UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

FANNY MACHADO JOFRE

Aproveitamento da biomassa seca de *Candida guilliermondii* FTI 20037 como agente destoxificante do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol

Lorena

2019

FANNY MACHADO JOFRE

Aproveitamento da biomassa seca de *Candida guilliermondii* FTI 20037 como agente destoxificante do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe

Versão Original

Lorena
2019

NÃO AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, SERÁ DISPONIBILIZADO AUTOMATICAMENTE APÓS 2 ANOS DA PUBLICAÇÃO

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

Jofre, Fanny Machado
Aproveitamento da biomassa seca de Candida guilliermondii FTI 20037 como agente destoxificante do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol / Fanny Machado Jofre; orientadora Maria das Graças de Almeida Felipe - Versão Original. - Lorena, 2019.
89 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. 2019

1. Adsorção. 2. Cana-de-açúcar. 3. Compostos tóxicos. 4. Destoxificação. 5. Xilitol. I. Título. II. Felipe, Maria das Graças de Almeida, orient.

Dedico à minha família: aos meus pais, que nunca mediram esforços para me ajudar, e ao meu querido irmão.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Claudinei e Ana Paula, que a todo momento do mestrado me apoiaram e incentivaram, além da compreensão e paciência que foram essenciais para mim. Agradeço também ao meu irmão Lucas pela amizade e cumplicidade, a quem posso confiar para tudo.

À minha família, pelo suporte e amor infinito que dela recebo: minhas tias Eliane, Andreia e Dora, meus tios Jorge e César. Também ao meu namorado Felipe, pelo companheirismo e amor.

À minha orientadora, professora Maria das Graças, que antes mesmo de ser minha orientadora, me aconselhou para que eu não desistisse de entrar no mestrado, e esta motivação fez toda a diferença para mim. Grata pela orientação, paciência, e por todo conhecimento passado a diante! Levarei seu profissionalismo como um exemplo a seguir.

Ao professor Júlio César dos Santos pelo auxílio na etapa de planejamento desta pesquisa, sua contribuição foi fundamental para o desenvolvimento da dissertação.

Aos meus queridos amigos e também parceiros de laboratório Sarah, Andrés e Henrique, que admiro cada qual com sua qualidade, ambos com muito talento e dedicação à pesquisa. Nossa convivência foi um grande ensinamento para mim. Por isto, agradeço a amizade, a ajuda e o suporte oferecido por vocês em vários momentos, sempre que precisei!

Às amizades que cultivei após iniciar o mestrado: Amanda, Ana Maria, Lívia, Mariana, Tainã, Uirajá. Muito obrigada pelo apoio oferecido nos momentos bons e nos difíceis, por compartilharem comigo suas alegrias e por proporcionarem encontros divertidos!

A todos os colegas que tive a oportunidade de conhecer no Departamento de Biotecnologia, obrigada a todos pelas risadas compartilhadas e aos que além disso, me auxiliaram em alguns momentos da pesquisa. Gentileza gera gentileza!

Às minhas amizades antigas também, Ana Cecília, Larissa e Marina, que acompanharam meu mestrado de longe e sempre torceram por mim!

Aos técnicos e funcionários do Departamento de Biotecnologia pela colaboração.

Aos docentes por compartilharem seus conhecimentos e permitirem minha formação no mestrado.

À agência de fomento Capes por conceder a bolsa de mestrado.

À Escola de Engenharia de Lorena e a Universidade de São Paulo.

"Somos todos mestres e discípulos uns dos outros." (Arly Cravo)

RESUMO

JOFRE, Fanny Machado. **Aproveitamento da biomassa seca de *Candida guilliermondii* FTI 20037 como agente destoxificante do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol.** 2019. 89p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Subprodutos provenientes de biomassas lignocelulósicas contém composição química rica em açúcares, os quais podem ser aproveitados em diferentes processos fermentativos, como na produção biotecnológica de xilitol, um importante insumo para os segmentos industriais alimentício, farmacêutico e odontológico. A despolimerização da parede celular vegetal é uma etapa importante para o aproveitamento destas biomassas em bioprocessos, como para obtenção do hidrolisado hemicelulósico, que tem a hidrólise ácido diluído como um dos principais métodos utilizados. Entretanto, além da solubilização dos açúcares, ocorre a liberação e formação de compostos tóxicos aos microrganismos, principalmente compostos fenólicos. Frente a este problema, metodologias de destoxificação dos hidrolisados vem sendo estudadas, de forma a se obter um método mais econômico, sustentável e rentável. Assim sendo, este trabalho tem o objetivo de aproveitar a biomassa seca de *Candida guilliermondii* FTI 20037 proveniente da bioprodução de xilitol, como agente destoxificante do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar. Aproveitou-se a biomassa da levedura proveniente do cultivo em hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar (1:1) suplementado com nutrientes. Esta biomassa foi autoclavada, seca em estufa a 90°C até peso constante, triturada em gral com pistilo, e empregada na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico. Foi empregado planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central, sendo as variáveis avaliadas o pH do hidrolisado, proporção entre a biomassa seca e hidrolisado, tempo de contato e temperatura. Como experimento controle empregou-se a destoxificação com carvão vegetal ativado. Observou-se que o tratamento do hidrolisado com biomassa seca de *C. guilliermondii* no HHBP reduziu o teor dos compostos tóxicos avaliados, principalmente de compostos fenólicos. Neste caso, a máxima remoção com a biomassa seca foi de 27%, enquanto que com o carvão, esta foi de 40,3%. Ambos procedimentos levaram a uma pequena perda dos açúcares xilose, glicose e arabinose. A condição de destoxificação com a biomassa seca estabelecida no planejamento fatorial que se verificou maior remoção de fenólicos foi empregada para a avaliação da produção de xilitol. Verificou-se que o máximo consumo de xilose (89%) ocorreu com o uso do carvão, enquanto que para a biomassa seca foi de 80,2%. Porém, o fator de conversão de xilose a xilitol foi favorecido com o uso de biomassa seca, enquanto a produtividade volumétrica de xilitol foi favorecida pelo uso do carvão. Estes resultados obtidos são promissores quanto a possibilidade de ser estabelecido um método alternativo de destoxificação de hidrolisados provenientes de biomassas vegetais, a partir do aproveitamento da biomassa microbiana residual do processo fermentativo da produção de xilitol.

Palavras-chave: Adsorção. Cana-de-açúcar. Compostos tóxicos. Destoxificação. Levedura seca. Parede celular. Xilitol.

ABSTRACT

JOFRE, Fanny Machado. **Utilization of the dried biomass of *Candida guilliermondii* FTI 20037 as a detoxifying agent of the hemicellulosic hydrolysate of sugarcane bagasse and straw mixture for the biotechnological production of xylitol.** 2019. 89p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

By-products from lignocellulosic biomass contain a chemical composition rich in sugars, which can be used in different fermentation processes, as in the biotechnological production of xylitol, an important input for the food, pharmaceutical and dental industries. The depolymerization of the plant cell wall is an important step for the utilization of these biomasses in fermentative bioprocesses, such as to obtain the hemicellulosic hydrolysate, which has dilute acid hydrolysis as one of the main methods used. However, besides the solubilization of sugars, this method releases and make toxic compounds to microorganisms, mostly phenolic compounds. In view of this problem, methodologies for detoxification of hydrolysate have been studied in order to obtain a more economical, sustainable and profitable method. Therefore, this work aims to take advantage of the dried biomass of *Candida guilliermondii* FTI 20037 derived from the bioproduction of xylitol as a detoxifying agent of the hemicellulosic hydrolysate of the sugarcane bagasse and straw (HHSBS) mixture. The yeast biomass cultivated on the hemicellulosic hydrolysate of sugarcane bagasse and straw mixture (1:1) and supplemented with nutrients was used. This biomass was autoclaved, oven dried at 90 °C until constant weight, ground with mortar and pestle, and used on detoxification of the hemicellulosic hydrolysate, by a 2^4 factorial design with triplicate at the central point. The variables evaluated were pH of HHSBS, ratio between dry biomass and HHSBS, time of contact and temperature. The control experiment was the hydrolysate detoxification by activated charcoal. It was observed that the use of dried biomass of *C. guilliermondii* in HHSBS reduced the content of all toxic compounds evaluated, mainly phenolic compounds. The phenolic compounds maximum removal by using dried biomass was 27%, although the use of activated charcoal removed 40.3%. Both procedures led to a small loss of sugars (xylose, glucose and arabinose). The condition removed the highest phenolic content was submitted to the fermentability test, aiming the production of xylitol. It was verified that the highest consumption of xylose (89%) occurred with the use of charcoal, whereas for the dried biomass it was 80.2%. However, the conversion factor of xylose to xylitol was favored using dried biomass, while the volumetric productivity of xylitol was favored by using charcoal. The results obtained are promising to establish an alternative method for detoxification of hemicellulosic hydrolysates by using residual microbial biomass from the fermentation process of xylitol production.

Keywords: Adsorption. Sugarcane. Toxic compounds. Destoxification. Dried yeast. Cell wall. Xylitol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da parede celular de biomassas lignocelulósicas, constituídas pelos principais polímeros celulose, hemicelulose e lignina. 19
Figura 2 - Principais componentes da biomassa lignocelulósica fracionados após procedimento de pré-tratamento. 21
Figura 3 - Esquema dos compostos obtidos após hidrólise ácido diluído de biomassas lignocelulósicas. 22
Figura 4 - Reação de conversão do fenol a catecol por *Candida tropicalis*.....26
Figura 5 - Vias metabólicas conhecidas e hipotéticas com relação ao consumo de furfural por *Candida magnoliae* na presença de xilose e glicose no meio de cultivo. 27
Figura 6 - Componentes estruturais da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. ..33
Figura 7 - Organização estrutural dos compostos presentes na parede celular de fungos. 34
Figura 8 - Estrutura molecular do xilitol. 37
Figura 9 - Produção de xilitol a partir de biomassas lignocelulósicas pelas vias químicas e biotecnológica. 40
Figura 10 - Rota metabólica da produção de xilitol por *Candida guilliermondii* FTI 20037. 41
Figura 11 - Diagrama de Pareto com efeitos estimados para a redução no teor de compostos fenólicos, obtidos em experimentos empregando a biomassa seca de *C. guilliermondii* no HHBP.....57
Figura 12 - Diagramas de Pareto com efeitos estimados para a redução no teor de ácido acético (A), 5-HMF (B), e furfural (C) obtidos nos experimentos de destoxificação realizados empregando a biomassa seca de *Candida guilliermondii* no HHBP.....62
Figura 13 - Perda ou ganho dos açúcares glicose (■), xilose (■) e arabinose (■), após destoxificações do HHBP em função do planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central. 65
Figura 14 - Diagramas de Pareto com efeitos estimados com relação a perda dos açúcares xilose (A), glicose (B), e arabinose (C) obtidos nos experimentos de destoxificação empregando biomassa seca de *C. guilliermondii* no HHBP.....66
Figura 15 - Consumo de xilose (▲), arabinose (●) e glicose (◆) por *C. guilliermondii* FTI 20037 durante fermentação em HHBP destoxificado com biomassa seca de *C. guilliermondii* (---) ou carvão ativado (—).....68
Figura 16 - Concentração de compostos fenólicos presente no HHBP destoxificado com biomassa seca de *C. guilliermondii* (■) ou carvão ativado (■) em função das fermentações nestes hidrolisados. 70
Figura 17 - Produção de xilitol (▲), biomassa (●) e etanol (◆) por *C. guilliermondii* FTI 20037 em HHBP destoxificado com biomassa seca de *C. guilliermondii* (---) ou carvão vegetal ativado (—).....71
Figura 18 - Fator de conversão de xilose a xilitol, $Y_{P/S}$ (A) e produtividade volumétrica de xilitol Q_p (B), durante as fermentações com *C. guilliermondii* em HHBP destoxificado com biomassa seca de *C. guilliermondii* (■) ou destoxificado com carvão ativado (■). 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de pka de alguns compostos fenólicos derivados da lignina..... 32
Tabela 2 - Planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central, e suas variáveis de entrada com níveis reais e codificados. 48
Tabela 3 - Caracterização química estrutural da palha e bagaço de cana, separadamente, da mistura destas duas biomassas, e do resíduo sólido (celulignina) resultante da hidrólise em ácido diluído. 51
Tabela 4 - Composição química estrutural da palha e do bagaço de cana individualmente e em mistura, reportados na literatura. P+B= mistura de palha e bagaço. 52
Tabela 5 - Composição química do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana após hidrólise (original) e após concentração a vácuo (concentrado). 54
Tabela 6 - Concentração de compostos fenólicos no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana (HHBP) não destoxificado (ND) e destoxificado (D), além da redução (%) destes compostos em função das destoxificações com biomassa seca de *C. guilliermondii* FTI 20037, para cada ensaio realizado por planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central. 56
Tabela 7 - Concentração (g/L) de ácido acético, 5-HMF e furfural no HHBP não destoxificado (ND), destoxificado (D), e a redução (%) destes compostos conforme planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central..... 60
Tabela 8 - Concentração média de compostos fenólicos, ácido acético, 5-HMF e furfural presentes no HHBP, em função da alteração de pH do hidrolisado realizadas antes das destoxificações..... 61

LISTA DE ABREVIATURAS

HHBP	Hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
5-HMF	5-hidroximetilfurfural

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 18
2.1 Cana-de-açúcar: bagaço e palha 18
2.2 Utilização de hidrolisados hemicelulósicos em bioprocessos 20
2.2.1 Compostos presentes em hidrolisados hemicelulósicos com ação tóxica ou inibitória às leveduras 23
2.2.2 Tolerância de leveduras aos compostos tóxicos 25
2.3 Emprego de microrganismos como agentes destoxificantes 28
2.3.1 Microrganismos vivos 29
2.3.2 Microrganismos não vivos/inviáveis 29
2.4 Parede celular de leveduras 32
2.5 *Candida guilliermondii* 35
2.6 Produção química e biotecnológica de xilitol 36
3 OBJETIVOS 43
3.1 Objetivo geral 43
3.2 Objetivos específicos 43
4 MATERIAL E MÉTODOS 44
4.1 Matéria-prima 44
4.2 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico 44
4.*2.1 Concentração do hidrolisado hemicelulósico* 44
4.3 Determinação da composição química estrutural dos subprodutos da cana-de-açúcar 45
4.*3.1 Determinação de extrativos* 45
4.3.2 Hidrólise da biomassa lignocelulósica 45
4.3.3 Determinação de lignina solúvel, insolúvel e de açúcares 45
4.3.4 Determinação de cinzas 46
4.4 Obtenção da biomassa *Candida guilliermondii* FTI 20037 para emprego na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico da mistura do bagaço e palha de cana-de-açúcar 46
4.4.1 Tratamento da biomassa residual de Candida guilliermondii FTI 20037 .. 47
4.5 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar 47
4.5.1 Análise estatística 48

4.6 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico submetido à destoxificação com biomassa seca de *C. guilliermondii* FTI 20037.....49

4.7 Métodos Analíticos.....49

4.7.1 Análises das concentrações de açúcares e compostos tóxicos..... 49

4.7.2 Quantificação de concentração celular, determinação da viabilidade celular e pureza da cultura..... 50

4.7.3 Determinação da viabilidade celular e pureza da cultura..... 50

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 51

5.1 Caracterização química do bagaço e palha de cana-de-açúcar.....51

5.2 Composição do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar (HHBP) 53

5.3 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana-de-açúcar (HHBP) empregando biomassa seca de *C. guilliermondii* FTI 20037.....55

5.3.1 Efeito das destoxificações com relação ao teor de compostos fenólicos 55

5.3.2 Efeito das destoxificações com relação aos teores de ácido acético, 5-hidroximetilfurfural e furfural 59

5.3.3 Efeito das destoxificações com relação aos teores de glicose, xilose e arabinose..... 64

5.4 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana com carvão vegetal ativado 67

5.5 Teste de fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar destoxificado com biomassa seca de *C. guilliermondii* FTI 20037.....67

6 CONCLUSÕES.....74

7 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS.....75

REFERÊNCIAS 76

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar tem grande importância econômica para o Brasil, o maior produtor mundial e integrá-la no contexto de biorrefinaria, significa converter esta biomassa em biocombustíveis, energia e produtos de alto valor agregado, sendo um destes produtos o xilitol. O xilitol é comercialmente produzido pela indústria química, a partir da utilização do açúcar xilose, proveniente de biomassas lignocelulósicas, e apresenta grande aplicabilidade nos setores industriais, como alimentício, farmacêutico e odontológico. Entretanto, devido às condições severas de temperatura e pressão empregadas neste processo, o preço de venda é alto, e por isto a produção biotecnológica deste produto ganha destaque por ser uma potencial alternativa econômica.

No caso da produção biotecnológica do xilitol, subprodutos agroindustriais, como bagaço e palha da cana-de-açúcar são aproveitados, e sua produção ocorre a partir da bioconversão da xilose a xilitol por leveduras fermentadoras de pentoses, com destaque à espécie *Candida guilliermondii*. Entretanto, devido à recalcitrância que as biomassas lignocelulósicas em geral apresentam, este bioprocesso requer previamente a solubilização dos açúcares constituintes da fração hemicelulósica, e neste caso a hidrólise com ácido diluído tem sido amplamente empregada.

Por outro lado, juntamente aos açúcares, a hidrólise ácida de biomassas lignocelulósicas libera e também produz compostos que são tóxicos para os microrganismos, e dependendo de suas concentrações, podem inibir a fermentação. A maior parte destes compostos são derivados da lignina, os compostos fenólicos, e em menor quantidade os derivados da hemicelulose, como o ácido acético, e os formados durante hidrólise, como furfural e 5-hidroximetilfurfural. Desta forma, para possibilitar o emprego de hidrolisados em bioprocessos, diferentes metodologias de destoxificação têm sido propostas, visando reduzir o teor de tóxicos a níveis toleráveis pelos microrganismos. A técnica de adsorção com carvão vegetal ativado tem sido empregada devido a sua eficácia na remoção de principalmente compostos fenólicos. Entretanto o alto custo do carvão e a geração de resíduos que seu uso implica podem ser desvantajosos em um processo de destoxificação. Considerando esta questão, potencial candidato a substituir o carvão é a parede celular microbiana, uma alternativa economicamente viável, que em certas condições, pode adsorver compostos tóxicos, a exemplo dos fenólicos.

Assim, com os avanços já alcançados na Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP) quanto à produção de xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos, como do bagaço de

cana-de-açúcar, e atualmente com a introdução da mistura do bagaço e palha, é aqui proposto investigações para a introdução de novas metodologias de destoxificação dos hidrolisados. Neste sentido o aproveitamento da biomassa residual de *Candida guilliermondii* FTI 20037, comumente empregada na produção de xilitol, se apresenta como um método alternativo ao carvão, de forma a se avaliar a eficácia deste procedimento com efeito sinérgico entre a capacidade de remoção dos tóxicos e favorecimento da bioconversão de xilose a xilitol, no contexto de uma biorrefinaria.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-açúcar: bagaço e palha

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sua produção estimada para a safra 2018/19 chega a 615,84 milhões de toneladas, sendo a região sudeste a maior produtora do país. Os principais produtos obtidos a partir da cana são o etanol e o açúcar, sendo que nesta safra sua produção deverá atingir 32,31 bilhões de litros e 31,73 milhões de toneladas, respectivamente (CONAB, 2018). A produção de etanol e açúcar gera alguns subprodutos, dentre os principais estão o bagaço, proveniente da extração do caldo de cana, e a palha, obtida em função da colheita mecanizada da cana, e juntos, estes subprodutos correspondem a cerca de 66% do conteúdo energético da planta (PIPPO et al., 2011). Estima-se que para cada 1 tonelada colhida de cana-de-açúcar, é possível obter cerca de 140 kg em massa seca de bagaço e de palha, separadamente (PIPPO et al., 2008).

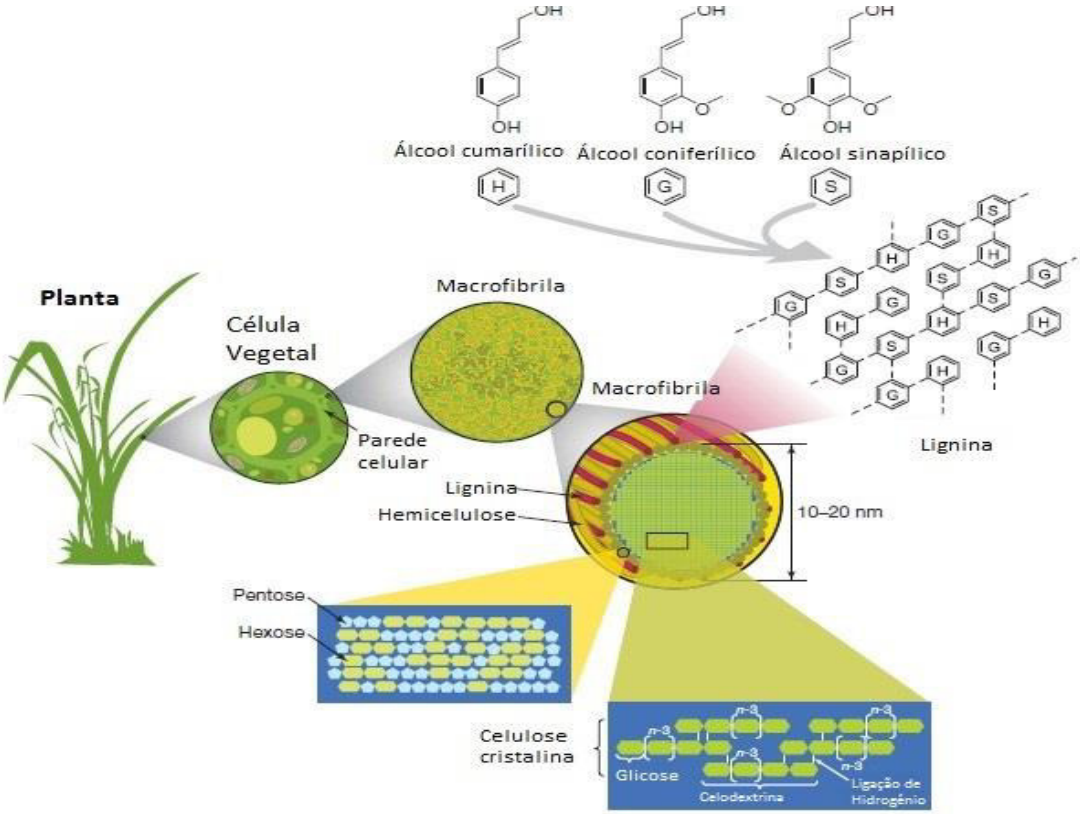
Devido à grande quantidade de bagaço e palha, existem diferentes destinos para o aproveitamento parcial desses subprodutos. No caso do bagaço, parte é incinerado em caldeiras para fornecer energia e vapor em moinhos de açúcar domésticos, e/ou para a cogeração de energia no próprio setor sucroalcooleiro (KIATKITTIPONG; WONGSUCHOTO; PAVASANT, 2009). O bagaço também pode ser aproveitado como fertilizante de solos no cultivo da cana (MONTEIRO et al., 2016), matéria prima para a produção de bioetanol, biogás e papel (KIATKITTIPONG; WONGSUCHOTO; PAVASANT, 2009), e na fabricação de novos materiais a partir de sua fibra (LOH et al., 2013).

Enquanto o aproveitamento parcial do bagaço já é consolidado, a palha é um subproduto que tem se tornado abundante nos últimos anos, devido à substituição gradual do método de colheita manual da cana, que até 2002 era realizado predominantemente pela queima da palha, para a colheita mecanizada. Em 2014, os maiores Estados produtores de cana, São Paulo e Minas Gerais, substituíram a queima da palha pela colheita mecanizada, e em 2018 foi implementada uma lei que determina a eliminação gradativa da queima da palha em todo o país (LEAL et al., 2013; CALDEIRA-PIRES et al., 2018). Assim, torna-se necessário implementar novas formas de manejo da palha parcialmente, pois já é sabido que, quando deixada no campo, serve como fonte de carbono e outros nutrientes, além de evitar a erosão e perda de água do solo (CERRI et al., 2011; CARDOSO et al., 2015). Além disto, esta biomassa vegetal se mostra propícia para uso na produção de bioeletricidade de 1ª geração, ou em biocombustíveis de 2ª geração, e há ainda a possibilidade de sua participação

conjunta com o bagaço na produção de energia (CALDEIRA-PIRES et al., 2018). Quanto às características desses subprodutos, o bagaço da cana é um material fibroso, homogêneo, enquanto que a palha representa as folhas verdes e secas da cana, com menor teor de umidade comparado ao bagaço (PIPPO et al., 2011).

Em relação à composição química da parede celular da cana-de-açúcar como um todo, e também dos vegetais de uma maneira geral, os principais constituintes são a celulose, hemicelulose e lignina, polímeros dos quais compõem a lignocelulose (Figura 1) (PULIGUNDLA; OH; MOK, 2016). No caso do bagaço, este é constituído por cerca de 40 a 46% de celulose, de 27 a 35% de hemicelulose, de 15 a 23% de lignina e 2,3 a 4% de cinzas (SUN et al., 2004; DE ÁVILA RODRIGUES; GUIRARDELLO, 2008; PIPPO et al., 2011). Já a palha, possui cerca de 31 a 40% de celulose, de 27 a 30% de hemicelulose, de 21 a 31% de lignina e 1,5 a 6% de cinzas (SILVA et al., 2010; MOUTTA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; SZCZERBOWSKI et al., 2014; HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA; FELIPE, 2016).

Figura 1 - Estrutura da parede celular de biomassas lignocelulósicas, constituídas pelos principais polímeros celulose, hemicelulose e lignina.



Fonte: Adaptado de Rubin (2008).

Segundo Fengel e Wegener (1989), a celulose, ilustrada na Figura 1, é um homopolissacarídeo linear, composto por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas do tipo β 1→4, enquanto que a hemicelulose, heteropolissacarídeo com ramificações curtas, é composto tanto de hexoses quanto de pentoses, dentre eles arabinose, glicose, galactose e majoritariamente xilose. De acordo com estes autores, a lignina é constituída por diversos compostos fenólicos e possui como precursores os álcoois p-cumarílico, coniferílico e sinapílico, os quais são incorporados na lignina por unidades básicas de guaiacil, siringil e *p*-hidroxifenil. Além disto, há diferenças na composição da lignina do bagaço e da palha, no caso do bagaço contém maior teor de siringil enquanto que para a palha, o guaiacil predomina (DEL RÍO et al., 2015). Rodrigues et al. (2001) identificaram os principais compostos fenólicos presentes no bagaço de cana: vanilina, siringaldeído, e os ácidos *p*-hidroxibenzóico, vanilinico, siríngico e ferúlico.

Considerando que a biomassa vegetal lignocelulósica é uma fonte abundante e renovável de açúcares, e que grande quantidade de subprodutos é formada na indústria sucroalcooleira, pesquisas são realizadas para avaliar a possibilidade do aproveitamento biotecnológico destas biomassas para a obtenção de produtos de alto valor agregado.

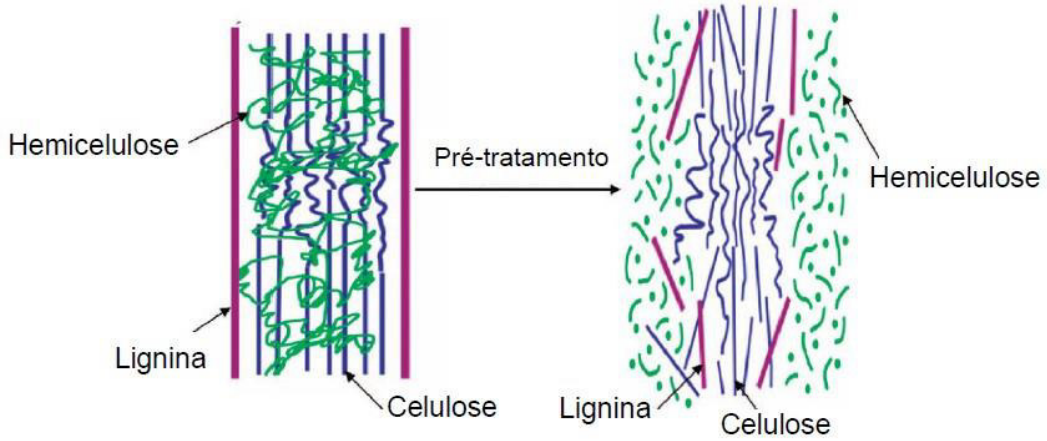
2.2 Utilização de hidrolisados hemicelulósicos em bioprocessos

A literatura reporta pesquisas com diferentes subprodutos agroindustriais, visando o aproveitamento de principalmente seus açúcares constituintes, e os subprodutos amplamente estudados são os bagaços de cana-de-açúcar (ARRUDA et al., 2017), de sorgo (BARCELOS et al., 2016), e as palhas de cana-de-açúcar (OLIVEIRA et al., 2013; HERNÁNDEZ-PÉREZ, 2015), de arroz (FONSECA et al., 2018), e de colza (LÓPEZ-LINARES et al., 2018).

Entretanto, os materiais lignocelulósicos apresentam recalcitrância devido à lignina presente na parede celular vegetal, o que dificulta o uso de seus compostos, como por exemplo dos carboidratos pelos microrganismos (MANSFIELD; MOONEY; SADDLER, 1999). Por este motivo, para o aproveitamento adequado de carboidratos provenientes de biomassas vegetais em bioprocessos, é necessário antes a desconstrução da parede celular vegetal. Esta desconstrução possibilita a solubilização dos açúcares constituintes da biomassa lignocelulósica, e para tanto é realizada a hidrólise, cujos procedimentos são escolhidos em função da fração a ser utilizada, seja celulósica, hemicelulósica ou ambas.

Para a solubilização dos carboidratos constituintes destas biomassas vegetais, celulose e hemicelulose, etapas de pré-tratamento e/ou hidrólise tem sido empregadas (OLIVEIRA et al., 2013; RAO et al., 2016; SILVA-FERNANDES et al., 2017; SANTOS et al., 2018) em que se obtém um hidrolisado celulósico ou hemicelulósico, dependendo da metodologia utilizada (HIMMEL et al., 2007). Também é sabido que o tipo de tratamento do bagaço de cana afeta a estrutura da lignina (MIYAMOTO et al., 2018). O desenho esquemático apresentado na Figura 2 é uma ilustração da estrutura da biomassa lignocelulósica antes e após pré-tratamento de desconstrução dos seus constituintes.

Figura 2 - Principais componentes da biomassa lignocelulósica fracionados após procedimento de pré-tratamento.



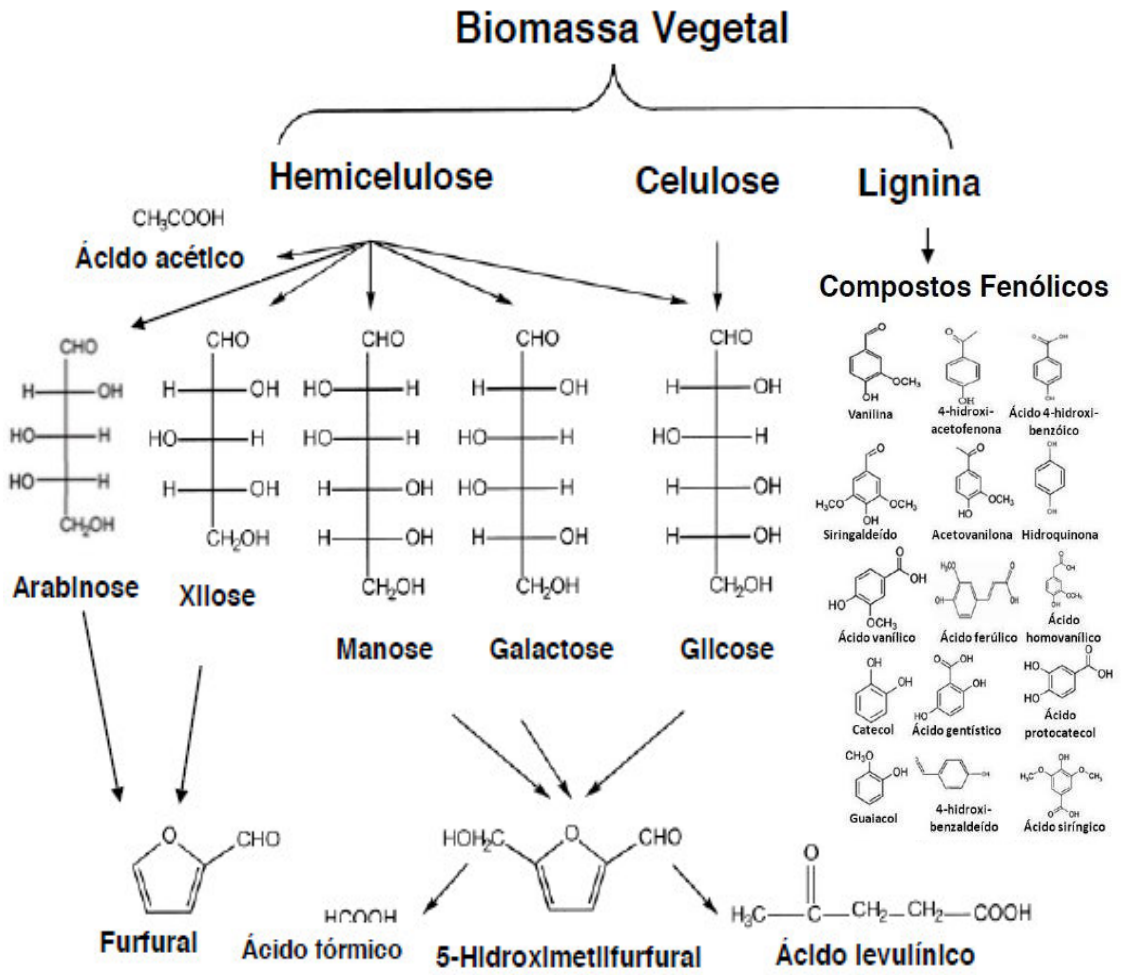
Fonte: Adaptado de Kumar et al. (2009)

Microrganismos de interesse industrial, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (NUANPENG et al., 2018), são empregados em bioprocessos visando o aproveitamento dos carboidratos provenientes da parede celular de vegetais, porém, no caso desta espécie, bem como de outras leveduras, estas não possuem a capacidade natural de fermentarem a xilose (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). Por outro lado, a levedura *Candida guilliermondii* é capaz de assimilar tanto hexoses quanto pentoses (PAPON et al., 2013), possibilitando o maior aproveitamento dos açúcares provenientes de fontes vegetais, como a xilose e arabinose, para a obtenção de produtos de interesse industrial.

A literatura apresenta diversos tipos de processos hidrolíticos do material lignocelulósico, e no caso das pesquisas sobre o aproveitamento da xilose constituinte da fração hemicelulósica do bagaço e da palha da cana-de-açúcar, a hidrólise com ácido diluído tem sido comumente empregada (RODRIGUES et al., 2003; HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA; FELIPE, 2016; SILVA-FERNANDES et al., 2017) devido à sua eficiência (LIU;

CHENG, 2010; CHENG et al., 2015). Para tanto, as condições deste processo são bem estabelecidas, e empregam temperatura de 121°C por 20 minutos, em solução a 1% (m/v) de H_2SO_4 (1:10) para o bagaço (SILVA et al., 2004) e palha de cana (HERNÁNDEZ-PÉREZ, 2015). Porém, assim como outros em procedimentos de hidrólise, a hidrólise com ácido diluído provoca não somente a solubilização carboidratos, mas também de ácido acético e principalmente compostos fenólicos, além de formar produtos como furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), ácidos fórmico e levulínico, como ilustrado na Figura 3.

Figura 3 - Esquema dos compostos obtidos após hidrólise ácido diluído de biomassa vegetal.



Fonte: Arruda (2011).

Conforme ilustrado na Figura 3, o tratamento da biomassa com ácido solubiliza a hemicelulose em pentoses, hexoses e ácido acético, este último proveniente dos grupos acetil (TIZAZU; MOHOLKAR, 2018). Este tratamento também ocasiona a remoção de compostos fenólicos derivados da lignina, sendo que no caso do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, os principais compostos fenólicos encontrados são os ácidos p-cumarílico, ferúlico

e, em menor quantidade, gálico (RODRIGUES et al., 2010). Os compostos furfural e 5-hidroximetilfurfural, derivados de pentoses e hexoses, respectivamente, são produtos formados a partir da reação de desidratação destes açúcares em função da alta temperatura empregada no processo de hidrólise (HU et al., 2018).

A composição química dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço bem como a de palha, resultante da hidrólise ácido diluída, é apresentada em diversos trabalhos, principalmente quanto aos teores de glicose, xilose, arabinose, ácido acético e compostos fenólicos. Segundo Arruda (2011), para o bagaço esta foi 1,82 g/L de glicose, 15,73 g/L de xilose, 1,45 g/L de arabinose, 2,31 g/L de ácido acético, 0,19 g/L de furfural, 0,02 de 5-hidroximetilfurfural e 5,48 g/L de compostos fenólicos, enquanto que para a palha Hernández-Pérez (2015) relatou valores de 3,7 g/L de glicose, 18,6 g/L de xilose, 3,9 g/L de arabinose, 2,23 g/L de ácido acético, 0,33 g/L de furfural e 0,57 g/L de 5-hidroximetilfurfural.

Além desses compostos acima mencionados, também estão presentes nesses hidrolisados, como o de bagaço de cana, íons metálicos, dentre eles: ferro (170 mg/L), cromo (34,32 mg/L), níquel (14,42 mg/L) e zinco (12,07 mg/L) conforme relatado na pesquisa realizada por Silva-Fernandes et al. (2017). Segundo Mussatto e Roberto (2004), estes metais podem ser encontrados nos hidrolisados hemicelulósicos em função da corrosão do aço presente no equipamento empregado para a realização da hidrólise e/ou da natureza do vegetal.

2.2.1 Compostos presentes em hidrolisados hemicelulósicos com ação tóxica ou inibitória às leveduras

Assim como citado no item anterior, compostos fenólicos, ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural, comumente encontrados em hidrolisados hemicelulósicos, podem ser tóxicos aos microrganismos, cuja ação inibitória sobre o metabolismo microbiano é dependente não somente da concentração de cada um, mas do efeito sinérgico entre estes, da composição do meio, além de outros fatores. De acordo com Klinke et al. (2003), os compostos fenólicos, compostos furânicos, ácidos carboxílicos são potenciais inibidores da fermentação, prejudicando o crescimento celular da levedura. Como exemplo, no caso relatado por López-Linares et al. (2018), a presença de compostos tóxicos no hidrolisado hemicelulósico de colza dificultou o consumo de xilose por *Candida guilliermondii,*

enquanto que em menores concentrações, a assimilação desta pentose e produção de xilitol foi superior.

Como observado anteriormente na Figura 3, há uma variedade de tipos de compostos fenólicos em hidrolisados hemicelulósicos, e a toxicidade destes compostos sobre leveduras está relacionada com a estrutura química de cada composto. De uma maneira geral, os fenólicos são considerados os principais fatores de inibição na utilização de hidrolisados provenientes de biomassas lignocelulósicas (HSU et al., 2010). Com relação aos efeitos destes compostos sobre a levedura *C. guilliermondii,* foi reportado que cerca de 2 g/L de siringaldeído, composto fenólico encontrado em hidrolisados hemicelulósicos, inibiu a produção de xilitol e o crescimento celular desta espécie quando cultivada em meio semidefinido contendo xilose como fonte de carbono (CORTEZ; ROBERTO, 2010). Os ácidos p-cumárico e ferúlico foram os principais fenóis encontrados na palha de arroz, e a presença de 0,2 g/L destes foram suficientes para inibir a produção de etanol pela levedura *Pichia stipitis* (WANG et al., 2017). Baixas concentrações de vanilina foram suficientes para inibir o crescimento e produção de etanol em *S. cerevisiae*, sendo que este composto exerce maior poder inibitório comparado a ação de outros grupos de fenólicos e compostos furânicos (KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004). Na pesquisa de Paidimuddala, Rathod e Gummadi (2017), constatou-se que para a levedura *Debaryomyces nepalensis*, a estabilidade enzimática da xilose redutase foi drasticamente afetada pela presença de ácido gálico e vanilina. No caso de bactérias produtoras de hidrogênio, os fenólicos siringaldeído e vanilina apresentaram forte inibição na produção de hidrogênio e no consumo de glicose (LIN et al., 2015). A toxicidade de compostos fenólicos está associada à atuação destes compostos como desacopladores metabólicos, ou seja, a energia dos açúcares que deve ser convertido a ATP, pode se dissipar na forma de calor, e além disto afetar o equilíbrio osmótico da mitocôndria na fosforilação oxidativa (LIU, 2003). Além disto, é sabido que a presença de fenólicos no meio de cultivo causa alterações na permeabilidade da membrana celular microbiana, ocasionando a perda de compostos intracelulares, dificuldade no transporte de substratos (a exemplo da glicose), e inativação ou redução da atividade de enzimas essenciais ao microrganismo (MONLAU et al., 2014; LIN et al., 2015).

Com relação ao ácido acético, este composto pode prejudicar processos fermentativos, como na produção de xilitol (SILVA et al., 2004), bioetanol (MIRA et al., 2010), de vinhos (ÁNGELES POZO-BAYÓN; ANDÚJAR-ORTIZ; MORENO-ARRIBAS, 2009), entre outros. Concentrações superiores a 3 g/L deste ácido inibiram a produção de xilitol por *C. guilliermondii,* em meio semidefinido contendo xilose como fonte de carbono

(FELIPE et al., 1995). Uma vez que o pKa do ácido acético é igual a 4,7, portanto em meio ácido este composto encontra-se na forma não dissociada, a qual é transportada para a célula através da difusão facilitada e no citosol sendo pH neutro, próximo a 7, ocorre a dissociação deste ácido, acidificando o citoplasma e inibindo algumas vias metabólicas (GIANNATTASIO et al., 2013). Esta diferença no pH afeta a atividade enzimática de importantes vias metabólicas e demanda o bombeamento ativo de prótons H^+ para o meio externo, através da enzima de membrana ATPase, para que a célula volte ao equilíbrio (PEREIRA et al., 2011).

No caso dos compostos furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF), concentrações acima de 1 g/L de cada composto inibiram o crescimento celular de *C. guilliermondii* cultivada em meio semidefinido (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988), e cerca de 0,5 g/L de furfural reduziu a taxa de produtividade volumétrica de xilitol por esta espécie (WANNAWILAI et al., 2017). Na pesquisa citada anteriormente, o composto que exibiu maior efeito negativo foi o furfural, em comparação ao 5-HMF. Em determinadas concentrações, estes compostos inibem a taxa de crescimento celular (LIU et al., 2015; HAROUN et al., 2016), induzem a formação de espécies reativas de oxigênio, causam danos na membrana celular (ALLEN et al., 2010) e interferem na síntese de RNA e proteínas (LIU, 2011). De acordo com Ran et al. (2014), a interferência do furfural e 5-hidroximetilfurfural na membrana celular está relacionada ao fato de que seus grupos hidrofóbicos se combinam com várias enzimas intracelulares, especialmente as glicolíticas.

2.2.2 Tolerância de leveduras aos compostos tóxicos

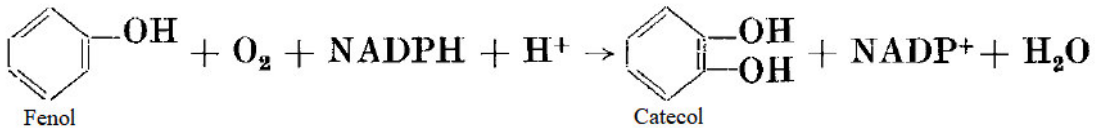
Assim como mencionado no item 2.2.1, alguns compostos presentes em hidrolisados hemicelulósicos podem ser tóxicos e inibidores de processos fermentativos, dependendo de suas concentrações. Devido a toxicidade aos microrganismos exercida por estes compostos, algumas espécies microbianas desenvolveram ao longo do tempo mecanismos para reduzir o dano causado por estes, por meio da assimilação e conversão a uma molécula não tóxica.

Quanto aos compostos fenólicos, a literatura mostra que diversas espécies de leveduras são capazes de degradar fenóis, como por exemplo na pesquisa de Karimi e Hassanshahian (2016) onde foi relatado que a degradação do fenol depende da concentração em que este se encontra no meio, por exemplo, *Pichia guilliermondii* assimilou 90% dos fenóis quando havia 0,05 g/L no meio, e ao aumentar a concentração de fenóis para 0,27 g/L, a assimilação foi cerca de 10%. Neste mesmo estudo, a espécie que obteve a maior taxa de

assimilação de fenóis foi *Candida tropicalis*, pois consumiu 95% dos fenóis no meio contendo 0,5 g/L. Como forma de proteção a levedura degrada estes compostos, porém não é observado o crescimento celular concomitante com a fase de clivagem dos fenólicos (LIU, 2003). Além disto, foi constado que esta espécie pode ser cultivada em meio contendo compostos fenólicos como única fonte de carbono (LIU et al., 2010; WANG et al., 2012).

Explicações quanto a assimilação de compostos fenólicos é relatada na literatura conforme Krug e Straube (1986). É proposto o metabolismo aeróbio, cujas etapas de degradação ocorrem principalmente por hidroxilação. A enzima fenol hidroxilase catalisa a reação do fenol a catecol e é dependente do cofator $NADPH+H^+$ (Figura 4). A segunda fase é a clivagem do anel aromático do catecol a partir de catecol 1,2-oxigenase, uma dioxigenase.

Figura 4 - Reação de conversão do fenol a catecol por *Candida tropicalis*.



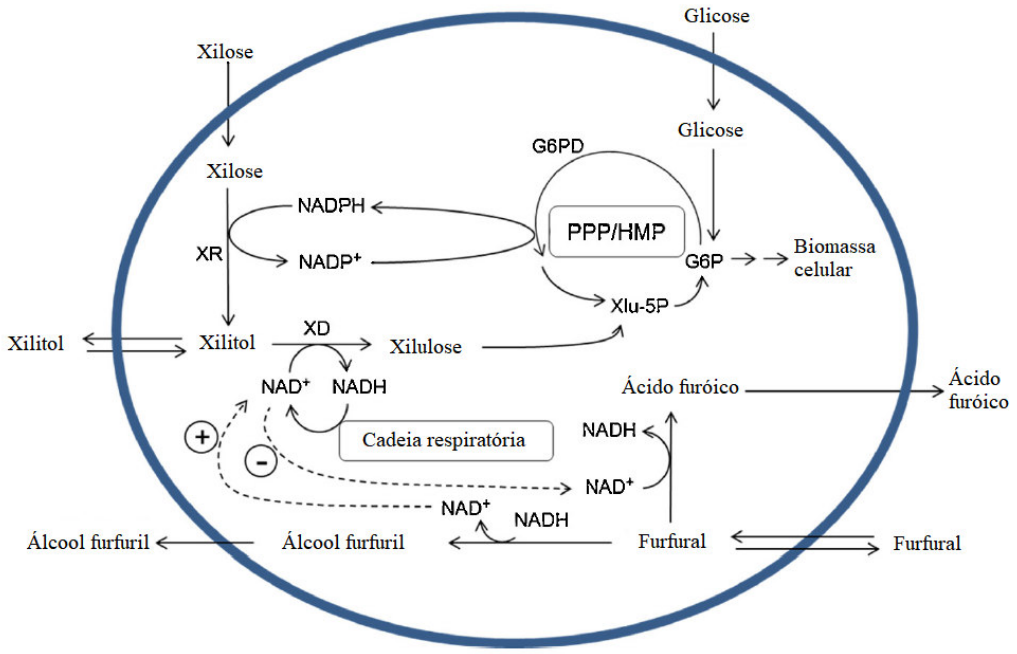
Fonte: Adaptado de Krug e Straube (1986).

No caso do ácido acético, assim como os compostos fenólicos, sua toxicidade é dependente da concentração do ácido no meio. Conforme relatado por Felipe et al. (1995) uma vez que a concentração deste ácido de até 3,0 g/L em meio semidefinido contendo xilose como fonte de carbono, não interferiu na bioconversão de xilose a xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037. Também em pesquisas com esta levedura, porém cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, realizada por Lima et al. (2004), a presença de 5 g/L deste ácido favoreceu o metabolismo de xilose por *C. guilliermondii* FTI 20037, através do aumento da atividade enzimática da xilose redutase (XR) e xilose desidrogenase (XDH).

No caso dos compostos furfural e 5-hidroximetilfurfural, segundo Horváth et al. (2003), a tolerância a estes compostos está relacionada à capacidade de sua conversão, demonstrando maior efeito tóxico do furfural em condição de aerobiose do que em anaerobiose. Wannawilai et al. (2017) relataram que a maior produção de biomassa por *C. guilliermondii* ocorreu na ausência de furfural, por outro lado, a presença do furfural na faixa de 0,1-0,3 g/L aumentou o consumo específico da xilose e favoreceu a produtividade

volumétrica de xilitol (Q_p) pela levedura, 11% a mais do que no controle, sem furfural. Segundo Liu (2011), leveduras tolerantes etanologênicas convertem furfural e 5-hidroximetilfurfural em compostos menos tóxicos, e a causa tóxica destes estaria relacionada ao aldeído ligado ao grupo funcional do anel furânico, sendo que estas leveduras convertem o aldeído em álcool, como o 2-furilmetanol e 2,5-furanodimetanol a partir de furfural e 5-hidroximetilfurfural, respectivamente. A tolerância de *S. cerevisiae* ao furfural e 5-hidroximetilfurfural foi observada quando ácido acético se encontrava presente no meio (GREETHAM; HART; TUCKER, 2016). Segundo estes autores, a saída da fase lag pela levedura ocorreu de forma mais rápida quando havia no meio ácido acético e compostos furânicos, do que comparado ao meio contendo somente compostos furânicos. No caso do furfural, algumas espécies de microrganismos, como *Candida tropicalis*, *Candida magnoliae, S. cerevisiae,* são capazes de converter este composto a álcool furfuril e ácido furóico (Figura 5), pois são derivados menos tóxicos para estas leveduras (HORVÁTH et al., 2003; WANNAWILAI et al., 2017; WANG; HE; YUAN, 2017). O favorecimento da produção de etanol, pela adição de furfural foi constatado durante cultivo de *Kluyveromyces marxianus* em meio semidefinido, sob condições de microaerobiose (KUNDIYANA et al., 2009).

Figura 5 - Vias metabólicas conhecidas e hipotéticas com relação ao consumo de furfural por *Candida magnoliae* na presença de xilose e glicose no meio de cultivo.



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

Como a presença desses compostos tóxicos em determinadas concentrações prejudicam a fermentabilidade de hidrolisados, diversas metodologias de destoxificação dos hidrolisados são empregadas, como o emprego de resinas de troca iônica (CANILHA et al., 2010; ARRUDA, 2011), carvão vegetal ativado (MARTON et al., 2006), neutralização (CHANDEL et al., 2007), evaporação a vácuo (RODRIGUES et al., 2001), membranas de nanofiltração e osmose reversa (NGUYEN et al., 2015), emprego de enzimas, como lacase e lignina peroxidase (CHO et al., 2009), microrganismos que metabolizam compostos tóxicos (LÓPEZ et al., 2004; FONSECA et al., 2011; YU et al., 2011; LUO et al., 2015) e biopolímeros (SILVA-FERNANDES et al., 2017).

No caso da utilização de hidrolisados hemicelulósicos para a produção de xilitol, a adsorção por carvão vegetal ativado tem sido a técnica de destoxificação mais empregada (MARTON et al., 2006; HERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2016; ARRUDA et al., 2017; GUPTA et al., 2017; LÓPEZ-LINARES et al., 2018). O carvão ativado é um composto empregado para destoxificação de hidrolisados devido a sua alta afinidade por compostos orgânicos, principalmente para compostos fenólicos, pois apresenta grande área de superfície por unidade de massa, exibindo boa capacidade de adsorção (HAMDAOUI; NAFFRECHOUX, 2007; HUA et al., 2012). Segundo Marton et al. (2006), a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar a partir do uso do carvão ativado, em condições pré-estabelecidas, resultou na remoção de 76% dos compostos fenólicos, 44% de ácido acético, 60% de 5-hidroximetilfurfural e 58% de furfural. A redução da concentração destes compostos neste hidrolisado hemicelulósico promoveu um aumento na conversão de xilose a xilitol e na produtividade volumétrica de xilitol por *Candida guilliermondii* FTI 20037.

2.3 Emprego de microrganismos como agentes destoxificantes

A utilização de microrganismos como agentes destoxificantes em bioprocessos é uma alternativa aos agentes físicos e químicos, pois optar pelo emprego de microrganismos apresenta baixo custo, devido a sua abundância na natureza, requer pouco processamento, não prejudica o meio ambiente por ser biodegradável, e ainda espécies de microrganismos utilizados em processos industriais podem ser reaproveitados (AHMARUZZAMAN, 2008; KIM; LEE; CHO, 2015). Estudos realizados com bactérias, fungos filamentosos e leveduriformes, mostram a capacidade destes na redução do teor de compostos fenólicos (HONFI et al., 2016), íons metálicos (RASHID et al., 2016), corantes reativos, furfural e 5-

hidroximetilfurfural em soluções aquosas (ZHANG et al., 2013), e micotoxinas (LUO et al., 2015). Desta forma, leveduras de interesse industrial são promissoras para utilização como agentes destoxificantes, pois de uma maneira geral, são microrganismos que apresentam rápido crescimento e são espécies em sua maioria não patogênicas.

2.3.1 Microrganismos vivos

Particularmente quanto ao emprego de leveduras em processos de destoxificação, há relatos com águas residuárias de indústrias e também com hidrolisados hemicelulósicos, tanto com células viáveis quanto inviáveis. A destoxificação a partir de células vivas ocorre de forma ativa, com gasto de energia pelo metabolismo microbiano dos compostos tóxicos (ZHANG et al., 2010). Nas pesquisas realizadas por Felipe et al. (1995) com a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037, durante a fermentação de xilose para a produção de xilitol, foi observado a capacidade desta em consumir o ácido acético presente no hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana, e segundo estes autores, estas células podem atuar como agentes destoxificantes do meio. Também foi observado por Camargo et al. (2015) a capacidade destoxificante desta levedura em hidrolisado hemicelulósico de sorgo forrageiro, também no bioprocesso de produção de xilitol. A utilização da levedura *Issatchenkia occidentalis* como agente destoxificante do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana resultou no metabolismo de compostos tóxicos deste hidrolisado, principalmente siringaldeído (66,67%), ácido ferúlico (73,33%), e também dos compostos furânicos furfural (62%) e 5-hidroximetilfurfural (85%), observando-se ainda a baixa redução no teor de açúcares. No caso do fungo filamentoso *Amorphotheca resinae* como agente destoxificante, verificou-se além do consumo de açúcares, o consumo de ácido acético, levulínico, furfural e 5-hidroximetilfurfural presentes nos hidrolisados hemicelulósicos provenientes de diferentes biomassas (ZHANG et al., 2010).

2.3.2 Microrganismos não vivos/inviáveis

Além do emprego de microrganismos vivos na remoção de compostos tóxicos presentes em uma solução, outra alternativa é o emprego de microrganismos não vivos ou inviáveis. O processo de remoção de compostos não ocorre através da assimilação destes, como descrito no item 2.3.1, mas sim através da adsorção. Na adsorção, moléculas existentes em meio líquido, que contém carga, se aderem a uma superfície sólida, que também

apresenta carga, por meio de interações eletrostáticas (CATELLAN, 2008; ATKINS; PAULA, 2008).

No caso da destoxificação de soluções aquosas por adsorção, a diferença entre as cargas dos compostos tóxicos (adsorbato) e a superfície da célula (adsorvente), resultam na adsorção (FOMINA; GADD, 2014). Portanto, o emprego de células não vivas ou inviáveis na destoxificação de hidrolisados pode mostrar-se vantajoso em relação ao uso de células vivas, pois uma vez que estas células não apresentam exigências nutricionais (pois não metabolizam açúcares presentes no hidrolisado), toleram diferentes níveis de pH, temperatura e concentração de tóxicos. Segundo estes autores, as células adsorventes podem ser armazenadas e recicladas para um novo ciclo de destoxificação, além disso, em processos fermentativos, as grandes quantidades de biomassa geradas podem ser reaproveitadas para a adsorção de compostos (HADI et al., 2003; AHMARUZZAMAN, 2008).

Considerando a remoção de diferentes compostos a partir uso de leveduras inviáveis, estudos reportam que a adsorção de compostos pela parede celular de leveduras ocorre através dos grupos funcionais da parede celular como carboxilas, hidroxilas, amidas, grupos fosfato (MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009; CHERIFI; BENTAHAR; HANINI, 2014). Devido a diferença entre cargas entre os grupos funcionais da parede celular e os compostos presentes na solução, interações eletrostáticas ocorrem entre estas moléculas, possibilitando a adsorção (PIOTROWSKA; MASEK, 2015). Pesquisas com diferentes espécies de leveduras vem sendo realizadas visando a redução ou remoção de diferentes tipos de moléculas. Segundo Hadi et al. (2003), *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces fragilis*, inviáveis, foram capazes reduzir a concentração de íons cádmio em uma solução aquosa contendo somente este íon. De acordo com Mathialagan e Viraraghavan (2009), o emprego da biomassa inativa de *Aspergillus niger* resultou em boa remoção do composto fenólico, pentaclorofenol, presente em águas contaminadas.

Segundo Boeris et al. (2016), a autoclavagem da biomassa microbiana aumenta a capacidade específica de adsorção de suas células, devido à alta pressão e temperatura exercidas. Alguns autores relatam que a autoclavagem fornece o aumento da área de superfície disponível e assim é ampliada a quantidade de sítios de ligação na superfície da célula (HU, 1996; ERRASQUÍN; VÁZQUEZ, 2003). A desidratação de leveduras também é estudada no ramo da adsorção de compostos iônicos, por exemplo (MUTER; PATMALNIEKS; RAPOPORT, 2001). Segundo Rapoport et al. (2018), alterações na conformação das glucanas resultam em perda da rigidez da parede celular, enfraquecimento das ligações entre manoproteínas e glucanas, e aumento na quantidade de cargas positivas e

negativas da superfície da parede celular. O grau e predominância de cargas negativas ou positivas está relacionada com o meio no qual a espécie foi cultivada. Em pesquisas realizadas por Mathialagan e Viraraghavan (2009), a qual teve como objetivo a remoção de pentaclorofenol de uma solução aquosa, com emprego da biomassa autoclavada e seca em estufa do fungo *Aspergillus niger,* foi verificado grande potencial deste fungo como agente adsorvente de pentaclorofenol.

Diversos estudos afirmam que para a obter eficácia na adsorção de compostos a partir do uso de microrganismos inviáveis, é necessário a investigação de determinados parâmetros físico-químicos, e dentre os principais estão: pH e temperatura da solução, tempo de contato entre adsorvato e adsorvente, e a concentração inicial de adsorvente (HADI et al., 2003; GADD, 2009; PARK; YUN; PARK, 2010; CHERIFI; BENTAHAR; HANINI, 2014; RASHID et al., 2016).

O pH da solução pode afetar o grau de ionização das espécies da solução, tanto para os grupos funcionais presentes no adsorvente quanto no adsorvato (BOERIS, 2016). Alguns grupos funcionais presentes na parede celular de microrganismos, como carboxilas e fosfatos apresentam carga negativa em solução com pH ácido, o que os tornam bons adsorventes de cátions. Segundo Bowman e Free (2006), a parede celular de leveduras contém como grupos funcionais carboxilas, fosforil, hidroxila, amino, amina, e imidazol, os quais são os responsáveis pela interação física com o adsorvato no processo de adsorção. Parâmetros como pH da solução igual a 4, e temperatura em torno de 15°C podem influenciar negativamente no processo de adsorção, tanto de fenóis quanto metais, pois com o aumento do pH, o grau de ionização dos grupos negativos presentes na biomassa também aumenta, causando repulsão eletrostática, dependendo da carga do composto a ser adsorvido (CHASSAGNE et al., 2005). Já na adsorção dos fenólicos, é importante considerar que estes são em geral ácidos fracos, sendo que o pKa do fenol é igual a 10, porém o pKa varia para cada composto fenólico, como mostra a Tabela 1 (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006). Por esta razão, a adsorção do fenol em pH básico não é favorecida devido a predominância do fenol na forma desprotonada.

Tabela 1 - Valores de pka de alguns compostos fenólicos derivados da lignina.

Composto	pKa
Catecol	9,3
Fenol	9,98
Guaiacol	9,93
Álcool vanilínico	9,78
Vanilina	7,4
Ácido ferúlico	4,56

Fonte: Ragnar, Lindgren e Nilvebrant (2000).

As interações eletrostáticas entre adsorvato e adsorvente podem ser interrompidas quando ocorre o fenômeno denominado dessorção. Durante a dessorção, há a liberação da substância adsorvida pelo adsorvente de volta para a solução de origem (CATELLAN, 2008; ATKINS; PAULA, 2008). Para o tratamento de dessorção de um composto, é necessária a adição de substâncias, temperaturas elevadas, os quais a escolha depende da natureza do sorbato (SILVA; MIRANDA, 2013; MUSHTAQ et al., 2016; DELGADO et al., 2018). No caso da dessorção de compostos fenólicos, o tratamento pode ser feito a partir do uso de água deionizada e cloreto de cálcio (GADD, 2009). A dessorção permite com que o agente adsorvente, possa ser reaproveitado e reciclado para um novo processo de destoxificação de compostos, como exemplo em hidrolisados hemicelulósicos (MATHIALAGAN; VIRARAGHAVAN, 2009). Boeris et al. (2016) afirmam que a dessorção de compostos presentes nas células inviáveis de *Pseudomonas putida*, que adsorveu o íon alumínio, ocorreu através do tratamento as células com ácido clorídrico a 0.01N, permitindo a reutilização destas células para emprego de um novo ciclo de destoxificação.

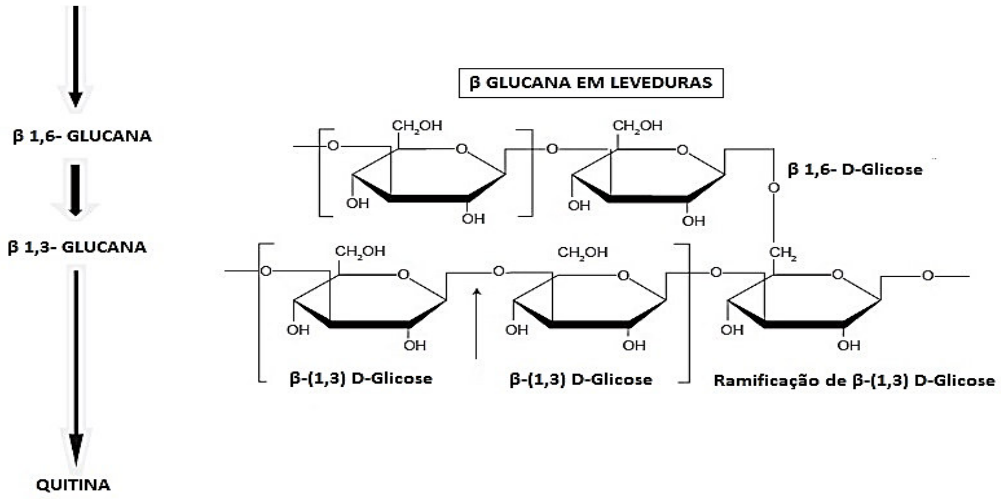
2.4 Parede celular de leveduras

A parede celular microbiana, assim como a parede das células vegetais, tem como principal função atribuir rigidez a célula, protegendo-a contra a pressão osmótica e lise celular. Apesar de apresentar certa rigidez, a parede celular de leveduras possui elasticidade suficiente para garantir o crescimento, a divisão celular e a formação de diferentes morfologias celulares, como hifas, pseudohifas e brotos por exemplo (BOWMAN; FREE, 2006). A levedura interage com o ambiente externo através da parede celular, sendo que algumas leveduras apresentam mecanismos como adesão (ao substrato ou a outras células),

sinalização (HOPKE et al., 2018). O formato da célula é determinado de acordo com a estruturação que seus componentes de parede estão organizados (BOWMAN; FREE, 2006).

Em relação à composição química de parede celular, a literatura descreve características presentes nas leveduras em geral, sendo *S. cerevisae* e *C. albicans*, as espécies mais estudadas (AGUILAR-USANGA; FRANÇOIS, 2003; NAVARRO-ARIAS et al., 2016). Em leveduras, a parede celular corresponde entre 20 a 30% de seu peso seco total e é composta por polissacarídeos (β (1,3) - glucana, β (1,6) – glucana, quitina e proteínas (manoproteínas), os quais estão unidos através de ligações covalentes (KAPTEYN; VAN DEN ENDE; KLIS, 1999). Parâmetros físicos, como oxigênio e temperatura, influenciam na composição química da parede celular como observado para *S. cerevisiae*. Aguilar-Uscanga e François (2003) observaram que para esta espécie houve redução de 25% da massa da parede celular e do conteúdo de quitina quando cultivada em anaerobiose, enquanto que em aerobiose e com o aumento da temperatura de 22 para 37°C, a produção de quitina e β (1,6) – glucana aumentou (AGUILAR-USCANGA; FRANÇOIS, 2003). A Figura 6 ilustra a composição polissacarídica e proteica presente na levedura *S. cerevisiae*. Mais de 50% do peso seco da parede celular é composta por β (1,3) - glucana, 20 a 30% por manoproteínas, 5% por β (1,6) - glucana, e de 1 a 2% por quitina. A estrutura principal da parede celular, β (1,3) – glucana, juntamente com a quitina, são moléculas insolúveis em água e responsáveis pela resistência e rigidez da célula, características determinantes do formato da célula (LIPKE; OVALLE, 1998), enquanto que, para o gênero *Candida* sp, as manoproteínas são responsáveis pela integridade da parede celular e por virulência (BATES et al., 2005).

Figura 6 - Componentes estruturais da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

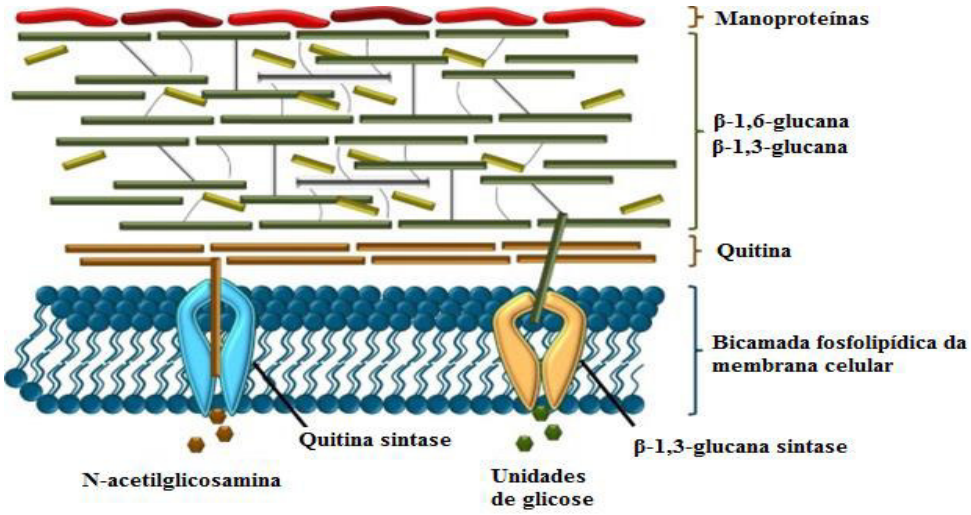


Fonte: Adaptado de Jiménez-Moreno e Ancín-Azpilicueta (2009).

Durante o ciclo de vida de um microrganismo, a proporção dos polissacarídeos de parede não são fixos pois a parede celular é uma estrutura dinâmica na qual a levedura continuamente responde a mudanças no meio externo e interno (KAPTEYN; VAN DEN ENDE; KLIS, 1999; KLIS; BOORSMA; DE GROOT, 2006). Ademais, Luo et al. (2015) afirmam que devido a isto a proporção dos polissacarídeos de parede variam dentro de uma espécie e entre espécies diferentes.

A síntese dos polissacarídeos de parede celular de leveduras, de uma forma geral, ocorre na membrana celular a partir de proteínas de membrana, tais como quitina sintase e β (1,3) - glucana sintase (FESEL; ZUCCARO, 2016). A enzima de membrana quitina sintase catalisa a ligação de resíduos de N- acetilglicosamina, de cadeia longa (ligação β-1,4), produzindo assim a quitina, uma molécula hidrofóbica (FESEL; ZUCCARO, 2016). As fibras de quitina liberadas atravessam a membrana celular até atingir a parede celular, sendo que esta molécula fica próxima a membrana, ou seja, próxima ao meio intracelular (BOWMAN; FREE, 2006). A enzima β (1,3) - glucana sintase catalisa a transferência de cerca de 1500 resíduos de glicose, para formação da cadeia polissacarídica de β (1,3) - glucana. A β (1,6) – glucana é um polissacarídeo formado por cerca de 150 unidades de glicose (LIPKE; OVALLE, 1998). A Figura 7 exibe a composição química da parede celular de fungos e as proteínas de membrana sintetizadoras dos compostos presentes na parede. Em *C. guilliermondii e S. cerevisiae*, as manoproteínas, que correspondem a fração proteica da parede celular são sintetizadas a partir de ligações α-1,2 em monômeros de manose e que apresenta ramificações, também de constituídas por manose, com ligações α -1,2 e α -1,3 (BOWMAN; FREE, 2006; OKAWA; OIKAWA; SUZUKI, 2006).

Figura 7 - Organização estrutural dos compostos presentes na parede celular de fungos.



Fonte: Fesel e Zuccaro (2016).

2.5 *Candida guilliermondii*

O microrganismo *Candida guilliermondii* é um fungo leveduriforme pertencente ao filo Ascomycota, no qual seu isolamento e caracterização ocorreu pela primeira vez em 1912. Amplamente distribuída pelo planeta, esta espécie pode ser isolada desde ambientes naturais (água, solo, folhas de plantas) bem como colonizando a espécie humana (PAPON et al., 2013). Com relação aos humanos, *C. guilliermondii* faz parte da microflora das mucosas e pele, e em alguns casos, é considerada como patógeno oportunista em pacientes hospitalizados com deficiência imunológica, porém com baixa incidência pois é responsável por menos de 4% dos casos de candidemia em indivíduos imunossuprimidos (ASENSIO et al., 2015).

Os fungos, de uma maneira geral, possuem mecanismos de reprodução tanto sexuada quanto assexuada. No caso da *C. guilliermondii*, esta é asporógena, ou seja, se reproduz assexuadamente através da formação de brotos por mitose, e os brotos produzidos podem ser encontrados na configuração de pequenas cadeias. É dado o nome de *Meyerozima guilliermondii* a cepa sexuada, anteriormente classificada como *Pichia guilliermondii* (KURTZMAN; SUSUKI, 2010, PAPON et al., 2013, KIELISZEK et al., 2017).

Dependendo das condições externas do meio no qual *C. guilliermondii* se encontra (estresse fisiológico, principalmente), há a produção de pseudo-hifas, a hifa verdadeira não é produzida por esta espécie, como ocorre em *Candida albicans* (KURTZMAN; SUSUKI, 2010). No que se refere a formação de colônia por *C. guilliermondii*, é possível identificar características como colônias de tamanho pequeno e com aspecto plano, úmido, textura macia, cremosa e coloração esbranquiçada (KURTZMAN; SUZUKI, 2010).

Com relação à obtenção de energia, a levedura *C. guilliermondii* é heterotrófica, sendo capaz de utilizar como fonte de carbono hexoses (glicose, sorbose e ramnose) e pentoses (arabinose, ribose e xilose), enquanto que não é capaz de metabolizar lactose e amido, por exemplo (PAPON et al., 2013). No caso da utilização de pentoses, como xilose e arabinose, várias pesquisas tem encontrado o melhor desempenho da levedura *C. guilliermonidii* FTI 20037 principalmente em xilose do que arabinose, já que este último é fracamente assimilado por esta espécie (HERNÁNDEZ-PERÉZ, 2015, ARRUDA et al., 2017). Além destas fontes de carbono mencionadas, foi relatado a capacidade de *C. guilliermondii* em metabolizar dissacarídeos como sacarose, maltose durante cultivo em hidrolisado hemicelulósico de palha de cana para a produção de xilitol (HERNÁNDEZ-PÉREZ, 2015).

Com relação ao requerimento de oxigênio, *C. guilliermondii* FTI 20037 é uma levedura aeróbia facultativa, mas apesar disto, a presença de oxigênio no meio em que se encontra é imprescindível, pois não é capaz de crescer em ambientes com anaerobiose estrita, mas sim em microaerobiose. Pesquisas relatam que, quando cultivada em microaerobiose, em meio contendo xilose, o metabolismo de *C. guilliermondii* é influenciado em função desta condição de restrição do oxigênio, e como consequência favorece a produção e excreção de xilitol (ROBERTO; MANCILHA; SATO, 1999, BRANCO et al., 2007, HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA; FELIPE, 2016).

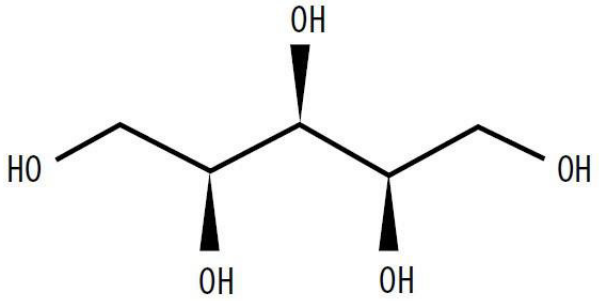
Por ser um microrganismo mesófilo, *C. guilliermondii* FTI 20037 apresenta melhores taxas de crescimento sob temperaturas em torno de 30°C. Também são cultivadas em meio levemente ácido, próximo ao pH 5.5, pois foi relatado por Felipe et al. (1997) como sendo a melhor condição para a bioconversão de xilose a xilitol por esta cepa. Seu armazenamento pode ocorrer em ágar extrato de malte ou meio YPD (Yeast extract, Peptone, Dextrose), em temperaturas abaixo de 5°C (GUO et al., 2006).

Essa espécie é comumente empregada em pesquisas na área biotecnológica devido a formação de produtos que apresentam aplicabilidade em diversos setores industriais. Dentre os produtos de interesse formados por *C. guilliermondii*, estão a riboflavina (vitamina B2) (PAPON et al., 2013), exopolissacarídeos (GIENTKA et al., 2016) e xilitol (FELIPE et al., 1995, ARRUDA et al., 2017).

2.6 Produção química e biotecnológica de xilitol

O xilitol é um poliálcool, poliól ou açúcar álcool, cuja fórmula química é $C_5H_{12}O_5$, e com massa molar de 152,15 g/mol. É uma molécula de estrutura aberta, composta por um conjunto de carbonos e cinco hidroxilas, cada hidroxila ligada a um átomo de carbono, como ilustrado na Figura 8 (TONG et al., 2007). O xilitol é denominado como açúcar álcool por ser um álcool que apresenta um sabor doce, muito similar ao açúcar sacarose. Além disso, outras características e propriedades físico-químicas do xilitol são: aparência de pó cristalino, cor branca, inodoro, muito solúvel em água, ponto de ebulição 216°C, elevado calor de solução endotérmico (34,8 cal/g), estável a 120°C, e baixo conteúdo calórico (2,4 kcal/g) em comparação com a sacarose (4 kcal/g) (MUSSATTO, 2002, O'DONNELL; KEARSLEY, 2012).

Figura 8 - Estrutura molecular do xilitol.



Fonte: Tong et al. (2007).

É devido as suas propriedades que tornam o xilitol um composto de interesse para o consumo humano, e por ser um composto do tipo GRAS (Generally Regarded as Safe) atóxico, é empregado em alimentos e medicamentos para o tratamento de algumas patologias. O xilitol apresenta diversas funções para os seres humanos e pode ser utilizado conforme a seguir (MUSSATTO, 2002):

- Uso como adoçante de alimentos e bebidas, pois apresenta sabor e aparência muito similar a sacarose presente no açúcar de cozinha, sendo que possui 1 terço a menos de conteúdo calórico em comparação com a sacarose.
- Em seres humanos, seu metabolismo é independente da insulina, ou seja, não aumenta os níveis de açúcar no sangue, o que torna possível seu uso por portadores de diabetes *mellitus* dos tipos I e II.
- Apresenta a ação anticariogênica, pois bactérias causadoras da cárie dental, em especial as do gênero *Streptococcus*, são incapazes de fermentar este poliól.
- Promove a remineralização dos dentes devido a sua ação anticariogênica, o que permite o aumento do pH bucal favorecendo o processo de remineralização.
- Eficiente conservante de alimentos por apresentar alta estabilidade química e microbiológica, impedindo a proliferação de microrganismos.
- Pode ser utilizado no tratamento de lesões renais e parenterais, pois hormônios que desencadeiam resistência à insulina são liberados no organismo, e o tratamento adequado, conjuntamente com o xilitol é benéfico pois aumenta a concentração de glicose e insulina no sangue do paciente.

- Pessoas com anemia hemolítica apresentam deficiência na enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH), o que afeta a recuperação do cofator reduzido NADPH. O metabolismo do xilitol envolve a oxidação da xilulose, recuperando o NAPH necessário para outros processos metabólicos da célula.
- Quadros de otite média aguda podem ser prevenidos com o uso do xilitol cujo microrganismo causador da infecção, na maior parte dos casos, é *Streptococcus pneumoniae*. O xilitol é transportado para o interior da célula bacteriana pelo sistema PTS (fosfotransferase), enzimas de atuação no xilitol 5-fosfato são ausentes, causando um acúmulo deste composto, tornando-o tóxico para a célula.
- Prevenção da osteoporose pois auxilia na absorção de cálcio pelas células intestinais, aumentando o conteúdo de cálcio nos ossos.
- Bactérias causadoras de infecções pulmonares como *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, são inibidas a partir do consumo de xilitol pois este composto não é metabolizado por estas e fortalece a defesa natural dos pulmões.

Na natureza, o xilitol é encontrado em algumas frutas, vegetais e cogumelos, porém em pequenas quantidades, cerca de 1000 mg a 100 g, que varia de acordo com a espécie. Os seres humanos e outros mamíferos também o produzem, sendo encontrado cerca de 5 a 15 g por dia de xilitol em um ser humano adulto, proveniente do metabolismo de carboidratos (PARAJÓ; DOMÍNGEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. 1998; MUSSATTO, 2012).

Apesar de ser encontrado na natureza, a produção de xilitol em escala industrial não ocorre a partir da extração nos vegetais, pois seria um processo economicamente desfavorável devido as pequenas quantidades de xilitol encontradas nestes vegetais. Sendo assim, a indústria produz o xilitol quimicamente, com base na utilização do açúcar xilose, uma pentose, que passa por hidrogenação convertendo-se a xilitol. A fonte mais abundante de xilose encontra-se nas biomassas lignocelulósicas, cuja matérias prima mais utilizadas na produção química de xilitol são lascas de madeira de bétula e bagaço de cana-de-açúcar (IRMAK et al., 2017).

A biomassa vegetal é submetida a hidrólise para obtenção do hidrolisado hemicelulósico, que posteriormente passa pelo processo de purificação e remoção de cor, a fim de se obter uma solução ultrapura em xilose. A solução de xilose pura sofre processo de hidrogenação catalítica, com sua redução em xilitol, através de um catalisador de níquel do tipo Raney (HOU-RUI, 2012), sendo aplicada temperaturas entre 80 a 140°C e pressão de até 50 atm. Posteriormente, a solução é concentrada e cristalizada para recuperação do xilitol (PARAJÓ; DOMÍNGEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. et al., 1998; DASGUPTA et al., 2017).

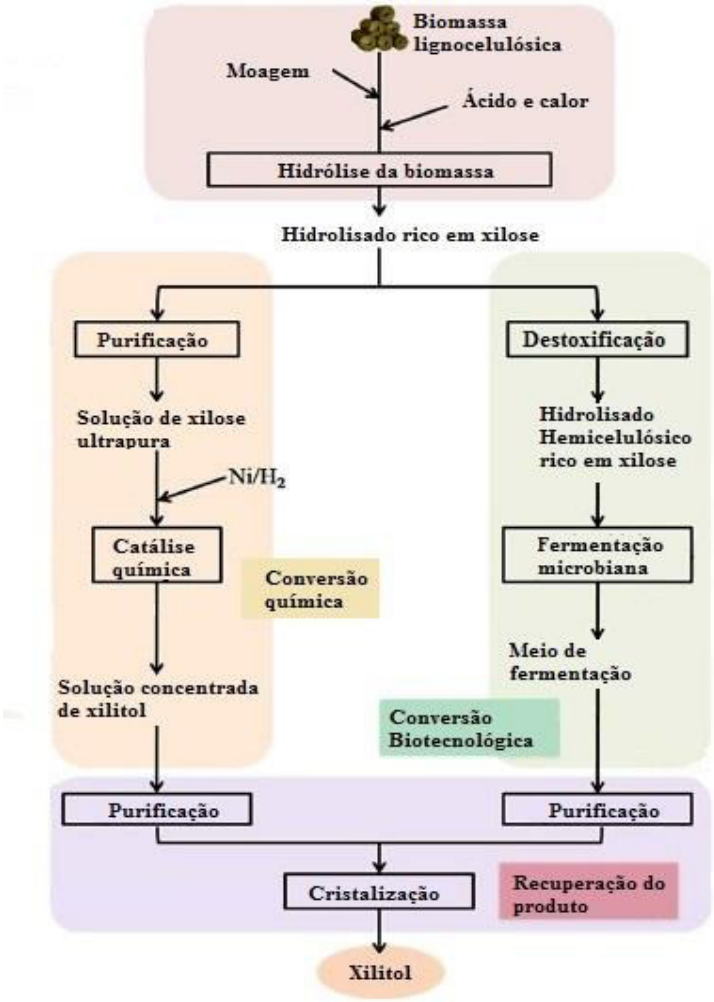
Em relação ao xilitol no mercado, seu preço de venda até 2012 atingiu aproximadamente 5 USD/kg quando comprado diretamente da produção, já o valor de venda em supermercados atingiu o valor de 20 USD/kg (RAVELLA et al., 2012). Já no ano de 2013, o valor mundial no mercado atingiu 670 milhões de dólares e seu mercado tende a expandir nos próximos anos (DASGUPTA et al., 2017). O xilitol produzido pela indústria encontra-se presente na formulação de diversos produtos como goma de mascar, chocolates, balas, sorvetes, cremes dentais, enxaguantes bucais, xaropes, dentre outros produtos das indústrias alimentícia, farmacêutica, cosmética e odontológica (HOLBAN; GRUMEZESCU, 2017).

Entretanto, o método de produção comercial de xilitol via química tem alto custo e apresenta desvantagens pois o processo utilizado para a purificação da xilose, presente no hidrolisado proveniente de biomassas lignocelulósicas, é ineficiente e de baixa produtividade (PARAJÓ; DOMÍNGEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998). Além disso, a etapa de catálise química requer a aplicação de temperatura e pressão elevadas, tornando-o um processo custoso (HOU-RUI, 2012). Em vista disso, outras formas de produção do xilitol, como por exemplo pela via biotecnológica pode ser considerada como uma alternativa promissora e econômica em relação a produção por via química. Visto que caracteriza-se por ser um processo exclusivamente biológico, a produção biotecnológica de xilitol não exige o uso de altas temperaturas e pressão (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998; HOU-RUI, 2012).

Atualmente, a produção biotecnológica de xilitol ocorre nas escalas laboratorial e piloto, porém pesquisas vem sendo realizadas a fim de possibilitar sua produção em escala industrial, visto o baixo custo por meio desta (ARRUDA et al., 2017). Desta forma, o xilitol é produzido a partir do uso de leveduras que fermentam a xilose, dentre elas *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida maltosa*, *Kluyveromyces marxianus*, *Debaromyces hansenii*, entre outros (SAMPAIO et al., 2004; GUO et al., 2006; MARTÍNEZ; SÁNCHEZ; BRAVO, 2012; DE ALBUQUERQUE et al., 2015; ERYASAR; KARASU-YALCIN, 2016). A espécie *C. guilliermondiii* FTI 20037 é conhecida por sua eficiência em fermentar a xilose (HERNÁNDEZ-PÉREZ, ARRUDA, FELIPE, 2016; WEN et al., 2016). Dado que a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 é capaz de produzir xilitol a partir da xilose como fonte de carbono, destaca-se o aproveitamento de resíduos provenientes de biomassas vegetais, como a palha e bagaço de cana-de-açúcar, palhas de arroz, sorgo, entre outros. Alguns parâmetros fermentativos para *C. guilliermondii* FTI 20037 já se encontram bem definidos, que favorecem a produção de xilitol, como

temperatura de 30°C, pH 5.5, concentração de xilose, concentração e idade do inoculo de 0,1 a 1 g/L e 16 a 24h, respectivamente (FELIPE et al., 1997; GURPILHARES et al., 2009; CAMARGO et al., 2015; ARRUDA et al., 2017). A Figura 9 apresenta uma comparação entre a produção de xilitol via química e biotecnológica.

Figura 9 - Produção de xilitol a partir de biomassas lignocelulósicas pelas vias químicas e biotecnológica.

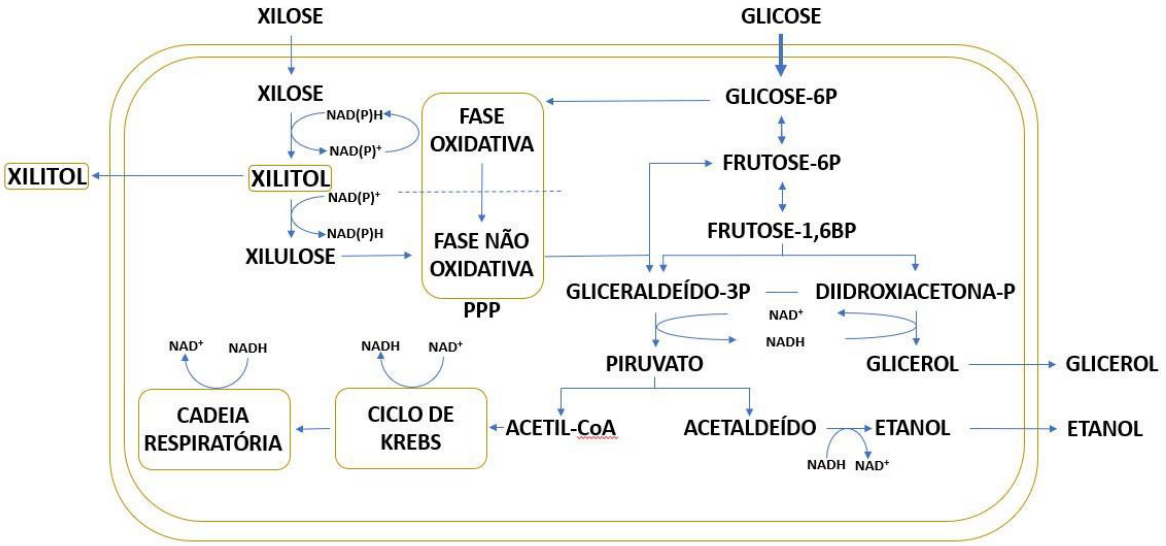


Fonte: Adaptado de Dasgupta et al. (2017).

Com relação as etapas de produção biotecnológica de xilitol ilustradas na Figura 9, é possível observar que primeiramente, o hidrolisado hemicelulósico proveniente de biomassas vegetais deve ser submetido à destoxificação, para redução no teor de compostos inibidores da fermentação. No metabolismo desta pentose, ocorro sua redução a xilitol, através da enzima xilose redutase (XR), dependente de NAD(P)H, e em seguida, a enzima xilitol desidrogenase (XDH), dependente de NAD^+ catalisa a oxidação de xilitol a xilulose. Esta xilulose recebe um grupo fosfato, tornando-se xilulose-5P, a qual é metabolizada pela

via das pentoses fosfato, cuja função é a regeneração de potentes redutores para a célula (GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007). Diferentes fatores podem interferir na bioconversão da xilose em xilitol com destaque para o oxigênio já que a condição de microaerobiose são essenciais para o favorecimento da produção de xilitol. Em *C. guilliermondii* FTI 20037 vários estudos já foram realizados para se avaliar o efeito da disponibilidade de oxigênio para a produção de xilitol por esta levedura. Porém há pesquisas indicando que a indução de microaerobiose no meio de fermentação favorece a produção de xilitol, uma vez que ocasiona um desvio na via metabólica da xilose (ROBERTO; MANCILHA; SATO, 1999; BRANCO et al., 2007; HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA; FELIPE, 2016). Quando há pouco oxigênio disponível para a levedura, sua taxa de respiração diminui, causando um desequilíbrio na proporção de cofatores ($NADH/NAD^+$) no interior da célula, pois os cofatores reduzidos (NADH) são acumulados o que afeta a atividade da enzima XDH. Como consequência, o xilitol intracelular é acumulado e excretado para o meio extracelular, como pode ser observado na Figura 10, em que a via metabólica de formação do xilitol é ilustrada (GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007).

Figura 10 - Rota metabólica da produção de xilitol por *Candida guilliermondii* FTI 20037.



Fonte: Adaptado de Hernández-Pérez (2015).

Apesar do xilitol ser o principal bioproduto obtido durante fermentações com o hidrolisado hemicelulósico de biomassa vegetal, de fato, pequenas quantidades de etanol já foram encontradas como subproduto durante fermentação de *C. guilliermondii* FTI 20037

(HERNÁNDEZ-PÉREZ, 2015). Além do etanol, o glicerol também é um subproduto encontrado neste bioprocesso como no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, e também em meio sintético contendo xilose como fonte de carbono (RODRIGUES et al., 2003). Segundo Hernández-Pérez (2015), a adição de sacarose no meio de cultura de *C. guilliermondii* FTI 20037, favoreceu a produção de xilitol pois este dissacarídeo atua como co-substrato, favorecendo o metabolismo da glicose permite a possibilidade de regeneração dos cofatores da célula. Portanto estudos vem sendo realizados na biotecnologia com o objetivo de estabelecer melhores condições para o processo de produção de xilitol a partir do emprego de leveduras.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Propor uma nova metodologia de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar a partir do aproveitamento da biomassa residual seca de *Candida guilliermondii* FTI 20037, visando a utilização deste hidrolisado na produção biotecnológica de xilitol.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar os valores de alguns parâmetros físicos e químicos para o emprego da biomassa seca da levedura *Candida guilliermondii* da adsorção FTI 20037 como agente destoxificante do hidrolisado hemicelulósico da mistura do bagaço e palha de cana-de-açúcar.
- Avaliar a produção de xilitol por *Candida guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar destoxificado com biomassa microbiana seca desta mesma espécie.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fermentações VI, do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo (EEL/USP).

4.1 Matéria-prima

Os subprodutos da cana-de-açúcar, bagaço e palha, provenientes da safra de 2017/18 foram doados pela Usina Pederneiras, localizada na cidade de Tietê/SP. Verificou-se a umidade destas biomassas e caso o teor de umidade fosse superior a 10%, estas foram secas ao ar e posteriormente armazenadas nas dependências do departamento de biotecnologia da EEL/USP.

4.2 Obtenção do hidrolisado hemicelulósico

Foi realizada a hidrólise ácido diluído para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana (HHBP), no qual empregou-se um reator de hidrólise de aço inoxidável (Albion) com capacidade máxima de 40L. A palha foi triturada em moedor e em seguida foi preparada a mistura de bagaço e palha na proporção 1:1, que foi transferida para o reator nas seguintes condições: 1% de H_2SO_4 e relação matéria seca: solução ácida de 1:10 (m/v), 121°C durante 20 minutos. O HHBP foi armazenado para utilização no presente trabalho, já a fração sólida (celulignina) foi lavada com água corrente até o pH da água atingir o valor 7, seca ao ar e armazenada para posterior caracterização química.

4.*2.1 Concentração do hidrolisado hemicelulósico*

Para tornar possível a execução dos testes de fermentabilidade a partir do HHBP destoxificado, foi necessário elevar o teor dos açúcares presentes no hidrolisado obtido. Para tanto, o mesmo foi concentrado a vácuo, conforme metodologia estabelecida por Rodrigues et al. (2003), com fator de concentração correspondente a 4 (FC=4), a uma temperatura de 65±5°C, para obtenção do teor de xilose em aproximadamente 60 g/L. Posteriormente, o HHBP concentrado foi armazenado em câmara fria a 2,4 °C.

4.3 Determinação da composição química estrutural dos subprodutos da cana-de-açúcar

4.*3.1 Determinação de extrativos*

Amostras de bagaço e palha de cana, tanto da mistura 1:1 quanto separadamente, foram moídas a 20 Mesh e cerca de 1,4 g destas biomassas foram armazenadas em papel filtro e destinadas para determinação de extrativos em extrator de Soxhlet com etanol 95% por 6 h. Após a extração, as biomassas foram secas ao ar e pesadas, e o teor de extrativos foi calculado a partir da subtração da massa inicial (com extrativos) com a massa final (sem extrativos).

4.3.2 Hidrólise da biomassa lignocelulósica

Foi quantificada a umidade das biomassas sem extrativos, com câmara de UV a 105°C, seguida da caracterização química a partir da hidrólise com ácido sulfúrico, segundo metodologia descrita por Ferraz et al. (2000). Em triplicata, foi adicionado cerca de 0,3 g das amostras em tubos de ensaio os quais foram colocados em banho termostático a 30°C e adicionou-se 3 mL de ácido sulfúrico a 72% (v/v), durante 1 h. Posteriormente, esta mistura foi transferida para frascos *Erlenmeyer* de 250 mL e adicionou-se 79 mL de água destilada, e em seguida os frascos foram autoclavados a 120°C (1 atm) durante 1 h. Os hidrolisados autoclavados e, em temperatura ambiente, foram filtrados a vácuo com filtro sintetizado n° 3 (SCHOOT), e a biomassa vegetal retida no filtro foi armazenada em estufa a 100°C até que atingisse massa constante, para determinação da lignina solúvel.

4.3.3 Determinação de lignina solúvel, insolúvel e de açúcares

Para a determinação da lignina solúvel, a fração líquida do filtrado foi analisada em espectrofotômetro UV-visível (Thermo Scientific Evolution 201) no comprimento de onda de 205 nm (absortividade da lignina solúvel 105 $L.g^{-1}.cm^{-1}$). No caso da determinação da lignina insolúvel, calculou-se a diferença de peso das amostras de biomassa antes e após hidrólise de determinação da composição química. Também foi determinada a concentração de açúcares monoméricos (xilose, glicose e arabinose) e ácido acético, as quais foram previamente filtradas com “Sep Pak” C18 e analisadas em Cromatografia Líquida de Alta

Eficiência (CLAE) com coluna Bio Rad (Hércules, CA) Aminex HPX- 87H, com H_2SO_4 0,01N como eluente, a 45°C, a um fluxo de 0,06 mL/min em cromatógrafo Agilent 1200 (Kyoto, Japão).

4.3.4 Determinação de cinzas

Para a determinação de cinzas presentes nas biomassas vegetais, empregou-se cadinhos de porcelana calcinados e tarados com tampa. Posteriormente, os cadinhos foram armazenados em dessecador com vácuo e após seu resfriamento foram pesados em balança analítica. Foram transferidas para os cadinhos, 0,5 g das amostras de biomassa sem extrativos, as quais permaneceram na mufla a 500°C. O teor de cinzas foi determinado pela diferença de peso das amostras antes e depois deste processo.

$$\%\ Cinzas = \frac{MC*100}{MA} \qquad (1)$$

Onde:
MC: massa de cinzas (g);
MA: massa da amostra seca (g).

4.4 Obtenção da biomassa *Candida guilliermondii* FTI 20037 para emprego na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico da mistura do bagaço e palha de cana-de-açúcar

Fermentações provenientes de outro projeto de pesquisa, que visa a produção de xilitol, foram realizadas empregando *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar, previamente destoxificado com carvão vegetal ativado. Com o objetivo de aproveitar a biomassa de levedura residual destas fermentações para o presente trabalho, o meio líquido final da fermentação foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos (Ls-3 Plus Celm), para separação das células e as mesmas foram inativadas em autoclave a 120°C, 1 atm, por 20 minutos, em seguida as células foram lavadas 3 vezes com água destilada e armazenadas à 4°C.

4.4.1 Tratamento da biomassa residual de Candida guilliermondii FTI 20037

A biomassa de levedura, previamente armazenada a 4°C, foi ressuspensa em água destilada, centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos (Ls-3 Plus Celm) para descartar o sobrenadante e, em seguida, a biomassa foi transferida para gral de porcelana e submetida a tratamento térmico em estufa a 75°C até atingir peso constante (CHERIFI; BENTAHAR; HANINI, 2014). Após este período, a biomassa seca de *C. guilliermondii* FTI 20037 foi moída com pistilo, no mesmo gral em que se encontrava, e peneirada com uma peneira de 35 Mesh. A biomassa seca foi armazenada em dessecador a vácuo.

4.5 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar

Para todos os experimentos de destoxificação, foi empregado o mesmo lote de HHBP concentrado, realizado conforme item 4.1. Ao início de cada experimento de destoxificação, foi necessário neutralizar o ácido sulfúrico (H_2SO_4), presente no hidrolisado devido às condições da hidrólise. Para tanto, o pH do hidrolisado foi ajustado para 7 com óxido de cálcio (CaO) e, em seguida, foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos para remoção do óxido de cálcio remanescente.

Foi proposto um planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central a fim de avaliar a influência de alguns parâmetros físicos e químicos na remoção de compostos tóxicos do HHBP empregando a biomassa seca de *C. guilliermondii*. Baseadas na literatura, as variáveis independentes foram: pH, proporção biomassa de levedura: HHBP (m/v), temperatura e tempo de contato. A Tabela 2 apresenta o planejamento fatorial 2^4 do presente trabalho com as variáveis e seus níveis mínimo (-1), máximo (+1) e ponto central (0).

Tabela 2 - Planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central, e suas variáveis de entrada com níveis reais e codificados.

Variável independente	Níveis		
	-1	0	1
pH	2	5	8
Proporção (% m/v)	1	3	5
Temperatura (°C)	30	45	60
Tempo de contato (h)	5	14,5	24

Fonte: Autoria Própria.

No processo de destoxificação, o pH do HHBP (pH inicial igual a 7), foi elevado a 8 com CaO ou reduzido para 2 com ácido fosfórico (H_3PO_4). Após o ajuste de pH, 15 mL do hidrolisado foram transferidos para frascos *Erlenmeyer* de 50 mL (em triplicata); em seguida adicionou-se nos frascos 1 ou 5% (m/v) da biomassa seca de *C. guilliermondii*. Tais frascos foram conduzidos para shaker (Sppencer SP 343/02) a temperatura de 30 ou 60°C em 100 rpm, durante 5 ou 24 h.

O experimento de destoxificação controle baseou-se no ajuste de pH e adsorção com carvão vegetal ativado (Labsynth), segundo metodologia descrita por Marton et al. (2006), a qual se baseia na utilização de óxido de cálcio (CaO) para elevar o pH a 7, seguido da adição de ácido fosfórico (H_3PO_4) até o pH do hidrolisado atingir 2,5; adição de pó de carvão vegetal ativado 1% (m/v) durante 30 minutos, sob 100 rpm a 60°C.

Ao final do processo de destoxificação, amostras foram centrifugadas e seu sobrenadante submetido a análises de pH, concentração de açúcares e compostos tóxicos acima mencionados.

4.5.1 Análise estatística

A eficácia dos tratamentos foi avaliada em função da redução no teor dos compostos furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético, metais e principalmente fenólicos, os quais são tóxicos para a levedura e podem interferir na produtividade do processo fermentativo. Os dados foram inseridos no software Statistica® 13.4 (StatSoft, Inc., 215 Tulsa, OK, USA) para elaboração de diagramas de Pareto e posterior análise da estimativa dos efeitos de cada variável em diferentes níveis.

4.6 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico submetido à destoxificação com biomassa seca de *Candida guilliermondii* FTI 20037

Anterior a fermentação, foi necessário realizar um inóculo com a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037, previamente armazenada em ágar extrato de malte a 4°C. A levedura foi cultivada em meio semidefinido, constituído por: 30 g/L de xilose, 20 g/L de extrato de farelo de arroz, 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$ e 0.1 g/L de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, previamente autoclavados, em shaker a 200 rpm, 30 °C, durante 24 h. As células foram separadas por centrifugação a 3000 rpm durante 15 min e foram empregadas na fermentação.

Após o inóculo de 24 h, foram realizadas fermentações em batelada, com aproximadamente 1,0 gL^{-1} de células, em frascos *Erlenmeyer* de 50 mL contendo 20 mL de meio, correspondente ao hidrolisado hemicelulósico submetido às destoxificações com a biomassa seca de levedura. Todos os hidrolisados foram suplementados com solução de extrato de farelo de arroz (20 g/L), $(NH_4)_2SO_4$ (2,0 g/L) e $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,1 g/L). Todos os frascos foram incubados em shaker a 30°C por 70 horas, sob agitação de 200 rpm. A cada 24 h do processo fermentativo, foram retiradas amostras, para análise da concentração e viabilidade celular, pH, concentração de açúcares e compostos tóxicos.

A fermentação controle foi realizada a partir do emprego do hidrolisado hemicelulósico destoxificado com carvão vegetal ativado, nas mesmas condições experimentais de fermentação realizadas para o hidrolisado destoxificado com a biomassa seca de levedura.

4.7 Métodos Analíticos

4.7.1 Análises das concentrações de açúcares e compostos tóxicos

A determinação da concentração dos açúcares (glicose, xilose, arabinose) bem como dos subprodutos (xilitol, ácido acético e etanol) foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (ARRUDA, 2011). As amostras foram previamente diluídas e filtradas em "Sep Pak" C18. A coluna utilizada: Bio Rad (Hércules, CA) Aminex HPX-87H, com H_2SO_4 0,01 N como eluente, a 45°C, a um fluxo de 0,06 mL/min em um cromatógrafo Agilent 1200 (Kyoto, Japão). No caso do 5-hidroximetilfurfural e furfural, o preparo das amostras foi feito a partir da sua diluição com deionizada e empregou-se cromatógrafo Agilent 1200 (Kyoto, Japão), com coluna Zorbax C18 Eclipse Plus, a 25°C, com detector de luz ultravioleta, ácido

acético a 1% e acetonitrila:água (1:9) como eluente, e fluxo de 0,8 mL/min (HERNÁNDEZ-PÉREZ, 2015).

Para os compostos fenólicos, foi empregada metodologia conforme Arruda (2011). Cada amostra foi diluída na proporção 1:250 com água deionizada e adicionada a esta uma solução de NaOH (6N) até as amostras alcançarem pH 12. A análise foi feita em espectrofotômetro com luz UV (Beckman Coulter DU 800, EUA) com comprimento de onda de 280nm e seu cálculo baseado nas equações 1 e 2.

$$CF = \left(4{,}187 \times 10^{-2} \times \left(A_{t280} - A_{pd280}\right)\right) - 3{,}279 \times 10^{-4} \qquad (1)$$

$$A_{pd280} = (C_{Fur} \times \in_{Fur}) + (C_{HMF} \times \in_{HMF}) \qquad (2)$$

Onde *CF* corresponde à concentração de compostos fenólicos totais (g/L). A_{t280} corresponde à absorbância da amostra, e A_{pd280} à absorbância dos produtos resultantes da degradação dos açúcares (Furfural e 5-Hidroximetilfurfural). O valor de A_{pd280} é obtido a partir da Equação 1, na qual C_{Fur} e C_{HMF} correspondem à concentração de furfural e 5-HMF (g/L), respectivamente, determinada por cromatografia líquida, e $\in_{Fur}$ e $\in_{HMF}$ são as absortividades destes compostos (146,85 e 114,00 L $g^{-1}cm^{-1}$, respectivamente).

4.7.2 Quantificação de concentração celular, determinação da viabilidade celular e pureza da cultura

A determinação da concentração celular, foi feita por espectrofotometria a 600 nm, mediante a relação da absorbância com a concentração em massa seca de células a partir de curva de calibração previamente estabelecida, a partir do cultivo das células em meio semidefinido.

4.7.3 Determinação da viabilidade celular e pureza da cultura

A viabilidade celular foi determinada com lâmina a fresco com azul de metileno (0,01%) e visualizadas por microscopia óptica em microscópio LABOMED, Labo America, Inc. EUA, e as células são ainda observadas a partir de lâminas fixadas e coradas com fucsina. Com o auxílio de um microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) foi verificado a pureza das culturas de *C. guilliermondii* FTI 20037.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química do bagaço e palha de cana-de-açúcar

Os subprodutos da cana-de-açúcar, bagaço e palha, foram submetidos a hidrólise ácido diluído (1% m/v de H_2SO_4), com o objetivo de solubilizar os constituintes da fração hemicelulósica. A princípio, foi realizada a caracterização química da palha e do bagaço separadamente, além da sua mistura (1:1) antes e após a hidrólise, para verificar o teor das principais macromoléculas estruturais da parede celular vegetal. A Tabela 3 apresenta o resultado da caracterização química, contendo o teor dos polímeros avaliados.

Tabela 3 - Caracterização química estrutural da palha e bagaço de cana, separadamente, da mistura destas duas biomassas, e do resíduo sólido (celulignina) resultante da hidrólise em ácido diluído.

Caracterização química da palha e bagaço de cana (g/100g)					
Componentes	Palha	Bagaço	Palha + bagaço	Celulignina	Celulignina original
Hemicelulose	28,2±0,9	27,8±1,1	27,58±0,3	14,9±0,2	9,1
Celulose	40,7±0,1	39,7±0,4	37±1,2	46,6±1,1	29,2
Lignina total	24,3±0,3	22±0,8	22,02±0,06	26,5±0,4	16,2
Extrativos	5,3±1,2	3,8±1,7	7,89±0,43	5,8±0,6	5,8
Cinzas	8,5±1,0	1,7±0,2	5,59±0,51	5,8±0,1	5,8

Fonte: Autoria própria.

A partir dos dados apresentados na Tabela 3, é possível notar que tanto na palha quanto no bagaço *in natura*, a celulose é o polímero predominante, seguido da hemicelulose, assim como a literatura reporta a respeito da parede celular vegetal (FENGEL; WEGENER, 1989). Ao misturar as biomassas bagaço e palha, não foi observado grandes flutuações no teor de celulose, hemicelulose e lignina, em comparação com estes subprodutos separadamente, porém no caso dos extrativos houve um aumento no teor, e das cinzas, decréscimo.

Com o intuito de comparar os teores de celulose, hemicelulose e lignina presentes em subprodutos provenientes de outros cultivos de cana-de-açúcar, a Tabela 4 apresenta alguns dados reportados por outros autores.

Tabela 4 - Composição química estrutural da palha e do bagaço de cana individualmente e em mistura, reportados na literatura. P+B= mistura de palha e bagaço.

	Palha			**Bagaço**			**Mistura P+B**
Componente (%)	Oliveira et al., 2014	Hernández-Pérez et al. 2016	Batista et al., 2019	Ferreira-Leitão et al., 2010	Cabral et al., 2018	Thiangtham et al., 2019	Ávila et al., 2018
Celulose	38,1	31,7	33,1	41,4	38,1	56,0	41,9
Hemicelulose	29,2	27,0	26,2	28,5	28,1	12,5	30,2
Lignina total	24,2	31,1	18,2	23,6	24,8	18,0	23,7

Fonte: Autoria própria.

Verifica-se na Tabela 4, que o teor das macromoléculas constituintes da palha de cana de açúcar foi variável, assim como para o bagaço. A composição mistura de bagaço e palha da Tabela 4 apresenta valores superiores de celulose, hemicelulose e lignina, comparado aos dados do presente trabalho (Tabela 3). Esta variação entre diferentes fontes de bagaço e palha da cana é comum, pois esta biomassa lignocelulósica apresenta composição química variável, que depende de fatores como genótipo da planta, local de cultivo, ano, estação do ano, solo, método de colheita, entre outros (WIEDENFELD, 2009, BENJAMIN; GÖRGENS; JOSHI, 2014, BEZERRA et al., 2017).

A respeito do teor de hemicelulose presente na cana-de-açúcar, Ávila, Forte e Goldbeck (2018) relatam valores semelhantes aos encontrados no presente trabalho, com cerca de 30% no bagaço, 29% na palha e 30% na mistura dos subprodutos. Os mesmos autores identificaram que o teor de lignina total no bagaço foi ligeiramente superior do que na palha, com cerca de 23 e 21%, respectivamente. Ainda com relação à lignina, Ferreira-leitão et al. (2010) mencionam a presença de 36% deste polímero na palha de cana, valor 12% superior que no presente trabalho (Tabela 3), sendo que esta variação do teor de lignina pode ser explicada devido a característica heterogênea da palha, da qual é composta por folhas secas e verdes da planta. Quanto à composição da mistura bagaço e palha, a literatura ainda é escassa com relação a sua mistura (ÁVILA; FORTE; GOLDBECK, 2018).

O intuito de empregar a hidrólise ácido diluído é a solubilização da fração hemicelulósica da biomassa, que apresenta composição rica em pentoses. Após a hidrólise, o resíduo sólido da biomassa é denominado de celulignina. Na composição química da celulignina, da Tabela 3, nota-se que o teor de hemicelulose decresceu, e houve também o

enriquecimento no teor de lignina e celulose, em comparação com a mistura bagaço e palha anterior a hidrólise. Tal fato foi relatado também por Miyamoto et al. (2018), ao realizar tratamento com ácido sulfúrico em bagaço de cana. Isto indica que o tratamento da biomassa com 1% (m/v) de ácido sulfúrico permite a remoção de compostos da biomassa, principalmente da hemicelulose, gerando assim o hidrolisado hemicelulósico. A correção nos valores de celulose e lignina está apresentada também na Tabela 3. É possível observar nesta coluna que após hidrólise, 21,08 e 26,43% da celulose e lignina, respectivamente, foram removidos da biomassa. Esta remoção indica que o pré-tratamento com ácido sulfúrico solubiliza estes polímeros, além da hemicelulose. Tal fato corrobora com os dados encontrados por Ávila, Forte e Goldbeck (2018), no qual o emprego da hidrólise ácido diluído (1% m/v H_2SO_4) na mistura de bagaço e palha de cana, removeu 2,32% da celulose e 0,72% da lignina.

Com relação a Tabela 3, verifica-se a presença de cinzas e extrativos tanto no bagaço quanto na palha *in natura*, sendo que o alto teor destes componentes é característico de gramíneas (CARVALHO et al., 2015). Há uma diferença evidente na Tabela 3 com relação ao conteúdo de cinzas entre os subprodutos bagaço e palha separadamente, sendo que na palha a quantidade deste componente foi 5 vezes superior ao presente no bagaço. Rocha et al. (2015) ao analisar sessenta amostras de bagaço de cana, encontraram desde 2,3 a 10,4 % de extrativos, sendo que 5,63% foi a média de todas as amostras e para as cinzas a média foi de 2,84%. O teor de extrativos e cinzas foi superior na palha de cana-de-açúcar em relação ao bagaço, e este fato se deve a presença de sílica e outros compostos inorgânicos no solo, assim como a presença de metais (ferro e titânio) provenientes das máquinas empregadas na colheita (ÁVILA; FORTE; GOLDBECK, 2018), uma vez que este subproduto é deixado sobre o solo.

5.2 Composição do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar (HHBP)

A mistura dos subprodutos bagaço e palha, na proporção 1:1, foi submetida a hidrólise ácido diluído em reator, e em seguida concentrado a vácuo, com fator de concentração (FC) de 4 vezes, com o objetivo de elevar o teor dos açúcares fermentescíveis.

A Tabela 5 apresenta o teor dos açúcares monoméricos (xilose, glicose e arabinose), ácido acético e compostos fenólicos presentes no HHBP antes e após a concentração à vácuo.

Tabela 5 - Composição química do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana após hidrólise (original) e após concentração a vácuo (concentrado).

HHBP	Composição química (gL^{-1})						
	Xilose	Glicose	Arabinose	Ác. acético	Fenólicos totais	Furfural	5-HMF
Original	17,9	2,49	2,68	4,96	1,5	0,18	0,24
Concentrado	71,6	10,07	12,19	7,01	8,6	0,15	0,46

Fonte: Autoria própria.

A partir da Tabela 5, observa-se que a xilose é o açúcar predominante no hidrolisado hemicelulósico original, representando 77,6% do teor total de açúcares, sendo os demais monossacarídeos a arabinose (11,61%) e glicose (10,79%). A predominância da xilose como principal açúcar foi relatado também em hidrolisados hemicelulósicos de outras biomassas, como palha de trigo (CANILHA et al., 2003), eucalipto (VILLARREAL et al., 2006), palha de arroz (FONSECA et al., 2018), bem como das biomassas bagaço (ARRUDA, 2011) e palha de cana-de-açúcar (HERNÁNDEZ-PÉREZ, 2015) hidrolisados separadamente.

Além dos açúcares, também foram identificados neste hidrolisado compostos inibidores do metabolismo microbiano, como o ácido acético, proveniente da hidrólise dos grupos acetila, que se encontram ligados à hemicelulose; furfural e 5-HMF, produtos da desidratação das pentoses e hexoses, respectivamente; e em maior quantidade os compostos fenólicos, derivados da degradação da lignina. A presença dos compostos tóxicos mencionados na Tabela 5 foi reportado também em hidrolisados hemicelulósicos obtidos por hidrólise ácido diluído, em separado, das biomassas bagaço e palha de cana. Valores superiores aos do presente trabalho foram relatados por Silva-Fernandes et al. (2017), que encontraram no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana 3,37 g/L de compostos fenólicos, 0,41 g/L de furfural, 1,08 g/L de 5-HMF e 1,89 g/L de ácido acético. No caso do hidrolisado hemicelulósico de palha de cana, Hernández-Pérez (2015) encontrou cerca de 3 g/L em compostos fenólicos, 0,18 g/L de furfural, 0,40 g/L de 5-HMF e 2,23 g/L de ácido acético.

É possível constatar ainda na Tabela 5, que a etapa de concentração a vácuo elevou em cerca de 4 vezes o teor dos monossacarídeos presentes no hidrolisado. Entretanto, no caso do ácido acético, houve um incremento de 2,05 g/L após esta concentração, obtendo-se ao final do processo 7,01 g/L deste ácido. No caso do trabalho de Martínez et al. (2007), também foi encontrado 7,49 g/L de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana concentrado.

Ainda nesta Tabela 5, nota-se que os produtos de degradação furfural e 5-HMF do hidrolisado estão presentes em quantidades muito menores comparados ao teor de fenólicos e ácido acético, da mesma forma como a literatura reporta para o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (TIZAZU; MOHOLKAR, 2018; MARCELINO et al., 2019). Embora a concentração a vácuo do hidrolisado tenha resultado no aumento aproximado da concentração para a maioria dos constituintes, no caso do furfural seu valor foi alterado minimamente, passando de 0,18 g/L no original para 0,15 g/L no concentrado, o que pode estar relacionado ao fato deste composto ser volátil na temperatura empregada, conforme relatado por Rodrigues et al. (2001).

5.3 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço e palha de cana-de-açúcar (HHBP) empregando biomassa seca de *Candida guilliermondii* FTI 20037

Antes de realizar a destoxificação do HHBP, a biomassa seca de *C. guilliermondii* FTI 20037 foi preparada. Esta preparação consistiu na recuperação da biomassa desta levedura proveniente de uma fermentação para a produção de xilitol, na qual o meio de cultivo foi o hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana (destoxificado com carvão vegetal ativado). Em seguida a biomassa foi lavada com água destilada, seca em estufa e triturada em gral e pistilo para obtenção de pequenos grânulos de biomassa seca, conforme descrito no item 4.4.1, para seu emprego nos testes de destoxificação. Para estes testes foi elaborado um planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central, sendo que as variáveis testadas foram o pH do HHBP, a temperatura, o tempo de contato e a proporção entre biomassa seca de *C. guilliermondii* FTI 20037 e HHBP.

5.3.1 Efeito das destoxificações com relação ao teor de compostos fenólicos

Após realizadas os testes de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana, segundo planejamento fatorial, foram feitas análises das amostras dos hidrolisados para quantificar o teor dos compostos tóxicos. A Tabela 6 apresenta o teor dos compostos fenólicos antes e após as destoxificações, referentes aos ensaios em função do planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central.

Tabela 6 - Concentração de compostos fenólicos no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana (HHBP) não destoxificado (ND) e destoxificado (D), além da redução (%) destes compostos em função das destoxificações com biomassa seca de *C. guilliermondii* FTI 20037, para cada ensaio realizado por planejamento fatorial 24 com triplicata no ponto central.

Ensaio	Níveis reais				Compostos fenólicos (g/L)		
	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Proporção (% m/v)	pH	ND	D	% redução
1	30	5	1	2	9,74	8,09	16,89
2	60	5	1	2	10,38	10,27	1,01
3	30	24	1	2	8,88	7,29	17,87
4	60	24	1	2	9,7	9,64	0,62
5	30	5	5	2	10,09	7,89	21,80
6	60	5	5	2	9,11	6,93	23,92
7	30	24	5	2	8,89	6,49	27,01
8	60	24	5	2	9,3	8,24	11,42
9	30	5	1	8	8,87	8,01	9,68
10	60	5	1	8	8,94	8,01	10,46
11	30	24	1	8	8,16	7,47	8,47
12	60	24	1	8	9,21	10,62	0,0*
13	30	5	5	8	9,72	7,9	18,80
14	60	5	5	8	8,94	6,84	23,52
15	30	24	5	8	9,72	7,35	24,38
16	60	24	5	8	9,9	8,72	11,91
17	45	14,5	3	5	8,54	6,65	22,20
18	45	14,5	3	5	8,54	6,57	23,13
19	45	14,5	3	5	8,54	6,8	20,39

*aumento de 15,8 % no teor de compostos fenólicos no ensaio de número 12.

Fonte: Autoria própria.

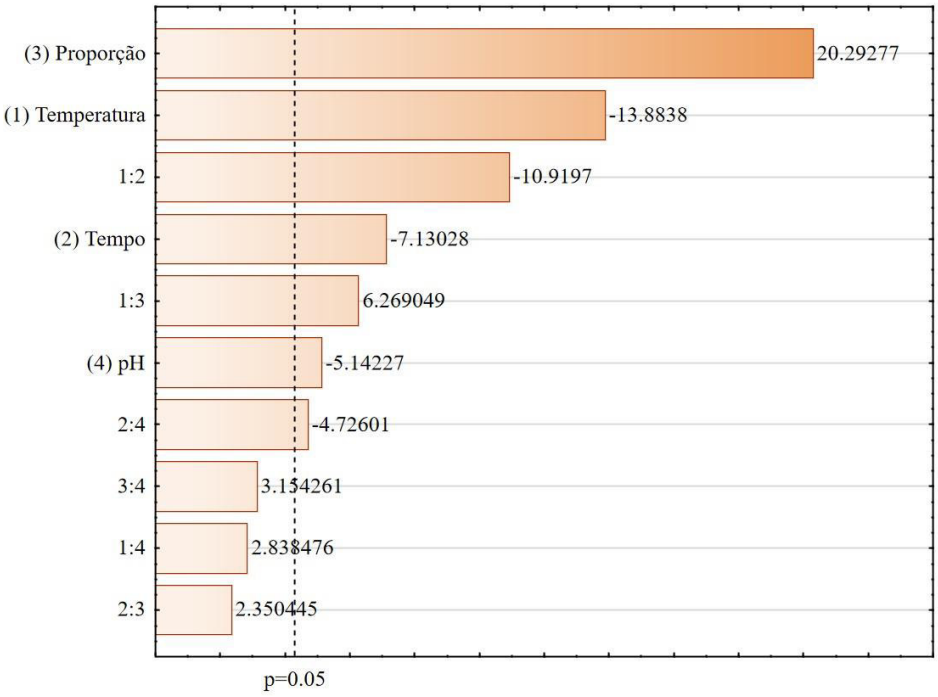
A partir da Tabela 6, verifica-se que o emprego da biomassa seca de levedura no HHBP reduziu o teor de compostos fenólicos, em diferentes níveis, que variam de acordo com as condições experimentais. Portanto, as variáveis testadas podem influenciar positivamente ou negativamente na eficácia do método. Não foi encontrado na literatura pesquisas empregando microrganismos como agentes adsorventes de compostos em hidrolisados hemicelulósicos, porém são reportados estudos empregando leveduras na adsorção de fenóis em soluções aquosas (VASSEROT; CAILLET; MAUJEAN, 1997; JIMÉNEZ-MORENO; ANCÍN-AZPILICUETA, 2009; MOYO et al., 2012).

A partir da Tabela 6 observa-se que no ensaio de número 12, no qual empregou-se temperatura de 60 °C, em pH 8, com 1% de biomassa seca, durante 24 h, não houve a redução

no teor de compostos fenólicos, mas sim o aumento deste após a destoxificação. Neste experimento, assim como em outros, notou-se que o volume de hidrolisado após as destoxificações diminuiu, porém no caso deste experimento ocorreu a concentração dos compostos fenólicos, que possivelmente ocorreu devido evaporação, uma vez que as condições de perda ocorreram nos experimentos empregando o maior tempo (24h) e temperatura (60 °C).

Para compreender quais variáveis apresentaram efeitos na remoção dos compostos fenólicos do hidrolisado e quais foram estes efeitos, foi elaborado diagrama de Pareto (Figura 11) com o auxílio do software *Statistica*.

Figura 11 - Diagrama de Pareto com efeitos estimados para a redução no teor de compostos fenólicos, obtidos em experimentos empregando a biomassa seca de *C. guilliermondii* no HHBP.



Fonte: Autoria própria.

Verifica-se através do diagrama de Pareto apresentado na Figura 11 que todas as variáveis testadas no presente trabalho apresentaram efeitos significativos, na redução do teor de compostos fenólicos do HHBP, com nível de confiança de 95%.

Conforme ilustrado na Figura 11, a variável que exerceu maior efeito na remoção de fenólicos do hidrolisado, foi a proporção entre a biomassa seca de *C. guilliermondii* e HHBP. Isto significa que o aumento da proporção de biomassa seca de 1 para 5% favoreceu o processo de destoxificação. Vasserot, Caillet e Maujean (1997) também relataram que houve um incremento na redução da antocianina, um composto fenólico, de 19 para 58% após aumentar a concentração da levedura *S. cerevisiae* seca (adsorvente) de 3 para 30 g/L. No caso da

adsorção de fenóis por carvão ativado, o aumento da concentração de carvão de 1 para 3% resultou na maior remoção de fenóis totais presentes no licor hemicelulósico de bagaço de cana (VALLEJOS et al., 2016).

Outra variável que exerceu efeito significativo na destoxificação foi a temperatura, a qual apresentou efeito negativo, ou seja, aumentar o valor desta variável resultou em menor remoção de fenólicos no HHBP. Realmente, a temperatura tem forte influência na adsorção de compostos e é inclusive um indicativo da natureza do processo de interação com o adsorvente. Se a adsorção aumenta com o aumento da temperatura, então o processo é endotérmico; caso contrário é exotérmico (SENTHILKUMAAR; KALAAMANI; SUBBURAAM, 2006, ABDELWAHAB, 2014). No caso da pesquisa de Vasserot, Caillet e Maujean (1997), foram testadas temperaturas amenas, na faixa de 5 a 35 °C, empregando células de *S. cerevisiae* para a remoção de antocianina, e foi relatado que, dentre as temperaturas testadas, 15 °C foi mais eficaz na adsorção, removendo 50% dos compostos em cerca de 30 minutos, o que possivelmente indica que o processo era exotérmico. Além disto, houve também uma interação negativa entre as variáveis temperatura e tempo de contato, indicando maior redução no teor de compostos fenólicos combinando-se maiores temperaturas com o menor tempo, ou vice-versa. Os ensaios que empregaram o uso concomitante dos níveis superiores de temperatura e tempo, por exemplo, ocasionaram perda de volume do hidrolisado por evaporação. Quanto ao tempo de contato, Kilic, Apaydin-Varol e Pütün (2011) afirmam que o processo de adsorção atinge o equilíbrio em um determinado tempo, e que este tempo depende da natureza do adsorvente, sendo que algumas vezes o equilíbrio pode ser deslocado tanto para a adsorção, quanto para a dessorção, o que leva a diminuição ou aumento do teor do composto na solução. No caso do uso da biomassa seca de *S. cerevisiae*, o tempo de equilíbrio para a adsorção de fenol foi 4h (MOYO et al., 2012), corroborando com o presente trabalho no qual a variável tempo, em seu nível máximo exerceu efeito negativo na remoção de fenólicos totais. Também é possível observar que houve uma interação negativa entre as variáveis pH e tempo, indicando que o uso concomitante dos maiores ou menores níveis não resultaram na maior redução de compostos fenólicos.

Com relação a variável pH, é possível observar que aumento de seu valor de 2 para 8 no hidrolisado não favoreceu a remoção de fenólicos no HHBP (Figura 11). Resultados obtidos por alguns autores, nos quais a adsorção de fenólicos em solução aquosa por células inviáveis de leveduras foi também favorecida em pH ácido, na faixa de 1 a 4 (VASSEROT, CAILLET, MAUJEAN, 1997, MARTON et al., 2006, MOYO et al., 2012). O pH do hidrolisado é um fator importante na adsorção, pois diversos compostos fenólicos atuam como ácidos fracos e

apresentam pKa distintos. Em meio básico há maior concentração de íons OH^- e a maior parte dos compostos fenólicos estão na forma desprotonada, o que gera competição por sítios do adsorvente, reduzindo a eficiência na remoção de fenólicos da solução (MOYO et al., 2012). De fato, Abussaud et al. (2016) afirmaram que a eficiência na adsorção de fenólicos por carvão ativado foi reduzida em pH alcalino, acima de 7. Também especula-se que em pH básico ocorre a alteração na conformação das glucanas presentes na parede celular de leveduras, causando o decréscimo na taxa de adsorção de compostos pela superfície celular (PIOTROWSKA; MASEK, 2015).

Portanto, no presente trabalho, a condição de destoxificação que resultou na maior redução do teor de compostos fenólicos no HHBP (27 %) ocorreu no experimento 7, no qual foi empregado 5 % de biomassa seca, pH do hidrolisado igual a 2, 30 °C, durante 24 h.

5.3.2 Efeito das destoxificações com relação aos teores de ácido acético, 5-hidroximetilfurfural e furfural

Além da análise da concentração dos compostos fenólicos no HHBP, foi quantificado também os teores de ácido acético, 5-HMF e furfural antes e após as destoxificações com biomassa seca de *C. guilliermondii* FTI 20037 conforme planejamento fatorial realizado, e estes valores estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Concentração (g/L) de ácido acético, 5-HMF e furfural no HHBP não destoxificado (ND), destoxificado (D), e a redução (%) destes compostos conforme planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central.

Ensaio	Níveis reais				Ácido acético (g/L)			5-HMF (g/L)			Furfural (g/L)		
	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Proporção (% m/v)	pH	ND	D	% redução	ND	D	% redução	ND	D	% redução
1	30	5	1	2	8,79	6,44	26,7	0,51	0,38	25,81	0,17	0,14	17,10
2	60	5	1	2	6,27	8,13	0,0	0,48	0,62	0,0	0,14	0,13	6,02
3	30	24	1	2	4,73	6,33	0,0	0,42	0,41	3,98	0,14	0,15	0,0
4	60	24	1	2	6,00	8,15	0,0	0,55	0,66	0,0	0,18	0,18	0,0
5	30	5	5	2	5,96	7,01	0,0	0,38	0,42	0,0	0,15	0,13	12,90
6	60	5	5	2	7,03	6,69	4,77	0,43	0,47	0,0	0,18	0,19	0,0
7	30	24	5	2	7,11	6,88	3,21	0,36	0,41	0,0	0,17	0,19	0,0
8	60	24	5	2	6,80	8,56	0,0	0,59	0,46	21,50	0,15	0,18	0,0
9	30	5	1	8	7,26	6,86	5,47	0,44	0,42	5,62	0,13	0,14	0,0
10	60	5	1	8	6,95	6,95	0,0	0,38	0,45	0,0	0,17	0,14	15,77
11	30	24	1	8	8,33	7,56	9,20	0,36	0,40	0,0	0,12	0,14	0,0
12	60	24	1	8	8,00	10,65	0,0	0,34	0,45	0,0	0,16	0,16	0,0
13	30	5	5	8	7,37	7,66	0,0	0,41	0,40	2,25	0,17	0,12	27,48
14	60	5	5	8	6,95	8,09	0,0	0,38	0,42	0,0	0,17	0,18	0,0
15	30	24	5	8	7,12	7,72	0,0	0,38	0,40	0,0	0,15	0,12	18,16
16	60	24	5	8	8,68	9,98	0,0	0,38	0,41	0,0	0,14	0,16	0,0
17	45	14,5	3	5	7,82	7,29	6,87	0,40	0,43	0,0	0,12	0,16	0,0
18	45	14,5	3	5	7,82	7,70	1,60	0,40	0,43	0,0	0,12	0,15	0,0
19	45	14,5	3	5	7,82	8,49	8,53	0,40	0,44	0,0	0,12	0,11	0,62

Fonte: Autoria Própria

A partir da Tabela 7, nota-se que, em determinadas condições, o emprego da biomassa seca de *C. guilliermondii* FTI 20037 no tratamento do HHBP resultou na redução de outros compostos além dos fenólicos, como ácido acético, 5-HMF e furfural. Diferentemente dos compostos fenólicos, em que é reportado na literatura a sua remoção empregando leveduras secas, nenhum trabalho foi encontrado utilizando microrganismos não viáveis na remoção de ácido acético e compostos furânicos.

Segundo a Tabela 7, a condição referente ao ensaio de número 1 do planejamento fatorial removeu o maior teor de ácido acético e 5-HMF, enquanto que a maior quantidade removida de furfural ocorreu no ensaio de número 13. Entretanto, em alguns ensaios não houve a remoção, mas sim o aumento na concentração de ácido acético, 5-HMF e furfural. Este aumento na concentração dos compostos possivelmente ocorreu devido à concentração do hidrolisado por evaporação, pois foi observado pequena perda de volume do HHBP, assim como no caso dos compostos fenólicos. Sobretudo, é importante considerar que no caso do ácido acético e compostos furânicos, suas concentrações no HHBP são relativamente inferiores, comparado ao teor dos fenólicos totais. Além disto, pequenas quantidades de furfural podem favorecer a produção de xilitol, como ocorreu no caso da levedura *Candida magnoliae,* em que a adição de 0,3 g/L de furfural no meio semidefinido contendo xilose como fonte de carbono resultou no aumento de 11% da produtividade volumétrica de xilitol (Qp) comparado a fermentação controle, sem furfural (WANNAWILAI et al., 2017).

É importante ressaltar que, para cada experimento realizado em função do planejamento fatorial desenhado (item 4.5), foi empregado o mesmo lote de HHBP concentrado e então submetido à alteração de pH antes do contato com a biomassa seca de *C. guilliermondii.* Portanto, a Tabela 8 apresenta a concentração média do teor de compostos fenólicos do HHBP nos experimentos realizados no planejamento fatorial, em função da alteração de pH.

Tabela 8 - Concentração média de compostos fenólicos, ácido acético, 5-HMF e furfural presentes no HHBP, em função da alteração de pH do hidrolisado realizadas antes das destoxificações.

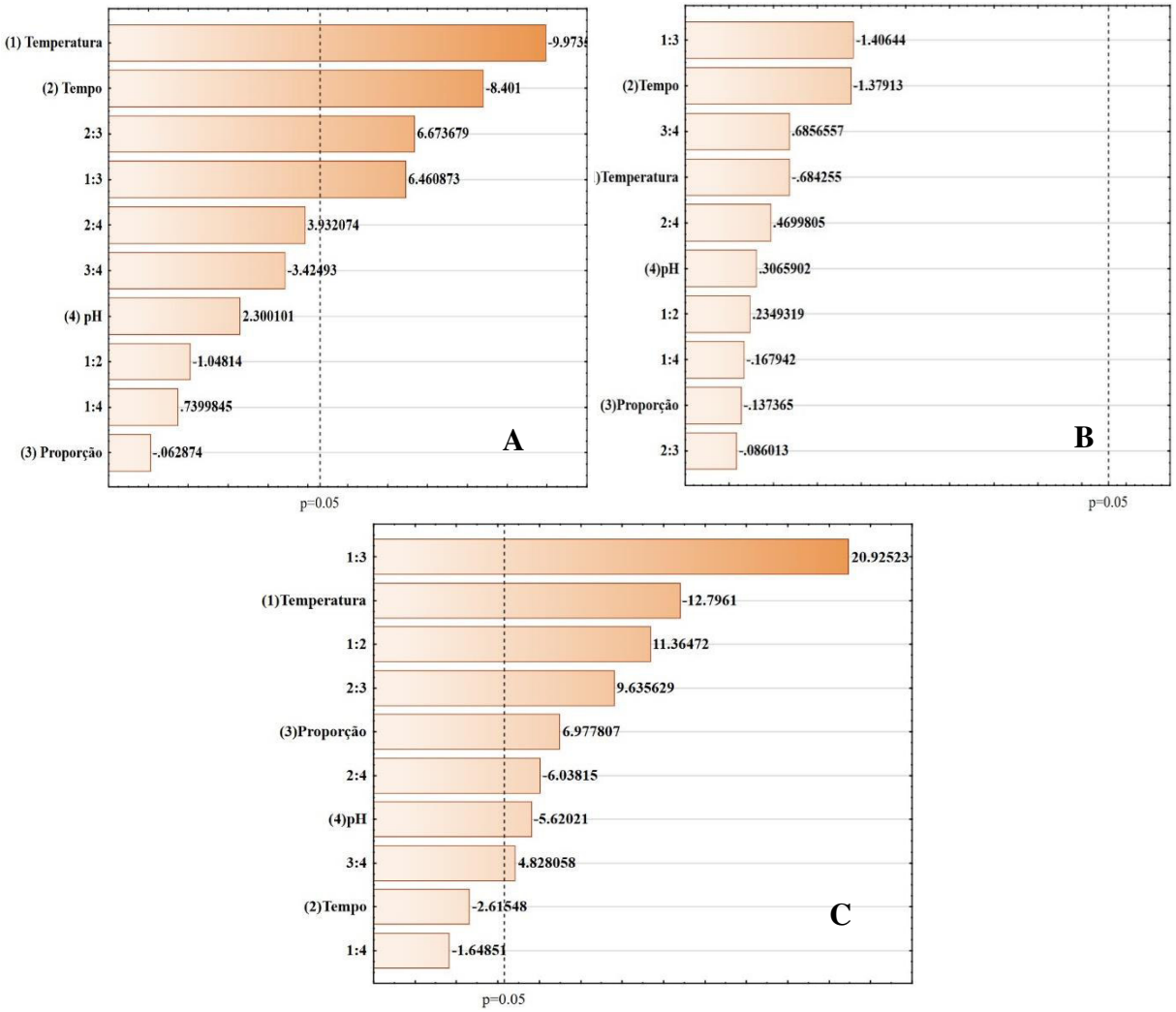
	Concentração média (g/L)		
Composto	pH 7	pH 2	pH 8
Compostos fenólicos	9,44±0,85*	9,51±0,56	9,18±0,58
Ácido acético	7,39±0,88	6,68±1,24	8,64±1,81
5-HMF	0,46±0,11	0,47±0,08	0,38±0,03
Furfural	0,15±0,03	0,16±0,02	0,15±0,02

* os valores acima referem-se à média±desvio padrão.
Fonte: Autoria Própria.

Para cada ensaio de destoxificação realizado, elevou-se o pH do HHBP para 7, visando a neutralização do ácido sulfúrico proveniente da hidrólise com ácido. Na Tabela 8, verifica-se a média na concentração de compostos tóxicos de todos os ensaios realizados. Após a etapa de neutralização, o pH do hidrolisado foi decrescido para 2 ou elevado para 8, dependendo da condição referente ao planejamento fatorial. Assim, observa-se que a mudança no pH de 7 para 8 ou 2 não ocasionou em grandes diferenças na concentração de compostos fenólicos e furânicos, e ácido acético.

A partir dos dados da Tabela 7, foram elaborados diagramas de Pareto (Figura 12) para a análise dos efeitos das variáveis sobre o teor de ácido acético e compostos furânicos no HHBP em função das destoxificações realizadas.

Figura 12 - Diagramas de Pareto com efeitos estimados para a redução no teor de ácido acético (A), 5-HMF (B), e furfural (C) obtidos nos experimentos de destoxificação realizados empregando a biomassa seca de *Candida guilliermondii* no HHBP.



Fonte: Autoria Própria.

Na Figura 12A, o diagrama de Pareto indica que no caso da remoção do ácido acético, as variáveis temperatura e tempo apresentaram efeitos significativos, além de interações que ocorreram entre algumas variáveis. Nesta figura observa-se que o aumento da temperatura de 30 para 60 °C afetou negativamente a remoção deste ácido. Também foi observado por Zhang et al. (2016) que a redução do ácido acético, a partir do emprego de estruturas metais-inorgânicas, diminuiu conforme aumento na temperatura de 5 para 45 °C. A partir destes resultados é possível pressupor que a adsorção deste ácido é exotérmica uma vez que não necessita de temperaturas elevadas. O tempo de contato também apresentou efeito negativo, ou seja, o tempo de 24 h não favoreceu a remoção do ácido acético, corroborando com os dados obtidos por Zhang, em que o tempo de equilíbrio da adsorção do ácido acético ocorreu em 6 h. Entretanto, a combinação do tempo no maior nível com a maior proporção de biomassa (5%) resultou no efeito positivo para a remoção deste ácido, conforme interação ilustrada na Figura 12A. O maior nível de tempo empregado no presente trabalho foi de 24 h, e algumas pesquisas indicam que no caso do uso do carvão ativado na adsorção deste ácido, o tempo de contato suficiente para atingir o equilíbrio de adsorção é cerca de 30 minutos (MARTON et al., 2006; BERHE; JEEVAN; LIJALEM, 2015). Houve também uma interação positiva entre a proporção de biomassa seca e a temperatura, indicando que os maiores níveis removeram a maior quantidade de ácido acético no HHBP.

A respeito da Figura 12B, é possível observar que nenhuma variável testada no presente estudo apresentou efeitos significativos para a remoção de 5-HMF. Não foram encontrados padrões para o comportamento deste composto em função da adsorção com biomassa seca de levedura, sendo necessário realizar mais estudos para investigar se de fato estas variáveis testadas não apresentam efeitos significativos.

Os efeitos estimados para o composto furfural estão apresentados na Figura 12C, sendo que as variáveis temperatura, pH e proporção de biomassa seca apresentaram significância. Com relação a temperatura, interessantemente, para todos os diagramas de Pareto apresentados, esta foi a variável que, isoladamente, apresentou efeito negativo na remoção de todos os compostos. Portanto, a máxima temperatura empregada no presente trabalho (60 °C) não se mostra como favorável no caso da destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos empregando biomassa seca de *C. guilliermondii* FTI 20037. No estudo realizado em 2014 por Cuevas e colaboradores, a remoção do furfural em solução aquosa foi testada empregando carvão ativado o favorecimento da remoção do furfural ocorreu a 25 °C, independente das concentrações de carvão testadas. Entretanto, Marton et al. (2006) relata que a maior remoção dos compostos tóxicos do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por carvão ocorreu a 60 °C. A

diferença de comportamento pode ser explicada devido ao fato de que hidrolisados são meios complexos, que apresentam uma grande diversidade de compostos, os quais podem interagir quando há mudanças nas condições experimentais.

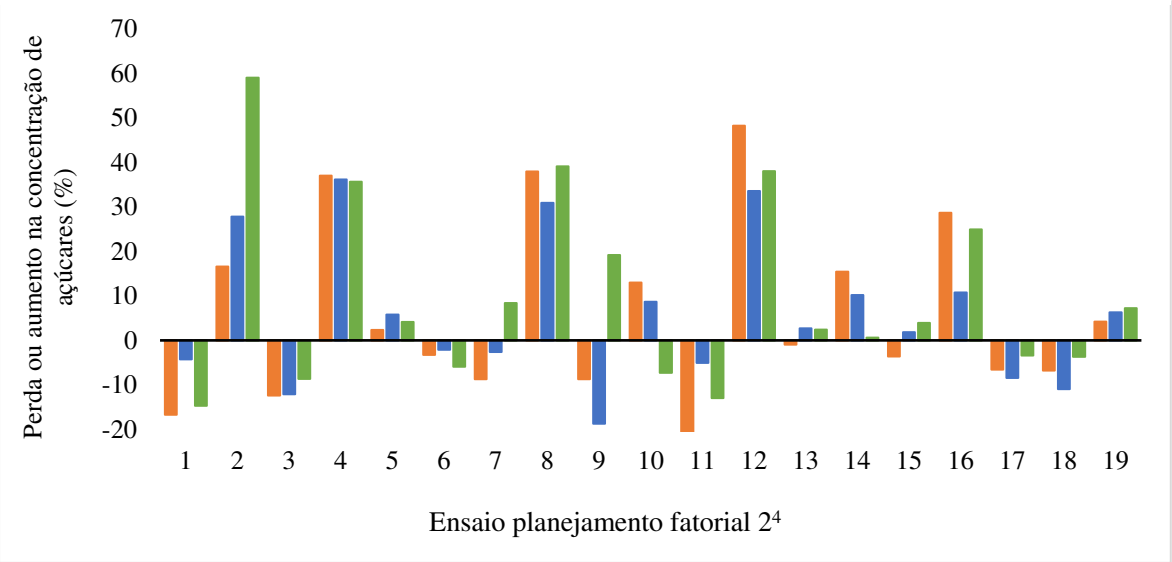
A interação entre temperatura e proporção de biomassa seca e HHBP, assim como no caso do ácido acético, exerceram efeito positivo no remoção de furfural. Outros efeitos positivos demonstrados na Figura 12C, que removeram o maior teor de furfural foi a proporção de biomassa seca (5% m/v), interações entre temperatura e tempo, entre tempo e proporção e entre proporção e pH. O pH exerceu efeito negativo, o que significa que em meio ácido a remoção do furfural foi superior. Esta é uma molécula que apresenta polaridade devido a presença de grupos hidroxila e cetona (Lomba et al., 2014) e em diferentes níveis de pH seu comportamento e estabilidade podem ser afetados.

Para todas as variáveis resposta avaliadas, o modelo de primeira ordem não se mostrou satisfatório, com baixos valores de R^2 (menor que 0,7), que procedeu também a um teste de curvatura. Esta foi significativa em todos os casos, indicando que um modelo de ordem superior poderia explicar melhor a variabilidade dos resultados experimentais. Neste caso, visando à otimização do processo, estudos futuros deverão ser realizados visando à composição de modelos quadráticos.

5.3.3 Efeito das destoxificações com relação aos teores de glicose, xilose e arabinose

Após as destoxificações do HHBP realizadas, observou-se que houve alterações nas concentrações de todos os compostos avaliados, inclusive dos açúcares. Neste caso, a Figura 13 apresenta, em porcentagem, a perda e/ou ganho de xilose, glicose e arabinose em função das destoxificações realizadas segundo planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central.

Figura 13 - Perda ou ganho dos açúcares glicose (■), xilose (■) e arabinose (■), após destoxificações do HHBP em função do planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central.



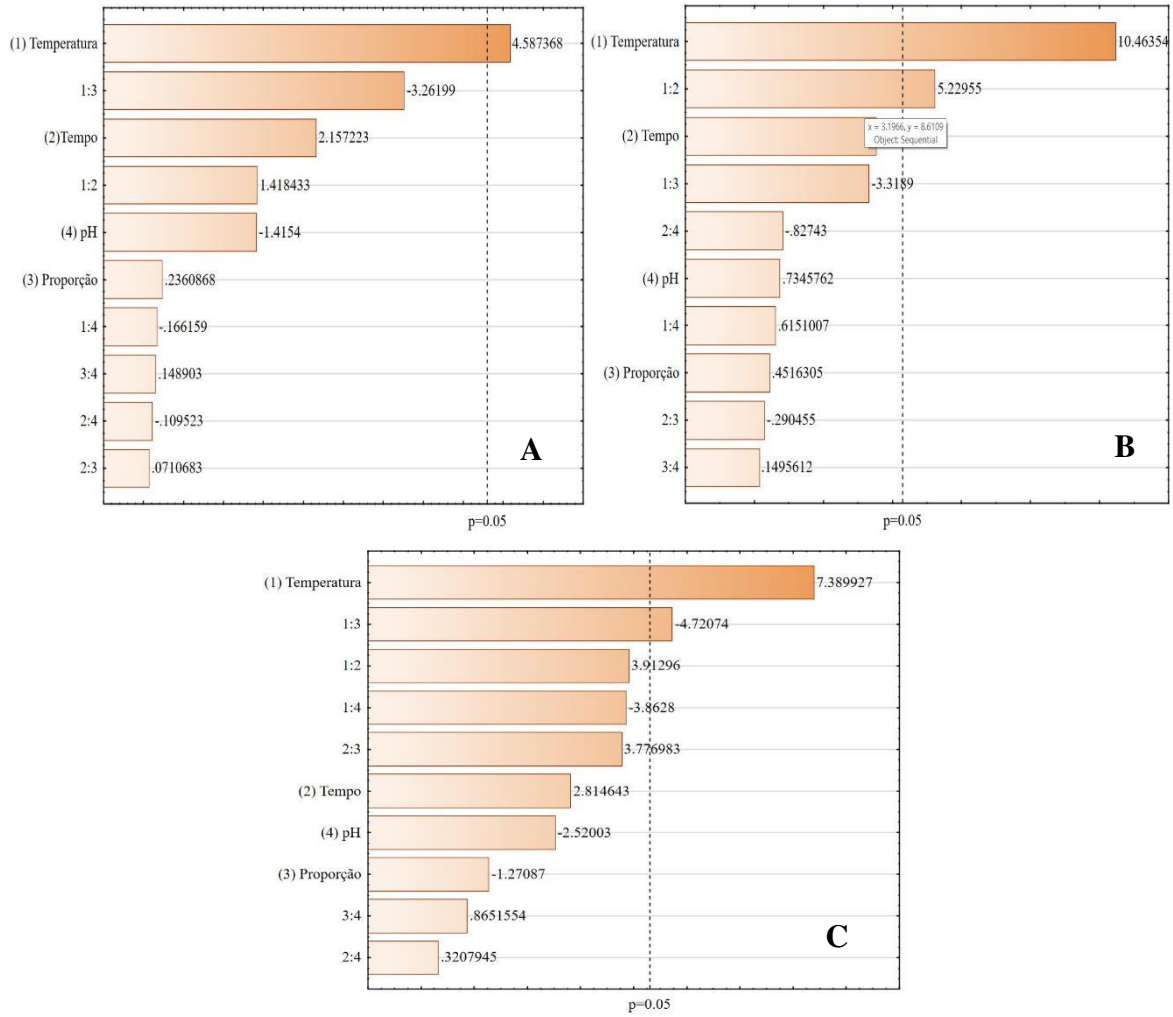
Fonte: Autoria Própria.

A partir da Figura 13, pode-se notar que em alguns ensaios houve a perda de açúcares e em outros, houve o aumento de sua concentração. É importante ressaltar que a perda de açúcares na destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos visando a bioprodução de xilitol, é indesejada, uma vez que tais açúcares, principalmente a xilose, são assimilados pela levedura. No caso do aumento na concentração, é possível que a perda de volume do HHBP por evaporação possa ter concentrado o conteúdo de açúcares, assim como ocorreu para os compostos tóxicos (compostos fenólicos e furânicos e ácido acético).

Na Figura 13 é possível observar que o açúcar no qual houve perda na maior quantidade de ensaios foi a glicose, enquanto que a arabinose foi o açúcar com menor perda. A literatura não reporta estudos envolvendo a adsorção de açúcares por células microbianas. Porém diferentes estratégias de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos como emprego de carvão ativado, resinas de troca iônica, tratamentos alcalinos, relatam a perda de açúcares (WICKRAMASINGHE; GRZENIA, 2008). Por exemplo, ao empregar resinas houve perda de 11 a 43,6% de glicose, sendo que a xilose para este caso não foi afetada. (VILLARREAL et al., 2006). Assim como Arruda et al. (2008) encontrou que a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por adsorção com carvão ativado removeu em maior quantidade a glicose em relação a xilose.

Foram elaborados diagramas de Pareto para avaliar quais variáveis testadas apresentaram efeitos significativos na perda de açúcares do HBBP (Figura 14).

Figura 14 - Diagramas de Pareto com efeitos estimados com relação a perda dos açúcares xilose (A), glicose (B), e arabinose (C) obtidos nos experimentos de destoxificação empregando biomassa seca de *C. guilliermondii* no HHBP.



Fonte: Autoria própria.

Os diagramas de Pareto ilustrados na Figura 14 apresentam a significância dos efeitos considerando a perda de açúcares. Para todos os açúcares avaliados (glicose, xilose e arabinose) a temperatura foi a variável que apresentou efeito significativo e positivo, indicando que em temperaturas maiores, a perda destes açúcares é reduzida. Assim como foi encontrado para Santos, Marton e Felipe (2014), no qual a perda de açúcares foi evitada a partir do aumento da temperatura, só que neste caso a máxima temperatura empregada foi de 35°C.

No caso da xilose (Figura 14A), somente a variável temperatura foi significativa, enquanto que no caso da glicose (Figura 14B), houve uma interação de efeito positivo entre temperatura e tempo, ou seja, a combinação destas variáveis nos maiores níveis, resulta na menor perda de açúcares. Já para a arabinose (Figura 14C), houve efeito negativo para a

interação entre temperatura e proporção de biomassa seca, indicando que a menor perda de açúcares ocorre ao empregar concomitantemente a maior temperatura (60 °C) com a menor proporção de biomassa seca (1%), ou vice-versa.

5.4 Destoxificação do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana com carvão vegetal ativado

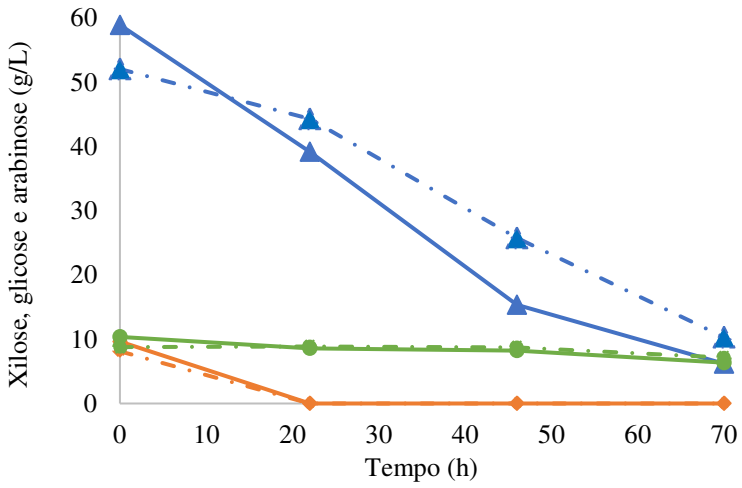
Como experimento controle, foi realizada a destoxificação do HHBP com carvão ativado, baseada na metodologia descrita por Marton et al. (2006). Tal metodologia consiste em elevar o pH do HHBP a 7 para neutralização do ácido sulfúrico presente neste, seguido do decréscimo do pH para 2,5 e adição do carvão ativado (1% m/v). Esta metodologia removeu 40,3% dos compostos fenólicos, 6% de ácido acético, 14,3% de furfural, 26,9% de 5-HMF. Além disso, houve a perda de açúcares do hidrolisado, 12% de xilose, 14% de glicose e 8% de arabinose, presentes no hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana. O emprego do carvão ativado na destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos de biomassas lignocelulósicas é amplamente empregada nas pesquisas para a produção de xilitol, tendo sido encontrado remoção de fenólicos de 27% para palha de arroz (MUSSATTO; ROBERTO, 2001), 76% para bagaço (MARTON et al., 2006) e 53% para a palha (HERNÁNDEZ-PÉREZ, 2015) de cana-de-açúcar.

5.5 Teste de fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar destoxificado com biomassa seca de *Candida guilliermondii* FTI 20037

Considerando o objetivo de reduzir o teor de compostos tóxicos do HHBP, principalmente de compostos fenólicos, para seu emprego na produção biotecnológica de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037, nesta etapa, posterior à destoxificação, é avaliada a fermentabilidade do HHBP destoxificado com a biomassa seca de *C. guilliermondii.* Para tanto, a escolha das condições de destoxificação do hidrolisado baseou-se nas condições experimentais as quais resultaram em redução do maior teor de compostos fenólicos, a qual foi 27%. Tais condições foram a proporção da biomassa seca: HHBP de 5 %, pH do hidrolisado igual a 2, 30 °C, durante 24 h, sob agitação de 100 rpm, correspondente ao ensaio número 7 do planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central. Também foi realizado o experimento controle, a partir do HHBP destoxificado com carvão ativado (Marton et al., 2006).

A partir da Figura 15 observa-se o perfil de consumo por *C. guilliermondii* dos açúcares xilose, glicose e arabinose, presentes no hidrolisado em função da destoxificação deste com biomassa seca ou por carvão ativado.

Figura 15 - Consumo de xilose (▲), arabinose (●) e glicose (◆) por *C. guilliermondii* FTI 20037 durante fermentação em HHBP destoxificado com biomassa seca de *C. guilliermondii* (---) ou carvão ativado (—).



Fonte: Autoria própria.

A partir da Figura 15, observa-se que independente da condição de tratamento do HHBP, o consumo de xilose foi superior a 80% em ambas fermentações, sendo máximo na fermentação com hidrolisado destoxificado com carvão (89%), enquanto que para o hidrolisado destoxificado com biomassa seca de *C. guilliermondii*, o consumo de xilose foi 80, 2%. O consumo de xilose superior a 80% é também reportado por outros autores em pesquisas com esta mesma levedura (HERNÁNDEZ-PÉREZ; ARRUDA; FELIPE, 2016, UNREAN; KETSUB, 2018, ARRUDA et al., 2017). Possivelmente, a assimilação da xilose foi inferior no hidrolisado destoxificado com biomassa seca de levedura devido a maior concentração de compostos fenólicos nesta fermentação (6 g/L), comparado a concentração no hidrolisado destoxificado com carvão (4 g/L). A presença de compostos fenólicos no meio pode dificultar o transporte de substratos e inativar a atividade enzimática em vias metabólicas importantes para a levedura (MONLAU et al., 2014; LIN et al., 2015).

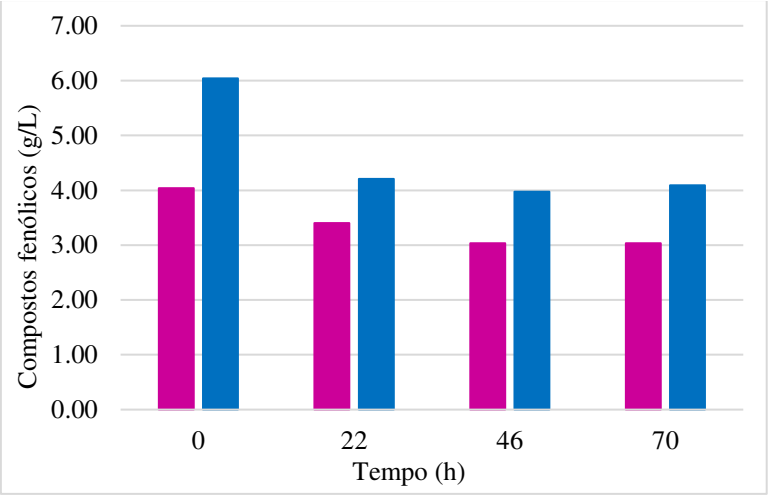
Ainda assim há casos os quais a xilose pode ser completamente assimilada por *C. guilliermondii*, mesmo na presença de compostos tóxicos, como na fermentação em hidrolisado hemicelulósico de colza contendo 40 g/L de xilose, a levedura consumiu

completamente esta pentose em 48h de fermentação (LÓPEZ-LINARES et al., 2018). Outro fator a ser considerado no metabolismo da xilose é a taxa entre açúcares: nitrogênio, fundamental para a eficiência do processo fermentativo, sendo que a suplementação com $(NH_4)_2SO_4$ pode favorecer o consumo desta pentose e o crescimento celular (UNREAN; KETSUB, 2018). Além da xilose, outro açúcar presente no HHBP, porém em menor quantidade, é a glicose, que conforme demonstrado na Figura 15 nota-se uma semelhança de comportamento para ambos os tratamentos de destoxificação empregados. Segundo Su et al. (2013), a glicose é o açúcar preferencial dos microrganismos, e sua presença no meio pode induzir à repressão catabólica em relação a outros açúcares presentes. Tal fato foi evidenciado por Tizazu e Moholkar (2018), no qual a assimilação da xilose por *C. tropicalis* foi desencadeada a partir do completo consumo da glicose, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. De fato, no presente trabalho, a glicose foi o primeiro monossacarídeo a ser completamente consumido, tanto na fermentação em HHBP destoxificado com biomassa seca quanto com carvão ativado (controle). Por outro lado, em trabalho de Silva et al. (2004) Foi constatado que a interferência da glicose sobre o consumo da xilose está relacionada com a proporção entre estes dois açúcares, sendo que para *C. guilliermondii* foi demonstrado ser a proporção de 1: 5 favorável ao bioprocesso de produção de xilitol.

Com relação ao lento e parcial consumo da arabinose (Figura 15) nota-se que, diferente ao encontrado para a xilose, que o favorecimento deste ocorreu na fermentação do HHBP destoxificado com biomassa seca. Além disso, em ambas fermentações, foi observado que seu consumo ocorreu a partir das 46h de fermentação, após a exaustão da xilose no meio. Este comportamento também foi constatado em outros trabalhos empregando a mesma levedura, cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, como na pesquisa de Rodrigues et al. (2006), no qual a arabinose foi 26,8% consumida, enquanto que Rodrigues et al. (2003), constataram que o consumo desta pentose foi de 16,7%. O baixo consumo de arabinose por *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósicos de outras biomassas é comum e reportado por diversos autores (MATEO et al., 2014; ARRUDA et al., 2017; LÓPEZ-LINARES et al., 2018) e supõe-se que tal comportamento se deve à ausência de vias catabólicas eficientes ou completas para a arabinose (KNOSHAUG et al., 2009).

No presente trabalho, observou-se que durante as fermentações, além do consumo dos açúcares, houve também a assimilação dos compostos fenólicos. A Figura 16 apresenta a concentração dos compostos fenólicos durante as fermentações em HHBP destoxificado com biomassa seca de *C. guilliermondii* ou com carvão ativado.

Figura 16 - Concentração de compostos fenólicos presente no HHBP destoxificado com biomassa seca de *C. guilliermondii* (■) ou carvão ativado (■) durante as fermentações nestes hidrolisados.

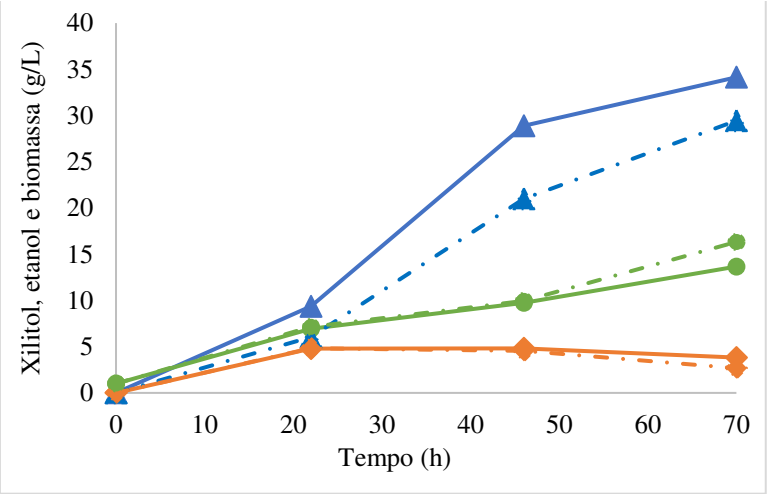


Fonte: Autoria própria.

Embora seja relatado na literatura a ação inibitória dos compostos fenólicos sobre o metabolismo microbiano, dependendo de sua concentração, é possível observar na Figura 16 que independente da destoxificação do hidrolisado com carvão ou biomassa seca de levedura, este composto teve sua concentração reduzida em 24,8 e 32,3%, respectivamente. Este fato pode indicar que compostos fenólicos podem ser metabolizados por esta levedura, conforme já relatado por Cortez e Roberto (2010). Interessantemente, o teor destes compostos decresceu somente nas primeiras 22h das fermentações, coincidente ao esgotamento da glicose, não sendo observado redução da sua concentração a partir deste tempo. Segundo Arruda (2011), foi constatado em trabalho com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, no qual continha 14,7 g/L de fenólicos, a assimilação de 2,1 g/L deste composto por *C. guilliermondii*.

O metabolismo destes açúcares pela levedura é direcionado para a formação de biomassa celular, assim como de compostos, a exemplo do xilitol, a partir da xilose e arabinose, e o etanol a partir da glicose (BARBOSA et al., 1988; HAHN-HAGERDAL et al., 1994; GRANSTRÖM; IZUMORI; LEISOLA, 2007). Durante as fermentações em HHBP destoxificado com biomassa seca de *C. guilliermondii* ou com carvão ativado, houve a formação dos produtos acima mencionados (Figura 17).

Figura 17 - Produção de xilitol (▲), biomassa (●) e etanol (◆) por *C. guilliermondii* FTI 20037 em HHBP destoxificado com biomassa seca de *C. guilliermondii* (---) ou carvão vegetal ativado (—).



Fonte: Autoria própria.

Verifica-se a partir da Figura 17, que a levedura *C. guilliermondii* foi capaz de produzir xilitol independente das condições de destoxificação do hidrolisado empregadas. Ao final das fermentações, o maior teor de xilitol (34,14 g/L) foi obtido na fermentação controle (HHBP destoxificado com carvão), sendo que na fermentação em HHBP destoxificado com biomassa seca de levedura, foi produzido 29,45 g/L de xilitol. Possivelmente, o maior teor de xilitol na destoxificação com carvão se deve ao favorecimento do consumo de xilose nestas condições conforme apresentado.

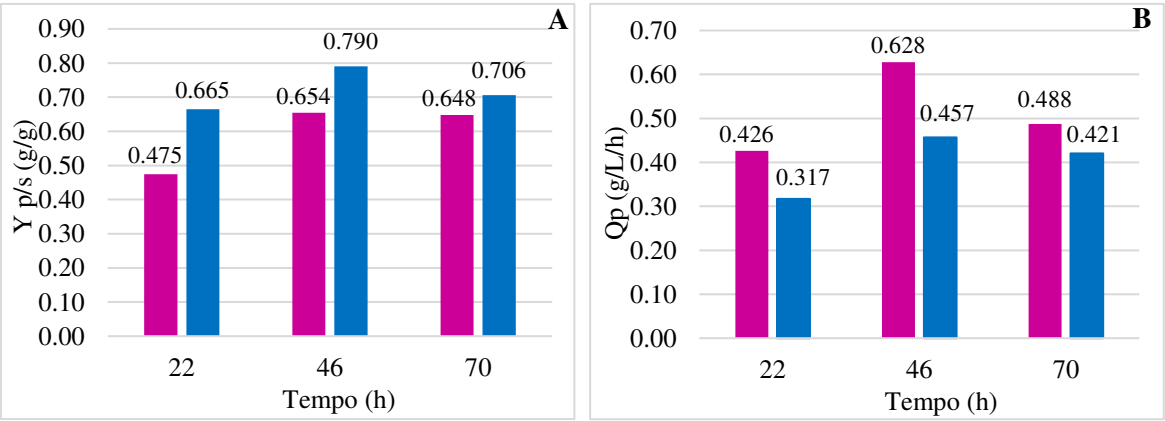
Ainda a respeito da Figura 17, o pico de xilitol foi atingido em 46h, concomitantemente com o pico de consumo de xilose, da mesma forma como relatado por Tizazu e Moholkar (2018). Foi reportado por Hernández-Pérez (2015) que *C. guilliermondii* produziu cerca de 37,9 g/L de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de palha, valor semelhante ao encontrado no presente trabalho. O cultivo desta espécie no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (em reator de 18L), resultou em cerca de 37 g/L de xilitol (ARRUDA et al., 2017). Além do aproveitamento dos subprodutos da cana, a produção de xilitol por esta levedura também foi reportada em hidrolisados hemicelulósicos de diversas biomassas lignocelulósicas e com diferentes metodologias de destoxificação, como: emprego de resinas de troca iônica, solventes orgânicos, precipitação (VALLEJOS et al., 2016; LÓPEZ-LINARES et al., 2018), porém não foi encontrado pesquisas empregando microrganismos inviáveis na destoxificação de hidrolisados.

Quanto a produção de etanol, ilustrada na Figura 17, o gráfico indica que até 46h, o teor deste encontra-se similar para o uso de carvão quanto da biomassa seca de levedura, sendo que na fermentação com biomassa seca foi produzido 4,5g/L e quanto com carvão foi 4,8 g/L. Também é possível observar neste gráfico o declínio do etanol após 46 h em ambas fermentações, o que pode indicar que este produto foi consumido pela levedura, uma vez que a concentração de açúcares neste momento encontrava-se escassa. Resultado similar também foi relatado por Hernández-Pérez (2015), durante fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, a maior produção de etanol por *C. guilliermondii* foi de 7,58 g/L, sendo observado que a maior taxa de produção ocorreu entre 8 e 24h.

Também é apresentado na Figura 17 a produção de biomassa celular nas fermentações dos hidrolisados destoxificado com biomassa seca ou com carvão ativado. Nesta figura, observa-se que as concentrações da biomassa celular permaneceram similares nas duas fermentações até o tempo 46h, sendo que após este tempo, o teor de biomassa celular foi superior na fermentação em HHBP destoxificado com biomassa seca de *C. guilliermondii* (16,13 g/L). Considerando que os produtos finais da degradação dos compostos fenólicos leva a obtenção de succinato e acetil-CoA (FRITSCHE; HOFRICHTER, 2005), e que na fermentação em HHBP destoxificado com levedura seca o consumo de fenólicos foi maior do que o experimento com carvão, estes produtos de degradação são intermediários do ciclo do ácido cítrico e são direcionados para a produção de ATP e consequente aumento da concentração da biomassa celular.

Com relação à produção de xilitol em função da destoxificação com biomassa seca ou carvão, nota-se a partir dos parâmetros fermentativos na Figura 18 que o hidrolisado destoxificado com biomassa seca favoreceu o fator de conversão de xilose em xilitol.

Figura 18 - Fator de conversão de xilose a xilitol, $Y_{P/S}$ (A) e produtividade volumétrica de xilitol Q_p (B), durante as fermentações com *C. guilliermondii* em HHBP destoxificado com biomassa seca de *C. guilliermondii* (■) ou destoxificado com carvão ativado (■).



Fonte: Autoria própria.

Segundo a Figura 18, nota-se que o fator de conversão de xilose a xilitol ($Y_{P/S}$) em todos os tempos (22, 46 e 70h) foi superior na fermentação realizada com HHBP destoxificado com biomassa seca de *C. guilliermondii* quando comparado a fermentação controle (hidrolisado destoxificado com carvão ativado). O valor máximo do fator de conversão foi atingido em 46h para ambas fermentações, e no caso do HHBP destoxificado com biomassa seca de levedura, o valor de $Y_{P/S}$ neste tempo foi 0,79 g/g. Segundo Barbosa et al. (1988), o valor teórico máximo para o fator de conversão de xilose a xilitol é 0,917 g/g, caso o cofator reduzido (NADPH) seja completamente regenerado na via das pentoses fosfato, uma vez que este cofator é requerido pela enzima xilose redutase para a conversão da xilose a xilitol. López-Linares et al. (2018) afirmam que não é recomendado a remoção completa de compostos tóxicos do hidrolisado hemicelulósico (compostos fenólicos, ácido acético e furanos), pois poucas quantidades destes tóxicos podem acelerar a conversão de xilose a xilitol por *C. guilliermondii*.

Apesar do fator de conversão de xilose a xilitol ($Y_{P/S}$) ser superior no hidrolisado destoxificado com biomassa seca, os valores de produtividade volumétrica (Q_p) foram superiores com o uso do carvão, sendo este máximo (Q_p= 0,628 g/L/h), enquanto com biomassa seca foi o $Y_{P/S}$ de 0,790 g/g. Concomitante ao tempo que foi atingido o máximo consumo de xilose com o uso do carvão, encontra-se também o maior valor de produtividade, o que foi em 46h.

6 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi demonstrado a possibilidade do aproveitamento da biomassa seca de *Candida guilliermondii* FTI 20037, residual de processos fermentativos, como agente destoxificante do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar. Evidenciou-se a redução no teor dos compostos tóxicos fenólicos totais, ácido acético e furfural.

Constatou-se a utilização do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana destoxificado com biomassa seca de *C. guilliermondii* proveniente do cultivo neste mesmo hidrolisado, como meio de fermentação para a bioconversão de xilose em xilitol por esta mesma levedura. Destaca-se que houve um favorecimento do fator de conversão de xilose a xilitol quando empregado o hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana destoxificado com a biomassa seca da levedura em comparação com o tratado com carvão ativado.

Considerando ser este trabalho inovador, os resultados são promissores e a possibilidade de se estabelecer melhores condições para o aumento dos parâmetros fermentativos, a proposta do aproveitamento da biomassa seca de *C. guilliermondii* como agente destoxificante no bioprocesso de produção de xilitol se apresenta como alternativa viável.

7 PERSPECTIVAS DE TRABALHOS FUTUROS

Com os resultados obtidos, trabalhos futuros podem ser realizados visando aprimoramento da destoxificação do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar com biomassa seca de *Candida guilliermondii* FTI 20037:

- Avaliar o efeito da adsorção da biomassa seca de *Candida guilliermondii* FTI 20037 sobre os compostos tóxicos isoladamente, a partir do preparo de solução aquosa.

- Empregar somente a parede celular de *C. guilliermondii* FTI 20037, ou utilizar suas células imobilizadas para avaliar a eficácia na remoção de compostos fenólicos e outros tóxicos do hidrolisado hemicelulósico da mistura de bagaço e palha de cana-de-açúcar.

- Explorar outras variáveis que possam interferir no processo de adsorção da biomassa seca de *C. guilliermondii* FTI 20037 sob os compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico e assim elaborar um modelo de superfície de resposta.

- Avaliar a possibilidade do reciclo da biomassa seca de *C. guilliermondii* FTI 20037, por meio da dessorção, visando a destoxificação de diversos lotes de hidrolisado hemicelulósico.

REFERÊNCIAS

ABUSSAUD, B. et al. Sorption of phenol from waters on activated carbon impregnated with iron oxide, aluminum oxide and titanium oxide**. Journal of Molecular Liquids**, v. 213, p. 351-359, 2016.

AGUILAR-USCANGA, B.; FRANÇOIS, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 268–274, 2003.

AHMARUZZAMAN, M. Adsorption of phenolic compounds on low-cost adsorbents: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 143, n. 1–2, p. 48–67, 2008.

ALLEN, S. A. et al. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Biofuels**, v. 3, p. 2, 2010.

ÁNGELES POZO-BAYÓN, M.; ANDÚJAR-ORTIZ, I.; MORENO-ARRIBAS, M. V. Scientific evidences beyond the application of inactive dry yeast preparations in winemaking. **Food Research International**, v. 42, n. 7, p. 754–761, 2009.

ARRUDA, P. V. **Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** 2011. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

ARRUDA, P. V. et al. Efeito da destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana sobre a remoção de fenóis, a perda de açúcares e a bioconversão de xilose em xilitol. **Nucleus**, v. 5, n. 1, p. 1–17, 2008.

ARRUDA, P. V. et al. Scale up of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry,** v. 47, p. 297–302, 2017.

ASENSIO, A. et al. *Candida guilliermondii* fungemia in hospitalized patients epidemiologically linked to a patient care attendant. **American Journal of Infection Control**, v. 43, n. 9, p. 1012-1014, 2015.

ATKINS, P.; PAULA, J. **Físico-química**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC- Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2008.

ÁVILA, P. F.; FORTE, M. B. S.; GOLDBECK, R. Evaluation of the chemical composition of a mixture of sugarcane bagasse and straw after different pretreatments and their effects on commercial enzyme combinations for the production of fermentable sugars. **Biomass and Bioenergy**, v. 116, n. 80, p. 180–188, 2018.

BARBOSA, M. F. S. et al. 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, n. 4, p. 241–251, 1988.

BARCELOS, C. A. et al. Sweet sorghum as a whole-crop feedstock for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 94, p. 46–56, 2016.

BATES, S. et al. Candida albicans Pmr1p, a secretory pathway P-type Ca2+/Mn2+-ATPase, is required for glycosylation and virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 24, p. 23408–23415, 2005.

BENJAMIN, Y.; GÖRGENS, J. F.; JOSHI, S. V. Comparison of chemical composition and calculated ethanol yields of sugarcane varieties harvested for two growing seasons. **Industrial Crops and Products**, v. 58, p. 133–141, 2014.

BERHE, A.; JEEVAN, A.; LIJALEM, T. Removal of Acetic Acid from Aqueous Solution by using Activated Carbon. **International Journal of Innovation and Scientific Research**, v. 17, n. 2, p. 443–450, 2015.

BEZERRA, J. D. C. et al. Biometric and chemical characteristics of sugarcane varieties for use as forage in limiting soil water conditions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 46, n. 5, p. 384–392, 2017.

BOERIS, P. S. et al. Biosorption of aluminum through the use of non-viable biomass of *Pseudomonas putida*. **Journal of Biotechnology**, v. 236, p. 57–63, 2016.

BOWMAN, S. M.; FREE, S. J. The structure and synthesis of the fungal cell wall. **BioEssays**, v. 28, n. 8, p. 799–808, 2006.

BRANCO, R. F. et al. Xylitol production in a bubble column bioreactor: Influence of the aeration rate and immobilized system concentration. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 2, p. 258–262, 2007.

CALDEIRA-PIRES, A. et al. Implications of removing straw from soil for bioenergy: An LCA of ethanol production using total sugarcane biomass. **Journal of Cleaner Production**, v. 181, p. 249–259, 2018.

CAMARGO, D. et al. Xylitol Bioproduction in Hemicellulosic Hydrolysate Obtained from Sorghum Forage Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 8, p. 3628–3642, 2015.

CANILHA, L. et al. Batch xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate using *Candida guilliermondii* in a stirred tank reactor. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1811–4, 2003.

CANILHA, L. et al. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1–8, p. 84–92, 2010.

CARDOSO, T. F. et al. A vertical integration simplified model for straw recovery as feedstock in sugarcane biorefineries. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 216–223, 2015.

CARVALHO, D. M. DE et al. Assessment of chemical transformations in eucalyptus, sugarcane bagasse and straw during hydrothermal, dilute acid, and alkaline pretreatments. **Industrial Crops and Products**, v. 73, p. 118–126, 2015.

CATELLAN, G. **Fundamentos de físico-química**. 1. ed. Rio de Janeiro: LTC- Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2008.

CERRI, C. C. et al. Effect of sugarcane harvesting systems on soil carbon stocks in Brazil: An examination of existing data. **European Journal of Soil Science**, v. 62, n. 1, p. 23–28, 2011.

CHANDEL, A. K. et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1947–1950, 2007.

CHASSAGNE, D. et al. Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 39–44, 2005.

CHENG, J. et al. Fermentative hydrogen and methane cogeneration from cassava residues: Effect of pretreatment on structural characterization and fermentation performance. **Bioresource Technology**, v. 179, p. 407–413, 2015.

CHERIFI, H.; BENTAHAR, F.; HANINI, S. Biosorption of phenol by dried biomass. **Desalination and Water Treatment**, v. 52, n. 7–9, p. 1699–1704, 2014.

CHO, D. H. et al. Detoxification of model phenolic compounds in lignocellulosic hydrolysates with peroxidase for butanol production from *Clostridium beijerinckii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 83, n. 6, p. 1035–1043, 2009.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar**. Safra 2018/19. Terceiro levantamento. Brasília. 2018. 71p.

CORTEZ, D. V.; ROBERTO, I. C. Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1858–1865, 2010.

CUEVAS, M. et al. Furfural removal from liquid effluents by adsorption onto commercial activated carbon in a batch heterogeneous reactor. **Ecological Engineering**, v. 68, p. 241–250, 2014.

DASGUPTA, D. et al. Challenges and prospects of xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. **Microbiological Research**, v. 197, p. 9–21, 2017.

DE ALBUQUERQUE, T. L. et al. Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. **Catalysis Today**, v. 255, p. 33-40, 2015.

DE ÁVILA RODRIGUES, F.; GUIRARDELLO, R. Evaluation of a sugarcane bagasse acid hydrolysis technology. **Chemical Engineering and Technology**, v. 31, n. 6, p. 883–892, 2008.

DEL RÍO, J. C. et al. Differences in the chemical structure of the lignins from sugarcane bagasse and straw. **Biomass and Bioenergy**, v. 81, p. 322–338, 2015.

DELGADO, J. A. et al. Modeling of the separation of lactic acid from an aqueous mixture by adsorption on polyvinylpyridine resin and desorption with methanol. **Separation and Purification Technology**, v. 200, p. 307–317, 2018.

ERRASQUÍN, E. L.; VÁZQUEZ, C. Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. **Chemosphere**, v. 50, n. 1, p. 137–143, 2003.

ERYASAR, K.; KARASU-YALCIN, S. Evaluation of some lignocellulosic byproducts of food industry for microbial xylitol production by *Candida tropicalis*. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, 2016.

FELIPE, M. G. A. et al. Effect of acetic-acid on xylose fermentation to xylitol *by Candida guilliermondii.* **Journal of Basic Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 171–177, 1995.

FELIPE, M. G. A. et al. Environmental parameters affecting xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 18, p. 251-254, 1997.

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

FERRAZ, A. et al. Estimating the chemical composition of biodegraded pine and eucalyptus wood by DRIFT spectroscopy and multivariate analysis. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 3, p. 201-212, 2000.

FERREIRA-LEITÃO, V. et al. An approach to the utilisation of CO2 as impregnating agent in steam pretreatment of sugar cane bagasse and leaves for ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, n. 1, p. 7, 2010.

FESEL, P. H.; ZUCCARO, A. β-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. **Fungal Genetics and Biology**, v. 90, p. 53–60, 2016.

FOMINA, M.; GADD, G. M. Biosorption: Current perspectives on concept, definition and application. **Bioresource Technology**, v. 160, p. 3–14, 2014.

FONSECA, B. G. et al. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast**. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 199–207, 2011.

FONSECA, B. G. et al. Biotreatment optimization of rice straw hydrolyzates for ethanolic fermentation with *Scheffersomyces stipitis*. **Biomass and Bioenergy**, v. 112, p. 19–28, 2018.

FRITSCHE, W.; HOFRICHTER, M. Aerobic Degradation of Recalcitrant Organic Compounds by Microorganisms. **Environmental Biotechnology Concepts and Application**, p. 203–227, 2005.

GADD, G. M. Biosorption: Critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology,** v. 84, n. 1, p. 13–28, 2009.

GIANNATTASIO, S. et al. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 1–7, 2013.

GIENTKA, I. et al. The exopolysaccharides biosynthesis by *Candida* yeast depends on carbon sources. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 31-37, 2016.

GRANSTRÖM, T. B.; IZUMORI, K.; LEISOLA, M. A rare sugar xylitol. Part I: The biochemistry and biosynthesis of xylitol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74, n. 2, p. 277–281, 2007.

GREETHAM, D.; HART, A. J.; TUCKER, G. A. Presence of low concentrations of acetic acid improves yeast tolerance to hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural. **Biomass and Bioenergy,** v. 85, p. 53–60, 2016.

GUO, C. et al. Screening and characterization of yeasts for xylitol production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 5, p. 1096–1104, 2006.

GUPTA, R. et al. Study of charcoal detoxification of acid hydrolysate from corncob and its fermentation to xylitol. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 5, p. 4573-4582, 2017.

GURPILHARES, D. B. et al. The behavior of key enzymes of xylose metabolism on the xylitol production by *Candida guilliermondii* grown in hemicellulosic hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 87–93, 2009.

HADI, B. et al. Kinetics and Equilibrium of Cadmium Biosorption by Yeast Cells *S. cerevisiae* and *K. fragilis*. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 1, n. 1, p. 1-18, 2003.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzime and Microbial Technology**, v. 16, n. 11, p. 933-943, 1994.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Metabolic engineering for pentose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 147–177, 2007.

HAMDAOUI, O.; NAFFRECHOUX, E. Modeling of adsorption isotherms of phenol and chlorophenols onto granular activated carbon. Part I. Two-parameter models and equations allowing determination of thermodynamic parameters. **Journal of Hazardous Materials,** v. 147, n. 1–2, p. 381–394, 2007.

HAROUN, B. M. et al. Impact of furfural on biohydrogen production from glucose and xylose in continuous-flow systems. **Renewable Energy**, v. 93, p. 302–311, 2016.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, A. F. **Aproveitamento da fração hemicelulósica da palha de cana-de-açúcar como matéria-prima na produção biotecnológica de xilitol: Estudo da atuação de co-substratos e permeabilizante de membrana celular**. 2015. 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 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.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804–807, 2007.

HOLBAN, A. M.; GRUMEZESCU, A. M. **Handbook of Food Bioengineering.** Elsevier Inc., 2017.

HONFI, K. et al. Copper (II) and Phenol Adsorption by Cell Surface Treated *Candida tropicalis* Cells in Aqueous Suspension. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 227, n. 2, 2016.

HOPKE, A. et al. Dynamic Fungal Cell Wall Architecture in Stress Adaptation and Immune Evasion. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 284–295, 2018.

HORVÁTH, I. S. et al. Effects of furfural on the respiratory metabolism of Saccharomyces cerevisiae in glucose-limited chemostats. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 7, p. 4076–86, 2003.

HOU-RUI, Z. Key drivers influencing the large scale production of xylitol. Chapter 12. In: SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. (Ed). **D-Xylitol. Fermentative production, application and commercialization.** Berlin. Springer-Verlag, 2012, p. 267-290.

HSU, T. C. et al. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4907–4913, 2010.

HU, B. et al. Pyrolysis mechanism of glucose and mannose: The formation of 5-hydroxymethyl furfural and furfural. **Journal of Energy Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 486–501, 2018.

HU, T. L. Removal of reactive dyes from aqueous solution by different bacterial genera. **Water science and technology**, v. 34, n. 10, p. 89-95, 1996.

HUA, C. et al. Adsorption of phenol from aqueous solutions using activated carbon prepared from crofton weed. **Desalination and Water Treatment**, v. 37, n. 1–3, p. 230–237, 2012.

IRMAK, S. et al. Xylitol production from lignocellulosics: Are corn biomass residues good candidates? **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 220–223, 2017.

JIMÉNEZ-MORENO, N.; ANCÍN-AZPILICUETA, C. Sorption of volatile phenols by yeast cell walls. **International Journal of Wine Research**, v. 1, n. 1, p. 11–18, 2009.

KAPTEYN, J. C.; VAN DEN ENDE, H.; KLIS, F. M. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects,** v. 1426, n. 2, p. 373–383, 1999.

KARIMI, M.; HASSANSHAHIAN, M. Isolation and characterization of phenol degrading yeasts from wastewater in the coking plant of Zarand, Kerman. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 18–24, 2015.

KIATKITTIPONG, W.; WONGSUCHOTO, P.; PAVASANT, P. Life cycle assessment of bagasse waste management options. **Waste Management**, v. 29, n. 5, p. 1628–1633, 2009.

KIELISZEK, M. et al. Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. **Fungal Biology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 185–198, 2017.

KILIC, M.; APAYDIN-VAROL, E.; PÜTÜN, E. Adsorptive removal of phenol from aqueous solutions on activated carbon prepared from tobacco residues: Equilibrium, kinetics and thermodynamics. **Journal of Hazardous Materials**, v. 189, p. 397–403, 2011.

KIM, T. Y.; LEE, J. W.; CHO, S. Y. Application of residual brewery yeast for adsorption removal of Reactive Orange 16 from aqueous solution. **Advanced Powder Technology**, v. 26, n. 1, p. 267–274, 2015.

KLINKE, H. et al. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 6, p. 738-747, 2003.

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. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 1, p. 10–26, 2004.

KLIS, F. M.; BOORSMA, A.; DE GROOT, P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast,** v. 23, n. 3, p. 185–202, 2006.

KNOSHAUG, E. P.; et al. Utilization and transport of l-arabinose by non-*Saccharomyces* yeasts. **Cellulose**, v. 16, n. 4, p. 729-741, 2009.

KRUG, M.; STRAUBE, G. Degradation of phenolic compounds by the yeast *Candida tropicalis*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 271–281, 1986.

KUMAR, P. et al. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713–3729, 2009.

KUNDIYANA, D. K. et al. Effect of furfural addition on xylose utilization by *Kluyveromyces marxianus* IMB4 under anaerobic and microaerobic conditions. **Biological Engineering Transactions**, v. 2, n. 1, p. 3-15, 2009.

KURTZMAN, C.; SUZUKI, M. Meyerozyma guilliermondii (Wickerham). In: KURTZMAN, C.; FELL, J. W; BOEKHOUT, T. (Eds). **The Yeasts: a taxonomic study**. 5th Ed. Amsterdam: Elsevier B. V, 2011. p. 622-624.

LEAL, M. R. L. V. et al. Sugarcane straw availability, quality, recovery and energy use: A literature review. **Biomass and Bioenergy**, v. 53, p. 11–19, 2013.

LIMA, L. H. A. et al. Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 734–738, 2004.

LIN, R. et al. Inhibitory effects of furan derivatives and phenolic compounds on dark hydrogen fermentation. **Bioresource Technology**, v. 196, p. 250–255, 2015.

LIPKE, P. N.; OVALLE, R. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 15, p. 3735–3740, 1998.

LIU, C. Z.; CHENG, X. Y. Improved hydrogen production via thermophilic fermentation of corn stover by microwave-assisted acid pretreatment. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 35, n. 17, p. 8945–8952, 2010.

LIU, Y. Chemically reduced excess sludge production in the activated sludge process. **Chemosphere**, v. 50, n. 1, p. 1-7, 2003.

LIU, Z. et al. Effects of furan derivatives on biohydrogen fermentation from wet steam-exploded cornstalk and its microbial community. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 152–159, 2015.

LIU, Z. F. et al. Effects of monorhamnolipid and Tween 80 on the degradation of phenol by *Candida tropicalis*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 805–809, 2010.

LIU, Z. L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, n. 3, p. 809–825, 2011.

LOH, Y. R. et al. Review Sugarcane bagasse - The future composite material: A literature review. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 75, p. 14–22, 2013.

LOMBA, L.; et al. Thermophysical properties of furfural compounds. **Journal of Chemical & Engineering Data,** v. 59, n. 2, p. 329-338, 2014.

LÓPEZ, M. J. et al. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, n. 1, p. 125–131, 2004.

LÓPEZ-LINARES, J. C. et al. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 247, p. 736–743, 2018.

LUO, Y. et al. Effect of yeast cell morphology, cell wall physical structure and chemical composition on patulin adsorption. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–16, 2015.

MANSFIELD, S. D.; MOONEY, C.; SADDLER, J. N. Substrate and enzymatic characteristics that limit cellulose hydrolysis. **Biotechnology Progress**, v. 15, p. 804–816, 1999.

MARCELINO, P. R. F. et al. Industrial Crops & Products Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. **Industrial Crops & Products**, v. 129, p. 212–223, 2019.

MARTÍNEZ, E. A. et al. Downstream process for xylitol produced from fermented hydrolysate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1193–1198, 2007.

MARTÍNEZ, M. L.; SÁNCHEZ, S.; BRAVO, V. Production of xylitol and ethanol by *Hansenula polymorpha* from hydrolysates of sunflower stalks with phosphoric acid. **Industrial Crops and Products**, v. 40, n. 1, p. 160–166, 2012.

MARTON, J. M. et al. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 9–21, 2006.

MATEO, S.; et al. Optimization of acid hydrolysis of olive tree pruning residue. Fermentation with *Candida guilliermondii*. **Biomass and Bioenergy**, v. 69, p. 39-46, 2014.

MATHIALAGAN, T.; VIRARAGHAVAN, T. Biosorption of pentachlorophenol from aqueous solutions by a fungal biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 549–558, 2009.

MIRA, N. P. et al. Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for tolerance to acetic acid. **Microbial Cell Factories**, v. 9, n. 1, p. 79, 2010.

MIYAMOTO, T. et al. Comparative analysis of lignin chemical structures of sugarcane bagasse pretreated by alkaline, hydrothermal, and dilute sulfuric acid methods. **Industrial Crops and Products**, v. 121, p. 124–131, 2018.

MONLAU, F. et al. Do furanic and phenolic compounds of lignocellulosic and algae biomass hydrolyzate inhibit anaerobic mixed cultures? A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 5, p. 934–951, 2014.

MONTEIRO, S. N. et al. Sugarcane bagasse waste in composites for multilayered armor. **European Polymer Journal**, v. 78, p. 173–185, 2016.

MOUTTA, R. O. et al. Statistical Optimization of Sugarcane Leaves Hydrolysis into Simple Sugars by Dilute Sulfuric Acid Catalyzed Process. **Sugar Tech**, v. 14, n. 1, p. 53–60, 2012.

MOYO, M. et al. Removal of Phenol from Aqueous Solution by Adsorption on Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **Ijrras**, v. 11, n. 3, p. 486–494, 2012.

MUSHTAQ, M. et al. *Eriobotrya japonica* seed biocomposite efficiency for copper adsorption: Isotherms, kinetics, thermodynamic and desorption studies. **Journal of Environmental Management,** v. 176, p. 21–33, jul. 2016.

MUSSATTO, S. I. **Application of xylitol on food formulations and benefits for health**. In: SILVA, S.S.; CHANDEL, A. K. (Ed). D-Xylitol. Fermentative production, application and commercialization. Berlin. Springer-Verlag, 2012. Cap. 14, p. 309-324.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: A review. **Bioresource Technology**, v. 93, n. 1, p. 1–10, 2004.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 23, n. 20, p. 1681–1684, 2001.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 401–413, 2002.

MUTER, O.; PATMALNIEKS, A.; RAPOPORT, A. Interrelations of the yeast *Candida utilis* and Cr (VI): metal reduction and its distribution in the cell and medium. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 963–970, 2001.

NAVARRO-ARIAS, M. J. et al. Disruption of protein mannosylation affects *Candida guilliermondii* cell wall, immune sensing, and virulence. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

NGUYEN, N. et al. Assessing nanofiltration and reverse osmosis for the detoxification of lignocellulosic hydrolysates. **Journal of Membrane Science**, v. 487, p. 40–50, 2015.

NUANPENG, S. et al. Ethanol production from sweet sorghum by *Saccharomyces cerevisiae* DBKKUY-53 immobilized on alginate-loofah matrices. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, p. 1–11, 2018.

O'DONNELL, K.; KEARSLEY, M. W. **Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology**. 1st Edition. Blackwell Publishing Ltd, 2012.

OKAWA, Y.; OIKAWA, S.; SUZUKI, S. Structural changes of cell wall mannans of *Candida guilliermondii* IFO 10279 strain cells cultured at high temperature. **Biological & pharmaceutical bulletin,** v. 29, n. 2, p. 388–91, 2006.

OLIVEIRA, F. M. V. et al. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 168–173, 2013.

PAIDIMUDDALA, B.; RATHOD, A.; GUMMADI, S. N. Inhibition of *Debaryomyces nepalensis* xylose reductase by lignocellulose derived by-products. **Biochemical Engineering Journal**, v. 121, p. 73–82, 2017.

PAPON, N. et al. *Candida guilliermondii*: Biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. **Current Genetics**, v. 59, n. 3, p. 73–90, 2013.

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

PARK, D.; YUN, Y. S.; PARK, J. M. The past, present, and future trends of biosorption. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 1, p. 86–102, 2010.

PEREIRA, F. B. et al. Identification of candidate genes for yeast engineering to improve bioethanol production in Very-High-Gravity and lignocellulosic biomass industrial fermentations. **Biotechnology for biofuels**, v. 4, n. 1, p. 57, 2011.

PIOTROWSKA, M.; MASEK, A. *Saccharomyces cerevisiae* cell wall components as tools for ochratoxin A decontamination. **Toxins**, v. 7, n. 4, p. 1151–1162, 2015.

PIPPO, W. A. et al. Energy recovery from sugarcane-trash in the light of 2nd generation biofuels. Part 1: Current situation and environmental aspects. **Waste and Biomass Valorization**, v. 2, n. 1, p. 1–16, 2011.

PIPPO, W. A. et al. Sugarcane energy use: The Cuban case. **Energy Policy**, v. 36, n. 6, p. 2163–2181, 2008.

PULIGUNDLA, P.; OH, S.-E.; MOK, C. Microwave-assisted pretreatment technologies for the conversion of lignocellulosic biomass to sugars and ethanol: a review. **Carbon letters**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2016.

RAGNAR, M.; LINDGREN, C. T.; NILVEBRANT, N. O. pKa-values of guaiacyl and syringyl phenols related to lignin. **Journal of Wood Chemistry and Technology**, v. 20, n. 3, p. 277-305, 2000.

RAN, H. et al. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2014.

RAO, L. V. et al. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 299–310, 2016.

RAPOPORT, A. et al. Anhydrobiosis: Inside yeast cells. **Biotechnology Advances**, v. 37, p. 51–67, 2018.

RASHID, A. et al. Fungal biomass composite with bentonite efficiency for nickel and zinc adsorption: A mechanistic study. **Ecological Engineering**, v. 91, p. 459–471, 2016.

RAVELLA, S. R. et al. **Overview on commercial production of xylitol, economic analysis and market trends**. In: SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. (Ed). D-Xylitol. Fermentative production, application and commercialization. Berlin. Springer-Verlag, 2012. Cap 12, p. 267-290.

ROBERTO, I. C.; DE MANCILHA, I. M.; SATO, S. Influence of kLa on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. **Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 6, p. 505–508, 1999.

ROCHA, G. J. DE M. et al. Influence of mixed sugarcane bagasse samples evaluated by elemental and physical-chemical composition. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 52–58, 2015.

RODRIGUES, R. C. L. B. et al. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1231–1237, 2003.

RODRIGUES, R. C. L. B. et al. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**, v. 101, n. 4, p. 1247–1253, 2010.

RODRIGUES, R. C. L. B. et al. The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 3, p. 299–311, 2001.

RODRIGUES, R. C. L. B.; et al. Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate at controlled pH values. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 26, n. 2, p. 103-107, 2003.

RODRIGUES, R. C. L. B. et al. Enhanced xylitol production by precultivation of *Candida guilliermondii* cells in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Current Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 53-59, 2006.

RUBIN, E. M. Genomics of cellulosic biofuels. **Nature**, v. 454, n. 7206, p. 841–845, 2008.

SAMPAIO, F. C. et al. Xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii* UFV-170. Effect of the specific oxygen uptake rate. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 6, p. 1641–1650, 2004.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 5, p. 315–318, 1988.

SANTOS, J. C.; MARTON, J. M.; FELIPE, M. G. Continuous system of combined columns of ion exchange resins and activated charcoal as a new approach for the removal of toxics from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 42, p. 16494-16501, 2014.

SANTOS, V. T. O. et al. Role of hemicellulose removal during dilute acid pretreatment on the cellulose accessibility and enzymatic hydrolysis of compositionally diverse sugarcane hybrids. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 722–730, 2018.

SENTHILKUMAAR, S.; KALAAMANI, P.; SUBBURAAM, C. V. Liquid phase adsorption of Crystal violet onto activated carbons derived from male flowers of coconut tree. **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, p. 800–808, 2006.

SILVA, A. H.; MIRANDA, E. A. Adsorption/Desorption of Organic Acids onto Different Adsorbents for Their Recovery from Fermentation Broths. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 58, n. 6, p. 1454–1463, 2013.

SILVA, A. S. A. et al. Milling pretreatment of sugarcane bagasse and straw for enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7402–7409, 2010.

SILVA, D. D. V. et al. Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 248–254, 2004.

SILVA-FERNANDES, T. et al. Biodegradable alternative for removing toxic compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysates for valorization in biorefineries. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 384–392, 2017.

SUN, J. X. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 2, p. 195–204, 2004.

SZCZERBOWSKI, D. et al. Sugarcane biomass for biorefineries: Comparative composition of carbohydrate and non-carbohydrate components of bagasse and straw. **Carbohydrate Polymers**, v. 114, p. 95–101, 2014.

TIZAZU, B. Z.; MOHOLKAR, V. S. Kinetic and thermodynamic analysis of dilute acid hydrolysis of sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 250, p. 197–203, 2018.

TONG, B. et al. Thermodynamic investigation of several natural polyols (I): Heat capacities and thermodynamic properties of xylitol. **Thermochimica Acta**, v. 457, n. 1–2, p. 20–26, 2007.

UNREAN, P.; KETSUB, N. Industrial Crops & Products Integrated lignocellulosic bioprocess for co-production of ethanol and xylitol from sugarcane bagasse. **Industrial Crops & Products**, v. 123, p. 238–246, 2018.

VALLEJOS, M. E. et al. Strategies of detoxification and fermentation for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. **Industrial Crops and Products**, v. 91, p. 161–169, 2016.

VASSEROT, Y.; CAILLET, S.; MAUJEAN, A. Study of anthocyanin adsorption by yeast lees. Effect of some physicochemical parameters. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 48, n. 4, p. 433-437, 1997.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. Springer Science & Business Media, 2007.

VILLARREAL, M. L. M. et al. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 1, p. 17–24, 2006.

WANG, J. et al. Biodegradation of phenol and 4-chlorophenol by *Candida tropicalis* W1. **Procedia Environmental Sciences,** v. 16, p. 299–303, 2012.

WANG, S.; HE, Z.; YUAN, Q. Xylose enhances furfural tolerance in *Candida tropicalis* by improving NADH recycle. **Chemical Engineering Science**, v. 158, n. 15, p. 37–40, 2017.

WANG, X. et al. Inhibitory effects of phenolic compounds of rice straw formed by saccharification during ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, v. 244, p. 1059–1067, 2017.

WANNAWILAI, S. et al. Furfural and glucose can enhance conversion of xylose to xylitol by *Candida magnoliae* TISTR 5663. **Journal of Biotechnology**, v. 241, p. 147–157, 2017.

WEN, X. et al. Exceptional hexose-fermenting ability of the xylitol-producing yeast *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 121, n. 6, p. 631–637, 2016.

WICKRAMASINGHE, S. R.; GRZENIA, D. L. Adsorptive membranes and resins for acetic acid removal from biomass hydrolysates. **Desalination**, v. 234, n. 1–3, p. 144–151, 2008.

Wiedenfeld, B. Effects of green harvesting vs burning on soil properties, growth and yield of sugarcane in South Texas. **Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists**, v. 29, p. 102-109, 2009.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering,** v. 86, n. 1, p. 1–14, 1998.

YU, Y. et al. Onsite bio-detoxification of steam-exploded corn stover for cellulosic ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 8, p. 5123–5128, 2011.

ZHANG, D. et al. Biological detoxification of furfural and 5-hydroxyl methyl furfural in hydrolysate of oil palm empty fruit bunch by *Enterobacter* sp. FDS8. **Biochemical Engineering Journal**, v. 72, p. 77–82, 2013.

ZHANG, H. et al. Adsorptive removal of acetic acid from water with metal-organic frameworks. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 111, p. 127–137, 2016.

ZHANG, J. et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, p. 1–15, 2010.