UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

HILTON TÚLIO LIMA DOS SANTOS

Avaliação da produção de xilitol a partir da palha de arroz empregando leveduras termotolerantes

Lorena - SP
2015

HILTON TÚLIO LIMA DOS SANTOS

Avaliação da produção de xilitol a partir da palha de arroz empregando leveduras termotolerantes

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Microbiologia Aplicada.
Orientadora: Profa. Dra. Inês Conceição Roberto

Edição reimpressa e corrigida

Lorena - SP
Dezembro, 2015

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

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

Santos, Hilton Túlio Lima dos
Avaliação da produção de xilitol a partir da palha de arroz empregando leveduras termotolerantes / Hilton Túlio Lima dos Santos; orientadora Inês Conceição Roberto - ed. reimp., corr. - Lorena, 2015.
129 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
Orientadora: Inês Conceição Roberto

1. Kluyveromyces marxianus. 2. Palha de arroz. 3. Desacetilação. 4. Destoxificação. 5. Xilitol. I. Título. II. Roberto, Inês Conceição, orient.

“A beleza do aprendizado é que ninguém pode roubá-lo de você”
(B.B. King)
“O pensamento cria, o desejo atrai e a fé constrói”(Lauro Trevisan)

Dedico este trabalho ao meu pai Walter José,
que por circunstâncias da vida não pôde ver a
sua conclusão, mas sempre esteve presente ao
longo dessa trajetória

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por absolutamente tudo em minha vida. Creio que Ele nunca me enviará a um lugar aonde Sua graça não alcançará.

À minha esposa Vivian, minha filha, Ana Luisa e ao meu filho Mateus, sem os quais esse trabalho não teria começado, nem prosseguido, pois foram eles que nunca me deixaram pensar em desistir nos momentos mais difíceis. Essa conquista é NOSSA.

À minha mãe Auristela, pelo apoio em todos os momentos que precisei dela e sempre se encontrava disponível. Ao meu irmão Thiago, pelos incansáveis conselhos e que nunca deixou de acreditar em mim. Ao meu pai Walter José, que no meio dessa jornada nos deixou, mas sempre torceu pelo meu êxito e sei que agora não será diferente.

À Professora Dr(a) Inês Conceição Roberto pela excelente pessoa, profissional, que se mostrou ser ao longo desses anos em que estivemos juntos. Certamente o engrandecimento que tive ao seu lado foi a maior mudança nesses últimos anos.

Aos companheiros do laboratório Rafael Castro, Bruno Guedes, Isabela Ferreira, Alana Mesquita e aos novatos Isabela Maciel e Daiana que estiveram sempre presentes me ajudando e contribuindo de alguma forma.

A todos os funcionários e corpo docente do Departamento de Biotecnologia Industrial em especial ao funcionário José Carlos (Zé Cobrinha), pelo apoio que nunca negou em prestar, meu muito obrigado.

Aos colegas do programa de Pós-graduação da EEL, muito obrigado pelo companheirismo e que Deus ilumine o caminho de todos.

A empresa de Beneficiamento de arroz Irmãos Ligabo pelo fornecimento da matéria-prima.

Ao CNPq pelo apoio financeiro desse projeto

RESUMO

SANTOS, H.T.L. **Avaliação da produção de xilitol a partir da palha de arroz empregando leveduras termotolerantes.** 2015. 129p. Tese (Doutorado em Ciências) Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o potencial de linhagens termotolerantes da espécie *Kluyveromyces marxianus* para produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Foi também objetivo deste trabalho estabelecer condições de tratamento alcalino diluído (desacetilação) previamente ao processo de hidrólise ácida da palha de arroz com vistas à obtenção de um hidrolisado com menor toxicidade. Numa primeira etapa do trabalho, foram avaliadas 4 cepas de *K.marxianus* (Y-6860, Y-6373, Y- 265 e Y-8287) quanto a produção de xilitol em meio semidefinido variando a temperatura de 30 a 40 °C. Com base nos resultados obtidos, foi selecionada a linhagem Y-6373, que apresentou os maiores valores de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$ = 0,70 g/g) e produtividade volumétrica (Q_P = 0,60 g/L.h) na temperatura de 40 °C. Esta linhagem foi então utilizada nos ensaios fermentativos a partir dos hidrolisados obtidos. Para obtenção do hidrolisado hemicelulósico, a palha de arroz foi primeiramente submetida a um tratamento alcalino, em escala de frascos Erlenmeyer, onde se avaliou o efeito da temperatura (50 - 70 °C) e da carga de NaOH (20 - 80 mg/g de biomassa) sobre a remoção de grupos acetil. De acordo com o modelo obtido, a máxima remoção de acetil (97,2 ± 3,4%) pôde ser alcançada empregando 70 °C; 80 mg de NaOH /g de palha por 45 min. Nestas condições do processo, o modelo previu remoções de lignina e de cinzas de 41,3 ± 4,3 e 62,3 ± 5,3%, respectivamente, sem perda significativa das frações açucaradas. Em maior escala (reator de 50L), o tratamento alcalino mostrou resultados de remoção de acetil próximos aos previstos pelo modelo. Com a palha desacetilada, foram então realizados ensaios de hidrólise ácida variando a concentração de H_2SO_4 (0,5 - 1,5% m/v) e tempo de residência (30 - 90 min) visando estabelecer as condições que maximizem a eficiência de hidrólise da hemicelulose (EHH). Nas condições otimizadas, (H_2SO_4 1,0% m/v e 85 minutos) foi alcançada uma EHH de 75% em frascos e de 76% em reator. Os resultados referentes à fermentabilidade do hidrolisado empregando a *K. marxinuas* Y-6373 demonstraram que independentemente da suplementação nutricional, a conversão de xilose em xilitol foi elevada ~ 0,87 g/g e superior a obtida em meio semidefinido contendo apenas xilose como fonte de carbono, porém os valores de produtividade volumétrica foram cerca de 6,5 vezes inferiores ~ 0,13 g/L.h, devido a baixa eficiência de utilização da xilose (X_C) ~ 20%, após 72 h de cultivo. A fermentabilidade dos hidrolisados foi melhorada após o procedimento de destoxificação e os resultados variaram com o método empregado. Os melhores resultados foram obtidos em hidrolisado tratado com CaO ($Y_{P/S}$= 0,74 g/g; Q_P = 0,32 g/L.h e X_C =92%). Neste trabalho, foi também demonstrado o efeito repressivo da glicose sobre a assimilação e conversão da xilose em xilitol por *K. marxianus*, uma vez que em meio semidefinido simulando as concentrações de xilose e glicose presentes no hidrolisado, os valores de X_C e $Y_{P/S}$ foram reduzidos em torno de 40%. De uma forma geral, conclui-se que a linhagem de *K. marxianus* selecionada neste estudo, apresenta grande potencial para a produção de xilitol em elevadas temperaturas, porém são ainda necessários estudos para otimizar as condições de produção de xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos.

Palavras-chave: *Kluyveromyces marxianus*. Palha de arroz. Desacetilação. Destoxificação. Xilitol.

ABSTRACT

SANTOS, H.T.L. **Evaluation of xylitol production from rice straw using thermotolerant yeast.** 2015**.** 129p. Thesis (Doctor of Science), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

In this work the potential of thermotolerant strains of *Kluyveromyces marxianus* to produce xylitol from rice straw hemicellulosic hydrolyzed was evaluated. In addition, were also established conditions of diluted alkaline treatment (deacetylation) previously to the process of rice straw acid hydrolysis, aiming to decrease the toxicity of the hydrolysate . Initially, four yeast strains of *K.marxianus* (Y-6860, Y-6373, Y-2265 e Y-8287) were evaluated regarding to the xylitol production in a semi-defined medium, varying the temperature from 30 to 40 ºC. From these results, the strain Y-6373 was selected, due to high values of xylose conversion into xylitol ($Y_{P/S}$ = 0.70 g/g) and volumetric productivity (Q_P = 0.60 g/L.h) at 40ºC. This strain was thus used in the fermentative tests employing the hemicellulosic hydrolysate obtained. The hemicellulosic hydrolysate of rice straw was prepared in two steps; firstly the rice straw was submitted to the alkaline treatment, which was carried out in Erlenmeyer flasks scale. In these experiments, the effects of temperature from 50 to 70 °C and NaOH load from 20 to 80 mg/g biomass on the removal of acetyl groups were evaluated. According to the model obtained, the maximum acetyl removal (97.2 ±3.4%) could be achieved by employing 70 ºC; 80 mg of NaOH/g of straw during 45 minutes. Under these conditions, the model predicted lignin and ashes removals of 41.3±4.3 and 62.3±5.3%, respectively, without significant loss of sugars. On a large scale (reactor of 50L), the alkaline treatment showed outcomes of acetyl removal near the ones predicted by the model. After, the deacetylating straw was submitted to acid hydrolysis process, varying the H_2SO_4 concentration from 0.5 to 1.5% w/v, and the residence time from 30 to 90 minutes, aiming to stablish the conditions that maximize the efficiency of hemicellulose hydrolysis (EHH). Under optimized conditions, (H_2SO_4 1.0% w/v and 85 minutes) 75% EHH was achieved in Erlenmeyers flasks and 76% in reactor. As regarding the hydrolysate fermentability employing *K. marxinuas* Y-6373, the results showed that, regardless of the nutritional supplementation, the conversion of xylose into xylitol was high ~ 0.87 g/g and superior in relation to the one obtained at a semidefined medium containing only xylose as a carbon source. Nevertheless, the values ofvolumetric productivity were approximately 6.5 times inferior ~ 0.13 g/L.h, due to the lowefficiency of xylose consumption (X_C) ~ 20%, after 72h of cultivation. The hydrolysate fermentability was improved after detoxification and the results varied with the method employed. The best results were obtained on hydrolysate treated with CaO ($Y_{P/S}$= 0.74 g/g; Q_P = 0.32 g/L.h and X_C = 92%). The glucose effect was further examined in semi-defined medium. The results showed that xylose assimilation and xylitol production by *K. marxianus* was repressed by glucose, since in a semi-defined media simulating the concentrations of xylose/glucose found in the hydrolyzed, the values of X_C e $Y_{P/S}$ were reduced in approximately 40%. Based on the results, was concluded that the strain of *K. marxianus* selected on this study, presents a great potential to produce xylitol at elevated temperatures. However, studies are still necessary to optimize the conditions of this bioconversion from the hemicellulosic hydrolysate.

Keywords: *Kluyveromyces marxianus.* Rice straw. Deacetylation. Detoxification. Xylitol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Representação esquemática dos principais constituintes lignocelulósicos da biomassa vegetal. 19

Figura 2.2. Cadeia de celulose formada por unidade de glicose através de ligação glicosídica β(1→4) (A) e ligação de hidrogênio (pontilhado) inter e intramolecular presentes na celulose (B) 20

Figura 2.3. Arranjo de fibrilas, microfibrilas e celulose na parede celular dos vegetais..... 21

Figura 2.4. Estrutura parcial da molécula de galactomanana. 22

Figura 2.5. Estrutura primária do polímero D-xiloglicana 22

Figura 2.6. Estrutura parcial da molécula de glucuronoxilana. 23

Figura 2.7. Estrutura parcial da molécula de arabinoglucuronoxilana acetilada com resíduos de arabinose e ácido glucorônico na cadeia lateral 24

Figura 2.8. Estrutura parcial da molécula de arabinoxilana com resíduos de arabinose na cadeia lateral 24

Figura 2.9. Estrutura geral dos principais monolignóis presentes em gramíneas: (1) álcool p-cumaril; (2) álcool coniferil; (3) álcool sinpail 25

Figura 2.10. Compostos aromáticos produzidos a partir dos monoglicóis p-cumaril, álcool coniferil e álcool sinapil, respectivamente..... 26

Figura 2.11. Complexo lignina/fenólico/carboidrato presente em palha de trigo..... 27

Figura 2.12. Distribuição das fontes de energia no cenário mundial 29

Figura 2.13. Plataforma química com os 12 grupos de moléculas biológicas selecionadas a partir de biomassa lignocelulósica sob o conceito de biorrefinaria. 31

Figura 2.14. Potenciais rotas de uma biorrefinaria para materiais lignocelulósicos..... 32

Figura 2.15. Potencial químico da conversão da celulose. (DMTHF: 2,5 – dimetiltetrahidrofurano, DMF: 2,5-dimetilfuranos, EMF: 5-etóximetil-2-furfural, HMF: Hidroximetil furano, MF: metil furano, EL: Etil levulínico)..... 334

Figura 2.16. Potenciais usos da fração hemicelulósica de materiais lignocelulósicos..... 364

Figura 2.17. Estrutura da molécula do xilitol com seus respectivos centros estereogênicos e suas configurações espaciais. (R,S)..... 376

Figura 2.18. Solvatação do íon cálcio por moléculas de água e moléculas e xilitol, estabilizando sua perda..... 4137

Figura 2.19. Resumo das vias metabolicas da D-Glicose e D-Xilose em leveduras 431

Figura 2.20. Metabolismo de diferentes carboidratos em micro-organismos 463

Figura 2.21. Mecanismos utilizados pelas leveduras para neutralizar os efeitos dos compostos inibidores.....46

Figura 4.1: Fluxograma das etapas realizadas neste trabalho.....53

Figura 4.2. Reator de aço inoxidável de 50 litros capacidade, provido de aquecimento por resistência elétrica e agitação por rotação sobre o próprio eixo. (1) boca de carga; (2) válvula de descarga; (3) manômetro; (4) termopar; (5) controle de temperatura; (6) sistema de agitação. 56

Figura 5.1. Consumo de xilose por linhagens de *K. marxianus* em diferentes temperaturas, após 48 h de cultivo em meio semidefinido 67

Figura 5.2. Crescimento das linhagens de *K. marxianus* em diferentes temperaturas, após 48 h de cultivo em meio semidefinido 68

Figura 5.3. Produção de xilitol por linhagens de *K. marxianus* em diferentes temperaturas, após 48 h de cultivo em meio semidefinido 69

Figura 5.4. Superfície de resposta descrita pelo modelo $\hat{Y}_1$ que representa o valor estimado da remoção de acetil em função da temperatura e carga de NaOH. 77

Figura 5.5. Eficiência de hidrólise da hemicelulose (A) e formação dos sub-produtos: ácido acético (B), furanos (C) e ácidos hidroxicinâmicos (D) nos hidrolisados obtidos a partir da palha de arroz *in natura* e desacetilada, em função da severidade combinada. 84

Figura 5.6. Superfície de resposta descrita pelo modelo $\hat{Y}_2$ que representa o valor estimado da eficiência da hidrólise da hemicelulose em função do tempo e concentração ácida.....90

Figura 5.7. Perfil fermentativo de *K. marxianus* Y- 6373 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz na ausência (A) e presença (B) de suplementação nutricional e em meio semidefinido (C). 93

Figura 5.8. Consumo de xilose e glicose (A); produção de xilitol e etanol (B), biomassa (C) e ácido acético (D) durante o cultivo de *K. marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz sem tratamento (▬) e após destoxificação: CaO (▬); Biológico (▬) e Carvão ativado (▬).....101

Figura 5.9. Consumo de xilose e glicose (A); produção de xilitol e etanol (B), biomassa (C) e ácido acético (D) durante o cultivo de *K. marxianus* Y-6373 em meio semidefinido contendo 50 g/L de xilose adicionado de diferentes concentrações de glicose (g/L): 0 (▬); 6 (▬); 12 (▬) e 18 (▬). 107

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Materiais lignocelulósicos com as porcentagens dos seus principais constituintes estruturais 28

Tabela 2.2. Plataformas químicas "TOP 10 +4" reformulada seguindo tendências do mercado e da evolução tecnológica. 33

Tabela 4.1. Planejamento fatorial 2^2 completo, com triplicata no ponto central, para avaliação do efeito do tratamento alcalino na concentração de ácido acético. Tempo de reação: 45 minutos 55

Tabela 4.2. Planejamento fatorial composto 2^2 com face centrada e quadruplicata no ponto central para avaliar o efeito das variáveis tempo e concentração de H_2SO_4 sobre as respostas avaliadas 57

Tabela 5.1. Parâmetros fermentativos de *K. marxianus* em diferentes temperaturas, após 48 h de cultivo, em meio semidefinido contendo xilose como fonte de carbono. 730

Tabela 5.2. Composição química da palha de arroz antes e após o tratamento alcalino, sob diferentes condições operacionais. 753

Tabela 5.3. Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de Student e nível de significância para o modelo que representa a remoção de grupos acetil durante o tratamento alcalino da palha de arroz. 765

Tabela 5.4. Analise de variância (ANOVA) de regressão do modelo representativo da remoção de grupos acetil a partir da palha de arroz tratada sob diferentes condições de temperatura e carga de NaOH. 786

Tabela 5.5. Composição química, massa recuperada e remoção de cada fração da palha de arroz após tratamento em reator de 50L empregando uma relação sólido líquido de 1:10, 80 mg de NaOH/ g de palha na temperatura de 70 °C por 45 min. 798

Tabela 5.6. Composição química do licor alcalino obtido durante o tratamento da palha de arroz em reator nas seguintes condições (relação sólido líquido de 1:10, 80 mg de NaOH/ g de palha, temperatura de 70 °C e tempo de residência de 45 min). 819

Tabela 5.7. Composição química dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos sob as diferentes condições de operação do processo 871

Tabela 5.8. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste *t* de *Student* para a resposta

eficiência de hidrólise da hemicelulose, durante a hidrólise ácida da palha de arroz desacetilada.....887

Tabela 5.9. Análise de variância (ANOVA) dos efeitos para a resposta eficiência de hidrólise da hemicelulose, durante a hidrólise ácida da palha de arroz desacetilada. 898

Tabela 5.10. Análise de regressão múltipla para a resposta eficiência de hidrólise da hemicelulose, durante a hidrólise ácida da palha de arroz desacetilada. 918

Tabela 5.11. Analise de variância (ANOVA) de regressão do modelo representativo da remoção de grupos acetil a partir da palha de arroz tratada sob diferentes condições de temperatura e carga de NaOH.....969

Tabela 5.12. Composição química do hidrolisado hemicelulósico da palha de arroz desacetilada sob as condições ótimas de hidrólise ácida, nas formas diluída (original) e concentrada.....991

Tabela 5.13. Parâmetros fermentativos obtidos durante o cultivo de *K. marxianus* Y–6373 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com e sem suplementação nutricional e em meio semidefinido. 96

Tabela 5.14. Composição química dos hidrolisados hemicelulósicos utilizados como meio de fermentação, após os tratamentos de destoxificação.....99

Tabela 5.15. Parâmetros fermentativos de *K. marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com e sem destoxificação, após 120 h e em meio semidefinido, após 48 h 104

Tabela 5.16. Comparação dos parâmetros fermentativos de *K. marxianus* Y-6373 em diferentes meios de cultivo, após 48 h.....108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HMF: 5-hidroximetilfurfural

ADH: Álcool desidrogenase

AF: Ácido Ferúlico

AIPC: Agência Internacional de Pesquisa em Câncer

ALDH: Aldeído desidrogenase

ANOVA: Análise de Variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APC: Ácido *p*-cumárico

ATP: Adenosina trifosfatada

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

DMF: 2,5 dimetilfurano

DMTHT: 2,5 dimetiltetrahidrofurano

EHH: Eficiência de hidrólise de hemicelulose

EL: Etil levulínico

EMF: 5 etóximetil-2-furfural

EMP: *Embden Meyerhof Parnas*

ERO: Espécie reativa de oxigênio

FDA: Food and Drugs Administration

FNOR: Ferridoxina oxidoredutase

GK: Glicose quinase

GL: Graus de liberdade

GRAS: *General Recognized As Safe*

HDCA: Hidrolisado destoxificado com carvão ativado

HHPT: Hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz tratada

HND: Hidrolisado não destoxificado

HPLC: High performance liquide chromatography

IEA: Agência Internacional de Energia

*Km*XDH: Xilitol desidrogenase expressa em *Kluyveromyces marxianus*

*Km*XR : Xilose redutase expressa em *Kluyveromyces marxianus*

LD_{50}: Dose letal que causa a morte em 50% de indivíduos de uma população

MF : Metil furano

MSD: Meio semidefinido

NAD^+ Nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada

NADH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

$NADP^+$: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada oxidada

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada reduzida

NREL: The National Renewable Energy Laboratory

OMS : Organização Mundial da Saúde

PDC: Piruvato descarboxilase

PDH: Piruvato desidrogenase

PFL: Piruvato formato liase

PFOR: Piruvatoferridoxina oxidoredutase

PNNL: Pacific Northwest National Laboratory

PNT: Palha de arroz não tratada

QM : Quadrado médio

Q_P : Produtividade volumétrica

Q_S Taxa de consumo de substrato

SC: Severidade combinada

SQ: Soma dos quadrados

SR: Sólido recuperado

TAL: Transaldolase

TKL: Transcetolase

USDA: United States Department of Agriculture

Xc: Porcentagem de xilose consumida

XDH: Xilitol-desidrogenase

XI: Xilitol invertase

XR: Xilose-redutase

$Y_{P/S}$: Fator de conversão de substrato em produto

$Y_{X/S}$: Fator de conversão de substrato em células

$Y_{P/X}$: Fator indicativo de fluxo do metabolismo de carbono

η : Eficiência do processo de bioconversão

p : Nível de significância

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 19
2.1. Biomassa Lignocelulósica 19
2.2. Biorrefinarias 28
2.3. Xilitol 36
2.3.1. Química do Xilitol 36
2.3.2. Aplicações do Xilitol 38
2.3.3. Aspectos Metabólicos da Produção Biotecnológica de Xilitol 40
2.3.4. Produção de Xilitol em Hidrolisados Hemicelulósicos: Principais Desafios 44
2.3.5. Principais Métodos de Destoxificação de Hidrolisados Hemicelulósicos 47
2.4. Produção de xilitol empregando *Kluyveromyces marxianus* 49
3.OBJETIVOS 52
3.1. Objetivo geral 52
3.2. Objetivos específicos 52
4. MATERIAIS E MÉTODOS 53
4.1. Processamento da Matéria Prima 54
4.1.1. Obtenção e preparo palha de arroz 54
4.1.2. Avaliação das condições de tratamento alcalino da palha de arroz sobre a remoção dos grupos acetis 54
4.1.3. Avaliação das condições de hidrólise ácida da palha de arroz desacetilada na recuperação da fração hemicelulósica 56
4.2. Tratamento de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico 58
4.2.1. Alteração do pH com óxido de Cálcio (CaO) 58
4.2.2. Carvão ativado 58
4.2.3. *Saccharomyces cerevisiae* 58
4.3. Ensaios Fermentativos 59
4.3.1. Seleção de uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* em meio semidefinido para produção de xilitol 59

4.3.2. Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado sobre a produção de xilitol 60

4.3.3. Avaliação da produção de xilitol em hidrolisado destoxificado 60

4.3.4. Efeito da presença de glicose no meio fermentativo sobre a produção de xilitol 61

4.4. MÉTODOS ANALÍTICOS 61

4.4.1 Determinação do teor de umidade na palha de arroz 61

4.4.2. Determinação dos teores de celulose, hemicelulose, lignina, grupo acetil e cinzas na palha de arroz.....62

4.4.3. Determinação da concentração de glicose, xilose, arabinose, xilitol, etanol e ácido acético.....64

4.4.4. Determinação dos teores de furanos e fenólicos 64

4.4.5. Determinação da concentração celular da levedura *Kluyveromyces marxianus*.....64

4.4.6. Determinação dos parâmetros fermentativos de produção de xilitol 65

4.4.7. Determinação do fator de severidade combinada 65

4.5. Análises estatísticas.....65

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 66

5.1. Seleção de uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* para a produção de xilitol 66

5.2. Avaliação das condições de tratamento alcalino da palha de arroz sobre a remoção dos grupos acetil.....72

5.3. Avaliação das condições de hidrólise ácida da palha de arroz desacetilada na recuperação da fração hemicelulósica.....80

5.4. Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico obtido a partir da palha de arroz desacetilada sobre a produção de xilitol.....90

5.5. Avaliação de diferentes métodos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico obtido a partir da palha de arroz desacetilada sobre a produção de xilitol.....98

5.5.1. Composição dos hidrolisados após os tratamentos de destoxificação 98

5.5.2. Avaliação da fermentabilidade dos hidrolisados destoxificados.....100

5.6. Efeito da presença de glicose no meio de fermentação sobre a produção de xilitol por *K. marxianus* Y-6373 105

6.CONCLUSÕES.....116

REFERÊNCIAS.....118

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país culturalmente agrícola, o que faz com que este setor seja desenvolvido economicamente, sendo competitivo em âmbito internacional. Como consequência são geradas grandes quantidades de subprodutos agrícolas como bagaço de cana-de- açúcar, palha de arroz, sabugo de milho e tantos outros que possuem baixo valor comercial, o que torna atrativo seu uso na obtenção de produtos mais nobres. Esses subprodutos por serem de natureza lignocelulósica, ou seja, basicamente constituídos por celulose, hemicelulose e lignina precisam ser despolimerizados por processos químicos e/ou enzimáticos para que os açúcares existentes nesses materiais possam ser utilizados em bioprocessos. É sabido que, durante o processo de hidrólise química são gerados compostos considerados tóxicos aos micro-organismos como, por exemplo, produtos de degradação dos açúcares (furfural e hidroximetilfurfural), produtos de degradação da lignina (compostos aromáticos) e outros diversos compostos orgânicos (ácido acético e terpenos) que podem comprometer a eficiência do bioprocesso. Cada tipo de composto pode atuar de forma diferente na estrutura celular, sendo a concentração mínima inibitória de cada composto dependente do tipo de micro-organismo e das condições do processo. O ácido acético, por exemplo, que é considerado, em geral, como um potente inibidor do metabolismo microbiano, atua comprometendo a produção de energia das células o que diminui sua eficiência metabólica. Sendo assim, tratamentos prévios da biomassa visando diminuir a geração desses compostos, assim como procedimentos de destoxificação dos hidrolisados obtidos, são estratégias úteis para melhorar a eficiência e a produtividade das bioconversões.

Em processos biotecnológicos, as frações açucaradas dos materiais lignocelulósicos podem ser utilizadas como substrato para obtenção de diversos produtos com alto valor de mercado fazendo com que estas frações, juntamente com a lignina, sejam integralmente aproveitadas. Dentre os diversos produtos que podem ser obtidos a partir destes materiais, o xilitol se destaca por apresentar aplicações em diversos setores industriais, além de servir de base para obtenção de derivados através de reações químicas. O xilitol é um composto que pode ser chamado de açúcar-álcool, em função da sua estrutura química e por apresentar característica organoléptica doce. Apresenta propriedades anticariogênicas, além de poder ser indicado na alimentação de diabéticos e auxiliar no tratamento contra osteoporose. Sua produção comercial iniciou-se na Finlândia onde foi obtido através da redução catalítica da xilose na presença de catalisadores a altas temperaturas, sendo

atualmente a principal via de obtenção deste produto. Apesar de uma rota bem estabelecida, o processo químico de conversão de xilose em xilitol apresenta baixos rendimentos (em torno de 50%), e emprega condições drásticas de temperatura e pressão (135 °C, 40 atm). Em função dessas desvantagens, uma alternativa de obtenção do xilitol é através do processo biotecnológico utilizando micro-organismos, uma vez que essas reações são realizadas sob condições brandas e não há necessidade do uso de catalisadores inorgânicos.

Muitos micro-organismos são capazes de utilizar xilose como fonte de carbono para a produção de xilitol, sendo as leveduras, especialmente as do gênero *Candida* o modelo biológico mais estudado. Apesar dos bons resultados obtidos com *Candida sp*, leveduras deste gênero não apresentam características de termotolerância, o que tem sido apontado como um aspecto importante a ser considerado do ponto de vista industrial, uma vez que em altas temperaturas o índice de contaminação do processo é menor, além de não precisar utilizar operações para resfriamento do processo. Além disso, as leveduras produtoras de xilitol pertencentes a este gênero não apresentam status GRAS (Generally Recognized As Safe) pelo FDA (Food and Drugs Administration), o que é uma classificação interessante para obtenção de produtos com aplicação nas indústrias de alimentos e farmacêutica. Dentro deste contexto, estudos recentes têm sido focados para a seleção de leveduras termotolerantes (naturais ou geneticamente modificadas), especialmente espécies de *Kluyveromyces marxianus*, as quais exibem clasificação GRAS, ou seja, não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade à saúde humana.

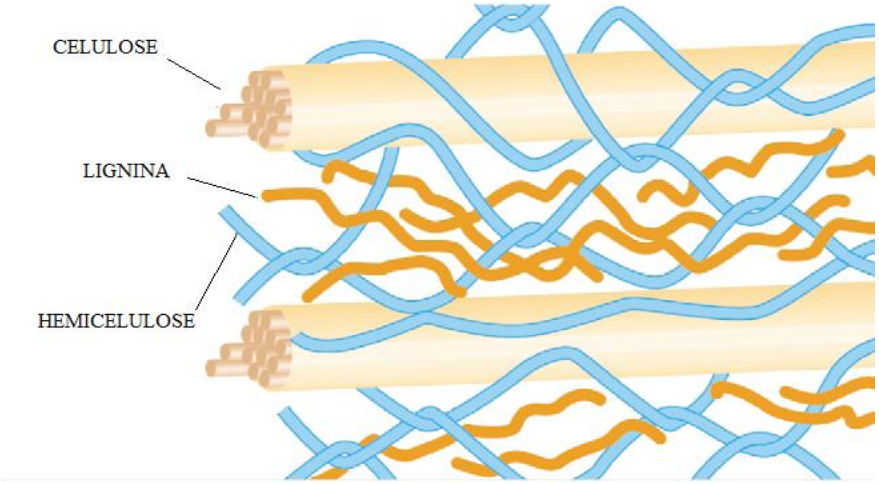
O presente trabalho teve como principal objetivo avaliar o potencial de linhagens termotolerantes da espécie *Kluyveromyces marxianus* para produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Foi também objetivo deste trabalho estabelecer condições de tratamento alcalino diluído (desacetilação) previamente ao processo de hidrólise ácida da palha de arroz com vistas à obtenção de um hidrolisado com menor toxicidade. Cabe ressaltar que essa estratégia de desacetilação da palha de arroz, juntamente com a utilização de uma levedura termotolerante classificada como GRAS para obtenção de xilitol, faz com que esse trabalho apresente caráter inovador, contribuindo com informações relevantes sobre esta bioconversão utilizando hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Biomassa Lignocelulósica

Muitos processos agroindustriais geram subprodutos lignocelulósicos ao longo da sua cadeia produtiva que quando não recebem um tratamento adequado acabam contribuindo para o aumento do impacto ambiental. Esses materiais lignocelulósicos são constituídos principalmente por três componentes: celulose, hemicelulose e lignina (DRAPCHO; NHUAN; WALKER, 2008) os quais estão organizados no material vegetal de forma a constituir uma rede. A representação dos principais constituintes lignocelulósicos da biomassa vegetal está na Figura 2.1.

Figura 2.1. Representação esquemática dos principais constituintes lignocelulósicos da biomassa vegetal.

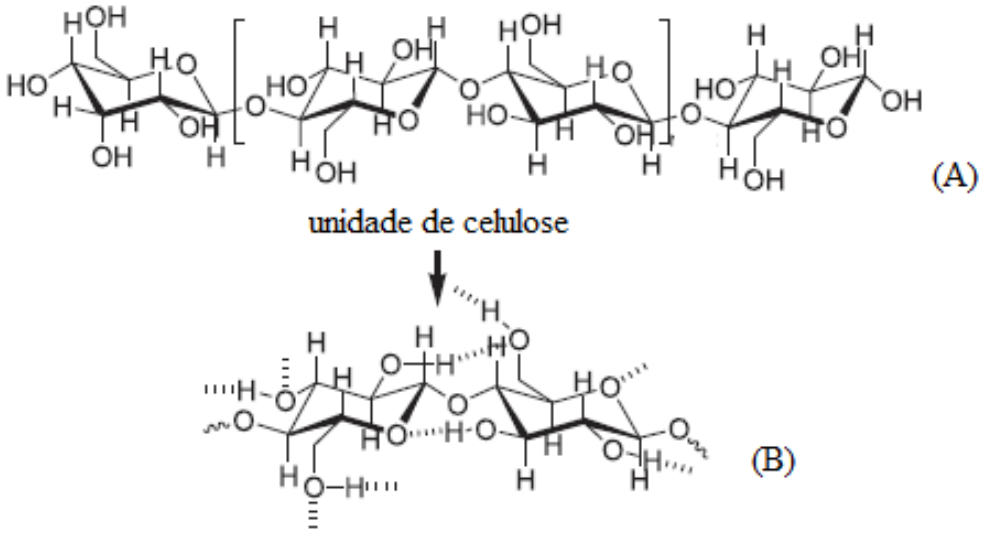


Fonte: Adaptado de Boudet et al. (2003)

A celulose é o polímero de açúcar mais abundante da Terra e está presente em cerca de 50% da composição biomassa vegetal (FENGEL; WEGENER, 1989). Segundo HON (2011) a celulose é constituída por um homopolímero linear formado por unidades de D-glicose, ligados entre si por ligações glicosídicas do tipo β(1→4). Devido a elevada quantidade de unidades de glicose em cada cadeia (~15000), a celulose é um dos polissacarídeos mais longos já conhecidos. De acordo com Zhang e Lynd (2004) os resíduos alternados de glicose possuem um giro de 180°, o que juntamente com as ligações

de hidrogênio intra e intermolecular conferem elevada cristalinidade a estrutura celulósica. Na Figura 2.2 está apresentada a cadeia de glicose formando unidades de celulose através de ligação glicosídica β(1→4).

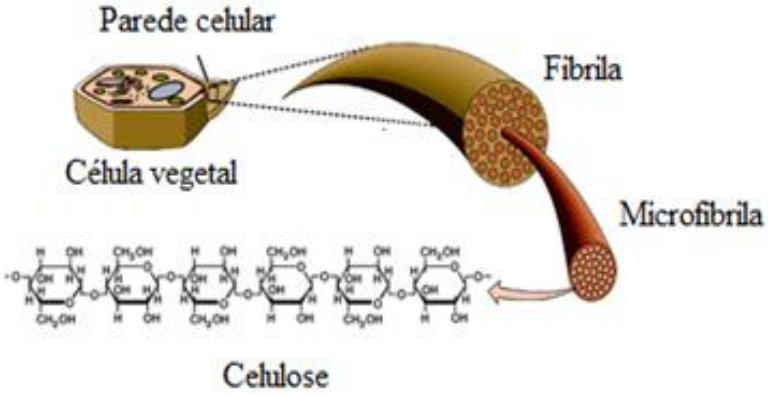
Figura 2.2. Cadeia de celulose formada por unidade de glicose através de ligação glicosídica β(1→4) (A) e ligação de hidrogênio (pontilhado) inter e intramolecular presentes na celulose (B**)**



Fonte: Adaptado de Dutta e Pal (2014)

De acordo com Habibi; Lucia e Rojas (2010) e Fengel e Wegener, (1989), a celulose está presente nos vegetais na forma de conjuntos de fibras. A hierarquia morfológica é definida por fibrilas elementares que quando se unem formam unidades maiores chamadas de microfibrilas, as quais se agrupam dando origem às fibras de celulose, como apresentado na Figura 2.3.

Figura 2.3. Arranjo de fibrilas, microfibrilas e celulose na parede celular dos vegetais.



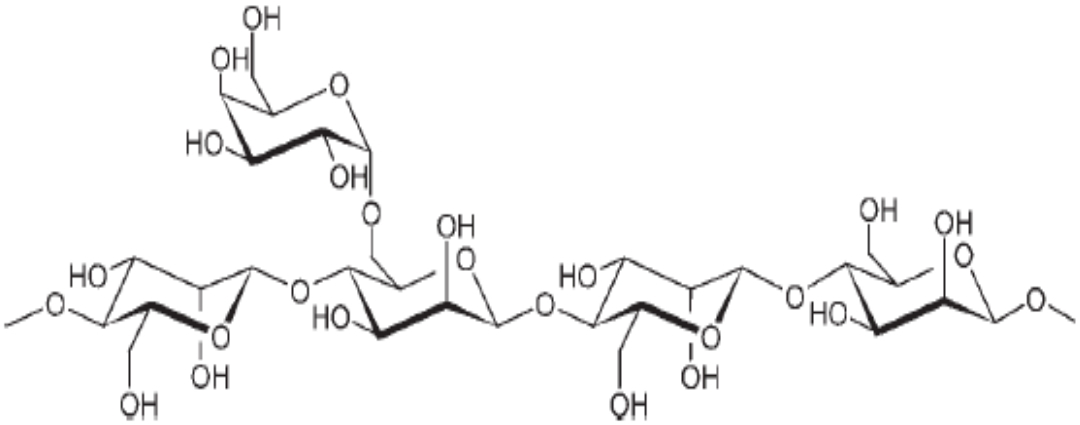
Fonte: Adaptado de MHHE (2015)

A hemicelulose é depois da celulose, o biopolímero mais abundante na natureza, e corresponde de 15 a 35% da composição biomassa vegetal (JIANG et al., 2014). Esta fração é formada por um heteropolímero amorfo, ramificado cuja composição pode variar de acordo com a natureza do vegetal (GÍRIO et al., 2010). A hemicelulose geralmente é dividida em três grupos principais: (i)mananas, (ii) xiloglucanas e (iii) xilanas

As mananas estão presentes, por exemplo, em madeiras duras. Este polímero consiste de um esqueleto de manose ou glicose ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo β (1→4), com resíduo de galactose substituída na posição 6 desses açúcares (galactoglucomanana , Figura 2.4). Em alguns grupos vegetais a manana pode ser conter grupos acetil na posição C2 e C3, sendo classificado como O-acetil-galactoglucomanana (GÍRIO et al., 2010)

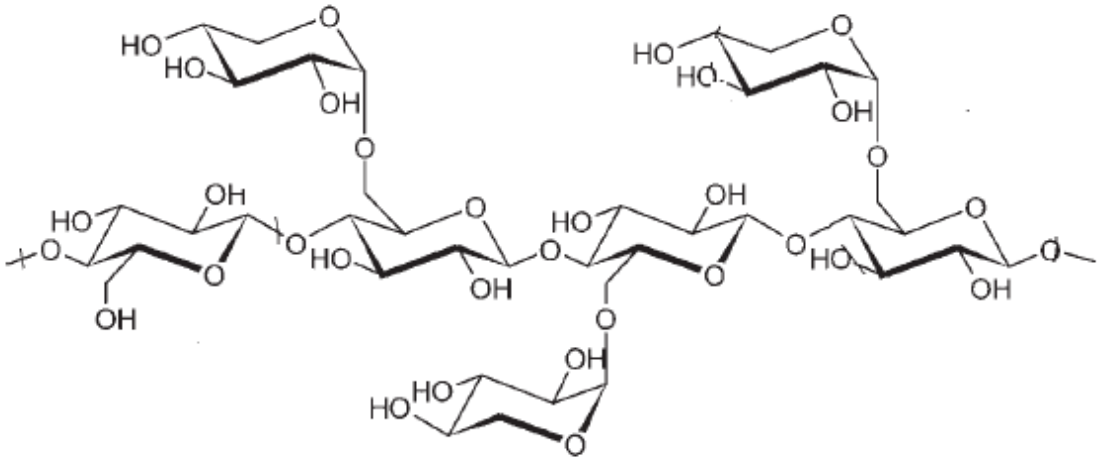
As xiloglicanas, conforme ilustrado na Figura 2.5, estão presentes em dicotiledôneas (Ex: feijão, amendoim). Este polímero é constituído por uma cadeia principal de glicose ligado entre si através de ligação glicosídicas do tipo β (1→4), com resíduos de α-D-xilose ligados ao carbono 6 dos monômeros da cadeia principal. Os resíduos de xilose presentes nesse polímero estão ligados à cadeia principal em blocos, classificados como [X-X-X-G], ou seja, para cada unidade de glicose “G” não substituída, as três unidades seguintes estão ligadas à xilose “X” (EBRINGEROVÁ, 2006)

Figura 2.4. Estrutura parcial da molécula de galactomanana**.**



Fonte: Adaptado de Ebringerová (2006)

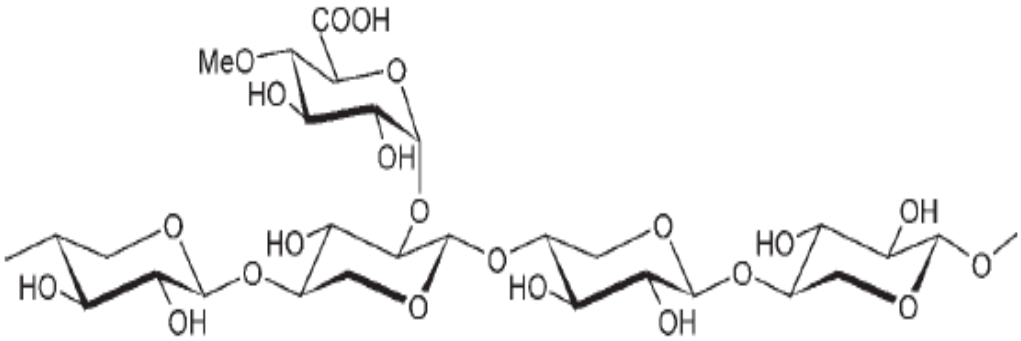
Figura 2.5. Estrutura primária do polímero D-xiloglicana.



Fonte: Adaptado de Ebringerová (2006)

As xilanas são grupos que apresentam diversos subgrupos como as glucuronoxilanas, arabinoxilanas, arabinoglucuronoxilanas (EBRINGEROVÁ, 2006). As glucuronoxilanas (4-O-metilglucuronoxilana), como apresentada na Figura 2.6, estão presentes na parede secundária de dicotiledôneas e em madeiras duras (GÍRIO et al., 2010). Segundo Ebringerová (2006), as glucuronoxilanas são polímeros constituídos de resíduos de α-D-xilose ligados entre si através de ligações glicosídicas do tipo β (1→4) e com resíduos de ácido glucurônico a cada dez resíduos de xilose por ligações glicosídicas do tipo α(1→2), podendo ainda ser acetilada nos carbonos 2 ou 3 do resíduo dessa pentose (EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000; GÍRIO et al., 2010)

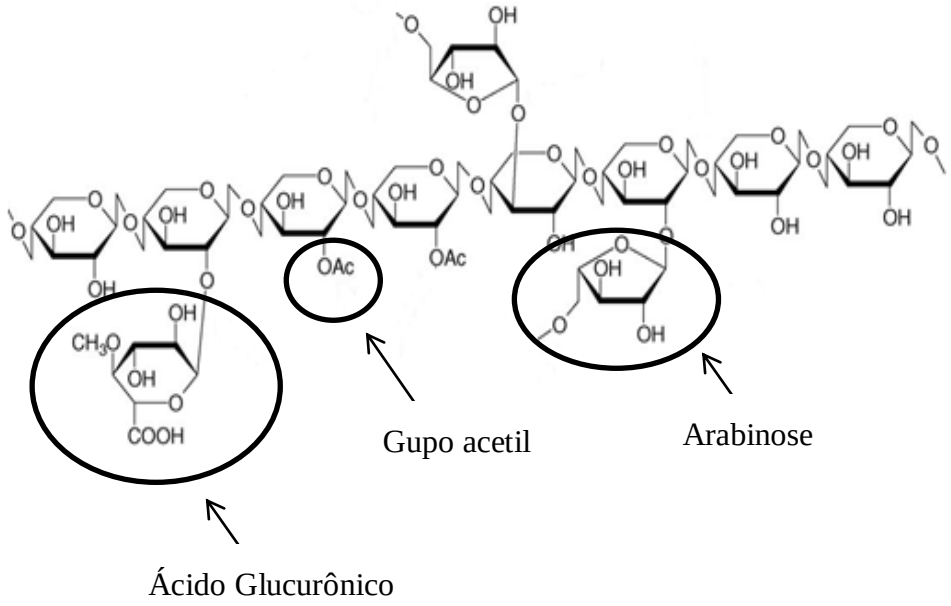
Figura 2.6. Estrutura parcial da molécula de glucuronoxilana**.**



Fonte: Adaptado de Ebringerová (2006)

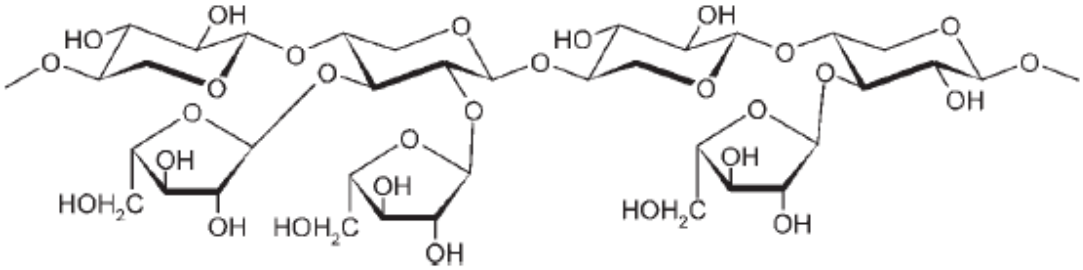
A hemicelulose do tipo arabinoglucuronoxilana ou arabinoxilana, conforme estruturas mostradas nas Figuras 2.7 e 2.8, respectivamente, estão presentes na parede celular de diversos cereais e gramíneas, grupo este que inclui a palha de arroz (GÍRIO et al., 2010) Estes polímeros possuem em comum o esqueleto principal constituído por xilose, com resíduos de arabinose ligados lateralmente a cadeia, por ligações glicosídicas do tipo α (1→3) e α(1→2), respectivamente. Além disso, ambas as estruturas possuem resíduos de grupos acetil ligados aos carbonos 2 e 3. No entanto, a arabinoglucuronoxilana também apresenta em sua cadeia grupos de ácido glucorônico, através de ligações glicosídicas do tipo α(1→2) (PENG et al., 2012; EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000; GÍRIO et al., 2010)

Figura 2.7. Estrutura parcial da molécula de arabinoglucuronoxilana acetilada com resíduos de arabinose e ácido glucorônico na cadeia lateral.



Fonte: Adaptado de Chávez, Bull e Eyzaguirre (2006)

Figura 2.8. Estrutura parcial da molécula de arabinoxilana com resíduos de arabinose na cadeia lateral



Fonte: Adaptado de Ebringerová (2006)

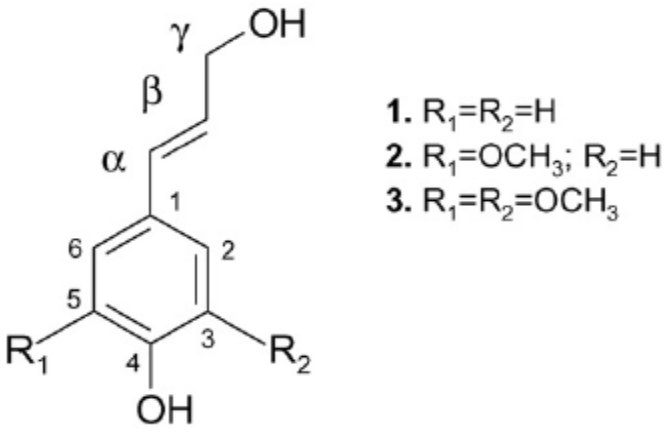
Um aspecto importante das arabinoxilanas e arabinoglucuronoxilanas é a presença de ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico e ácido *p*-cumárico), os quais estão esterificados em O-5 do resíduo de arabinose. Tal ocorrência desses ácidos não é observada em outras variedades de hemicelulose (EBRINGEROVÁ; HEINZE, 2000)

Em função da sua ramificação, a hemicelulose apresenta propriedades físicas diferentes da celulose, e, portanto pode ser removida mais facilmente da matriz lignocelulósica e de maneira seletiva (EBRINGEROVÁ , 2006)

A lignina é o terceiro maior polímero natural da biomassa vegetal (BURANOV; MAZZA, 2002). Este polímero é uma macromolécula de conformação amorfa constituída de unidades fenólicas e seus derivados tendo como precursores três álcoois aromáticos (monolignóis): álcool p-cumaril, álcool coniferil e álcool sinapil. Estes álcoois originam respectivamente os compostos p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S), como demonstrado na Figura 2.9 e Figura 2.10, respetivamente (FENGEL; WEGENER, 1989; LEWIS; YAMAMOTO, 1990). Durante a biossíntese da lignina, existe o acoplamento desses três grupos criando um único polímero, porém com estruturas diferentes para cada espécie de vegetal. Geralmente em madeiras, a lignina é formada por unidades de guaiacil e siringil, enquanto em gramíneas a lignina é constituída das três unidades (H, G, S) em diferentes proporções(LAPIERRE; ROLANDO; POLLET, 1995).

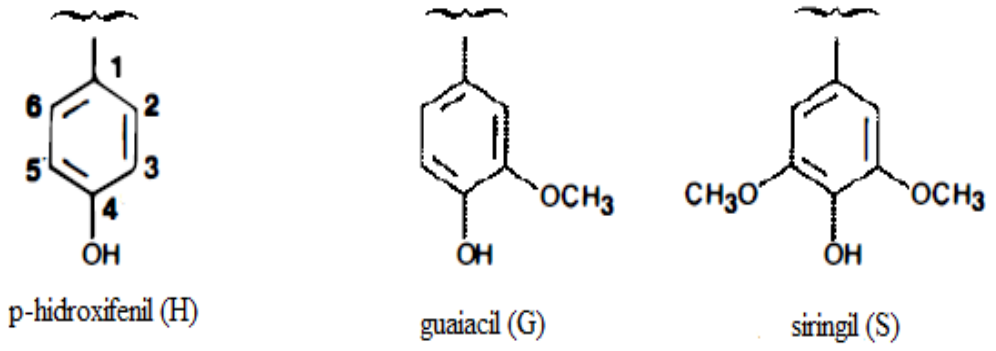
De acordo com Billa, Koukios e Monties (1998), na palha de arroz as unidades de monolignol H, G e S estão presentes nas proporções de 15, 45 e 40%, respectivamente e, por isso são chamadas de lignina p-hidroxifenil-guaiacil-siringil.

Figura 2.9. Estrutura geral dos principais monolignóis presentes em gramíneas: (1) álcool p-cumaril; (2) álcool coniferil; (3) álcool sinpail



Fonte: Adaptado de Buranov e Mazza, 2002

Figura 2.10. Compostos aromáticos produzidos a partir dos monoglicóis p-cumaril, álcool coniferil e álcool sinapil, respectivamente.



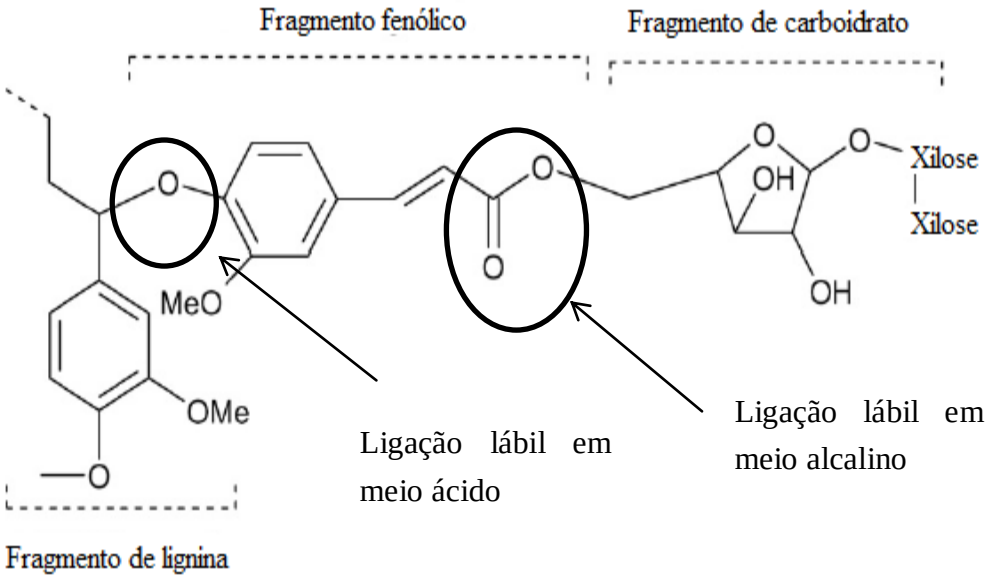
Fonte: Adaptado de Lewis e Yamamoto (1990)

Outro aspecto importante da lignina de gramíneas é a sua ligação com a hemicelulose através dos ácidos hidroxicinâmicos, especialmente ácido ferúlico (ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico - AF) e o ácido *p*-cumárico (ácido 4-hidroxicinâmico - APC) (SUN et al.,2002). Esses ácidos desempenham um papel importante na estrutura do vegetal, especificamente na integridade da parede celular, uma vez que estes impedem o ataque de patógenos (FAULDS; WILLIAMSON, 1999; WENDE; FRY, 1997; EBRINGEROVÁ, 2006).

O conteúdo dos ácidos hidroxicinâmicos, assim como sua composição é dependente da morfologia, localização e o estágio de diferenciação do vegetal (SUN et al.,2002). Segundo Faulds e Williamson (1999). Ferúlico é o ácido mais abundante dentro do grupo dos ácidos hidroxicinâmicos (que contém também os caféico, sináptico, p-cumárico). Como algumas dessas moléculas são bifuncionais (ácido carboxílico ou fenol), suas ligações na estrutura do vegetal podem ser do tipo éster ou éter. As ligações do tipo éster normalmente ocorrem no O-5 do resíduo de arabinose (arabinoxilana) ou 4-O do resíduo de xilose (xiloglicana), enquanto que a ligação éter ocorre entre o carbono α do monoglicol da lignina com o C-4 do anel benzênico do ácido hidroxicinâmicos (geralmente ácido ferúlico), formando um complexo lignina/fenólico/carboidrato, (SUN et al.,2002). Ainda segundo o autor Sun et al. (2002), o ácido ferúlico funciona como ponte de ligação entre a lignina e a porção de carboidrato, permitindo a incorporação desse material com as frações

polissacarídeas e servindo de sítios de iniciação da lignificação da parede celular durante o crescimento do vegetal. Já o ácido p-cumárico permanece apenas com ligação éster após a lignificação. A Figura 2.11 exemplifica o complexo lignina/fenol/carboidrato presente na palha de trigo.

Figura 2.11. Complexo lignina/fenólico/carboidrato presente em palha de trigo



Fonte: Adaptado de Sun et al. (2002)

De acordo com Harvey e Hartley (1986) as ligações éster e éter em palha de trigo ocorrem ao longo do esqueleto polissacarídeo sendo o ácido p-cumárico esterificado a cada 31 resíduos de arabinose, enquanto o ácido ferúlico é esterificado a cada 15 resíduos da mesma pentose. Além dos compostos como os ácidos hidroxicinâmicos, que possuem aplicações industriais como antioxidantes (TORRE et al., 2008), a lignina, apesar de baixo valor de mercado, tem potencial para servir como matéria-prima para obtenção de vanilina, ácido ferúlico, vinil guaiacol e lignanas (dímeros de monolignóis) opticamente ativas, tendo alto valor de mercado (FAULDS E WILLIAMSON, 1999).

A celulose, hemicelulose e lignina não apresentam as mesmas proporções dentro dos materiais lignocelulósicos e essas diferenças são inerentes à natureza da biomassa. Na Tabela 2.1 sumariza alguns materiais lignocelulósicos com suas respectivas quantidades de celulose, hemicelulose e lignina.

Tabela 2.1. Materiais lignocelulósicos e suas respectivas porcentagens dos principais constituintes estruturais

Materiais lignocelulósicos*	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
Palha de Trigo	43,3	31,7	17,3	Sun et al., 2015
Bagaço de cana de açúcar	45,0	25,8	19,1	Canilha et al., 2011
Palha de arroz	43,4	22,9	17,2	Roberto, Mussatto e Rodrigues, 2003
Casca de soja	40,0	26,0	9,0	Cassales et al., 2011
Bagaço de malte	16,8	28,4	27,0	Mussatto, Dragone e Roberto, 2007
Palha de sorgo	35,9	26,0	nf	Paris; Cardoso et al., 2014

*A soma das porcentagens não resulta no material integral; (nf) não informado.

Considerando que os materiais lignocelulósicos são fontes potenciais de polímeros de açúcar e de lignina, os quais podem servir de base para produção de energia, assim como para obtenção de produtos químicos utilizados pela sociedade (MAITY, 2015), o processamento destes materiais dentro de um contexto de biorrefinarias tem sido explorado.

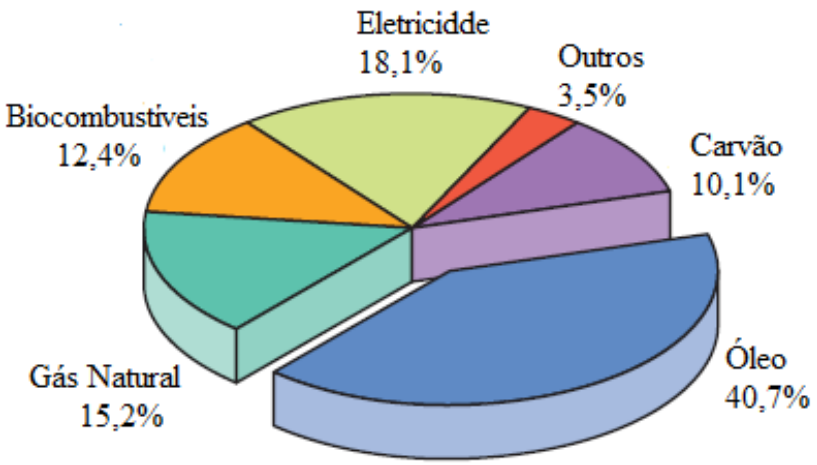
2.2. Biorrefinarias

Segundo The National Renewable Energy Laboratory (NREL) biorrefinaria é uma indústria que integra equipamentos e processos de conversão de biomassa para produção de combustíveis, energia e químicos (NREL, 2009)

Fazer uso de fontes alternativas como biomassa, para produção de energia de maneira sustentável é requisito obrigatório para conseguir manter as demandas atuais da humanidade e diminuir a emissão de gás carbônico na atmosfera (PARIS; CARDOSO, 2014; AMIDON; LIU, 2009)

De acordo com a Agência Internacional de Energia (IEA), atualmente 55,9% da energia utilizada no mundo é proveniente de combustíveis fósseis (petróleo e gás natural), como pode ser visto na Figura 2.12 (IEA, 2014).

Figura 2.12. Distribuição das fontes de energia no cenário mundial



Fonte :Adaptado de IEA (2014)

Assim como o petróleo, as biomassas têm potencialidades enormes para fornecer todas as formas úteis de energias necessárias (eletricidade, calor e combustíveis), além de produtos químicos orgânicos e polímeros (MAITY, 2015). As biomassas (para refinarias) podem ser divididas em três categorias, de acordo com a sua natureza química (ALONSO; BOND; DUMESIC, 2010).

1) *Materiais Triglicérides*: Vegetais oleaginosos como mamona e macaúba, gordura animal, óleo residual de vegetais e óleo de microalgas;
2) *Material amiláceos e sacaríneos*: Vegetais amiláceos como milho, trigo, aveia e sacaríneos como cana de açúcar, sorgo sacaríneo e beterraba sacarínea;
3) *Material lignocelulósico*: Palhas e bagaços de diferentes biomassas vegetais e gramíneas.

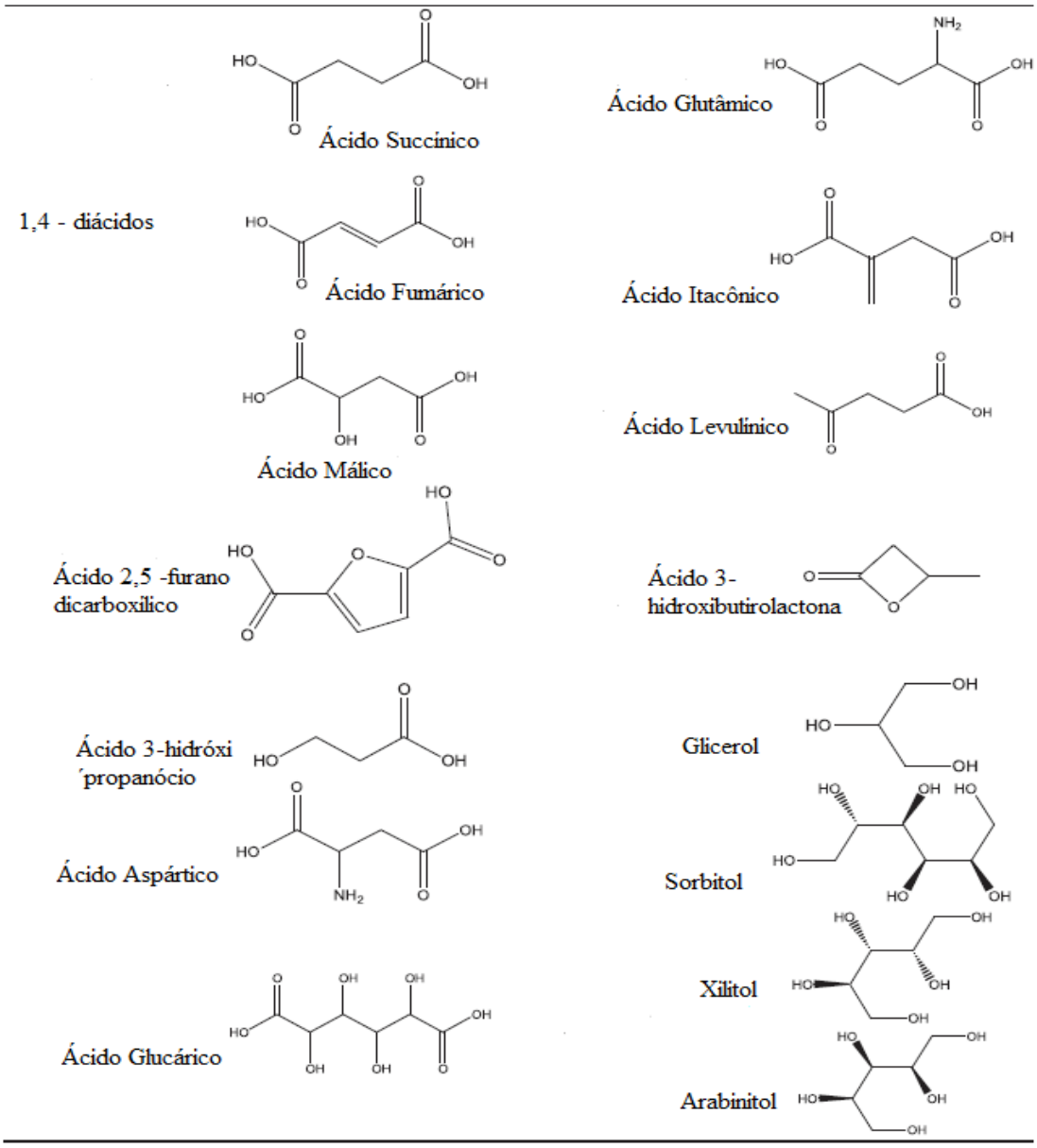
As biomassas lignocelulósicas provenientes do setor agroindustrial como bagaço de cana de açúcar, casca de trigo, palha de arroz e sabugo de milho, por não possuirem alto valor de mercado, podem ser utilizadas como matérias primas para obtenção de produtos mais valorizados comercialmente, (BAYRACKI; KOÇAR, 2014; GURAGAIN et al., 2011; VOHRA et al., 2014).

Em 2004, o Laboratório Nacional no Noroeste do Pacífico (PNNL) juntamente com NREL lançaram uma lista com mais de trezentas moléculas que podem ser produzidas a partir de biomassas seguindo os moldes da refinaria petroquímica. Dentro deste contexto, foram construídos blocos incluindo várias moléculas precursoras de polímeros, medicamentos e outros produtos de valor comercial. Em função do grande número de substâncias, a lista foi reduzida para doze compostos (plataformas), tomando como base o seu valor comercial como precursor e a complexidade química para obtenção de outros produtos (WERPY; PETERSEN, 2004). Na Figura 2.13 estão ilustrados os 12 grupos de moléculas biológicas selecionadas a partir de biomassa lignocelulósica sob o conceito de biorrefinaria.

Essas plataformas químicas obtidas a partir de biomassas lignocelulósicas sob o ponto de vista de biorrefinaria (Figura 2.14) têm alto potencial de conversão para diversos produtos químicos de base biológica de alto valor, sendo poliméricos ou não. A mudança de paradigma de plataforma química onde os precursores químicos são provenientes de hidrocarbonetos (base petroquímica) para plataformas químicas de base biológica altamente funcionalizada com oxigênio, irá gerar oportunidades para desenvolvimento tecnológico, uma vez que atualmente as indústrias não estão aptas a utilizar essas novas plataformas em seu processo industrial. O uso de produtos químicos oxigenados dessas plataformas de base biológica poderá eliminar as necessidades de processos oxidativos de capital intensivo utilizados nas indústrias petroquímicas (BOZELL; PETERSENB, 2010)

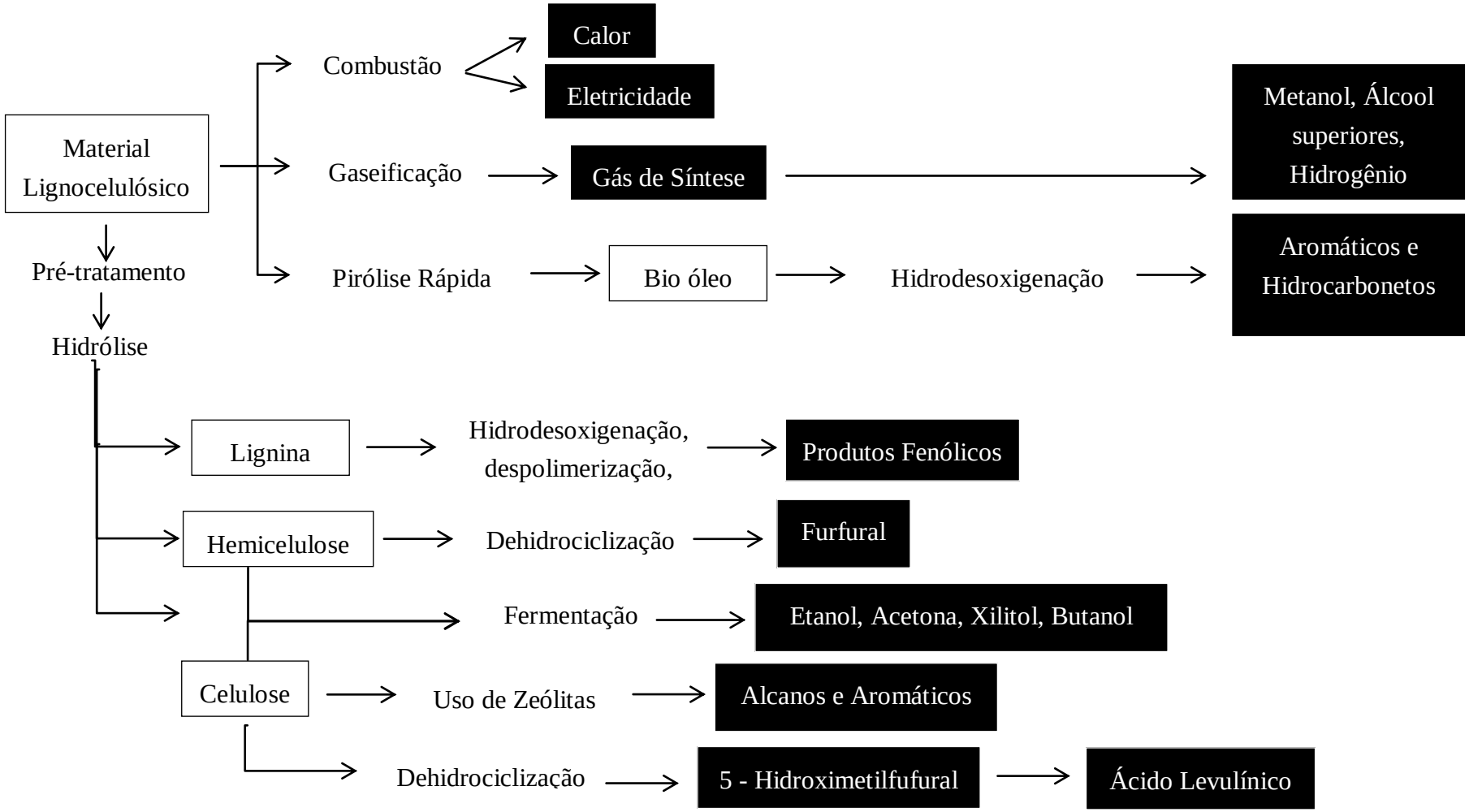
O uso dos produtos de base biológica teve uma evolução significativa desde lançamento da plataforma química, em 2004. Em função desse progresso essa lista com as 12 plataformas químicas foram alteradas para uma lista chamada "Top 10 + 4", onde novos grupos foram identificados com base em critérios similares utilizados na lista criada em 2004 (BOZELL; PETERSENB, 2010). Esses compostos estão representados na Tabela 2.2.

Figura 2.13. Plataforma química com os 12 grupos de moléculas biológicas selecionadas a partir de biomassa lignocelulósica sob o conceito de biorrefinaria.



Fonte: Adaptado de Bozell e Petersenb (2010)

Figura 2.14. Potenciais rotas de uma biorrefinaria para materiais lignocelulósicos



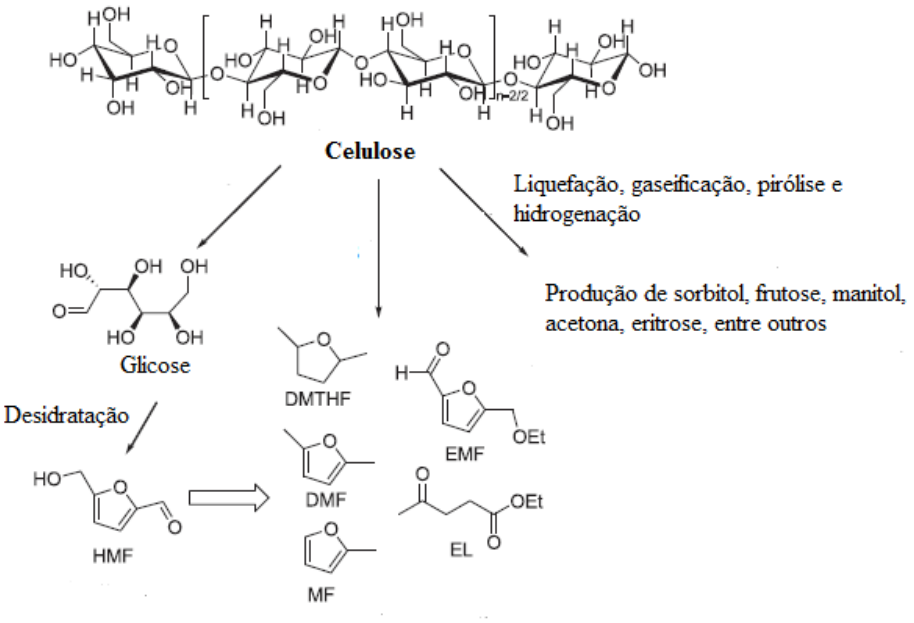
Fonte: Adaptado de Maity (2015)

Tabela 2.2. Compostos inseridos na plataforma química reformulada “TOP 10 +4” seguindo tendências do mercado e da evolução tecnológica.

Etanol	Furfural	Glicerol e Derivados	Ácido Lático
5-HMF	Ácido Furano dicarboxílico	Isopreno	Biohidrocarboneto
Ácido Levulínico	Sorbitol	Ácido Succínico	Ácido hidroxipropanóico
Xilitol	Aldeído hidroxipropanóico	-	-

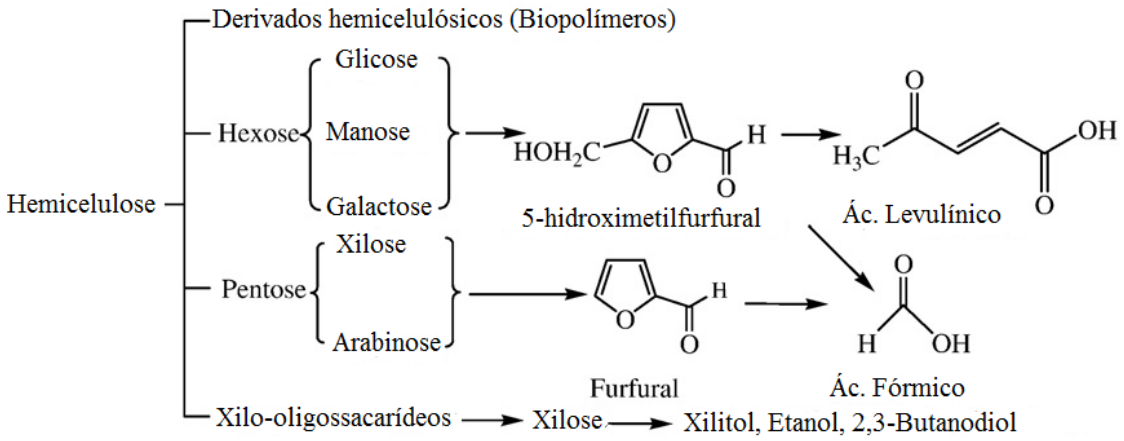
As Figuras 2.15 e 2.16 mostram exemplos de utilização das frações, celulósica e hemicelulósica, respectivamente, a partir de biomassas lignocelulósicas.

Figura 2.15. Potencial químico da conversão da celulose. (DMTHF: 2,5 – dimetiltetrahidrofurano, DMF: 2,5-dimetilfuranos, EMF: 5-etóximetil-2-furfural, HMF: Hidroximetil furano, MF: metil furano, EL: Etil levulínico)



Fonte: Adaptado de Dutta e Pal (2014)

Figura 2.16. Potenciais usos da fração hemicelulósica de materiais lignocelulósicos.



Fonte: Adaptado de Peng et al. (2012)

De acordo com a literatura, o aproveitamento racional de biomassas lignocelulósicas, além da obtenção de diversos compostos com valor comercial, contribui para minimização de resíduos e podem servir de base para a produção de combustível para transporte (ALONSO, BONDI, DUMESIC, 2010; DUTTA,PAL 2014).

No Brasil, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a estimativa de produção de grãos para o ano de 2015 é de 202,23 milhões de toneladas, sendo a cultura do arroz responsável por 6,13% deste total. Ao longo da cadeia de produção do arroz, são gerados diferentes coprodutos como a palha, casca e farelo, dentro os quais a palha de arroz tem sido amplamente estudada como matéria prima para obtenção de vários compostos tais como etanol (DIEP et al., 2015; SILVA; MUSSATTO; ROBERTO, 2010), xilitol (MAITY, 2015) e carvão ativado (OH; PARK, 2002). De acordo com Karimi, Kheradmandinia e Taherzadeh (2006) para cada quilograma do grão de arroz colhido, são gerados de 1 a 1,5 Kg de palha. Considerando os dados da CONAB de 2015, a quantidade de palha de arroz gerada em 2015 no Brasil pode ser estimada em 18 milhões toneladas.

Tendo em vista que os materiais lignocelulósicos são compostos por complexos polímeros heterogêneos de carboidratos, densamente envolvidos pela lignina, sua utilização em aplicações biotecnológicas requer uma separação seletiva destes constituintes. A primeira etapa desta separação é o chamado pré-tratamento, onde

diferentes métodos físicos, químicos e térmicos, assim como suas combinações, podem ser empregados para promover a redução da cristalinidade da celulose, elevar a área superficial da biomassa e remover a hemicelulose e/ou a lignina (BINOD et al., 2010).

Os métodos físicos geralmente são empregados como uma etapa inicial dos processos de fracionamento. Tratamentos físicos como a moagem e trituração são processos que tem por finalidade a redução do tamanho da partícula, levando a redução da cristalinidade da celulose e facilitando etapas posteriores de tratamentos químicos e enzimáticos (SUN; CHENG, 2002; BINOD et al., 2010).

Dentre os métodos físico-químicos de pré-tratamento de materiais lignocelulósicos, a explosão a vapor é o método mais estudado. Neste método, a biomassa é tratada com alta pressão de vapor saturado, e em seguida a pressão é subitamente reduzida, submetendo o material a uma descompressão explosiva, provocando reações de auto-hidrolises em que parte da hemicelulose e da lignina são transformados em oligômeros solúveis (SANCHEZ; CARDONA, 2008). A explosão com amônia e a explosão com CO_2 são outros tipos de pré-tratamento físico-químicos muito semelhantes à explosão a vapor. Na explosão com amônia os materiais lignocelulósicos são expostos à amônia líquida a alta temperatura e pressão por um determinado período de tempo, e em seguida a pressão é reduzida rapidamente. Os mesmos princípios se aplicam a explosão com CO_2, porém, neste processo ocorre à formação de ácido carbônico, o que propicia o aumento da taxa de hidrolise quando comparado com o uso de amônia (SUN; CHENG, 2002).

Segundo Taherzadeh e Karimi (2007), dentre os métodos químicos de pré-tratamento empregados para a separação da hemicelulose dos materiais lignocelulósicos, a hidrólise empregando ácido diluído, é um dos mais estudados. Os processos empregam principalmente H_2SO_4, HCl ou HNO_3 (CARDONA; QUINTERO; PAZ, 2010). De acordo com Cardona, Quintero; e Paz (2010), o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído apresenta baixo custo e boa eficiência na solubilização da hemicelulose em açúcares monoméricos, além de melhorar etapas posteriores de conversão da celulose.

Roberto e Mussatto (2003) estudaram o processo de hidrólise da palha de arroz com ácido sulfúrico diluído. Neste estudo foram avaliados os efeitos da concentração de H_2SO_4 e tempo de reação sobre a seletividade da hidrolise dos açúcares da hemicelulose (xilose e arabinose), e a formação de subprodutos de reação (furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético). A condição ótima de hidrólise encontrada proporcionou uma conversão de 77% da hemicelulose, e uma relação de 5:1 entre as concentrações de xilose e glicose. Karimi,

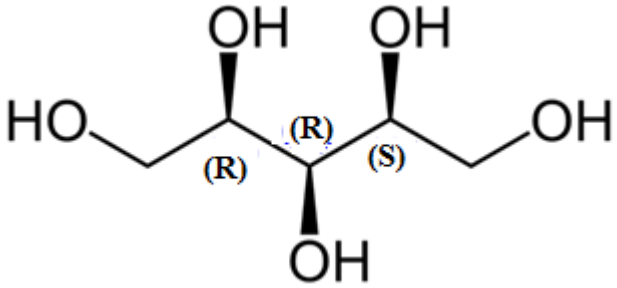
Kheradmandinia e Taherzadeh (2006) investigaram a hidrólise da palha de arroz por ácido sulfúrico diluído em um processo de dois estágios, para a separação dos açúcares presentes na hemicelulose e celulose. No primeiro estágio buscou-se o máximo rendimento dos açúcares da hemicelulose e no segundo estágio, os açúcares da celulose. Os resultados mostram que na hidrólise da primeira fase foi possível obter uma conversão de 80 % da hemicelulose, com apenas 25,8 % de conversão da celulose. Enquanto que na segunda fase, cerca de 47 % da celulose foi convertida a glicose.

2.3. XILITOL

2.3.1. Química do Xilitol

O xilitol (2R, 3R, 4S – pentano-1,2,3,4,5-pentol) é um composto orgânico constituído por carbono, hidrogênio e oxigênio. Sua fórmula molecular é $C_5H_{12}O_5$, e seu peso molecular é 152,5 g/mol. Sua estrutura é uma cadeia aberta (acíclica) com 5 grupos hidroxilas, sendo cada uma delas ligada a um átomo de carbono, como representado na Figura 2.17. O xilitol pertence à classe do alditóis, que são poliálcoois (polióis) de cadeia aberta que possuem grupos hidroxilas provenientes de reações de redução de grupos aldeído e/ou cetona. O alditol é uma classe especial dos álcoois (SOLOMONS, FRYHLE, 2006). A estrutura do xilitol foi avaliada por Angyl, Greeves e Mills (1974) que verificaram através de estudos espectroscópicos que a molécula do xilitol apresenta uma conformação espacial em zig-zag, semelhante aos hidrocarbonetos acíclicos.

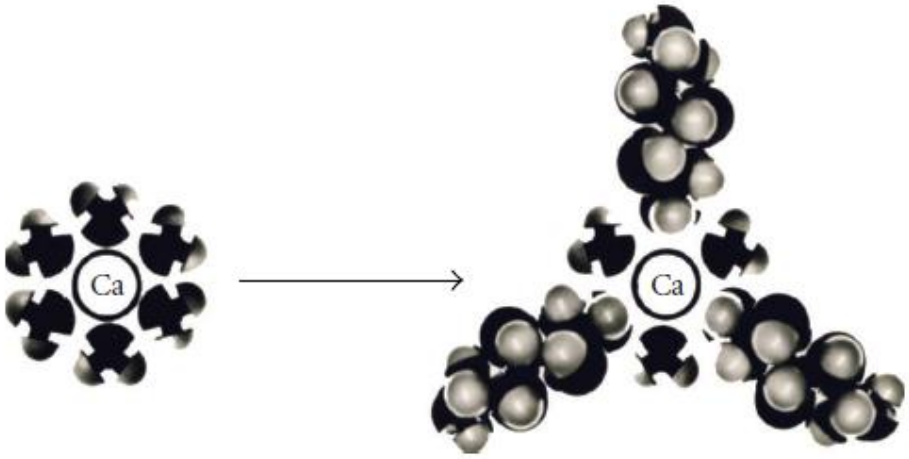
Figura 2.17. Estrutura da molécula do xilitol com seus respectivos centros estereogênicos e suas configurações espaciais. (R,S).



Fonte: Arquivo pessoal

Por ser uma molécula polihidroxilada, este pentitol apresenta características importantes em sistemas biológicos. Por exemplo, a estrutura hidroxilada do xilitol, principalmente em C2, C3 e C4, confere a ele capacidade de formar complexos orgânicos (quelatos) com íons como o Ca^{2+} (bivalentes) e fosfato, como ilustrado na Figura 2.18. Esse quelato estabiliza os íons cálcio na saliva humana, contribuindo para a uma menor perda desse íon nos dentes. (MAKINEN, 2010). Além disso, a ausência de grupo carbonílicos na molécula do xilitol faz com que ele seja quimicamente menos reativo em relação a muitos açúcares, o que é positivo, pois os açúcares carbonilados podem ser convertidosem ácidos, favorecendo o aparecimento das cáries (MAKINEN et al., 2011).

Figura 2.18. Solvatação do íon cálcio por moléculas de água e moléculas e xilitol, estabilizando sua perda.



Fonte: Adaptado de Makkinen (2010)

Segundo Hyvonen e Koivistoinen (1982), o calor de dissolução do xilitol (36,6 cal/g) é maior do que o de outros açúcares como o sorbitol (23,2 cal/g) e a sacarose (4,34 cal/g). A reação de dissolução do xilitol é uma reação endotérmica ($\Delta H>0$), requerendo energia do meio para dissolver causando assim,quando ingerido,uma refrescância bucal, o que favorece seu uso em gomas de mascar.

O xilitol é um composto pouco calórico (2,4 Kcal/g), possui elevado ponto de ebulição (216 °C) e apresenta-se estável a 120°C, não sendo caramelizado. Esse poliol por não possuir grupos aldeídicos e nem cetônicos não reage com aminoácidos presentes nos

alimentos, reação conhecida como reação da Maillard. Dessa forma não provoca o escurecimento químico nos alimentos, que apesar de ser interessante sob o aspecto visual dos alimentos pode diminuir o teor dos nutrientes dos mesmos, trazendo prejuízo nutricional ao consumidor. (HYVONEN; KOIVISTOINEN; 1982).

2.3.2. Aplicações do Xilitol

O xilitol é um composto bastante versátil podendo ser empregado em vários setores industriais (HYVONEN; KOIVISTOINEN, 1982). O xilitol é considerado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) um edulcorante que pode ser utilizado em produtos farmacêuticos e alimentícios em "quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico necessário," (*quantum satis*) assim descrito pela legislação (BRASIL, 2008). Esse composto é usado em dentifrícios, enxanguantes bucais, cremes dentais, medicamentos, alimentos e outros. Estudos realizados desde a década de 1970 revelam que o xilitol apresenta propriedade anticariogênica. De acordo com Makinen et al. (1975) células cariogênicas de *Streptococcus mutans* crescidas no meio de cultura do tipo trypticase phytone (meio rico não seletivo) contendo glicose ou xilitol ou glicose/xilitol tiveram influência no crescimento desta bactéria. Concentrações de 2,5% (m/v) de xilitol na presença de 0,25% (m/v) de glicose foram capazes de retardar o crescimento celular. Os autores constataram que baixas concentrações de xilitol (até 55 mg/mL de meio de crescimento) promoveram um aumento entre 60-80% da atividade polissacarídea, responsável pela formação do biofilme de adesão no dente.

Ishihara et al. (2012) realizaram um estudo com 56 pessoas onde foi oferecido goma de mascar contendo xilitol (cerca de 4 g/dia, 3 vezes por dia) por 13 meses. Após esse período o mesmo grupo foi monitorado por mais 15 meses, mas sem uso de goma de mascar contendo xilitol. Foi constatado que durante os 13 meses com intervenção da goma de mascar houve diminuição da população da bactéria *Streptococcus mutans* de maneira significativa. Além disso, constataram que no período seguinte de 15 meses, sem uso da goma de mascar, níveis de *Streptococcus mutans* ainda continuavam baixos demonstrando um efeito prolongado da ação anticariogênica do xilitol. De acordo com LEE et al. (2011), este efeito se deve a deficiência na produção de biofilmes em função da pouca atividade da glicosiltransferase, enzima que contribui para a formação de polissacarídeo constituinte do biofilme.

O xilitol também demonstrou ação promissora na prevenção do câncer bucal. Uittamo et al. (2011) em seu trabalho utilizando micro-organismos do gênero *Candida* da microbiota oral realizaram testes com meios de cultura constituídos por etanol, etanol-glicose, etanol-frutose e etanol-xilitol onde obtiveram teores de acetaldeído após a incubação por 30 minutos a 37 °C. Foi verificado que o meio constituído apenas de etanol gerou cerca de 250 µM de acetaldeído, enquanto o meio contendo etanol-xilitol produziu cerca de 40 µM. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (AIPC), ligada a Organização Mundial da Saúde (OMS), concentrações acima de 100 µM de etanol são capazes de produzir *adducts*, que são complexos constituídos por DNA ligado a biomoléculas em que o DNA se altera perdendo a função de divisão, causando danos às células (AIPC, 2012). Esse fenômeno é apontado como a principal causa de câncer bucal em alcóolatras por terem altas concentrações de etanol na região bucal.

O xilitol também está relacionado com tratamento da otite média aguda (OMA). Uhari et al, (1996) constatou em estudos com crianças de idade média de 5 anos a ação do xilitol contra OMA. Os autores verificaram que crianças que receberam chiclete com xilitol (cerca de 8g / dia) diariamente pelo período de dois meses apresentaram menor índice de OMA.

No metabolismo humano, o xilitol, diferentemente da glicose, não requer o hormônio insulina para ser metabolizado, podendo ser utilizado por diabéticos sem alterar sua glicemia. Durante os estudos realizados por Valero et al. (2001), em pacientes diabéticos não sépticos, os autores verificaram que solução constituída por glicose, frutose e xilitol quando administrada via parenteral, diminuiu a necessidade de insulina em cerca de 20%, quando comparada com administração via parenteral de solução de glicose.

Com relação à toxicidade do xilitol, Wang et al. (1973) observaram que a dose letal (LD_{50})em coelhos foi de 4 a 6 gramas de xilitol por quilo de animal, quando administrado oralmente, enquanto em cães a administração acima de 500 mg/kg de animal resultou em toxicidade hepática (DUNAYER et al., 2006). Segundo Culbert et al. (1986), a ingestão de xilitol em humanos deve ser limitada a 60 g por dia, pois em quantidades maiores pode acarretar em distúrbios gastrointestinais.

O uso de xilitol como aditivo em alimentos para consumo humano é autorizado pelo FDA (Food and Drugs Administration) que, por sua vez, considera este poliol é um composto do tipo GRAS (Generally Recognized As Safe).

2.3.3. Aspectos Metabólicos da Produção Biotecnológica de Xilitol

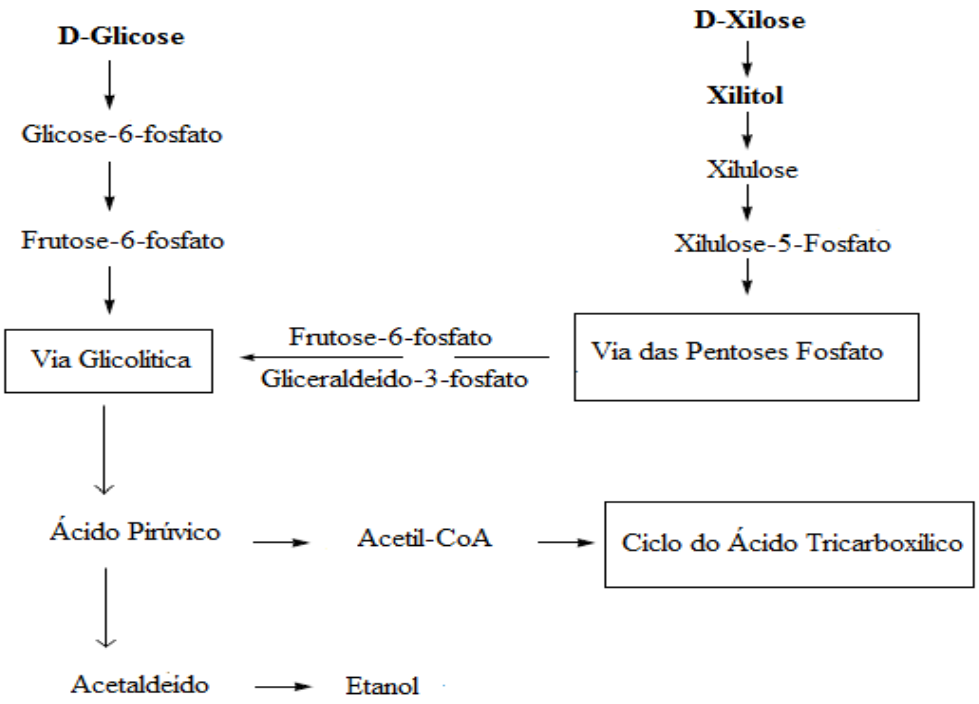
A produção biotecnológica do xilitol pode ser realizada empregando diferentes tipos de micro-organismos. Há relatos na literatura sobre o uso fungos filamentosos como *Mucor sp e Fusarium oxysporum* (PARAJÓ et al., 1998), *Aspergillus* (WITTENEEN et al.,1994), bactérias como *Corynebacterium glutamicum* (SASAKI et al., 2010) *Enterobacter liquefaciens* (YOSHITAKE et al., 1976), *Escherichia coli* (SUZUKI et al.,1999), e leveduras (naturais ou recombinantes) como *Saccharomyces cerevisiae* (KIM et al., 2012; LEE; RYU; SEO, 2000), *Candida tropicalis* (GUO et al., 2013), *Candida guilliermondii* (CAMARGO et al., 2015) e *Kluyveromyces marxianus* (ZHANG et al., 2013; LULU et al., 2013)Apesar da diversidade de micro-organismos, as leveduras são consideradas as melhores produtoras de xilitol (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

A conversão da xilose em xilitol em leveduras é realizada em duas etapas (Figura 2.19), sendo que a primeira se inicia logo após a entrada da xilose na célula, quando então esta pentose é catalisada pela xilose redutase (XR) (EC 1.1.1.2.1), geralmente dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada reduzida (NADPH), gerando ao término da reação uma nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada oxidada ($NADP^+$) e xilitol. Nesse ponto o xilitol pode ser excretado ou ser convertido a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (XDH) (EC 1.1.1.9), que geralmente é dependente $NADP^+$. Essas duas reações são consideradas limitantes no processo de bioconversão da xilose a xilitol. A xilulose é então fosforilada a xilulose-5-fosfato pela enzima xilulosequinase (EC 2.7.1.17) que em seguida pode seguir para a via das pentoses fosfato sendo convertida a gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato. Uma vez formado esses compostos, eles podem ser metabolizados pela via glicolítica, gerando piruvato. Uma vez produzido piruvato, este composto pode ser descarboxilado gerando etanol e gás carbônico ou seguir para o ciclo do ácido tricarboxílico (WINKELHAUSEN, KUSMANOVA, 1998, CHEN et al., 2010).

A enzima xilose redutase pode apresentar especificidade pelo NADH ou NADPH, dependendo do micro-organismo usado na bioconversão. Yablochkova et al., (2003), estudando diferentes leveduras produtoras de xilitol e de etanol a partir de xilose, incluindo *Kluyveromyces marxianus* constataram que a atividade enzimática da xilose redutase em *K. marxianus* foi maior na presença de NADPH do que na presença de NADH, sendo observados valores de 0,16 e 0,01 µmol/(min.mg de proteína), respectivamente, indicando

a especificidade dessa enzima pelo NADPH. Já a enzima xilitol desidrogenase demostrou maior especificidade para o NAD^+do que para o $NADP^+$, sendo os valores da atividade enzimática para o $NADP^+$ inferiores a 0,01 µmol/(min.mg de proteína), enquanto que para o NAD^+foram observados valores de 0,04 µmol/(min.mg de proteína). O mesmo comportamento foi relatado por Zhang et al. (2013) e Lulu et al. (2013), empregando espécies *Kluyveromyces marxianus.*

Figura 2.19. Resumo das vias metabolicas da D-Glicose e D-Xilose em leveduras**.**



Fonte: Adaptado de Yablochkova et al. (2003)

De acordo com a literatura, a conversão de xilose em xilitol é um processo que pode ser influenciada por diversos fatores como oxigenação, pH, temperatura, e tipo de meio fermentativo devendo cada um deles ser analisado durante o bioprocesso. A concentração de oxigênio, por exemplo, desempenha um papel relevante nesta bioconversão.

Estudos realizados por Yablochkova et al. (2004), empregando a levedura *Pachysolen tannophilus* demonstraram diferença nos valores dos fatores de conversão de

xilose em xilitol em função de diferente taxas de oxigenação empregadas. Os autores constataram que em meios fermentativos com taxa de oxigenação de 0, 5 e 140 mmol O_2/L.h, o micro-organismo alcançou valores de fatores de conversão diferentes. Para ambiente anaeróbio o valor do fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$) foi inferior a 0,01 g/g, o qual foi similar ao obtido em ambiente com 140 mmol O_2/L.h. Por outro lado, em ambiente com baixas taxas de oxigenação (5 mmol O_2/L.h), o valor de $Y_{P/S}$ foi aumentado para 0,16 g/g. Os autores atribuem os baixos valores de $Y_{P/S}$ em ambientes anaeróbios a baixa assimilação de xilose pela levedura, enquanto que em condições aeróbias, a baixa conversão da xilose em xilitol se deve ao desvio do carbono para a produção de biomassa.

O efeito do nível de aeração sobre a eficácia da transformação de xilose em xilitol é susceptível a mudanças induzidas nas atividades da xilose redutase ligadas com NADPH e NADH. O $NADP^+$, que é formado durante a produção do xilitol pode ser reduzido no ciclo das pentoses fosfato. A regeneração de NADH, durante a transformação do xilitol em xilulose requer um aceptor de elétrons, cuja função é exercida pelo oxigênio. De acordo com esta hipótese, o fato da regeneração do NADH estar envolvida na fase inicial do metabolismo da xilose, perturba o equilíbrio entre NADPH e NAD^+ e conduz à formação de xilitol (YABLOCHKOVA et al., 2004).

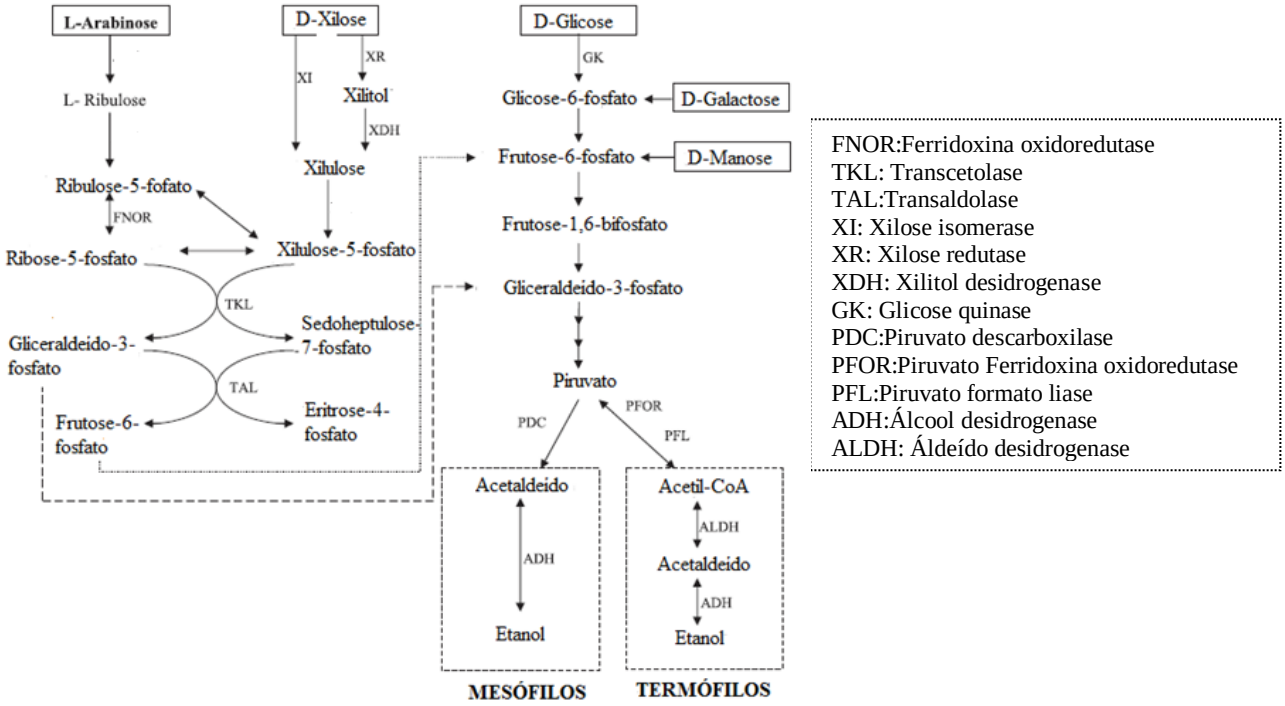
Signori et al. (2014), avaliando o efeito da oxigenação sobre a fermentação de xilose (20 g/L) por *K. marxianus* CBS712 demonstraram que as enzimas xilose redutase (*Km*XR) e xilitol desidrogenase (*Km*XDH) apresentaram menor atividade com a diminuição da oxigenação do meio (de 20,95 para 11% de oxigênio) o que favoreceu o acúmulo de xilitol. Segundo os autores, esta redução de atividade está relacionada com a assimilação da xilose que decresceu de 12 para 5,9 g/L quando a oxigenação diminuiu de 20,95 para 11%, respectivamente.

Em leveduras produtoras de xilitol os cofatores $NADP^+$ e NAD^+ são regenerados independentemente. Em condições aeróbias, NADH é completamente oxidado através da cadeia respiratória, enquanto em condições microaeróbia e anaeróbia, o acúmulo intracelular de NADH, retarda e/ou bloqueia o catabolismo de xilose na fase de formação de xilitol. Nas leveduras produtoras de etanol, no entanto, o NADH, que é produzido durante a transformação do xilitol em xilulose, pode ser parcialmente regenerado pela xilose redutase ligada ao NADH. Este ciclo de regeneração adicional reduz o desequilíbrio entre NADH e NAD^+ e promove a fermentação de xilose a etanol. Com isso, a elevada

atividade de NADH ligada à xilose redutase é favorável para a regeneração intracelular de NADH e NAD^+ o que reduz a quantidade de xilitol produzido a partir de xilose.

Recentemente, Arora, Behera e Kumar (2015) discutiram algumas diferenças no metabolismo de pentoses em leveduras termotolerantes, como a espécie *K. marxianus*,em relação aos micro-organismos classificados como mesófilos (Figura 2.20).

Figura 2.20. Metabolismo de diferentes carboidratos em micro-organismos



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

De acordo com os autores, em leveduras termotolerantes as pentoses (xilose e arabinose) são metabolizadas pela via das pentoses fosfato, onde xilulose-5-fosfato é epimerizada a ribulose-5-fosfato e posteriormente isomerizada à ribose-5-fosfato pela enzima ferrodoxina oxidoredutase para produção de NADPH. Os produtos da via das pentoses fosfato são então canalizados para a via EMP (Embden-Meyerhof Parnas) nas formas de frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, que através da conversão à piruvato originam diferentes produtos de fermentação, tais como o etanol e ácido acético. Em leveduras termotolerantes, quando cultivadas em condições de alta temperatura, normalmente o acetaldeído produzido a partir do piruvato é convertido em ácido acético

através da acetaldeído desidrogenase que reduz $NADP^+$ a NADPH. Segundo Signori et al. (2014), os cofatores reduzidos gerados por esta via irão contribuir com um maior suprimento de NADPH para neutralizar as espécies reativas de oxigênio (ERO) que são produzidas pelas células quando expostas sob condições estressantes, especialmente em altas temperaturas.

2.3.4. Produção de Xilitol em Hidrolisados Hemicelulósicos:Principais Desafios

Os hidrolisados hemicelulósicos de biomassas vegetais têm sido usados como fonte de carbono para produção de xilitol há décadas (RAFIQUL; MIMI SAKINAH, 2013), porém ainda existem alguns desafios que precisam ser superados para aumentar a eficiência e a produtividade deste bioprocesso. Normalmente, durante o processo de hidrólise ácida visando à obtenção de hidrolisados hemicelulósicos, além das pentoses (xilose e arabinose), são ainda solubilizadas pequenas quantidades de hexoses, tais como a glicose. São ainda gerados compostos químicos, dentre os quais se encontram fenólicos de baixa massa molar, que são provenientes da degradação da lignina, o furfural e hidroximetilfurfural, que são formados pela desidratação das pentoses e hexoses, respectivamente, e o ácido acético, que é liberado no meio reacional a partir da quebra dos grupos acetil que estão ligados na cadeia de hemicelulose (MUSSATTO; ROBERTO, 2004). A presença de glicose, pode causar repressão catabólica (RODRUSSAMEE et al., 2011), assim como a presença de compostos químicos, especialmente o ácido acético (RUGTHAWORN et al., 2014) pode inibir o metabolismo do micro-organismo.Tanto a glicose, quanto os compostos inibidores, podem afetar a captação da xilose pela levedura fazendo com que produção de xilitol seja mais lenta, ou mesmo ineficiente.

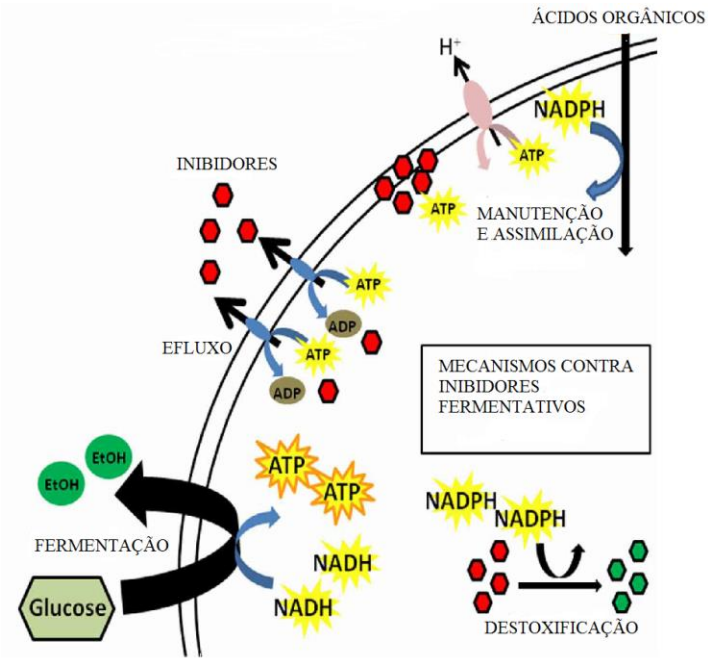
Signori et al., (2014) ao cultivar a levedura *K. marxianus* CBS172 em meio semidefinido contendo glicose (20 g/L) e xilose (20 g/L) sob diferentes condições de temperatura e suprimento de oxigênio verificaram que, em todas as condições oxigenação testadas, a velocidade de consumo de glicose foi superior a da xilose, sendo ainda maior na tempertaura de 41 °C (20 vezes) do que a 30 °C (10 vezes). Em ambas as temperaturas, a formação de xilitol somente foi observada no menor nível de oxigênio avaliado, apresentando um fator de rendimento similar (~ 0,77 g/g). Neste trabalho, foi ainda mostrada uma correlação direta entre o decrescimo da eficiência de consumo de xilose com

a diminuição das atividades específicas das duas principais enzimas (xilose redutase e xilitol desidrogenase) envolvidas no seu catabolismo.

A inibição do consumo de xilose por *K. marxianus* em meios contendo uma mistura de glicose (20 g/L) e xilose (20 g/L) em diferentes condições de temperatura foi também relatada por Rodrussamee et al., (2011). A velocidade de consumo de xilose foi nitidamente reduzida com o aumento da temperatura de 30 para 45 °C, sendo ainda observado um consumo sequencial da xilose na presença de glicose. Segundo os autores, na presença de glicose, os transportadores de pentoses pela levedura são inativados, e como consequência a xilose é assimilada por difusão, que é um processo mais lento.

Segundo Piotrowski et al., (2014), os mecanismos desenvolvidos pelos micro-organismos para contornar os efeitos inibitórios desses compostos podem ser divididos em três categorias principais: (i) destoxificação, que consiste na conversão de compostos tóxicos em outros com menor toxicidade para o micro-organismo, utilizando para isso cofatores como NADH/NADPH, (ii) o efluxo, que consiste na remoção de prótons do interior do micro-organismo para o meio extracelular, fazendo uso de bombas localizadas na membrana celular e consumo de ATP, e (iii) reparo que exige uma demanda de ATP e outros elementos celulares em função dos danos causados nas membranas, organelas e outras estruturas celulares. Para diminuir os efeitos desses compostos gerados durante o aumento da biomassa, diversos tipos de tratamento podem ser realizados ao longo do processamento desse material até a obtenção do hidrolisado a ser fermentado. A Figura 2.21 mostra de forma reduzida os principais mecanismos desenvolvidos pelos micro-organismos para neutralizar os efeitos dos inibidores.

Figura 2.21 Mecanismos utilizados pelas leveduras para neutralizar os efeitos dos compostos inibidores.



Fonte: Adaptado de Piotrowski et al. (2014).

Oliva et al. (2006) avaliaram o efeito de três tipos de compostos: furfural (0 a 2 g/L), ácido acético (0 a 10g/L) e catecóis (0 a 1g/L) sobre a fermentação de *K. marxianus* CECT 10875 a 42 °C em meios semidefinidos contendo 30 g/L de glicose. Os autores observaram que o furfural e o ácido acético apresentam efeito negativo sobre a velocidade específica de crescimento da levedura, enquanto que os catecóis não influenciaram neste parâmetro. Na concentração de 10 g/L de ácido acético, a produção de biomassa foi inibida em 50 %. O efeito inibitório do ácido acético sobre o crescimento de leveduras *K. marxianus* foi estudado por Rugthaworn et al. (2014). Segundo os autores, o efeito inibitório do ácido acético sobre o crescimento celular em cultivos realizados a 30°C ocorreu a partir de 20 mM (1,2 g/L) deste ácido. Nesta concentração, a inibiçãofoi de aproximadamente 10 %, e aumentou para 40 % quando a concentração foi elevada para 60 mM (3,6 g/L). O efeito inibitório do ácido acético foi ainda maior na temperatura de 42 °C, onde se observou uma redução de 83 % no crescimento celular na presença de 60 mM, indicando que em temperaturas elevadas o efeito inibitório é potencializado.

2.3.5. Principais Métodos de Destoxificação de Hidrolisados Hemicelulósicos

A remoção de inibidores metabólicos tem sido apontada como uma etapa de fundamental importância para melhorar a fermentabilidade dos hidrolisados hemicelulósicos por micro-organismos. Dentro deste contexto, vários tratamentos de destoxificação baseados em métodos físicos, químicos ou biológicos têm sido desenvolvidos para minimizar o efeito destes compostos, sendo que a eficiência dos métodos irá depender do tipo de biomassa, do método de hidrólise, e dos micro-organismos utilizados (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Os métodos físicos de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos estão baseados nas diferenças de volatilidade dos inibidores presentes no meio. O processo de evaporação a vácuo é um método físico que reduz os níveis dos compostos voláteis, tais como o ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural (HMF), vanilina, que normalmente estão presentes nos hidrolisados ácidos, contudo, este método também aumenta de forma moderada a concentração de compostos não voláteis, o que constitui uma desvantagem dessa técnica (MUSSATTO; ROBERTO, 2004; CHANDEL et al., 2011).

Rodrigues et al. (2001) e Larsson et al. (1999) relataram remoções ≥ 90% de furfural quando foi aplicado vácuo durante a concentração do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar e madeira, respectivamente. Geddes, Shanmugam e Ingram (2015) observaram que o furfural foi completamente removido, enquanto que o ácido acético foi reduzido em apenas 27%. Por outro lado, nos trabalhos de Yadav et al., (2011), foi observada uma menor redução de furanos (30%) após concentração a vácuo do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Estas diferenças se devem as condições do processo em termos de temperatura e fator de concentração.

Os métodos químicos de destoxificação dos hidrolisados hemicelulósicos se baseiam na precipitação e/ou instabilidade de alguns compostos tóxicos em determinado valor de pH (MUSSATTO; ROBERTO, 2004; MARTINEZ et al.; 2000). Dentre os métodos de químicos mais utilizados estão o processo de alcalinização com diferentes tipos de base (CaO), $(CaOH)_2$ ou (NaOH) e o processo de adsorção com carvão ativado ou resina de troca iônica (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Chandel et al. (2007) realizaram tratamento de destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando hidróxido de cálcio $Ca(OH)_2$. O método consistiu em elevar o pH do hidrolisado até 10 sob agitação vigorosa por 1 hora a temperatura ambiente.

Este procedimento permitiu uma redução de 45,8% de furanos e 35,87% de compostos fenólicos, e segundo os autores, a fermentabilidade do hidrolisado por *Candida shehatae* NCIM 3501 foi significativamente aumentada.

Millati, Niklasson e Taherzadeh (2002) estudando diferentes condições de pH, temperatura e tempo sobre a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de madeira com $Ca(OH)_2$verificaram que,independente da temperatura empregada, o tratamento do hidrolisado por 20 horas em pH 12 foi capaz de remover >90% de furanos. No entanto, nestas condições, foi também verificada uma perda acentuada nas concentrações de D-glicose (34%) e D-xilose (72%). Uma perda menos acentuada de açúcares (~ 16%) foi verificada por Martinez et al. (2000) empregando $Ca(OH)_2$ para a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. O tratamento foi conduzido em pH 9,0, 60 °C por 30 min. Os autores atribuem este fenômeno as modificações químicas ocorridas nos açúcares em função da presença de íons cálcio nas condições avaliadas.

Além da variação do pH, o emprego de carvão ativado para destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos tem mostrado eficácia na remoção de furanos e compostos fenólicos, levando a melhores resultados nos subsequentes processos fermentativos. (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

Mussatto e Roberto (2001) avaliaram diferentes proporções mássicas entre hidrolisado hemicelulósico e carvão ativado sobre a remoção de compostos fenólicos em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. O melhor resultado (redução de 27% no teor de compostos fenólicos) foi obtido utilizando a proporção 40 g de hidrolisado/g de carvão ativado. Nestas condições, os parâmetros fermentativos de produção de xilitol por *Candida guilliermondii* FTI-20037 a partir do hidrolisado tratado foram similares aos obtidos em meio semidefinido ($Y_{P/S}$= 0,70 g/g e Q_P = 0,60 g/L.h), demonstrando assim a eficiência do método. O efeito da destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana combinando variação de pH com CaO e adsorção com carvão ativado sobre a produção de xilitol por *Candida guilliermondii* foi avaliado por. Arruda et al. (2008). Os autores constataram uma remoção de 88% dos compostos fenólicos, em relação ao hidrolisado não destoxificado, o que resultou em melhorias na fermentabilidade.

Os métodos biológicos de destoxificação utilizam micro-organismos e/ou enzimas com capacidades de promover modificações na estrutura química dos compostos inibidores, resultando em substâncias de menor toxicidade (MUSSATTO; ROBERTO, 2004). Moreno et al. (2012) empregando enzima lacase para destoxificar a suspensão de palha

de milho obtida por explosão a vapor, observaram reduções de 70 até 100% nos teores de compostos fenólicos, o que permitiu um ganho de 89% nos valores de produtividade volumétrica em etanol empregando *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. A eficiência da destoxificação biológica empregado a levedura *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 em hidrolisados hemicelulósicos obtidos de diferentes biomassas (casca de café, palha de cana de açúcar e fibra de milho) foi estudada por Fonseca et al. (2011). Os autores observaram que o nível de remoção do furfural pela levedura variou com o tipo de hidrolisado, sendo encontrados valores de 76,6; 54 e 88%, respectivamente, nos hidrolisados de casca de café, palha de cana de açúcar e fibra de milho. Além disso, esse tratamento removeu 100% do ácido acético presente no hidrolisado de casca de café e fibra de milho e 28% em palha de cana-de-açúcar. Em outro trabalho, Fonseca et al. (2013) empregaram *Saccharomyces cerevisiae* como agente biológico para destoxificar o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e de poda de oliveira. Os autores observaram uma redução de 50 e 35% nos teores de furanos totais no hidrolisado de palha dearroz e de poda de oliveira, respectivamente. Com este tratamento, foi possível reduzir a toxicidadede ambos os hidrolisados, a qual foi confirmada pelos ensaios de fermentabilidade com a levedura *Pichia stipitis.*

2.4. Produção de xilitol empregando *Kluyveromyces marxianus*

A levedura *Kluyveromyces marxianus* constitui uma espécie termotolerante com uma longa história de aplicação na fermentação de alimentos e devido a sua classificação GRAS (Generally Recognized as Safe) pela FDA (Food and Drug Administration), é considerado um micro-organismo seguro, o que permite sua aplicação, assim como seus derivados em produtos alimentícios e farmacêuticos (FONSECA; HEINZLE; WITTMANN; GOMBERT, 2008).

Espécies de *K. marxianus* são classificadas como respiro-fermentativa (LANE; MORRISSEY, 2010) uma vez que, são capazes de obter energia tanto na presença de oxigênio (respiração), quanto na ausência (fermentação). Sua descrição é como Crabtree negativa, ou seja, na presença de oxigênio e alto teor de açúcar o metabolismo é direcionado para via respiratória, não é totalmente aceita devido a grande variabilidade de cepas.

A importância tecnológica da levedura *K. marxianus* está também relacionada com

sua capacidade de crescimento e fermentação em altas temperaturas, o que reduz o índice de contaminação e dispensa operações de resfriamento do processo, e consequentemente diminui os custos operacionais (KUMAR et al. 2009).

O emprego de linhagens termotolerantes de *K. marxianus* na bioconversão de xilose em xilitol tem sido ainda pouco explorado na literatura, porém estudos recentes destacam o potencial desta levedura como modelo biológico em processos de bioconversão a partir de biomassas lignocelulósicas, devido a sua capacidade de assimilar diferentes tipos de açúcares, especialmente os constituintes dos hidrolisados de biomassas lignificadas, tais como xilose, glicose, arabinose, manose, galactose e celobiose (RODRUSSAMEE et al. 2011).

Wilkins et al. (2008), avaliaram diferentes cepas de *K .marxianus* (IMB2, IMB4 e IMB5) quanto a produção de xilitol sob diferentes condições de temperaturas (40 e 45 °C) e pH (4,5; 5,0 e 5,5) em ambiente anaeróbio na presença de 10 g/L de xilose. O melhor resultado de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$ = 0,25 g/g) foi obtido com a cepa IMB5 em pH 4,5 e 40 °C. Porém, na temperatura de 45 °C no mesmo valor de pH, a cepa IMB2 mostrou um melhor desempenho ($Y_{P/S}$ = 0,28 g/g). Com base nos baixos valores de conversão obtidos, os autores sugerem a exploração de outras condições de processo visando melhorias nos resultados. Em outro estudo, Kumar et al. (2009) avaliou o efeito concentração de xilose sobre a produção de xilitol por *Kluyveromyces* sp IIPE453 na temperatura de 50 °C e pH 5,0. A concentração máxima de xilitol produzida foi 11,5 g/L em meio contendo 40 g/L de xilose, o que correspondeu a um fator de conversão de aproximadamente 0,57 g/g e produtividade volumétrica de 0,17 g/L.h.

Mueller et al., (2011), avaliando a produção de xilitol por *K. marxianus* IMB2 em meio contendo 50 g/L de xilose na temperatura de 40 °C, observaram uma produção de 24,09 g/L após 120 h ($Y_{P/S}$ = 0,90 g/g e Q_P = 0,24 g/L,h), porém a levedura apresentou um ineficiente consumo de xilose (47,5%).

A capacidade de leveduras *K. marxianus* termotolerantes em assimilar xilose e produzir xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal foi relatada por Zhang et al. (2013). Neste estudo, foi empregado o hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho previamente destoxificado com uma combinação de tratamentos (CaO até pH 10 e carvão ativado) contendo xilose na concentração de ~26 g/L. Os resultados da fermentação em hidrolisado foram comparados aos obtidos em meio semidefinido, e segundo os autores, a linhagem recombinante YZB014 de *K. marxianus* foi capaz de

produzir quantidades similares de xilitol (12,21 g/L) em ambos os meios na temperatura de 42 °C. Em outro trabalho, Albuquerque et al. (2015) investigando a produção de xilitol por *K. marxianus* CCA510 na temperatura de 30 °C em hidrolisado de bagaço de caju destoxificado com carvão ativado contendo 35 g/L de xilose e 35 g/L constataram uma baixa produção de xilitol (6,7 g/L) após 120 h, o que correspondeu a uma conversão de 0,36 g/g e produtividade de 0,07 g/L.h.

A produção de xilitol empregando globo.com cepas de *Kluyveromyces marxianus* modificadas geneticamente foi relatada por Zhang et al. (2014). Segundo os autores, a cepa YZJ015, sobre a qual foi mantido o gene da xilitol desidrogenase, mas com superexpressão (4 cópias) da xilose redutase foi capaz de produzir 35,6 g/L de xilitol, após 24 h, em meio contendo 50 g/L de xilose (96% de consumo) quando cultivada na temperatura de 42°C. Nestas condições, o fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$) e a produtividade volumétrica (Q_P) atingiram valores de 0,72 g/g e 1,48 g/L.h, respectivamente. Com o aumento da concentração de xilose para 100 g/L, nesta mesma temperatura, a produção de xilitol atingiu 71,46 g/L, o que resultou em um aumento na conversão ($Y_{P/S}$ = 0,88 g/g) sem alterar a produtividade volumétrica em xilitol (~1,49 g/L.h). Mesmo a 45 °C, a cepa modificada foi capaz de produzir 60,03 g/L de xilitol a partir de 100 g/L. Com estes resultados, os autores concluem que a cepa YZJ015 é uma exelente plataforma para a bioconversão de xilose em xilitol em elevadas temperaturas.

A tolerância da *K. marxianus* frente aos compostos inibidores encontrados nos hidrolisados hemicelulósicos foi reportada por Kundiyana et al. (2009). Neste trabalho, os autores avaliaram o efeito do furfural (0; 0,5 e 1,0 g/L)sobre a produção de xilitol pela levedura termotolerante *Kluyveromyces marxianus* IMB4 sob condições anaeróbias e microaeróbias, em meios contendo 20 g/L de xilose na temperatura de 40 °C. Os resultados mostraram que sob condições anaeróbias, a produção de xilitol foi similar (8,0 g/L) em todas as concentrações de furfural avaliadas, indicando que o furfural, nas concentrações avaliadas, não afetou o bioprocesso. Este mesmo comportamento foi observado sob as condições microaeróbias, porém a produção de xilitol decresceu para 4,0 g/L. De acordo com os autores, essa diferença se deve ao desvio do metabolismo de xilose para produção celular em detrimento da produção de xilitol.

3.OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a potencial aplicação de espécies termotolerantes de *Kluyveromyces marxianus* na produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico obtido da palha de arroz

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o processo de bioconversão de xilose em xilitol com 4 linhagens de *Kluyveromyces marxianus*, sob diferentes condições de temperatura, em meio semidefinido;

- Determinar as condições ótimas de tratamento alcalino da palha de arroz visando maximizar a remoção de grupos acetil, com menor perda de açúcar;

- Determinar as condições ótimas de hidrólise ácida da palha de arroz tratada com álcali nas condições previamente otimizadas; visando maximizar a recuperação dos açúcares da fração hemicelulósica;

- Avaliar a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz empregando a levedura *Kluyveromyces marxianus* selecionada;

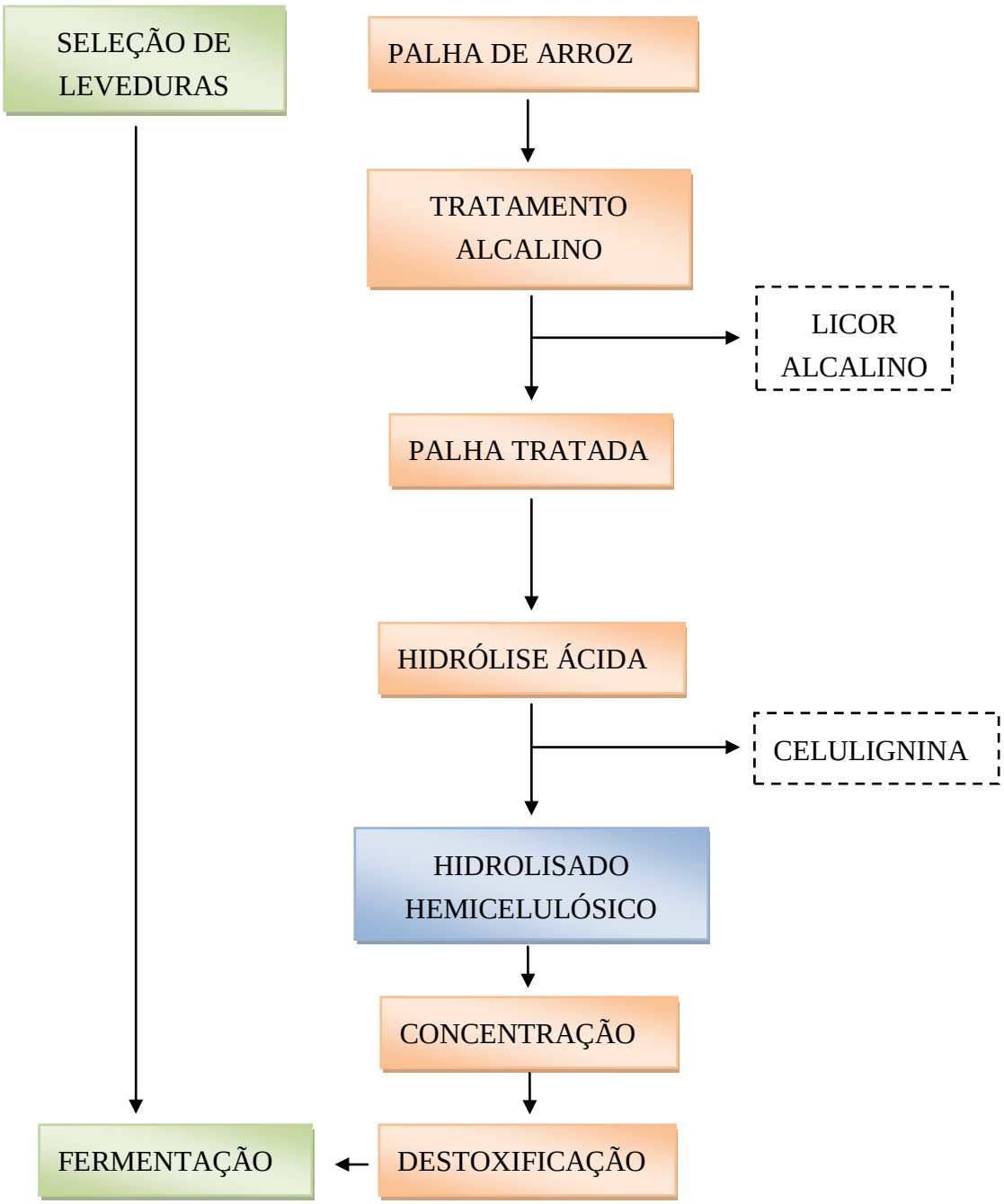
- Avaliar diferentes tratamentos de destoxificação do hidrolisado, visando melhorar a sua fermentabilidade;

- Avaliar o efeito da glicose sobre o perfil fermentativo da *Kluyveromyces marxianus*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fermentação I do Departamento de Biotecnologia Industrial da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. A Figura 4.1 é uma representação do trabalho proposto.

Figura 4.1: Fluxograma das etapas realizadas neste trabalho**.**



Fonte: Arquivo pessoal

4.1. Processamento da Matéria Prima

4.1.1. Obtenção e preparo da palha de arroz

A palha de arroz foi cedida pela empresa Irmãos Ligabo, localizada nas proximidades da cidade de Lorena, no estado de São Paulo, Brasil. O material foi exposto ao sol para secar até a umidade alcançar cerca de 10%. Em seguida, a palha foi moída em moinho de martelo (BEMEDETTI – dupla 270) e acondicionada até o momento do uso. O material moído foi caracterizado quimicamente de acordo com protocolo padrão do NREL, com algumas modificações (conforme descrito no item 4.4.2) e armazenado até a realização dos tratamentos.

4.1.2. Avaliação das condições de tratamento alcalino da palha de arroz sobre a remoção dos grupos acetis

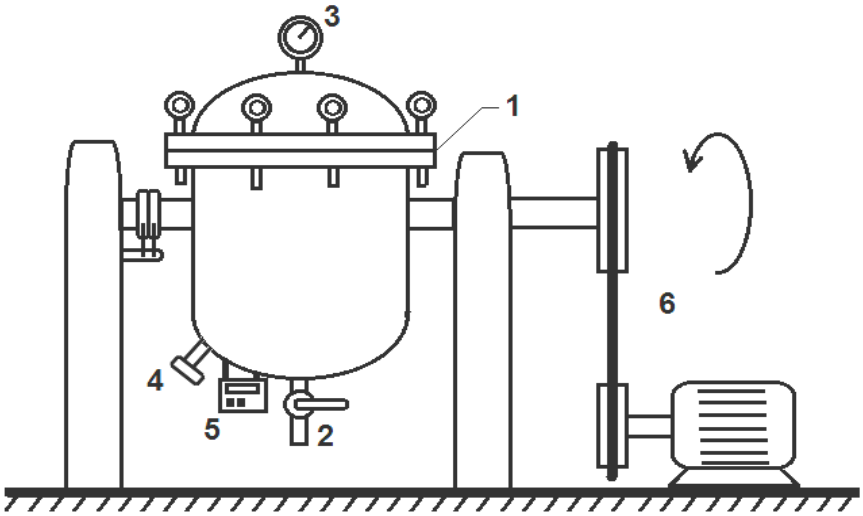
O presente trabalho propôs um tratamento alcalino na palha de arroz previamente ao processo de hidrólise ácida, capaz de solubilizar o acetato no licor alcalino e assim, diminuir a concentração deste composto na composição do hidrolisado ácido. Para tanto foi realizado um planejamento fatorial do tipo 2^2 completo com 3 pontos centrais avaliando como variáveis independentes a temperatura (50, 60 e 70 °C) e a carga de NaOH (20, 60 e 80 mg NaOH/g biomassa), como apresentado na Tabela 4.1. Foi utilizada como variável dependente a porcentagem de grupos acetil. Os tratamentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo cerca de 5 g de palha de arroz e o volume apropriado de solução de NaOH de 0,2, 0.5 ou 0,8%, de acordo com cada ensaio. A solução de NaOH foi previamente ambientada à mesma temperatura requerida para cada ensaio (50, 60 ou 70 °C) e então adicionadas aos frascos contendo a palha de arroz. Esta mistura foi imediatamente homogeneizada com um bastão de vidro e em seguida, colocada em banho-maria (Banho Dubnoff, Nova Ética, Brasil) com um tempo de residência de 45 minutos e agitação de 100 rpm. Após o tratamento, os sólidos foram separados da fração líquida utilizando peneiras de 120 *mesh*. Os sólidos recuperados em cada condição do tratamento alcalino foram lavados até pH neutro e secos ao sol até atingir cerca de 10% de umidade.

Tabela 4.1. Planejamento fatorial 2^2 completo, com triplicata no ponto central, para avaliação do efeito do tratamento alcalino na concentração de ácido acético. Tempo de reação: 45 minutos

Ensaio	NaOH	Níveis codificados		Níveis reais	
	(%)	Temperatura (°C)	NaOH (mg/g biomassa)	Temperatura (°C)	NaOH (mg/g biomassa)
01	0,2	-1	-1	50	20
02	0,2	+1	-1	70	20
03	0,8	-1	+1	50	80
04	0,8	+1	+1	70	80
05	0,5	0	0,33	60	60
06	0,5	0	0,33	60	60
07	0,5	0	0,33	60	60
08	0,5	-1	0,33	50	60
09	0,5	+1	0,33	70	60
10	0,2	0	-1	60	20
11	0,8	0	+1	60	80

Visando uma maior quantidade de palha tratada por NaOH, para posterior hidrólise acida, foram realizados ensaios em reatores de 50L com 40 litros de volume útil, provido de aquecimento por resistência elétrica e agitação por rotação sobre o próprio eixo (Figura 4.2). A reação foi realizada a 70 °C, por 45 minutos, com agitação de 2 rpm e uma carga de NaOH de 80 mg/g de biomassa. Após o tempo de reação e resfriamento do reator, o licor alcalino foi removido, a palha tratada foi lavada até pH próximo de 7,0 e seca ao sol, quando então foi armazenada até o momento da análise

Figura 4.2. Reator de aço inoxidável de 50 litros capacidade, provido de aquecimento por resistência elétrica e agitação por rotação sobre o próprio eixo. (1) boca de carga; (2) válvula de descarga; (3) manômetro; (4) termopar; (5) controle de temperatura; (6) sistema de agitação.



Fonte: Silva (2011)

4.1.3. Avaliação das condições de hidrólise ácida da palha de arroz desacetilada na recuperação da fração hemicelulósica

A palha obtida após tratamento alcalino como descrito no item 4.1.2, foi submetida ao processo de hidrólise ácida visando obter um hidrolisado hemicelulósico (HHPT) com elevado teor de xilose e baixa concentração de compostos tóxicos. Para isso, foi utilizado um planejamento experimental do tipo 2^2de face centrada com quadruplicata no ponto central (Tabela 4.2), tendo como variáveis independentes o tempo (30, 60, 90 minutos) e a concentração de ácido sulfúrico (0,5, 1,0, 1,5 % m/v) e a variável dependente foi a porcentagem de rendimentos de hidrólise da hemicelulose. Os níveis utilizados estão apresentados na Tabela 4.2. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer com capacidade de 125 mL, com aproximadamente 4 g de matéria seca (desacetilada) e um volume total da solução ácida de 40 mL, o que corresponde a uma relação de matéria seca/solução ácida de 1:10. Os frascos foram fechados com papel alumínio e levados à autoclave, onde as reações foram conduzidas a uma temperatura de 121 °C, durante 30 a 90 minutos. Após este processo, a mistura reacional foi filtrada para separação dos resíduos sólidos (celulignina) da fração líquida (hidrolisado hemicelulósico).

Tabela 4.2. Planejamento fatorial composto 2^2 com face centrada e quadruplicata no ponto central para avaliar o efeito das variáveis tempo e concentração de H_2SO_4 sobre a eficiência da hdrólise da hemicelulose

Ensaios	Níveis codificados		Níveis reais	
	Tempo (min)	**H_2SO_4 (% m/v)**	**Tempo (min)**	**H_2SO_4 (%m/v)**
01	-1	-1	30	0,5
02	+1	-1	90	0,5
03	-1	+1	30	1,5
04	+1	+1	90	1,5
05	-1	0	30	1,0
06	+1	0	90	1,0
07	0	-1	60	0,5
08	0	+1	60	1,5
09	0	0	60	1,0
10	0	0	60	1,0
11	0	0	60	1,0
12	0	0	60	1,0

Visando a obtenção de um volume maior de hidrolisado hemicelulósico a palha de arroz previamente tratada com NaOH conforme descrito no item 4.1.2 deste trabalho foi submetida à condição de hidrólise ácida previamente otimizada, em reator de 50 L de aço inox, com volume útil de 40 litros, como ilustrado na Figura 4.2. A hidrólise ácida foi realizada com 4 quilos de palha úmida, utilizando 36 L litros de solução ácida 1,0% (m/v) o que corresponde a uma relação de matéria seca/solução ácida de 1:10. Após esse processo, o hidrolisado hemicelulósico foi concentrado até obter um fator de concentração de cinco vezes, utilizando evaporação a vácuo 70 °C ± 5 ◦C visando aumentar o teor de D-xilose. Este processo foi realizado em um concentrador (*Precision Scientific* – U.S.A) de 5 litros de capacidade total, operado de forma descontínua.

4.2. Tratamento de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico

O hidrolisado hemicelulósico concentrado conforme descrito no item 4.1.3 foi submetido a diferentes tratamentos de destoxificação visando diminuir o teor de compostos tóxicos presentes no meio, conforme descrito a seguir:

4.2.1. Alteração do pH com óxido de Cálcio (CaO)

Esse tratamento foi realizado segundo a metodologia descrita por Mateo et al. (2013). Inicialmente, o hidrolisado concentrado teve seu pH elevado para 10 com CaO e após 10 min de agitação a 300 rpm, o pH do meio foi reduzido para 5,5 utilizando solução de ácido sulfúrico (72% m/m). O hidrolisado foi então centrifugado (946 x *g* por 20 min) para remoção dos precipitados.

4.2.2. Carvão ativado

Esse tratamento foi realizado segundo a metodologia descrita por Mussatto et al. (2004). Os ensaios foram realizados em frascos de 250 ml contendo 110 ml do hidrolisado. Para isso, o pH do hidrolisado concentrado foi ajustado para 2,0 utilizando NaOH (10M) e em seguida foi adicionado o carvão ativado (marca Synth) obedecendo a relação mássica de 1g carvão /40 g de hidrolisado hemicelulósico. Após essa mistura, os frascos foram submetidos à agitação de 150 rpm, por 60 minutos a 45 °C. Ao final da reação, a mistura foi centrifugada (946 x g por 20 min) para remoção do carvão e o obtenção do hidrolisado tratado.

4.2.3. *Saccharomyces cerevisiae*

Esse tratamento foi realizado segundo a metodologia descrita por Fonseca (2014). Foi empregada *Saccharomyces cerevisiae* comercial (Dr. Oetker® - Lote SET 2015 3 267) sob a forma liofilizada. Inicialmente, foi preparada uma suspensão contendo 5 g/L de células em base seca. Para o preparo desta suspensão, a massa desejada da levedura foi reidratada em água destilada esterilizada (massa seca/água destilada de 1:10), por período de 10 minutos à temperatura ambiente. A suspensão foi então centrifugada (946 x *g* por 20 min) e a massa obtida foi ressuspendida em hidrolisado concentrado, o qual teve seu pH

previamente ajustado para pH 3,0. Em seguida, a mistura (hidrolisado + levedura) foi então incubada em agitador giratório a 30°C, 200 rpm por 6 horas. Após este tempo, a mistura foi centrifugada(946 x g por 20 min) para remoção das células e o obtenção do hidrolisado tratado.

4.3. Ensaios Fermentativos

4.3.1. Seleção de uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* em meio semidefinido para produção de xilitol

Foram estudadas 4 linhagens de *Kluyveromyces marxianus* (NRRL Y-6860, 6373, 8287, 2265) as quais foram obtidas da Coleção de Culturas ARS, URSA, Peoria – IL, EUA. As linhagens foram mantidas repicadas em tubos de ensaio contendo ágar extrato de malte inclinados e conservada a 4 °C.

O inóculo foi preparado por meio da transferência de uma alçada das células recém-repicadas para tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada esterilizada. Alíquotas de 1 mL desta suspensão foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio semidefinido descrito por Castro e Roberto (2014) cuja composição foi (g/L) xilose: 30; $(NH4)_2SO_4$; 2,0; KH_2PO_4; 1,0; $MgSO_4 . 7H_2O$; 0,3 e extrato de levedura; 5,0. As soluções concentradas de cada nutriente foram preparadas separadamente e esterilizadas a 121 °C por 20 minutos com exceção da xilose que foi esterilizada a 111 °C durante 15 minutos.

Os frascos foram incubados em agitador rotatório (TE-420 TecnaL) a 200 rpm, 30 °C durante 24 horas. Após este tempo, as células foram separadas por centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos (centrífuga Jowan MR1812) e após duas etapas de lavagem com água destilada esterilizada, as células foram ressuspensas em 25 mL de água destilada esterilizada. Esta suspensão foi então utilizada para inocular o meio de fermentação com uma concentração celular de 1,0 g/l.

O meio de fermentação foi preparado com os mesmos nutrientes utilizados para o cultivo do inóculo, com exceção da xilose cuja concentração foi de 50 g/L. As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de fermentação, nas temperaturas de 30, 35, 40 e 45 °C com agitação de 200 rpm, por 48 horas. Amostras foram coletadas em intervalos de 12 horas para acompanhamento do crescimento celular, consumo de xilose, produção de xilitol, etanol e de ácido acético.

4.3.2. Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado sobre a produção de xilitol

O micro-organismo utilizado nestes experimentos foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-6373, a qual foi selecionada na etapa anterior. O inóculo foi preparado transferindo-se uma alçada de células, proveniente do repique em meio de manutenção, para tubos de ensaios contendo 5 ml de água destilada esterilizada. Alíquotas de 1 mL desta suspensão foram transferidas para frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL do meio de crescimento.

O meio de crescimento do inóculo foi preparado com o hidrolisado hemicelulósico concentrado conforme obtenção descrita no item 4.1.3. Inicialmente, o hidrolisado teve o pH ajustado para 5,5 utilizando solução de NaOH 10 M e então foi centrifugado a 946 x g por 20 minutos para remoção dos sólidos. Após a centrifugação, o hidrolisado foi diluído com água destilada esterilizada para ajustar a concentração de xilose em 30 g/L.

Os frascos foram incubados a 30°C em agitador rotatório a 200 rpm por 24 horas. Após este período, as células foram separadas por centrifugação a 946 x *g* por 20 minutos e ressuspendidas diretamente no meio de fermentação.

Os meios de fermentação utilizados nestes experimentos foram preparados da seguinte forma: hidrolisado concentrado (conforme descrito no item 4.1.3) com o pH ajustado para 5,5 pela adição de NaOH 10 M, centrifugação 946 x *g* por 20 minutos e diluição com água destilada esterilizada para obtenção da concentração inicial de xilose desejada (~50 g/L). Para a avaliação da suplementação nutricional, o hidrolisado, após correção de pH e diluição, foi suplementado com os mesmos nutrientes utilizados para o cultivo do inóculo.

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de fermentação, a 40 °C, sob agitação de 200 rpm por 72 horas. Amostras foram coletadas em intervalos de 12 horas para acompanhamento do crescimento celular, consumo de xilose, produção de xilitol, etanol e de ácido acético.

4.3.3. Avaliação da produção de xilitol em hidrolisado destoxificado

As condições de cultivo e preparo do inóculo utilizadas nestes ensaios foram às mesmas descritas no item 4.3.2.

Para serem utilizados como meios de fermentação, os hidrolisados obtidos após cada tratamento de destoxificação (4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3) tiveram seu pH ajustado 5,5 com NaOH 10 M sendo então centrifugados a 946 x *g* , por 20 minutos para remoção dos sólidos,

e em seguida diluído com água destilada esterilizada para obtenção de uma concentração inicial de xilose de 50 g/L. Como referência (não destoxificado), o hidrolisado hemicelulósico concentrado foi submetido ao mesmo procedimento de ajuste de pH e de diluição descrito para os hidrolisados destoxificados. Nesta etapa, os meios de fermentação não foram suplementados com nutrientes.

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de fermentação inoculado com uma concentração celular de 1,0 g/L. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm, 40 °C durante 120 horas. Amostras foram coletadas em intervalos de 24 horas para acompanhamento do crescimento celular, consumo de xilose, produção de xilitol, etanol e de ácido acético.

.

4.3.4. Efeito da presença de glicose no meio fermentativo sobre a produção de xilitol

Nessa etapa, o inóculo foi preparado com a levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-6373 e cultivado de maneira semelhante ao descrito no item 4.3.1. O meio de fermentação foi similar ao meio semidefinido descrito no item 4.3.1, porém nestes ensaios os meios foram suplementados com glicose nas concentrações iniciais de 6, 12, 18 g/L de glicose.

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de fermentação inoculado com uma concentração celular de 1,0 g/L. Os frascos foram incubados em agitador rotatório a 200 rpm, 40 °C durante 48 horas. Amostras foram coletadas em intervalos de 12 horas para acompanhamento do crescimento celular, consumo de xilose, produção de xilitol, etanol e de ácido acético.

4.4. MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1 Determinação do teor de umidade na palha de arroz

Amostras de aproximadamente 1 grama da palha de arroz foram colocadas em balança com secagem por ação de raios infravermelhos (Gehaka IV 2000). A secagem foi realizada a 105 ºC até obtenção de peso constante (variação de massa menor que 0,0005 g/min) e a umidade da palha de arroz foi calculada por diferença de peso antes e após a secagem.

4.4.2. Determinação dos teores de celulose, hemicelulose, lignina, grupo acetil e cinzas na palha de arroz.

Para a determinação da composição química da palha de arroz; foi empregada a metodologia baseada no protocolo padrão do *National Renewable Energy Labaratory* (SLUITER et al., 2012). Aproximadamente 300 mg de amostra (10% de umidade) foram transferidas para um tubo de ensaio de 25 mL, onde foram adicionados 3 mL de solução de H_2SO_4 (72% m/m). A mistura foi mantida em banho termostatizado a 30 ± 1,0 °C, por 60 minutos, sendo homogeneizada com bastão de vidro em intervalos de 10 minutos. Após esse tempo, a reação foi interrompida pela adição de 10 mL de água destilada e todo o conteúdo foi transferido quantitativamente para um frasco Erlenmeyer de 250 mL, onde foram adicionados 74 mL de água destilada. O frasco contendo o material foi fechado com papel alumínio e autoclavado a 1 atm, 121 °C, durante 60 minutos, para promover a hidrólise completa dos oligômeros restantes. Após autoclavagem, o frasco foi resfriado até temperatura ambiente e o material sólido foi separado da fração líquida por filtração utilizando papel de filtro previamente tarado. O hidrolisado ácido foi recolhido em um balão volumétrico e avolumado para 100 mL (Hidolisado ácido) e utilizado para a determinação da concentração dos açúcares monoméricos (glicose, xilose e arabinose) e de ácido acético, as quais foram utilizadas para o cálculo da porcentagem de celulose (equação 1), hemicelulose (equação 2), ácido acético (equação 3) e lignina solúvel (equação 4) presente na amostra de palha. A lignina solúvel foi analisada por espectroscopia de UV (Hitachi U1800) a um comprimento de onda de 205 nm, utilizando a metodologia descrita por Dence, 1992 apud Ferraz et al., 2000.

O resíduo sólido (RS) retido no papel de filtro (lignina insolúvel + cinzas) foi lavado com aproximadamente 1,5L de água destilada e secado em estufa a 105 °C até atingir peso constante. Para determinação das cinzas, cerca de 1 grama de palha de arroz foi transferida para cadinhos de porcelana previamente tarados e após calcinação em mufla elétrica com rampa de temperatura (105 °C por 12 minutos, 250 °C por 30 minutos, 575 °C por 3 horas), a temperatura da mufla foi diminuida para 105 °C e as amostras foram transferidas para um dessecador, onde permaneceram por 40 minutos, até pesagem em balança analítica. As cinzas foram determinadas pela diferença de peso das amostras, antes e após calcinação de acordo com a equação 5. A lignina insolúvel foi determinada pela diferença entre a massa do resíduo sólido (RS) e a massa de cinzas presente na amostra de palha, conforme equação 6.

$$\%Celulose = \left(\frac{C_{gli} x V_F x F_C}{M_S} \right) x100$$

Equação 1

$$\%Hemicelulose = \left(\frac{C_{xil+Arax} x V_F x F_H}{M_S} \right) x100$$

Equação 2

$$\%\ Acetil = \left(\frac{C_{AA} x V_F x F_A}{M_S} \right) x100$$

Equação 3

$$\%Lignina\ Solúvel = \left(\frac{A_{205} x dil_a x V_F}{\varepsilon x M_S x L} \right) x100$$

Equação 4

$$\%Cinzas = \left(\frac{Mc}{Ms} \right) x100$$

Equação 5

$$\%Lignina\ Insolúvel = \left(\frac{M_{RS} - M_C}{M_S} \right) x100$$

Equação 6

Onde: C_{gli} = concentração de glicose no hidrolisado ácido (g/L); $C_{xil + Ara}$ = concentração de xilose + arabinose no hidrolisado ácido (g/L);C_{AA} = concentração de ácido acético no hidrolisado ácido (g/L); V_F = volume final do HÁ (0,1 L); F_C= fator de conversão de glicose em celulose (0,90); F_H= fator de conversão de fator de conversão de xilose em hemicelulose (0,88); F_A= fator de conversão de ácido acético em acetil (0,72); M_S= massa da amostra de palha seca (g);.A_{205} = absorbância da amostra a 205 nm; dil = diluição amostra; ε = absortividade da lignina a 205 nm (105 L/g.cm); L = caminho óptico da cubeta (1cm); M_C= massa de cinzas (g); M_{RS}= massa do resíduo sólido (g).

4.4.3. Determinação da concentração de glicose, xilose, arabinose, xilitol, etanol e ácido acético

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, xilitol, ácido acético e etanol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), em equipamento Agilent Technologies 1260 Infinity com detector de índice de refração e coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 X 7,8 mm) (Hercules, CA, USA), nas seguintes condições: temperatura de 45 °C; eluente: ácido sulfúrico 0,005 M; fluxo do eluente 0,6 mL/min; volume de amostra de 20 µL. Para as análises, as amostras foram diluídas de forma que a concentração ficasse dentro da linearidade da curva previamente estabelecida. A diluição foi realizada com água deionizada e filtrada em Sep-Pack Cartidge C_{18} (Waters Associate – MILLIPORE). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

4.4.4. Determinação dos teores de furanos e fenólicos

As concentrações de furanos (furfural, 5-hidroximetilfurfural) e fenólicos (produto de degradação de lignina) de baixo peso molecular foram determinadas por HPLC, em equipamento Agilent Technologies 1260 Infinity utilizando detector UV (276 nm) e coluna Waters Spherisorb C18 5 µm ODS2 4,6 x 100 mm sob as seguintes condições: 25 °C; eluente: acetonitrila/água (1:8 com 1% de ácido acético); fluxo 0,8 mL/min; volume de amostra: 20 µL. As amostras foram diluídas cinco vezes com água deionizada e filtradas em membranas do tipo HSWP com poros de 0,45 µm (Waters Associate – MILLIPORE). As concentrações destes compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

4.4.5. Determinação da concentração celular da levedura *Kluyveromyces marxianus*

O crescimento celular da levedura *Kluyveromyces marxianus* foi acompanhado por medida da densidade ótica (DO) a 600 nm em espectrofotômetro (Hitachi U-1800). A massa de células, proveniente de amostras de volume conhecido, foi lavada com água destilada e devidamente diluída para uma faixa de leitura entre 0,05 a 0,5 unidades de DO. A concentração celular foi determinada utilizando uma equação obtida por regressão linear dos dados entre massa seca e absorbância a 600 nm.

4.4.6. Determinação dos parâmetros fermentativos de produção de xilitol

O fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$, g/g) foi calculado pela relação entre a concentração de xilitol formado (g/L) e a concentração de xilose consumida (g/L). O fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$, g/g) foi calculado pela relação entre a concentração de células formadas (g/L) e a concentração de substrato (glicose + xilose) consumido (g/L). O fator de rendimento de xilitol por célula ($Y_{P/X}$, g/g) foi determinado pela relação entre a concentração de xilitol formado (g/L) e a concentração de células presentes no meio de fermentação (g/L). A produtividade volumétrica em xilitol (Q_P, g/l.h) foi calculada pela relação entre a concentração de xilitol formado (g/L) e o tempo de fermentação (h). O coeficiente volumétrico de consumo de xilose (Q_S, g/l.h) foi calculado pela relação entre a concentração de xilose consumida (g/L) e o tempo de fermentação (h). A eficiência de produção de xilitol (η, %) foi calculada pela relação entre os valores de $Y_{P/S}$ obtido (g/g) e o valor máximo teórico para este parâmetro (0,917 g/g) de acordo com Barbosa et al. (1988). Este valor foi calculado utilizando como modelo biológico a levedura C*andida guilliermondii*.

4.4.7. Determinação do fator de severidade combinada

O fator de severidade combinada (SC) foi calculado de acordo com a equação 7, conforme proposto por Guo et al. (2008)

$$CS = \log\left\{ t \exp\left[\left(\frac{T_H - T_R}{14{,}75} \right) \right] \right\} - pH$$

Onde: *t* é o tempo de hidrólise (min); T_H é a temperatura de hidrólise (°C); T_R é a temperatura de referência (100 °C); pH ´é acidez da concentração ácida.

4.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas dos dados foram realizadas nos softwares *Statistica* 8.0 e *Design Expert* 6.0, nos quais foram obtidos modelos que descrevam as repostas avaliadas em função das condições experimentais empregadas. Os resultados foram expressos em tabelas de estimativas de efeitos, erro-padrão, teste t de *Student*, assim como tabelas de análise de variância (ANOVA) dos efeitos e da regressão do modelo e gráficos de superfície resposta.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

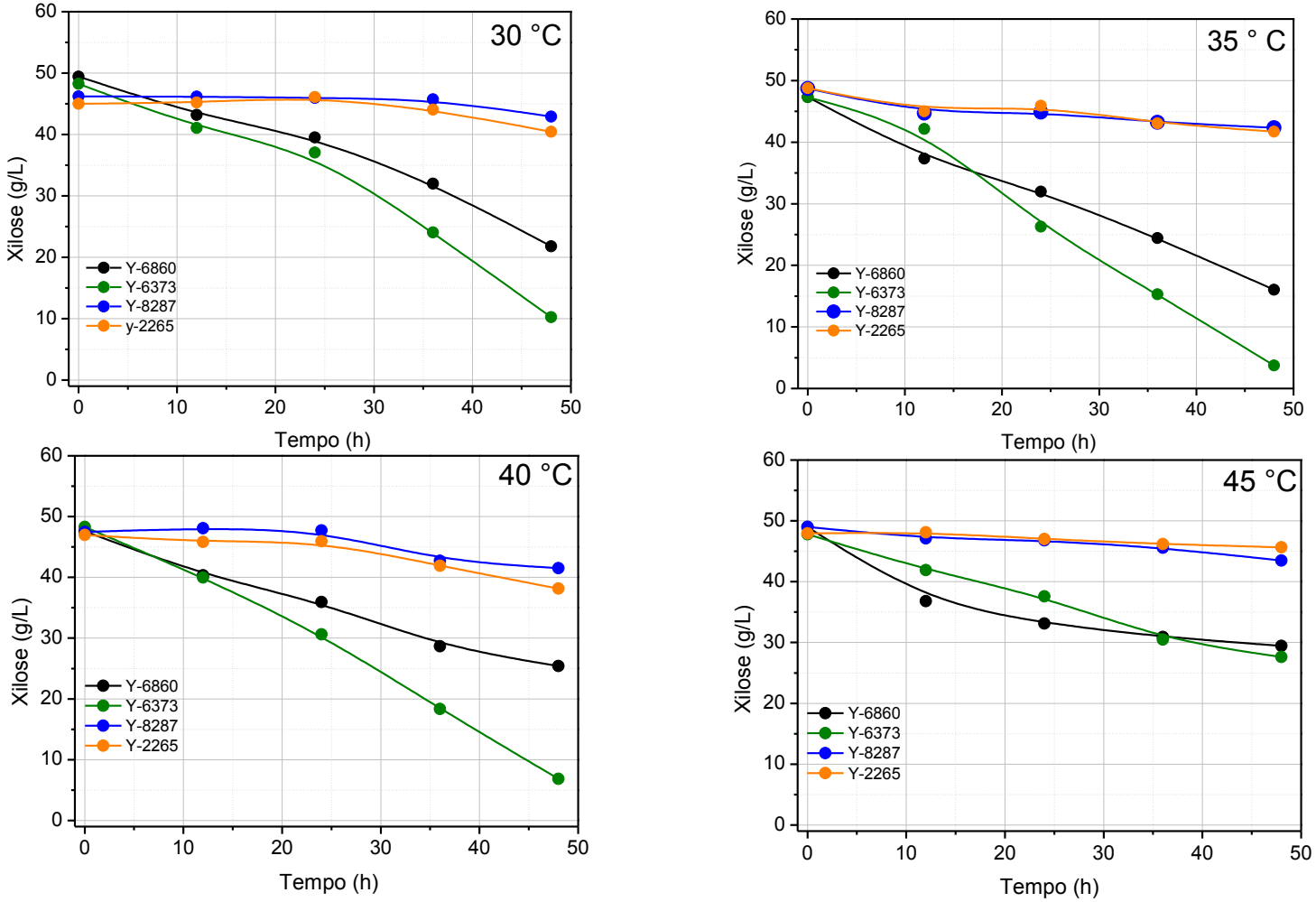
5.1. Seleção de uma linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* para a produção de xilitol

Para este estudo, foram avaliados os cultivos de quatro diferentes linhagens de *K. marxianus* (Y- 8287; Y-2265; Y- 6860 e Y- 6373) nas temperaturas de 30, 35, 40 e 45 °C em meio formulado com 50 g/L de xilose comercial como fonte de carbono.

A Figura 5.1 apresenta os perfis cinéticos do consumo de xilose para as quatro linhagens de *K. marxianus* avaliadas. Conforme pode ser visto, as linhagens Y-8287 e Y-2265 não foram capazes de utilizar eficientemente a xilose nas temperaturas estudadas, apresentando valores de assimilação abaixo de 20%, após 48 h de fermentação. Já para as linhagens Y- 6373 e Y- 6860, o consumo de xilose variou de 42 a 92% e de 40 a 66%, respectivamente de acordo com a temperatura empregada. Nota-se que para ambas as linhagens, o aumento da temperatura de 30 para 35 °C favoreceu a eficiência de consumo de xilose sendo alcançado com a linhagem Y- 6373 um incremento de 79 para 92%, enquanto que para a linhagem Y- 6860 este aumento foi de 56 para 66%, respectivamente. Nota-se ainda que, nas temperaturas mais elevadas (40 e 45 °C), a eficiência de assimilação de xilose pela Y-6373 decresceu para 86 e 42% após 48 h, respectivamente, ao passo que para Y-6860 estes valores foram ainda menores (47 e 40%). Estes resultados indicam a superioridade da linhagem Y-6373, em comparação às demais quanto à eficiência de consumo de xilose.

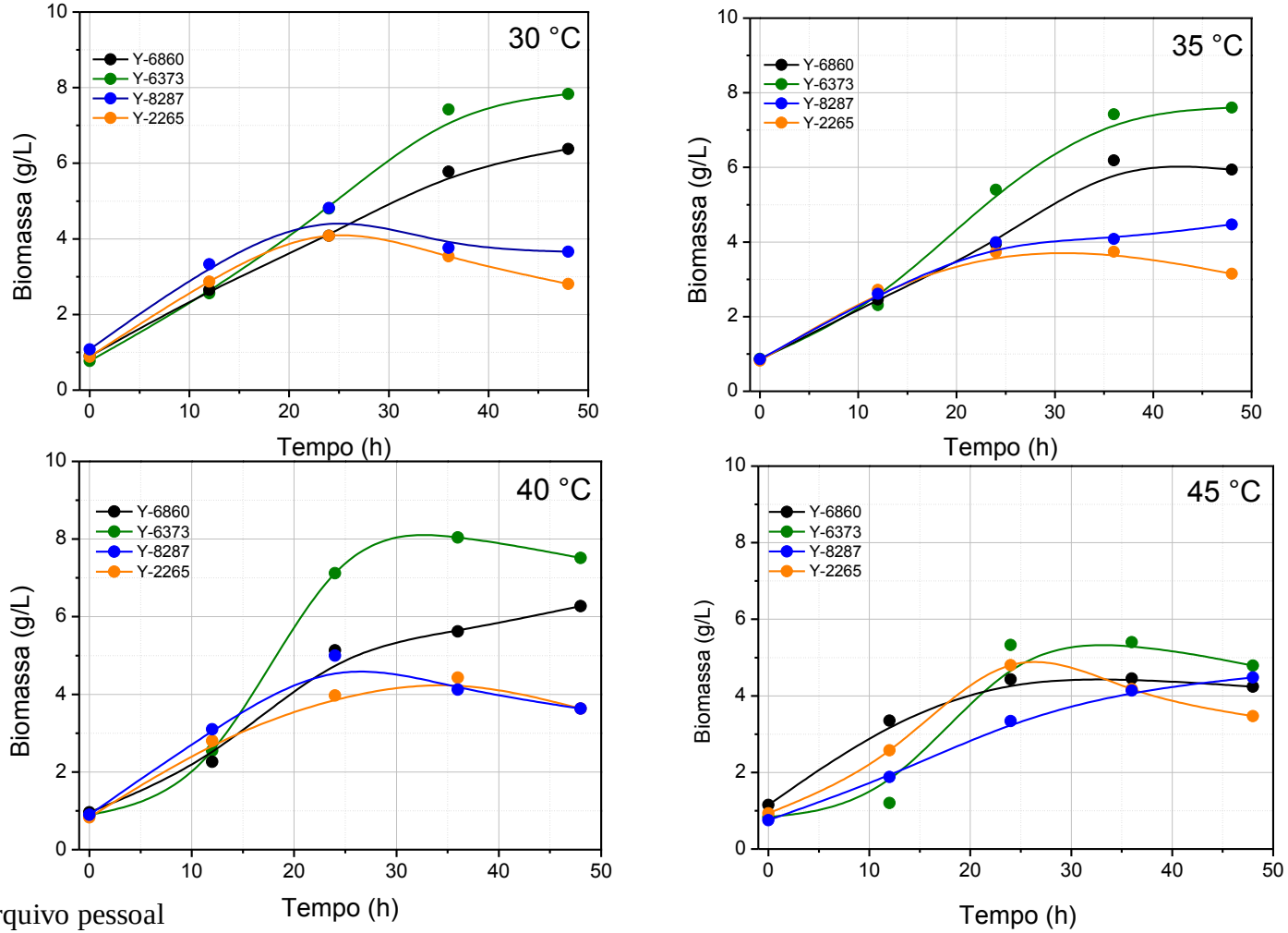
Como esperado, para as linhagens (Y-8287 e Y-2265) que apresentaram uma baixa assimilação da fonte de carbono, o crescimento celular foi também limitado, sendo obtido um valor máximo de biomassa de aproximadamente 4,0 g/L em todas as temperaturas estudadas (Figura 5.2). Para as linhagens Y-6373 e Y-6880 a concentração celular atingiu valores máximos de 7,5 e 6,0 g/L, respectivamente, nas temperaturas de 30, 35 e 40 °C. Com o aumento da temperatura para 45 °C, estes valores decresceram para 5,0 e 4,0 g/L, respectivamente. Na Figura 5.3, é apresentado o perfil cinético de formação de xilitol para as quatro linhagens de *K. marxianus.* Nota-se que, nas diferentes temperaturas estudadas, as linhagens Y-8287 e Y-2265 praticamente não produziram quantidades apreciáveis do produto ao longo do processo. Nota-se ainda que, exceto para temperatura de 45 °C, a concentração máxima de xilitol obtida pela linhagem Y- 6373 foi bastante superior a

Figura 5.1. Consumo de xilose por linhagens de *K. marxianus* em diferentes temperaturas, após 48 h de cultivo em meio semidefinido



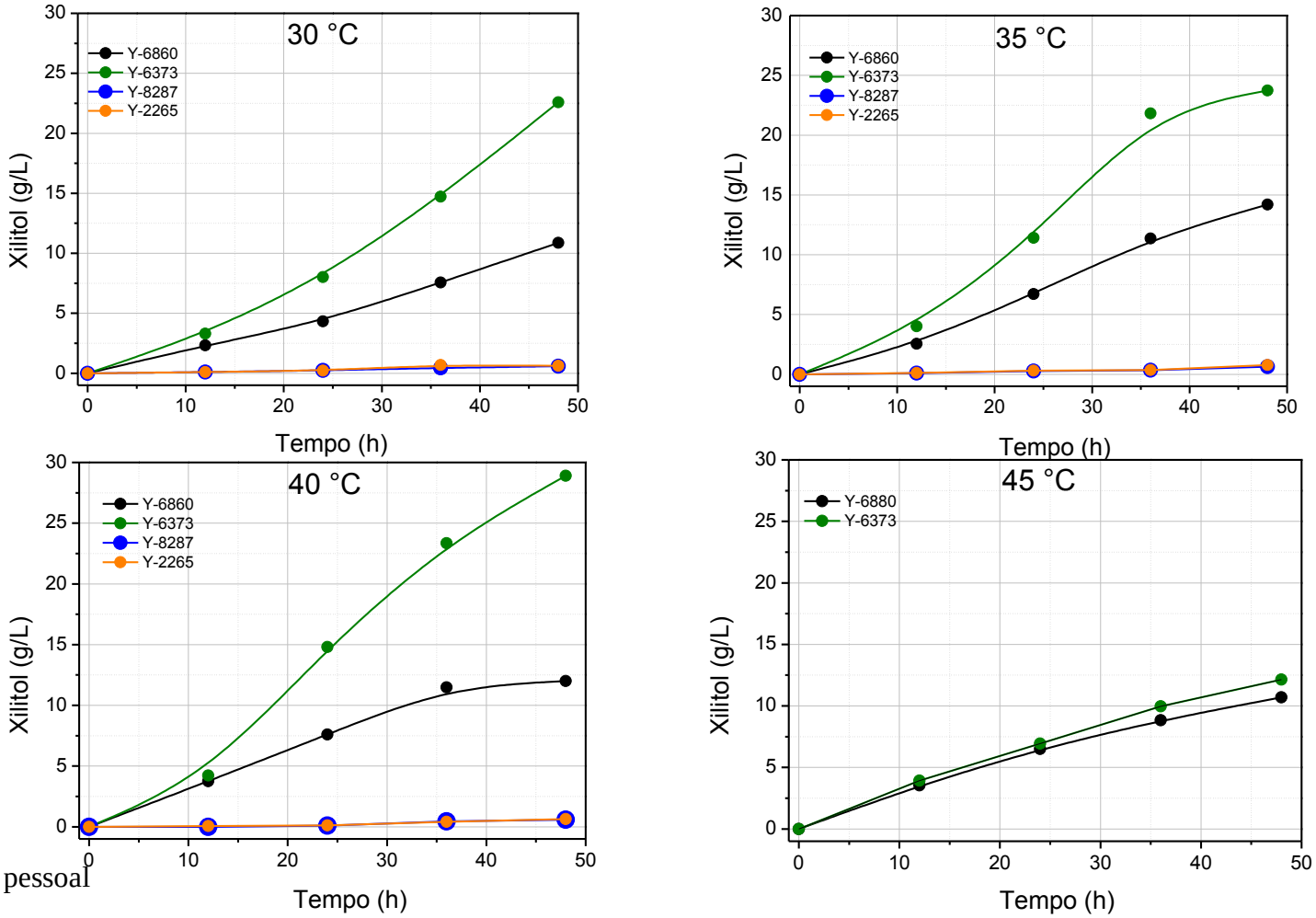
Fonte: Arquivo pessoal

Figura 5.2. Crescimento das linhagens de *K. marxianus* em diferentes temperaturas, após 48 h de cultivo em meio semidefinido



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 5.3. Produção de xilitol por linhagens de *K. marxianus* em diferentes temperaturas, após 48 h de cultivo em meio semidefinido



Fonte: Arquivo pessoal

alcançada pela linhagem Y- 6860. Estes valores foram de 22,5; 23,7; 28,9 e 12,1 g/L para a linhagem Y- 6373 e de 10,9; 14,2; 12,0 e 10,7 g/L para a linhagem Y-6880, nas temperaturas de 30, 35, 40 e 45 ^{o}C, respectivamente.

Para uma análise mais objetiva destes resultados, foram determinados os parâmetros fermentativos para as linhagens que apresentaram produção de xilitol nas diferentes temperaturas estudadas e os resultados estão mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Parâmetros fermentativos de *K. marxianus* em diferentes temperaturas, após 48 h de cultivo, em meio semidefinido contendo xilose como fonte de carbono.

Parâmetros	***K. marxianus* Y-6373**				***K. marxianus* Y-6860**			
Temperatura (° C)	30	35	**40**	45	30	35	40	45
Xilose inicial (g/L)	48,2	47,3	**48,3**	47,8	49,4	47,3	47,6	48,9
Xilose final (g/L)	10,2	3,7	**6,9**	27,6	21,8	16,0	25,4	29,5
Biomassa inicial (g/L)	0,77	0,87	**0,83**	0,83	0,90	0,85	0,96	1,15
Biomassa final (g/L)	7,83	7,60	**7,50**	4,79	6,83	5,89	6,27	4,24
Xilitol produzido (g/L)	22,6	23,7	**28,9**	12,1	10,9	14,2	12,0	10,7
Xilose consumida (%)	79	92	**86**	42	56	66	47	39
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,20	0,17	**0,16**	0,17	0,22	0,17	0,21	0,16
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,59	0,54	**0,70**	0,60	0,39	0,47	0,54	0,54
$Y_{P/X}$ (g/g)	2,95	3,17	**4,37**	3,53	1,77	2,76	2,57	3,37
Q_P (g/L h)	0,47	0,51	**0,60**	0,25	0,23	0,30	0,25	0,22
Q_S (g/L,h)	0,79	0,91	**0,85**	0,42	0,57	0,65	0,46	0,40
η(%)	65	62	**77**	66	43	52	59	59

É possível observar na Tabela 5.1 um aumento no fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$) e de produtividade volumétrica (Q_P) com a elevação da temperatura até 40 °C para as duas linhagens avaliadas. O maior valor para o fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$ = 0,70 g/g) foi obtido com a linhagem Y-6373 na temperatura de 40 ^{o}C. Além disso, nota-se que nesta condição de temperatura foi também observado o maior consumo de xilose (85%) e a máxima produção de xilitol (28,9 g/L). Vale ressaltar que a concentração máxima de xilitol obtida a partir da linhagem Y-6373 foi praticamente o dobro da obtida com a linhagem Y-6860 na mesma temperatura, o que significa um

aumento significativo nos valores de produtividade volumétrica em xilitol (Q_P= 0,60 g.L/h) para aquela linhagem.

De uma forma geral, os estudos de produção de xilitol têm sido realizados, em sua grande maioria, com leveduras do gênero *Candida*, as quais exibem produção ótima deste poliol na faixa de temperatura de 28 a 35 °C. (RAFQUL; SAKINAH, 2013). No entanto, a condução do bioprocesso acima desta faixa de temperatura, utilizando leveduras termotolerantes, apresenta algumas vantagens, incluindo a redução dos custos de resfriamento do processo, aumento das velocidades de conversão e menor risco de contaminação (BANAT, 1998). Dentro deste contexto, estudos recentes têm sido focados para a seleção de leveduras termotolerantes (naturais ou geneticamente modificadas), especialmente espécies de *K. marxianus*, capazes de converter eficientemente a xilose em xilitol. Além das vantagens citadas anteriormente, o interesse pela *K. marxianus* reside no seu status GRAS (Generally Regarded as Safe), ou seja não apresenta riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações nas indústrias de alimentos e farmacêutica.

Mueller et al., (2011), avaliando a produção de xilitol a partir de cinco cepas termotolerantes de *K. marxianus* em meio contendo 20 g/L de xilose, numa faixa de temperatura de 25 a 45 °C, constataram que a temperatura de incubação teve uma forte influência sobre a produção de xilitol, sendo que a média das maiores concentrações foram obtidas a 40 °C (6,24 g/L após 96 h) e as menores a 25 °C (1,09 g/L após 144 h). Com a cepa selecionada (*K. marxianus* IMB2) os autores investigaram o bioprocesso na temperatura ótima (40 °C) em meios contendo uma concentração inicial de xilose de 50 g/L. Nestas condições, a produção atingiu cerca de 24,09 g/L após 120 h ($Y_{P/S}$ = 0,90 g/g e Q_P = 0,24 g/L,h), porém a levedura apresentou um ineficiente consumo de xilose (X_C = 47,5%). Estes resultados quando comparados aos obtidos no presente trabalho ($Y_{P/S}$ = 0,70 g/g; Q_P = 0,60 g/L.h e X_C = 86%) demonstram o grande potencial da levedura *K. marxianus* Y- 6373 para a produção de xilitol.

Recentemente, Zhang et al. (2014), avaliaram a produção de xilitol em temperaturas elevadas (37, 42 e 45 °C) empregando cepas de *Kluyveromyces marxianus* modificadas geneticamente. Dentre as várias cepas recombinantes estudadas, a *K. marxianus* YZJ015 se destacou pelos resultados obtidos a partir de 50 g/L de xilose. Com esta cepa, os autores obtiveram a melhor produção de xilitol (35,6 g/L de xilitol, após 24 h) na temperatura de 42°C. Nestas condições, o fator de conversão em xilitol ($Y_{P/S}$) foi de 0,72 g/g e a produtividade volumétrica de 1,48 g/L.h. Estes resultados se comparam de forma

satisfatória aos obtidos no presente trabalho uma vez que o valor de $Y_{P/S}$ da linhagem modificada geneticamente com superexpressão dos genes de xilose redutase foi similar ao da linhagem Y-6373 selecionada no presente trabalho, sem qualquer modificação genética. Além disso, os menores valores de produtividade volumétrica obtidos no presente estudo podem ser melhorados através da otimização das condições de processo.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a levedura *K. marxianus* Y-6373 é uma candidata em potencial para conversão de xilose em xilitol, sendo a temperatura de 40°C selecionada para a condução dos experimentos nas etapas seguintes.

5.2. Avaliação das condições de tratamento alcalino da palha de arroz sobre a remoção dos grupos acetil

De acordo com a literatura, o ácido acético é um potente inibidor do metabolismo microbiano e, portanto, a extração dos grupos acetil que se encontram esterificados com a estrutura hemicelulósica da biomassa, constitui uma importante estratégia para reduzir a liberação de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico obtido por catálise ácida, melhorando assim sua fermentabilidade. O objetivo do tratamento alcalino, empregando condições operacionais brandas, é promover a solubilização do acetato no licor alcalino (desacetilação), sem degradar ou remover os principais polissacarídeos da estrutura lignocelulósica (celulose e hemicelulose). Segundo Chen et al. (2011), a remoção bem sucedida de grupos acetil a partir da biomassa lignocelulósica empregando extração alcalina diluída, pode potencialmente aumentar a produção de xilose monomérica durante o processo de hidrólise, melhorar a digestibilidade de celulose, e reduzir a toxicidade do licor de fermentação. No entanto, essas reações não são totalmente seletivas para remoção do acetil, e dependem do tipo de biomassa empregada, sendo então necessário definir as condições de reação que permitam maior extração do acetato sem comprometer as frações açucaradas.

Visando estabelecer as melhores condições para realização deste tratamento, foi proposto um planejamento experimental para avaliar o efeito da temperatura (50 a 70 ° C) e da carga de álcali (20 a 80 mg de NaOH/g de biomassa) sobre a desacetilação da palha de arroz. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer conforme descrito no item 4.1.2 de materiais e métodos e os resultados estão mostrados na Tabela 5.2. Observa-se que os

Tabela 5.2. Composição química da palha de arroz antes e após o tratamento alcalino, sob diferentes condições operacionais.

Ensaio	Variáveis Independentes[a]		Composição da palha tratada (g/100 g)					SR[b] (%)	Remoção durante o tratamento alcalino (%)				
	X_1	X_2	Cel	Hemi	Lig	Cinzas	Acetil		Cel	Hemi	Lig	Cinzas	Acetil
1	50	20	37,9	24,2	16,3	9,7	2,0	91,0	2,3	7,5	15,2	21,9	30,0
2	70	20	37,6	24,3	15,6	9,9	1,8	93,5	< 0,5	4,5	16,6	18,1	35,3
3	50	80	42,4	27,5	13,3	5,9	0,2	82,8	< 0,5	4,3	37,1	56,8	93,6
4	70	80	43,3	27,3	12,5	5,7	0,04	80,5	1,2	7,7	42,5	59,4	98,8
5	60	60	41,5	26,8	14,5	6,2	0,3	83,9	1,4	5,5	30,5	53,9	90,3
6	60	60	42,1	26,7	15,2	6,9	0,2	86,9	0	2,5	24,5	46,9	93,3
7	60	60	40,7	26,4	15,7	6,8	0,3	85,2	1,8	5,5	23,6	48,7	90,2
8	50	60	41,8	26,9	14,9	7,1	0,4	82,1	2,8	7,2	30,1	48,4	87,4
9	70	60	42,2	28,1	14,3	6,2	0,3	84,6	0	< 0,5	30,8	53,6	90,2
10	60	20	38,1	24,7	15,8	9,6	1,7	86,2	6,9	10,5	22,2	26,8	43,6
11	60	80	42,1	26,7	13,7	4,6	0,2	81,9	2,3	8,1	35,9	66,7	93,7
PNT[c]	**-**	**-**	**35,3**	**23,8**	**17,5**	**11,3**	**2,6**	**100**	**-**	**-**	**-**	**-**	**-**

[a] X_1 = temperatura(°C); X_2 = (mg NaOH/g palha); SR [b]= % de sólidos recuperados após tratamento; PNT [c] = (palha não tratada), Cel = celulose; Hemi = hemicelulose; Lig = lignina.

teores de celulose e de hemicelulose não variaram fortemente nas condições avaliadas (de 37,6 % no ensaio 2, a 43,3 % no ensaio 4) e (de 24,2% no ensaio 1, a 28,1% no ensaio 9), respectivamente. Considerando as variações de massa recuperada após cada tratamento, as perdas observadas nestas frações foram pequenas e atingiram um valor máximo de 6,9 e 10,5 %, respectivamente, na condição do ensaio 10. Observa-se ainda que, os teores de lignina também variaram com as condições de reação (de 13,3% no ensaio 3, a 16,3% no ensaio 1) sendo a maior remoção desta fração (42,5%) obtida no ensaio 4.

As maiores variações estruturais da palha, após o tratamento alcalino, foram observadas na fração de cinzas e acetil (Tabela 5.2). É possível observar nesta tabela que a remoção destes componentes foram mais acentuadas nas maiores cargas de NaOH empregada, independentemente da temperatura. De fato, a remoção de acetil atingiu valores acima de 87% quando se empregou 60 ou 80 mg NaOH/g de palha, enquanto que para a carga de 20 mg de NaOH/g de palha, estes valores decresceram para aproximadamente 30-40%. A maior remoção de acetil (98,8%) foi observada nas condições do ensaio 4 (70 °C, 80 mg de NaOH /g de palha, 45 min). Nestas condições, foram removidas 42,5% de lignina e 59.4% de cinzas com pequenas perdas nas frações de celulose (1,2 %) e de hemicelulose (7,7%). Chen et al. (2011), encontraram um valor inferior de remoção de acetil (75 % m/m) durante o tratamento alcalino da palha de milho com uma carga de 48 mg de NaOH/ g de material, a 80 °C por 3 h. Este resultado foi 30 % inferior ao obtido no presente estudo e, embora os autores tenham utilizado uma carga inferior de NaOH, tanto a temperatura quanto o tempo de reação foram superiores. No trabalho de Chen et al. (2012) foi constatado que, o impacto da desacetilação sobre composição química da palha de milho é altamente dependente da variedade do vegetal. Neste estudo, o tratamento foi conduzido com 48 mg de NaOH, 70 °C por 3 h e os autores encontraram uma variação de 55 a 68% na remoção de acetil, em função da variedade de palha de milho empregada.

Para definir as condições de temperatura e carga de NaOH que maximizam a remoção dos grupos acetil a partir da palha de arroz, foram realizadas análises estatísticas dos dados. As estimativas dos efeitos, os erros-padrão, o teste *t* de Student e os níveis de significância para o modelo que representa a remoção de grupos acetil em função da temperatura (X_1) e carga de NaOH (X_2), estão mostrados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de Student e nível de significância para o modelo que representa a remoção de grupos acetil durante o tratamento alcalino da palha de arroz**.**

Parâmetro	Coeficientes	Erros-padrão	$t_{estatístico}$	*p-valor*
Constante	83,5768	1,97013	38,5730	*0,0000**
Temperatura (X_1)	2,21667	1,39904	1,4458	*0,2079***
NaOH (X_2)	29,5333	1,39904	19,2839	*0,0000**
$X_1 . X_2$	-0,1541	1,8425	-0,0836	*0,9366****
X_1^2	–3,39211	2,15308	-1,4392	*0,2096***
X_2^2	–15,4821	2,47113	-5,7233	*0,0023**

*****significativo ao nível de 99% de confiança; **significativo ao nível de 80% de confiança; ***não significativo.

Como pode ser visto na Tabela 5.3, o efeito principal da carga de NaOH (X_2), assim como o termo quadrático desta variável são significativos ao nível de 99% de confiança (p<0,01).Vale ressaltar que, embora o efeito da temperatura (principal e quadrático) não tenha mostrado um alto nível de significância (p<0,2), esta variável foi relevante para obtenção de um modelo com elevado ajuste. Nota-se ainda, que a interação entre temperatura e carga de NaOH ($X_1.X_2$) não foi significativa ao processo (p = 0,9366), ou seja, o efeito da carga de NaOH, independe da temperatura utilizada no tratamento. Neste caso, esta interação foi excluída do modelo.

A análise de variância (ANOVA) da regressão do modelo mostrada na Tabela 5.4, confirmou a relevância estatística do modelo obtido (*p<0,0001*) com elevado coeficiente de determinação (R^2= 0,98). Isto significa que os dados experimentais se ajustam bem ao modelo quadrático selecionado e, portanto o efeito das variáveis temperatura e carga de NaOH sobre a resposta avaliada (remoção de grupos acetil durante o tratamento alcalino da palha de arroz) pode ser descrito pela Equação 1.

$$\hat{Y}_1 = 83{,}6 + 2{,}2X_1 + 29{,}5X_2 - 3{,}4X_1^2 - 15{,}5X_2^2 \qquad \text{Equação 1}$$

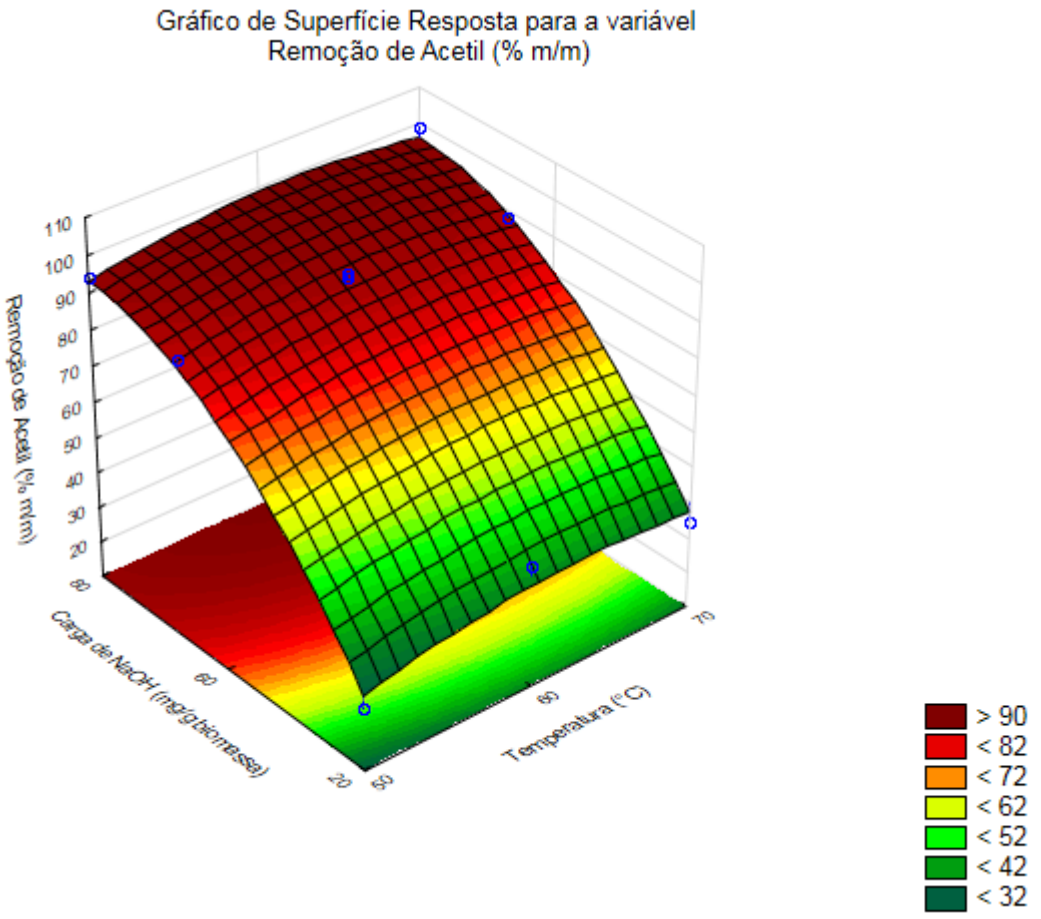
Onde: $\hat{Y}_1$ representa o valor estimado da remoção de acetil (%); X_1 e X_2 representam os níveis codificados das variáveis temperatura e carga de NaOH, respectivamente.

Tabela 5.4. Analise de variância (ANOVA) de regressão do modelo representativo da remoção de grupos acetil a partir da palha de arroz tratada sob diferentes condições de temperatura e carga de NaOH**.**

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	*F*	*p-valor*
Modelo	6921,86	4	1730,47	147,35	*<0,0001*
Residuo	70,4635	6	11,7439		
Total (corr)	6992,33	10			
		R^2 = 0,98			

Através da equação obtida para o modelo $\hat{Y}_1$, foi possível construir uma representação tridimensional da superfície de resposta que representa o efeito da temperatura e carga de NaOH sobre a remoção de acetil durante o tratamento alcalino da palha de arroz. De acordo com o modelo obtido, a máxima remoção de acetil (97,2%) pode ser alcançada empregando as seguintes condições de tratamento alcalino: (70 °C, 80 mg de NaOH /g de palha, 45 min). Nestas condições do processo, as remoções de lignina e de cinzas foram de 41,3 e 62,3%, respectivamente. Estas remoções poderão impactar positivamente as etapas posteriores de processamento desta biomassa, uma vez que, a lignina é responsável pela liberação de inibidores no hidrolisado hemicelulósico obtido por catálise ácida, sendo assim sua remoção é favorável. Além disso, a permanência de lignina no resíduo sólido juntamente com as cinzas pode aumentar a recalcitrância da biomassa frente ao processo de hidrólise enzimática da celulose. Portanto, pode-se dizer que a palha de arroz tratada sob as condições de tratamento alcalino otimizadas, produziu um sólido com características favoráveis para obtenção tanto do hidrolisado hemicelulósico quanto do celulósico.

Figura 5.4. Superfície de resposta descrita pelo modelo $\hat{Y}_1$ que representa o valor estimado da remoção de acetil em função da temperatura e carga de NaOH.



Fonte: Arquivo pessoal

Após definição das condições de temperatura (70 °C) e carga de NaOH de 80 mg NaOH/g de palha para o tratamento alcalino da palha, foram realizados ensaios em reator de 50 L visando a obtenção de uma maior quantidade de palha tratada para os estudos referentes a otimização das condições de hidrólise com ácido diluído, assim como para obtenção do hidrolisado necessário para os testes fermentativos.

A Tabela 5.5, mostra os resultados da composição química da palha de arroz antes e após o tratamento alcalino realizado em reator, sob as condições previamente definidas, assim como a massa de biomassa recuperada e a remoção de cada fração.

Tabela 5.5. Composição química, massa recuperada e remoção de cada fração da palha de arroz após tratamento em reator de 50L empregando uma relação sólido líquido de 1:10, 80 mg de NaOH/ g de palha na temperatura de 70 °C por 45 min.

Componentes	**Composição (g/100g)**		**Massa recuperada* (g)**	**Remoção (%)**
	In natura	**Tratada**		
Celulose	**35,3**	**42,8**	**34,2**	**3,1**
Hemicelulose	**23,8**	**28,3**	**22,6**	**5,0**
Xilana	*19,9*	*23,9*	*19,1*	4,0
Arabinana	*3,9*	*4,4*	*3,5*	10,2
Grupos acetil	**2,6**	**0,5**	**0,4**	**84,6**
Lignina total	**17,5**	**16,5**	**13,2**	**24,6**
Lignina insolúvel	*13,0*	*11,5*	*9,2*	29,2
Lignina solúvel	*4,5*	*3,7*	*2,9*	20,0
Cinzas	**11,3**	**6,4**	**5,1**	**54,8**
Outros	9,5	5,5	4,4	48,8
Total	**100**	**100**	**80,0**	**20,0**

* Calculada considerando a recuperação de 80% de sólidos.

Nota-se que após o tratamento alcalino, o rendimento de recuperação da palha de arroz foi da ordem de 80%. Como esperado, o grupo acetil foi o principal componente removido (84,6%), restando 0,4 g a partir de 2,6 g presente na palha original. Nesta etapa, a remoção de cinzas e de lignina total foi também relevante (54,8 e 24,6%, respectivamente), enquanto que a frações polissacarídicas (celulose e hemicellulose) foram eficientemente recuperadas, ou seja, apenas uma pequena porção destes componentes foi perdida após o tratamento (≤ 5%).

O licor alcalino produzido nesta etapa foi quantificado quanto à solubilização de açúcares, compostos fenólicos e acetato (Tabela 5.6). Verifica-se que os principais compostos liberados foram o acetato (2,1 g/L) e os ácidos hidroxicinâmicos (0,463 g/L de ferúlico e 0,26 g/L de p-cumárico).

Tabela 5.6. Composição química do licor alcalino obtido durante o tratamento da palha de arroz em reator nas seguintes condições (relação sólido líquido de 1:10, 80 mg de NaOH/ g de palha, temperatura de 70 °C e tempo de residência de 45 min).

Componentes	**Concentração (g/L)**
Glicose	nd
Xilose	nd
Arabinose	nd
Acetato	2,1 ± 0,1
Álcool vanilil	0,030 ± 0,001
Ácido vanílico	0,038 ± 0,005
Vanilina	0,027 ± 0,001
Ácido ferúlico	0,463 ± 0,001
Ácido p-cumárico	0,260 ± 0,002

nd = não detectado

Considerando o teor de grupos acetil presente na palha *in natura*, a recuperação de acetato no licor alcalino foi de 60 %. Porém, de acordo com a Tabela 5.5, a remoção de acetil após o tratamento atingiu 84 %, o que potencialmente poderia solubilizar até 3,0 g/L de acetato no licor. Esta diferença pode ser explicada pelo fato de que, no presente trabalho, a quantificação do acetato no licor se referiu apenas a sua forma livre. De acordo com Chen et al. (2012), no licor alcalino, o acetato está presente em duas formas: 1) livre (acetato/ácido acético) liberado a partir da xilana; e 2) ligado (grupos acetil covalentemente ligados aos oligômeros de xilana solubilizados). Assumindo esta hipótese, os resultados do presente trabalho sugerem que 24% do acetato solubilizado no licor alcalino encontram-se ligado em oligomeros de xilana.

A presença de ácidos hidroxicinâmicos no licor alcalino era também esperada, uma vez que a palha de arroz pode conter de 5 a 15% de ácidos hidroxicinâmicos com base no teor de lignina total (SUN et al., 2002) e que estes ácidos fenólicos são facilmente liberados durante o tratamento alcalino (BURANOV; MAZZA, 2008; MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2007). Visando estudar a separação e concentração de ácidos hidroxicinâmicos a partir de um licor alcalino de palha de arroz, Li et al. (2015) também constataram que os principais compostos fenólicos solubilizados no licor foram o ácido ferúlico e p-cumárico com concentrações de 0,634 e 0,180 g/L, respectivamente. Quando comparado ao presente trabalho, nota-se que a concentração de ácido ferúlico foi 37% inferior, enquanto que o ácido p-cumárico foi superior em 44%. Estas diferenças podem

ser atribuídas as diferentes condições experimentais utilizadas. No trabalho de Li et al. (2015) foi empregada uma solução de 0,5 M NaOH com uma relação sólido:líquido de 1:10 em temperatura de 120 °C por 2 h. Além dos ácidos hidroxicinâmicos, os autores também encontraram outros compostos fenólicos, incluindo o p - hidroxibenzaldeído, vanilina, ácido vanílico, e siringaldeído nas concentrações de 0,117; 0,052; 0,042 e 0,038 g/L, respectivamente.

5.3. Avaliação das condições de hidrólise ácida da palha de arroz desacetilada na recuperação da fração hemicelulósica

Estes ensaios foram propostos para avaliar a recuperação de açúcares da fração hemicelulósica da palha de arroz desacetilada em meio ácido, sob diferentes condições de reação. Nesta etapa, foi utilizado um planejamento experimental composto de 2^2 com face centrada para avaliar a influência das variáveis tempo (de 30 a 90 min) e concentração de ácido sulfúrico (de 0,5 a 1,5% m/v). Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer mantendo-se a relação sólido:líquido de 1:10 e temperatura de 121 °C, conforme descrito no item 4.1.3 de materiais e métodos.

Paralelamente, foram também conduzidos ensaios com a palha *in natura* para uma análise comparativa do comportamento da reação de hidrólise. Os hidrolisados obtidos nas diferentes condições de reação foram quantificados quanto aos teores de açúcares (glicose, xilose e arabinose) e de compostos inibidores ao metabolismo microbiano, incluindo os furanos (furfural, hidroximetilfurfural), ácido acético, e ácidos fenólicos (ferúlico e p-cumárico) e os resultados estão mostrados na Tabela 5.7.

Com relação aos inibidores (furanos e ácidos fenólicos), verifica-se que a solubilização destes compostos variou com as condições de hidrólise em ambas as palhas avaliadas (*in natura* e desacetilada), sendo os maiores níveis dos furanos observados sob as condições mais severas de processo (ensaio 4), onde as reações foram realizadas no maior tempo de reação (90 min) e maior concentração ácida (1,5%), enquanto para os ácidos fenólicos os maiores níveis foram observados no maior tempo de reação (90 min) e concentração ácida intermediária (1,0%).

Nota-se que, os furanos (furfural e HMF) foram encontrados em pequenas quantidades nos hidrolisados obtidos (< 0,4 g/L), o que demonstra uma baixa degradação

Tabela 5.7. Composição química dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos sob as diferentes condições de operação do processo**.**

Ensaio	Palha	Variáveis		SC	Açúcares (g/L)			Furanos (mg/L)		Ácidos (mg/L)			EHH (%)
		Tempo (min)	H_2SO_4 (%)		Gli	Xil	Ara	Furfural	HMF	Acético	Ferúlico	*p*-Cumárico	
1	Desacetilada	30	0,5	1,10	0,1	2,8	4,2	13,0	11,3	nd	24,8	80,8	21,8
	In natura				0,1	1,6	2,2	10,9	35,9	0,4	27,2	105,0	14,7
2	Desacetilada	90	0,5	1,58	0,2	10,6	4,5	81,9	13,9	nd	31,1	94,9	46,9
	In natura				0,3	6,5	2,4	53,6	55,2	0,9	53,0	192,5	34,4
3	Desacetilada	30	1,5	1,58	0,6	16,6	4,7	70,6	8,5	nd	45,7	108,1	66,2
	In natura				0,6	13,9	2,7	52,0	53,1	1,3	56,7	184,5	64,1
4	Desacetilada	90	1,5	2,06	1,8	20,3	4,4	328,1	27,5	0,1	34,4	56,8	76,8
	In natura				1,8	17,5	2,9	293,8	100,5	1,7	79,4	120,0	78,7
5	Desacetilada	30	1,0	1,41	0,3	13,6	4,8	39,2	3,9	nd	34,1	112,9	57,2
	In natura				0,3	8,8	2,3	35,1	55,8	0,9	52,0	198,7	42,8
6	Desacetilada	90	1,0	1,88	1,4	20,4	5,0	222,8	23,4	nd	48,9	91,4	79,0
	In natura				1,5	17,4	2,6	198,4	91,1	1,9	78,3	163,0	77,2
7	Desacetilada	60	0,5	1,41	0,1	6,6	4,5	44,1	6,2	nd	23,2	94,3	34,5
	In natura				0,3	3,6	2,4	25,1	48,4	0,6	32,5	153,6	23,2
8	Desacetilada	60	1,5	1,89	1,4	17,8	4,3	208,3	13,5	nd	34,1	66,9	68,7
	In natura				1,6	18,2	2,5	179,5	69,8	1,8	73,6	110,2	86,9
9*	Desacetilada	60	1,0	1,71	0,7	17,9	4,8	98,3	8,7	nd	49,2	116,6	70,9
	In natura				0,8	15,9	3,0	81,9	75,0	1,5	69,1	212,1	69,9

*média dos pontos centrais; HMF = hidroximetilfurfural; SC = severidade combinada; EHH = eficiência de hidrolise da hemicelulose (xilana + arabinana).

dos açúcares durante o processo de hidrólise ácida. Apesar disso, é importante observar que os níveis de furfural nos hidrolisados da palha desacetilada foram ligeiramente superiores aos observados nos hidrolisados da palha *in natura*, enquanto que os teores de HMF mostrou um comportamento inverso. Estes resultados sugerem que a palha desacetilada é mais susceptível as reações de desidratação das pentoses. As maiores concentrações destes compostos (328 mg/L de furfural e 100,5 mg/L de HMF) foram obtidas nas condições do ensaio 4 (90 min e 1,5% de ácido) empregando a palha desacetilada e *in natura*, respectivamente.

Quanto ao ácido acético, nota-se que este composto não foi detectado nos hidrolisados obtidos a partir da palha desacetilada, o que já era esperado, devido à etapa de desacetilação da biomassa. Por outro lado, nos hidrolisados obtidos a partir da palha *in natura* os níveis deste ácido variaram de 0,4 até 1,9 g/L. De acordo com Fengel; Wegener (1989), a concentração de ácido acético liberada depende das condições do processo e do tipo de biomassa, e relaciona-se fortemente com a frequência do grupamento acetil presente no material. Mussatto e Roberto (2005) estudando o efeito da concentração ácida, tempo e relação sólido-líquido sobre a composição do licor hemicelulósico do bagaço de malte constataram que a concentração de ácido acético variou de 0,76 a 1,39g/L. Com base nos teores de grupos acetil do bagaço de malte (1,35% m/m), estima-se que a recuperação máxima de ácido acético foi de 59%, sendo este resultado similar ao obtido no presente trabalho que foi de 53 % para a palha *in natura*.

Além do furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético, todos os hidrolisados obtidos continham ácidos fenólicos (ferúlico e p-cumárico), em concentrações que variaram de acordo com a palha utilizada (*in natura* ou desacetilada). Nota-se ainda que, para ambas as palhas avaliadas, os níveis do ácido p-cumárico foram superiores aos de ácido ferúlico. Os dados revelam que as proporções ferúlico/p-cumárico nos hidrolisados variaram de 0,2 até 0,66, e que quando comparadas ao licor alcalino que apresentou uma proporção de 1,7, revelam um comportamento inverso de solubilização. Estas diferenças podem ser explicadas pelas ligações moleculares dos ácidos hidroxicinâmicos junto ao complexo: lignina - carboidrato. Os ácidos fenólicos, especialmente ferúlico e p-cumárico, estão diretamente envolvidos na associaçãoda lignina com as hemiceluloses da parede celular. As principais formas de interação molecular estão bem estabelecidas e envolvem principalmente ligações éster com os carboidratos e éter com as unidades condensadas da lignina (BURANOV E MAZZA 2008). Portanto, o tratamento alcalino favorece a clivagem da ligação éster, promovendo maior solubilização do ácido ferúlico no licor

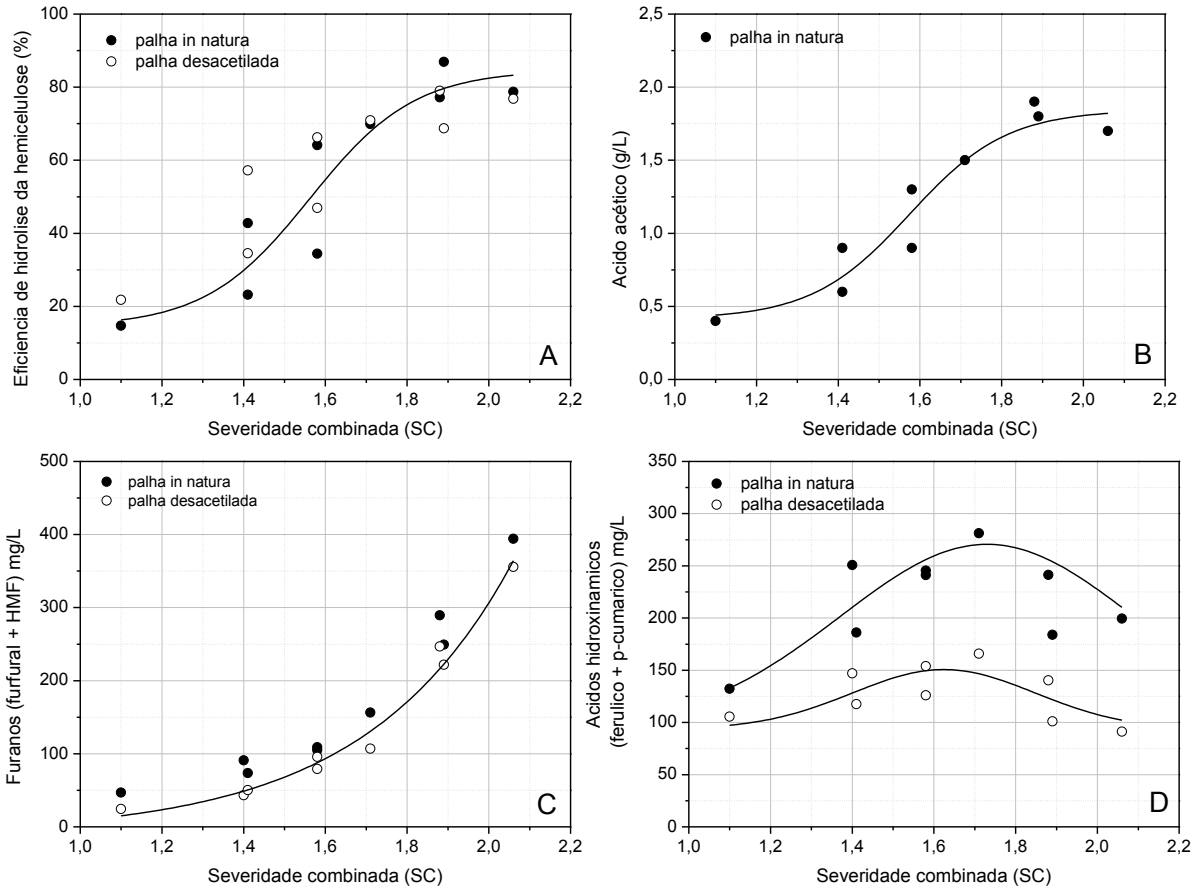
alcalino, enquanto que as ligações do tipo éter, as quais são as ligações predominantes com a lignina, são rompidas com o tratamento ácido.

Com relação à solubilização dos açúcares, nota-se que, independentemente das condições avaliadas e do tipo de palha de arroz empregada, os níveis de glicose foram relativamente baixos (< 1,8 g/L) sugerindo uma baixa degradação da fração celulósica. Nota-se ainda que as concentrações de arabinose, em ambos os materiais avaliados, não variaram significativamente com as condições de hidrólise, apresentando em média um valor de 2,2 g/L no hidrolisado da palha *in natura* e de 4,5 g/L no hidrolisado da palha desacetilada. Por outro lado, as concentrações de xilose variaram fortemente com as condições do processo (de 2,8 a 20,4 g/L) e de (1,6 e 18,2 g/L) para a palha desacetilada e *in natura*, respectivamente, demonstrando uma forte influência das variáveis avaliadas sobre a eficiência hidrólise da hemicelulose. Ainda com relação aos açúcares, verifica-se que as concentrações de xilose e arabinose foram mais elevadas nos hidrolisados hemicelulósicos da palha desacetilada. Porém, isto não significa que a eficiência de hidrólise da palha tratada foi superior, uma vez que os teores de xilana e arabinana neste material foram maiores do que os obtidos na palha *in natura* (Tabela 5.7).

Com base na concentração das pentoses solubilizadas nos hidrolisados, foram então calculadas as eficiências de hidrólise da hemicelulose (xilana + arabinana) e os resultados foram analisados em função da severidade combinada (SC) do processo. A severidade combinada (SC) é uma variável que integra em um único valor, as variações de temperatura, tempo e concentração de ácido de uma dada reação. Esta variável tem sido aplicada amplamente nos estudos de fracionamento de biomassas lignocelulósicas, especialmente nos pré-tratamentos com ácido diluído (HSU, 2010, CHEN, 2011, LEE; JEFFRIES, 2011; GUO et al., 2008; LLOYD; WYMAN, 2005). Uma das principais vantagens da utilização desta variável é a possibilidade de comparação dos resultados a partir de diferentes condições.

A Figura 5.5 mostra o efeito da severidade combinada sobre a eficiência de hidrólise da hemicelulose (EHH), assim como na solubilização dos subprodutos da reação. Nota-se na Figura 5.5A, que a EHH aumentou com a severidade do processo até o limite de 1,88, não sendo constatadas melhorias no processo acima deste valor de severidade. É interessante verificar ainda que, para ambas as palhas avaliadas, valores de EHH superiores a 70 % somente foram alcançados quando a SC foi superior a 1,70. Este mesmo perfil foi

Figura 5.5. Eficiência de hidrólise da hemicelulose (A) e formação dos sub-produtos: ácido acético (B), furanos (C) e ácidos hidroxicinâmicos (D) nos hidrolisados obtidos a partir da palha de arroz *in natura* e desacetilada, em função da severidade combinada.



Fonte: Arquivo pessoal

verificado com relação à liberação do ácido acético a partir da palha *in natura* (Figura 5.5 B). Este fato se justifica uma vez que os grupos acetil estão estruturalmente ligados a fração hemicelulósica. Vale ressaltar que as maiores concentrações deste ácido (> 1,4 g/L) foram obtidas nas condições do ensaio 4, 6 e 8, os quais também proporcionaram as maiores eficiências de hidrólise (> 75 %). Este comportamento foi também relatado por Hsu et al. (2010) e Guo et al. (2008) que alcançaram a máxima solubilização de ácido acético no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz nas mesmas condições que foram atingidas as maiores eficiências de hidrólise.

No presente estudo, o maior valor de EHH (86,9 %) foi obtido com a palha *in natura* nas condições do ensaio 8 (60 min; 1,5% de ácido e SC = 1,89). Estes resultados são comparáveis aos obtidos por HSU et al. (2010) que obtiveram um máximo rendimento de xilose (89%) a partir da palha de arroz pré-tratada com 1% (m/m) de ácido sulfúrico a

160 °C por 5 min, o que correspondeu a uma fator de severidade combinada de 1,8. Neste trabalho, os autores também verificaram que acima de 2,0 de severidade, o rendimento de hidrólise decresce gradualmente, o que foi atribuído a parcial degradação da xilose em furfural.

No que se refere à eficiência de hidrólise da hemicelulose a partir da palha desacetilada, os maiores valores (~ 78 %) foram alcançados nas condições dos ensaios 4 (SC = 2,06) e 6 (SC = 1,88), os quais foram conduzidos com concentração ácida de 1,5 e 1,0 %, respectivamente, por um período de 90 min. Nestas condições, a eficiência de hidrólise da palha *in natura* foi similar, sugerindo que sob condições mais severas de hidrólise, a solubilização da hemicelulose não é influenciada pela etapa de desacetilação. Este comportamento foi também constatado por Chen et al. (2012), que avaliaram o impacto da desacetilação da palha de milho sobre o rendimento de monômeros de xilose durante o pré-tratamento com ácido diluído. Os autores verificaram que o aumento do tempo de residência reduziu a diferença entre o rendimento de xilose da palha de milho não tratada (controle) e desacetilada. Segundo os autores, os resultados podem ser explicados pelo fato de que, sob as condições de maior severidade, a fração esterificada da xilana, que pode atingir até 40% da biomassa, é facilmente hidrolisada e, portanto, o efeito do tratamento alcalino torna-se atenuado.

A Figura 5.5 C mostra um perfil exponencial de formação de furanos (furfural + hidroximetilfurfural) em função da severidade combinada. Tal comportamento demonstra que a velocidade de degradação dos açúcares é muito sensível a severidade do processo. Hsu et al. (2010) também encontraram um aumento exponencial dos furanos em função da severidade da hidrólise ácida da palha de arroz. Porém, os valores encontrados por estes autores foram superiores aos obtidos no presente estudo. Por exemplo, no presente estudo, os maiores níveis de furanos (~ 0,4 g/L) foram obtidos quando o processo foi conduzido na maior severidade (SC = 2,06); enquanto que no trabalho de Hsu et al. (2010) empregando um fator similar de severidade (SC = 2,1) a quantidade de furanos foi cerca de 4 vezes superior (1,6 g/L). Esta diferença pode estar relacionada com as condições de processo utilizadas pelo autor (160 °C, 1,0% (m/m) de H_2SO_4 e 5 min).

Com relação à solubilização dos ácidos hidroxianâmicos (Figura 5.5 D), verifica-se um aumento nos níveis destes compostos até a severidade de 1,7, sendo que a partir deste valor ocorre um decréscimo. Verifica-se ainda que, as maiores concentrações destes ácidos foram encontradas nos hidrolisados obtidos a partir da palha *in natura*, o que pode ser

explicado pelo fato de que na palha desacetilada, parte destes ácidos foi extraída durante o tratamento alcalino. A máxima concentração de ácidos hidroxicinâmicos liberados após a hidrólise ácida foi de aproximadamente 281 mg/L (69 mg/L de ferúlico + 212 mg/L de p-cumárico) na palha *in natura* e de 165,8 mg/L (49,2 mg/L de ferúlico + 116,6 mg/L de p-cumárico) na palha desacetilada. As quantidades totais destes ácidos fenólicos nos hidrolisados ácidos são bastante inferiores daquelas obtidas no licor alcalino (Tabela 5.6), as quais atingiram um valor de 723 mg/L (463 mg/L de ferúlico + 260 mg/L de p-cumárico). Conforme discutido anteriormente, o tratamento alcalino favorece a clivagem da ligação éster, promovendo maior solubilização do ácido ferúlico no licor alcalino. Por outro lado, as ligações do tipo éter, as quais são as ligações predominantes com a lignina, são rompidas com o tratamento ácido. Portanto, pode-se inferir que os ácidos hidroxicinâmicos solubilizados nos hidrolisados hemicelulósicos são predominantemente provenientes, em grande parte, da degradação da lignina.

É importante ainda observar que, valores similares de SC (Tabela 5.7) podem ser obtidos com distintas condições de tempo e temperatura. Por exemplo, nos ensaios 2 e 3, os quais foram conduzidos com 90 min; 0,5% de ácido e 30 min; 1,5% de ácido, respectivamente, o valor de SC foi de 1,58. No entanto, os resultados de eficiência de hidrólise da hemicelulose no ensaio 2, o qual foi conduzido com um maior tempo, porém em uma concentração ácida cerca de 3 vezes menor em relação ao ensaio 3, mostrou um decréscimo de 40% na eficiência de hidrólise. Este fato sugere que, mesmo para valores similares de severidade, os efeitos destas variáveis são distintos e, que a concentração ácida pode ter maior influência sobre o processo. Neste sentido, foram realizadas as análises estatísticas para identificar os efeitos estimados de cada variável no processo. Esta análise foi realizada apenas para o hidrolisado proveniente da palha tratada com NaOH uma vez que o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a produção de xilitol por *Kluyveromyces marxianus* a partir de um hidrolisado hemicelulósico com características favoráveis com relação aos níveis de inibidores produzidos. Conforme demonstrado na Figura 5.5, a palha desacetilada forneceu um hidrolisado hemicelulósico com teor de xilose similar ao hidrolisado controle (palha *in natura*), porém com menor nível dos compostos tóxicos avaliados.

A análise estatística referente ao processo de hidrólise ácida da palha desacetilada (Tabela 5.8) revelou que ambas as variáveis (tempo de reação e da concentração ácida), apresentaram efeitos significativos, ao nível de 95% de confiança, sobre a eficiência de hidrólise da hemicelulose. Observa-se ainda que, o efeito da concentração ácida (+36,17)

foi praticamente o dobro do efeito do tempo (+19,17), confirmando a análise direta dos dados, que sugeriu uma maior influência da concentração de ácido sobre a resposta. Destaca-se ainda que, a interação entre o tempo e a temperatura mostrou efeito negativo (–3,86), indicando que a eficiência de hidrólise da hemicelulose é favorecida quando são empregadas maiores concentração ácidas. Além disso, o termo quadrático da variável concentração de ácido apresentou efeito de sinal negativo (–14,9), indicando que a eficiência de hidrólise da hemicelulose pode ser maximizada na região estudada.

Tabela 5.8. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste *t* de *Student* para a resposta eficiência de hidrólise da hemicelulose, durante a hidrólise ácida da palha de arroz desacetilada.

Variáveis Independentes	Estimativa dos Efeitos	Erros-padrão	$t_{calculado}$
Média	70,21	± 0,857	81,92*
Tempo (X_1)	19,17	± 1,533	12,50*
H_2SO_4 (X_2)	36,17	± 1,533	23,59*
X_1^2	–1,47	±2,299	0,64
X_2^2	–34,47	±2,299	14,99*
X_1X_2	–7,25	±1,877	3,86*

[a] significativo com 95 % de confiança.

A significância estatística dos efeitos foi confirmada pela análise de variância (ANOVA) mostrada na Tabela 5.9, a qual mostrou um elevado coeficiente de correlação (R^2 = 0,99).

Tabela 5.9. Análise de variância (ANOVA) dos efeitos para a resposta eficiência de hidrólise da hemicelulose, durante a hidrólise ácida da palha de arroz desacetilada**.**

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	*F*	*p-valor*
Tempo (X_1)	551,042	1	551,042	156,29	*0,0000**
H_2SO_4 (X_2)	1962,04	1	1962,04	556,50	*0.0000**
X_1^2	1,4406	1	1,440	0,41	*0,5463*
X_2^2	792,121	1	792,121	224,67	*0,0000**
X_1X_2	52,5625	1	52,562	14,91	*0,0084**
Erro Total	21,154	6	3,5256		
Total (corr)	3504,89	11			
		R^2 = 0,99			

[a] significativo com 95 % de confiança.

Uma análise de regressão múltipla (Tabela 5.10) foi então realizada para a obtenção de um modelo matemático capaz de descrever a relação entre as variáveis independentes e a resposta avaliada. Para esta análise excluiu-se o efeito quadrático do tempo X_1^2, devido a sua baixa significância estatística (p = 0,5463). Conforme mostrado na Tabela 5.11, a analise de variância (ANOVA) de regressão do modelo confirmou a relevância estatística do mesmo ($p<0,00001$), com elevado coeficiente de correlação (R^2 = 0,99), o que significa uma forte concordância entre os resultados experimentais e os valores previstos pelo modelo matemático representado pela Equação 2.

Tabela 5.10. Análise de regressão múltipla para a resposta eficiência de hidrólise da hemicelulose, durante a hidrólise ácida da palha de arroz desacetilada.

Parâmetro	Coeficientes	Erros-padrão	$t_{estatístico}$	*p-valor*
Constante	69,9633	0,733463	95,3877	*0,0000*
Tempo (X_1)	9,58333	0,733463	13,0659	*0,0000*
H_2SO_4 (X_2)	18,0833	0,733463	24,6547	*0,0000*
X_2^2	-17,48	1,03727	-16,8519	*0,0000*
X_1X_2	-3,625	0,898305	-4,03538	*0,0050*

Tabela 5.11. Analise de variância (ANOVA) de regressão do modelo representativo da remoção de grupos acetil a partir da palha de arroz tratada sob diferentes condições de temperatura e carga de NaOH**.**

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	*F*	*p-valor*
Modelo	3482,3	4	870,57	269,71	*<0,0001*
Residuo	22,6	6	3,2278		
Total (corr)	3504,9	10			
			R^2 **= 0,99**		

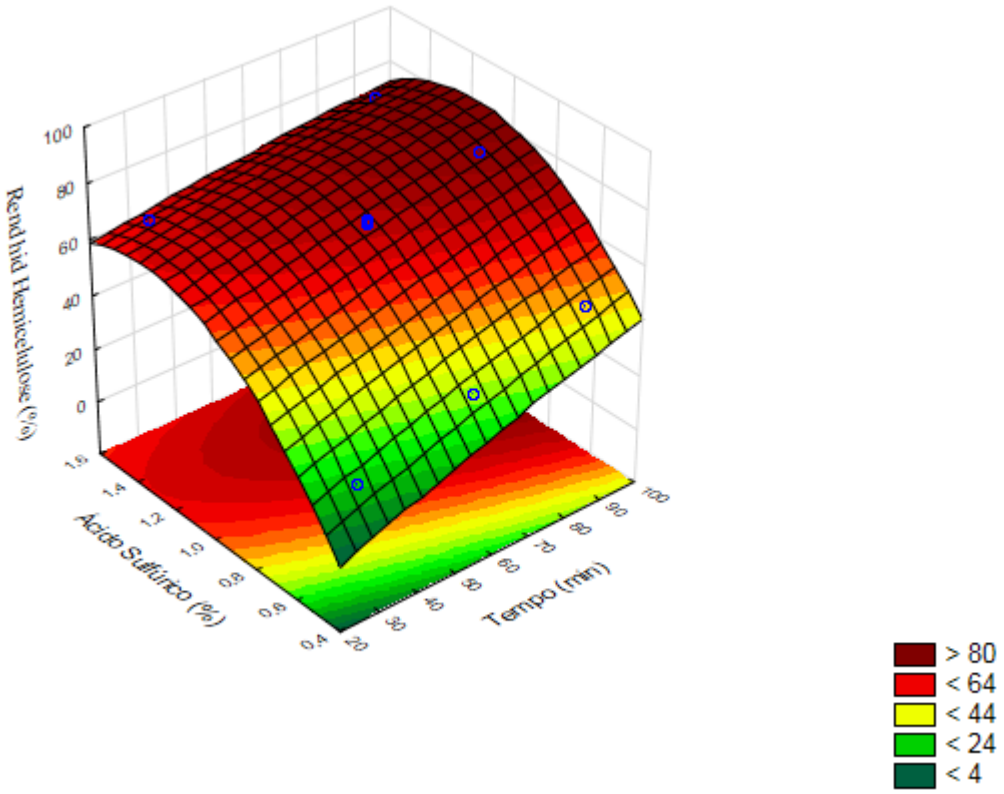
$$\hat{Y}_2 = 69{,}9 + 9{,}6X_1 + 18{,}1X_2 - 3{,}6X_1X_2 - 17{,}5X_2^2 \quad \text{Equação 2}$$

Onde: $\hat{Y}_2$ representa o valor estimado da eficiência de hidrólise da hemicelulose (%); X_1 e X_2 representam os níveis codificados das variáveis tempo e concentração de H_2SO_4, respectivamente.

A partir da equação do modelo, foi construída uma representação tridimensional da superfície de resposta na região experimental estudada (Figura 5.6). Esta figura mostra claramente que elevados valores de eficiência de hidrólise da hemicelulose (> 75%) podem ser alcançados com diferentes combinações de tempo e concentração ácida.

Com o objetivo de maximizar a eficiência de hidrólise da hemicelulose (EHH), e ao mesmo tempo obter um hidrolisado hemicelulósico com menor grau de toxicidade, foi então realizada uma análise de otimização numérica empregando o programa Design Expert 6.0. De acordo com esta análise, foram definidas as seguintes condições de tratamento ácido: (121 °C; 1,0% de H_2SO_4 e 85 min). Nestas condições do processo, o modelo prevê uma eficiência de hidrólise da hemicelulose (EHH) de 78 ± 2,0%.

Figura 5.6. Superfície de resposta descrita pelo modelo $\hat{Y}_2$ que representa o valor estimado da eficiência da hidrólise da hemicelulose em função do tempo e concentração ácida.



Fonte: Arquivo pessoal

5.4. Efeito da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico obtido a partir da palha de arroz desacetilada sobre a produção de xilitol

Após a definição das condições ótimas para o processo de hidrólise ácida da palha de arroz desacetilada (1% m/v de H_2SO_4, 121 °C e 85 min), foram então realizados ensaios em reator de 50 litros visando à obtenção de uma maior quantidade de hidrolisado para os estudos fermentativos. No entanto, para ser utilizado como meio de fermentação, o hidrolisado produzido nesta etapa foi submetido a uma etapa de concentração para aumentar o teor de xilose a valores acima de 50 g/L. Vale ressaltar ainda que, durante esta etapa podem ocorrer algumas modificações na composição química do hidrolisado, as quais podem influenciar o desempenho do micro-organismo durante a fermentação. Neste sentido, a composição química do hidrolisado na sua forma original e concentrada, foi analisada e os resultados estão apresentados na Tabela 5.12. Vale ressaltar ainda que, com base nos teores de xilose e arabinose obtidos, a eficiência de recuperação da hemicelulose

foi de 76%, o que esta de acordo com os valores previstos pelo modelo obtido na etapa de otimização das condições de hidrólise ácida.

Tabela 5.12. Composição química do hidrolisado hemicelulósico da palha de arroz desacetilada sob as condições ótimas de hidrólise ácida, nas formas diluída (original) e concentrada.

Componentes	Concentração (g/L)	
	Hidrolisado original	Hidrolisado concentrado
Glicose	2,1 ± 0,1	11,8 ± 0,2
Xilose	19,2 ± 0,5	96,8 ± 1,3
Arabinose	5,2 ± 0,2	22,7 ± 0,3
Ácido acético	nd	nd
5-HMF	0,027 ± 0,0004	0,172 ± 0,007
Furfural	0,369 ± 0,0024	0,163 ± 0,004
Ácido furóico	0,127 ± 0,0028	0,813 ± 0,032
Álcool vanilil	0,013 ± 0,0018	0,107 ± 0,013
Ácido vanílico	0,008 ± 0,0005	0,046 ± 0,003
Vanilina	0,013 ± 0,0004	0,048 ± 0,005
Ácido *p*-cumárico	0,018 ± 0,0004	0,031 ± 0,003
Ácido ferúlico	0,013 ± 0,0001	0,029 ± 0,0002

nd = não detectado

Nota-se na Tabela 5.12, que após a concentração do hidrolisado os níveis dos açúcares foram aumentados proporcionalmente ao fator de concentração utilizado (cerca de 5 vezes), revelando que não ocorreu degradação destes componentes durante esta etapa. No entanto, os teores dos subprodutos, com exceção do furfural que teve sua concentração reduzida em 56%, foram aumentados de forma não proporcional ao fator de concentração, sugerindo que estes compostos podem ter sido parcialmente volatilizados ou degradados durante esta etapa. Comportamento semelhante foi relatado por Mussatto et al. (2005), empregando o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. Durante a etapa de concentração do hidrolisado (Fc = 4), os autores observaram uma redução de 70% nos níveis de furfural, que foi atribuída à volatilidade deste composto durante a concentração a

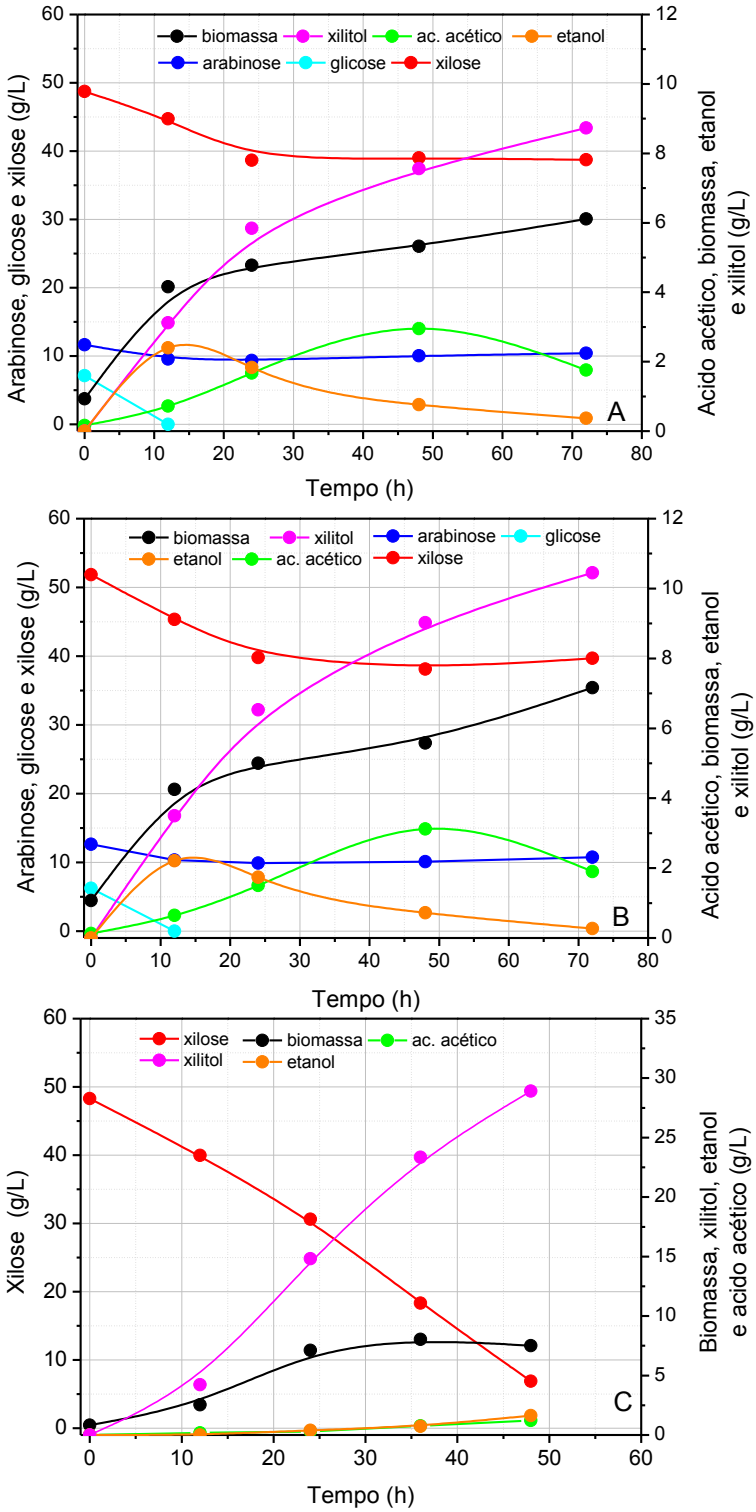
vácuo, e um aumento de 2,5 vezes na concentração de fenólicos totais. Em outro estudo, Dehkhoda et al. (2009) empregando o hidrolisado hemicelulósico de abeto, compararam dois métodos de concentração do hidrolisado. No primeiro denominado - VEH, a evaporação foi conduzida sob vácuo a 80 °C /0,5 bar de pressão e no segundo, denominado - HPEH o processo foi conduzido ausente de vácuo a 107,5 °C/1,3 bar. Os resultados mostraram que, em ambos os procedimentos, não ocorreu decomposição dos açúcares e dentre os inibidores avaliados, o furfural teve sua concentração reduzida (> 90%), enquanto que o HMF e a lignina solúvel foram aumentados na mesma proporção do fator de concentração (Fc = 3). A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que, ambos os métodos podem ser usados em escala industrial para aumentar a concentração de açúcares fermentescíveis.

Para o estudo da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico obtido foi utilizada a levedura termotolerante *K. marxianus* Y - 6373, previamente selecionada (item 4.3.1) por sua capacidade de produzir xilitol em meio semidefinido a 40 °C.

Conforme mostrado na Tabela 5.12, o ácido acético não foi detectado no hidrolisado obtido, porém vários outros inibidores do metabolismo microbiano, incluindo furanos (furfural, 5-HMF e ácido furóico) e ácidos hidroxicinâmicos (ferúlico e p-coumárico) estão presentes em sua composição. Considerando que a tolerância de leveduras fermentadoras de pentoses aos compostos inibitórios, especialmente os furanos (furfural e 5-HMF), pode ser melhorada com uma adequada suplementação nutricional (SLININGER et al., 2009), esta etapa teve como objetivo, avaliar a fermentabilidade do hidrolisado de palha com e sem suplementação nutricional. Os nutrientes utilizados nesta etapa foram os mesmos empregados na etapa de seleção.

Visando comparar o desempenho da levedura em meio ausente em compostos tóxicos, ensaios foram também realizados em meio semidefinido e os resultados estão mostrados na Figura 5.7 (A-C). Observa-se que o comportamento fermentativo de *K. marxianus* Y-6373 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (com e sem suplementação nutricional), em termos de consumo de açúcares, produção de biomassa, etanol, xilitol e ácido acético foi similar (Figura 5.7 A e B). Nota-se que, nas primeiras 12 horas de cultivo ocorreu o esgotamento total de glicose e que este consumo foi concomitantemente com a assimilação de xilose. Porém, após 24 h, a assimilação desta pentose foi paralisada e ao final de 72 h, o meio ainda continha uma elevada concentração residual de xilose (39,0 g/L), o que correspondeu a um consumo total de 22%.

Figura 5.7. Perfil fermentativo de *K. marxianus* Y- 6373 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz na ausência (A) e presença (B) de suplementação nutricional e em meio semidefinido (C).



Fonte: Arquivo pessoal

Este perfil de consumo de xilose não foi observado no meio semidefinido contendo 50 g/L desta pentose como única fonte de carbono (Figura 5.7 C). Observa-se nesta Figura que, a levedura consumiu quase que completamente a xilose (86%), após 48 h, com uma velocidade média de 0,86 g/L.h. Esta diferença de comportamento pode ser explicada pela composição química do hidrolisado, uma vez que além dos inibidores, a presença de outros açúcares, especialmente a glicose, pode exercer repressão catabólica sobre os mecanismos de transporte e/ou indução das enzimas envolvidas na assimilação de xilose (SU, 2013). No entanto, o nível de repressão depende do tipo de micro-organismo utilizado e das condições de cultivo empregadas, sendo que a base fisiológica deste fenômeno não está totalmente esclarecida.

A influência da glicose sobre o perfil fermentativo de *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar foi estudado por SILVA; FELIPE (2006). Neste estudo, a concentração de xilose no hidrolisado foi mantida em 46 g/L e a de glicose foi variada de 4 a 18 g/L. De acordo com os autores, quando o inóculo foi cultivado em meio contendo apenas a xilose como fonte de carbono, o consumo desta pentose no hidrolisado hemicelulósico de bagaço-de-cana foi de 86%, após 48 h de fermentação, independentemente da proporção glicose:xilose presente no hidrolisado. No entanto, a produção de xilitol foi influenciada positivamente com o aumento da proporção glicose:xilose no hidrolisado mostrando uma produção máxima de 27,8 g/L ($Y_{P/S}$ = 0,59 g/g; Q_P = 0,53 g/L,h) quando se utilizou a relação de 1:5. Os valores dos parâmetros representaram um aumento de 15 e 23%, respectivamente, em relação à condição de controle (glicose:xilose = 1:25). Ainda neste trabalho, os autores não verificaram qualquer correlação das melhores condições de produção de xilitol com os níveis das atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH).

Ainda na Figura 5.7 A e B nota-se que, durante as primeiras 12 horas de cultivo, foram produzidas pequenas concentrações de etanol e de ácido acético em meio hidrolisado. A partir deste tempo, observa-se que a concentração de ácido acético continua aumentando, enquanto o etanol apresenta uma queda. Provavelmente, o etanol foi assimilado para a produção de ácido acético. A formação de etanol e ácido acético pela levedura *K. marxianus* foi também observada em meio semidefinido, porém a partir de 24 h e de forma mais atenuada (Figura 5.7 C).

Cabe ressaltar que, a arabinose não foi assimilada durante o cultivo e que o crescimento celular, assim como a produção de xilitol atingiram valores máximos de (6,1 e 8,7 g/L) e de (7,1 e 10,4 g/L), nas fermentações dos hidrolisados sem e com

suplementação, respectivamente.

Recentemente, Signori et al, (2014) avaliando o perfil metabólico de *K. marxianus* CBS712 na temperatura de 41 °C, sob diferentes níveis de oxigênio (1,75; 11 e 20,95%), em meios contendo uma mistura de glicose e xilose (20 g/L cada) como fontes de carbono, constataram que a glicose foi totalmente consumida após 15 h, e que a xilose foi parcialmente consumida em todas as condições de oxigenação testadas. No menor nível de oxigênio (1,75%), o consumo desta pentose foi de apenas 15% e nestas condições, os autores também observaram a maior concentração de xilitol (2,5 g/L), o que correspondeu a um fator de conversão de 0,75 g/g. Além disso, foi também observado um pico na concentração de etanol após o consumo de glicose e em seguida a acumulação de ácido acético em detrimento do etanol. Os autores atribuíram este comportamento metabólico a demanda de NADPH pelas células. De fato, a literatura reporta que, além da via das pentoses fosfato, a oxidação do etanol em acetaldeido com posterior conversão em acetato pela ação da acetaldeido desidrogenase pode contribuir de forma significativa para o suprimento deste cofator (RODRUSSAMEE et al., 2011).

Os resultados do presente trabalho, estão consistentes com os observados por Signori et al, (2014) e sugerem que a glicose presente no hidrolisado, mesmo em baixas concentrações contribuiu para o limitado consumo de xilose no hidrolisado. O perfil de assimilação de xilose em meio semidefinido contendo apenas xilose como fonte de carbono, reforça também esta hipótese.

A Tabela 5.13 apresenta os parâmetros fermentativos de *K. marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (com e sem suplementação nutricional) e em meio semidefinido. Comparando os resultados da fermentação de *K. marxianus* Y-6373 empregando o hidrolisado com e sem adição de nutrientes, verifica-se que a suplementação nutricional não promoveu melhorias nos parâmetros do processo. No entanto, quando os resultados obtidos em hidrolisado foram comparados aos do meio semidefinido, diferenças importantes foram observadas nos parâmetros do processo, especialmente nos fatores de conversão e produtividade volumétrica em xilitol.

Tabela 5.13. Parâmetros fermentativos obtidos durante o cultivo de *K. marxianus* Y–6373 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com e sem suplementação nutricional e em meio semidefinido.

Parâmetros	Hidrolisado Suplementado	Hidrolisado Não Suplementado	Meio Semidefinido
Tempo de fermentação (h)	72	72	48
Xilose inicial (g/L)	51,84	48,72	48,30
Xilose final (g/L)	39,70	38,74	6,9
Xilose consumida (%)	23,4	20,5	86
Glicose inicial (g/L)	6,24	7,12	-
Glicose final (g/L)	0	0	-
Biomassa inicial (g/L)	1,07	0,93	0,83
Biomassa final (g/L)	7,16	6,11	7,50
Xilitol final (g/L)	10,45	8,73	28,9
Etanol final (g/L)	0,27	0,37	1,64
Ácido acético inicial (g/L)	0,13	0,16	0
Àcido acético final (g/L)	1,90	1,76	1,21
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,10	0,09	0,16
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,86	0,87	0,70
$Y_{P/X}$ (g/g)	8,6	9,7	4,37
Q_S (g/L,h)	0,17	0,14	0,86
Q_P (g/L h)	0,14	0,12	0,85
η(%)	94	96	77

Nota-se que os maiores fatores de conversão em xilitol (~ 0,86 g/g) foram obtidos nas fermentações dos hidrolisados; valores estes muito próximos ao máximo teórico (0,91 g/g) e que representam um aumento de 23% quanto comparado ao meio semidefinido. Estes resultados sugerem que, a levedura *K. marxianus* apresenta uma elevada capacidade de conversão de xilose em xilitol a partir do hidrolisado, o que foi confirmado pelos elevados valores de $Y_{P/X}$ obtidos (praticamente o dobro do meio semidefinido). No entanto, devido à incompleta utilização de xilose nos hidrolisados, a concentração final de xilitol foi cerca de 3X inferior a obtida em meio semidefinido. Consequentemente, a produtividade volumétrica em xilitol (Q_P) no meio semidefinido foi mais elevada, atingindo 0,60 g/L,h ao final da fermentação.

Os resultados de produção de xilitol em meio semidefinido obtidos no presente trabalho comparam favoravelmente aos reportados na literatura empregando outras linhagens termotolerantes de *K. marxianus*. Por exemplo, Muller et al. (2011) empregando um meio contendo 50 g/L de xilose em cultivos realizados a 40 °C e 1,0 g/L de células alcançaram com a linhagem IMB2 de *K. marxianus* uma produção máxima de xilitol de 24,09 g/L em 120 h ($Y_{P/S}$ = 0,90 g/g e Q_P = 0,20 g/L.h). Embora os resultados de conversão estejam próximos aos obtidos no presente trabalho, os valores de produtividade volumétrica foram bem inferiores (cerca de 4 vezes) e a concentração de xilose residual foi elevada (23, 0 g/L), indicando um ineficiente consumo de xilose (54%). Resultados ainda inferiores aos obtidos no presente trabalho foram relatados por Kumar et al. (2009), utilizando a levedura *Kluyveromyces sp* IIPE453 em cultivos realizados a 50 °C. Os autores relataram uma concentração máxima de xilitol de 11,5 g/L, após 67 h de cultivo ($Y_{P/S}$ = 0,65 g/g e Q_P = 0,17 g/L.h) a partir de meio semidefinido contendo 40 g/L de xilose. Nestas condições, o consumo de xilose foi de apenas 43%. Em outro estudo, Wilkins et al. (2008) cultivando *K. marxianus* IMB4 a 40 °C em meio semidefinido contendo 20 g/L de xilose, relataram um consumo de 68% de xilose em 96 h, com uma produção de 7,36 g/L de xilitol ($Y_{P/S}$ = 0,54 g/g e Q_P = 0,08 g/L.h).

É importante destacar que os estudos referentes à produção de xilitol por leveduras termotolerantes de *K. marxianus* empregando hidrolisados hemicelulósicos de biomassa lignocelulósica tem sido ainda pouco explorados. Recentemente, Zhang et al. (2013) avaliaram o perfil fermentativo de uma linhagem recombinante de *K. marxianus* denominada YZB014 em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho contendo 25,88 g/L de xilose. Neste trabalho, o hidrolisado foi previamente destoxificado empregando uma combinação de tratamentos (CaO até pH 10 e carvão ativado). De acordo com os autores, a levedura foi capaz de consumir 21,41 g/L de xilose e produzir 12,21 g/L de xilitol e 4,09 g/L de etanol a 42 °C, após 48 h. Estes resultados, quando comparados aos obtidos com *K. marxianus* em hidrolisado no presente estudo, revelam que a levedura YZB014 mostrou um eficiente consumo de xilose (83%) com o dobro de produtividade volumétrica (Q_P = 0,25 g/L.h). No entanto, sua capacidade de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$ = 0,57 g/g) foi inferior. É importante ressaltar que no presente trabalho, o hidrolisado de palha de arroz foi utilizado sem qualquer tratamento prévio de destoxificação e com uma maior concentração inicial de xilose. Considerando estes dois aspectos, somados ao fato de que a levedura *K. marxianus* Y–6373 não foi modificada

geneticamente, o baixo consumo de xilose, assim como os menores valores de produtividade volumétrica obtidos no hidrolisado de palha de arroz são justificáveis.

5.5. Avaliação de diferentes métodos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico obtido a partir da palha de arroz desacetilada sobre a produção de xilitol

A etapa de destoxificação normalmente é requerida quando os hidrolisados apresentam níveis elevados de compostos tóxicos e/ou quando o micro-organismo fermentativo apresenta baixa tolerância a estes compostos. Nos experimentos anteriores, foi verificada uma limitada utilização de xilose por *K. marxianus* em meios constituídos de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Este comportamento pode ser atribuído a dois fatores: 1) baixa tolerância da levedura aos compostos tóxicos presentes no hidrolisado e 2) presença de glicose no meio. Visando elucidar estas hipóteses, nesta etapa, foram avaliados três diferentes métodos de destoxificação do hidrolisado. Além disso, alguns ensaios em meio semidefinido foram também realizados para verificar o efeito da glicose no metabolismo fermentativo de *K. marxianus*.

5.5.1. Composição dos hidrolisados após os tratamentos de destoxificação

Os hidrolisados obtidos após tratamentos de destoxificação empregando: 1) CaO (*overliming*); 2) *Saccharomyces cerevisiae* e 3) carvão ativado, conforme detalhamento descrito no item 4.2 de material e métodos, foram devidamente diluídos para ajustar a concentração inicial de xilose até 50 g/L. Estes hidrolisados foram então analisados quanto aos teores de açúcares (xilose, glicose e arabinose) e de compostos inibidores ao metabolismo microbiano incluindo os furanos (furfural e 5-HMF) e os ácidos hidroxicinâmicos. Os resultados referentes à composição química dos hidrolisados obtidos estão mostrados na Tabela 5.14. Como esperado, não foi detectada a presença de ácido acético nos hidrolisados os quais foram submetidos a uma etapa de desacetilação previamente ao processo de hidrólise ácida. No entanto, variações importantes foram obervadas nos níveis dos furanos (furfural e 5-HMF) e ácidos hidroxicinâmicos em função do tratamento empregado. Para avaliar a perda ou remoção destes compostos, utilizou-se como referência a composição do hidrolisado neutralizado com NaOH, o qual foi denominado de "*não-tratado*".

Tabela 5.14. Composição química dos hidrolisados hemicelulósicos utilizados como meio de fermentação, após os tratamentos de destoxificação.

Composição	**Tratamentos de Destoxificação**			
	Não tratado[a]	*CaO*[b]	*Biológico*[c]	*Carvão ativado*[d]
Açúcares (g/L)				
Xilose	48,7	55,9	52,7	50,9
Glicose	5,8	7,4	4,9	6,5
Arabinose	11,6	13,9	12,9	12,5
Inibidores (mg/L)				
Ácido acético	nd	nd	nd	nd
Furfural	85,0	nd	nd	6,5
5-HMF	89,5	53,5	51,7	8,9
Ácido *p*-cumárico	15,8	18,9	10,1	nd
Ácido ferúlico	14,8	nd	nd	nd
Perda em volume (%v/v)	10	46	12	17

[a] (NaOH pH 5,5); [b] ("*overliming*"CaO pH 10, H_2SO_4 pH 5,5); [c] (NaOH pH 3,0, 5 g/L de *S. cerevisiae*, 30 °C; 200 rpm 6 h, NaOH pH 5,5; [d] (NaOH pH 2,0, [d] hidrolisado:carvão de1:40, 45 °C, 150 rpm, 1h, NaOH pH 5,5).

Analisando a Tabela 5.14, verifica-se uma total remoção de furfural após tratamento biológico e com CaO do hidrolisado, e de 92% a partir do carvão ativado. Nota-se ainda que, o tratamento com carvão ativado promoveu uma elevada redução nos níveis de 5-HMF (90%), enquanto que para os demais tratamentos (biológico e CaO) foi constatada uma redução de aproximadamente 40%. No que se refere aos ácidos hidroxianâmicos, verifica-se que os todos os tratamentos avaliados foram efetivos em remover o ácido ferúlico, e que apenas o carvão ativado removeu totalmente o ácido *p*-cumárico, sendo ainda observada uma redução de 36% deste ácido após tratamento biológico e nenhuma remoção empregando CaO. Ainda na Tabela 5.14, verifica-se que o método de alcalinização com CaO até pH 10, foi o que promoveu a maior perda em volume de hidrolisado (46%), seguido do carvão ativado (17%) e biológico (12%).

Resultados similares aos obtidos no presente trabalho foram relatados por Mussatto et al. (2005) utilizando o carvão ativado para destoxificar o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de malte. Os autores observaram uma total remoção dos furanos e de 48% nos níveis dos compostos fenólicos. Consideráveis remoções nos níveis de furanos (83%) e

compostos fenólicos (72%) em decorrência do tratamento de "*overliming*" com CaO foi reportado por Mateo et at. (2013) empregando o hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira. Já utilizando o método de destoxificação biológica com *Saccharomyces cerevisiae*, Fonseca et al. (2013) constataram que o nível de redução destes compostos foi dependente do tipo de hidrolisado utilizado. Por exemplo, em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, a concentração de furanos e de compostos fenólicos foi reduzida em 50 e 36%, respectivamente, enquanto que no hidrolisado hemicelulósico de poda de oliveira estes valores decresceram para 35 e 13%, respectivamente.

Como pode ser visto na Tabela 5.14, no presente trabalho, a perda de volume durante a destoxificação com CaO foi elevada (46%), o que, do ponto de vista econômico, poderá limitar sua utilização. De fato, uma análise econômica para uma planta de produção de etanol a partir de pentoses realizada por Von Silver et al. (1994) revelou que o custo de destoxificação representa 22% do custo total do processo.

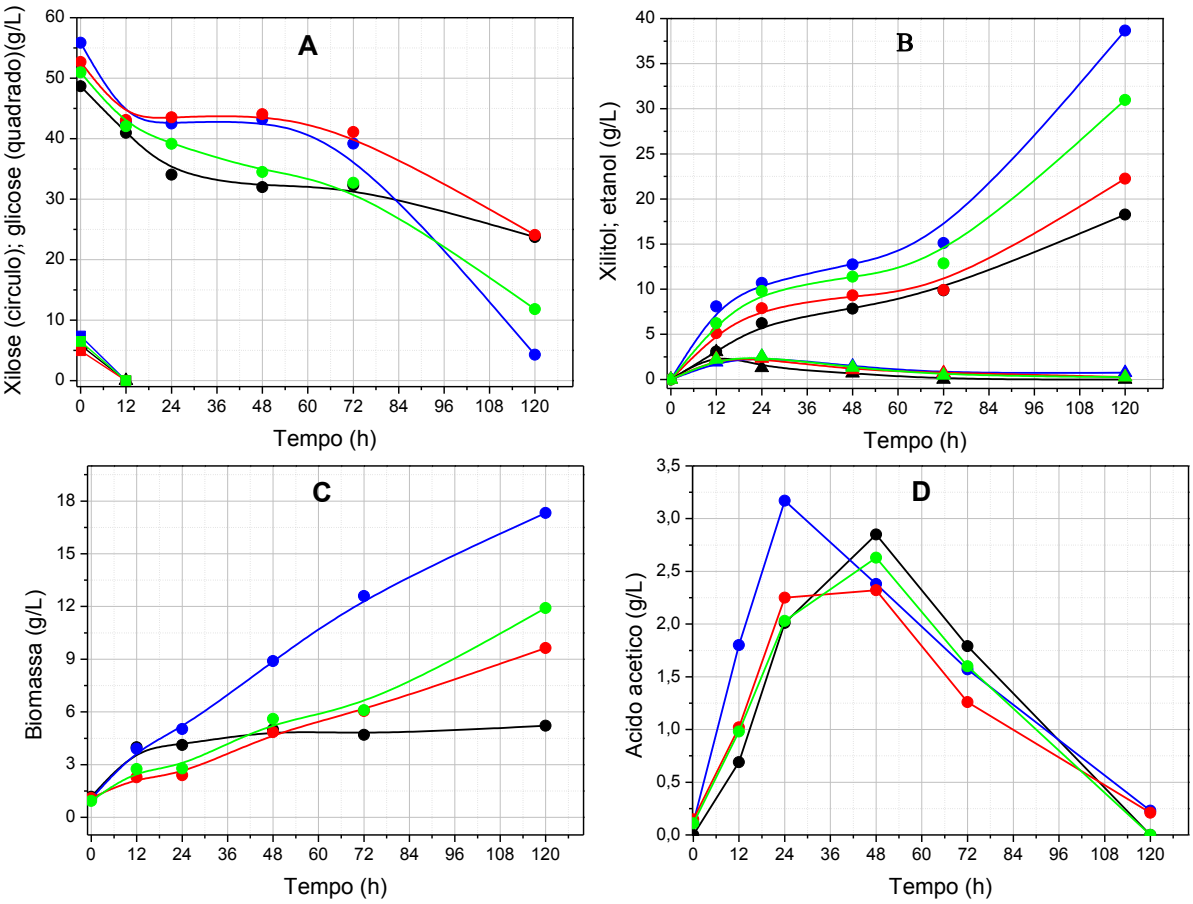
De uma forma geral, os resultados revelaram que o tratamento com carvão ativado foi o que apresentou maior efetividade na remoção dos compostos inibidores presentes no hidrolisado (~ 92%), seguido do biológico (~75%) e CaO (~ 65%). No entanto, não se pode afirmar que o tratamento com carvão ativado irá fornecer um hidrolisado com menor toxicidade para o processo fermentativo, uma vez que a tolerância aos compostos inibidores depende do micro-organismo empregado. Então, o melhor tratamento de destoxificação só poderá ser definido após a avaliação da fermentabilidade destes hidrolisados, a qual foi realizada através de cultivos de *K. marxianus*, conforme apresentados a seguir.

5.5.2. Avaliação da fermentabilidade dos hidrolisados destoxificados

Os perfis de consumo de açúcares, assim como de produção de xilitol, etanol, ácido acético e biomassa por *K. marxianus* NRRLY-6373 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, após diferentes tratamentos de destoxificação, estão apresentados na Figura 5.8 (A-D). Verifica-se que, para todos os hidrolisados avaliados, a levedura consumiu totalmente a glicose nas primeiras 12 horas de cultivo e que, neste período, a xilose foi também assimilada, demonstrando um perfil de consumo simultâneo destes açúcares (Figura 5.8 A). Nota-se ainda que, com exceção do hidrolisado tratado com carvão ativado, o consumo de xilose nos demais hidrolisados, foi praticamente paralisado entre 24 e 72 h, o que revelou uma fase de latência de 48 h. Após este período, verifica-se uma retomada

no consumo de xilose, no entanto, a eficiência de assimilação variou com o tratamento de destoxificação empregado.

Figura 5.8. Consumo de xilose e glicose (A); produção de xilitol e etanol (B), biomassa (C) e ácido acético (D) durante o cultivo de *K. marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz sem tratamento (—) e após destoxificação: CaO (—); Biológico (—) e Carvão ativado (—).



Fonte: Arquivo pessoal

Como pode ser visto na Figura 5.8 A, o tratamento do hidrolisado com CaO foi o que apresentou a melhor eficiência no consumo de xilose após 120 h (92%), seguido pelo tratamento com carvão ativado (77%) e biológico (54%). Nota-se ainda que, a eficiência de consumo de xilose no hidrolisado não tratado (51%), foi similar à obtida no hidrolisado tratado com agente biológico, o que sugere a ineficácia deste método em reduzir a

toxicidade do hidrolisado. Em princípio, o menor consumo de xilose observado no tratamento biológico não pode ser atribuído aos níveis iniciais dos compostos inibidores quantificados neste estudo, uma vez que estes foram similares aos do hidrolisado tratado com CaO. Porém, considerando que o mecanismo de destoxificação biológica se baseia na biotransformação dos compostos tóxicos, e que a identificação/quantificação destas substâncias é de difícil realização, não se pode descartar a possibilidade de formação de produtos ainda mais tóxicos durante o tratamento biológico e, portanto mais prejudiciais ao metabolismo fermentativo. Já os métodos químicos de destoxificação do hidrolisado, através da alcalinização com CaO, ou por adsorção com carvão ativado se baseiam em mecanismos que promovem a remoção destes compostos, o que pode explicar os resultados obtidos.

A Figura 5.8 B, mostra que o perfil de produção de xilitol seguiu o mesmo comportamento observado para o consumo de xilose, ou seja, até 24 h ocorreu uma crescente excreção deste poliol no meio fermentativo em função do consumo de xilose. Porém, durante o período de paralisação de assimilação de xilose (24 até 72 h), a produção de xilitol foi atenuada, sendo então aumentada com a retomada do consumo de xilose pela levedura. Vale ressaltar, que a concentração final de xilitol variou com o tratamento empregado sendo obtidos valores de 38,7; 30,9 e 22,2 g/L nos hidrolisados tratados com CaO, carvão ativado e *S. cerevisiae*, respectivamente. Comparando estes resultados ao obtido no hidrolisado não-tratado (18,3 g/L), nota-se um aumento na produção de xilitol de 111, 69 e 21%, respectivamente, o que demonstra que o método da alcalinização do hidrolisado com CaO foi o mais efetivo para a melhorar a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com vistas a produção de xilitol por *K. marxianus*. Ainda nesta Figura, nota-se que a máxima concentração de etanol (~2,5 g/L) foi atingida após 12 h, coincidindo com o esgotamento da glicose do meio. Após este tempo, ocorreu uma reassimilação deste composto, o qual se esgotou após 72 h, período este que correspondeu a retomada do consumo de xilose e produção de xilitol pela levedura. Signori et al. (2014) estudando o efeito da temperatura e da oxigenação do processo sobre o perfil fermentativo de *K. marxianus* CBS7212 em meio contendo uma mistura de xilose e glicose também constataram um co-consumo de etanol e xilose, após o esgotamento da glicose no meio.

Quanto à formação de biomassa, a Figura 5.8C mostra claramente que os tratamentos de destoxificação que favoreceram a produção de xilitol, também promoveram o maior crescimento celular. As maiores concentrações celulares obtidas (17,3 e 11,9 g/L) foram observadas após 120 h de fermentação nos hidrolisados tratados com CaO e carvão

ativado, respectivamente. Nota-se ainda que, nos cultivos realizados em hidrolisado não tratado, o crescimento celular foi praticamente estacionado após 48 h, mostrando uma produção de apenas 4,0 g/L de biomassa.

No que se refere à formação de ácido acético (Figura 5.8 D), nota-se que em todos os hidrolisados avaliados, este metabólito foi produzido durante a fase inicial dos cultivos. De fato, a formação de ácido acético por *K. marxianus*, especialmente em elevadas temperaturas, tem sido reportada por outros autores (Signori et al. 2014; Wilkins et. al. 2008). De acordo com Signori et al. 2014 a acumulação de acetato por *K. marxianus* CBS7212 foi dependente das condições de oxigenação e temperatura, sendo observado o maior nível deste composto (8,5 g/L) nos cultivos realizados sob as mais elevadas condições de oxigenação (20,95% de O_2) e de temperatura (41 °C) avaliadas. De acordo com estes autores, a acumulação de acetato pode estar relacionada com a demanda de NADPH pelas células, uma vez que, não apenas a via das pentoses fosfato, mas também a via do ácido acético (acetaldeido desidrogenase) pode contribuir para regeneração deste cofator. Os autores também relataram que a via do acetato pode ser necessária para neutralizar o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais promovem estresse oxidativo para as células. O furfural, por exemplo, tem sido apontado como uma substância capaz de induzir o acúmulo de ERO em *Saccharomyces cerevisiae*, provocando danos às membranas das mitocôndrias e vacúolos (ALLEN et al. 2010). Desta forma, a acumulação de acetato observada no presente trabalho pode ser explicada pela condição de estresse (alta temperatura e oxigenação) na qual a levedura foi submetida

A Tabela 5.15 apresenta os parâmetros fermentativos de *K. marxianus*Y-6373 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, após diferentes tratamentos de destoxificação. Para efeito de comparação, são mostrados também os parâmetros obtidos em meio semidefinido contendo xilose como fonte de carbono.

Tabela 5.15. Parâmetros fermentativos de *K. marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz com e sem destoxificação, após 120 h e em meio semidefinido, após 48 h.

Parâmetros	Tratamentos de Destoxificação				
	Não tratado	*CaO*	*Carvão ativado*	*Biológico*	*Meio semidefinido*
P (g/L)	18,3	38,7	30,9	22,2	28,9
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,68	0,74	0,79	0,77	0,70
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,13	0,28	0,25	0,25	0,16
Q_P (g/Lh)	0,15	0,32	0,26	0,18	0,85
X_C (%)	51	92	77	54	86

P = xilitol; $Y_{P/S}$ = fator de conversão de xilose em xilitol; $Y_{X/S}$ = fator de conversão de (xilose + glicose) em células; Q_P = produtividade volumétrica em xilitol; X_C = xilose consumida.

Analisando os parâmetros fermentativos de *K. marxianus* mostrados na Tabela 5.15, nota-se que a composição dos meios de cultivo avaliados não interferiu fortemente na capacidade das células em converter a xilose consumida em xilitol, uma vez que o fator de conversão de xilose em xilitol variou de 0,68 g/g (hidrolisado não tratado) até 0,79 g/g (hidrolisado destoxificado com carvão ativado), o que corresponde a uma variação de 16%. Porém, a eficiência de utilização da xilose (X_C) variou consideravelmente (de 51 a 92 %), o que refletiu nas quantidades de xilitol produzido, assim como nos valores de produtividade volumétrica em xilitol (Q_P). Em termos de Q_P, nota-se que dentre as fermentações dos hidrolisados destoxificados, o tratamento com CaO foi o meio que proporcionou o maior valor deste parâmetro (0,32 g/L.h), o que significa um aumento de 113% em relação ao hidrolisado não tratado. Porém, quando comparado ao meio semidefinido onde se obteve um valor de 0,85 g/L.h, verifica-se um decréscimo de 62%. Estes resultados revelam a necessidade de uma etapa de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz obtido no presente estudo visando à produção de xilitol por *K. marxianus*. Dentre os métodos avaliados, a alcalinização com CaO e a adsorção com carvão ativado, foram os que proporcionaram os melhores resultados. Já o tratamento biológico com *S. cerevisiae* não mostrou melhorias na fermentabilidade do hidrolisado por *K. marxianus*, como foi demonstrado por Fonsenca et al., (2013) durante a produção de etanol por *Pichia stipitis* em hidrolisado de palha de arroz utilizando este mesmo procedimento. Isto mostra que os métodos de destoxificação devem ser definidos para cada

caso.

Os resultados do presente estudo obtidos com *K. marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de palha destoxificado com CaO ($Y_{P/S}$ = 0,74 g/g; Q_P = 0,32 g/L.h e X_C = 92 %) foram superiores ao obtidos por Zhang et al., (2013) durante o cultivo de uma linhagem recombinante de *K. marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho previamente destoxificado com uma combinação de tratamentos (CaO até pH 10 e carvão ativado) e também aos reportado por Albuquerque et al. (2015) que investigaram a produção de xilitol por *K. marxianus* CCA510 em hidrolisado de bagaço de caju destoxificado com carvão ativado ($Y_{P/S}$ = 0,36 g/g; Q_P = 0,07 g/L.h e X_C = 94%).

. O efeito inibitório de vários compostos tóxicos presentes no hidrolisado de madeira pré-tratada por explosão a vapor sobre o crescimento e a produção de etanol pela levedura termotolerante *K. marxianus* CECT 10875 foi investigado por Oliva et al., (2003). O hidrolisado continha (furfural 490 mg/L; catecol 30 mg/L; vanilina 18 mg/L e 4-hidroxibenzaldeido < 10 mg/L) e segundo os autores, nestas concentrações, nenhum destes compostos individualmente afetaram significativamente o bioprocesso.

No presente trabalho, não foram realizados estudos sobre a influência dos compostos inibidores presentes no hidrolisado de palha sobre a produção de xilitol, vislumbrando-se a possibilidade de realização de trabalhos futuros para um melhor conhecimento da tolerância desta levedura aos principais compostos tóxicos identificados no hidrolisado obtido. Porém, com o presente trabalho ficou demonstrado a possibilidade de desenvolver um eficiente processo de produção de xilitol a partir da fração hemicelulósica da palha de arroz, com a implementação de uma etapa de destoxificação.

5.6. Efeito da presença de glicose no meio de fermentação sobre a produção de xilitol por K. marxianus Y-6373

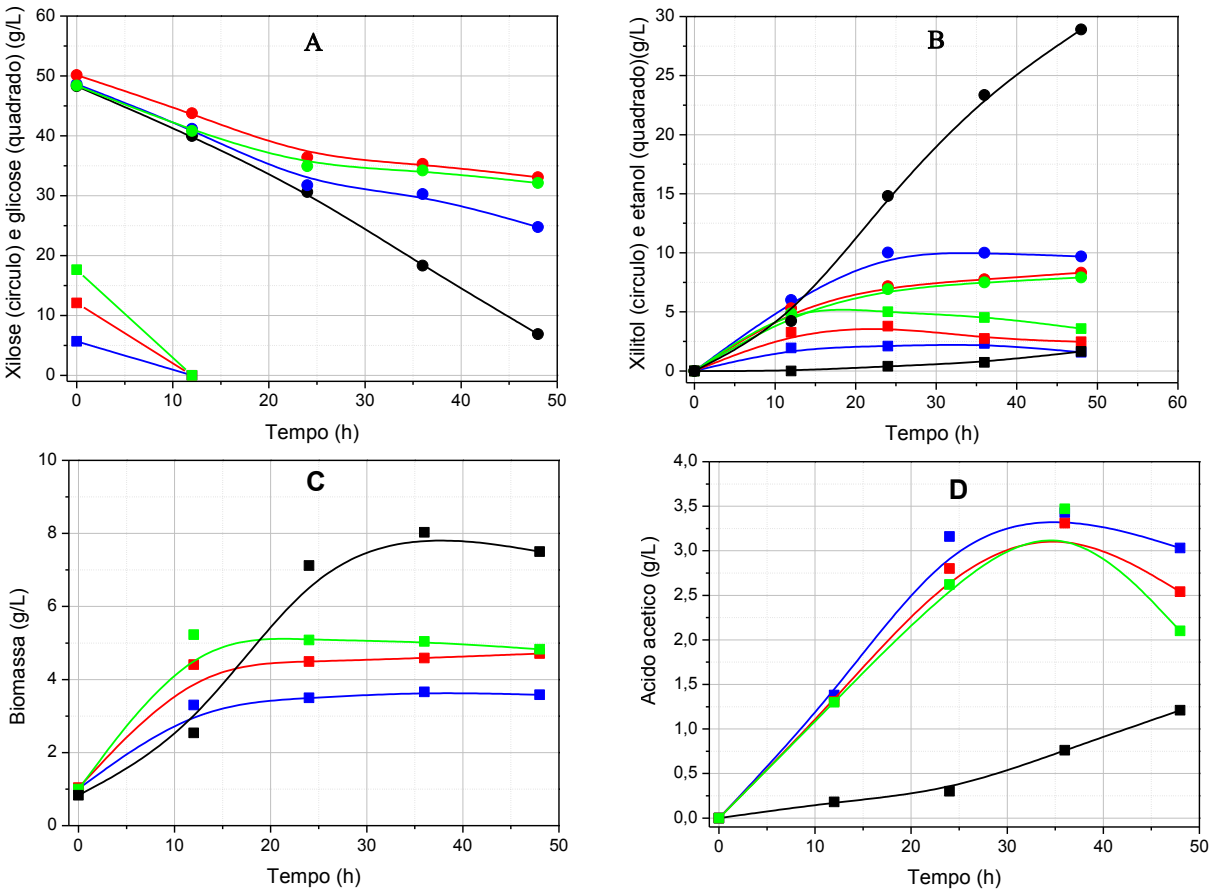
Nos experimentos anteriores foi verificado que a fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *K. marxianus*, foi bastante melhorada após o procedimento de destoxificação, devido a redução dos níveis de compostos inibidores presentes no licor. Porém, a velocidade de consumo de xilose, assim como de produção de xilitol se mostraram ainda inferiores em relação as obtidas em meio semidefinido contendo apenas xilose como fonte de carbono. Esta diferença de comportamento pode ser atribuída à presença de glicose no hidrolisado, uma vez há relatos na literatura sobre o efeito de

repressão catabólica desta hexose sobre o metabolismo de xilose por *K. marxianus* (RODRUSSAMEE et al. 2011). Para verificar esta hipótese, foram realizados ensaios fermentativos em meio semidefinido contendo xilose na mesma concentração do hidrolisado, porém, variando a concentração inicial de glicose de 0 até 18 g/L. Os resultados destes ensaios em termos de consumo de açúcares, produção de metabólitos e de biomassa estão apresentados na Figura 5.9 A-D.

Com relação ao consumo de xilose (Figura 5.9 A), nota-se uma diminuição da velocidade volumétrica de assimilação desta pentose com o aumento da concentração de glicose no meio. Após 48 h de cultivo, a levedura consumiu 86% de xilose em meio contendo apenas a xilose como fonte de carbono, o qual decresceu para 49,6% e quando foi adicionado de glicose, respectivamente.

A inibição do consumo de xilose por *K. marxianus* em meios contendo uma mistura de glicose (20 g/L) e xilose (20 g/L) foi também relatada por Rodrussamee et al., (2011). Segundo os autores, a repressão catabólica aumentou com a elevação da temperatura do cultivo (45 °C > 40 °C >30 °C). Especificamente, os autores verificaram que a 30°C, a glicose foi totalmente consumida após 12 h, e somente após este período ocorreu a assimilação de xilose com uma eficiência de 80%, após 96 h. Com o aumento da temperatura do cultivo para 40 °C, o perfil de consumo de glicose foi similar ao de 30 °C, porém a velocidade de consumo de xilose foi nitidamente reduzida e, após 96 h, apenas 20% desta pentose foi assimilada. Na temperatura de 45 °C, praticamente não ocorreu consumo de xilose. Para os autores, a sensibilidade dos sistemas de transporte de *K. marxianus* à inativação catabólica, pode ter sido responsável pela repressão observada. De fato, Stambuck et al., (2003) estudando a cinética e regulação de assimilação de xilose por *K. marxianus* ATCC 52486, observaram uma forte inibição do transporte de xilose pela glicose, e concluíram que, sob condições repressivas, o transporte é mediado por um sistema de difusão facilitada de baixa afinidade para a xilose. Estas observações podem explicar, pelo menos em parte, o perfil de assimilação de xilose na presença de glicose pela linhagem de *K. marxianus* utilizada no presente trabalho.

Figura 5.9. Consumo de xilose e glicose (A); produção de xilitol e etanol (B), biomassa (C) e ácido acético (D) durante o cultivo de *K. marxianus* Y-6373 em meio semidefinido contendo 50 g/L de xilose adicionado de diferentes concentrações de glicose (g/L): 0 (▬); 6 (▬); 12 (▬) e 18 (▬).



Fonte: Arquivo pessoal

Quando se analisa a produção de xilitol (Figura 5.9 B), verifica-se que em meio ausente de glicose, a concentração deste poliol atingiu um valor máximo de 27 g/L após 48 h, enquanto que na presença de 6, 12 e 18 g/L de glicose, a concentração máxima de xilitol atingiu o máximo com 24 h com valores de 9,7; 7,2 e 7,0, respectivamente, e praticamente se estabilizou após este período. Ainda nesta figura, é possível observar que a levedura produziu pequenas quantidades de etanol em todos os meios avaliados e que a concentração deste subproduto aumentou ligeiramente com o aumento do nível de glicose inicial.

Com relação ao crescimento celular, verifica-se na Figura 5.9 C que a maior concentração de biomassa (~8 g/L) foi obtida no meio contendo apenas xilose como fonte

de carbono, após 36 h. Já na presença de glicose, o crescimento atingiu a fase estacionária após 24 h com valores de 5,0; 4,7 e 3,6, na presença de 6, 12 e 18 g/L de glicose, respectivamente. Foi ainda observado produção de ácido acético em todos os ensaios (Figura 5.9 D), porém o perfil de formação deste ácido no meio contendo apenas xilose como fonte de carbono foi diferente do observado nos meios que continham a mistura xilose + glicose. É possível observar na Figura 5.9 D que na presença de xilose e glicose, a produção de ácido acético atingiu seu valor máximo (~3,0 g/L)com 36 h, e a partir deste tempo o ácido passou a ser consumido pelas células, enquanto que na presença apenas de xilose, a produção decresceu para 1,5 g/L, não sendo observado consumo do mesmo.

Comparando os ensaios fermentativos em meio semidefinido contendo apenas xilose como fonte de carbono (MSD1) e uma mistura de xilose e glicose simulando a composição do hidrolisado (MSD2) com os ensaios em hidrolisado não destoxificado (HND) e destoxificado com carvão ativado (HDCA), alguns aspectos importantes podem ser discutidos (Tabela 5.16).

Tabela 5.16. Comparação dos parâmetros fermentativos de *K. marxianus* Y-6373 em diferentes meios de cultivo, após 48 h.

Parâmetros	**Hidrolisado Hemicelulósico**		**Meio Semidefinido**	
	HND	*HDCA*	*MSD1*	*MSD2*
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,47	0,69	0,70	0,41
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,13	0,25	0,16	0,08
Q_P (g/L.h)	0,16	0,24	0,85	0,20
Q_S (g/L.h)	0,35	0,34	0,86	0,49
X_C (%)	34	30	86	49

MSD1 = meio contendo 50 g/L de xilose como fonte de carbono; MSD2 = meio contendo 50 g/L de xilose + 6 g/L de glicose; HND = hidrolisado não destoxificado; HDCA = hidrolisado destoxificado com carvão ativado.

Nota-se que, na fermentação do meio semidefinido na ausência de glicose (MSD1), ocorreu um aumento significativo em todos os parâmetros do processo em comparação aos obtidos em meio contendo xilose e glicose (MSD2), sugerindo que, a repressão catabólica causada pela glicose pode estar envolvida na inibição tanto dos sistemas de transporte da xilose quanto das enzimas responsáveis pela conversão de xilose em xilitol. Por outro lado,

na fermentação do hidrolisado destoxificado nota-se que, os parâmetros relativos ao produto ($Y_{P/S}$ e Q_P) foram aumentados em cerca de 50%, em relação ao hidrolisado não destoxificado, enquanto que os parâmetros relativos ao consumo de substrato não mostrou uma variação significativa. Estes resultados evidenciam o efeito negativo da glicose sobre a assimilação da xilose, uma vez que essa hexose contribui para o aumento da produção de ácido acético, porém não influencia na eficiência do metabolismo de conversão de xilitol. Além disso, os resultados revelam que a remoção parcial dos inibidores através da etapa de destoxificação é crucial para aumentar a excreção de xilitol no meio.

É também interessante notar na Tabela 5.16, que o bioprocesso foi mais afetado pela presença de glicose do que pela presença de inibidores, uma vez que os parâmetros obtidos no meio hidrolisado não destoxificado (HND) são próximos aos obtidos no MSD2 (meio com glicose sem inibidores). Portanto, para contornar este problema, alternativas visando a remoção da glicose podem ser avaliadas. A realização do processo em duas etapas visando inicialmente a assimilação da glicose, seguido de um novo inóculo para efetiva conversão da xilose em xilitol tem mostrado resultados positivos, comprovando assim a eficácia do método (LEATHERS E DIEN 2000).

Estudando o potencial fermentativo *K. marxianus* 36907 em meio semidefinido simulando a concentração de açúcares encontradas no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (50 g/L de xilose; 4 g/L de glicose e 7,5 g/L de arabinose), da Silva et al., (2015) também observaram um consumo parcial de xilose, assim como a produção de ácido acético durante o cultivo da levedura. Segundo os autores, o rendimento em xilitol a partir da fermentação em hidrolisado destoxificado foi 53,8% superior em comparação ao meio semidefinido simulando a concentração de açúcares, o que foi atribuído à presença de compostos presentes nos hidrolisado, tais como o ácido acético, que, em concentrações não inibitórias, tem mostrado favorecer o metabolismo de xilitol em *Candida guilliermondii* (FELIPE et al., 1995). No presente trabalho, o favorecimento do rendimento em xilitol no meio hidrolisado destoxificado em relação ao meio semidefinido simulado foi de 69%, ou seja, ainda superior ao observado por Felipe et al., (1995).

6. CONCLUSÕES

Os resultados experimentais obtidos neste trabalho permitiram concluir que:

✓ A linhagem termotolerante de *Kluyveromyces marxianus* Y-6373 selecionada em meio semidefinido contendo xilose como fonte de carbono, foi capaz de produzir xilitol com boa eficiência, sendo os melhores resultados obtidos na temperatura de 40 °C ($Y_{P/S}$ = 0,70 g/g e Q_P = 0,60 g/L.h).

✓ O tratamento alcalino da palha de arroz, empregando condições alcalinas brandas (desacetilação), mostrou ser um método eficaz na remoção dos grupos acetil da biomassa. Além disso, permitiu uma redução parcial de lignina e de cinzas, sendo ainda um procedimento útil para a liberação de ácidos fenólicos, especialmente os ácidos ferúlico e p-cumárico no licor alcalino.

✓ Os melhores resultados de tratamento alcalino da palha de arroz foram obtidos quando o processo foi realizado a temperatura de 70 °C durante 45 minutos com uma carga de 80 mg de NaOH/g de palha. Em reator de 50 L, o tratamento foi capaz de remover 84,6% de grupos acetil, 54,8% de cinzas, 28,3% de lignina e <5% das frações açucaradas. Portanto, pode-se dizer que sob as condições de tratamento alcalino otimizadas, foi produzido um sólido com características favoráveis para obtenção tanto do hidrolisado hemicelulósico quanto do celulósico.

✓ A eficiência de hidrólise da hemicelulose (EHH) a partir da palha de arroz *in natura* e desacetilada foi positivamente influenciada pela severidade combinada do processo (SC) até o limite de 1,88, não sendo constatadas melhorias no processo acima deste valor de severidade.

✓ As condições de hidrólise ácida que permitiram a obtenção da máxima recuperação da hemicelulose variaram com a palha utilizada. O maior valor de EHH empregando a palha *in natura* (86,9%) foi obtido com uma concentração de ácido sulfúrico de 1,5% (m/v) durante 60 min (SC = 1,89). Para a palha desacetilada, o maior valor (~ 78%) foi alcançado com 1,0 ou 1,5% de acido durante 90 minutos, o que correspondeu a um valor de SC de 1,88 e 2,06, respectivamente.

✓ A composição química do hidrolisado hemicelulósico da palha de arroz desacetilada obtido em reator, sob as condições otimizadas estatisticamente (1,0% de ácido durante 85 minutos), revelou uma menor concentração de compostos tóxicos em relação ao

hidrolisado da palha *in natura*, demonstrando assim que a etapa de desacetilação foi uma estratégia eficaz para obtenção de um licor de açúcares com menor toxicidade.

- ✓ A produção de xilitol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* Y-6373 a partir do hidrolisado hemicelulósico da palha desacetilada contendo 50 g/L de xilose, não foi influenciada pela suplementação nutricional, mas foi fortemente afetada pela presença do ácido acético produzido a partir da glicose no meio, e pela toxicidade química do hidrolisado.
- ✓ A efetividade na remoção dos compostos inibidores presentes no hidrolisado hemicelulósico da palha desacetilada variou com o tipo de tratamento de destoxificação empregado, sendo os melhores resultados obtidos com carvão ativado (~ 92%), seguido do tratamento com *S. cerevisiae* (~ 75%) e CaO (~ 65%). Porém, levando em consideração a fermentabilidade dos hidrolisados por *K. marxianus* Y-6373, o melhor tratamento de destoxificação foi baseado no uso CaO, seguido de carvão ativado e *S. cerevisiae*.
- ✓ A etapa de destoxificação do hidrolisado é de fundamental importância para aumentar a excreção de xilitol no meio, melhorando assim a produtividade volumétrica em xilitol. Empregando o hidrolisado destoxificado com CaO foi possível obter valores de $Y_{P/S}$ e Q_P de 0,74 g/g e 0,35 g/L.h, respectivamente, enquanto que no hidrolisado não destoxificado, estes parâmetros foram reduzidos em 9% e 133%, respectivamente.
- ✓ Em fermentações em meio semidefinido, ficou evidenciado que a presença de glicose afeta negativamente todos os parâmetros da bioconversão, sugerindo que, a repressão catabólica causada pela glicose pode estar envolvida na inibição tanto dos sistemas de transporte da xilose quanto das enzimas responsáveis pela conversão de xilose em xilitol.
- ✓ A partir do perfil fermentativo de *K. marxianus* Y-6373 em meio semidefinido simulando a proporção xilose:glicose encontradas no hidrolisado destoxificado ficou demonstrado que a glicose impactou negativamente a assimilação da xilose, mas não afetou a eficiência do metabolismo de conversão de xilitol, a qual se mostrou superior em hidrolisado.

De uma forma geral, conclui-se que a levedura *Kluyveromyces marxianus* Y-6373 é uma candidata em potencial para ser utilizada na bioconversão de xilose em xilitol em elevadas temperaturas, sendo necessária a avaliação de estratégias de condução do processo que minimizem o efeito inibitório causado pelo ácido acético formado.

REFERÊNCIA

ALBUQUERQUE, T. L. , GOMES, S. D. L.; Jr, J. E. M.; Jr, I. J. S.; ROCHA, M. V. P. Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. **Catalysis Today,** v. 255, p. 33–40, 2015.

ALLEN, S.A.; CLARK, W.; Mc CAFFERY, J.M.; CAI, Z.; LANCTOT, A. SLININGER, P.J.; LIU, Z.L.; GORSICH, S.W. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology for Biofuels,** v.3, n°2, p. 1-10, 2010.

ALONSO, D. M.; BOND, J. Q.; DUMESIC, J. A. Catalytic conversion of biomass to biofuels. **Green Chemitry**.,v. 12, p. 1493–1513, 2010.

AMIDON, T. E.; LIU, S. Water-based woody biorefinery. **Biotechnology Advances**, v.27, p. 542–550, 2009.

ANGY, S. J., GREEVES, D.; MILLS, J. A. Complexes of Carbohydrates with Metal Cations III - Conformations of Alditols in Aqueous Solution. **Australian Journal Chemitry**., v. 27,p. 1447-56, 1974.

ARORA, R.; BEHERA, S.; KUMAR, S. Bioprospecting thermophilic/thermotolerant microbes for production of lignocellulosic ethanol: A future perspective. **Renewable and Sustainable Energy Reviews,** v.51, p. 699–717, 2015.

BALAT, M.; BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. **Applied Energy**, v. 86, p. 2273–2282, 2009

BANAT, I. M.; NIGAM, P.; MARCHANT, R. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 259-263, 1992.

BANAT, I. M, NIGAM, P., SINGH, D., MARCHANT, R., MICHALE, A. P. Review: Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I - Yeasts in general. W. **Journal Microbiol. Biotechnol**, v. 14, p. 809-821, 1998.

BARBOSA, M.F.S., MEDEIROS, M.B., MANCILHA, I.M., SCHNEIDER, H., LEE, H. Screening of Yeasts for Production of Xylitol from D-Xylose and Some Factors which Affect Xylitol Yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, p. 241-251, 1988.

BAYRAKCI, A. G.; KOÇAR, G. Second-generation bioethanol production from water hyacinth and duckweed in Izmir: A case study. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 30, p. 306–316, 2014.

BILLA, E.; KOUKIOS, E. G.; MONTIES, B. Investigation of lignins structure in cereal crops by chemical degradation methods. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 71-75, 1998.

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R.R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; AGALAKSHMI, S.; KURIEN, N., SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4767–4774, 2010.

BOUDET, A. M., KAJITA, S., PETTENATI, J.G., GOFFNER, D. Lignins and lignocellulosics a better control of synthesis for new and improved uses. **Trends in Plant Science,** v.8, n° 12, 2003.

BOZELL, J. J.; PETERSENB, G. R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy's "Top 10".**Green Chemistry.**, v. 12, p. 539–554, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC n°18, de 24 março 2008. Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/00f52080443f051bb2eab24e461d9186/Microsoft+Word++Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+n%C2%BA+18,+de+24+de+mar%C3%A7o+de+2008.pdf?MOD=AJPERES>.Acessado em: 23 mar. 2015.

BURANOV, A. U.; MAZZA, G. Lignin in straw of herbaceous crops. **Industrial Crops and Products**, v. 28, p. 237–259, 2008

CAMARGO, D.; SENE, L.; VARIZ, D. I. L. S.; FELIPE, M. G. A Xylitol bioproduction in hemicellulosic hydrolysate obtained from sorghum forage biomass. **Applied Biochem Biotechnol**, v. 175, p. 3628–3642, 2015

CANILHA, L.; SANTOS, V. T. O.; ROCHA, G. J. R.; SILVA, J. B.A.; GIULIETTI, M.;SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F.; CARVALHO, W. A study on the pretreatment of a sugarcane bagasse sample with dilute sulfuric acid. **Journal Industrial & Microbiology Biotechnology,** v. 38, p. 1467–1475, 2011.

CARDONA, C.A; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4754–4766, 2010

CASSALES, A.; SOUZA-CRUZ, P .B.; RECH, R., AYUB, M. A. Z.Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v, 35, p. 4675-4683, 2011

CASTRO, R. C. A.; ROBERTO, I. N. Selection of a Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* Strain with Potential Application for Cellulosic Ethanol Production by Simultaneous Saccharification and Fermentation, **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 172, p.1553-64, 2014.

CHANDEL, A. N.; SILVA, S. S.; SINGH, O. V. Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production. **Biofuel Production – Recent Developments and Prospects,** v.1, p.225-246, 2011.

CHÁVEZ, R.; BULL, P.; EYZAGUIRRE, J. The xylanolytic enzyme system from the genus Penicillium. **Journal of Biotechnology,** v. 123, n.4, p.413-433, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB) –**Monitoramento agrícola, cultivo de verão, 2° safra de inverno - Safra 2014/2015, v.2, n° 8**. Brasília. Disponível:<http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/upload/arquivos/15_05_13_08_46_55_boletim_graos_maio_2015.pdf>.Acesso em:03 jun. 2015.

CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMÍNGUEZ, M. J. Xylitol production from Hardwood hemicellulose hydrolysate by *Pachsolen tannophilus, Debaryomyces hanseniiI* and *Candida guilliermondii.* **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.82, 1999.

CHANDEL, A. K.; KAPOOR, R. K.; SINGH, A.; KUHAD, R.C.;Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1947–1950, 2007.

CHEN, W-H.; PEN, B-L; YU, C-T; HWANG, W-S. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. **Bioresource Technology,** v.102, p. 2916–2924, 2011

CHEN, X., SHEKIRO, J., FRANDEN, M. A., WANG, W., ZHANG, M., KUHN, E. JOHSON, D., TUCKER, P. M. The Impacts of deacetylation prior to dilute acid pretreatment on the bioethanol process. **Biotechnology for Biofuels,** v.5, n° 8,p. 2012ª

CHEN, X.; TAO, L, SHEKIRO, J.; MOHAGHAGHI, A.; DECKER, S., WANG, W.,SMITH, H., PARK, S.; HIMMEL, M.; TUCKER, M. Improved ethanol yield and reduced Minimum Ethanol Selling Price (MESP) by modifying low severity dilute acid pretreatment with deacetylation and mechanical refining: 1) Experimental **Biotechnology for Biofuels**, v.5, n° 60, 2012b.

CHEN, X., WANG, Z., FU, Y., LI, Z., QIN, M. Specific lignin precipitation for oligosaccharides recovery from hot water wood extract. **Bioresource Technology**, v. 152, p. 31–37, 2014.

CHEN, X.; SHEKIRO, J.; ELANDER, R.; TUCKER, M. Improved xylan hydrolysis of corn stover by deacetylation with high solids dilute acid pretreatment. **Industrial & Engineering Chemistry Research,** v. 51, p. 70-76, 2012

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

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS (USDA) **U.S. 2015/16 Rice Crop Forecast at 219.0 Million Cwt.** Disponível em<http://www.ers.usda.gov/media/1841050/rcs-15e.pdf>**.** Acessado em 03 jun.2015.

DEHKHODA , A.; BRANDBERG, T.; TAHERZADEH, M.J. Comparison of vacuum and high pressure evaporated wood hydrolyzate for ethanol production by repeated fed-batch using flocculating *Saccharomyces cerevisiae* **BioResources, v.**4, p. 309-320, 2009.

DIEP, N. Q.; SAKANISHI, K.; NAKAGOSHI, N.; FUJIMOTO, S.; MINOWA, T. Potential for rice straw ethanol production in the Mekong Delta, Vietnam. **Renewable Energy**, v. 74, p. 456-463, 2015.

DRAPCHO, C. M.; NHUAN, N. P.; WALKER, T. H. **Biofuels Engineering Process**, 1° edição, EUA, ed. Mc Graw Hill, 2008. 317p.

DUNAYER, E.K. New findings on the effects of xylitol ingestion in dogs. **Veterinary Medicine** v.12, p.791–796, 2006

EBRINGEROVA, A.; HEINZE, T. Xylan and xylan derivatives – biopolymers with valuable properties, 1 Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. **Macromolecular. Rapid Communication**, v. 21, p. 542–556, 2000.

EBRINGEROVA, A. Structural Diversity and Application Potential of Hemicelluloses. **Macromolecular. Symposium**, v. 232, p. 1–12, 2006.

FAULDS, C. B.; WILLIAMSON, G. The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v.79, p. 393-395, 1999.

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

FENGEL, D.; WEGENER, G. Wood: chemistry, ultrastructures, reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1983.

FONSECA, B.G. **Avaliação das condições do tratamento biológico de hidrolisado hemicelulósico visando melhorar a produção de etanol por *Scheffersomyces (pichia) Stipitis*.** 186p. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2014.

FONSECA, B. G.; PUENTES, J. G.; MATEO, S.; SÁNCHEZ, S.‡ ALBERTO J. MOYA, A.J.; ROBERTO, I.C.Detoxification of Rice Straw and Olive Tree Pruning Hemicellulosic Hydrolysates Employing *Saccharomyces cerevisiae* and Its Effect on the Ethanol Production by *Pichia stipitis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 9658−9665, 2013.

FONSECA, B. G., MOUTTA, R. O.; FERRAZ, F. O.; VIEIRA, E. R.; NOGUEIRA, A. S.; BARATELLA, B. F.; RODRIGUES, L. C.; HOU-RUI, Z.; SILVA, S. S. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast**. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology** ,v. 38, p. 199–207, 2011.

FONSECA, G. G.; CARVALHO, N. M. B.; GOMBERT, A. K.; Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 5055–5067, 2013.

FONSECA, G.G.; HEINZLE, E.; WITTMANN, C.; GOMBERT, A.K. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 339-54, 2008

GEDDES, R.; SHANMUGAM, K. T.; INGRAM, L. O. Combining treatments to improve the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysates by ethanologenic *Escherichia coli* LY180. **Bioresource Technology,** v. 189, p. 15–22, 2015

GIELEN, D. J., FUJINO, J., HASHIMOTO, S., MORIGUCHI, Y. Biomass strategies for climate policies? **Climate Policy**, v.2, n°4, p. 319-333, 2002.

GIRIO, F. M.; FONSECA, C., CARVALHEIRO, F., DUARTE, L. C., MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology,** v. 101, p. 4775–4800, 2010.

GUO, G-L.; CHEN, W-H; CHEN, W-H; MEN, L-C; HWANG, W-S. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. **Bioresource Technology,** v.99 p. 6046–6053, 2008.

GUO, X. X.; ZHANG, R.; LI, Z.; DAI, D., LI, C.; ZHOU, X. A novel pathway construction in Candida tropicalis for direct xylitol conversion from corncob xylan. **Bioresource Technology**, v. 128, p. 547–552, 2013

GURAGAIN, Y. N.; CONINCK, J.; HUSSON, F.; DURAND, A.; RAKSHIT, S. K. Comparison of some new pretreatment methods for second generation bioethanol production from wheat straw and water hyacinth. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 4416–4424, 2011.

HABIBI, Y.; LUCIA, L. A.; ROJAS, O. J. Cellulose Nanocrystals: Chemistry, Self-Assembly, and Applications**. Chemicals. Reviews,** v. 110,p. 3479–3500, 2010**.**

HARVEY, I. M.; HARTLEY, R. Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell wall polysaccharides of barley straw. **Carbohydrate Research,** v. 148, p. 71-85, 1986

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology,** v.100, p. 10–18, 2009.

HERRERA, A.; TÉLLEZ-LUIZ, S. J., RAMÍREZ, J. A.; VÁSQUEZ, M. Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. **Journal Cereal Science**.,v.37, p. 267-274, 2003

HON, D. N. S.; SHIRAISHI, N. **Wood and cellulosic chemistry**. 2.ed., rev. e aum. New York : Marcel Dekker, 2001, 914 p.

HORIUCHI, J.; TADA, K.; KANNO, T. Biorefinery for bioethanol, lactic acid, xylitol and astaxanthin production from corn cobs. **Special Abstracts / Journal of Biotechnology**, p. 150-576, 2010.

HU, G.; HEITMANN, J. A.; ROJAS, O. J. Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark, and forest residues. **BioResources,** v. 3, n° 1, p. 270-294, 2008.

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

HYVONEN, L.; KOIVISTOINEN, P. Food Technological evaluation of xylitol. In: **Advanced in Food Research**. Academic Press Inc: New York, 1982, v.28, .p. 373-405 ISBN: 0-12-016428.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. Key World Energy Statistics. Disponível em: http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/KeyWorld2014.pdf. Acesso em 02 Ago, 2015.

ISHIHARA, C. S.; NAKAI, Y.; MILGROM, P.; SÖDERLING, E.;TOLVANEN, M.;MURAKAMI, K. Xylitol Carryover Effects on Salivary Mutans Streptococci after 13 Months of Chewing Xylitol Gum. **Caries Research**, v. 46, p. 519–522, 2012

JIANG, H.; CHEN, Q.; GE, J.; ZHANG, Y. Efficient extraction and characterization of polymeric hemicelluloses from hybrid poplar. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 1005 – 1012, 2014.

KADAM, K. L.; FORREST, L. H.; JACOBSON, A. W. Rice straw as a lignocellulosic resource: collection, processing, transportation, and environmental aspects. **Biomass and Bioenergy,** v. 18, p. 369-389, 2000.

KARIMI, K.; KHERADMANDINIA, S.; TAHERZADEH, M. J. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. **Biomass and Bioenergy**, v. 30, p. 247–253, 2006.

KIM, S.R.; HA, S. J.; KONG, I.; JIN, Y. S. High expression. of XYL2 coding for xylitol dehydrogenase is necessary for efficient xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Metabolic Engineering**, v. 14, p. 336–343, 2012.

KIM, T. H.; KIM, J. S.; SUNWOO, C.; LEE, Y. Y. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 39–47, 2003

KUMAR, S.; SINGH, S. P.; MISHRA, I.M.; ADHIKARI, D.K. Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp. IIPE453. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnol**, v. 36, p. 1483–1489, 2009.

KUNDIYANA, D. K.; WILKINS, M. R.; HUHNKE, R. L;. BANAT, I. M. Effect of Furfural Addition on Xylose Utilization by *Kluyveromyces marxianus* IMB4 under Anaerobic and Microaerobic Conditions. **Biological Engineering**, v.2, n°1, p. 3-15, 2009.

KRUTOV,S. M., VOZNYAKOVSKII, A. P., GRIBKOV, I. V., SHUGALEI, I.V. Lignin Wastes: Past, Present, and Future. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 84, n°. 13, p. 2632–2642, 2014.

LAPIERRE, C.; ROLANDO, C.; POLLET, B. New insights into the molecular architecture of hardwood lignins by chemical degradative methods. **Research on. Chemical Intermediates,** v.21, n°3-5, p.397-412, 1995.

LANE, M.M., BURKE, N., KARREMAN, R., WOLFE, K. H., O´BYRNE, C.P.,MORRISEY, J.P. Physiological and Metabolic Diversity In The Yeast Kluyveromyces marxianus**. Antonie Van Leeuwennhoek Journal of Microbiology**, 2011

LANE, M.M.; MORRISSEY, J.P. *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal Biology Reviews**, v. 24, p. 17-26, 2010.

LARSSON, S.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N. O.; JONSSON, L. J. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77–79, p. 91-103, 1999.

LEATHERS, T.D., DIEN, B.S. Xylitol Production from Corn Fibre Hydrolysates by a two–stage Fermentation Process. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 765-769, 2000.

LEE, S. H.; CHOI, B. K.; KIM, Y. J. The cariogenic characters of xylitol-resistant and xylitol-sensitive Streptococcus mutans in biofilm formation with salivary bactéria **Archives of Oral Biology** , v. 57, p. 697 – 703, 2011

LEE, J-W; JEFFRIES, T.W. Efficiencies of acid catalysts in the hydrolysis of lignocellulosic biomass over a range of combined severity factors. **Bioresource Technology**, v.102, p. 5884–5890, 2011.

LEE, W. J.; RYU, Y. W.; SEO, J. H. Characterization of two-substrate fermentation processes for xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene. **Process Biochemistry,** v. 35, p. 1199–1203, 2000.

LEWIS, N. G.; YAMAMOTO, E. Lignin: occurrence, biogenesis and biodegradation **Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology**, v.41, p. 455-96, 1990.

LLOYD, T.A.; WYMAN, C.E. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1967–1977, 2005

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

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

LULU, L. ZHAHG, L. DONGMEI, W., XIALOIAN, G.,HISANORI, T.,HIDEHIKO, K., JONG, H. Identification of a xylitol desidrogenase gene from *Kluyveromyces marxianus* NBRC 1777. **Molecular Biotechnology**., v.53, p. 159-169, 2013.

MAITY, S. K. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: PartI **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p.1427–1445, 2015.

MAKINEN, K. K. Sugar Alcohols, Caries Incidence, and Remineralization of Caries Lesions: A Literature Review. **International Journal of Dentistry,** p. 23 pages, 2010.

MÄKINEN, K. K. Sugar Alcohol Sweeteners as Alternatives to Sugar with Special Consideration of Xylitol**. Medical Principles Practice**, v. 20,p. 303–320, 2011.

MAKINEN, K.; KNUUTTILA, M. L.,. Effect of xylitol on the growth and metabolism of Streptococcus mutans. **Caries Research**.,v.9,n. 3, p. 177-89. 1975.

MATEO, S.; ROBERTO, I. C.; SÁNCHEZ, S.; MOYA, A. J. Detoxification of hemicellulosic hydrolyzate from olive tree pruning residue. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 196– 203, 2013

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M. E.; YORK, S. W.; PRESTON, J. F.; INGRAM, L. O. Effects of Ca(OH)2 Treatments(“Overliming”) on the Composition and Toxicity of Bagasse Hemicellulose Hydrolysates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n°. 5, 2000.

MELISSA MONTALBO-LOMBOY, M.; JOHNSON, L.; KHANAL, S. K.; LEEUWEN , H.; DAVID GREWELL, D. Sonication of sugary-2 corn: A potential pretreatment to enhance sugar release. **Bioresource Technology,** v. 101, p.351–358, 2010

MHHE (MC GRAW HILL EDUCATION). **Cotton: The fiber of life** Disponível em <http://www.mhhe.com/biosci/pae/botany/botany_map/articles/article_30.html>. Acessado 27 mai. 201.5

MILLATI, R.; NIKLASSON, C.; TAHERZADEH, M. J.Effect of pH, time and emperature of overliming on detoxification of dilute-acid hydrolyzates for fermentation by*Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 515-522, 2002.

MONICA, E. K.; GELLERSTEDT, G.; HENRIKSSON, G. **Pulp and Paper Chemistry and technology**. Berlin: de Gruyter, 2009

MORENO, A.D.; TOMÁS-PEJÓ, E.; IBARRA, D.; BALLESTEROS, M.; OLSSON, L. *In situ* Laccase treatment enhances the fermentability of steam-exploded wheat straw in SSCF processes at high dry matter consistencies. **Bioresource Technology**, v. 143, p. 337-343, 2013.

MORGENSTERN, I.; POWLOWSKI, J.,ISHMAEL, N.; DARMOND, C.; MARQUETEAU, S., MOISAN, M. C., QUENNEVILLE, G., TSANG, A. A molecularphylogeny of thermophilic fungi. **Fungal Biology**, v. 11, p. 489-502, 2012.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M. LADISCH, M.Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology** , v. 96, p. 673–686, 2005.

MUELLER, M.; WILKINS, R.; BANAT, I. M. Production of Xylitol by the Thermotolerant Kluyveromyces marxianus IMB Strains. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v.1, n.2, p. 1-5, 2011.

MUSSATTO , S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I, C. Ferulic and *p*-coumaric acids extraction by alcaline hydrolysis of brewer's spent grain **Industrial Crops and Products,** v. 25, p. 231–237, 2007

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, p.1–10, 2004.

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

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, p. 268-274, 2006.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Evaluation of nutrient supplementation to charcoaltreated and untreated rice straw hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p. 497-502, 2005.

MUSSATO,S.I., ROBERTO,I.C. Produção Biotecnólogica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, 28- setembro/outubro, 2002.

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

MUSSATTO, S.I, ROBERTO, I.C.. Influence of toxic compound present in brewer´s spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-xylitol bioconversion by *Candida guillermondii*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3801-3806, 2005.

MUELLER M, WILKINS M.R, BANAT I.M. Production of xylitol by the therm tolerant *kluyveromyces marxianus* IMB strains. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v.1:102, e doi: 10.4172/2155-9821.1000102e, 2011

NREL (NATIONAL RENEWABLE ENERGY LABORATORY), 2009. Disponível em <http://www.nrel.gov/biomass/birefinery.html>. Acessado em 27 mai. 2015.

NEL, W. P.; COOPER, C. Implications of fossil fuel constraints on economic growth and global warming. **Energy Policy**, v. 37, p. 166–180, 2009.

NILVERBRANT, N. O.; REIMANN, A.; LARSSON, S.; JONSSON, L. Detoxification of lignocellulosic hydrolysate with ion exchange resins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91, n° 93, p. 35-49, 2001.

OH, G. H.; PARK, C. R. Preparation and characteristics of rice straw based porous carbons with high adsorption capacity. **Fuel**, v. 81, p. 327-336, 2002.

OLIVA, J. M., NEGRO, M. J., SÁEZ, F.; BALLESTEROS, I., MANZANARES, P.,GONZÁLES, A., BALLESTEROS, M. Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v. 41, p.1223-1228, 2006.

OLIVA, J.M.; SÁEZ, F.; BALLESTEROS, I. GONZÁLEZ, A.; NEGRO, M.J.;MANZANARES, P.; BALLESTEROS, M.; Effect of lignocellulosic degradationcompounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* **Applied Biochemistry and Biotechnology,** v. 105–108, p. 141-153, 2003

O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels **Cellulose**,v. 4, p. 173-207, 1997.

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

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

PARAJULI, R., DALGAARD, T., JØRGENSEN, U.; ADAMSEN, A. P.; MANKNUDSEN, M. T.; BIRKVED, M.; GYLLING, M; SCHJØRRING, J. K.. Biorefining in the prevailing energy and materials crisis: a review of sustainable pathwaysfor biorefinery value chains and sustainability assessment methodologies. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 43, p. 244–263, 2015

PARIS, M. J., CARDOSO, M.A.T., FONSECA, L.P. Towards bioethanol: an overview of whole lignocellulose processing. **Research and Reviews in Materials Science and Chemistry,** v.4, n° 2, p. 55-118, 2014.

PENG, F., PENG, P., FENG XU, SUN, F.R.C. Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses. **Biotechnology Advances,** v.30, p. 879–903, 2012.

PIOTROWSKI, J. S.; ZHANG, Y.; BATES, D. M.; KEATING, D.H.; SATO, T. K.; ONG, I. O.; LANDICK, R. Death by a Thousand cuts: the challenges and diverse landscape of lignocellulosic hydrolysate inhibitors. **Frontier in Microbiology**, v. 5, p. 1-8, 2014.

RAFIQUL, I. S. M.; MIMI SAKINAH, A. M. Processes for the Production of Xylitol—AReview. **Food Reviews International**, v. 29, n. 2, p. 127-156, 2013.

RALPH, J.; Lignin structure: recent developments. In: **Proceedings of the 6th Brazilian Symposium Chemistry of Lignins and Other Wood Components**, Guaratinguetá, Brazil, p. 97–112, 2010.

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

RODRIGUES, R. C. L. B., FELIPE, M. G .A., ALMEIDA E SILVA, J. B., VITOLO, M., GOMEZ, P. V. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacum evaporation. **Brazilian. Journal of Chemical Engineering**, v.18, p. 299–311, 2001.

RODRUSSAMEE, N.; LERTWATTANASAKUL, R.; HIRATA, K.; SUPRAYOGI, S. L.; KOSAKA, T.; YAMADA, M. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1573–1586, 2011.

RUGTHAWORN, P.; MURATA, Y.; MACHIDA, M.; APIWATANAPIWAT, W.; HIROOKA, A.; THANAPASE, W.; DANGJAREAN, H.; USHIWAKA, S.; MORIMITSU, K.; KOSUGI, A.; ARAI, T.; VAITHANOMSAT, P. Growth Inhibition of Thermotolerant Yeast, Kluyveromyces marxianus, in Hydrolysates from Cassava Pulp. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.173, p. 1197–1208, 2014.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5270–5295, 2008.

SANTOS, J. W.; CABRAL, L. S.; ZERVOUDAKIS, J., T.; ABREU, J. G.; SOUZA, A. L.; PEREIRA, G.A.; REVERDITO, R. Farelo de arroz em dietas para ovinos. **Revista. Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.11, n.1, p 193-201, 2010.

SAULNIER, L.; MAROT, C.; CHANLIAU, E.; THIBAULT, J. T. Cell wall polysaccharide interactions in maize bran. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, p. 279-287, 1995.

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

SIGNORI, L., SIMONE PASSOLUNGHI, S.; RUOHONEN, L.; PORRO, D.;BRANDUARDI, P. Effect of oxygenation and temperature on glucose-xylose fermentation in *Kluyveromyces marxianus* CBS712 strain. **Microbial Cell Factories**, v.13, n° 51, p.1-16, 2014.

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

SILVA D. D. V.; ARRUDA P. V.; VICENTE, F. M. C. F.; SENE, L.; SILVÉRIO, S. S.; FELIPE, M. G. A. Evaluation of fermentative potential of *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 in cellulosic and hemicellulosic sugarcane bagasse hydrolysates on xylitol and ethanol production. **Annals of Microbiology**, v. 65, p. 687–694, 2015

SILVA, J.P.A. **Aplicação de processos oxidativos avançados como uma nova estratégia para a destoxificação de hidrolisado hemicelulósico visando à produção de etanol**. 201.265f. Tese (Doutorado) - Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2011.

SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. The Influence of Initial Xylose Concentration, Agitation, and Aeration on Ethanol Production by *Pichia stipitis*from Rice Straw Hemicellulosic Hydrolysate .**Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, p. 1306–1315, 2010.

SINGH, R.D., BANERJEE, J. B., ARORAN, A. Prebiotic potential of oligosaccharides. A focus on xylan derived oligosaccharides. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, p.19–30, 2015.

SLUITER, A., HAMES, B., RUIZ, R.; SCARLATA, C., SLUITER, J., TEMPLETON, D., CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass **Laboratory Analytical Procedure (LAP).** Disponível em <http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html>. Acesso em 27 abr 2014.

SOARES JÚNIOR, M. S.; BASSINELLO, P. Z.; CALIARI, M.; GEBIN, P. F. C.;JUNQUEIRA, T. L.; GOMES, V. A.; LACERDA, D. B. C. L. Qualidade de pães com farelo de arroz torrado. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos,** v.29, n° 3, p. 636-641, 2009.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica,** 8th ed.; John Wiley & Sons, Inc: v.2, 2006, 715p. ISBN: 978-85-216-1449-4.

STAMBUK, B.U.; FRANDEN, M.A.; SINGH, A.; ZHANG, M. D-Xylose transport by *Candida succiphila* and *kluyveromyces marxianus* **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105–108, p. 255-263, 2003.

SU, B.;WU, M.; LIN, J. Yang, L. Metabolic engineering strategies for improving xylitol production from hemicellulosic sugars **Biotechnology Letters** v. 35, p. 1781–1789, 2013

SUN, R. C.; SUN, X. F.; WANG, S. Q.; ZHU, W.; WANG, X. Y. Ester and ether linkages between hydroxycinnamic acids and lignins from wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, and fast-growing poplar wood. **Industrial Crops and Products**,v. 15, p. 179–188, 2002

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, p. 1–11, 2002

SUN, F. F.; WANG, L. HONG, J.; REN, J.; DU, F.; HU, J.; ZHANG, Z.; ZHOU, B. The impact of glycerol organosolv pretreatment on the chemistry and enzymatic hydrolyzability of wheat straw. **Bioresource Technology**,v**.** 187, p. 354–361, 2015.

SUZUKI, T. YOKOYAMA, S. I.; KINOSHITA, Y.; YAMADA, H.; HATSU, M,; TAKAMIZAWA, K.; KEIICHI KAWAP, K. Expression of *xyrA* gene encoding for Dxylose reductase of Candida tropicalis and production of xylitol in *Escherichia coli*. **Journal of Bioscience and Bioengineering,** v. 87, p.280-284, 1999.

TILLONEN, J., HOMANN, N., RAUTIO, M., SOMER-JOUSIMIES, H., SALASPURO, Role of yeast in the salivary acethaldehyde production from etanol among risk groups for etanol-associated oral cavity câncer – **Alcoholism Clinical and Experimental Research**, v. 23, n. 8, p. 1409-1415, 1999.

TORRE, P.; ALIAKBARIAN, B.; RIVAS, B.; DOMÍNGUEZ, J. M.; CONVERTI, A. Release of ferulic acid from corn cobs by alkaline hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 500–506, 2008.

UHARI, M.; KONTIOKARI, T.; KOSKELA, M.; NIEMELA, M. Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: double blind randomised trial .**British Medical Journal**, v. 313, p.1180-1183, 1996.

UITTAMO, J. NIEMINEN, M. T.; KAIHOVAARA, P.; BOWYER, P.; SALASPURO, M.; RAUTEMA, R. Xylitol inhibits carcinogenic acetaldehyde production by *Candida species*. **International Journal of Cancer**, v. 129, p. 2038–2041, 2011

URIT, T.; STUKERT, A.; BLEY, T. LÖSER, C. Formation of ethyl acetate by *Kluyveromyces marxianus*on whey during aerobic batch cultivation at specific traceelement limitation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 96, p. 1313–1323, 2012.

VACA, C.E., NILSSON, J.A., FANG, J.L., GRAFSTROM, R.C.,Formation of DNA adducts in human buccalepitelial cells exposed to acetaldehyde and methyglyoxal in vitro. **Chemico-Biological Interactions**, v. 108, p. 197-208, 1998.

VALERO, M. A.; LEO´N-SANZ, M.; ESCOBAR, I.; GOMIS, P.; CAMARA, A.;MORENO, J. M. Original Communication Evaluation of non glucose carbohydrates in parenteral nutrition for diabetic patients. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 55, p. 1111–1116, 2001.

VÁZQUEZ, M., OLIVA, M., SIMÓN J., TÉLLEZ-LUIS ,A., RAMÍREZ, J. A. Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid Evaluation of furfural production. **Bioresource Technology,** v. 98, p. 3053–3060, 2014.

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

VOHRA, M.; MANWAR, J; MANMODE, R.; PADGILWAR, S.; PATIL, S. Bioethanol production: Feedstock and current technologies. **Journal of Environmental Chemical Engineering,** v2, p. 573–584, 2014.

WANG, Y. M.; KING, S. M., PATTERSON, J. H., EYS, J. V. Mechanism of xylitol toxicity in the rabbit. **Metabolism**, v.22, n.7, p.443-457 1973.

WENDE, G.; FRY, S. C. O-Feruloylated, O-Acetylated oligosaccharides as side-chains of grass xylans. **Phytochemistry**, v. 44, n° 6, p. 1011 – 1018, 1997.

WERPY T.; PETERSEN G. Top value added chemicals from biomass. **Volume I- results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas.** U.S. Department of Energy. Disponível em: <http://www1.eere.energy.gov/ bioenergy/pdfs/35523.pdf>; 2004.

WIDYASTUTI, Y.; ABE, A. Effect of the Silica Content on Digestibility of Rice Straw **Japan Agricultural Research Quaterly**, v..23, n°1, 1989.

WILKINS, M. R.; MUELLER, M.; EICHLING, S.; BANAT.I. M. Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains Kluyveromyces marxianus IMB2, IMB4, and IMB5 under anaerobic conditions. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 346–350, 2008

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

WITTEVEEN, C.F.B. WEBER,F.; BUSINK, R.; VISSER, J. Isolation and characterization of two xylitol dehidrogenases from *Aspergillus niger*. **Microbiology**, v.140, n.7, p.1679-1675, 1994.

YABLOCHKOVA , E. N.; BOLOTNIKOVA ,O. I.; MIKHAILOVA, N. P.; NEMOVA ,N. N.; GINAK, A. I. The activity of key enzymes in xylose-assimilating yeast at diferente rates of oxygen transfer to the fermentation médium. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 39, n.. 3, p. 265–269, 2004

YABLOCHKOVA , E. N.; BOLOTNIKOVA ,O. I.; MIKHAILOVA, N. P.; NEMOVA ,N. N.; GINAK, A. I. The Activity of Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase in Yeasts. **Microbiology**, v. 72, n.4, 200, p. 414–417, 2003

YADAV, K.S.; NASEERUDDIN, S.; PRASHANTHI, G.S.; SATEESH, L.; RAO, L.V. bioethanol fermentation of concentrated rice straw hydrolysate using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis* **Bioresource Technology**, v. 102, p. 6473-6478, 2011.

YOSHITAKE, J., SHIMIMARUA, M., ISHIZAKI, H., IRIE, Y. Xylitol production by*Enterobacterliquefaciens*. **Agricultural and Biological Chemistry**, n. 40, p.1493-1503, 1976.

ZHANG, B.,L. I, L.,ZHANG. J.,GAO, X.,WAAG, D.,HONG, J. Improving ethanol and xylitol fermentation at elevated temperature through substitution of reductase in kluyveromyces marxianus. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, n.40, p. 305-316, 2013.

ZHANG, J.; ZHANG, B.; WANGA, D., GAO, X., HONG, J. Improving xylitol production at elevated temperature with engineered*Kluyveromyces marxianus* through over-expressing transporters. **Bioresource Technology**, v. 175, p. 642–645, 2015.

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, p. 367–375, 2008.

ZHANG, Y. H. P.; LYND, L. R. Toward an Aggregated Understanding of Enzymatic Hydrolysis of Cellulose noncomplexed cellulase systems. **Biotechnology and Bioengineering**, v.8, n° 7, 2004.