UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

DANIELA INÊS LORETO SARAIVA VARIZ

**Avaliação da Biomassa de Sorgo Forrageiro para Produção
Biotecnológica de Xilitol**

**Lorena- SP
2011**

DANIELA INÊS LORETO SARAIVA VARIZ

**Avaliação da Biomassa de Sorgo Forrageiro para Produção Biotecnológica
de Xilitol**

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

Orientador: Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe.

Edição Reimpressa e Corrigida

**Lorena- SP
Maio, 2011**

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.

Catálogo na Publicação

Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”

Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Variz, Daniela Inês Loreto Saraiva

Avaliação da biomassa de sorgo forrageiro para produção biotecnológica de xilitol. / Daniela Inês Loreto Saraiva Variz. - ed. reimpr., corr.- 2011.

77 p. : il.

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

Orientadora: Maria das Graças de Almeida Felipe

1. Xilitol 2. Biomassa de sorgo 3. Hidrolisado hemicelulósico 4.

Candida guilliermondii . I. Título

664.16 - CDU

*A Deus pelo amor incondicional e irrestrito e ao
meu marido, Gladstoni, pela paciência,
incentivo e confiança depositada em mim.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo excelente exemplo de dedicação e amor devotados à área acadêmica.

Aos meus irmãos por todo carinho e incentivo concedidos a mim.

À Profa Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe, por sua excelente orientação, por compartilhar seu conhecimento e pela sua generosidade e paciência constantes.

Ao pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo-Sete Lagoas, José Avelino Santos Rodrigues, pelo fornecimento da biomassa de 3 variedades de sorgo forrageiro.

Aos queridos amigos de laboratório, em especial ao Mateus pela sua colaboração no realizar dos experimentos, à Luciana Chaud pela ajuda sempre presente e à Priscila por dividir seus conhecimentos.

À Profa. Dra. Rita de Cássia, por todo carinho e paciência para me explicar minhas inúmeras dúvidas.

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

A CAPES pelo auxílio financeiro.

BIOGRAFIA

Daniela Inês Loreto Saraiva Variz

Data de nascimento: 12/10/1983.

2003: Ingressou no Curso de Graduação em Bacharel em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa – UFV/ MG.

Maio 2004 - Janeiro 2005: Realizou Curso de Inglês na escola St. George's Centre for English As A Second Language – Guelph – Ontário – Canadá.

2006-2008: Bolsista de Iniciação Científica (CNPq) no Laboratório de Biologia Molecular de Plantas da Universidade Federal de Viçosa – UFV/ MG.

Agosto 2008: Conclusão da Graduação em Bacharel em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa – UFV/ MG.

Fevereiro 2009: Ingressou no Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia Industrial, nível Mestrado, na Escola Engenharia de Lorena – Lorena, SP.

RESUMO

VARIZ, D. I. L. S. **Avaliação da biomassa de sorgo forrageiro para produção biotecnológica de xilitol**. 2011. 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, 2011.

O cultivo de sorgo se encontra em grande ascensão no Brasil pelas características favoráveis deste cereal como um excelente substituto do milho na alimentação animal, pelo seu comparável valor nutritivo e melhor adaptação a climas secos. Considerando que o sorgo forrageiro é um tipo de sorgo empregado como cobertura de solo e produção de silagem, a sua característica como material lignocelulósico, sua constituição em açúcares nas suas frações celulósica e hemicelulósica, pesquisas para o seu aproveitamento biotecnológico poderão contribuir para a obtenção de produtos de interesse econômico e social, como o xilitol. A obtenção biotecnológica do xilitol, um álcool pentahidroxilado, comercialmente obtido por catálise química de xilose proveniente de materiais lignocelulósicos é uma opção de aproveitamento desta biomassa. Este produto possui características peculiares como poder adoçante comparável ao da sacarose, anticariogenicidade, indicado para diabéticos e obesos o que permite a sua ampla aplicação em diferentes segmentos industriais. Em função de seu elevado custo de produção por via química, pesquisas vêm sendo extensivamente realizadas na busca de uma tecnologia alternativa para sua obtenção por via biotecnológica. Porém, para a aplicação da biotecnologia para produção de xilitol a partir de biomassas lignocelulósicas é necessário a realização de hidrólise destes materiais para a solubilização dos açúcares constituintes da sua fração hemicelulósica. Esta fração é de interesse, devido ao seu elevado teor de xilose, substrato para a produção de xilitol. Assim, no presente trabalho foram avaliadas 3 variedades (A, B e C) de biomassa de sorgo forrageiro para produção biotecnológica de xilitol empregando a levedura *Candida guilliermondii*. Foram realizadas diferentes etapas do processo como a caracterização química das variedades, hidrólise ácida, concentração à vácuo, destoxificação e fermentação dos hidrolisados. A performance fermentativa foi avaliada a partir da determinação dos parâmetros rendimento ($Y_{P/S}$) e produtividade (Q_P) de xilitol, bem como das atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH). Pela caracterização química das 3 variedades avaliadas constatou-se que não há diferenças relevantes quanto aos teores das frações celulose, hemicelulose e lignina, embora a variedade A tenha se mostrado mais promissora para a produção de xilitol, em função dos máximos parâmetros $Y_{P/S}$ e Q_P obtidos. Neste caso os máximos valores de rendimento e produtividade de xilitol foram respectivamente correspondentes a 0,35 g/g e 0,16 g/L.h⁻¹ para a variedade A, 0,25 g/g e 0,12 g/L.h⁻¹ para a variedade B e 0,17 g/g e 0,063 g/L.h⁻¹ para a variedade C. Consequentemente as máximas atividades enzimáticas para as enzimas XR (0,25 U/mgprot) e XDH (0,17 U/mgprot) ocorreram nas fermentações realizadas com a variedade A, embora não se observou diferenças marcantes em relação às demais variedades.

Palavras-chave: Xilitol. Biomassa de Sorgo. Hidrolisado hemicelulósico. *Candida guilliermondii*.

ABSTRACT

VARIZ, D. I. L. S. **Evaluation of the forage sorghum biomass for biotechnological production of xylitol**. 2011. 77 p. Dissertation (Master of Science)- Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, São Paulo, 2011.

The culture of sorghum is in great ascension in Brazil due to the favorable characteristics of this cereal as an excellent substitute for the maize in the animal feeding, with comparable nutritional value and the better adaptation for dry climates. Considering forage sorghum as a type of sorghum that is used as covering of the ground and production of ensilage, its characteristics as lignocellulosic material which is constituted of sugars in its cellulosic and hemicellulosic fractions, researches for the biotechnological exploitation of this biomass will contribute for obtainment of economic and social interest products, like xylitol. The obtainment of xylitol, a pentahydroxilic alcohol, commercially obtained by chemical catalysis of xylose proceeding from lignocellulosic materials is an option of exploitation of this biomass. This product has peculiar characteristics like its sweetener power similar to that of saccharose, anticariogenicity, indicated for diabetic and obese people allowing its application in different industrial segments. Due to its raised cost of chemical production, researches have been extensively carried out in order to search a technological alternative for its obtainment by biotechnological way. However, for xylitol production from lignocellulosic biomasses by biotechnological way, the hydrolysis of these materials for the solubilization of the sugars present in its hemicellulosic fractions is necessary. This fraction is of interest, because it has large amount of xylose, substrate for the production of xylitol. Then, in the present work 3 varieties (A, B and C) of forage sorghum biomass for biotechnological production of xylitol were evaluated using the *Candida guilliermondii* yeast. Different stages of the process were carried out: chemical characterization of the varieties, acid hydrolysis, vacuum concentration, detoxification and fermentations of the hydrolysates. The fermentative performance was evaluated from the determination of the xylitol yield ($Y_{P/S}$) and productivity (Q_P), and from the activities of the enzymes xylose reductase (XR) and xylitol dehydrogenase (XDH). For the chemical characterization of the 3 evaluated varieties, no relevant difference was verified in relation to amounts of the cellulose, hemicellulose and lignin fractions. However the variety A showed to be more promising for the production of xylitol as a function of the obtained $Y_{P/S}$ and Q_P maximum parameters. In this case the maximum values xylitol yield and productivity were respectively 0,35 g/g and 0,16 g/L.h⁻¹ for the variety A, 0,25 g/g and 0,12 g/L.h⁻¹ for the variety B and 0,17 g/g and 0,063 g/L.h⁻¹ for the variety C. Consequently the maximum enzymatic activities for enzymes XR (0,25 U/mgprot) and XDH (0,17 U/mgprot) occurred in the fermentations carried out with the variety A, and no notable difference was observed in relation to the other varieties.

Key-words: Xylitol. Sorghum biomass. Hemicellulosic hydrolysate. *Candida guilliermondii*.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 SORGO	15
2.2 XILITOL	17
2.2.1 Propriedades e Aplicações	17
2.2.2 Obtenção de Xilitol	21
2.2.2.1 Via Química	21
2.2.2.2 Via Biotecnológica	23
2.2.3 Fatores que Influenciam a Bioconversão de Xilose em Xilitol	26
2.3 INIBIDORES DO METABOLISMO MICROBIANO	27
2.4 DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO	30
2.4.1 Carvão Vegetal Ativado	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS BIOMASSAS DE SORGO	32
3.1.1 Determinação de Carboidratos e Ácidos Orgânicos	32
3.1.2 Determinação de Lignina Insolúvel em Ácido	33
3.1.3 Determinação de Lignina Solúvel	34
3.1.4 Determinação do Teor de Cinzas	34
3.1.5 Determinação de Furfural e Hidroximetilfurfural	35
3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	35
3.3 OBTENÇÃO DOS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS DA BIOMASSA DE 3 VARIEDADES DE SORGO	35
3.4 DESTOXIFICAÇÃO DOS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS DA BIOMASSA DE 3 VARIEDADES DE SORGO PELA ALTERAÇÃO DE pH E ADSORÇÃO EM CARVÃO VEGETAL ATIVADO	36
3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS	36
3.6 FERMENTAÇÕES	36
3.6.1 Microrganismo e Preparo do Inóculo	36
3.6.2 Meio e Condições de Fermentação	37
3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	37
3.7.1 Viabilidade e Pureza da Cultura	37

3.7.2 Determinação da Concentração Celular.....	38
3.7.3 Determinação das Concentrações de Xilose, Glicose, Arabinose, Xilitol, Glicerol, Etanol e Ácidos Acético.....	38
3.7.4 Determinação das Concentrações de Furfural e Hidroximetilfurfural.....	38
3.7.5 Determinação das Concentrações de Compostos Fenólicos.....	38
3.7.6 Determinação das Atividades de XR e XDH.....	38
3.7.7 Determinação de Proteína Solúvel.....	39
3.8 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FERMENTATIVOS.....	40
3.8.1 Fator de Conversão de Xilose em Xilitol ($Y_{P/S}$).....	40
3.8.2 Produtividade Volumétrica de Xilitol (Q_P).....	40
3.8.3 Eficiência de Conversão (η).....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE 3 VARIEDADES DE SORGO AVALIADAS.....	41
4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS DA BIOMASSA DE 3 VARIEDADES DE SORGO	41
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ LIGNOCELULÓSICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ANTES E APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA.....	44
4.4 FERMENTAÇÃO POR <i>Candida guilliermondii</i> DOS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS DA BIOMASSA DE 3 VARIEDADES DE SORGO.....	46
4.4.1 Consumo de Açúcares.....	46
4.4.2 Consumo de Ácido Acético e Variação de pH.....	48
4.4.3 Consumo de Fenóis.....	50
4.4.4 Produção de Biomassa e Xilitol.....	51
4.4.5 Formação dos Subprodutos Glicerol e Etanol.....	56
4.4.6 Efeito da Destoxificação dos Hidrolisados sobre os Produtos Fermentativos Após 96h de Cultivo.....	58
4.5 AVALIAÇÃO DAS FERMENTAÇÕES DOS TRÊS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS DA BIOMASSA SORGO SOBRE AS ATIVIDADES DAS ENZIMAS XILOSE REDUTASE (XR) E XILITOL DESIDROGENASE (XDH) DE <i>Candida guilliermondii</i>	61
5. CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS	66
APÊNDICES.....	75

1. INTRODUÇÃO

A população humana produz milhões de toneladas de resíduos agroindustriais anualmente e, na maioria das vezes, esses rejeitos são eliminados no meio ambiente, provocando como consequência um acúmulo excessivo de matéria orgânica na natureza. A América Latina produz, aproximadamente, 500 milhões de toneladas/ano de subprodutos agroindustriais, sendo que o Brasil produz quase metade deste montante.

Os diferentes materiais lignocelulósicos, os quais se diferenciam quanto ao teor de suas frações celulósica, hemicelulósica e lignina, utilizados para a obtenção de hidrolisados hemicelulósicos empregados na obtenção de xilitol, são bagaço de cana-de-açúcar, cavacos de eucalipto, palha de arroz, palha de trigo, palha de sorgo e casca de aveia entre outros.

O sorgo é um dos vegetais mais versáteis e eficientes, tanto do ponto de vista fotossintético, como em velocidade de maturação. É da mesma família do trigo, da cevada e da cana-de-açúcar e possui reconhecida aplicabilidade que se estende desde o uso de seus grãos como alimento animal, bem como matéria-prima para produção de álcool anidro, bebidas alcoólicas, colas e tintas além da aplicação de suas panículas para produção de vassouras. Da mesma forma que em culturas de vegetais como a cana-de-açúcar, trigo e aveia que geram subprodutos como o bagaço de cana-de-açúcar, a palha de trigo e a casca de aveia, o sorgo tem a palha como excedente na sua produção. Estes materiais são caracterizados pelas suas frações celulósica, hemicelulósica e lignina, típicos dos vegetais.

Xilitol é um açúcar-álcool de propriedades peculiares com alto poder adoçante, semelhante ao da sacarose, anticariogenicidade, metabolismo independente de insulina e recentemente indicado na prevenção de osteoporose e tratamento de otites. É um aditivo em alimentos, substância “GRAS” (Generally Regarded as Safe) pelo Food and Drug Administration dos Estados Unidos, obtido convencionalmente por processo químico. No entanto, o alto custo da produção de xilitol por processo químico, devido à necessidade de várias etapas para purificação de seu precursor (xilose) e utilização de catalisador, reduz o seu potencial de aplicação nos setores farmacêutico, odontológico e alimentício. Pesquisas têm sido feitas para se obter uma tecnologia alternativa de obtenção biotecnológica de xilitol a partir da utilização de microrganismos capazes de assimilar xilose o que requer a participação das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase. Vários trabalhos vêm sendo realizados com a utilização do bagaço de cana de açúcar, entretanto, a avaliação de outras fontes de

biomassa é de importância para este bioprocesso como no caso a biomassa de sorgo forrageiro.

Vários estudos têm sido feitos para se estabelecer um processo biotecnológico para obtenção de xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos que apresentem rendimento igual ou superior ao do processo químico. No entanto, os resultados das pesquisas em escala laboratorial, embora promissores, não são ainda suficientes para ampliação de escala principalmente em função da produtividade do xilitol ser ainda relativamente baixa ao se comparar com o processo químico. Este fato deve-se à presença nos hidrolisados, de compostos tóxicos aos microrganismos, como fenólicos, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural, provenientes do procedimento de hidrólise ácida da biomassa bem como de metais pesados que podem ser oriundos da corrosão dos equipamentos de hidrólise ou mesmo da matéria-prima..

A importância do presente trabalho se deve à possibilidade de utilização da biomassa de 3 variedades de sorgo forrageiro, para fins de produção biotecnológica de xilitol como alternativa à via química utilizada atualmente, com o intuito de conhecimento desta matéria-prima e identificação da melhor variedade para produção biotecnológica de xilitol por *Candida guilliermondii*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SORGO

A cultura do sorgo, no Brasil, apresentou avanço significativo a partir da década de 70. Nesses poucos mais de 30 anos, a área cultivada tem mostrado flutuações, em decorrência da política econômica, tendo a comercialização como principal fator limitante. Atualmente, a cultura tem apresentado grande expansão (20% ao ano, a partir de 1995), principalmente, em plantios de sucessão a culturas de verão, com destaque para os Estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e região do Triângulo Mineiro, onde se concentram aproximadamente 85% do sorgo granífero plantado no país. Projeções feitas sobre o potencial de expansão da cultura indicam aumento de até seis vezes da área plantada, ainda nesta década, sem risco de excesso de oferta (EMBRAPA, 2008).

Agronomicamente os sorgos são classificados em 4 grupos: granífero; forrageiro para silagem e/ou sacarino; forrageiro para pastejo/corte verde/fenação/cobertura morta; vassoura. O primeiro grupo inclui tipos de porte baixo (híbridos e variedades) adaptados à colheita mecânica. O segundo inclui tipos de porte alto (híbridos e variedades) apropriados para confecção de silagem e/ou produção de açúcar e álcool. No terceiro grupo estão incluídos variedades de capim sudão ou híbridos inter específicos de *Sorghum bicolor* x *Sorghum sudanense*. Enquanto o quarto inclui-se tipos de cujas panículas são confeccionadas vassouras (EMBRAPA, 2008).

Dos quatro grupos, o sorgo granífero é o que tem maior expressão econômica e está entre os cinco cereais mais cultivados em todo o mundo, ficando atrás do arroz, trigo, milho e cevada. A área total cultivada com sorgo granífero é de cerca de 37 milhões de ha, e deste total Ásia e África participam com 82%. No entanto, a maior produção e produtividade estão na América do Norte. Estados Unidos e México juntos produzem 34% da produção mundial. Entre os maiores produtores de grãos de sorgo do mundo, a Índia detém a maior área plantada, com cerca de 11 milhões de ha. Mas os Estados Unidos lideram a produção mundial, com quase 14 milhões de toneladas numa área de pouco mais de 3 milhões de ha. Índia, Nigéria, México, Sudão, China, Argentina, Austrália, Etiópia, Burkina, pela ordem, completam o grupo dos dez maiores produtores mundiais de grãos de sorgo. Na América do Sul, Argentina é o maior produtor, seguido pelo Brasil, que está muito próximo de fazer parte do grupo dos dez. A produção brasileira está crescendo rapidamente e poderá, ainda nesta década, se igualar ou

superar a posição da Argentina no Continente. Em termos globais, sorgo é a base alimentar de mais de 500 milhões de pessoas em mais de 30 países. Somente arroz, trigo, milho e batata o superaram em termos de quantidade de alimento consumido. Entretanto, a cultura de sorgo produz muito menos do que seu potencial oferece. O século XX foi o século do trigo, do arroz e do milho. O século XXI poderá ser o século do sorgo (EMBRAPA, 2008).

O maior uso de grãos de sorgo no Brasil está na avicultura e suinocultura. Bovinos, eqüinos e pequenos animais são também consumidores mas em menor proporção. Praticamente não há consumo de sorgo em alimentação humana. A silagem de sorgo e o pastejo são igualmente utilizados para rebanhos de corte e de leite. A agroindústria de carnes está cada vez mais interessada em aumentar o consumo de sorgo em dietas de monogástricos. Estima-se que a produção de grãos de sorgo poderá se elevar até 4-5 milhões de toneladas. nesta década sem risco de excesso de oferta, uma vez que o balanço demanda/oferta de milho está ajustado, e mais recentemente o país recomeçou a exportar este cereal com bons resultados financeiros para produtores e exportadores. O sorgo passa a assumir cada vez mais um papel estratégico para a consolidação de uma política de exportação de milho, quer sob a forma direta ou agregada em carnes de aves e suínos (EMBRAPA, 2008).

O sorgo pode substituir parcialmente o milho nas rações para aves e suínos e totalmente, para ruminantes, com uma vantagem comparativa de menor custo de produção e valor de comercialização de 80% do preço do milho. Além disso, a cultura tem mostrado bom desempenho como alternativa para uso no sistema de integração lavoura/pecuária e para produção de massa, proporcionando maior proteção do solo contra a erosão, maior quantidade de matéria orgânica disponível e melhor capacidade de retenção de água no solo, além de propiciar condições para uso no plantio direto (EMBRAPA, 2008).

A lavoura de sorgo forrageiro para corte e/ou pastejo vem ganhando destaque nos últimos anos, devido à sua facilidade de cultivo, resistência à seca, rapidez no estabelecimento e no crescimento, e por sua facilidade de manejo para o corte, além de um bom valor nutritivo e alta produção de forragem (MELLO et al., 2003).

O uso de forragens na forma de silagem está se tornando cada vez mais comum, como uma alternativa para amenizar o problema de escassez de pastagem, no período de estiagem; apresentando o sorgo e o milho como as culturas mais adaptadas ao processo de ensilagem, por suas facilidades de cultivo, altos rendimentos e pelas qualidades das silagens produzidas.

Sendo favorecido o uso do sorgo na forma de silagem por essa cultura apresentar bons níveis de carboidratos solúveis, baixo poder tampão, conteúdo de matéria seca apropriado por ocasião da época de ensilagem e estrutura física que favorece a compactação no silo e o desenvolvimento da fermentação láctica (PEREIRA et al., 2008).

Segundo Pereira et al. (2007) em determinadas situações em que a forrageira não possui características ideais para a conservação na forma de silagem, ou quando houver falhas no processamento, uma alternativa seria o uso de aditivos, com o objetivo de melhorar sua conservação, seu valor nutritivo e sua palatabilidade. Como exemplos, a adição de carbonato de cálcio, isoladamente ou associado à uréia em silagens de milho e sorgo que possuem baixos teores de nitrogênio, cálcio e de fósforo; ou a adição de inoculantes bacterianos à fermentação, já que a população de bactérias produtoras de ácido láctico pode ser pequena nas forragens, sendo afetada pelas condições ambientais, podendo levar à obtenção de silagens de qualidade variável

Um dos excedentes do processamento do sorgo é a sua palha, que ainda é escassamente explorada, sendo que há poucos relatos na literatura quanto ao seu aproveitamento biotecnológico. Segundo pesquisas realizadas por Herrera et al. 2004, a palha de sorgo possui na sua composição química parcial 34 % de celulose, 44 % de hemicelulose e 20 % de lignina. Também há informações quanto à utilização da palha como ingrediente na ração de alimentação animal, na pasta de papel e também na produção de compostos químicos, como a xilose (HERRERA et al., 2003, 2004; VÁZQUEZ et al. 2007). Em pesquisa realizada por Sene et al. (2011) foi avaliada a produção biotecnológica de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de sorgo forrageiro por *Candida guilliermondii*, tendo sido constatada a capacidade desta em produzir xilitol em baixas concentrações comparadas a outros hidrolisados como o de bagaço de cana o que segundo esses autores requer mais estudos para estabelecer melhores condições de hidrólise desta biomassa e de um adequado processo de destoxificação do hidrolisado.

2.2 XILITOL

2.2.1 Propriedades e Aplicações

O xilitol (Figura 1), poliálcool cuja fórmula molecular é $C_5H_{12}O_5$ possui poder adoçante semelhante ao da sacarose e superior ao de polióis comuns, tolerado para diabéticos,

além de valor calórico reduzido (MÄKINEN, 2000). Uma das vantagens do xilitol sobre a sacarose é que em virtude de sua estabilidade química e microbiológica, ele atua, mesmo em baixas concentrações, como conservante de produtos alimentícios, oferecendo resistência ao crescimento de microrganismos e prolongando a vida de prateleira destes produtos (BAR, 1991). Uma outra vantagem é que, devido à ausência de grupos aldeídicos ou cetônicos em sua molécula, o xilitol não participa de reações com aminoácidos, conhecidas como reações de “Maillard”, não sofrendo reações de escurecimento não enzimático, reações que provocam diminuição do valor nutricional das proteínas (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973).

A anticariogenicidade, uma das propriedades mais relevantes do xilitol, é determinada principalmente pela sua não-fermentabilidade por bactérias do gênero *Streptococcus*, cuja proliferação na flora bucal torna-se então limitada, não contribuindo assim para a formação de ácidos que atacam o esmalte dos dentes, além deste promover a remineralização dos mesmos, revertendo lesões recém formadas (SHEN *et al.*, 2001). Segundo Wen, Browngardt e Burne (2001), o mecanismo de inibição do crescimento da bactéria *S. mutans* na presença de xilitol, se deve à sua fosforilação no interior da célula, o que impede a sua assimilação, evitando a formação de cáries. Enquanto Kandelman (2003) atribui a diminuição do número de *S. mutans* na saliva e/ou na placa, à perda da capacidade de adesão destas bactérias na cavidade bucal. Em resumo, o xilitol contribui para a saúde bucal de seis maneiras: (1) reduzindo a incidência de cáries; (2) estabilizando íons cálcio e fosfato na saliva e conseqüentemente remineralizando os dentes; (3) estabilizando as cáries já formadas; (4) reduzindo o crescimento de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* na saliva; (5) estimulando a formação da saliva (sem aumentar a produção de ácidos na placa dentária); (6) controlando o pH da placa e a capacidade tamponante da saliva, após o consumo de sacarose (KANDELMAN, 1997; MAKINEN, 2000).

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

Uma outra característica importante do xilitol é o seu metabolismo independente de insulina, de fato, nenhuma das duas principais vias de absorção do xilitol (fígado e flora intestinal) é mediada pela insulina, tornando-o um substituto de outros açúcares na dieta de diabéticos (MANZ *et al.*, 1973; PEPPER; OLINGER, 1988). Este adoçante também pode ser empregado no tratamento de outras desordens metabólicas como a anemia falciforme, que é a deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, enzima responsável pela manutenção de um nível adequado da coenzima reduzida NADPH, o que leva a uma diminuição dos eritrócitos (VIEIRA-NETO; PEREIRA; FONSECA, 1999). E na obesidade, uma vez que a sua utilização na dieta de obesos exerce pequena contribuição para a formação de tecidos gordurosos quando comparado a outros açúcares (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973). Em estudos realizados com ratos foi constatado que a ingestão de xilitol reduziu o ganho de peso e o consumo de alimento com conseqüente diminuição dos níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol nestes animais (ELLWOOD *et al.*, 1999).

Outras aplicações clínicas do xilitol demonstradas em animais, foi a capacidade deste em impedir a progressão da osteoporose, promovendo o aumento da massa dos ossos, preservando os minerais neles existentes e evitando o enfraquecimento de suas propriedades biomecânicas, através do estímulo da absorção de cálcio pelo intestino e por facilitar a sua passagem do sangue para os ossos (MATTLA; KNUUTTLA; SVANBERG, 1998).

Pesquisas também foram realizadas quanto à aplicação do xilitol no tratamento da fibrose cística, uma doença que afeta principalmente os pulmões, caracterizada por uma colonização bacteriana crônica e infecção recorrente das vias respiratórias (ROWE; MILLER; SORSCHER, 2005; ZABNER *et al.*, 2000). Esses autores constataram em testes com humanos, que o uso inalatório do xilitol em “spray” resultou na diminuição da concentração salina da camada superficial da membrana respiratória, o que favoreceu a imunidade própria desta superfície e, como conseqüência, reduziu o número de bactérias do gênero

Staphylococcus coagulase-negativa na cavidade nasal de voluntários, diminuindo o risco de infecções bacterianas pulmonares.

O xilitol tem também a sua eficácia comprovada no tratamento de pacientes com otite média aguda, que é a segunda infecção mais comum em crianças, causada por bactérias da nasofaringe que penetram no ouvido médio através do tubo de Eustáquio (ERRAMOUSPE; HEYNEMAN, 2000). O que é atribuído à inibição do crescimento de *Streptococcus pneumoniae* em função do impedimento da adesão desta bactéria sobre as células nasofaringeais. Esta propriedade foi observada em experimentos clínicos em crianças, onde o xilitol mostrou-se eficaz na prevenção do desenvolvimento de otite, com a utilização de uma dose variando entre 8,4 a 10 g/dia dividida em cinco porções (UHARI; TAPIAINEN; KONTIOKARI, 2001; TAPIAINEN *et al.*, 2002). Estes autores observaram ainda que o uso de xilitol na prevenção desta doença reduziu consideravelmente a utilização de antibióticos empregados no tratamento, o que diminui a resistência de bactérias a agentes antimicrobianos causada justamente pelo uso descontrolado dos mesmos.

O farnesol pode ser combinado ao xilitol como forma de controlar o balanço da microbiota da pele, pela inibição da formação de biofilme da bactéria *Staphylococcus aureus* além de dissolver aquele já existente (MASAKO *et al.*, 2005a e b). É importante ressaltar, que estes autores não observaram a inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus epidermidis*, a qual é a principal constituinte da microflora da epiderme de pessoas saudáveis protegendo-as contra o crescimento de bactérias patogênicas como no caso de *S. aureus*.

O xilitol é bem tolerado pelo corpo humano podendo ser consumido até 20g por dose, ou 60g por dia se ingerido em várias refeições. A ingestão acima dessa porção pode apresentar efeito laxativo devido ao desequilíbrio osmótico causado no intestino grosso pela baixa taxa de assimilação (EMODI, 1972; CULBERT *et al.*, 1986). Em organismos superiores, o metabolismo de xilitol ocorre principalmente no fígado, onde pode ser transformado em glicose a uma taxa entre 20 e 80%, dependendo da necessidade, e uma vez que sua absorção é lenta, ele pode ser metabolizado indiretamente pela biota intestinal (HASSINGER *et al.*, 1981).

Quanto à segurança do consumo e utilização por humanos, o xilitol já é aceito pela Comunidade Econômica Européia desde 1984, enquanto a agência que regula alimentos e medicamentos nos Estados Unidos (*Food and Drug Administration*) o classifica como

“geralmente reconhecido como seguro” (*Generally Regarded as Safe* – GRAS) desde 1986 e “seguro para os dentes” desde 1994. O Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares da Organização Mundial da Saúde confirmou os estudos de toxicidade de xilitol e o classificou como “aceitável para consumo diário”. No Brasil, o Ministério da Saúde aprovou o composto, como produto dietético, em 1980 (AGUIAR; OETTERER; MENEZES, 1999). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) as alegações para gomas de mascar relacionadas ao sorbitol, xilitol e manitol foram reavaliadas em 2007 como não produtoras de ácidos que danificam os dentes, sendo que o consumo não substitui hábitos adequados de higiene bucal e de alimentação (ANVISA, 2008).

Todas as características apresentadas pelo xilitol têm garantido sua aprovação em mais de 35 países, com demanda crescente nas indústrias alimentícia, farmacêutica e odontológica. No Brasil, a sua utilização está voltada principalmente para produtos como creme dental, gomas de mascar e pastilhas. Em contrapartida, atualmente cerca de 80 a 90% das gomas de mascar vendidas na Ásia têm xilitol nas suas formulações (CCC, 2011).

2.2.2 Obtenção de Xilitol

A produção comercial de xilitol ocorre principalmente por processo químico, com a via biotecnológica de produção deste poliol sendo extensivamente estudada a fim de se obter maior rendimento que o proporcionado pelo processo químico (50-60% baseado na xilana convertida) e diminuir os altos custos dos processos de recuperação e purificação, que acabam limitando a utilização comercial deste adoçante (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998a).

2.2.2.1 Via Química

A produção de xilitol por via química em escala industrial teve início em 1975, na Finlândia, com a Finnish Sugar Co. Ltda, em Helsink. Esse processo é realizado em reatores com elevadas pressões (31-40 atm) e temperaturas (100-130 °C) e um tempo de duração de 3 a 5 horas, dependendo das condições de temperatura e pressão empregadas (JAFPE; SZKRYBALO; WEINERT, 1974; MELAJA, HÄMÄLÄINEN, 1977). Este processo de obtenção de xilitol consiste na hidrogenação catalítica da xilose pura obtida através da hidrólise de materiais lignocelulósicos (Figura 2). São necessárias quatro etapas básicas para a

realização do processo químico: (1) desintegração de materiais lignocelulósicos ricos em xilana através de uma hidrólise ácida, (2) separação da xilose do hidrolisado, por cromatografia, para a obtenção de uma solução de xilose de elevada pureza, (3) hidrogenação catalítica da xilose pura em xitol na presença de níquel como catalisador e (4) purificação e cristalização do xitol (MELAJA; HÄMÄLÄINEN, 1977).

Figura 2- Esquema simplificado do processo de produção de xitol por via química baseado em Melaja e Hämäläinen (1977).

A pureza da solução inicial de xilose é de extrema importância para o processo de catálise, pois as impurezas interferem no rendimento do processo químico, bem como na qualidade do xitol. Exigindo várias etapas de purificação para remoção de resíduos do catalisador e de subprodutos gerados durante o processo de hidrogenação (MELAJA; HÄMÄLÄINEN, 1977), resultando no aumento de tempo de processamento e encarecimento do produto, sendo difícil alcançar alto rendimento pela quantidade considerável de subprodutos formados e pelo alto custo dos processos de recuperação e purificação do xitol (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998a).

2.2.2.2 Via Biotecnológica

Processos biotecnológicos utilizando microrganismos para conversão de xilose em xilitol tem sido uma alternativa ao processo químico, não necessitando de uma solução inicial de xilose pura para o seu emprego nas fermentações (SILVA *et al.*, 1996; FELIPE *et al.*, 1997a; SENE *et al.*, 2000; RODRIGUES *et al.*, 2003a; SILVA *et al.*, 2004a). Vários microrganismos já foram identificados como fermentadores de xilose em xilitol. Destacam-se as leveduras, especialmente o gênero *Candida*, pela maior eficiência de conversão (Tabela 1).

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

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

O processo de obtenção de xilitol por via biotecnológica que, semelhante ao químico, inicialmente requer a etapa de hidrólise do material lignocelulósico rico em xilana está ilustrado na Figura 3. No processo biotecnológico é necessária a concentração do hidrolisado para aumentar o teor de xilose, além da etapa de destoxificação para reduzir a concentração de compostos tóxicos resultantes do procedimento de hidrólise, seguida da fermentação do hidrolisado hemicelulósico (FELIPE, 2004) e recuperação do xilitol (SANTOS, 2004; MARTINEZ, 2005).

Figura 3- Esquema simplificado da via biotecnológica de obtenção de xilitol (CHAUD, 2010).

No esquema da Figura 4, pode-se observar uma série de reações envolvidas na produção biotecnológica de xilitol, verificando-se a ocorrência de integração de vias em diversas fases do metabolismo microbiano. O metabolismo de açúcares inicia-se com o transporte destes através da membrana celular por diferentes mecanismos (WINKELHAUSEN, KUZMANOVA, 1998). A xilose, uma vez no interior das células é

reduzida em xilitol, em uma reação catalisada pela enzima xilose redutase (E.C. 1.1.1.21) ligada a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada ou não, em sua forma reduzida (NADPH/NADH). O xilitol é oxidado em xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (E.C. 1.1.1.9) ligada a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada ou não em sua forma oxidada (NADP⁺/NAD⁺). A xilulose é fosforilada a xilulose-5-fosfato que pode ser convertida em piruvato através da conexão da via das fosfopentoses com a via Embden-Meyerhof-Parnas (HAHN-HAGERDAL *et al*, 1994). Além da xilose, os açúcares glicose e arabinose presentes nos hidrolisados hemicelulósicos, são também utilizados por leveduras, conforme constatado em várias pesquisas (SENE *et al.*, 2001; SILVA, FELIPE., 2006; RODRIGUES *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007).

A enzima xilose redutase (XR) de *Candida guilliermondii* é um membro da superfamília aldo-ceto redutase (HANDUMRONGKUL; MA; SILVA, 1998). Entre as enzimas que catalisam reações de oxidação e redução em sistemas vivos estão aquelas pertencentes à superfamília aldo-ceto redutase (AKR). Membros destas famílias são encontrados em todos os tipos de organismos, como mamíferos, anfíbios, plantas, leveduras, protozoários e bactérias (JEZ; GEOFFREY; PENNING, 1997; JEZ; PENNING, 2001).

As enzimas xilose redutases de leveduras formam a sub-família AKR2B8, as quais catalisam a redução de xilose em xilitol, como parte da via para a xilulose, a qual pode conectar-se às vias fosfopentose, Embden-Meyerhof ou fosfocetolase. Elas são proteínas monoméricas consistindo de cerca de 320 aminoácidos (massa molecular em torno de 33 a 40 KDa), com alto grau de similaridade na sequência destes aminoácidos (ELLIS, 2002).

Quanto à xilitol desidrogenase, ainda são encontrados poucos trabalhos na literatura que descrevem esta enzima. Em *P. stipitis* esta enzima possui duas subunidades de 32 KDa, apresentando massa molecular de 63 KDa (RIZZI *et al.*, 1989). Já a xilitol desidrogenase de *C. shehatae* apresentou massa molecular de 82 KDa para a enzima na sua forma nativa e de 40 KDa na forma desnaturada, indicando que a xilitol desidrogenase é composta de duas subunidades (YANG; JEFFRIES, 1990).

Dependendo da levedura, as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase podem ter especificidades diferentes em relação aos cofatores oxidados e reduzidos. Em *C. guilliermondii* FTI 20037, usada no presente trabalho, a enzima XR é NADPH-dependente e a enzima XDH é NAD⁺ ou NADP⁺-dependente (SILVA *et al.*, 1996a).

Figura 4- Esquema do metabolismo de glicose, xilose e arabinose em *C. guilliermondii* (Adaptado de SILVA; FELIPE, 2006).

2.2.3 Fatores que Influenciam a Bioconversão de Xilose em Xilitol

A bioconversão de xilose em xilitol pode ser influenciada por diversos fatores, que podem modificar o metabolismo em leveduras. Até o momento já foram identificados alguns parâmetros responsáveis pelo favorecimento da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, durante fermentação de hidrolisados hemicelulósicos como: concentração (0,1 a 1,0 g/L) e idade do inóculo (24 h) (DOMINGUEZ; GONG; TSAO, 1997; FELIPE et al., 1997a); pH (5,5 a 6,5) (ROBERTO; SATO; MANCILHA, 1996; FELIPE et al., 1999; CANNETIERI et al., 2001); temperatura (30 °C) (FELIPE et al., 1997a; SENE et al., 2000; CONVERTI et al., 2001); concentração de xilose (50 a 60 g/L) (FELIPE et al., 1997a); relação

glicose:xilose (1:5) (SILVA; FELIPE, 2006); concentração de ácido acético (LIMA et al., 2004; SILVA et al., 2004b). Também a adaptação e reciclagem do inóculo ao próprio hidrolisado (MATOS, 2004; RODRIGUES et al., 2006), bem como o preparo do inóculo na presença de baixa concentração de glicose (SILVA, 2004; SILVA; FELIPE, 2006) ou arabinose (MATOS, 2004) junto à xilose foram condições de fermentação que propiciaram o favorecimento da produção de xilitol nas pesquisas realizadas com *C. guilliermondii*. Quanto ao oxigênio, a condição mais empregada em frascos agitados (125 mL contendo 50 mL de meio) tem sido 200 rpm (FELIPE et al., 1997a; SENE et al., 2000; RODRIGUES et al., 2001; SILVA et al., 2004b). Já em fermentador de bancada a utilização de um coeficiente volumétrico de transferência de O_2 (K_La) de $22,5\ h^{-1}$ foi empregado durante estas pesquisas (MORITA; SILVA, 2000; RODRIGUES et al., 2003b). Nestas condições, Morita e Silva (2000) encontraram maior produtividade ($0,72\ g/L.h$) e rendimento em xilitol ($0,71\ g/g$) porém em pH 7,0, enquanto os valores obtidos nas pesquisas realizadas por Rodrigues et al. (2003b) os resultados obtidos foram de $0,64\ g/g$ e $0,76\ g/L.h$ mas em pH 5,5.

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

2.3 INIBIDORES DO METABOLISMO MICROBIANO

Pesquisas relacionadas aos efeitos inibitórios da atividade microbiana, causados em função da presença nos hidrolisados hemicelulósicos de compostos tóxicos aos microrganismos, revelam que tais efeitos dependem não só do tipo e concentração dos compostos, mas também da atuação sinérgica entre eles (FELIPE, 2004). Durante pesquisas com a levedura *C. guilliermondii* verificou-se que o aumento da concentração de ácido acético no meio a valores superiores a $3,0g/L$, interferiu negativamente na bioconversão de xilose em xilitol por esta levedura durante fermentações realizadas em meio sintético, enquanto a presença de baixas concentrações deste ácido ($1,0g/L$) favoreceu este metabolismo sendo a levedura capaz de assimilar todo o ácido durante o processo (FELIPE et al., 1995). No caso das fermentações em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, Lima et al.

(2004), verificaram a redução dos parâmetros fator de conversão de xilose e produtividade volumétrica de xilitol por *C. guilliermondii*, em função do aumento da concentração deste ácido no meio de 5 para 10g/L.

Felipe et al. (1995) atribuíram o favorecimento da fermentação de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* na presença de baixa concentração de ácido acético, pelo fato de parte deste ácido poder entrar diretamente no ciclo de Krebs via acetil-CoA, enquanto concentrações maiores poderiam ser utilizadas por outras vias metabólicas dependentes de energia, como o ciclo do glicoxilato. Quanto à inibição da atividade exercida por altas concentrações de ácido acético, Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000), atribuem aos mecanismos de sua incorporação e ao acúmulo intracelular de ânion. Estes autores propõem algumas teorias para o efeito deste ácido como a diminuição do pH intracelular resultante do refluxo de ácidos fracos em função da neutralização por ação da ATPase da membrana plasmática, a qual bombeia prótons para fora da célula com gasto de ATP. Em altas concentrações ácidas a capacidade de bombear o próton da célula é esgotada resultando em exaustão de ATP, dissipação da força próton motora e acidificação do citoplasma em função do acúmulo de ânions intracelular. De acordo com essa teoria a forma aniônica do ácido é capturada na célula e o ácido não dissociado se difunde dentro da célula até que o equilíbrio seja alcançado (PALMQVIST E HAHN-HÄGERDAL, 2000).

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

O efeito tóxico de alguns compostos fenólicos como hidroquinona (0,25-3,0 g/L), siringaldeído (0,25-1,50 g/L) e 4-metilcatecol (0,25-1,0 g/L), foi também avaliado em

Debaryomyces hansenii CCMI 941 durante a fermentação de um meio quimicamente definido simulando a composição de hidrolisado hemicelulósico rico em pentose (DUARTE *et al.*, 2005). Esses autores encontraram uma correlação negativa da produtividade de xilitol e concentração de biomassa para todos os fenólicos estudados, além de verificarem que a presença de tais compostos nos meios, resultou em menor assimilação de xilose se comparada ao meio ausente destes tóxicos.

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

Com relação aos íons metálicos, estudos revelaram que o reator de aço inoxidável utilizado durante o preparo de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar é uma fonte em potencial de liberação destes como cátions de ferro, cromo e níquel, uma vez que as concentrações destes cátions presentes no hidrolisado preparado em reator de plástico, resistente ao calor, foram consideravelmente menores (WATSON *et al.*, 1984). Estes autores verificaram ainda em fermentações com *Pachysolen tannophilus* que os íons níquel e cromo nas concentrações de 0,01 g/L inibiram fortemente o crescimento desta levedura e a produção de etanol durante fermentação de meio contendo 10 g/L xilose, ao contrário do observado para o íon cobre nesta mesma concentração em função do efeito tóxico ter sido menos evidenciado em relação aos demais íons. Enquanto para *Candida sp.* cultivada em meio contendo glicose como fonte de carbono (30g/L) pesquisas revelaram ser esta levedura mais sensível ao íon níquel do que ao cobre, sendo seu crescimento totalmente inibido quando a concentração de níquel foi 0,508g/L (DÖNMEZ; AKSU, 2001).

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

Durante a fermentação de meios sintéticos ou contendo hidrolisado de bagaço de cana por *C. guilliermondii*, alguns autores constataram a formação dos subprodutos glicerol e etanol (CARVALHO JUNIOR *et al.*, 2005; SILVA; HASMAN; FELIPE, 2007 ; ARRUDA ; FELIPE, 2009). Segundo ARRUDA e FELIPE (2009), a maior formação de glicerol está relacionada à condição de maior teor de tóxicos presentes no meio fermentativo, já que sua formação se deve a um provável mecanismo de defesa da levedura em condições de estresse celular. Enquanto Silva et al. (2006) observaram a diminuição da concentração de glicerol e etanol durante todo o tempo de fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, sugerindo a utilização destes subprodutos como fonte de carbono e energia, principalmente quando os açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico foram depletados.

2.4 DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

2.4.1 Carvão Vegetal Ativado

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

As propriedades físico-químicas do carvão ativo são obtidas durante o processo de fabricação em que ocorre a ativação do carvão, o qual adquire durante este processo, a propriedade de adsorção física (MARTON, 2002). Através do aquecimento a altas temperaturas (500-1000°C), com ou sem a adição de produtos químicos, há eliminação dos

constituintes voláteis e formação da estrutura porosa rudimentar, que irá adquirir poros mais largos, aumentando o volume do material. As características adquiridas neste processo são determinantes para a ação do carvão, além de outros fatores como a temperatura, tempo de contato, agitação, pH e concentração (MARTON, 2002).

A utilização de diferentes concentrações de carvão (CC), aliada aos parâmetros temperatura (T), tempo de contato (tc), agitação (A) e pH foram avaliadas por Marton (2002), sendo que a condição estabelecida de tratamento (T= 60°C, tc= 30min, A= 100rpm, pH= 2,5 e CC= 1%) permitiu remoção média 44,18% de ácido acético, 76,22% de fenóis, 58,27% de furfural e 59,69% de 5-hidroximetilfurfural. Segundo este autor este procedimento propiciou melhor fermentabilidade do hidrolisado com conseqüente favorecimento da produção de xilitol por *Candida guilliermondii*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE 3 VARIEDADES DE SORGO

Foram avaliadas três variedades de sorgo forrageiro (0942-032, 0942-058 e 0942-064), na forma de palhada (colmo, folha, panícula, com pouca ou nenhuma semente), empregadas em ensilagem, cedidas pela EMBRAPA- Milho e Sorgo (Sete Lagoas) obtidas da cidade de Janaúba, as quais já vieram secas (aproximadamente 10 % de umidade) e moídas. A caracterização ocorreu quanto aos teores de suas principais frações de celulose, hemicelulose e lignina. A análise dos teores de seus componentes foi realizada de acordo com a metodologia analítica para bagaço de cana desenvolvida por Rocha et al. (1997) e validada por Gouveia et al. (2009) que se fundamenta na sacarificação quantitativa dos polissacarídeos. As variedades de sorgo foram moídas e passadas na peneira de 20 “mesh”, sendo os materiais peneirados secos em estufa a 60 °C, por 1 hora (umidade inferior a 10%). Em béquer foram colocados 2 g do material e 10 ml de H₂SO₄ 72% (p/p) o qual foi agitado continuamente por 7 minutos, mantendo-se a mistura sob temperatura controlada a 45 °C. Nesta etapa, denominada hidrólise principal, ocorreu o rompimento das fibras em oligômeros.

Ao completar o tempo de hidrólise, a reação foi interrompida com adição de 50 ml de água destilada e o conteúdo foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 500 ml, completando o volume para 275 ml. A suspensão foi autoclavada a 121 °C por 30 minutos, tempo necessário para a pós-hidrólise do material e transformação dos oligômeros em monômeros. Após resfriamento, a suspensão foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 500 ml. O volume foi completado com água destilada para a determinação das concentrações dos açúcares (xilose, glicose e arabinose), ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural presentes na suspensão. Posteriormente ocorreu a conversão dos dados obtidos das concentrações dos açúcares, segundo fórmula estabelecida pelos autores citados, em hemicelulose e celulose. Foi também determinada a porcentagem de lignina solúvel, insolúvel e de cinzas.

3.1.1 Determinação de Carboidratos e Ácidos Orgânicos

Os hidrolisados obtidos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm, Bio-Rad Laboratories Ltd) em um

cromatógrafo Shimadzu LC-10AD. Como fase móvel foi empregado H_2SO_4 0,005 mol.L⁻¹ com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹, a 45°C. Os compostos foram monitorados com um detector de índice de refração Shimadzu RID-6 A, sendo os compostos fenólicos presentes nas amostras removidos por cartuchos de extração sólida Sep-Pak C₁₈ (Waters).

Os cromatogramas das amostras foram comparados com o padrão dos açúcares e ácidos orgânicos que foram analisados. A quantificação foi feita através de curvas de calibração de cada composto.

$$\% \text{celulose} = \frac{C_{gli} * 50}{ma * ps(\%)} * 0,9 * 1,055 * 100 \quad (1)$$

$$\% \text{hemicelulose} = \frac{(C_{xil} * 50 + C_{ara} * 50)}{ma * ps(\%)} * 0,88 * 1,155 * 100 \quad (2)$$

Onde: C_{gli} = concentração de glicose (g/L)

C_{xil} = concentração de xilose (g/L)

C_{ara} = concentração de arabinose (g/L)

ma = massa da amostra (g)

ps = peso seco da amostra (%)

3.1.2 Determinação de Lignina Insolúvel em Ácido

O material insolúvel retido no papel de filtro proveniente da etapa de hidrólise ácida para caracterização química foi lavado com aproximadamente 1,5 L de água destilada, para remoção de ácido residual (até pH próximo de 7), e seco em estufa à temperatura de 105 °C até massa constante. A porcentagem de lignina insolúvel em meio ácido foi calculada em relação à massa de material lignocelulósico seco descontando-se a massa de cinzas presente na lignina.

$$\% \text{ Lignina insolúvel} = \frac{MK - MC}{MA} * 100 \quad (3)$$

Onde: MK – massa de lignina insolúvel seca; MC – massa de cinzas e

MA – massa da amostra seca

3.1.3 Determinação da Lignina Solúvel

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância a 280 nm em um espectrofotômetro UV-visível Perkin Elmer modelo Lambda 25. Uma alíquota de 5 mL do hidrolisado obtido da etapa de hidrólise ácida para caracterização química dos materiais lignocelulósicos foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL, juntamente com 50 mL de água destilada e 2 mL de NaOH 6,5 N (pH final próximo a 12).

Após agitação, o volume será completado com água destilada e essa mistura resultante foi analisada no espectrofotômetro. A equação abaixo foi utilizada para determinar a concentração de lignina solúvel no hidrolisado:

$$C_{Lig} = \frac{(A_{280nm} - \epsilon_{HMF} \cdot C_{HMF} - \epsilon_{Furf} \cdot C_{Furf})}{A} \quad (4)$$

onde: C_{lig} : Concentração de lignina solúvel no hidrolisado (g/L);

A_{280nm} : Absorbância do hidrolisado em 280 nm;

ϵ_{HMF} : Absortividade do hidroximetilfurfural (114 L.g⁻¹);

$\epsilon_{Furfural}$: Absortividade do furfural (146,85 L.g⁻¹);

C_{HMF} : Concentração de hidroximetilfurfural no hidrolisado (g/L);

$C_{Furfural}$: Concentração de furfural no hidrolisado (g/L).

A: absortividade da lignina (L/g)

3.1.4 Determinação do Teor de Cinzas

O material obtido foi colocado em um cadinho de porcelana previamente calcinado e tarado. Em seguida, esse material foi calcinado inicialmente a 400°C e depois por mais 2 h a 800°C. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada. A massa real de lignina Klason foi calculada descontando-se a massa de cinzas.

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{MC \times 100}{MA} \quad (5)$$

onde: MC - massa de cinzas (g); MA - massa da amostra seca

3.1.5 Determinação de Furfural e Hidroximetilfurfural

Furfural e hidroximetilfurfural foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando uma coluna LiChrospher 100 RP-18 (5 μ m) de 125 x 4 mm (Hewlett-Packard), utilizando-se acetonitrila/água 1:8 (v/v) com 1% de ácido acético como fase móvel, a uma vazão de 0,8 mL.min⁻¹ a 25°C. O hidrolisado obtido filtrado em membrana de diâmetro de poro de 0,47 μ m (Milipore), e injetado com uma válvula Rheodyne equipada com alça de injeção de 20 μ L. Os compostos foram detectados a 276 nm, em um detector UV/Visível Shimadzu SPD-10. As concentrações de furfural e hidrometilfurfural foram determinadas a partir de curvas de calibração obtidas com os compostos puros.

3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As amostras das fibras das 3 variedades de sorgo antes e após a hidrólise ácida diluída foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM5310, disponível no Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais/INPE em São José dos Campos, operando de 15 a 20 Kw e utilizando detector de elétrons secundários. As amostras foram fixadas em um suporte com auxílio de uma fita de carbono autocolante dupla face e submetidas ao recobrimento metálico com ouro.

3.3 OBTENÇÃO DOS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS DA BIOMASSA DE 3 VARIEDADES DE SORGO

Os hidrolisados foram obtidos por hidrólise ácida da biomassa de 3 variedades de sorgo utilizando autoclave. As hidrólises ocorreram por 71 minutos, a 121 °C, empregando 2% de H₂SO₄ concentrado seco e uma relação final matéria seca:solução ácida de 1:10 (m/V) (TÉLLEZ-LUIS; RAMÍREZ; VÁZQUEZ, 2002). Após a hidrólise, o hidrolisado foi concentrado à vácuo em concentrador de aço inoxidável, visando elevar o teor inicial de xilose de forma a favorecer a bioconversão (RODRIGUES et al., 2001). Tanto o hidrolisado inicial quanto o concentrado foram caracterizados quanto aos teores de tóxicos e açúcares.

3.4 DESTOXIFICAÇÃO DOS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS DA BIOMASSA DE 3 VARIEDADES DE SORGO PELA ALTERAÇÃO DE pH E ADSORÇÃO EM CARVÃO VEGETAL ATIVADO

Este tratamento foi realizado empregando-se carvão vegetal ativado segundo metodologia estabelecida por Marton et al. (2006), que consiste no ajuste do pH para 7,0 com CaO, seguido de redução para 2,5 com H₃PO₄. Posteriormente os hidrolisados foram submetidos à adsorção em carvão vegetal ativado (1% p/v) em frascos agitados a 200rpm, 60°C por 30 min.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS

Os hidrolisados concentrados anterior aos tratamentos e os resultantes do método de destoxificação foram caracterizados a partir da determinação do pH, da concentração de açúcares (xilose, glicose, arabinose), dos compostos tóxicos (ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural e compostos fenólicos) para se avaliar a eficácia dos métodos de destoxificação.

3.6 FERMENTAÇÕES

3.6.1 Microrganismo e Preparo do Inóculo

O cultivo foi realizado em incubadora de movimento rotatório (New Brunswick, Scientific Co. Inc.) a 200rpm e 30°C por 24h. Em seguida as células foram recuperadas por centrifugação e lavadas em água destilada esterilizada, centrifugadas novamente e após o descarte do sobrenadante, foram utilizadas para preparar uma suspensão de células a qual foi empregada como inóculo. Foi utilizada a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, rotineiramente empregada para produção de xilitol a partir do bagaço de cana-de-açúcar (FELIPE et al., 1997a e b; MARTINEZ; SILVA; FELIPE, 2000; RODRIGUES et al., 2003 a e b; SILVA; FELIPE, 2006). A obtenção do inóculo foi feita a partir de metodologia previamente estabelecida nestas pesquisas, nas quais as células foram provenientes de uma cultura estoque mantida a 4 °C em tubos inclinados com ágar extrato de malte. Alçadas da levedura recém repicada, foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125ml, contendo 50ml de meio semi sintético composto de xilose (30g/L), extrato de farelo de arroz (20g/L),

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2g/L) e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1g/L).

3.6.2 Meio e Condições de Fermentação

Os ensaios fermentativos foram realizados em triplicata com os hidrolisados das variedades de sorgo destoxificadas, suplementados com os mesmos nutrientes empregados durante o preparo do inóculo, exceto a xilose. Experimento controle foi realizado empregando hidrolisado não destoxificado. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio sendo o pH inicial de 5,5 e os frascos incubados a 200rpm e 30°C semelhante ao utilizado para o preparo do inóculo, sendo de aproximadamente 1,0 g/L a concentração celular inicial em cada frasco. O período de fermentação foi aquele necessário para consumo de no mínimo 80% de xilose.

O acompanhamento do processo foi feito a partir de retiradas de amostras periodicamente, para que fossem imediatamente avaliadas quanto à concentração e viabilidade celular. Em seguida estas foram centrifugadas a 2000 x g por 15 minutos, para separação do sobrenadante para determinação do pH, das concentrações dos açúcares (glicose, xilose, arabinose) e de ácido acético, bem como do xilitol e dos subprodutos deste metabolismo como o glicerol e etanol. As células foram lavadas com água destilada e após nova centrifugação, foram ressuspensas em solução tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,2 e armazenadas em freezer para posterior determinação de proteína solúvel e das atividades de XR e XDH. (SENE et al., 2001; SILVA; FELIPE, 2006).

3.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.7.1 Viabilidade e Pureza da Cultura

A viabilidade da cultura foi verificada a partir de visualizações microscópicas de lâminas preparadas a fresco, nas quais as células foram coradas pela adição de igual volume de uma solução 0,01% (p/v) de azul de metileno dissolvido em citrato de sódio 2% (p/v), enquanto a pureza foi verificada a partir de lâminas fixadas e coradas com fucsina. As observações foram realizadas em microscópio óptico digital binocular (LABOMED DIGI 3) acoplado a câmara digital de forma a fornecer dados referentes à morfologia celular.

3.7.2 Determinação da Concentração Celular

A determinação da concentração celular foi realizada através de turbidimetria a 600nm, onde a concentração de células em g/L foi calculada por uma curva padrão que correlaciona a absorbância a 600nm e o peso seco das células obtidas do cultivo por 24h em meio sintético.

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

As concentrações dos açúcares, bem como de glicerol, etanol e ácido acético serão determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em condições já estabelecidas (RODRIGUES et al., 2006) nas seguintes condições: coluna “Bio-Rad Aminex” HPX-87H mantida a 45 °C; detector de índice de refração RID 6A; eluente ácido sulfúrico 0,01N, fluxo de 0,6 mL/min.; volume da amostra injetada, 20 µL.

3.7.4 Determinação das Concentrações de Furfural e Hidroximetilfurfural

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

3.7.5 Determinação das Concentrações de Compostos Fenólicos

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita utilizando-se a metodologia descrita por Rocha (2000), fundamentada na avaliação dos compostos derivados de lignina, pela leitura de absorbância em espectrofotômetro a 280nm.

3.7.6 Determinação das Atividades de XR e XDH

Para a obtenção das enzimas intracelulares xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), as células de *C. guilliermondii* obtidas nos ensaios em shaker foram previamente descongeladas, centrifugadas e ressuspensas em tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,2 a uma concentração de 15 a 20g/L. Para o rompimento, foram empregadas esferas de vidro (diâmetro médio de 0,5 mm) sob agitação em vórtice. O método consiste em adicionar esferas

de vidro a uma suspensão celular em proporções de 1:1 (v/v) e promover 5 ciclos de agitação em vórtice alternando com períodos de resfriamento em banho de gelo. Volume de 3mL de suspensão celular e 3mL de esferas de vidro foram colocados em tubo cônico e submetidos à agitação em vórtice por intervalo regular de tempo de 1 minuto, sendo que a cada 1 min de agitação, a suspensão foi resfriada em banho de gelo por 30s. Os *debris* celulares foram separados por centrifugação em centrífuga refrigerada (Jouan MR 1812) a 10.000rpm por 10min, a 4°C, recolhendo-se o sobrenadante para determinação das atividades de XR e XDH e de proteína solúvel (GURPILHARES, 2004).

A determinação das atividades de XR e XDH foi realizada por espectrofotometria segundo método de Alexander (1985), modificado por Sene et al. (2001). O meio padrão de reação para a XR foi constituído de 200µL de extrato livre de células, 570µL de água destilada, 150µL de β-mercaptoetanol (0,1M), 80µL de tampão fosfato de potássio (KH₂PO₄-KHPO₄, 0,1M, pH 7,2), 100µL de NADPH (1,2mM), 200µL de xilose (0,5M), correspondendo a um volume total de 1,3mL. Para a XDH, o meio padrão de reação foi constituído de 100µL de extrato livre de células, 550µL de água destilada, 150µL de β-mercaptoetanol (0,1M), 200µL de TRIS (0,5M, pH 8,6), 150µL de NAD⁺ (1,26mM) e 150µL de xilitol (0,5M), correspondendo a um volume final de 1,3mL.

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

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

3.7.7 Determinação de Proteína Solúvel

A determinação da concentração de proteína no extrato livre de células foi feita conforme o método de Bradford (1976), empregando-se albumina bovina cristalizada (BSA) como padrão e reagente de Bradford (Azul-Brilhante de Coomassie G-250) como corante. As leituras de absorbância foram feitas em espectrofotômetro BECKMAN DU[®] 640B a 550nm.

3.8 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS FERMENTATIVOS

3.8.1 Fator de Conversão de D-Xilose em Xilitol ($Y_{P/S}$)

O fator de conversão expressa: massa de xilitol produzido por massa de xilose consumida, em gramas, e é calculado pela seguinte equação:

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

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

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

3.8.2 Produtividade Volumétrica de Xilitol (Q_p)

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

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

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

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

3.8.3 Eficiência de Conversão (η)

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BIOMASSA DE 3 VARIEDADES DE SORGO AVALIADAS

Na tabela 3 se encontram os resultados da caracterização da biomassa das 3 variedades de sorgo avaliadas (A, B e C) no presente trabalho com relação às suas principais frações, a celulose, hemicelulose e lignina, bem como de outras biomassas. Verifica-se nesta tabela que as diferentes variedades da biomassa sorgo possuem maiores teores de celulose, seguidas de hemicelulose e lignina, sendo estes teores variáveis em função de cada variedade, semelhante ao que ocorre para as outras biomassas. Estas características são importantes para a identificação de biomassas que possam vir a ser aproveitadas em processos de bioconversão como para a produção de xilitol, que tem a escolha destas baseado no teor de hemicelulose. Considerando isto, as 3 variedades avaliadas são promissoras para a produção de xilitol sendo que os teores de hemicelulose das 3 variedades de sorgo avaliadas são próximos aos de outras biomassas como da de palha de trigo e de bagaço de cana (Tabela 3).

Tabela 3. Composição química da biomassa de 3 variedades de sorgo e de diferentes matérias-primas

Matéria-Prima	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Referência
Biomassa de Sorgo A	39,5	27,6	23,1	5,5	Presente Trabalho
Biomassa de Sorgo B	42,8	25,6	22,3	5,9	Presente Trabalho
Biomassa de Sorgo C	44,1	24,7	23,2	5,8	Presente Trabalho
Palha de Arroz	43,5	22	17,2	11,4	Mussato e Roberto, 2002
Palha de Cana-de Açúcar	38,1	29,2	24,1	2,3	Saad e Gonçalves, 2009
Palha de Cevada	38,6	21,4	19,9	9,5	Moraes, 2008
Palha de Trigo	31	26	24	7	Canilha, 2006
Bagaço de Cana	42,8	25,8	22,1	1,4	Gouveia et al., 2009

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS DA BIOMASSA DE 3 VARIEDADES DE SORGO

A composição química dos hidrolisados hemicelulósicos provenientes da hidrólise ácida da biomassa de 3 variedades de sorgo (A, B e C) bem como posterior ao procedimento de concentração à vácuo e destoxificação se encontra apresentada na Tabela 4 . Verifica-se nesta tabela que as 3 variedades apresentaram semelhanças na composição dos hidrolisados com relação aos teores de açúcares (hexose e pentose), bem como de tóxicos, encontrando-se

predominância de xilose em relação à glicose e arabinose, semelhante ao constatado para outras biomassas (MUSSATO, 2002; CANILHA et al., 2003; TAMANINI et al., 2004; VILLARREAL et al., 2006; SILVA et al., 2007). Verifica-se também nesta tabela que dentre os tóxicos os fenóis se encontram em maior concentração, seguido do ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, como também é encontrado para as outras biomassas mencionadas.

No presente trabalho o procedimento de destoxificação empregado, o qual foi a alteração de pH dos hidrolisados combinada à adsorção em carvão ativo, propiciou apenas a remoção parcial dos compostos tóxicos, ao mesmo tempo que levou à perda dos açúcares (Tabela 4), e também a clarificação dos hidrolisados (Figura 5), semelhante ao encontrado em outros trabalhos (ARRUDA; FELIPE, 2008; MARTON et al., 2003). Quanto à perda de açúcares esta é indesejável, entretanto, com relação aos tóxicos ainda presentes nos hidrolisados submetidos à destoxificação, isto precisa ser avaliado em função do tipo e concentração de cada tóxico. Pelos valores apresentados na Tabela 4, para os tóxicos verifica-se que somente os fenólicos se encontram presentes em concentrações bem superiores às avaliadas como inibitórias para o metabolismo de açúcares pela levedura *Candida guilliermondii*, empregada no presente trabalho. Felipe et al. (1999) em pesquisas com esta mesma levedura encontraram, em meio sintético contendo xilose como fonte de carbono que apenas 0,05 g/L de fenóis foi suficiente para levar à morte celular enquanto Duarte et al. (2005) encontraram para *Debaromyces hansenii* um efeito negativo sobre a produtividade de xilitol, concentração de biomassa e assimilação de açúcares para diversos fenólicos estudados. Entretanto, é importante considerar que a toxicidade dos hidrolisados é devido não somente à atuação individual de cada um destes tóxicos, mas ao efeito sinérgico entre eles (FELIPE, 2004). Acrescente-se aos tóxicos identificados no presente trabalho os íons metálicos (não determinados) como responsáveis também pela toxicidade dos hidrolisados às células (DONMEZ; AKSU, 2001; CHAUD, 2010).

Tabela 4. Caracterização dos hidrolisados hemicelulósicos das variedades da biomassa sorgo, após os procedimentos de hidrólise (H), concentração (C) e destoxificação(D).

Variedades	Açúcares (g/L)									Compostos Tóxicos (g/L)											
	Xilose			Glicose			Arabinose			Fenóis			Furfural			Hidroximetilfufural			Ácido Acético		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
H	17,22	17,42	16,76	6,26	8,24	8,75	3,43	3,48	3,16	4,75	5,35	4,99	0,13	0,13	0,12	0,56	0,71	0,79	2,23	2,30	2,70
C	61,06	64,00	65,52	22,60	31,14	33,93	11,80	12,28	11,07	15,54	21,70	21,41	0,09	0,13	0,11	1,64	1,99	2,09	3,38	3,26	2,98
D	54,08	53,78	49,34	20,16	26,54	27,94	10,40	11,17	9,93	8,01	9,18	10,81	0,05	0,06	0,07	0,85	0,85	0,97	3,03	2,95	2,80

Figura 5. Coloração dos hidrolisados da biomassa das 3 variedades de sorgo avaliadas. 1- não destoxificado; 2 (etapas de destoxificação): a-após CaO; b-após H_3PO_4 ; c-após carvão e d-após NaOH.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ LIGNOCELULÓSICA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA ANTES E APÓS HIDRÓLISE ÁCIDA

Na Figura 6 está apresentada as microestruturas superficiais das fibras lignocelulósicas “in natura” e hidrolisadas da biomassa das 3 variedades de sorgo avaliadas. Observamos nestas fotos as morfologias das variedades “in natura” das três variedades como uma estrutura intacta das fibras, com comprimento e diâmetro regulares e boa distribuição das fibras dentro da matriz. Diferente ao encontrado nas fibras após hidrólise ácida diluída, onde se verifica um rompimento destas e maior porosidade, com perda de sua integridade compacta, devido à retirada de boa parte da fração hemicelulósica.

Figura 6. Microscopia eletrônica de varredura da biomassa das três variedades (A, B e C) de sorgo avaliadas “in natura” (I) e após hidrólise ácida (II). Magnificação de 100x (JEOL JSM5310).

4.4 FERMENTAÇÕES POR *Candida guilliermondii* DOS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS DA BIOMASSA DE 3 VARIEDADES DE SORGO

4.4.1 Consumo de Açúcares

Os hidrolisados hemicelulósicos da biomassa das 3 variedades de sorgo após as etapas de concentração à vácuo e destoxificação foram empregados para avaliação da bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii*. Na Figura 7 (a e b) verifica-se o comportamento desta levedura com relação ao consumo das pentoses xilose e arabinose, sendo que para a glicose, esta foi consumida totalmente nas primeiras 24 horas independente da biomassa de sorgo avaliada. Nas primeiras 24 horas a levedura já consumiu em média 35% de xilose, semelhante ao encontrado em outros trabalhos (LIMA et al., 2004; SILVA et al., 2007) . Ao final do período de incubação verifica-se na Figura 7a consumo de xilose superior a 90% para as variedades A e B (94,9 e 95,66 %, respectivamente), enquanto um menor consumo para a variedade C (85,21%). Este comportamento pode ser atribuído à maior concentração de tóxicos no hidrolisado obtido da variedade C (Tabela 4). Com relação à arabinose (Figura 7b) presente em baixas concentrações verifica-se o lento consumo parcial para as 3 variedades, verificando-se maior consumo (49,79%) para a variedade A. Este baixo consumo de arabinose pela levedura tem sido relatado por outros pesquisadores quando da utilização de hidrolisados tanto de palha de sorgo (SENE et al., 2011), quanto de bagaço de cana (FELIPE et al., 1997b; RODRIGUES et al., 2003c).

Figura 7. Consumo (%) de xilose (a) e arabinose (b) por *Candida guilliermondii* durante fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos da biomassa das 3 variedades (A, B e C) de sorgo.

4.4.2 Consumo e Produção de Ácido Acético e Variação de pH

Nas fermentações dos hidrolisados provenientes das diferentes variedades de sorgo foi também constatada a capacidade de assimilação e formação de ácido acético por *Candida guilliermondii* com conseqüente alteração do pH durante as fermentações (Figura 8 a e b). Nas primeiras 24 horas houve um pequeno consumo de ácido acético (Figura 8a) para as 3 variedades, indicando a capacidade desta levedura como agente destoxificante do meio, sendo que provavelmente este ácido foi uma fonte adicional de nutriente para o seu crescimento, parte do ácido acético pode entrar diretamente no ciclo de Krebs via acetil-CoA, enquanto em maiores concentrações ele poderia ser utilizado por outras vias metabólicas dependentes de energia, como o ciclo do glioxilato (FELIPE et al., 1995). No entanto, após as 24 horas de fermentação observa-se a produção deste ácido (Figura 8a) acompanhada do decréscimo de pH (Figura 8b) para as variedades B e C. A formação de ácido pode não ser desejável para este bioprocessos, pois o acúmulo deste pode levar a uma falta de energia para a manutenção do metabolismo da levedura, devido ao consumo de ATP pela ATPase para manter o gradiente de próton intracelular, o que é prejudicado pelo declínio de pH que potencializa o efeito tóxico do ácido acético (FELIPE et al., 1997b). Em trabalhos com esta mesma levedura foi constatado a formação deste ácido em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana (FELIPE, 1994).

Figura 8. Concentração de ácido acético (a) e variação do pH (b) durante as fermentações por *Candida guilliermondii* dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos da biomassa das 3 variedades (A, B e C) de sorgo.

4.4.3 Consumo de Fenóis

Durante as fermentações por *Candida guilliermondii* dos hidrolisados hemicelulósicos da biomassa das 3 variedades de sorgo, semelhante ao encontrado para o tóxico ácido acético, houve uma assimilação de fenóis já nas primeiras 24 horas para as 3 variedades (Figura 9), encontrando-se maior consumo deste na fermentação do hidrolisado obtido da variedade C (46,41 %). Para algumas espécies de fungos tem se constatado a capacidade destes em degradar fenóis em águas residuárias, pois eles são seres aclorofilados e necessitam de substâncias orgânicas que não conseguem sintetizar, absorvendo-as do meio através da produção de enzimas extracelulares que hidrolisam grandes moléculas, tornando-as assimiláveis por mecanismos de transporte (TRABULSI, 2002; RIGO et al., 2006). Verifica-se ainda na Figura 9 que após 24 horas de fermentação as concentrações de fenóis se mantêm constantes para as 3 variedades. Possivelmente após este período a levedura não foi mais capaz de assimilar estes compostos, devido à prioridade em consumir os açúcares para o seu crescimento. O maior consumo de fenóis constatada para a variedade C se deve provavelmente à maior concentração de fenóis para esta variedade no início da fermentação, sendo esta uma forma da levedura reagir a esta alta concentração de tóxicos, ou seja destoxificando o meio.

Figura 9. Consumo de fenóis por *Candida guilliermondii* durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos da biomassa das 3 variedades (A, B e C) de sorgo.

4.4.4 Produção de Biomassa e Xilitol

O comportamento da levedura em função das fermentações nos hidrolisados provenientes da biomassa das 3 variedades de sorgo (A, B e C) com relação à produção de células e xilitol pode ser verificado na Figura 10. Verifica-se na Figura 10a o rápido crescimento celular para as variedades B e C nas primeiras 24 horas, encontrando-se que este crescimento foi 58 % superior ao observado para a variedade A, embora a concentração celular tenha sido semelhante ao final de 48 horas para as 3 variedades de sorgo avaliadas. Pela análise dos consumos dos açúcares xilose e arabinose apresentados anteriormente na Figura 7, não é possível justificar este comportamento diferenciado já que o consumo destes açúcares por esta levedura foi semelhante neste período. Possivelmente este crescimento diferenciado para as variedades B e C nas primeiras 24 horas de fermentação pode ser devido à concentração de glicose superior 24% em média em relação à variedade A no início da fermentação. Pode ser constatado ainda na Figura 10a que para a variedade C ocorreu após 72 horas de fermentação uma decaída da concentração celular, o que não se observou para as demais variedades, possivelmente devido à maior concentração de tóxicos para esta variedade (Tabela 4). Tal fato propiciou a morte celular devido ao estresse encontrado neste meio de fermentação o que foi constatado após avaliação de lâminas coradas com azul de metileno nas quais as células mortas se encontram azuladas (Figura 11). Já para o xilitol (Figura 10b) verificou-se para as três variedades a sua rápida formação logo após 24 horas de fermentação, tempo este coincidente também com o crescimento celular. A maior produção de xilitol ocorreu para a variedade A (15,45 g/L) seguida da variedade B (11,29 g/L) e C (6,21 g/L) conforme a Figura 10b. A concentração de xilitol inferior em média 46,45% para a variedade C em relação às demais pode ser atribuída ao maior teor de tóxicos nesta, em particular fenóis (Tabela 4). De fato menor consumo de açúcares foi constatado para a variedade C (Figura 7), ao mesmo tempo que se observou ainda a morte celular durante fermentação deste hidrolisado, conforme apresentado na Figura 10a.

Figura 10. Produção de biomassa (a) e xilitol (b) por *Candida guilliermondii* durante fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos da biomassa das 3 variedades (A, B e C) de sorgo.

Figura 11. Microscopia óptica das células de *Candida guilliermondii* dos hidrolisados da biomassa das 3 variedades de sorgo no tempo de 72 horas de fermentação (Aumento de 40x – LABOMED DIGI 3).

Pela avaliação dos parâmetros fermentativos apresentados na Figura 12, rendimento(a) e produtividade (b) de xilitol e eficiência de conversão de xilose em xilitol (c) durante as fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos da biomassa das 3 variedades de sorgo, observamos um maior rendimento (0,35 g/g), produtividade (0,16 g/L.h-1) e eficiência (38,15%) para a variedade A do que para as variedades B (0,25 g/g , 0,12 g/L.h-1 e 27,48%) e C (0,17 g/g, 0,063 g/L.h-1 e 19,18%) em 96 horas de fermentação, para esta variedade os valores destes parâmetros também foram maiores para os demais tempos de fermentação avaliados. Resultados já esperados pela menor concentração de tóxicos, menor concentração inicial de glicose e maior concentração inicial de xilose para a variedade A, em relação às variedades B e C. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Sene et al. (2011) que utilizaram esta mesma levedura cultivada em hidrolisado hemicelulósico de palha de sorgo proveniente de outra variedade. Entretanto estes resultados são bem inferiores em relação a outras biomassas, como para o bagaço de cana (MARTON et al., 2006; ARRUDA et al., 2008), sendo necessário, portanto, melhores condições de hidrólise, destoxificação e suplementação nutricional adequada dos hidrolisados hemicelulósicos da biomassa de 3 variedades de sorgo empregadas no presente trabalho.

Figura 12. Rendimento (a), produtividade (b) e eficiência de conversão (c) por *Candida guilliermondii* durante as fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos da biomassa das 3 variedades (A, B e C) de sorgo avaliadas.

4.4.5 Formação dos Subprodutos Glicerol e Etanol

As concentrações dos subprodutos glicerol (a) e etanol (b) formados durante as fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos da biomassa das 3 variedades de sorgo estão apresentados na Figura 13. A rápida produção de glicerol constatada nesta figura nas primeiras 24 horas para as 3 variedades era esperado pela maior concentração de tóxicos no início da fermentação, principalmente fenóis. A maior concentração deste subproduto foi observada para a variedade A (1,83 g/L) seguida das variedades B (1,47 g/L) e C (1,42 g/L). A maior produção de glicerol durante a fermentação do hidrolisado obtido da biomassa de sorgo da variedade A coincidiu com a condição de maior produção de xilitol o que pode estar relacionado ao fato de ser o glicerol um soluto compatível. A formação deste subproduto de certa forma contribui para contornar o problema da toxicidade do hidrolisado à levedura conforme já relatado por Arruda et al. (2009). No caso do etanol, sua rápida produção também ocorreu nas primeiras 24 horas para as 3 variedades, devido possivelmente à grande concentração de glicose inicial conforme já constatado por outros autores. Entretanto as variedades B e C apresentaram no tempo de 24 horas valores de produção de etanol superiores em média 29,45% em relação à variedade A, e um aumento nas concentrações de etanol até 72h de fermentação o que pode ser atribuído a uma maior concentração de glicose inicial nos meios de fermentação para as variedades B e C. Estas maiores concentrações de etanol para as variedades B e C podem ter prejudicado a produção de xilitol, devido ao direcionamento da via para a produção de etanol e também devido à toxicidade do etanol à levedura. É importante considerar ainda que a presença de maior teor de glicose no hidrolisado obtido das variedades B e C em relação à variedade A (Tabela 4) também é interferente neste bioprocesso já que coincidente à menor formação de etanol para a variedade A, verificou-se maior produção de xilitol (Figura 10b). De fato a presença de glicose junto à xilose durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico para produção de xilitol deve ser levada em consideração em função desta hexose poder interferir tanto como ativadora ou inibidora deste bioprocessos (FELIPE 2004).

Fig 13. Produção dos subprodutos glicerol (a) e etanol (b) por *Candida guilliermondii* durante as fermentações dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos da biomassa das 3 variedades (A, B e C) de sorgo avaliadas.

4.4.6 Efeito da Destoxificação dos Hidrolisados sobre os Produtos Fermentativos Após 96h de Cultivo

Tendo em vista que as avaliações da bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* nos hidrolisados hemicelulósicos da biomassa das 3 variedades de sorgo foram feitas a partir dos hidrolisados destoxificados, em função de ser esta uma etapa requerida quando da utilização de outras biomassas vegetais (FELIPE, 2004), nesta fase do trabalho foi avaliado o comportamento da levedura também no hidrolisado não destoxificado.

Neste caso avaliou-se a necessidade de destoxificação dos hidrolisados obtidos das 3 variedades de biomassa de sorgo sobre as fermentações por *Candida guilliermondii* no tempo 96 horas de cultivo devido ao consumo de xilose ter sido superior a 80% quando empregou os hidrolisados destoxificados. Verifica-se na Tabela 5 que o consumo de açúcares e fenóis foi inferior para os hidrolisados não destoxificados (controles), bem como verifica-se a produção de ácido acético nos hidrolisados não destoxificados e sua assimilação quando ocorreu a destoxificação. Maior produção dos subprodutos etanol e glicerol foi também encontrada na ausência de destoxificação para as 3 variedades avaliadas.

Verifica-se na Figura 14 no tempo de 96 horas de fermentação o rendimento (a), a produtividade (b) e a eficiência de conversão (c) para os hidrolisados hemicelulósicos destoxificados e não destoxificados (controle) obtidos das 3 variedades. Nesta figura fica evidente a necessidade da destoxificação já que os valores de rendimento encontrados para os hidrolisados não destoxificados provenientes das variedades A, B e C (0,22, 0,14 e 0,15 g/g, respectivamente), produtividade (0,06, 0,026 e 0,03 g/L.h-1, respectivamente) e a eficiência de conversão (23,66, 15,40 e 15 %, respectivamente) são bem inferiores ao rendimento (0,35, 0,25 e 0,17 g/g, respectivamente), produtividade (0,16, 0,12 e 0,06 g/L.h-1, respectivamente) e eficiência de conversão (38,15, 27,48 e 19,18 %, respectivamente) para os hidrolisados não destoxificados. Tal comportamento já era esperado pela maior concentração de tóxicos nos hidrolisados não destoxificados, o que é confirmado para as variedades A, B e C pelo menor consumo de xilose (47,91, 32,31 e 34,94 %, respectivamente), ausência de consumo de arabinose, maior produção de ácido acético (4,47, 3,54 e 3,51 g/L, respectivamente), maior produção de glicerol (2,30, 2,63 e 3,05 g/L, respectivamente), menor produção de biomassa (5,37, 4,68 e 5,61 g/L, respectivamente) e menor produção de xilitol (5,57, 2,51 e 2,65 g/L, respectivamente).

Tabela 5. Efeito da destoxificação dos hidrolisados hemicelulósicos da biomassa das 3 variedades de sorgo após 96 horas de fermentação por *Candida guilliermondii*

Compostos (g/L)	T0h						T96h					
	Controle			Destoxificado			Controle			Destoxificado		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Glicose	17,28	24,66	27,9	17,44	22,8	23,08	0	0	0,14	0	0	0
Xilose	53,5	55,02	55,04	46,52	46,84	40,76	27,87	37,24	35,81	2,35	2,03	6,03
Arabinose	11,196	11,48	10,512	9,5	9,728	8,156	11,196	11,48	10,512	4,77	6,72	5,796
Ácido Acético	2,984	2,822	2,728	2,69	2,59	2,334	4,431	3,535	3,51	1,43	2,73	3,645
Fenóis	7,7	7,23	7,07	7,25	8,71	9,33	7	8,71	7,97	5,14	6,38	5,54
Xilitol	0	0	0	0	0	0	5,56	2,51	2,65	15,45	11,29	6,1
Etanol	0	0	0	0	0	0	10,82	13,24	15,1	7,93	13,88	12,22
Glicerol	0	0	0	0	0	0	2,3	2,63	3,05	1,57	1,25	1,308

Figura 14. Efeito da destoxificação no rendimento (a), na produtividade (b) e na eficiência de conversão (c) por *Candida guilliermondii* após 96 horas de fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos da biomassa das 3 variedades (A, B e C), não destoxificadas (controle) e destoxificadas de sorgo avaliadas.

4.5 AVALIAÇÃO DAS FERMENTAÇÕES DOS TRÊS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS DA BIOMASSA SORGO QUANTO ÀS ATIVIDADES DAS ENZIMAS XILOSE REDUTASE (XR) E XILITOL DESIDROGENASE (XDH) DE *Candida guilliermondii*

Considerando que as enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) são responsáveis pelas etapas iniciais do metabolismo de xilose, a avaliação de suas atividades durante as fermentações por *Candida guilliermondii* nos hidrolisados hemicelulósicos obtidos da biomassa das 3 variedades de sorgo foi feita para auxiliar no esclarecimento da bioconversão de xilose em xilitol em função das particularidades que cada variedade possui, principalmente quanto aos teores de açúcares e tóxicos. Conforme apresentado nas Figuras 15a e 15b verifica-se que independentemente do tipo de biomassa de sorgo empregada houve um decréscimo das atividades das enzimas, tanto para a XR quanto para a XDH nas primeiras 48 horas de fermentação, e posteriormente um aumento acentuado a partir deste período. Nota-se nestas figuras que a utilização da biomassa A propiciou uma maior atividade para a XR (valor 19,38 % superior às medias das atividades nas fermentações das demais variedades), enquanto para a XDH verifica-se maiores diferenças entre os valores de atividades, já que a utilização da biomassa C resultou em valor 31,58 % inferior às médias das atividades obtidas nas fermentações das demais variedades, o que coincide com a condição de maior teor de fenóis e menor produção de células e xilitol (Figura 10)..

O decréscimo dos valores das atividades de XR e XDH nas primeiras horas de fermentação já foi constatado em outros trabalhos (SENE et al., 2001; ALVES et al., 2002; LIMA et al., 2004; SILVA et al., 2006; CHAUD, 2010) sobre fermentação com esta mesma levedura em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana. Tal comportamento pode ser atribuído ao fato de que estas enzimas são induzidas pela xilose (WEBB; LEE, 1992) e o inóculo ter sido obtido do cultivo de células em meio semi-sintético contendo xilose como única fonte de carbono, ou seja, isento de compostos tóxicos, diferente dos hidrolisados empregados no presente trabalho, os quais além de açúcares contém tóxicos à levedura. De fato compostos tóxicos a célula, como fenóis, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural interferem no metabolismo microbiano e estavam presentes nos hidrolisados mesmo após a destoxificação destes (Tabela 4). Íons metálicos, que no caso do presente trabalho não foram

quantificados podem também ser responsáveis pelo decréscimo das atividades destas enzimas nas primeiras horas de fermentação.

Figura 15. Atividades enzimáticas das enzimas xilose redutase (a) e xilitol desidrogenase (b) de *Candida guilliermondii* em hidrolisados hemicelulósicos obtidos da biomassa das 3 variedades (A, B, C) de sorgo avaliadas

Com relação a mais baixa atividade para a enzima XDH quando fermentação foi realizada para a variedade C em relação às outras duas variedades avaliadas (Figura 15b), tal comportamento pode ser atribuído à maior atuação dos compostos tóxicos no hidrolisado desta variedade, o que de fato pode ser confirmado pelos menores valores dos parâmetros avaliados (Figura 12). Ao mesmo tempo há um indicativo de ser a enzima XDH mais susceptível à toxicidade do hidrolisado do que a enzima XR, já que para esta última enzima não se constatou diferenças marcantes nos valores de atividades em função das fermentações nos hidrolisados provenientes das 3 variedades avaliadas.

Ao se comparar os dados obtidos para as atividades enzimáticas de XR e XDH durante cultivo de *Candida guilliermondii* nos hidrolisados das variedades empregadas no presente trabalho com demais trabalhos da literatura, no qual foi utilizado hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, tem-se que nas variedades de sorgo os valores das atividades são inferiores. Segundo Chaud (2010) valores de atividades enzimáticas máximas, XR igual a 0,31 U/mg e XDH igual a 0,28 U/mg, foram encontrados também no tempo de 96 horas em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana destoxificados nas mesmas condições de destoxificação do presente trabalho.

É importante considerar que vários fatores além da natureza da matéria-prima podem atuar interferindo nas atividades das enzimas XR e XDH. Rosa et al. (1998) durante pesquisas em meio semi-sintético também com *Candida guilliermondii* encontraram valores bem superiores ao do presente trabalho, além do que não se verificou decréscimo das atividades nas primeiras horas de fermentação, conforme constatado para as 3 variedades da biomassa sorgo avaliadas no presente trabalho.

5. CONCLUSÕES

Verificou-se uma similaridade em composição quanto às frações constituintes da biomassa das 3 variedades de sorgo.

As 3 variedades apresentaram semelhanças quanto à composição dos hidrolisados hemicelulósicos com relação aos teores de açúcares (hexose e pentose), bem como de tóxicos, encontrando-se predominância de xilose em relação à glicose e arabinose e de fenóis em relação aos demais tóxicos semelhante ao constatado para outras biomassas.

O procedimento de destoxificação por adsorção em carvão ativo propiciou a remoção parcial dos compostos tóxicos e também dos açúcares, mas propiciou ainda a clarificação dos hidrolisados semelhante ao encontrado para outras biomassas.

Melhor performance fermentativa de *Candida guilliermondii* foi encontrada nos hidrolisados da biomassa das variedades A e B enquanto para a variedade C foram obtidos os menores valores dos parâmetros fermentativos bem como das atividades das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, coincidente com a condição de maior produção de ácido acético, o que já era esperado pela maior concentração de tóxicos com consequente morte celular.

A capacidade de destoxificação dos hidrolisados hemicelulósicos obtidos da biomassa das 3 variedades de sorgo pela *Candida guilliermondii* foi constatada pela assimilação tanto de fenóis quanto de ácido acético.

O maior consumo de fenóis foi constatado para a variedade C, devido provavelmente à maior concentração de fenóis para esta variedade no início da fermentação, sendo esta uma forma da levedura reagir a esta alta concentração de tóxicos, ou seja destoxificando o meio.

Etanol e glicerol foram encontrados como subprodutos durante as fermentações independente da variedade de biomassa de sorgo avaliada.

Ficou evidente a necessidade de destoxificação dos hidrolisados provenientes da biomassa das variedades de sorgo avaliadas anterior à utilização destes para a produção de xilitol em função da melhoria dos parâmetros fermentativos obtidos em relação à condição ausente de destoxificação.

Devido aos baixos valores dos parâmetros fermentativos obtidos para a biomassa das 3 variedades de sorgo avaliadas em relação à outras biomassas torna-se necessário estudos posteriores para se estabelecer condições mais adequadas de hidrólise desta biomassa e de destoxificação dos hidrolisados hemicelulósicos bem como de suplementação nutricional dos hidrolisados.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; OETTERER, M.; MENEZES, T. J. B. Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia. **Boletim da SBCTA**, v. 33, n. 2, p. 184-193, 1999.
- ALVES, L. A., FELIPE, M. G. A., ALMEIDA E SILVA, J. B., SILVA, S. S., PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70-72, p. 89-98, 1998.
- ALVES, L. A.; VITOLO, M.; FELIPE, M. G. A. ; SILVA, J. B. A. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of *Candida guilliermondii* as a function of different treatments of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate employing experimental design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 403-413, 2002.
- ANVISA – Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos. **IX Lista de Alegações de Propriedade Funcional Aprovadas**. Atualizado em Julho/2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em Março/2011.
- ARRUDA, P. V.; CHAUD, L. C. S. ; FELIPE, M. G. A.; PIVETTA, L. R. Efeito da destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana sobre a remoção de fenóis, a perda de açúcares e a bioconversão de xilose em xilitol. **Nucleus Ituverava**, v. 5, p. 167-183, 2008.
- ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. Role of glycerol addition on xylose to xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Current Microbiology**, v.58, n. 3, p.274-278, 2009.
- BAR, A. **Xylitol: Alternative Sweeteners**, 2nd eds., New York: Marcel Dekker, 1991, p. 349-379.
- BARBOSA, M. F. S., MEDEIROS, M. B., MANCILHA, I. M., SCNEIDER, H., LEE, H. Screening of yeast for production of xylitol from d-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, p.241-251, 1988.
- BINIAK, S.; SWIATKOWSKI, A.; PAKULA, M. Eletrochemical studies of phenomena at active carbon-electrolyte solutions interfaces. In: LJUBISA R. RADOVIC Eds. **Chemistry and Physics os Carbon**. New York: Marcel Dekker, 2001, vol. 27, cap. 3, p. 126-216.
- BRADFORD, M. A. Rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
- CANILHA, L.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A.; CARVALHO, W. Batch xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate using *Cândida guilliermondii* in a stirred tank reactor. **Biotechnology Letters**, v.25, p.1811-1814, 2003.
- CANILHA, L. **Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo**. 2006, 153 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Departamento de Biotecnologia, EEL/USP, Lorena, 2006.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Xylitol bioproduction from wheat straw: hemicellulose hydrolysis and hydrolysate fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, n.9, p.1371-1376, 2006.

CANNETIERI, E. V.; ALMEIDA e SILVA, J. B.; FELIPE, M.G.A. Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulose hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnological**, v. 94, p. 159-168, 2001.

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

CCC – CALORIE CONTROL COUNCIL. **Reduced-calorie sweeteners: Xylitol**. Disponível em: <http://www.caloriecontrol.org/xylitol.html>. Acesso em Março/2011.

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

CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMINGUEZ, J. M.; SILVA, S. S. Effect of temperature on the microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 28, p. 339-345, 2001.

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

DOMINGUEZ, J. M.; GONG, C.S.; TSAO, G. T. Production of xylitol from D-xylose by *Debaryomyces hansenii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63-65, p. 117-127, 1997.

DÖNMEZ, G.; AKSU, Z. Bioaccumulation of copper (II) and níquel (II) by the non-adapted and adaptedet growing *Candida guilliermondii*. **Water Research**, v.35. n.6, p.1425-1432, 2001.

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

ELLIS, E. M. Microbial aldo-keto reductases. **FEMS Microbiology Letters**, v. 216, p. 123-131, 2002.

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

EMBRAPA MILHO E SORGO. **Sistemas de Produção**, 2. ISSN 1679-012X. Versão Eletrônica- 4 edição. Set./2008. Disponível em: <http://www.cnpms.embrapa.br/>. Acesso em Maio/2010.

EMODI, A. Xylitol: it's properties and food applications. **Food Technology**, p.28-32, 1972.

ERRAMOUSPE, J.; HEYNEMAN, C. Treatment and prevention of otitis media. **Ann. Pharmacoter**, v. 34, p. 1452-1468, 2000.

FELIPE, M. G. A. **Obtenção de xilitol por fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 1994. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica). Universidade de São Paulo, São Paulo, 1994.

FELIPE, M. G. A. Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Materials. In: SAHA, B. C., HAYASHI KYOSHI. Eds. **Lignocellulose Biodegradation**. Washington: American Chemical Society. Cap. 18. p. 300-314, 2004.

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

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

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

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

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

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

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. M. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

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

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

HANDUMRONGKUL, C.; MA, D. P.; SILVA, T. L. Cloning and expression of *Candida guilliermondii* xylose reductase gene (xyl 1) in *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, p. 339-404, 1998.

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

HASSINGER, W.; SAUER, G.; CORDES, U.; KRAISE, U.; BEYER, J.; BAESSLER, K. **Diabetologia**, v. 21, p. 37-39, 1981.

HERRERA, A.; TÉLLEZ-LUIS, S. J.; GONZÁLES-CABRIALES, J. J.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Effect of hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. **Journal of Food Engineering**, v. 63, p. 103-109, 2004.

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

JAFFE, G. M.; SZKRYBALO, W.; WEINERT, P. H. **Process for production xylose**. Patent US n 3.784.408, 1974.

JEZ, J. M.; GEOFFREY, T.; PENNING, T. M. A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. **Biochemical Pharmacology**, v. 54, p. 639-647, 1997.

JEZ, J. M.; PENNING, T. M. The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. **Chemico-Biological Interactions**, v. 130-132, p. 499-525, 2001.

KANDELMAN, D. Sugar, alternative sweeteners and meal frequency in relation to caries prevention : new perspectives. **Britanic Journal Nutrition**, v. 77, p. 121-128, 1997

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

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

MÄKINEN, K.K. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observations made with xylitol? **Med Hypotheses**, v. 54, p. 603-613, 2000.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MELLO, R.; NORBERG, J. L.; ROCHA, M. G.; DAVID, D. B. Análise produtiva e qualitativa de um híbrido de sorgo interespecífico submetido a dois cortes. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, n. 1, p. 20-33, 2003.

MORAES, E. J. C. **Estudo de viabilidade econômica de produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada**. 2008. 156 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Departamento de Biotecnologia- Escola de Engenharia de Lorena-USP, Lorena, 2008.

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

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

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

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

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

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

PEREIRA, A. C.; GONÇALVES, L. C.; BORGES, A. L. C. C.; RODRIGUES, J. A. S.; GOMES, S. P.; BORGES, I.; RODRIGUEZ, N. M.; FERREIRA, J. J. C.; DELGADO, L. P.; CAMPOS, M. M. Avaliação da silagem do híbrido de sorgo BR 601 com aditivos – alterações nos teores de matéria seca, frações fibrosas e digestibilidade “in vitro” da matéria seca. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 7, n. 2, p. 153-163, 2008.

PEREIRA, A. C.; SILVA, R. R.; GONÇALVES, L. C.; BORGES, A. L. C. C.; BORGES, I.; GOMES, S. P.; RODRIGUES, J. A. S.; SALIBA, E. O. S.; FERREIRA, J. J. C.; SILVA, J.J. Avaliação da silagem do híbrido de sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] BR 601 com aditivos 1 – pH, nitrogênio amoniacal, matéria seca, proteína bruta e carboidratos solúveis. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 6, n.2, p. 211-222, 2007.

RIGO, M.; COUTINHO, M. R.; ALVAREZ, D. C.; BEZERRS, J. R. M. V.; BRANCO, I. G.; ALEGRE, R. M. Biodegradação de fenol por *Candida parapsilopsis* em reator contínuo (CSTR) pressurizado. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 8, n. 2, p. 153-162, 2006.

ROBERTO, I. C.; SATO, S.; MANCILHA, I. M. Biocanversion of Rice straw hemicellulose hydrolysate for the production of xylitol: effect of pH and nitrogen source. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57/58, p. 339-347, 1996.

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

ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; CURVELO, A. A. S.; ARAÚJO, G. T. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTES, 5., 1997. Paraná, Brasil. **Resumos**.

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

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

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

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

RODRIGUES, R. C. L. B. ; FELIPE, M. G. A. ; ROBERTO, I.C. ; VITOLO, M. . Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate at controlled pH values. **Bioprocess and Biosystems Engineering, Germany**, v. 26, n. 02, p. 103-107, 2003c

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

ROSA, S. A. M. ; FELIPE, M. G. A. ; SILVA, S. S. ; VITOLO, M. . Xylose Reductase Production By *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 127-135, 1998.

ROWE, S. M.; MILLER, S.; SORSCHER, E. J. Cystic fibrosis. **N English Journal Med**, v. 352, n.19, p. 1992-2001, 2005.

RIZZI, M.; HARWART, K.; ERLEMANN, P.; BUI-THANH, N-A.; DELLWEG, H. Purification and properties of the NAD⁺-xylitol dehydrogenase from yeast *Pichia stipitis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 67, n.1, p. 20-24, 1989.

SAAD, M. B. W.; GONÇALVES, A. R. Utilização da palha de cana-de-açúcar pré-tratada biologicamente para produção de polpa celulósica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, p. 1-6, 2009. **Anais**.

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

SENE, L.; ARRUDA, P. V.; OLIVEIRA, S. M. M.; FELIPE, M.G. A. Evaluation of sorghum straw hemicellulose hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2011. In press.

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

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

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

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

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

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

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

SILVA, S. S.; VITOLO, M.; PESSOA, JR., A.; FELIPE, M. G. A. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of D-xylose-xylitol-fermenting *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 187-191, 1996a.

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

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

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

TÉLLEZ-LUIS, S. J.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Mathematical modelling of hemicellulosic sugar production from sorghum straw. **Journal of Food Engineering**, v. 52, p. 285-291, 2002.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3. ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

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

VÁZQUEZ, M.; OLIVA, M.; TÉLLEZ-LUIS, S. J.; RAMÍREZ, J. A. Hydrolysis of sorghum straw using phosphoric acid: Evaluation of furfural production. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3053-3060, 2007.

VIEIRA-NETO, E.; PEREIRA, C. N.; FONSECA, A.A. Avaliação do desempenho de rastreamento neonatal de deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase em amostras de sangue em papel filtro. **Laes & Haes**, n. 119, p. 98-104, 1999.

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.

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

WEBB, S. R.; LEE, H. Characterization of xylose reductase from yeast *Pichia stipitis* : evidence for functional thiol and histidyl groups. **Journal Genes Microbiology**, p. 1857- 1863, 1992.

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

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

ZABNER, J. *et al.* The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, n.21, p.11614-11619, 2000.

YANG, V. W.; JEFFRIES, T. W. Purification and properties of xylitol dehydrogenase from the xylose-fermenting yeast *Candida shehatae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 26, p. 197-206, 1990.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Concentrações (g/L) de células, açúcares, produtos fermentativos, bem como valores de pH durante cultivo de *Candida guilliermondii* nos hidrolisados hemicelulósicos destoxificados obtidos da biomassa das 3 variedades (A, B e C) de sorgo.

Tempo (h)	0			24			48			72			96		
Variedades	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Células	0,77	0,89	1,07	3,34	7,71	8,19	9,33	9,35	9,28	9,43	10,42	9,15	10,83	11,76	8,73
pH	5,78	5,65	5,72	5,75	5,55	5,57	5,73	5,47	5,49	5,63	5,41	5,4	5,75	5,4	5,31
Xilose	46,52	46,84	40,76	31,07	30,54	26,53	22,44	21,56	20,58	12,2	11,74	14,36	2,35	2,03	6,03
Glicose	17,44	22,8	23,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arabinose	9,5	9,73	8,15	9,44	9,72	8,11	7,3	8,39	7,2	6,2	7,3	6,71	4,77	6,72	5,8
Ác Acético	2,69	2,59	2,33	2,16	2,26	2,1	2,09	2,53	2,72	2,05	2,66	3,23	1,43	2,73	3,64
Xilitol	0	0	0	0	0	0,7	3,89	4	2,49	11,72	8,52	4,43	15,45	11,3	6,1
Glicerol	0	0	0	1,83	1,47	1,42	1,5	1,33	1,3	1,52	1,31	1,38	1,57	1,25	1,31
Etanol	0	0	0	9,09	13,26	12,51	8,89	13,79	12,78	7,3	14,26	13,38	7,93	13,88	12,22
Fenol	7,25	8,71	9,33	4,85	6,39	5	4,87	6,73	5,2	5,07	6,41	5,1	5,14	6,38	5,54

APÊNDICE B - Valores das atividades enzimáticas específicas das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) durante cultivo por *Candida guilliermondii* nos hidrolisados hemicelulósicos da biomassa das 3 variedades (A, B e C) de sorgo.

Tempo (h)	XR (U/mg _{prot})			XD (U/mg _{prot})		
	Variedades			Variedades		
	A	B	C	A	B	C
0	0,3347	0,3347	0,3347	0,4334	0,4334	0,4334
24	0,1293	0,106	0,1245	0,1424	0,15	0,144
48	0,071	0,0547	0,0622	0,054	0,068	0,07
72	X	0,117	0,1044	X	0,1205	0,09
96	0,1731	0,14	0,15	0,2513	0,231	0,165