por reações até ser convertida a gliceraldeído-3-fosfato. Esta molécula será então metabolizada pela glicólise para piruvato, que via acetil-CoA entrará no ciclo do ácido tricarboxílico, ocorrendo aumento da biomassa celular. Em contrapartida, para a formação de etanol, a molécula de gliceraldeído-3-fosfato será convertida em piruvato e este para acetaldeído, e finalmente, será produzido etanol. Adicionalmente, o glicerol também pode ser um subproduto do metabolismo de glicose ou xilose em cultivos realizados com baixas concentrações de oxigênio (PETROVSKA et al. 1999).

Já em relação aos ensaios de biotransformação em meio definido (60 g/L xilose, 1,0 g/L $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ e tampão fosfato de potássio 0,1 M), praticamente não ocorreu variação da concentração celular e produção de subprodutos metabólitos, mostrando que a composição do meio reacional desempenha um papel fundamental para o processo de biotransformação,

onde não é desejável que ocorra o desvio da fonte de carbono para formação de biomassa e/ou subprodutos metabólicos.

Nota-se que quando as células foram permeabilizadas em meio semi-definido, a produtividade volumétrica da biotransformação em meio definido ($Q_P = 2,39 \text{ g/L.h} \pm 0,04$) no ensaio E1 foi superior ao da biotransformação em hidrolisado hemicelulósico ($Q_P = 1,86 \text{ g/L.h} \pm 0,01$) no ensaio E2, apresentando uma redução na produtividade de 22 %. Já em relação ao fator de conversão de xilose em xilitol, no ensaio E1 foi obtido $0,69 \text{ g/g} \pm 0,02$, e no ensaio E2, $0,58 \text{ g/g} \pm 0,01$, o que equivale a um decréscimo de 16 %, mostrando que o meio de biotransformação a base de hidrolisado afetou negativamente os parâmetros do bioprocessos.

Ainda na Tabela 8, analisando os parâmetros referentes ao emprego de células permeabilizadas em hidrolisado hemicelulósico (E3 e E4), é possível observar que a biotransformação em meio definido (E3) apresentou um valor de produtividade volumétrica ($Q_P = 1,73 \text{ g/L.h} \pm 0,04$) superior ao observado na biotransformação em hidrolisado ($Q_P = 1,38 \text{ g/L.h} \pm 0,01$), o que corresponde a um aumento de 25 %. Este mesmo comportamento foi observado para o fator de conversão de xilose em xilitol em que aumentou de $0,56 \text{ g/g} \pm 0,02$ para $0,71 \text{ g/g} \pm 0,02$.

O efeito da composição do meio de permeabilização das células de *C. guilliermondii* sobre a biotransformação em meio definido pode ser avaliado através da comparação dos parâmetros de biotransformação entre os ensaios E1 e E3. Nestes ensaios o fator de conversão de xilose em xilitol foi bastante semelhante ($\sim 0,70 \text{ g/g}$), enquanto a produtividade volumétrica foi favorecida com o uso de células permeabilizadas em meio semi-definido (E1), mostrando um acréscimo de 38 % em relação ao uso de células permeabilizadas em hidrolisado (E3). Estes resultados sugerem que a conversão de xilose em xilitol independe do meio de permeabilização, mas a produtividade volumétrica em xilitol foi afetada, mostrando que a permeabilização celular em hidrolisado hemicelulósico pode ter sido prejudicada pela retenção de partículas do hidrolisado na membrana celular.

Este mesmo comportamento foi também observado na biotransformação em hidrolisado hemicelulósico (E2 e E4). Nestes ensaios o fator de conversão de xilose em xilitol foi bastante semelhante ($\sim 0,57 \text{ g/g}$), enquanto a produtividade volumétrica foi favorecida com o uso de células permeabilizadas em meio semi-definido (E2), mostrando um acréscimo de 35 % em relação ao uso de células permeabilizadas em hidrolisado (E4).

Os parâmetros de biotransformação no presente trabalho nas condições do ensaio E1 ($Q_P = 2,39$ g/L.h; $Y_{P/S} = 0,69$ g/g) quando comparados aos parâmetros de produção de xilitol em condições fermentativas obtidos por Cortez e Roberto (2006) ($Q_P = 0,66$ g/L.h; $Y_{P/S} = 0,75$ g/g) revelam um valor de 3,62 vezes superior na produtividade volumétrica em xilitol e similar nos fatores de conversão de xilose em xilitol. Neste processo fermentativo, Cortez e Roberto (2006) estudaram a produção de xilitol por células de *C. guilliermondii* em meio semi-definido (85 g/L de xilose inicial, 13 g/L de glicose, 3,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 20 % v/v de extrato de farelo de arroz) na presença de tampão fosfato de potássio (600 mmol) durante 72 horas, enquanto no presente estudo, a biotransformação foi realizada em meio definido (Xilose 60 g/L; $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1,0 g/L e tampão fosfato de potássio 0,1 M), obtendo-se a máxima produção de xilitol com apenas 17 horas, o que favoreceu a produtividade volumétrica. Este resultado pode ser explicado pelo uso de altas densidades celulares (10-12 g/L), as quais são limitantes no processo fermentativo. Por exemplo, Roberto et al. (1996a) estudando o efeito do nível de inóculo (0,67 a 2,41 g/L) na produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *Candida guilliermondii*, observaram uma produção máxima de xilitol (40,48 g/L) a partir de 80 g/L de xilose após 72 horas ($Q_P = 0,56$ g/L.h; $Y_{P/S} = 0,71$ g/g) empregando uma concentração de inóculo de 0,9 g/L, sendo constatado uma redução dos parâmetros acima desta concentração. Segundo os autores, este comportamento foi devido a uma menor disponibilidade de oxigênio no meio. De fato, o oxigênio é regulador das etapas iniciais do metabolismo de xilose. Estas reações iniciais são consideradas as etapas mais limitantes devido a diferença das exigências de oxigênio e cofator pelas duas primeiras enzimas, xilose redutase e xilitol desidrogenase. A xilose redutase requer o cofator NADPH para a conversão de xilose em xilitol, gerando a formação de NADP^+ , enquanto a xilitol desidrogenase requer NAD^+ para a conversão de xilitol para xilulose, gerando a produção de NADH. Enquanto o NADP^+ gerado na primeira conversão pode ser reduzido pela via das pentoses fosfato, o NADH será pouco reoxidado em condições de baixa concentração de oxigênio. Este desequilíbrio é refletido pela maior excreção do xilitol (HAHN-HAGERDAL et al. 1994). Sendo assim, a produção de xilitol necessita do controle de oxigênio no meio em processos fermentativos, pois uma maior concentração pode promover maiores desvios para crescimento celular, através do ciclo do ácido tricarboxílico e concentrações muito baixas podem limitar a regeneração de cofatores reduzidos. Já em relação ao presente estudo, o uso de altas concentrações celulares (10 a 12 g/L) promoveu aumento na produtividade volumétrica,

mostrando que o uso de altas densidades celulares no processo de biotransformação independe das vias metabólicas envolvidas na via das pentoses fosfato.

De uma forma geral, nota-se que os valores de fator de conversão de xilose em xilitol obtidos na biotransformação em hidrolisado hemicelulósico, E2 e E4, os quais as células foram permeabilizadas em meio semi-definido e em hidrolisado, respectivamente, foram semelhantes ($\sim 0,57$ g/g) em ambos os ensaios, mas inferiores (18,6 %) aos obtidos na biotransformação em meio definido ($\sim 0,70$ g/g). Isto sugere que a conversão de xilose em xilitol independe do meio de permeabilização, mas é afetada pelo meio de biotransformação a base de hidrolisado hemicelulósico. Estes resultados reforçam o fato de que o hidrolisado hemicelulósico é um meio complexo e que a enorme variedade de componentes pode ter prejudicado o processo de biotransformação. Conforme mostrado por Cortez, Mussatto e Roberto (2016), a capacidade biossintética das células de *C. guilliermondii* permeabilizada com Triton X-100 não foi afetada positivamente com a suplementação do meio definido com nutrientes (sulfato de amônio, cloreto de cálcio e farelo de arroz), sendo sugerido pelos autores que as células permeabilizadas contém níveis basais de enzimas essenciais para fornecer uma biotransformação eficiente de xilose a xilitol a partir do meio tamponado composto apenas por xilose como única fonte de carbono e cloreto de magnésio. Estes dados mostram que o processo de biotransformação não requer suplementação de nutrientes. Porém, apesar do hidrolisado hemicelulósico não ter sido suplementado com nutrientes no presente estudo, sua constituição rica em diversos componentes afetou o processo de biotransformação, de modo a favorecer a ocorrência do metabolismo celular.

O hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz obtido após a hidrólise com ácido diluído apresenta uma constituição complexa, com diversos componentes que possibilitam o desvio para o crescimento celular e formação de metabólitos durante a biotransformação em hidrolisado hemicelulósico. De fato, Silva et al. (2013) analisando o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado 7 vezes, mostrou a presença de diversos minerais, como sulfato, potássio, ferro, manganês, magnésio, fosfato, cromo, alumínio, sódio, cálcio, zinco e cobre. Em relação ao magnésio, que atua como cofator ou ativador de enzimas, a concentração foi de 923 mg/L. A presença de magnésio (Mg) no hidrolisado hemicelulósico é considerada positiva, devido ao fato deste fazer parte da composição do meio definido por Cortez, Mussatto e Roberto (2016). Estima-se que a concentração de magnésio (Mg) no hidrolisado do presente estudo esteja abaixo da quantidade que foi adicionada por Cortez, Mussatto e Roberto (2016). Além disso, o magnésio (Mg) no hidrolisado poderia não estar biodisponível sob a forma de cloreto de magnésio. Dessa

maneira, é possível sugerir que a baixa concentração de magnésio (Mg) no hidrolisado hemicelulósico pode ter sido um dos fatores limitantes no que se refere aos fatores de conversão, uma vez que estes foram inferiores na biotransformação em hidrolisado hemicelulósico quando comparado ao meio definido. Adicionalmente, a não suplementação do hidrolisado com tampão fosfato de potássio pode ter afetado a concentração iônica durante a biotransformação. Sendo assim, para avaliar o efeito do tampão fosfato de potássio e do $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre a biotransformação de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* permeabilizada com Triton X-100, foram realizados experimentos com e sem adição destes componentes, conforme o item a seguir.

5.4 Efeito do tampão fosfato de potássio e do $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre a biotransformação de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz

Nesta etapa foi avaliado o efeito do tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4 e KH_2PO_4) e do $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre a biotransformação de xilose em xilitol por células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100 empregando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Em todos os ensaios a permeabilização celular foi realizada em meio semi-definido conforme estabelecido na etapa anterior. Os ensaios foram conduzidos de acordo com uma matriz de planejamento experimental 2^2 com 3 pontos centrais (Tabela 9), onde estão mostrados os níveis reais das variáveis, bem como os resultados referentes ao consumo de xilose, produção de xilitol e pH_{final} .

Nota-se que para todos os ensaios, o consumo de xilose pela levedura foi acima de 90 % com uma produção de xilitol em torno de 30 g/L após 15 horas de biotransformação. Nota-se ainda que embora tenha ocorrido variação do pH, a suplementação de tampão fosfato de potássio promoveu uma menor variação independente da presença de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (E2 e E4).

Tabela 9 - Matriz de planejamento experimental utilizada para avaliar o efeito do tampão fosfato de potássio e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre a biotransformação de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* permeabilizada com Triton X-100 empregando hidrolisado hemicelulósico.

Ensaio	$\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (M)	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	Consumo de Xilose (%)	Xilitol (g/L)	pH_{final} (ΔpH)
1	0	0	$93,32 \pm 1,71$	$30,75 \pm 2,05$	5,65 (1,05)
2	0,1	0	$90,64 \pm 1,06$	$28,70 \pm 0,25$	6,52 (0,39)
3	0	1	$91,37 \pm 0,33$	$28,13 \pm 0,83$	5,38 (1,42)
4	0,1	1	$94,74 \pm 3,00$	$29,95 \pm 0,99$	6,55 (0,38)
5	0,05	0,5	92,76	30,39	5,87 (1,15)
6	0,05	0,5	93,33	28,78	5,84 (1,18)
7	0,05	0,5	89,02	27,7	5,82 (1,20)

Fonte: Autoria própria.

Nota: Média do pH inicial de todos os ensaios: $6,84 \pm 0,15$.

Os perfis de concentração celular, consumo de xilose e produção de xilitol em cada ensaio do planejamento estão mostrados na Figura 32. É possível observar que todos os ensaios de biotransformação apresentaram pouca variação da concentração celular ao longo do tempo, sendo observado um perfil similar de consumo de xilose e produção de xilitol em todos os ensaios.

Figura 32 - Concentração celular, consumo de xilose e produção de xilitol nos ensaios de biotransformação de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* permeabilizada com Triton X-100 empregando hidrolisado hemicelulósico conforme o planejamento experimental.

Fonte: Autoria própria.

M: média dos pontos centrais.

Para melhor analisar o efeito da suplementação de tampão fosfato de potássio e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre a biotransformação em hidrolisado hemicelulósico, os parâmetros relacionados a produção de xilitol foram calculados, conforme mostrado na Tabela 10. Nota-se que em todos os ensaios as células apresentaram uma viabilidade próxima a 100 %. Os valores de produtividade volumétrica variaram de 1,84 a 2,05 g/L.h e o fator de conversão de xilose em xilitol, de 0,54 a 0,58 g/g. Estes resultados revelam que a suplementação de tampão fosfato de potássio e/ou $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ não afetou os parâmetros de biotransformação, o que foi confirmado pela análise estatística dos dados conforme o gráfico de pareto (Figura 33).

Tabela 10 - Produtividade volumétrica e fator de conversão de xilose em xilitol nos ensaios de biotransformação em hidrolisado hemicelulósico por *C. guilliermondii* permeabilizada com Triton X-100 em meio semi-definido.

Ensaio	$\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (M)	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	Q_P (g/L.h)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Viabilidade celular (%)
1	0	0	$2,05 \pm 0,13$	$0,57 \pm 0,03$	$97,87 \pm 1,48$
2	0,1	0	$1,91 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,01$	$96,9 \pm 2,45$
3	0	1	$1,84 \pm 0,09$	$0,58 \pm 0,01$	$100 \pm 0,65$
4	0,1	1	$2,00 \pm 0,06$	$0,56 \pm 0,01$	$96,9 \pm 2,45$
5	0,05	0,5	2,03	0,56	100
6	0,05	0,5	1,92	0,54	98,7
7	0,05	0,5	1,85	0,57	99,3

Fonte: Autoria própria.

Nota: Condição padrão: pH = $6,84 \pm 0,15$; T = 35 °C; A = 200 rpm; $[\text{X}]_0 = 11,65 \pm 1,78$ g/L.

Figura 33 - Gráfico de Pareto para a estimativa dos efeitos da suplementação de tampão fosfato de potássio e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre os parâmetros ($Y_{P/S}$ e Q_P) da biotransformação de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* permeabilizada com Triton X-100 empregando hidrolisado hemicelulósico.

Fonte: Autoria própria.

Com base nesta análise estatística, é possível afirmar que a biotransformação de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* permeabilizada com Triton X-100 empregando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não necessita de custos adicionais relacionados

a suplementação com tampão fosfato de potássio e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. No entanto, os valores de produtividade volumétrica e fator de conversão de xilose em xilitol obtidos em hidrolisado sem qualquer suplementação, quando comparados ao meio definido, foram inferiores em 14,22 % e 17,40 %, respectivamente. Dessa maneira, outra possível hipótese para estes resultados seria a presença de inibidores no hidrolisado sobre a atividade das enzimas.

Conforme mostrado no presente estudo (Tabela 5), o hidrolisado hemicelulósico obtido por hidrólise ácida, além de apresentar açúcares, contém diversos compostos, como fenólicos (álcool vanilil, ácido vanílico, ácido p-cumárico e vanilina) e furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural) que atuam como inibidores do metabolismo celular. Os compostos fenólicos em geral promovem perda da integridade das membranas celulares, prejudicando a funcionalidade como barreira seletiva e matriz enzimática, afetando na assimilação do substrato (ZHAO et al. 2012). Zaldivar, Martinez e Ingram (2000) estudando o efeito de álcoois, aldeídos e ácidos aromáticos sobre o metabolismo fermentativo de microrganismos, demonstraram que a toxicidade do hidrolisado é mais pronunciada quando ocorre a combinação de diversos compostos do que o efeito individual de cada um.

Dessa maneira, com o objetivo de avaliar o efeito destes componentes sobre os parâmetros de biotransformação, o hidrolisado hemicelulósico foi submetido a um processo de detoxificação com carvão ativado. Este processo promove a adsorção destes componentes no carvão ativado. Mussatto, Santos e Roberto (2004) ao estudar o efeito do pH e da detoxificação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com carvão ativado, mostrou que na condição de adicionar carvão ativado (150 rpm, 45 °C, 60 minutos) no hidrolisado em pH 2,0 e posteriormente ajustá-lo para pH 6,5 promoveu uma remoção de 90 % de furfural e 72 % de 5-hidroximetilfurfural, com baixa remoção de xilose (11,5 %). Sendo assim, os ensaios de biotransformação empregando hidrolisado detoxificado ocorreram nas mesmas condições demonstradas no planejamento experimental 2² utilizado anteriormente, de modo a avaliar o efeito de tampão fosfato de potássio e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre a biotransformação, conforme mostrado na Tabela 11.

Tabela 11 - Matriz de planejamento experimental utilizada para avaliar o efeito do tampão fosfato de potássio e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre a biotransformação de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* permeabilizada com Triton X-100 empregando hidrolisado hemicelulósico detoxificado com carvão ativado.

Ensaio	$\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ (M)	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	Consumo de Xilose (%)	Xilitol (g/L)	pH_{final} (ΔpH)
1	0	0	$93,11 \pm 1,53$	$30,82 \pm 0,28$	5,23 (1,51)
2	0,1	0	$95,92 \pm 1,28$	$32,59 \pm 1,48$	6,68 (0,26)
3	0	1	$93,15 \pm 1,49$	$30,52 \pm 0,58$	5,32 (1,41)
4	0,1	1	$94,86 \pm 0,22$	$30,18 \pm 0,28$	6,62 (0,34)
5	0,05	0,5	93,94	30,59	6,03 (0,94)
6	0,05	0,5	96,07	32,15	5,95 (1,03)
7	0,05	0,5	93,91	30,58	5,92 (1,06)

Fonte: Autoria própria.

Nota: Média do pH inicial de todos os ensaios: $6,87 \pm 0,12$.

Assim como observado nos processos de biotransformação em hidrolisado hemicelulósico não detoxificado (planejamento anterior), o consumo de xilose foi acima de 90 % e a produção de xilitol semelhante e próxima a 30 g/L em todos os ensaios de biotransformação em hidrolisado detoxificado após 15 horas. Destaca-se que nos ensaios adicionados de tampão fosfato de potássio ocorre menor variação do pH, independente da presença de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

A detoxificação com carvão ativado com posterior correção do pH, tornou o hidrolisado mais límpido (Figura 34), devido a precipitação e/ou instabilidade dos componentes inibitórios e a adsorção destes no carvão ativado. Após a detoxificação do hidrolisado, foi possível observar que o conteúdo de xilose reduziu em apenas $11,24 \% \pm 1,32$ quando comparado ao hidrolisado não detoxificado e a concentração dos compostos fenólicos e furanos foi grandemente reduzida após este tratamento (Tabela 5 – item 5.1).

Figura 34 - Coloração do hidrolisado hemicelulósico não detoxificado e detoxificado com carvão ativado (CA) contendo células de *C. guilliermondii*.

Fonte: Autoria própria.

Os perfis de concentração celular, consumo de xilose e produção de xilitol em cada ensaio do planejamento empregando hidrolisado detoxificado estão mostrados na Figura 30. Nota-se pouca variação da concentração celular ao longo do tempo de biotransformação. Adicionalmente, todos os ensaios consumiram praticamente toda a xilose e apresentaram uma produção de xilitol praticamente máxima após 15 horas de biotransformação. O ensaio M mostrado na Figura 35 representa a média dos pontos centrais.

Para melhor analisar o efeito da suplementação de tampão fosfato de potássio e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre a biotransformação de xilose em xilitol empregando hidrolisado detoxificado, os parâmetros de biotransformação foram calculados, conforme mostrado na Tabela 12. Nota-se que em todos os ensaios as células apresentaram uma viabilidade próxima a 100 %. Adicionalmente, os valores de produtividade volumétrica variaram de 2,01 a 2,17 g/L.h e o fator de conversão de xilose em xilitol, de 0,57 a 0,59 g/g. Estes resultados revelam que a detoxificação do hidrolisado hemicelulósico com carvão ativado e a suplementação de tampão fosfato de potássio e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ neste hidrolisado não afetou os parâmetros de biotransformação, o que foi confirmado pela análise estatística dos dados conforme o gráfico de pareto (Figura 36).

Figura 35 - Concentração celular, consumo de xilose e produção de xilitol durante os ensaios de biotransformação de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* permeabilizada com Triton X-100 empregando hidrolisado hemicelulósico detoxificado com carvão ativado conforme o planejamento experimental.

Fonte: Autoria própria.

Nota: M representa a média dos pontos centrais.

Tabela 12 - Produtividade volumétrica e fator de conversão de xilose em xilitol nos ensaios de biotransformação em hidrolisado hemicelulósico detoxificado com carvão ativado por *C. guilliermondii* permeabilizada com Triton X-100 em meio semi-definido.

Ensaio	K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ (M)	MgCl ₂ .6H ₂ O (g/L)	Q _P (g/L.h)	Y _{P/S} (g/g)	Viabilidade Celular (%)
1	0	0	2,05 ± 0,02	0,59 ± 0,02	98,4 ± 1,65
2	0,1	0	2,17 ± 0,10	0,58 ± 0,01	96,3 ± 0,45
3	0	1	2,03 ± 0,04	0,58 ± 0,01	96,3 ± 0,45
4	0,1	1	2,01 ± 0,06	0,59 ± 0,02	96,6 ± 0,15
5	0,05	0,5	2,04	0,57	95,6
6	0,05	0,5	2,14	0,58	97,9
7	0,05	0,5	2,04	0,57	96,7

Fonte: Autoria própria.

Nota: Condição padrão: pH = 6,87 ± 0,12; T = 35 °C; A = 200 rpm; [X]₀ = 10,42 ± 0,70 g/L.

A Figura 37 compara os parâmetros relacionados a produção de xilitol (Y_{P/S} e Q_P) obtidos em todos os ensaios de biotransformação em hidrolisado (não detoxificado e detoxificado com carvão ativado) na presença e/ou ausência de tampão fosfato de potássio e MgCl₂.6H₂O com a biotransformação em meio definido. Todos os ensaios de biotransformação em hidrolisado (não detoxificado e detoxificado com carvão ativado) apresentaram fatores de conversão de xilose em xilitol extremamente semelhantes (~0,57 g/g), mostrando que a detoxificação não foi capaz de melhorar este parâmetro.

Figura 36 - Gráfico de Pareto para a estimativa dos efeitos da suplementação de tampão fosfato de potássio e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ sobre os parâmetros (Q_P e $Y_{P/S}$) da biotransformação de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* permeabilizada com Triton X-100 empregando hidrolisado hemicelulósico detoxificado com carvão ativado (HD).

Fonte: Autoria própria.

Figura 37 - Comparação dos parâmetros relacionados a produção de xilitol ($Y_{P/S}$ e Q_P) nos ensaios de biotransformação em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz detoxificado com carvão ativado (HD) e não detoxificado (HND) e em meio definido (MD).

Fonte: Autoria própria.

Nota: K: tampão fosfato de potássio (0,1 M);

Mg: $MgCl_2 \cdot 6H_2O$; MD: meio definido;

PC: média do ponto central.

Nota-se que o ensaio de biotransformação em hidrolisado detoxificado com carvão ativado e suplementado com tampão fosfato de potássio (HD + K) apresentou a maior produtividade volumétrica ($Q_P = 2,17 \text{ g/L.h} \pm 0,10$) dentre os ensaios de biotransformação em hidrolisado, onde foi observado um aumento de 13,6 % na produtividade em relação ao ensaio correspondente não detoxificado. Porém, esta diferença cai para 5,8 % quando comparado a produtividade obtida em hidrolisado sem qualquer suplementação e não detoxificado ($Q_P = 2,05 \pm 0,13$). Ao comparar os ensaios em hidrolisado sem qualquer suplementação, as produtividades volumétricas obtidas em hidrolisado não detoxificado (HND) e detoxificado (HD) não apresentaram diferença, sugerindo que a detoxificação com carvão ativado não foi suficiente para melhorar os parâmetros relacionados a produção de xilitol. Ainda na Figura 37, é possível observar que a produtividade volumétrica e o fator de conversão obtidos no ensaio empregando hidrolisado não detoxificado e sem qualquer suplementação (HND) foram reduzidos em 14,22 % e 17,40 %, respectivamente, quando comparado aos obtidos em meio definido (MD).

De um modo geral, ficou demonstrado que a detoxificação com carvão ativado não promoveu melhorias ao processo de biotransformação, independente da suplementação com tampão fosfato de potássio e/ou $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, uma vez que os valores de produtividade volumétrica em xilitol e fator de conversão de xilose em xilitol foram muito próximos aos demais ensaios. Sendo assim, os resultados obtidos na biotransformação de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* permeabilizada com Triton X-100 empregando hidrolisado não detoxificado e sem qualquer suplementação (tampão fosfato de potássio e/ou $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foi selecionado para comparações com estudos da literatura. Li et al. (2016) estudando a biotransformação de xilitol a partir de meio contendo arabitol (40 g/L) como fonte de carbono a partir de células recombinantes de *Gluconobacter oxydans* (superexpressão da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase), observaram uma produção de 29,3 g/L de xilitol após 48 horas com 12,5 % (p/v) de células úmidas em biorreator ($Q_P = 0,62 \text{ g/L.h}$; $Y_{P/S} = 0,73 \text{ g/g}$). Para esta conversão, primeiramente o D-arabitol foi oxidado a D-xilulose, a qual foi reduzida a xilitol com a adição de glicose (5 % p/v) para regeneração de cofator. A modificação genética para superexpressão da glicose-6-fosfato-desidrogenase (primeira enzima da via das pentoses fosfato) foi realizada para gerar maior formação de cofator NADPH. Com base neste estudo, que embora os autores tenham utilizado outro substrato como fonte de carbono, os resultados de produtividade volumétrica em xilitol foram bastante inferiores aos do presente estudo, sugerindo que a biotransformação de xilose em xilitol tem maior potencial.

Em outro estudo empregando lactose como fonte de carbono (TOYODA; OHTAGUCHI, 2009), foi produzido 3,5 g/L de xilitol após 42,9 h com um fator de conversão de 0,24 g/g e uma produtividade volumétrica de 0,08 g/L.h, sendo valores inferiores aos obtidos na biotransformação em hidrolisado no presente estudo. É importante destacar que esta biotransformação é baseada em 3 etapas: (1) conversão de lactose a D-arabitol por *Kluyveromyces lactis* NBRC 1903, (2) oxidação de D-arabitol para D-xilulose por *Gluconobacter oxydans*, (3) redução de D-xilulose para xilitol por *Candida shehatae* na presença de etanol. Segundo os autores, a adição de etanol na terceira etapa tem um alto potencial para gerar NADH, uma vez que a oxidação de etanol em acetaldeído promove a geração desta coenzima, a qual é necessária para a conversão de xilulose para xilitol. Neste estudo, os valores de parâmetros da biotransformação em xilitol foram bastante inferiores ao do presente estudo. Além disso, envolveu 3 etapas, mostrando maior complexidade de processo quando comparado ao presente estudo.

Os resultados obtidos no presente estudo foram também comparados com a produção enzimática de xilitol a partir de xilose. Branco, Santos e Silva (2011a) utilizando um meio reacional contendo xilose (50 g/L) como fonte de carbono, NADPH (1,2 mM) como cofator e o extrato pré-purificado de xilose redutase de *Candida guilliermondii* obtiveram uma produção máxima de xilitol de 18 g/L após 24 horas ($Q_P = 0,75$ g/L.h; $Y_{P/S} = 0,86$ g/g). Embora os autores tenham encontrado um elevado fator de conversão, a concentração de xilose residual foi também elevada (~30 g/L), indicando que apenas 20 g/L de xilose foi utilizada no processo. Ressalta-se que o sistema enzimático apresenta maior complexidade quando comparado ao presente estudo, uma vez que há necessidade de adicionar cofator e etapas de pré-purificação de xilose redutase. Estes mesmos autores (BRANCO; SANTOS; SILVA, 2011b) também estudaram a produção de xilitol por via enzimática empregando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Neste estudo, foi utilizada a mesma metodologia para a preparação do extrato pré-purificado de xilose redutase citada no estudo anterior e foi adicionado ao meio a enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase para a regeneração de NADPH. A produção de xilitol em meio de reação contendo 100 % v/v de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (18,6 g/L de xilose) foi de 3,12 g/L após 12 horas de reação, o que corresponde a uma produtividade volumétrica de 0,26 g/L.h e um fator de conversão de 0,99 g/g, mas com um consumo de xilose de apenas 17 %. Estes resultados quando comparados ao do presente estudo ($Q_P = 2,05$ g/L.h $\pm 0,13$; $Y_{P/S} = 0,57$ g/g $\pm 0,01$) revelam que a produtividade volumétrica foi 7,3 vezes inferior, e apesar do fator de conversão no sistema enzimático ter sido bastante superior, a concentração de xilose residual foi elevada (15,44 g/L), mostrando a ineficiência do processo em hidrolisado, enquanto a biotransformação do hidrolisado hemicelulósico apresenta grande potencial.

De acordo com a literatura, nota-se grande variedade de estudos relacionados a produção de xilitol que adicionam cofator NADPH no meio reacional ou utilizam enzimas, como a glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD), para a sua regeneração. Devido ao fato da produção de xilitol por *C. guilliermondii* a partir de xilose ser realizada pela enzima xilose redutase (XR) dependente de NADPH, Gurpilhares et al. (2009) demonstraram que os maiores valores de produtividade volumétrica em xilitol e fator de conversão ($Q_P = 0,40$ g/L.h; $Y_{P/S} = 0,60$ g/g) foram alcançados em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz na razão ótima de G6PD/XR igual a 2,5 e uma menor relação de xilose redutase/xilitol desidrogenase, mostrando que as concentrações de NADPH influenciam mais nos parâmetros de produção de xilitol do que as razões da atividade das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase. Para os autores a relação G6PD/XR é considerada como um dos

parâmetros chave para a otimização da produção deste poliól, devido a ação da glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) na geração de NADPH. O fator de conversão de xilose em xilitol obtido no presente estudo durante a biotransformação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz ($Y_{P/S} = 0,57$ g/g) foi semelhante ao obtido no estudo de Gurpilhares et al. (2009), sugerindo que a relação G6PD/XR esteja semelhante à relação ótima descrita por Gurpilhares et al. (2009). Enquanto a diferença nas produtividades volumétricas em xilitol foi devido ao uso de altas densidades celulares no presente estudo.

Ao comparar os resultados obtidos em estudos relacionados a produção de xilitol por via fermentativa empregando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, foi possível constatar que o presente estudo apresentou resultados bastante promissores. Silva et al. (2006) utilizando o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz em fermentações em batelada sob condição otimizada em biorreator (78 g/L de xilose inicial, 3 g/L de células, 550 rpm, 30 °C) observaram uma máxima produção de xilitol de 45,4 g/L após 45 horas. De acordo com estes resultados, foi obtida uma produtividade volumétrica em xilitol de 1,01 g/L.h e um fator de conversão de 0,58 g/g. Nota-se que o processo fermentativo apresentou uma produtividade volumétrica 2 vezes inferior a obtida na biotransformação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz nas condições do presente estudo, que foi de 2,05 g/L.h.

Uma das estratégias utilizadas para aumentar a produtividade volumétrica em xilitol em meios a base de hidrolisado é a condução do processo em modo contínuo com o uso de altas densidades celulares. No entanto, estudos relacionados a produção de xilitol por *Candida guilliermondii* a partir de hidrolisado hemicelulósico em processos contínuos ou semi-contínuos apresentam valores de produtividade volumétrica inferiores aos obtidos no presente estudo. Por exemplo, Martínez, Silva e Felipe (2000) estudando a produção de xilitol por *Candida guilliermondii* a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em reator de tanque agitado com modo de operação contínuo (30 °C, pH 5,5, 300 rpm, $0,03\text{ h}^{-1}$) obtiveram uma produção de xilitol de 23,1 g/L, com uma produtividade volumétrica em xilitol de 0,69 g/L.h e um fator de conversão de xilose em xilitol de 0,58 g/g. Em outro estudo com modo de operação semi-contínuo, a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por *C. guilliermondii* imobilizada em alginato de cálcio foi estudada por Carvalho et al. (2008) em reator de tanque agitado. O processo fermentativo foi realizado em 5 ciclos sucessivos de 120 horas cada e uma concentração de células imobilizadas de cerca de 4 g/L. A produção média de xilitol foi de 51,6 g/L a partir de 72 g/L de xilose, o que corresponde a uma produtividade volumétrica média em xilitol de 0,43 g/L.h e um fator de conversão médio de 0,71 g/g.

Para avaliar o impacto da permeabilização das células de *C. guilliermondii* com Triton X-100, foram realizados ensaios empregando células não permeabilizadas e os resultados estão mostrados na Figura 38. Nota-se que a concentração das células não permeabilizadas variou de 9,20 a 12,30 g/L durante a biotransformação, enquanto as células permeabilizadas variaram de 11,01 a 12,38 g/L. Em relação ao consumo de xilose, ambos os ensaios apresentaram um perfil semelhante, com um consumo praticamente total após 17 horas de biotransformação. Nota-se que a diferença na produção de xilitol tornou-se mais pronunciada após 2 horas de biotransformação, sendo 29 % inferior no ensaio com células não permeabilizadas quando comparado às células permeabilizadas após 15 horas.

Para melhor analisar o efeito da permeabilização celular com Triton X-100 sobre a biotransformação de xilose em xilitol empregando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, os parâmetros de biotransformação foram calculados, conforme mostrado na Tabela 13. Nota-se que o fator de conversão de substrato em células no ensaio empregando células não permeabilizadas foi 2,5 vezes superior ao obtido no ensaio com células permeabilizadas. A produtividade volumétrica em xilitol e o fator de conversão de xilose em xilitol obtidos no ensaio com células não permeabilizadas ($Q_P = 1,47 \text{ g/L.h} \pm 0,04$; $Y_{P/S} = 0,43 \text{ g/g} \pm 0,01$), foram em torno de 28 % e 24,6 %, respectivamente, inferiores aos obtidos no ensaio com células permeabilizadas ($Q_P = 2,05 \text{ g/L.h} \pm 0,04$; $Y_{P/S} = 0,57 \text{ g/g} \pm 0,03$). Em relação aos subprodutos, a produção de etanol e glicerol foi semelhante em ambos os ensaios e a viabilidade celular foi próxima a 100 %. Estes resultados mostram que a permeabilização celular é uma potencial estratégia para a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico, pois além de aumentar os parâmetros da biotransformação não promoveu queda da viabilidade celular. Esta estratégia tem sido utilizada como forma de aumentar a atividade de enzimas (KAUR; SATYANARAYANA, 2010), bem como a produção de eritritol (RAKICKA et al. 2016). No entanto, ainda não existem estudos relacionados a produção de xilitol por células permeabilizadas empregando hidrolisado hemicelulósico.

Figura 38 - Concentração celular, consumo de xilose e produção de xilitol durante a biotransformação de xilose em xilitol em hidrolisado por células não permeabilizadas (■) e permeabilizadas com Triton X-100 (●).

Fonte: Autoria própria.

Tabela 13 - Consumo de xilose, produção de xilitol e subprodutos, fator de conversão de substrato em células, viabilidade celular e variação do pH nos ensaios de biotransformação em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com células não permeabilizadas e permeabilizadas com Triton X-100 após 15 horas.

Triton X-100	Concentração celular (g/L)	Consumo de Xilose (%)	Xilitol (g/L)	Subprodutos (g/L)		Y _{X/S} (g/g)	Y _{P/S} (g/g)	Q _P (g/L.h)	Viabilidade celular (%)	pH _{final} (ΔpH)
				Etanol	Glicerol					
+	12,38	93,32	30,75	6,27	5,14	0,02	0,57	2,05	97,87	5,65
	(± 2,00)	(± 1,71)	(± 2,05)	(± 0,18)	(± 0,20)	(± 0,002)	(± 0,03)	(± 0,13)	(± 0,24)	(1,05)
-	12,30	85,05	21,94	7,54	3,91	0,05	0,43	1,47	96,30	5,60
	(± 0,97)	(± 0,45)	(± 0,60)	(± 0,56)	(± 0,13)	(± 0,01)	(± 0,01)	(± 0,04)	(± 0,14)	(1,21)

Fonte: Autoria própria.

Nota: Média do pH inicial: $6,81 \pm 0,14$.

Concentração inicial das células permeabilizadas foi de $11,01 \text{ g/L} \pm 1,89$ e das células não permeabilizadas, $9,20 \text{ g/L} \pm 0,25$.

5.5 Reciclo de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz

Com o objetivo de avaliar a capacidade de reciclo das células durante a biotransformação de xilose em xilitol por células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100 empregando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, as células foram submetidas a 4 ensaios de biotransformação com duração de 15 horas cada. Ao final de cada biotransformação, as células foram recolhidas e transferidas para um novo meio reacional a base de hidrolisado hemicelulósico. Os perfis de consumo de xilose e produção de xilitol estão demonstrados na Figura 39. De um modo geral, é possível analisar que ao longo dos 4 ciclos de biotransformação, a produção de xilitol foi semelhante ($29,8 \text{ g/L} \pm 2,15$), sugerindo que as células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100 apresentam boa estabilidade para produzir xilitol em condições de reciclo celular. Em relação a viabilidade das células, é possível observar que após o quarto ciclo, ocorreu uma pequena queda de 7,92 % na viabilidade celular quando comparado ao primeiro ciclo de biotransformação. Ainda assim, a viabilidade manteve-se maior que 90 % ao longo dos 4 ciclos.

Figura 39 - Produção de xilitol, consumo de xilose e viabilidade celular ao longo de 4 ciclos de reutilização de células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100 durante a biotransformação em hidrolisado hemicelulósico.

Fonte: Autoria própria.

De acordo com os parâmetros relacionados a produção de xilitol (Figura 40), foi possível observar que o fator de conversão de xilose em xilitol apresentou valores semelhantes ao longo dos 4 ciclos de biotransformação em hidrolisado hemicelulósico,

atingindo uma média de 0,59 g/g. Adicionalmente, também foi observado valores semelhantes de produtividade volumétrica em xilitol, gerando uma média de 1,93 g/L.h. Estes resultados demonstram o grande potencial das células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100 na produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico em condições de reciclo celular.

Figura 40 - Produtividade volumétrica (Q_p) e fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{p/s}$) após 4 ciclos de reutilização de células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100 durante a biotransformação em hidrolisado hemicelulósico.

Fonte: Autoria própria.

A biotransformação de arabinol (40 g/L) em xilitol por células recombinantes de *Glucanobacter oxydans* PZ (superexpressão da enzima glicose-6-fosfato-desidrogenase) empregando biorreator, foi realizado 4 ciclos (50 horas cada ciclo) sem ocorrer a diminuição na produção de xilitol, correspondendo a uma produtividade volumétrica média de 0,54 g/L.h, conforme o estudo de Li et al. (2016). Estes resultados mostram uma estabilidade celular ao longo de 4 ciclos semelhante ao presente estudo, porém, o valor da produtividade volumétrica foi inferior ao obtido durante a biotransformação em hidrolisado hemicelulósico descrito no presente estudo empregando *C. guilliermondii* permeabilizada com Triton X-100, com uma produtividade volumétrica média de 1,93 g/L.h $\pm$ 0,13 nos 4 ciclos. Estas diferenças podem ser devido ao uso de diferentes fontes de carbono e tipo de microrganismo. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, é possível concluir que as células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100 promoveram altos valores de produtividade volumétrica em xilitol durante a biotransformação de xilose empregando

hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Algumas possíveis estratégias para melhorar o fator de conversão de xilose em xilitol podem ser sugeridas, incluindo a avaliação de tratamentos com vista a reduzir os minerais do hidrolisado através de precipitação, como a alta alcalinização (aumento do pH para 8,0/10) seguida de redução do pH para o valor desejado. Isto seria capaz de promover uma maior precipitação de compostos e tornar o hidrolisado mais pobre em termos de constituição nutricional. Adicionalmente, outra possível estratégia para melhorar os parâmetros de biotransformação seria a avaliação de outros surfactantes, assim como a otimização da razão Triton:célula no hidrolisado hemicelulósico.

6 CONCLUSÕES

O meio semi-definido composto por xilose, sais e suplementado com extrato de farelo de arroz foi o que apresentou os melhores resultados para o cultivo de células de *Candida guilliermondii*. A substituição do extrato de farelo de arroz por extrato de levedura além de menor crescimento, promoveu alterações metabólicas e morfológicas, incluindo floculação e produção de arabitol;

A suplementação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com sais e extrato de farelo de arroz favoreceu o aumento da biomassa celular em cerca de 30 % quando comparado ao suplementado com extrato de levedura. No entanto, o hidrolisado hemicelulósico mostrou conter nutrientes capazes de promover o cultivo das células de *C. guilliermondii* sem qualquer suplementação;

A composição do meio de permeabilização celular interferiu na produtividade volumétrica em xilitol no processo de biotransformação do hidrolisado hemicelulósico, enquanto o fator de conversão de xilose em xilitol não foi alterado. O uso de células permeabilizadas em meio semi-definido promoveu um aumento de 35 % na produtividade volumétrica em xilitol quando comparado ao uso de células permeabilizadas no próprio hidrolisado;

A adição de tampão fosfato de potássio ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$) e/ou $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ao hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não mostrou qualquer influência sobre os parâmetros de produção de xilitol durante a biotransformação;

A detoxificação com carvão ativado não promoveu melhorias ao processo de biotransformação, independente da suplementação com tampão fosfato de potássio e/ou $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, uma vez que os valores de produtividade volumétrica em xilitol e fator de conversão de xilose em xilitol foram muito próximos aos demais ensaios;

A permeabilização celular é uma potencial estratégia para a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico, pois além de aumentar os parâmetros da biotransformação, não promoveu queda da viabilidade celular;

Células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100 apresentaram estabilidade ao longo de 4 ciclos de biotransformação do hidrolisado hemicelulósico com duração de 15 horas cada, obtendo uma produtividade volumétrica média de 1,93 g/L.h e um fator de conversão de xilose em xilitol médio de 0,59 g/g.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-HAMID, A. M.; SOLBIATI, J. O.; CANN, I. K. Insights into lignin degradation and its potential industrial applications. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 82, p. 1-28, 2013.
- ABRAHAM, J.; BHAT, S. G. Permeabilization of baker's yeast with N-lauroyl sarcosine. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, n.8, p.1367-5435, 2008.
- ABRAHAM, A.; MATHEW, A. K.; SINDHU, R.; PANDEY, A.; BINOD, P. Potencial of rice straw for bio-refining: An overview. *Bioresource Technology*, p-29-36, 2016.
- AKIN, D. E.; RIGSBY, L. L.; SETHURAMAN, A.; MORRISON, W. H.; GAMBLE, G. R.; ERIKSSON, K. E. Alterations in structure, chemistry, and biodegradability of grass lignocellulose treated with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 1591-8, 1995.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment Technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851-4861, 2010.
- AMINOFF, C.; VANNINEN, E.; e DOTY, T., E. The occurrence, manufacture and properties of xylitol. **Applied Science Publishers**, London, P. 1-9, 1978.
- ANANDA, N.; VADLANI, P. V.; MADL, R. L. Rice Bran is an effective substitute for yeast extract in ethanol fermentation. **J. Biobased Mater Bioener**, v. 5, n. 1, p.70-74, 2011.
- ARORA, R.; BEHERA, S.; KUMAR, S.: Bioprospecting thermophilic/thermotolerant microbes for production of lignocellulosic ethanol: A future perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 51, p. 699-717, 2015.
- ARANDA-BARRADAS, J. S.; GARIBAY-ORIJIEL, C.; BADILLO-CORONA, J. A. A stoichiometric analysis of biological xylitol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 50, p. 1-9, 2010.
- ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. D. C. L. B.; SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. G. A. Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biodegradation**, v. 22, n. 8, p. 15-22, 2011.
- ASSEV, S.; VEGARUD, G.; ROLLA, G. Growth inhibition of *Streptococcus mutans* strain OMZ176 by xylitol. **Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica**, v. 88, p. 61-63, 1980.
- BAE, S.; PARK, Y.; LEE, T.; KWEON, D.; CHOI, J. Production of xylitol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene in repeated fed-batch and cell-recycle fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 545-549, 2004.

- BAEK, S.; KWON, Y. Optimization of the Pretreatment of Rice Straw Hemicellulosic Hydrolyzates for Microbial Production of Xylitol. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 12, p. 404-409, 2007.
- BARBOSA, M. F. S.; MEDEIROS, M. B.; MANCILHA, I. M.; SCHNEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts 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.
- BASSLER, K. H. Biochemistry of xylitol. In: COUNSELL, J. N. **Xylitol**. Applied Science Publishers, London, 1978, p. 35-41.
- BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R. R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4767-4774, jul 2010.
- BRANCO, R. F.; SILVA, S. S. Contribution of Tris Buffer on Xylitol Enzymatic Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1558-1563, 2010.
- BRANCO, R. F.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. A solid and Robust Model for Xylitol Enzymatic Production Optimization. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**, v.1, p. 1-4, 2011a.
- BRANCO, R. F.; SANTOS, J. C.; SILVA, S. S. A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: Xylitol enzymatic production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 3241-3246, 2011b.
- BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial crops and products**, p. 237-259, 2008.
- CALBOM, C. **Juicing, Fasting, and Detoxing for Life: Unleash the Healing Power of Fresh Juices and Cleansing Diets**. New York, Grand Central Publishing, 2008.
- CAMARGO, D.; SENE, L.; VARIZ, D. I. L. S.; FELIPE, M. G. A. Xylitol Bioproduction in Hemicellulosic Hydrolysate Obtained from Sorghum Forage Biomass. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 175, n. 8, p. 3628-3642, 2015.
- CANETTIERI, E. V.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 323-331.
- CANILHA, L.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; CARVALHO, W. Batch xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate using *Candida guilliermondii* in a stirred tank reactor. **Biotechnology Letters**, 25, p. 1811-1814, 2003.
- CÁNOVAS, M. e IBORRA, J. L. Whole cell biocatalysts stabilization for L-carnitine production. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 23, n. 3/4, p. 149-158, 2005.

CASTRO, R. C. A.; FONSECA, B. G.; SANTOS, H. T. L.; FERREIRA, I. S.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alkaline deacetylation as a strategy to improve sugars recovery and ethanol production from rice straw hemicellulose and cellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 106, p. 65-73, 2016.

CARNEIRO, L. V. **Avaliação de estratégias de cultivo da levedura *Pichia stipitis* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando a produção de etanol**. 175 p. Tese (Doutorado em Ciências), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. São Paulo, 175 p., 2011.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Semi-continuous xylose-to-xylitol bioconversion by Ca-alginate entrapped yeast cells in a stirred tank reactor. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 31, p. 493-498, 2008.

CHAUD, L. C. S.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Potencial do farelo de arroz para utilização em bioprocessos. **Nucleus**, v. 6, n. 2, p. 33-46, 2009.

CHEN, W.; BEN-LI, P.; YU, C.; HWANG, W. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2916-2924, 2011.

CHENG, Y.; ZHENG, Y.; YU, C. W.; DOOLEY, T. M.; JENKINS, B. M.; GHEYNST, J. S. V. Evaluation of High Solids Alkaline Pretreatment of Rice Straw. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 162, p. 1768-1784, 2010.

CORTEZ, D. V.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Improvement on D-xylose to Xylitol Biotransformation by *Candida guilliermondii* Using Cells Permeabilized with Triton X-100 and Selected Process Conditions. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 180, n. 5, p. 969-979, 2016.

CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. CTAB, Triton X-100 and freezing-thawing treatments of *Candida guilliermondii*: Effects on permeability and accessibility of the glucose-6-phosphate dehydrogenase, xylose reductase and xylitol dehydrogenase enzymes. **New Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 192-198, 2012.

CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Effect of phosphate buffer concentration on the batch xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 42, p. 321-325, 2006.

COWAN, J. A. Structural and catalytic chemistry of magnesium-dependent enzymes. **Biometals**, v. 15, n. 3, p. 225-235, 2002.

CULBERT, S. J., WANG, Y. M., FRITSCH, H. A., CARR, D., LANTIN, E., EYS, J. V. Oral xylitol in American adults. **Nutr. Res.**, v. 6, p. 913-922, 1986.

CUMMINGS, J. H. Short chain fatty acids in the human colon. **Gut**, v. 22, p. 763-779, 1981.

- DASGUPTA, D.; BANDHU, S.; ADHIKARI, D. K.; GHOSH, D. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. **Microbiology Research**, v. 197, p. 9-21, 2017.
- DUNWELL, J. L.; AHMAD, F.; e ROSE, A. H. Changes in the polysaccharide composition of yeast resulting from biotin deficiency. **Acta**, v. 51, p. 604-607, 1961.
- ELMEKAWY, A.; DIELS, L.; WEVER, H.; PANT, D. Valorization of Cereal Based Biorefinery Byproducts: Reality and Expectations. **Environmental Science and Technology**, v. 47, p. 9014-9027, 2013.
- FARIA, L. F.; JR N. P.; NOBREGA R. Xylitol production from D-Xylose in a membrane bioreactor. **Desalination**, 149, p. 231-236, 2002.
- FELIPE, M., G., A.; VIEIRA, D., C.; VITOLO, M.; SILVA, S. S.; ROBERTO, I. C.; MANCHILHA, I. M. Effect of acetic acid on xylose fermentarion to xylitol by *Candida guilliermondii*. **J. Basic Microbiol.**, 35, p. 171-177, 1995.
- FERREIRA, I. S.: **Estudo da produção de etanol a partir das frações açucaradas da palha de arroz**. 151 p. Tese (Doutorado em Ciências), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. São Paulo, 151 p., 2017.
- FISCHER, E., STAHEL, R. Zur kenntnis der xylose. **Berichte der Deutschen Chemischen Fessellschaft**, v. 24, p. 528–539, 1891.
- FOSTER-POWELL, S. H. A.; HOLT, BRAND-MILLER, J. C. International table of glycemic index and glycaemic load values: **American Journal of Clinical Nutrition** v. 76, p. 5–56, 2002.
- GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary Modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. **American Institute of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.
- GODSWILL, A. C. Sugar alcohols: chemistry, production, health concerns and nutritional importance of mannitol, sorbitol, xylitol, and erythritol. **International Journal of Advanced Academic Research**, v. 3, p. 31-58, 2017.
- GONG, C. S.; CLAYPOOL, T. A.; MCCracken, L. D.; MAUN, C. M.; UENG, P. P.; TSAO, G. T. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 25, n.1, p. 85-102, 1983.
- GOOSSENS, K. V. Y.; LELASI, F. S.; NOOKAEW, I.; STALS, I.; ALONSO-SARDUY, L.; DAENEN, L.; MULDER, S. E. V.; STASSEN, C.; EIJSSEN, R. G. E. V.; SIEWERS, V.; DELVAUX, F. R.; KASAS, S.; NIELSEN, J.; DEVREESE, B.; WILLAERT, R. G. Molecular Mechanism of Flocculation Self-Recognition in Yeast and Its Role in Matin and Survival. **American Society for Microbiology**, v. 6, p. 1-12, 2015.
- GUIRIMAND, G.; SASAKI, K.; INOKUMA, K.; BAMBA, T.; HASUNUMA, T.; KONDO, A. Cell surface engineering of *Saccharomyces cerevisiae* combined with

membrane separation technology for xylitol production from rice straw hydrolysate. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 100, n. 8, p. 3477-3487, 2015.

GURPILHARES, D. B.; HASMAN, F. A.; PESSOA Jr, A.; ROBERTO, I. C. The Behavior of key enzymes of xylose metabolism on the xylitol production by *Candida guilliermondii* grown in hemicellulosic hydrolysate. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 36, p. 87-93, 2009.

HAHN-HAGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 16, p. 933-940, 1994.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F.; COSTA, I. A. L.; SILVA, D. D. V.; DUSSÁN, K. J.; VILLELA, T. R.; CANETTIERI, E. V.; CARVALHO Jr, J. A.; NETO, T. G. S.; FELIPE, M. G. A. Biochemical conversion of sugarcane straw hemicellulosic hydrolyzate supplemented with co-substrates for xylitol production. **Bioresource Technology**, v. 200, p. 1085-1088, 2015.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F.; ARRUDA, P. V.; FELIPE, M. G. A. Sugarcane straw as a feedstock for xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p.489-496, 2016.

HSU, T.; GUO, G.; CHEN, W.; HWANG, W. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4907-4913, 2010.

ISIKGOR F. H.; BECER, R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. **Polym. Chem.**, v. 6, p. 4497-4559, 2015.

ISOGANGAS, P.; MAKINEN, K. K, TIESKO, J.; ALANEN, P. Long-term effect of xylitol chewing gum in the prevention of dental caries: a follow-up 5 years after termination of a prevention program. **Caries Research**, v. 27, n. 6, p. 495-498, 1993.

JEFFRIES, T. W. Utilization of Xylose by Bacteria, Yeasts, and Fungi. **Adv. Biochem. Eng.**, v. 27, p. 1-32, 1983.

JÖNSSON, L.; ALRIKSSON, B.; NILVEBRANT, N. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 16, p. 6-16, 2013.

JÖNSSON, L.; MARTIN, C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**, v. 199, p. 103-112, 2015.

KAHN, S. E.; COOPER, M. E.; PRATO, S. D.: Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present and future. **Lancet**, v. 383, p. 1068-1083, 2014.

KALIPATNAPU, S.; CHATTOPADHYAY, A. Membrane Protein Solubilization: Recent advances and challenges in solubilization of serotonin1A receptors. **IUBMB Life**, 57, v. 7, p. 505-512, 2005.

KANIS, J. A.; MELTON, L. J.; CHRISTIANSEN, C.; JOHNSTON, C. C.; KHALTAEV, N. The diagnosis of osteoporosis. *J. Bone Miner Res.*, v. 8, n. 9, p. 1137-41, 1994.

KAUR, P.; SATYANARAYANA, T. Improvement in cell-bound phytase activity of *Pichia anomala* by permeabilization and applicability of permeabilized cells in soymilk dephytinization. *Journal of Applied Microbiology*, v. 108, p. 2041-2049, 2010.

KANG, T. Z.; MOHAMMAD, S. H.; MURAD, A. M. A.; ILLIAS, R. M.; JAHIM, J. M. Fermentative Production of Xylitol: A First Trial on Xylose Bifurcation. *Ind. J. Sci. Technol.*, v. 9, p.1-5, 2016.

KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, v. 26, n. 4, p. 361-375, 2004.

KLEMM, D.; HEUBLEIN, B.; FINK, H.; BOHN, A. Cellulose: Fascinating Biopolymer and Sustainable Raw Material. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 44, p. 3358-3393, 2005.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol.*, v. 66, n. 1, p. 10-26, 2004.

KO, J. K.; BAK, J. S.; JUNG, M. W.; LEE, H. J.; CHOI, I.; KIM, T. H.; KIM, K. H. Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 4374-4380, 2009.

KONTIOKARI, T.; UHARI, M.; KOSKELA, M. Effect of xylitol on growth of nasopharyngeal bacteria *in vitro*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, p. 1820-1823, 1995.

KUMAR, A. K.; SHARMA, S. Recent updates on different methods of pretreatment of lignocellulosic feedstocks: a review. *Bioresource. Bioprocess.*, v. 4, n. 7, p. 1-19, 2017.

LEE, C. K. Structural functions of taste in the sugar series: taste properties, of sugar alcohols and related compounds. *Food Chemistry*, v. 2, p. 95-105, 1977.

LI, Y.; QI, B.; LUO, J.; KHAN, R.; WAN, Y. Separation and concentration of hydroxycinnamic acids in alkaline hydrolyzate from rice straw by nanofiltration. *Separation and Purification Technology*, v. 149, n. 27, p. 315-321, 2015.

LI, S.; ZHANG, J.; XU, H.; FENG, X. Improved Xylitol Production from D-Arabitol by Enhancing the Coenzyme Regeneration Efficiency of the Pentose Phosphate Pathway in *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 64, p. 1144-1150, 2016.

LIAN, W.; CHEN, C.; CHANG, W.; CHEN, K. Xylitol Production from Rice Straw Hemicellulose Hydrolyzate by Polyacrylic Hydrogel Thin Films with Immobilized *Candida subtropicalis* WF79. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 105, n. 2, p. 97-105, 2008.

- LIMA, G. J. M. M.; MARTINS, R. R.; ZANOTTO, D. L.; BRUM, P. A. R. Composição química e valores de energia de subprodutos do beneficiamento do arroz. **Embrapa**, v. 2, p. 1-2, 2000.
- LIN, T.; HUANG, C.; GUO, G.; HWANG, W.; HUANG, S. Pilot-scale ethanol production from rice straw hydrolysates using xylose-fermenting *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 314-319, 2012.
- LINDBERG, L.; SANTOS, A. X.; RIEZMAN, H.; OLSSON, L.; BETTIGA, M. Lipidomic profiling of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosacharomyces bailli* reveals critical changes in lipid composition in response to acetic acid stress. **PLoS One**, v. 8, n. 9, 2013.
- LIU, X.; HILIGSMANN, S.; GOURDON, R.; BAYARD, R. Anaerobic digestion of lignocellulosic biomasses pretreated with *Ceriporiopsis subvermispota*. **Journal of Environmental Management**, v. 193, p. 154-162, 2017.
- LIVESEY, G. The energy values of dietary fibre and sugar alcohols for man. **Nutr. Res. Rev.**, v. 5, p. 61-84, 1992.
- LY, K. A.; MILGROM, P.; MARILYNN, R. Xylitol, Sweeteners and Dental caries. **American academy of pediatric dentistry**, v. 28, p. 154-163, 2006.
- LYNCH, H.; MILGROM, P. Xylitol and dental caries: an overview for clinicians. **Journal Calif. Dent. Assoc.**, v. 31, p. 205-209, 2003.
- MACHADO, A. S.; FERRAZ, A. Biological pretreatment of sugarcane bagasse with basidiomycetes producing varied patterns of biodegradation. **Bioresour. Technol.**, v. 225, p. 17-22, 2017.
- MAITY, S. K. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 1427-1445, 2015.
- MAKELAINEN, H. S.; MAKIVUOKKO, H. A.; SALIMEN, S. J.; RATONEN, N. E.; OUWEHAND, A. C. The effects of Polydextrose and Xylitol on Microbial Community and Activity in a 4-stage Colon Simulator. **Food Microbiology and Safety**, v. 72, n. 5, p. 153-159, 2007.
- MAKINEN, K. K.; SODERLING, E. A quantitative study of mannitol, sorbitol, xylitol, and xylose in wild berries and commercial fruits. **Journal of Food Science**, v. 45, n. 2, p. 367-371, 1980.
- MARTÍNEZ, 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 reactor fermentation. **Applied biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 633-641, 2000.
- MATTILA, P. T.; SVANBERG, M. J.; POKKA, P.; KNUUTTILA, M. L. Dietary xylitol protects against weakening of bone biomechanical properties in ovariectomized rats. **J. Nutr.**, 128, v. 10, p. 1811-4, 1998.

- MATTILA, P.; KNUUTTILA, M.; KOVANEN, V.; SVANBERG, M. Improved Bone Biomechanical Properties in Rats after Oral Xylitol Administration. **Calcif Tissue Int.**, v. 64, p. 340-344, 1999.
- MAYERHOFF, Z. D. V. L.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S. Production of Xylitol by *Candida mogii* from rice straw hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 149-159, 1998.
- MENDES, F. M.; LAURITO, D. F.; BAZZEGGIO, M.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M.: Enzymatic Digestion of Alkaline-Sulfite Pretreated Sugar Cane Baggasse and Its Correlation with the Chemical and Structural Changes Occurring During the Pretreatment Step. **Biotechnol. Prog.**, v. 29, n. 4, p. 890-895, 2013.
- MILESSI, T. S. S.; ANTUNES, F. A. F.; CHANDEL, A. K.; SILVA, S. S. Rice bran extract: an inexpensive nitrogen source for the production of 2G ethanol from sugarcane bagasse hydrolysate. **3 Biotech.**, v. 3, p. 373-379, 2013.
- MILLER, T. L.; CHURCHILL, B. W. Substrates for Large-Scale Fermentations. In: DEMAIN, A. L.; SOLOMON, N. A., **Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology**, p. 123-130, 1986.
- MIRANDA, L. M. D.: **Estudo da fermentabilidade do hidrolisado enzimático obtido do bagaço de cana pré-tratado com sulfito alcalino**. 132 p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. São Paulo, 132 p., 2016.
- MORALES-RODRIGUEZ, R.; PEREZ-CISNEROS, E. S.; REYES-HEREDIA, J. A.; RODRIGUEZ-GOMEZ, D. Evaluation of biorefinery configurations through a dynamics model-based platform: Integrated operation for bioethanol and xylitol co-production from lignocellulose. **Renewable Energy**, v. 89, p. 139-143, 2016.
- MOYA, A. J.; PEINADO, S.; MATEO, S.; FONSECA, B. G.; SÁNCHEZ, S. Improving bioethanol production from olive pruning biomass by deacetylation step prior acid hydrolysis and fermentation processes. **Bioresourche Technology**, v. 220, p. 239-245, 2016.
- MUCCILI S.; RESTUCCIA, C. Bioprotective Role of Yeasts. **Microorganisms**, v. 3, p. 588-611, 2015.
- MUNTON, S. L.; BIRCH, G. G. Accession of sweet stimuli to receptors. I. Absolute dominance of one molecular species in binary mixtures. **Journal of Theoretical Biology**, v. 112, p. 539-551, 1985.
- MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1681-1684, 2001.
- MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol

bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3801-3806, 2005.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xylitol production from high xylose concentration: evaluation of the fermentation in bioreactor under different stirring rates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 331-337, 2003.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Optimal Experimental Condition for Hemicellulosic Hydrolyzate Treatment with Activated Charcoal for Xylitol Production. **Biotechnol. Prog.**, v. 20, p. 134-139, 2004.

MUSSATTO, S. I.; SANTOS, J. C.; ROBERTO, I. C. Effect of pH and activated charcoal adsorption on hemicellulosic hydrolysate detoxification for xylitol production. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 79, p. 590-596, 2004.

MUSTAFA, A. M.; POULSEN, T. G.; XIA, Y.; SHENG, K. Combinations of fungal and milling pretreatments for enhancing rice straw biogas production during solid-state anaerobic digestion. **Bioresource Technology**, v. 224, p. 174-182, 2017.

NATAH, S. S.; HUSSEIN, K. H.; TUOMINEN, J. A.; KOIVISTO, V. A. Metabolic response to lactitol and xylitol in healthy men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 947-950, 1997.

NIDETZKY, B.; NEUHAUSER, W.; HALTRICH, D.; KULBE, K. D. Continuous enzymatic production of xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor. **Biotechnol Bioeng**, v. 52, n. 3, p. 387-396, 1996.

OLIVA, J. M.; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, I.; GONZÁLEZ, A.; NEGRO, M. J.; MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M. Effect of lignocellulosic defradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *kluuyveromyces marxianus*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 141-152, 2003.

OTZEN, D. Protein-surfactant interactions: A tale of many states. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1814, p. 562-591, 2011.

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, 74, p. 25-33, 2000.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part. 2: Operation in culture media made with commercial sugars. **Bioresource Technology**, 65, p. 203-2012, 1998.

PARK, Y.; KIM, S.; SEO, J. **Recent Advances for Microbial Production of Xylitol**. In: WILEY, J.; SONS. **Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts**, First Edition, p. 498-515, 2014.

PAULOVÁ, L.; PATÁKOVÁ, P.; BRANYIK, T. Engineering Aspects of Food Biotechnology. In: TEIXEIRA, J.; VINCENTE, A. A. **Advanced Fermentation Processes**, Prague, 2013, p. 89-105.

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

PEREIRA, R. S.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Inhibitory action of toxic compounds presente in lignocellulosic hydrolysates on xylose to xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Journal Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 4, 38, p. 71-78, 2011.

PERLACK, R. D.; WRIGHT, L. L.; TURHOLLOW, A. F.; GRAHAM, R. L. Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: The technical feasibility of a billion-ton annual supply. **U.S Department of Energy**, p. 1-16, 2005.

PETROVSKA, B.; WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Glycerol production by yeasts under osmotic and sulfite stress. **Canadian journal of microbiology**, v. 45, n. 8, p. 695-699, 1999.

POL, E. C. V.; BAKKER, R.; BAETS, P.; EGGINK, G. By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio)chemicals and fuels. **Appl. Microbiol Biotechnol.**, v. 98, p. 9579-9593, 2014.

QI, X.; ZHANG, H.; MAGOCHA, T. A.; AN, Y.; YUN, J.; YANG, M.; XUE, Y.; LIANG, S.; SUN, W.; CAO, Z.: Improved xylitol production by expressing a novel D-arabitol dehydrogenase from isolated *Gluconobacter* sp. JX-05 and co-biotransformation of whole cells. **Bioresource Technology**, v. 235, p. 50-58, 2017.

RAFQUL, I. S., M.; SAKINAH, M. A perspective Bioproduction of xylitol by enzyme technology and future prospects. **International Food Research Journal**, v. 19, p. 405-408, 2012.

RAFIQUL, I. S. M.; SAKINAH, A. M. M. Processes for the Production of Xylitol – A Review. **Food Reviews International**, v. 29, p. 127-156, 2013.

RANGASWAMY, S.; AGBLEVOR, F., A. Secreening of facultative anaerobic bacteria utilizing D-xylose for xylitol production. **Appl. Microbiol. Biotechnology**, v. 60, p. 88-93, 2002.

RANJAN, A.; MOHOLKAR, V. Comparative study of various pretreatment techniques for rice straw saccharification for the production of alcoholic biofuels. **Fuel**, v. 112, p. 567-571, 2013.

RAO, L. V.; GOLI, J. K.; GENTELA, J.; KOTI, S. Bioconversion of Lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 299-310, 2016.

RAKICKA, M.; RYWINSKA, A.; CYBULSKI, K.; RYMOWICZ, W. Enhanced production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* in media containing surfactants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 417-423, 2016.

ROBERTO, I. C.; MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, R. C. L. B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 17, p. 171-176, 2003.

ROBERTO, I. C.; SATO, S.; MANCILHA, I. M. Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, p. 348-350, 1996a.

ROBERTO, I. C.; SATO, S.; MANCILHA, I. M. Bioconversion of Rice Straw Hemicellulose Hydrolysate for the Production of Xylitol: Effect of pH and Nitrogen Source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57/58, p.339-347, 1996b.

ROBERTO, I. C.; SATO, S.; MANCILHA, I. M.; TAQUEDA, M. E. S. Influence of media composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 11, p. 1223-1228, 1995.

RUBIN, E. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature** v. 454, p. 841-845, 2008.

RUEL, K.; NISHIYAMA, Y.; JOSELEAU, J. Crystalline and amorphous cellulose in the secondary walls of Arabidopsis. **Plant Science**, v. 193, p. 48-61, 2012.

SAHA, B., C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SALYERS, A. A.; LEEDLE, J. A. Z. Carbohydrate metabolism in the human colon. In: D.J. Hentges (ed.). **Human Intestinal Flora in Health and Disease**, Academic Press, New York; p. 129–146, 1983.

SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.

SHAFFER, R. B.; LEVINE, A. S.; MARLETTE, J. M.; MORLEY, J. E. Effects of xylitol on gastric emptying and food intake. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 45, p. 744-747, 1987.

SCHEIE, A. A.; FIJERSKOV, O.: Xylitol in caries prevention: What is evidence for clinical efficacy? **Oral Dis.**, v. 4, p. 268-278, 1998.

SCHEININ, A.; MAKINEN, K.K.; YLITALO, K. Turku sugar studies V. Final report on the effect of sucrose, fructose and xylitol on the caries incidence in man. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 33 (Suppl. 70), p. 67–104, 1975.

SHIN, K.; SIM, D.; SEO, M.; OH, D. Increased Production of Food-grade D-Tagatose from D-galactose by Permeabilizes and Immobilized Cells of *Corynebacterium glutamicum*, a GRAS Host, Expressing D-galactose Isomerase from *Geobacillus thermodenitrificans*. **Journal Agric. Food Chem.**, v. 64, p. 8146-8153, 2016.

SHUAI, L.; YANG, Q.; LU, F. C.; WEIMER, P.J.; RALPH, J.; PAN, X. J. Comparative study of SPORL and dilute-acid pretreatments of spruce for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 3106-3114, 2010.

SILVA, S. S.; CHANTO, A. Q.; VITOLO, M.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M. A preliminary Information About Continuous Fermentation Using Cell Recycling for Improving Microbial Xylitol Production Rates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 571-575, 1999.

- SILVA, C. J. S. M.; ROBERTO, I. C. Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 31, p. 248-252, 2001a.
- SILVA, C. J. S. M. e ROBERTO, I. C. Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI20037 using response surface methodology. **Process Biochemistry**, 36, p. 1119-1124, 2001b.
- SILVA, C. J. S. M.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Study of xylitol production by *Candida guilliermondii* on a bench bioreactor. **Journal of Food Engineering**, 75, p. 115-119, 2006.
- SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; LUCHESE, R. H.; SILVIO, S. S. Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Journal of Microbiology**, 35, p. 248-254, 2004.
- SILVA, D. D. V.; CÂNDIDO, E. J.; ARRUDA, P. V.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. New cultive medium for bioconversion of C5 fraction from sugarcane using rice bran extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1469-1475, 2014.
- SILVA, J. P. A.; CARNEIRO, L. M.; ROBERTO, I. C. Treatment of rice straw hemicellulosic hydrolysates with advanced oxidative processes: a new and promising detoxification method to improve the bioconversion process. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 6-23, 2013.
- SIRISANSANEYAKUL, S.; WANNAWILAI, S.; CHISTI, Y. Repeated fed-batch production of xylitol by *Candida magnolia* TISTR 5663. **Journal Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 88, p. 1121-1129, 2013.
- SLININGER, P. J.; BOLEN, P. L.; KURTZMAN, C. P. Pachysolen tannophilus: properties and process considerations for ethanol production from D-xylose. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 9, p. 5-15, 1987.
- SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. **Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass**, 2012. Disponível em: <https://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>. Acessado em 10-03-2017.
- SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technol.**, v. 83, p. 1-11, 2002.
- TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T.; SAMMALKIVI, L.; IKAHEIMO, I.; KOSKELA, M.; UHARI, M. Effect of xylitol on growth of *Streptococcus pneumoniae* in the presence of fructose and sorbitol. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 166-169, 2001.
- TANIGUCHI, M.; SUZUKI, H.; WATANABE, D.; SAKAI, K.; HOSHINO, K.; TANAKA, T. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for Enzymatic

Hydrolysis of Rice straw. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 6, p. 637-643, 2005.

TOYODA, T.; OHTAGUCHI, K. Xylitol production from lactose by biotransformation. **J. Biochem Techn.**, v. 2, n. 1, p. 126-132, 2009.

TONG, Z. H.; GU, W. Z.; GEN, Z. Effect on plasma glucose and insulin after xylitol loading in 30 normal adults. **Zhonghau Nei Ke Za Zhi**, v. 26, n. 7, p. 420-422, 1987.

TOUSTER, O. The metabolism of polyols. In: SIPPLE, H. L.; MCNUTT, K. W. (Ed). **Sugars in Nutrition**, Academic Press, New York; p. 229-239, 1974.

VANDESKA, E.; KUZMANOVA, S.; JEFFRIES, T. Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 213-218, 1995.

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D. Valor nutritivo da biomassa de células íntegras, do autolisado e do extrato de levedura originária de cervejaria. **Rev. Nut.**, v. 13, n. 2, p. 127-134, 2000.

WACHTMEISTER, J.; ROTHER, D. Recent advances in whole cell biocatalysis techniques bridging from investigative to industrial scale. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 42, p. 169-177, 2016.

WALSH, M. K.; KHLIAF, H. F.; SHAKIR, K. A. Production of Xylitol from Agricultural Waste by Enzymatic Methods. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 13, n. 1, p. 1-8; 2018.

WASHUETT, J.; RIEDER, P.; BANCHER, E. A qualitative and quantitative study of sugar-alcohols in several foods. **Journal of Food Science**, v. 38, 1262-1263, 1973.

WERPY, T.; PETERSEN, G. Top Value Added Chemicals from Biomass. In: STAFF, M. **Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas**. US Department of Energy, 2004, p. 61-65.

WINKELWAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial Conversion of D-xilose to Xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 1-14, 1998.

YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C. Composição centesimal e valor proteico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. **Rev. Nutr.**, v. 16, n. 4, p. 423-432, 2003.

YANG, L.; CAO, J.; MAO, J.; JIN, Y. Sodium carbonate-sodium sulfite pretreatment for improving the enzymatic hydrolysis of rice straw. **Industrial crops and products**, v. 43, p. 711-717, 2013.

YLIKAHRI, R. Metabolic and Nutritional Aspects of Xylitol. **Advances in Food Research**, v. 25, p. 159-176, 1979.

YOUNES, H.; DEMIGNE, C.; REMESY, C. Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. **British Journal of Nutrition**, v. 75, p. 301–314, 1996.

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. **PNAS**, v. 97, p. 11614-11619, 2000.

ZACHARIS, C. Xylitol. In: WILEY e SONS, Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology. In: KEARSLEY, M.; O'DONNELL, K. **Xylitol**, 2012, p. 347-382.

ZAHED, O.; JOUZANI, G. S.; ABBASALIZADEH, S.; KHODAIYAN, F.; TABATABAEI, M. Continuous co-production of ethanol and xylitol from rice straw hydrolysate in a membrane bioreactor. **Folia Microbiol.**, v. 61, n. 3, p. 179-189, 2015.

ZALDIVAR, L.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L. O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 5, p. 524-530, 2000.

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **J. In. Microbiol. Biotechnology**, v. 35, p. 367-375, 2008.

ZHAO, X. B.; PENG, F.; DU, W.; LIU, C. M.; LIU, D. H. Effects of some inhibitors on the growth and lipid accumulation of oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* and preparation of biodiesel by enzymatic transesterification of the lipid. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 6, p. 993-1004, 2012.

ZHU, J. Y.; PAN, X. J.; WANG, G. S.; GLEISNER, R. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 2411-2418, 2009.