UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

DANIELA VIEIRA CORTEZ

Permeabilização de Células de *Candida guilliermondii* Empregando Processos Químicos e Físicos e Seu Potencial Uso como Biocatalisadores na Síntese de Xilitol

Lorena

2010

DANIELA VIEIRA CORTEZ

Permeabilização de Células de *Candida guilliermondii* Empregando Processos Químicos e Físicos e Seu Potencial Uso como Biocatalisadores na Síntese de Xilitol

Tese apresentada a Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração Conversão de Biomassa.

Orientador: Profa. Dra. Inês Conceição Roberto

Lorena

2010

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

Catalogação na Publicação
Biblioteca "Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite"
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Cortez, Daniela Vieira

Permeabilização de células de *Candida guilliermondii* empregando processos químicos e físicos e seu potencial uso como biocatalisadores na síntese de xilitol. / Daniela Vieira Cortez ; orientadora Inês Conceição Roberto. – Lorena: 2010.

123 pág. : fig.

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

1. *Candida guilliermondii* 2. Permeabilização celular 3. Biotransformação 4. Xilose 5. Xilitol. I. Título

577.15 - CDU

Dedico esta tese aos meus pais, meus grandes amores.

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial à minha orientadora, Profa. Dra. Inês Conceição Roberto, pela imensa paciência, compreensão, consideração e pelo grande ensinamento.

Aos amigos e eternos irmãos de laboratório, Daniely, Juliana (Juju), Livia e João Paulo, principalmente pela companhia, paciência e amizade.

Ao Departamento de Biotecnologia, pela oportunidade.

A TODOS os amigos e colegas de pós, pelo carinho e amizade.

Aos funcionários, professores e servidores, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus pais que em silenciosa e constante presença, pacientemente acompanharam e apoiaram em mais esta jornada.

Às minhas irmãs queridas, Nia, Tita e Dora. Amo vocês.

E finalmente, a Capes, CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

CORTEZ, D. V. **Permeabilização de células de *Candida guilliermondii* empregando processos químicos e físicos e seu potencial uso como biocatalisadores na síntese de xilitol.** 2010. 123p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

Este trabalho teve como objetivo estudar a permeabilização celular de *Candida guilliermondii* FTI 20037 empregando processos químicos (agentes tensoativos) e físicos (congelamento-descongelamento) e verificar o potencial uso das células permeabilizadas na redução de xilose em xilitol. Os ensaios de permeabilização empregaram suspensão celular de 2 g/L, temperatura de 30ºC e pH 7. Para os processos químicos foram avaliados CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio) e Triton X-100 e os ensaios foram realizados empregando metodologia do planejamento experimental. O monitoramento da permeabilidade celular foi realizado através da dosagem *in situ* e no sobrenadante da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), selecionada como marcador do tratamento. As enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD) também foram dosadas. A permeabilização de *C. guilliermondii* com CTAB permitiu a dosagem *in situ* de G6PD e XD, mas não de XR. As três enzimas avaliadas não foram detectadas no sobrenadante. As condições que promoveram máxima permeabilidade celular (0,41 mM de CTAB, 200 rpm de agitação e 50 min de tempo de contato) resultaram em níveis *in situ* de G6PD de 283,4 ± 60,7 U/L e 122,4 ± 15,7 U/$g_{células}$. Nestas condições de tratamento, o CTAB influenciou negativamente a atividade catalítica de G6PD, XR e XD presentes no homogenato das células rompidas (não tratadas). O estudo de permeabilização celular com Triton X-100 mostrou que o tensoativo foi pouco efetivo, permitindo a dosagem *in situ* apenas da G6PD. As condições que promoveram máxima permeabilidade celular, ou seja, 2,78 mM de Triton X-100, 200 rpm de agitação e 50 min de tempo de contato, resultaram em níveis *in situ* de G6PD de 44,7 ± 0,0 U/L e 16,9 ± 0,0 U/$g_{células}$. Nestas condições, Triton X-100 não afetou a atividade catalítica de G6PD, XR e XD presentes no homogenato das células rompidas (não tratadas). O processo físico de permeabilização consistiu no congelamento da suspensão celular (-18ºC) por período de 48h, seguido do descongelamento em banho-maria (30ºC). Este tratamento permitiu a dosagem *in situ* das enzimas G6PD (108,7 ± 3,8 U/L e 54,3 ± 1,9 U/ $g_{células}$) e XR (26,4 ± 0,1U/L e 13,2 ± 0,1 U/$g_{células}$), mas não da XD. O tratamento não foi suficiente para liberar G6PD, no entanto, cerca de 60% da atividade total de XR foi detectada no sobrenadante (47,1 ± 0,4 U/L e 23,6 ± 0,2 U/$g_{células}$). Os ensaios de biotransformação mostraram que, nas condições avaliadas, a conversão de xilose em xilitol foi dependente do tipo de tratamento de permeabilização do biocatalisador. Os ensaios de cultivo mostraram que o tratamento das células com Triton X-100 não foi suficiente para causar perda de viabilidade e atividade metabólica de *C. guilliermondii*, enquanto o congelamento-descongelamento promoveu perda parcial da viabilidade celular. O tratamento das células com CTAB foi mais agressivo, causando a perda total de viabilidade celular. Foi também verificado que *resting cells* (células em estado de repouso) de *C. guilliermondii* sem tratamento e permeabilizadas com Triton X-100 foram capazes de converter xilose em xilitol com rendimento de ~60%, após 10 h de reação. Com o presente trabalho pode se concluir que os métodos estudados podem ser especialmente úteis para a determinação *in situ* de G6PD. Além disto, a utilização de células permeabilizadas pode ajudar a superar os problemas/custos associados com a extração e purificação das enzimas e conseqüentemente contribuírem para o desenvolvimento de uma tecnologia de baixo custo para a produção de xilitol.

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

ABSTRACT

CORTEZ, D. V. **Permeabilization of *Candida guilliermondii* cells using chemical and physical processes and their potential use as biocatalysts in the synthesis of xylitol.** 2010. 123p. Thesis (Doctor of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

This work describes the effect of the surfactants (CTAB and Triton X-100) and freezing-thawing treatment on the permeabilization of *C. guilliermondii* cells. The potential use of these cells (unpermeabilized and permeabilized by CTAB, Triton X-100 and freezing-thawing treatment) was also evaluated. Response surface methodology was used to investigate the effect of different parameters (detergent concentration, agitation and treatment time) on the permeabilization of *C. guilliermondii* cells. The experimentation was aimed to find the values of process variables to achieve maximal glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity *in situ*. The intracellular G6PD of the *C. guilliermondii* could not be detected in intact (unpermeabilized) whole cells. However, on treatment of *C.guilliermondii* with detergents (CTAB and Triton X-100) and freeze-thawing, the G6PD activity could be measured.The effectiveness of detergent permeabilization of *C.guilliermondii* cells was dependent on its concentration and exposure time. Maximum permeabilization, measured in terms of assayable G6PD activity *in situ*, was obtained when the cells were treated with CTAB. Triton X-100 and freeze-thawing were also found to permeabilize the cells, but to a lesser degree than CTAB. The optimum operating conditions for permeabilization process were 0.41 mM (CTAB) or 2.78 mM (Triton X-100) under agitation of 200 rpm at 30ºC temperature and process duration of 50 min and pH 7. At these conditions of process variables, the maximum value of enzyme activity was found to be 283.4 ± 60.7 U/L (122.4 ± 15.7 U/g_{cells}) and 44.7 ± 0.0 U/L (16.9 ± 0.0 U/g_{cells}) for permeabilized cells with CTAB and Triton X-100, respectively. The Triton X-100 was not enough to cause loss of viability and metabolic activity of *C. guilliermondii*. Freezing-thawing treatment promoted partial loss of cell viability. On the other hand the cells treated with CTAB were totally affected. The biotransformation of xylose to xylitol was studied by employing *C. gulliermondii* FTI 20037 in two different forms namely unpermeabilized cells and permeabilized cells. The maximum xylitol yield of about 60% was observed with unpermeabilized yeast cells and Triton X-100 permeabilized cells after 10 h of reaction time. In conclusion, surfactants and freezing-thawing treatment provides a simple and mild procedure for *C.guilliermondii* permeabilization. The method may be especially useful for the *in situ* determination of G6PD. Response surface methodology was found effective in optimizing and determining the interactions among process variables for the permeabilization process. The use of permeabilized cells can help to overcome the problems/costs associated with enzyme extraction and purification from yeast cells and in the development of a low-cost technology for xylitol production.

Keywords: *Candida guilliermondii*. Cell permeabilization. Biotransformation. Xylose. Xylitol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Diagrama da estrutura da membrana citoplasmática microbiana (Adaptado de MADIGAN et al., 2004).....17

Figura 2.2. Esquema simplificado do processo de permeabilização celular.....19

Figura 2.3. Estruturas e características químicas dos agentes tensoativos avaliados no presente trabalho (FONTE: Catálogo Merck e Vetec on line, Wikipedia.com).....21

Figura 2.4. Estágios da dissolução de uma membrana biológica com tensoativos (Adaptado de BHAIRI; MOHAN, 2007).....23

Figura 2.5. Esquema do metabolismo da xilose em leveduras (Adaptado de BARBOSA et al., 1988).....32

Figura 5.1. Atividade *in situ* das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e xilitol desidrogenase (XD) de *C. guilliermondii*, obtidas após o tratamento de permeabilização com CTAB nas diferentes condições propostas no planejamento experimental: (A) atividade volumétrica e (B) atividade específica 57

Figura 5.2. Gráficos de Pareto representando o efeito do CTAB sobre a permeabilidade da membrana de *C. guilliermondii*. Atividade *in situ* da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase: (A) volumétrica e (B) específica. O valor referencial de *t* (2,35) foi determinado ao nível de confiança de 90%.....60

Figura 5.3 A. Curvas de contorno representando iso-respostas para atividade volumétrica *in situ* de G6PD obtidas com tratamento de aproximadamente 2 g/L de células de *C. guilliermondii* com CTAB, independentemente da agitação do sistema em 200 rpm a 30 ºC.....63

Figura 5.3 B. Curvas de contorno representando iso-respostas para atividade específica *in situ* de G6PD obtidas com tratamento de aproximadamente 2 g/L de células de *C. guilliermondii* com CTAB, independentemente da agitação do sistema em 200 rpm a 30 ºC.....64

Figura 5.4. Perfis de atividades residuais das enzimas G6PD, XD e XR, obtidas durante incubação do homogenato celular sob agitação de 200 rpm durante 50 min a 30ºC, na ausência (A_0) ou presença (A) de CTAB 0,41 mM.....67

Figura 5.5. Variação da concentração celular de *C. guilliermondii*, de açúcares e de xilitol, obtidos durante as 24 h de cultivo de aproximadamente 2 g/L de células não tratadas (símbolo fechado) e permeabilizadas com CTAB 0,41 mM (símbolo aberto), sob agitação de 200 rpm a 30 ºC durante 50 min.....70

Figura 5.6. Microscopia óptica da suspensão de *C. guilliermondii* coradas com azul de metileno, antes (A) e após (B) tratamento de permeabilização celular com CTAB 0,41 mM durante 50 min sob agitação de 200 rpm. As fotos foram tiradas ao microscópio com aumento de 100 vezes.....71

Figura 5.7. Atividade *in situ* da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) de *C. guilliermondii*, obtidas após o tratamento de permeabilização com Triton X-100 nas diferentes condições propostas no planejamento experimental.....77

Figura 5.8. Gráficos de Pareto representando o efeito do tratamento de permeabilização da membrana celular de *C. guilliermondii* com Triton X-100 sobre as atividades volumétrica (A) e específica (B) *in situ* da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). O valor referencial de t (2,13) foi determinado ao nível de confiança de 90% 79

Figura 5.9. Atividade *in situ* da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) de *C. guilliermondii*, obtidas após o tratamento de permeabilização com Triton X-100 nas diferentes condições propostas no planejamento experimental.....82

Figura 5.10. Gráficos de Pareto representando o efeito do Triton X-100 sobre a permeabilidade da membrana de *C. guilliermondii*. Atividade *in situ* da enzima glicose-6-fosfato

desidrogenase: (A) volumétrica e (B) específica. O valor referencial de t (4,30) foi determinado ao nível de confiança de 95% 84

Figura 5.11. Curvas de contorno representando iso-respostas para atividade volumétrica (A) e específica (B) *in situ* de G6PD obtidas com tratamento de aproximadamente 2 g/L de células de *C. guilliermondii* com Triton X-100 sob agitação de 200 rpm a 30 ºC 87

Figura 5.12. Perfis de atividades residuais das enzimas G6PD, XD e XR, obtidas durante exposição do extrato livre de células à incubação sob agitação de 200 rpm durante 50 min a 30ºC, na ausência (A_0) ou presença (A) de Triton X-100 2,78 mM 90

Figura 5.13. Variação da concentração celular de *C. guilliermondii*, de açúcares e de xilitol, obtidos durante as 24 h de cultivo de aproximadamente 2 g/L de células não tratadas (símbolo fechado) e permeabilizadas com Triton X-100 2,78 mM (símbolo aberto), sob agitação de 200 rpm a 30 ºC durante 50 min 92

Figura 5.14. Microscopia óptica da suspensão de *C. guilliermondii* coradas com azul de metileno, antes (A) e após (B) tratamento de permeabilização celular com Triton X-100 2,78 mM durante 50 min sob agitação de 200 rpm. As fotos foram tiradas ao microscópio com aumento de 100 vezes 93

Figura 5.15. Balanço de atividade das enzimas G6PD (A) e XR (B) após tratamento da suspensão de *C. guilliermondii* por congelamento-descongelamento 97

Figura 5.16. Variação da concentração celular de *C. guilliermondii*, de açúcares e de xilitol, obtidos durante as 24 h de cultivo de aproximadamente 2 g/L de células não tratadas (símbolo fechado) e permeabilizadas por congelamento-descongelamento (símbolo aberto), sob agitação de 200 rpm a 30 ºC 99

Figura 5.17. Microscopia óptica da suspensão de *C. guilliermondii* coradas com azul de metileno, antes (A) e após (B) tratamento de permeabilização celular por congelamento-descongelamento. As fotos foram tiradas ao microscópio com aumento de 100 vezes 100

Figura 5.18. Consumo de xilose e formação de xilitol em ensaios de biotransformação empregando *resting cells* de *C. guilliermondii*: células sem tratamento (quadrado) e permeabilizadas com Triton X-100 (losango), CTAB (triângulo) e congelamento-descongelamento (círculo) 103

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Outros exemplos de aplicações de permeabilizadas.....30

Tabela 2.2. Exemplos de aplicação de *resting cells* (não permeabilizadas).....31

Tabela 4.1 - Matriz de planejamento experimental 2^3 com 3 repetições no ponto central, utilizada para investigar o efeito da concentração de CTAB (X_1), da agitação (X_2) e do tempo de contato (X_3) sobre a atividade *in situ* das enzimas G6PD, XR e XD 40

Tabela 4.2 - Matriz de planejamento experimental 2^3 com 3 repetições no ponto central, utilizada para investigar o efeito da concentração de Triton X-100 (X_1), da agitação (X_2) e do tempo de contato (X_3) sobre a atividade *in situ* das enzimas G6PD, XR e XD.....44

Tabela 4.3 - Matriz de planejamento experimental 2^3, utilizada para investigar o efeito da concentração de Triton X-100 (X_1), da agitação (X_2) e do tempo de contato (X_3) sobre a atividade *in situ* das enzimas G6PD, XR e XD.....45

Tabela 4.4 - Matriz de planejamento experimental 2^2 com 3 repetições no ponto central, utilizada para investigar o efeito da concentração de Triton X-100 (X_1), da agitação (X_2) e do tempo de contato (X_3) sobre a atividade *in situ* das enzimas G6PD, XR e XD.....46

Tabela 5.1 - Matriz do planejamento experimental 2^3 com 3 pontos centrais com resultados de atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), xilitol desidrogenase (XD) e xilose redutase (XR) a partir de células de *C. guilliermondii* FTI 20037 tratadas com o tensoativo catiônico CTAB.56

Tabela 5.2 - Análise de regressão múltipla para os fatores que representam a atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* da enzima G6PD a partir de células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com CTAB.....62

Tabela 5.3 - Análise de variância de regressão para o modelo que representa a atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) in situ da enzima G6PD em células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com CTAB.....62

Tabela 5.4 - Atividades volumétrica (Av) e específica (Ae) das enzimas G6PD, XD e XR, obtidas *in situ* e no homogenato proveniente das células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com CTAB.....65

Tabela 5.5 - Atividades volumétricas das enzimas G6PD, XD e XR, obtidas no homogenato de *C. guilliermondii* submetido à agitação de 200 rpm a 30 ºC, durante 50 min na ausência (A_0) e presença de CTAB 0,41 mM (A).....67

Tabela 5.6 - Matriz do planejamento experimental com resultados de atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), xilitol desidrogenase (XD) e xilose redutase (XR) a partir de células de *C. guilliermondii* FTI 20037 tratadas com o tensoativo não iônico Triton X-100 0,08 a 0,23 mM 74

Tabela 5.7 - Matriz do planejamento experimental com resultados de atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), xilitol desidrogenase (XD) e xilose redutase (XR) a partir de células de *C. guilliermondii* FTI 20037 tratadas com Triton X-100 0,46 e 2,78 mM 76

Tabela 5.8 - Matriz do planejamento experimental com resultados de atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), xilitol desidrogenase (XD) e xilose redutase (XR) a partir de células de *C. guilliermondii* FTI 20037 tratadas com Triton X-100 2,78 a 7,73 mM, sob agitação de 200 rpm 81

Tabela 5.9 - Análise de regressão múltipla para os fatores que representam a atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* das enzimas G6PD e XD a partir de células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100.....85

Tabela 5.10 - Análise de variância da regressão para o modelo que representa a atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* da enzima G6PD em células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100 86

Tabela 5.11 - Atividades volumétrica (Av) e específica (Ae) das enzimas G6PD, XR e XD, obtidas *in situ* e no homogenato proveniente das células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100 88

Tabela 5.12 - Atividades volumétricas das enzimas G6PD, XD e XR, obtidas no homogenato de *C. guilliermondii* submetido à agitação de 200 rpm a 30 ºC, durante 50 min na ausência (A_0) e presença de Triton X-100 2,78 mM (A)..... 90

Tabela 5.13 - Parâmetros de bioconversão obtidos no cultivo de células de *C. guilliermondii* intactas (controle) e permeabilizadas com Triton X-100 2,78 mM, em meio semi-sintético composto por xilose e glicose como fontes de carbono 94

Tabela 5.14 - Resultados de atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* e no sobrenadante das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), xilitol desidrogenase (XD) e xilose redutase (XR) a partir de células de *C. guilliermondii* FTI 20037 tratadas por congelamento (-18 ºC) durante 48 h, seguido descongelamento em banho-maria (30 ºC) 96

Tabela 5.15 - Parâmetros de bioconversão obtidos no cultivo de células de *C. guilliermondii* não tratadas (controle) e permeabilizadas por congelamento-descongelamento em meio semi-sintético composto por xilose e glicose como fontes de carbono 101

Tabela 5.16 - Parâmetros da bioredução de xilose em xilitol obtidos durante as condições normais de cultivo e em ensaios de biotransformação empregando células de *C. guilliermondii*. Ensaios realizados com ~ 30 g/L de xilose em tampão Tris-HCl 0,1M pH 7 104

Tabela A.1 - Valores de absorbância (340 nm) de diferentes concentrações de CTAB nos valores de pH correspondentes para a dosagem das atividades das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD)..... 116

Tabela A.2 - Ensaios de viabilidade de aproximadamente 2 g/L de células de *C. guilliermondii* sem tratamento (controle) e permeabilizadas por CTAB 0,41 mM, cultivadas em meio semi-sintético durante 24 h a 200 rpm e 30ºC 117

Tabela A.3 - Valores de absorbância (340 nm) de diferentes concentrações de Triton X-100 nos valores de pH correspondentes para a dosagem das atividades das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD) 118

Tabela A.4 - Ensaios de viabilidade de aproximadamente 2 g/L de células de *C. guilliermondii* sem tratamento (controle) e permeabilizadas por Triton X-100 2,78 mM, cultivadas em meio semi-sintético durante 24 h a 200 rpm e 30ºC 119

Tabela A.5 - Ensaios de viabilidade de aproximadamente 2 g/L de células de *C. guilliermondii* sem tratamento (controle) e permeabilizadas por congelamento-descongelamento, cultivadas em meio semi-sintético durante 24 h a 200 rpm e 30ºC 120

Tabela A.6.1 - Bioredução de xilose em xilitol a partir de células de *C. guilliermondii* permeabilizadas. Ensaios realizados com ~ 30 g/L de xilose em tampão Tris-HCl 0,1M pH 7..... 121

Tabela A.6.2 - Ensaios de cultivo de *C. guilliermondii* sem tratamento (controle) em meio semi-sintético contendo ~30 g/Lde xilose e 1,5 g/L de glicose..... 122

Tabela A.7.1 - Atividades volumétrica (Av) e específica (Ae) da enzima G6PD, XR e XD obtidas no homogenato proveniente das células de *C. guilliermondii* não tratadas e permeabilizadas com CTAB 0,41 mM 123

Tabela A.7.2 - Atividades volumétrica (Av) e específica (Ae) da enzima G6PD, XR e XD obtidas no homogenato proveniente das células de *C. guilliermondii* não tratadas e permeabilizadas com Triton X-100 2,78 mM..... 123

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 15

2. REVISÃO DA LITERATURA 17

2.1. Permeabilização celular: Aspectos gerais e métodos empregados 17

2.2. Algumas aplicações biotecnológicas de células permeabilizadas e *resting cells* não tratadas 25

2. 3. Metabolismo da xilose em leveduras 31

2.3.1. Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) 33

2.3.2. Xilose redutase (XR) 34

2.3.3. Xilitol desidrogenase (XD) 35

2.4. Xilitol: principais características e produção biotecnológica 35

3. OBJETIVOS 38

4. MATERIAL E MÉTODOS 39

4.1. Microrganismo e condições de cultivo 39

4.2. Permeabilização com tensoativo catiônico CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio) 39

4.2.1. Efeito do CTAB sobre as atividades das enzimas G6PD, XR e XD em extrato livre de células (homogenato), nas condições de permeabilização 41

4.2.2. Determinação da viabilidade celular de *C. guilliermondii* permeabilizada com CTAB 42

4.3. Permeabilização celular empregando o agente tensoativo Triton X-100 43

4.3.1. Efeito do Triton X-100 sobre as atividades das enzimas G6PD, XR e XD em extrato livre de células (homogenato) 46

4.3.2. Determinação da viabilidade celular de *C. guilliermondii* permeabilizada com Triton X-100 47

4.4. Permeabilização por congelamento-descongelamento 47

4.4.1. Determinação da viabilidade celular de *C. guilliermondii* permeabilizada por congelamento-descongelamento 48

4.5. Ensaios de biotransformação de xilose em xilitol empregando células permeabilizadas 48

4.6. Métodos analíticos 49

4.6.1. Determinação da concentração celular 49

4.6.2. Determinação da concentração de glicose, xilose, xilitol e etanol 49

4.6.3. Determinação da atividade enzimática 49

4.6.3.1. Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) 49

4.6.3.2. Xilose redutase (XR) 50

4.6.3.3. Xilitol desidrogenase (XD) 51

4.7. Metodologia de análise dos resultados 51

4.7.1. Parâmetros de cultivo e biotransformação: 51

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 54

Parte 1A: ESTUDO DA PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *C. guilliermondii* FTI 20037 POR PROCESSO QUÍMICO 55

5.1. Permeabilização de *C. guilliermondii* com o tensoativo catiônico CTAB 55

5.1.1. Efeito da concentração de CTAB, agitação e tempo de contato sobre a permeabilização de *C. guilliermondii* 55

5.1.1.1. Análise estatística dos dados de permeabilização com CTAB a partir da matriz do planejamento experimental 2^3 59

5.1.1.2. Validação do modelo que representa a atividade *in situ* da enzima G6PD a partir das células permeabilizadas com CTAB 64
5.1.2. Efeito do CTAB sobre a atividade das enzimas G6PD, XR e XD 66
5.1.3. Ensaios de viabilidade das células de *C. guilliermondii* permeabilizadas por CTAB 69
5.2. Permeabilização de *C. guilliermondii* com tensoativo não iônico Triton X-100 72
5.2.1. Efeito da concentração de Triton X-100, agitação e tempo de contato sobre a permeabilização *C. guilliermondii* 72
5.2.1.1. Análise estatística dos dados a partir da matriz do planejamento experimental 2^3 78
5.2.1.2. Análise estatística dos dados de permeabilização com Triton X-100 a partir da matriz do planejamento experimental 2^2 83
5.2.1.3. Validação do modelo que representa a atividade *in situ* da enzima G6PD a partir das células permeabilizadas com Triton X-100 88
5.2.2. Efeito do Triton X-100 sobre as enzimas G6PD, XR e XD 89
5.2.3. Ensaios de viabilidade das células de *C. guilliermondii* permeabilizadas por Triton X-100 quando cultivadas em meio semi-sintético 91
Parte 1B: ESTUDO DA PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *C. guilliermondii* FTI 20037 POR PROCESSO FÍSICO 95
5.3. Permeabilização celular de *C. guilliermondii* por congelamento-descongelamento 95
5.3.1. Efeito do congelamento-descongelamento sobre a permeabilização de *C. guilliermondii* 95
5.3.2. Ensaios de viabilidade das células de *C. guilliermondii* permeabilizadas por congelamento-descongelamento quando cultivadas em meio semi-sintético 98
Parte 2: ENSAIOS INICIAIS DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE XILOSE EM XILITOL EMPREGANDO AS CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *C. guilliermondii* 102
6. CONCLUSÕES 107
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 109
REFERÊNCIAS 110
APÊNDICES 116

1. INTRODUÇÃO

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas em substituição aos processos químicos convencionais vem aumentando gradativamente, em diversas áreas, com vistas à obtenção de alternativas limpas para o desenvolvimento de produtos e processos.

Reações de biotransformação são reações químicas catalisadas por microrganismos: células em crescimento, *resting cells* (íntegras ou permeabilizadas) ou suas enzimas, com objetivo de converter um substrato em um número limitado de etapas enzimáticas. O uso de células íntegras (não fragmentadas) em biocatálise constitui uma alternativa mais econômica quando comparada ao sistema que utiliza enzimas isoladas, principalmente devido aos custos de isolamento e purificação. O sistema com células é também mais estável do que os extratos enzimáticos, pois as estruturas intactas das células conferem proteção às biomoléculas. Além disto, o sistema com células pode permitir a retenção ou a regeneração de cofatores no meio intracelular, o que não ocorre quando se usa enzimas isoladas. No entanto, estes sistemas apresentam uma maquinaria enzimática diversificada, e por isso, o maior problema encontrado neste tipo de biocatálise é a baixa seletividade, devido à ação simultânea das várias enzimas presentes, que geralmente apresentam diferentes cinéticas e velocidades de conversão. Além disto, em se tratando de células em fase de crescimento, as reações biossintéticas podem ser afetadas com o desvio de parte do fluxo metabólico para a multiplicação celular. Uma alternativa aos sistemas de enzimas puras ou células em crescimento seria o emprego de *resting cells* (íntegras ou permeabilizadas), as quais são metabolicamente ativas, mas com capacidade reduzida de multiplicação celular (em estado de repouso).

Sistemas de células permeabilizadas apresentam grande aplicabilidade na obtenção de biocatalisadores celulares com alto nível de atividade enzimática. Dentre as técnicas de permeabilização, destacam-se a permeabilização com agentes tensoativos e o congelamento-descongelamento da suspensão celular, os quais promovem a redução da barreira de permeabilidade da parede/membrana celular. Esta alteração na barreira de permeabilidade tende a favorecer a mobilidade intra/extracelular de substrato(s) e/ou produto(s), permitindo assim, uma conversão mais eficiente no produto de interesse. No presente estudo, foram enfocados dois aspectos da permeabilização celular: a) efeito dos tratamentos (químicos ou físicos) sobre a atividade das enzimas de interesse e b) utilização das células permeabilizadas em processos de biocatálise. A levedura *Candida guilliermondii* foi selecionada como um sistema celular modelo, devido aos seus resultados promissores na conversão de xilose em

xilitol por fermentação. A xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XD) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) são as principais enzimas desta bioconversão e foram portanto, avaliadas nos diferentes procedimentos de permeabilização celular.

O xilitol constitui um importante insumo para a indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentos. Além de poder adoçante, o xilitol traz benefícios à saúde humana e pode ser utilizado na área médica para tratamento ou prevenção de doenças, porém, sua maior aplicação é na saúde bucal, uma vez que já foi comprovada sua eficiência na redução da incidência de cáries, na estabilização das cáries já formadas e na remineralização dos dentes. Sua produção industrial se baseia na hidrogenação de xilose purificada na presença de níquel como catalisador. Devido ao elevado aporte energético requerido pelo processo químico (80 – 140 °C de temperatura e 50 atm de pressão) e ao fato de que os processos biotecnológicos promovem menor impacto ambiental, muitas pesquisas vem sendo direcionadas para o desenvolvimento de uma tecnologia sustentável de bioprodução de xilitol. O processo fermentativo empregando leveduras como biocatalisador tem mostrado avanços significativos, mas ainda encontra limitações comerciais devido aos baixos valores de produtividades. O processo enzimático de produção de xilitol, embora eficiente, ainda esbarra nos custos de isolamento e purificação das enzimas. Uma alternativa a estes processos seria a utilização de células íntegras permeabilizadas, em processos de biocatálise ou biotransformação.

O emprego de células permeabilizadas há anos vem sendo utilizado para o monitoramento *in situ* de reações biossintéticas. Recentemente, muita atenção tem sido dada ao uso de células permeabilizadas com alto nível de atividade catalítica em sistemas de biotransformação (biocatálise) visando à obtenção de produtos de elevado valor agregado. Dentro deste contexto, o presente trabalho visou estudar o efeito da permeabilização das células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 empregando agentes tensoativos ou por congelamento-descongelamento, sobre a atividade *in situ* das enzimas XR; XD e G6PD, que são responsáveis pela bioconversão da xilose em xilitol. Foi também objetivo deste trabalho, avaliar a potencialidade das células permeabilizadas em ensaio de biotransformação de xilose em xilitol. A presente proposta se insere no programa de pesquisa do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL – USP), que tem como objetivo o desenvolvimento de tecnologias para o aproveitamento de matérias-primas lignocelulósicas, especialmente os resíduos agro-industriais visando à produção de insumos por via biotecnológica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Permeabilização celular: Aspectos gerais e métodos empregados

A membrana citoplasmática e a parede celular do microrganismo são estruturas vitais, pois, além de proteger o citoplasma da célula do ambiente externo, estas estruturas são responsáveis pela manutenção das condições adequadas para o metabolismo celular, desempenhando um papel importante na regulação da troca de substratos entre a célula e o meio que a circunda. Além disto, a membrana celular, além de atuar como barreira de permeabilidade impedindo o extravasamento passivo dos constituintes citoplasmáticos, desempenha também um importante papel no transporte de moléculas como sítio de proteínas carreadoras (MADIGAN et al., 2004).

A unidade de membrana, como é chamada a membrana citoplasmática, consiste da bicamada *fosfolipídica* com proteínas imersas em sua extensão (Figura 2.1). Os fosfolipídeos contêm porções altamente hidrofóbicas (ácidos graxos) e porções relativamente hidrofílicas (glicerol), podendo ser encontrados sob diferentes formas químicas, resultantes da variação na natureza dos ácidos graxos ou dos grupos contendo fosfato, ligados ao esqueleto de glicerol (MADIGAN et al., 2004).

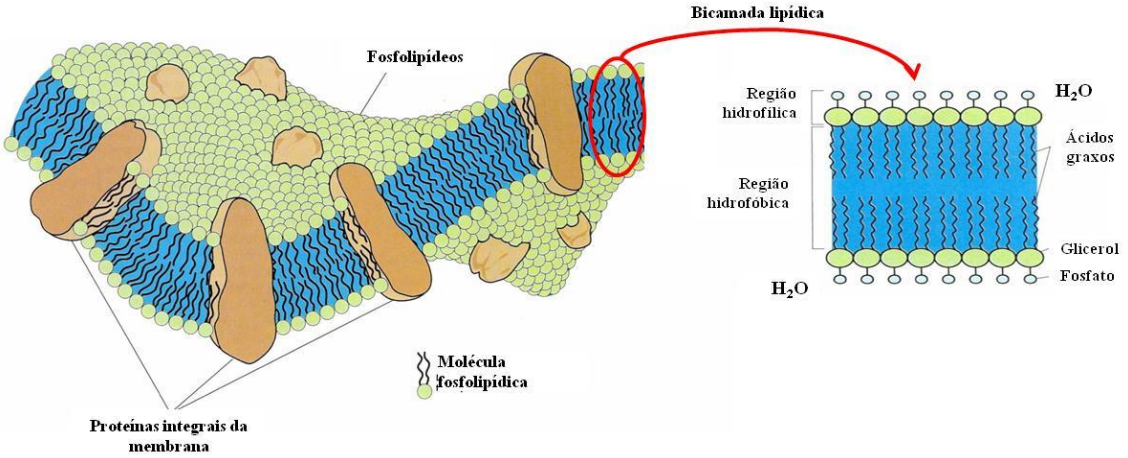


Figura 2.1. Diagrama da estrutura da membrana citoplasmática microbiana (Adaptado de MADIGAN et al., 2004)

Os fosfolipídeos se agregam em solução aquosa e tendem a formar espontaneamente estruturas em bicamada - os ácidos graxos direcionam-se para o interior da bicamada,

voltados uns para os outros, originando um ambiente hidrofóbico, enquanto que as porções hidrofílicas permanecem expostas no ambiente aquoso externo. A estrutura global da membrana citoplasmática é estabilizada por pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas. Além disto, cátions como Mg^{+2} e Ca^{+2} também auxiliam na estabilização da membrana, por meio de associações iônicas com as cargas negativas dos fosfolipídeos. O caráter de bicamada das membranas provavelmente representa o arranjo mais estável de moléculas lipídicas em um ambiente aquoso. (MADIGAN et al., 2004).

A parede celular de leveduras constitui cerca de 15 a 25% da massa seca da célula e não é uma estrutura estática, estando em constante crescimento e mudança. É uma estrutura dinâmica, ajustável durante o ciclo celular e em resposta às condições ambientais como nutrientes, disponibilidade de O_2, temperatura e pH. Perturbações na parede celular de leveduras desencadeiam mecanismos de reparo que reorganizam toda a estrutura molecular, para preservar a integridade da célula. A parede celular de leveduras é formada principalmente por uma camada de mananaproteínas (polímero de manose com ligações α-1,2, α-1,3 e α -1,6, que estão covalentemente ligadas a peptídeos formando glicopeptídeos) que sobrepõe a camada de glucana (polímero de β-1,3 e β-1,6 glicose). A parede celular de *Saccharomyces* sp., é formada por: 48-60 % de glucana, 20-23 % de mananaproteínas e 0,6-2,7 % de quitina (polímero de β-1,4 N-acetilglicosamina) (FLEURI; SATO, 2005).

Um sistema de biotransformação ou biocatálise emprega células em crescimento, *resting cells* (íntegras ou permeabilizadas) ou suas enzimas, na obtenção de um produto de interesse (CÁNOVAS; IBORRA, 2005). Quando o alvo do bioprocesso é a obtenção de produtos puros, as enzimas purificadas são preferidas por eliminarem reações paralelas, porém, esta tecnologia muitas vezes se esbarra no custo de isolamento, purificação, estabilização (imobilização) e regeneração dos cofatores (NG, 2001). O emprego de suspensões celulares, por outro lado, é mais vantajoso do que sistemas enzimáticos, uma vez que a(s) enzima(s) envolvida(s) na reação de interesse se encontra(m) em seu ambiente natural, o que faz com que permaneça(m) ativa(s) e estável(is) durante todo o processo catalítico (CÁNOVAS; IBORRA, 2005). No caso de células íntegras, porém, a barreira da permeabilidade da membrana para substrato(s) e/ou produto(s) pode promover baixas taxas de reação das enzimas contidas nas células (ABRAHAM; BHAT, 2008; NG, 2001). Quando as células microbianas se encontram em fase de crescimento, as reações biossintéticas podem ser afetadas com o desvio de parte do fluxo metabólico para a multiplicação celular (TANAKA et al., 2002). Uma alternativa então seria o uso de sistemas de células permeabilizadas (*resting*

cells ou células em repouso), nos quais o rompimento completo da célula não é o objetivo do tratamento porque se almeja obter um sistema metabolicamente ativo, e de preferência, com capacidade reduzida de crescimento celular (ABRAHAM; BHAT, 2008; NG, 2001; TANAKA et al., 2002).

A técnica de permeabilização (ou rompimento) celular, que pode ser química ou física, é empregada primariamente na recuperação de biomoléculas, incluindo enzimas, proteínas e produtos farmacêuticos (NG, 2001). No entanto, dependendo das condições utilizadas, permite-se somente alterar a parede/membrana celular, sem, no entanto, causar liberação de seus componentes intracelulares (NG, 2001) ou a fragmentação celular (PESSOA JUNIOR, 2005). Segundo Abraham e Bhat (2008), com a alteração na parede/membrana (permeabilização) celular, há uma tendência na redução da barreira de permeabilidade da membrana, conseqüentemente promove uma melhor mobilidade intra/extracelular de substrato(s) e/ou produto(s), o que pode favorecer a conversão do substrato no produto de interesse (Figura 2.2). A estrutura inteira das células permeabilizadas pode reter cofatores e/ou permitir sua regeneração. Desta forma, estes sistemas podem ser empregados para o estudo e monitoramento de enzimas *in situ* e também como catalisadores em diferentes processsos de biotransformação (FÉLIX, 1982; NG, 2001; SERRANO; GANCEDO, J.; GANCEDO, C., 1973).

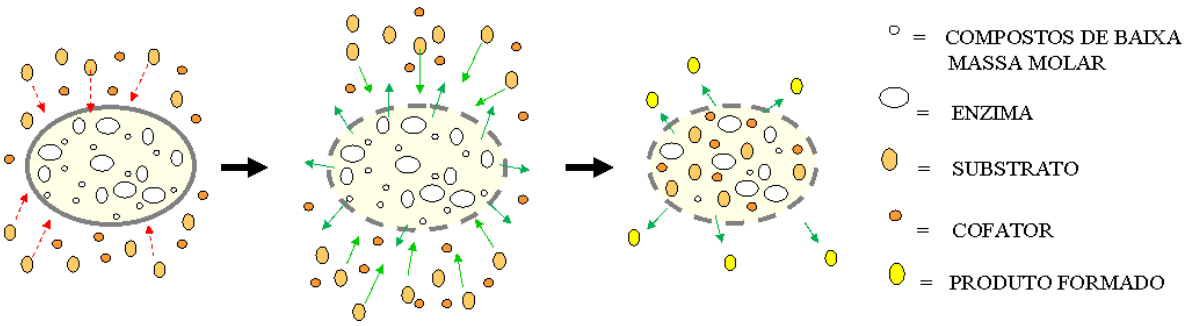


Figura 2.2. Esquema simplificado do processo de permeabilização celular

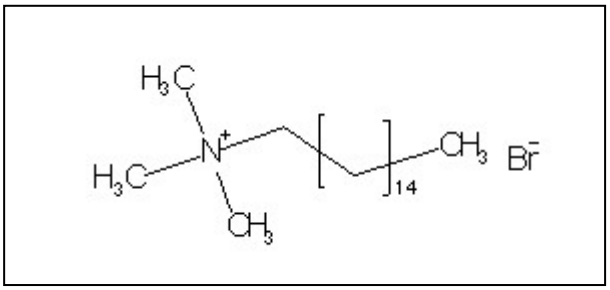
No entanto, dependendo das condições experimentais, não se descarta a formação de sub-produtos e problemas difusionais com relação ao transporte de substrato(s) e/ou produto(s) através da membrana permeabilizada (FELIX, 1982; NG, 2001). Além disto, as piridinas-nucleotídeos (cofatores) estão ligadas à proteína através de ligações não-covalentes

relativamente frouxas (LEHNINGER, 1997), e desta forma, podem ser facilmente liberadas das células após procedimento de permeabilização, o que não é desejável, principalmente em reações enzimáticas que dependem destes compostos. Segundo Shepard et al. (2002), as condições de permeabilização não podem ser generalizadas, sendo necessário otimizar o processo de acordo com as características da molécula alvo e com a estratégia de processo. A escolha do procedimento depende do tipo de organismo, da composição da parede e da membrana celular.

Os agentes tensoativos (detergentes ou surfactantes) são usados em diferentes áreas da Biotecnologia. São moléculas anfipáticas (anfifílicas) com um núcleo polar (parte hidrofílica) e uma cauda apolar (parte hidrofóbica). A porção apolar é freqüentemente uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Devido a esta natureza anfipática, os tensoativos não somente se solubilizam em água, mas também solubilizam compostos hidrofóbicos neste ambiente (BHAIRI; MOHAN, 2007). Desta forma, uma das principais aplicações destes compostos é na solubilização de lipídeos e proteínas das membranas (ROCHA, 1999), o que os tornam potenciais para a obtenção de células permeabilizadas. Dentre os diferentes tipos de tensoativos utilizados, destacam-se o CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio) e Triton X-100 (Figura 2.3).

O CTAB faz parte dos chamados “Quats” - cátions quaternários de amônio (ou sais quaternários de amônio com um ânion associado). Os Quats são íons poliatômicos positivamente carregados de estrutura NR^{4+} com R sendo grupos alquila. São permanentemente carregados, independente do pH de sua solução, e são sintetizados pela completa alquilação da amônia ou outras aminas. Possuem uma afinidade muito alta por superfícies (membranas celulares), o que os tornam tensoativos (ou detergentes) poderosos. No caso do CTAB, a porção hidrofóbica é constituída por grupo cetil, que possui característica oleosa, o que a faz repelir água (ou buscar um ambiente hidrofóbico negativamente carregado) (Quaternary Ammonium Compunds, disponível em www.fefchemicals.com). Segundo Gowda, Bacchawat e Bhat (1991), CTAB possui alta afinidade de ligação à biomoléculas.

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio



Fórmula empírica = $C_{19}H_{42}BrN$

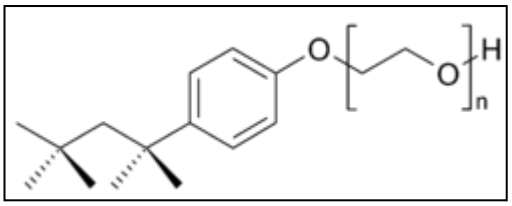
MM = 364,46 g/mol

pH = 5 - 7 (50 g/L, H_2O, 20 °C)

CMC = 1 mM (20 a 25 °C)

Facilmente dissolvido em água fria

Triton X-100



Fórmula empírica = $C_{34}H_{62}O_{11}$

MM = 646,86 g/mol

d = 1,07 g/cm^3 = 1,07 g/mL (20 °C)

CMC = 0,2 - 0,9 mM (20 a 25 °C)

Figura 2.3. Estruturas e características químicas dos agentes tensoativos avaliados no presente trabalho (FONTE: Catálogo Merck e Vetec on line, Wikipedia.com)

O Triton X-100 é um agente tensoativo não-iônico, com porção hidrofílica constituída por uma cadeia de polioxietileno com um número médio de 10 unidades de óxido de etileno, e com a porção hidrofóbica formada pelo grupo *p*-t-octilfenol. Os átomos de oxigênio da porção hidrofílica tornam-na solúvel em água (pontes de hidrogênio) (ROCHA, 1999). Os tensoativos não iônicos, como o Triton X-100, permitem avaliar as interações hidrofóbicas entre seus monômeros ou agregados (micelas) e membranas porque não estabelecem ligações eletrostáticas com os componentes desta. Em geral, estes compostos são melhores para quebrar interações entre lipídeos e entre lipídeos e proteínas, que entre proteínas. Por isso,

eles são considerados tensoativos não-desnaturantes e são amplamente usados no isolamento de proteínas de membranas em suas formas biologicamente ativas (PRETÉ, 2006). Segundo Makino, Reynolds e Tanford (1973), Triton X-100 apresenta uma tendência em formar micelas muito superior do que sua associação com proteínas.

King et al. (1991) avaliaram o efeito dos tensoativos Pluronic F-68 e Triton X-100 sobre a bicamada lipídica. Segundo os autores, dentre os possíveis mecanismos do efeito dos tensoativos sobre a permeabilização da membrana incluem a alteração da interação lipídeo-proteína, lipídeo-lipídeo. Ainda, o tratamento com tensoativos promove um abre-fecha de poros na bicamada fosfolipídica, e a sua ruptura pode ocorrer quando o número de poros abertos for maior do que de poros fechados.

Segundo Bhairi e Mohan (2007), os agentes tensoativos solubilizam as proteínas da membrana, mimetizando o ambiente da bicamada lipídica e este fenômeno está relacionado à CMC (concentração micelar crítica) do tensoativo (Figura 2.4). As micelas formadas por tensoativos são análogas às bicamadas das membranas biológicas e as proteínas se incorporam a estas micelas via interações hidrofóbicas. De acordo com os autores, o procedimento ocorre em diferentes estágios: quando em baixas concentrações (abaixo da CMC), os monômeros de tensoativo dispersos no meio aquoso simplesmente se ligam a membrana, particionando e mimetizando a bicamada lipídica (formação de poros). À medida que a concentração do tensoativo aumenta no meio, em valor igual ou maior a CMC, ocorre a saturação da bicamada com estes compostos, o que pode levar a completa desintegração desta estrutura, obtendo-se ao final, além das micelas de tensoativo, micelas mistas (tensoativo: lipídeo, tensoativo: proteína), constituindo assim, um sistema completamente heterogêneo.

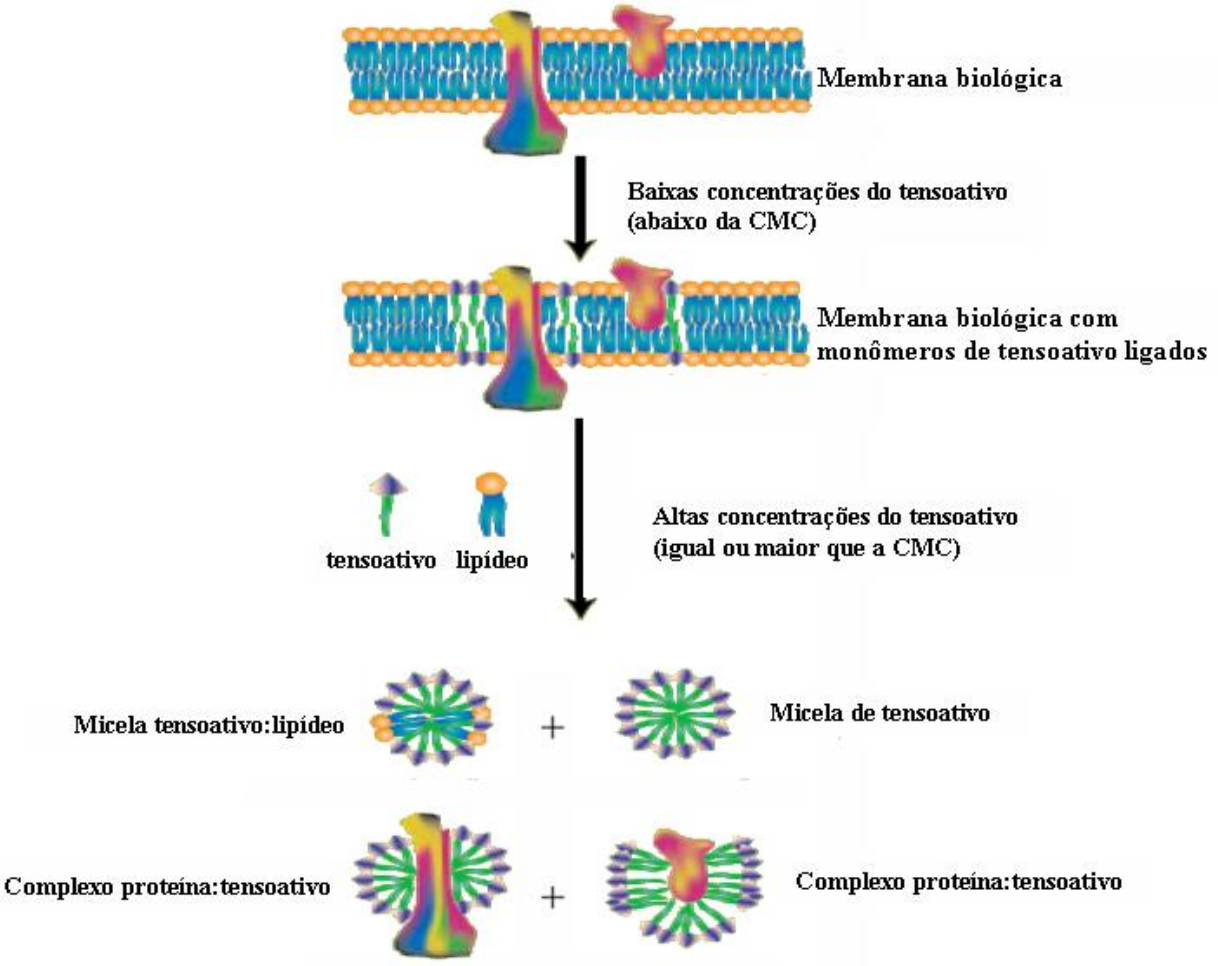


Figura 2.4. Estágios da dissolução de uma membrana biológica com tensoativos (Adaptado de BHAIRI; MOHAN, 2007)

Segundo Hugo[1] (1967 apud UENO, 1992), após adsorção do tensoativo na membrana celular, processos secundários podem ocorrer, e estes contribuem para uma maior ou menor extensão de inibição dos processos metabólicos e reprodutivos da célula e até para uma perda de viabilidade.

Raicu et al. (1998) avaliaram o efeito do CTAB sobre as propriedades dielétricas de *S. cerevisiae*. Os autores trataram as células da levedura (8-9 células/mL) com CTAB (0 a 1 mM) durante 30 min a temperatura ambiente e verificaram que os tratamentos não afetaram a forma das células, mas promoveram uma redução de 30% na área superficial da membrana e 60% no volume celular. Segundo os autores, o tratamento com CTAB causou uma redução na

[1] HUGO, W.B. The modo of action of antibacterial agents. **Journal of Applied Bacteriology**, v.30, p. 17-50, 1967.

condutividade interna do vacúolo (composto em sua maioria por água e íons) e a partir da observação deste comportamento, sugeriram que houve a liberação dos íons provenientes deste compartimento como uma resposta indireta da permeabilização da membrana celular, como sendo uma tendência da célula para compensar a perda de material citoplasmático.

O congelamento-descongelamento da suspensão celular constitui uma técnica freqüentemente empregada para recuperação de produtos intracelulares (NG, 2001; SOUZU, 1980), na permeabilização visando a dosagem *in situ* de enzimas intracelulares (BINDU; SOMASHEKAR; JOSEPH, 1988; DOOLAN; WILKINSON, 2009; SEKHAR; BHAT, N.; BHAT, S., 1999) e também como etapa auxiliar ao procedimento de rompimento celular por ultrasson (MAYERHOFF, ROBERTO; FRANCO, 2006).

Segundo Park et al. (1997) e Pessoa Junior (2005), o grau de permeabilização e/ou lise é dependente das taxas de congelamento-descongelamento e do tipo de microrganismo empregado. Quando se emprega taxas elevadas de congelamento, ocorre formação de cristais de gelo intracelularmente, levando a danos celulares. Por outro lado, quando as taxas de congelamento são baixas, predomina a formação de gelo extracelular, levando à desidratação intracelular. Portanto, cada célula terá uma resposta própria quanto ao grau de permeabilização quando submetidas ao congelamento rápido ou lento. De acordo com Dumont, Marechal e Gervais (2004), o processo de congelamento-descongelamento lento gera um stress duplo para a célula, ou seja, o stresss térmico e o hiperosmótico, os quais atuam simultaneamente durante o resfriamento da suspensão. A água que circunda a célula congela antes do conteúdo celular, isto porque o citoplasma é mais concentrado do que este meio circundante (geralmente, solução tampão), e porque termodinamicamente, o componente com o maior volume irá nuclear em primeiro lugar. Este congelamento aumenta a pressão osmótica do meio, e os solutos extracelulares concentram-se na água remanescente do meio extracelular. Desta forma, uma osmose irá desidratar as células, através da difusão da água do citoplasma para a solução externa mais concentrada.

O tipo de investigação enzimática a ser adotada também é um fator importante em processos de permeabilização celular. De acordo com Galabova, Tuleva e Spasova (1996), o sucesso do procedimento de permeabilização depende também da localização da enzima a ser ensaiada. Segundo Savelli, Spreti e Di Profio (2000), os tensoativos podem afetar a atividade enzimática através da competição com o substrato pelo sítio ativo, da alteração do ambiente natural da biomolécula e em altas concentrações, a inibição pode ocorrer devido ao aumento

da partição do substrato nas micelas de detergente, o que reduziria a concentração do substrato livre. No entanto, estes compostos também podem se ligar à enzima, causando uma mudança conformacional para uma forma mais ativa, podendo o grupo hidrofílico do tensoativo ser o responsável por este acontecimento. A ativação pode ocorrer devido a um aumento na solubilidade do substrato. Ainda segundo os mesmos autores, a estabilização de enzimas constitui um dos principais objetivos no campo da enzimologia micelar. De acordo com Lalitha e Mulimani (1997), tensoativos como por exemplo o CTAB, podem atuar como ativadores de algumas enzimas, promovendo um aumento na hidrofobicidade do ambiente, causando indiretamente um mudança conformacional destas biomoléculas para uma forma mais ativa. Estes autores constataram o favorecimento (20%) da atividade de fosfatase ácida de batata quando em presença de CTAB. Yoon e Robyt (2005) constataram efeito estabilizador do Triton X-100 sobre 10 diferentes enzimas que participam da degradação de amido. Segundo Singh et al. (2006), os tensoativos podem complexar diretamente com a enzima de forma a alterar sua estrutura terciária, e portanto, modulando a atividade e/ou especificidade e/ou estabilidade da biomolécula.

No caso do tratamento da suspensão celular por congelamento-descongelamento, não se descarta a desnaturação de biomoléculas sensíveis ao procedimento (PESSOA JUNIOR, 2005).

2.2. Algumas aplicações biotecnológicas de células permeabilizadas e *resting cells* não tratadas

O interesse industrial por tecnologias alternativas aos processos químicos convencionais vem aumentando gradativamente, em diversas áreas, com vistas à obtenção de alternativas *limpas* para o desenvolvimento de produtos e processos. Neste contexto, a área de biocatálise emergiu como uma ferramenta poderosa para a chamada ‘química ecologicamente correta’ (*green chemistry*), a qual levará cada vez mais a processos industriais comprometidos com o controle ambiental (BOMMARUS; POLIZZI, 2006; DE CONTI et al., 2001). Os biocatalisadores constituem uma alternativa de menor impacto quando comparada à síntese orgânica tradicional. Estas biomoléculas oferecem ferramentas apropriadas para a transformação industrial de materiais naturais ou sintéticos sob condições brandas de reação, com baixas demandas de energia, além de minimizar os problemas de isomerização e de rearranjo de compostos (ALCADE et al., 2006). Dentro deste contexto, células

permeabilizadas e *resting cells* (não tratadas) apresentam destaque, sendo amplamente empregadas na obtenção de sistemas de biotransformação em processos biocatalíticos.

De acordo com Cánovas, Torroglosa e Iborra (2005), as características dos processos de biotransformação são importantes. Para realizar uma biotransformação com células íntegras, *resting cells* permeabilizadas ou não, diversas variáveis devem ser otimizadas para a obtenção de níveis satisfatórios do bioproduto alvo. Desta forma, devem ser levados em consideração: as condições físico-químicas operacionais para a obtenção de máxima atividade catalítica por unidade celular (pH, temperatura, osmolaridade e presença de ativadores/inibidores), a concentração do biocatalisador, concentração do(s) substrato(s) específico(s), o ambiente biocatalítico (reator ou frascos agitados), ativação e/ou indução da(s) enzima(s) envolvida(s) na reação e o tipo de apresentação do biocatalisador (enzima ou células imobilizadas).

A técnica de permeabilização celular é utilizada para a recuperação de produtos microbianos, como ferramenta analítica na medida de várias enzimas *in situ* e na obtenção de sistema biocatalíticos. Vários são os fatores que influenciam a permeabilização celular com agentes tensoativos, incluindo o tipo e a concentração do agente permeabilizante, a temperatura de incubação, o tempo de contato, dentre outros. As condições variam de acordo com o tipo de microrganismo e com o objetivo do processo de permeabilização:

Souzu (1980) estudou o efeito de diferentes taxas de congelamento-descongelamento sobre a permeabilidade da membrana celular de *Escherichia coli*. Segundo os autores, este processo causou a liberação de componentes da membrana celular tais como proteínas, fosfolipídeos e lipo-polissacarídeos. Os autores observaram ainda que a liberação de compostos para fora das células foi dependente da taxa de congelamento-descongelamento. Os componentes da membrana externa foram principalmente liberados pelo processo lento, enquanto que no processo rápido foram liberados os componentes da membrana citoplasmática e da membrana externa. Esta fragmentação das membranas foi assumida como o resultado da cristalização da água externa. No processo lento de congelamento-descongelamento, a fase de separação da bicamada fosfolipídica da membrana aumentou a possibilidade de fragmentação da membrana externa. No processo rápido, o efeito da fase de separação se mostrou menor devido à rápida passagem através das temperaturas de transição.

A permeabilização de células de *Kluyveromyces fragilis* empregando CTAB e Triton X-100 foi avaliada por Joshi, Gowda e Bhat (1987), com o objetivo de se obter um sistema biocatalíco, fonte da enzima β-galactosidase (lactase). Foi observado que células tratadas com CTAB 0,1% (4ºC, 5 min) hidrolisaram a lactose e, que o potencial catalítico da levedura foi

aumentado em aproximadamente 480 vezes em relação ao controle (células não tratadas). Para o tratamento com Triton X-100 1 % (v/v) (40ºC, 1 h) o aumento foi de cerca de 110 vezes.

Naina, Gowda e Bhat (1991) empregaram células permeabilizadas de levedura de panificação (*S. cerevisiae*) como fontes das enzimas álcool desidrogenase (ADH) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) para o preparo de NADH/NADPH. Convencionalmente, estes cofatores reduzidos são obtidos a partir destas enzimas isoladas e purificadas, o que eleva o custo da produção. Buscando uma alternativa, mais econômica, os autores estudaram a permeabilização celular com CTAB. Foi constatado que a atividade de ADH aumentou de 0,6 para 346,2 $U/g_{células,}$ enquanto a G6PD passou de 1,1 para 7,2 $U/g_{células}$ em relação ao controle. Segundo os autores, ambos cofatores NADH/NADPH gerados, se apresentaram estáveis durante as condições de permeabilização, além disto, a redução foi completa e os cofatores apresentaram pureza cromatográfica, o que torna o método uma alternativa economicamente viável para o processo em questão.

Visando obter sistemas enzimáticos com potencial uso em biocatálise, Gowda, Bacchawat e Bhat (1991) permeabilizaram células de levedura de panificação com CTAB. Neste trabalho, algumas enzimas glicolíticas e oxidativas (ADH, G6PD, HK – hexoquinase) foram selecionadas como marcadores do processo de permeabilização. As condições ótimas de permeabilização, avaliadas em termos das máximas atividades intracelulares, foram as mesmas para as três enzimas estudadas (CTAB 2 %, 15 min e 24 ºC). Foi também observado que a razão célula/tensoativo tem maior influência sobre a permeabilização das células, do que a concentração do tensoativo. Além disto, os autores constataram que as células permeabilizadas não apresentaram atividade com a adição de substrato ou cofatores sozinhos, indicando que estes foram removidos das células durante o processo de permeabilização.

Sorbitol e ácido glucônico são convencionalmente produzidos por via química sob condições operacionais extremas e dispendiosas. Uma alternativa seria sua produção via biotecnológica, porém, com células intactas o ácido glucônico pode ser convertido à etanol e outros subprodutos, o que reduz os rendimentos do processo. A produção de sorbitol e ácido glucônico com células permeabilizadas de *Zymomons mobilis* em agente tensoativo (CTAB) foi estudada por Rehr, Wilhelm e Sahm (1991). Os resultados revelaram que o tratamento das células com 0,1 % de CTAB por 10 min, promoveu a obtenção de elevados rendimentos de ácido glucônico e sorbitol (98-99 %) e que o ácido glucônico não foi convertido em etanol. Resultado semelhante (conversão de 97 %) foi encontrado por Wilberg, Alves e Nobrega

(1997) quando células de *Z. mobilis* foram permeabilizadas em 0,2 % de CTAB sob agitação de 300 rpm por 30 min.

Laouar, Mulligan e Lowe (1992) compararam os efeitos de diversos tensoativos sobre a permeabilização celular de *S. cerevisiae* (X 2180 1B), através da atividade enzimática de álcool desidrogenase (ADH). Os autores observaram que quando a levedura foi pré-crescida na presença de Triton X-100 (0,1 % v/v) durante 24 h, a atividade de ADH foi 47 % maior, quando comparado com o ensaio na qual *S. cerevisiae* foi pré-crescida na ausência do tensoativo.

Bhat et al. (1993), avaliaram o uso de células permeabilizadas de levedura de panificação e *K. fragilis* para estimar etanol, glicose e lactose, através das atividades das enzimas ADH, G6PDH, HK e β-GAL (β-glicosidase), em amostras complexas como sangue, leite e fermentado. Os resultados obtidos com as células permeabilizadas em CTAB foram comparados com os obtidos em métodos tradicionais de estimação destes produtos, que são baseados no uso de enzimas purificadas e HPLC. Segundo os autores, a permeabilização celular é uma alternativa viável para medida destes produtos, uma vez que os resultados estimados de etanol, glicose e lactose foram similares aos obtidos nos métodos tradicionais.

Bindu, Somashekar e Joseph (1998), avaliaram vários métodos de permeabilização celular (métodos químicos, enzimáticos e físicos) de *Rhodotorula gracilis* objetivando a determinação da atividade *in situ* de fitase. Foi verificado que dentre todos os métodos estudados, somente o procedimento de congelamento-descongelamento promoveu um aumento na atividade da enzima (aumento de aproximadamente 189% em relação ao controle - células não permeabilizadas). Os autores concluíram que células de *R. gracilis* permeabilizadas por congelamento-descongelamento além de constituir uma fonte de fitase, estas células podem ser empregadas na indústria de alimentos na redução de fitato.

Ng (2001) estudando a permeabilização de *Zymomonas mobilis* e *Escherichia coli* constataram que o método do congelamento-descongelamento favorece a liberação de enzimas citoplasmáticas, utilizando a enzima G6PD como fonte de estudo.

Com o objetivo de se obter um método de reciclagem de cofator a ser utilizado posteriormente numa biorredução enantiosseletiva, Zhang, Witholt e Li (2006), empregaram células permeabilizadas de *Bacillus subtilis* BGSC 1A1 contendo glicose desidrogenase e *Bacillus pumillus* Phe-C3 contendo ceto redutase. Os autores combinaram ("acoplaram") os microrganismos de forma a obter uma eficiente regeneração do cofator e biorredução, respectivamente. Por uma questão econômica, foi utilizado $NADP^+$ para geração e regeneração do NADPH na presença de glicose. Foi observado que a biorredução com as

células permeabilizadas promoveram rendimentos maiores do que com o equivalente em células íntegras, e os autores constataram a generalidade da técnica, como um eficiente sistema acoplado de regeneração de cofator-biocatálise para uma grande variedade de oxidorreduções.

Etil(R)-4-cloro-3-hidroxibutanoato ((R)-CHBE) é um composto quiral de grande importância nas indústrias química e farmacêutica. Yu et al. (2007) permeabilizaram células de *S. cerevisiae* com CTAB para a obtenção de ((R)-CHBE) a partir de etil 4-cloro-3-oxobutanoato (COBE) na presença de brometo de alila. Os autores utilizaram os sistemas ADH - álcool desidrogenase/2-propanol e G6PD/glicose-6-fosfato para a regeneração do NAD(P)H. Foram obtidos rendimento e excesso enantiomérico (ee) de ((R)-CHBE) de 99,5 e 99%, respectivamente, num período de 6 h. A partir de células não permeabilizadas, estes resultados corresponderam a 34,4 e 96%, respectivamente, nas mesmas condições.

Abraham e Bhat (2008) estudaram a permeabilização de *S. cerevisiae* com o tensoativo catiônico N-lauril sarcosina (LS) para obtenção de um biocatalisador com alta atividade *in situ* de catalase. Os autores observaram que a permeabilização celular foi dependente da concentração do tensoativo, do tempo de contato e da temperatura e obtiveram um aumento de 350 vezes na atividade da enzima (atingindo aproximadamente 1000 U/$g_{\text{peso úmido}}$) quando tratada uma suspensão celular de 200 g/L com 2% de LS a 45ºC por 15 min.

Yuan e Heinzle (2009) permeabilizaram cerca de 10 g/L de *Corynebacterium glutamicum* com Triton X-100 0,05%, CTAB 0,1%, digitonina 0,1%, mistura tolueno-etanol (TE) 10% e etanol 40% durante 30 min à temperatura ambiente. Os autores objetivaram a dosagem *in situ* das enzimas málica, G6PD, isocitrato desidrogenase e fosfoglicose isomerase e constataram que as atividades das biomoléculas variaram com o tratamento de permeabilização. Os autores verificaram que G6PD foi a única enzima em que a atividade *in situ* a partir de células permeabilizadas com Triton X-100 e TE foram similares ao homogenato das células não tratadas (~20 U/$g_{\text{células}}$). Todas as demais enzimas foram negativamente afetadas por estes tratamentos. Também foi observado que os demais tratamentos de permeabilização (CTAB, digitonina e etanol) promoveram atividades *in situ* nulas ou até 50% inferiores aos correspondentes níveis no homogenato.

As células microbianas permeabilizadas apresentam uma vasta aplicação, além das apresentadas anteriormente. Na Tabela 2.1 estão citados mais exemplos do uso desta tecnologia nas diversas áreas da Biotecnologia.

Tabela 2.1 - Outros exemplos de aplicações de permeabilizadas

Tipo de microrganismo	Técnica de permeabilização	Objetivo	Referência
Pichia pinus	Agentes tensoativos (CTAB e digitonina)	Estudo quantitativo *in situ* das enzimas álcool oxidase, formaldeído desidrogenase e formato desidrogenase	Alamäe e Järviste (1995)
Yarrowia lipolytica	Agente tensoativo (Triton X-100)	Determinação da atividade *in situ* das enzimas periplasmáticas (fosfatase ácida e fosfatase alcalina)	Galabova, Tuleva e Spasova (1996)
Saccharomyces cerevisiae	Congelamento-descongelamento, agentes tensoativos (CTAB, digitonina e Triton X-100) e mistura de solventes orgânicos (tolueno, etanol e clorofórmio)	Obtenção de um biocatalisador para a remoção de H_2O_2 residual em indústrias de laticínios	Sekhar, Bhat, N., Bhat, S., (1999)
Pichia. pastoris	Agentes tensoativos (N,N-dimetiltetradecilamina e Triton X-100)	Recuperação de proteína recombinante (neurotoxina botulínica) utilizada na indústria farmacêutica	Shepard et al. (2002)
Escherichia coli JM101	Solventes orgânicos (acetona, benzeno, clorofórmio, etanol, hexano, metanol, piridina, tolueno e xileno)	Obtenção de um biocatalisador para produção do precursor da penicilina (ácido-6-amino penicilânico)	De León et al. (2003)
Escherichia coli	Solventes orgânicos (etanol, acetona, álcool isopropílico e tolueno), agentes tensoativos (Tween 20 e Triton X-100) e PEI (polietileneimina)	Obtenção de um biocatalisador para produção de L-carnitina, a qual participa da oxidação lipídica	Cánovas, Torroglosa e Iborra (2005)
Lactococcus lactis	Ultra-som, tratamentos químicos (CTAB, SDS, álcool isopropil) , choque térmico por aquecimento (45,55 e 65ºC) e ciclos de congelamento (- 196ºC)	Favorecimento da acessibilidade das enzimas peptidases da bactéria ácido lática aos substratos do queijo, o que influencia positivamente na formação de flavour do produto	Doolan, Martin e Wilkinson (2009)

As *resting cells* podem ser obtidas na fase final do crescimento exponencial microbiano (DORAN, 1998). Por outro lado, *resting cells* também podem ser obtidas em sistemas de biotransformação em que o(s) substrato(s) específico(s) é/são solubilizado(s) em solução tampão ou aquosa, ausentes de nutrientes, ou o chamado *resting process* (BÄUMCHEN, et al., 2007; CÁNOVAS; IBORRA, 2005; KHAN; BHIDE; GADRE et al., 2009; POONPERM et al., 2007). Este tipo de sistema biocatalítico é frequentemente empregado em processos que requerem altas taxas de conversão e produtividade e pureza enantioseletiva. Na Tabela 2.2 estão apresentados alguns exemplo de aplicação de *resting cells* (não permeabilizadas).

Tabela 2.2. Exemplos de aplicação de *resting cells* (não permeabilizadas)

Tipo de microrganismo	Aplicação	Referência
S.cerevisiae	Obtenção de (R)- ou (S)-etil 4-cloro-3-hidroxibutirato, precursor de fármaco anti-depressivo	Bertau (2002)
Escherichia coli e *Proteus* sp.	Obtenção de um biocatalisador para produção de L-carnitina, a qual participa da oxidação lipídica	Cánovas, Torroglosa e Iborra (2005)
Bacillus pallidus Y25	Produção de L-xilulose a partir de xilitol	Poonperm et al. (2007)
Norcardia corallina B-276	Obtenção de (1S)-(-)-verbenona, um componente de óleo essencial	Manjarrez et al. (2007)
Bacillus megaterium	Obtenção de manitol	Bäumchen et al. (2007)
Candida magnoliae		Khan, Bhide e Gadre (2009)

2. 3. Metabolismo da xilose em leveduras

O metabolismo da xilose em leveduras opera em um ciclo fechado e coordenado, assegurando a geração de NADPH necessário para a conversão de xilose em xilitol (Figura 2.5). As leveduras catabolisam uma quantidade de xilitol suficiente para produzir glicose-6-fosfato (G6P) necessário para a regeneração de NADPH e a manutenção do ciclo (SILVA et al., 1996).

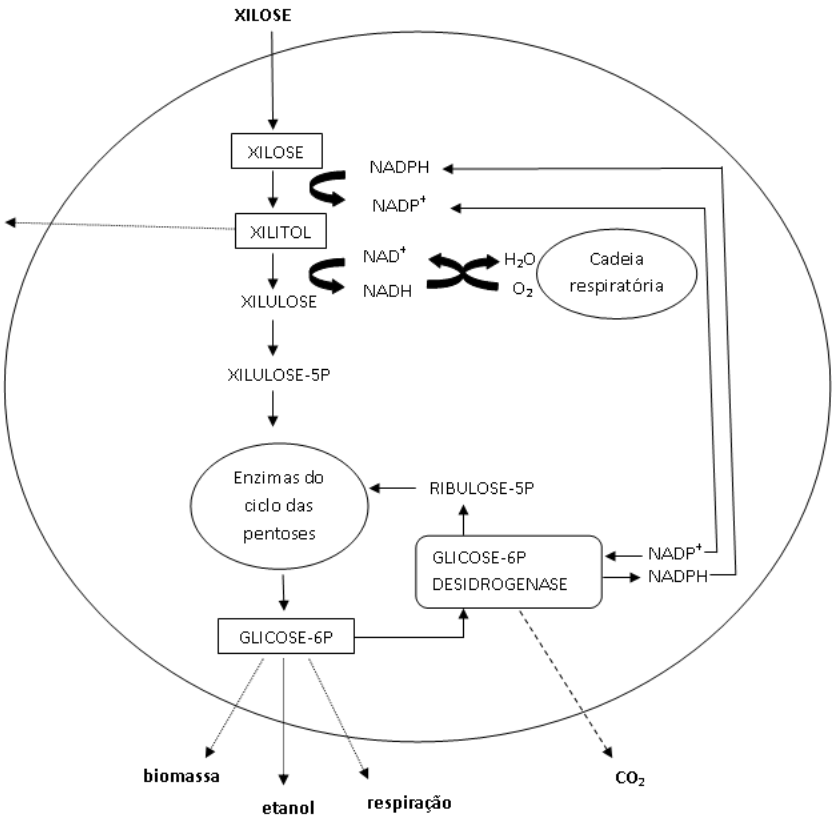


Figura 2.5. Esquema do metabolismo da xilose em leveduras (Adaptado de BARBOSA et al., 1988)

Uma vez dentro da célula da levedura, a xilose é reduzida em xilitol pela xilose redutase (aldose redutase EC 1.1.1.21) dependente quer de NADH ou de NADPH. O xilitol, composto relativamente estável, ou é excretado da célula ou oxidado a xilulose pela xilitol desidrogenase (EC 1.1.1.9) dependente de NAD^+ ou $NADP^+$ (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998). Porém, a dependência do tipo do cofator da xilose redutase pode afetar a proporção entre as quantidades produzidas de xilitol e xilulose. Yablochkova et al. (2003) verificaram que a cepa *Pachysolen tannophilus*, cujas xilose redutases são quase igualmente específicas para o NADH e o NADPH, produziu xilitol e etanol em quantidades comparáveis, enquanto que para *C. shehatae* e *P. stipitis*, cujas xilose redutases são mais específicas para o NADH do que para NADPH, o etanol foi o produto predominante. Conseqüentemente, a formação intensa da xilulose a partir da xilose é uma condição necessária para a produção do etanol. Segundo os mesmos autores, o impedimento da formação da xilulose devido a dependência predominante da xilose redutase por NADPH conduz à produção do xilitol como o produto principal da fermentação da xilose.

Para a determinação das atividades de enzimas intracelulares, o substrato deve ser adicionado ao meio, de forma a promover uma saturação eficiente da enzima (LEHNINGER,

1997) e além disto, a atividade enzimática relacionada a variação da absorção de piridinas-nucleotídeos (cofatores) se baseia no princípio de que suas formas reduzidas (NADH/NADPH) absorvem energia a 340 nm, enquanto que suas formas oxidadas (NAD^+/$NADP^+$) não apresentam esta absorção (MARINHO et al., 2007).

2.3.1. Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

A enzima citoplasmática glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49) foi descoberta em 1931 por Warburg e Christian. Esta enzima catalisa a reação de oxidação da glicose-6-fosfato pelo $NADP^+$ com formação da 6-fosfogluconolactona e NADPH. A reação da G6PD é a primeira e também limitante da velocidade da via das pentoses fosfato, que possui 3 funções importantes: (1) a produção de equivalentes redutores sob a forma de NADPH; (2) a produção de pentoses fosfato necessários para a biossíntese de nucleotídeos e (3) servir como porta de entrada das pentoses na via glicolítica. O NADPH é utilizado como redutor numa grande variedade de reações incluindo não somente a produção de xilitol como de ácidos graxos e colesterol, e um nível adequado deste cofator é igualmente importante para proteção das células contra o estresse oxidativo (MARINHO et al., 2007).

A G6PD de leveduras existe em solução como uma mistura em equilíbrio de dímeros e tetrâmeros. Somente os dímeros são ativos. Uma característica típica da G6PD, como de outras desidrogenases, é a inativação resultante de sua dissociação, o que é um indicativo da importância do contato entre as subunidades para que as propriedades catalíticas sejam pronunciadas. A massa molecular do dímero é 102 kDa (ZAITSEVA; CHUKRAI; POLTORAK, 2000). Segundo os mesmos autores, a forma dimérica de G6PD contém dois centros equivalentes de $NADP^+$ que se liga com as constantes de dissociação, K_1 = 45 μM e K_2 = 0,13 μM (pH 8,0, 27 °C). As cinéticas de ação da enzima obedecem a Lei de Lambert-Beer com uma ligação independente dos substratos. Segundo Marinho et al. (2007), a enzima G6PD de *S. cerevisiae* apresenta K_M para G6P de 58 μM e para o $NADP^+$ de 20 μM; o NADPH, um dos produtos da reação é inibidor da enzima sendo que o K_I é 27 μM e a atividade da enzima apresenta pH ótimo entre 8 e 9, e decresce com o decréscimo da temperatura de 35 ºC para 22 ºC. Em estudos de estabilidade, Souza et al. (2002) observaram que à 4 ºC, a enzima se manteve estável numa faixa de pH de 4 a 9,5 durante 4 h de estocagem.

A G6PD encontra-se amplamente distribuída na natureza, em quase todos os tecidos de origem animal e vegetal e em células de microrganismos (GURPILHARES et al., 2006).

A deficiência em G6PD é uma doença genética comum nos humanos, podendo resultar na anemia hemolítica e em um aumento da sensibilidade dos eritrócitos a compostos oxidantes, devido à deficiência em NADPH (MARINHO et al., 2007).

A enzima é comumente utilizada em estudos médicos e bioquímicos, como reagente analítico para vários ensaios quantitativos, incluindo medidas de atividades da hexoquinase e creatina-quinase, concentrações de ATP e hexoses (BERGMEYER, 1984). Kwon et al. (2006) propuseram um estudo para promover a elevação da atividade de G6PD com vistas a aumentar o fluxo metabólico através da via das pentoses fosfato, aumentando assim a regeneração do NADPH para a produção de xilitol em *S. cerevisiae* recombinante. Naina, Gowda e Bhat (1991) também já haviam utilizado a enzima como fonte de regeneração de cofator. Bhat et al. (1993) avaliaram a atividade da enzima G6PD (a partir de células permeabilizadas) com o intuito de se obter um método alternativo para estimar glicose em amostras complexas como sangue, leite e leite fermentado.

2.3.2. Xilose redutase (XR)

A xilose redutase (XR) ou aldose redutase de leveduras faz parte da família das aldo-ceto redutases, a qual catalisa a redução reversível NAD(P)H-dependente de aldeídos e cetonas em seus álcoois correspondentes. A xilose redutase (XR) é a enzima responsável pela primeira etapa no metabolismo de xilose por leveduras (CHIANG; KNIGHT, 1960).

XR de diferentes leveduras e fungos têm sido purificadas e parcialmente caracterizadas. A massa molecular encontrada para a XR de *Candida guilliermondii* foi de 36 kDa, com K_M de 79 mM para D-xilose, adotando NADPH 0,15 mM (GRANSTRÖM et al., 2002). As condições ótimas de pH e temperatura para a atividade da XR podem variar de acordo com o microrganismo empregado. De uma forma geral a faixa de pH ótimo para esta enzima encontra-se entre 5,0 e 7,5, enquanto que a temperatura tem se mostrado ótima entre 25 e 50 ºC (NEUHAUSER et al., 1997; YOKOYAMA et al., 1995). Empregando a metodologia do planejamento experimental, Mayerhoff, Roberto e Franco (2006) demonstraram que para *Candida mogii* a máxima atividade de XR ocorre em pH de 6,5 e temperatura de 38 ºC. A enzima produzida por *Cryptococcus lactativorus* mostrou-se estável em valores de pH entre 6,0 e 8,0 unidades, após 24 h de incubação, para ambos os cofatores (NADH e NADPH), sendo desnaturada em pH abaixo de 4,0 e acima de 9,0 (KISE; KOIZUMI; MAEDA, 1988). O estudo de estabilidade térmica para esta enzima determinou uma atividade residual de 100%, 93% e 3% da atividade inicial, após 10 min de incubação a

30, 50 e 80 ºC, respectivamente. A meia-vida desta enzima foi de 800 h e 14 h, a 30 e 50 ºC, respectivamente, também para ambos os cofatores empregados.

A XR de *Candida shehatae* mostrou-se estável a 4 ºC por vários meses, e por 48 h à temperatura ambiente (HO et al., 1990). Frações contendo xilose redutase produzida por *Candida boidinii* puderam ser estocadas por pelo menos dois meses à 20 ºC, sem perda da atividade (BOLEN; MCCRACKEN, 1990). De acordo com Mayerhoff, Roberto e Franco (2006), a XR de *C. mogii* se manteve estável por 3 h a 4 ºC e 38 ºC e por 4 meses de estocagem a -20 ºC.

2.3.3. Xilitol desidrogenase (XD)

Como visto anteriormente, na bioconversão da xilose, dependendo das condições experimentais, o xilitol formado segue a via metabólica das pentoses fosfato, sendo a xilitol desidrogenase (XD) a enzima responsável pela oxidação inicial do poliol a xilulose, reação dependente de NAD^+ ou $NADP^+$.

Yang e Jeffries (1990) purificaram XD a partir de *C. shehatae*, e obtiveram uma enzima de massa molecular de 82 kDa, sendo composta de 2 subunidades. Em 1996, Gírio, Pelica e Amaral-Colaço investigaram as características da XD de *Debaromyces hansenii*, uma importante produtora do poliol. Foi verificado que a enzima apresentou um pH ótimo de atividade entre 9 e 9,5, com K_M para xilitol de 16,4 mM e para NAD^+, de 0,55 mM. Os autores ainda observaram queda na atividade (15%) quando adiocionado ao meio reacional ATP (1 mM) ou GTP (1 mM).

Mayerhoff, Roberto e Franco (2006), obtiveram a partir de *C. mogii* uma condição ótima de pH e temperatura (6,5 e 38 °C), para a obtenção de uma atividade máxima de XR a expensas de XD, resultando numa razão de 2,2.

2.4. Xilitol: principais características e produção biotecnológica

O xilitol é um composto orgânico (poliálcool natural de cinco átomos de carbono) de fórmula $C_5H_{12}O_5$, encontrado naturalmente em pequenas quantidades (< 935 mg por 100 g da matéria seca) em muitas frutas e vegetais. O xilitol é também formado como um produto intermediário durante o metabolismo de carboidratos no homem (YLIKAHRI, 1979), apresentando no sangue níveis de 0,03-0,06 (mg/100mL). Segundo Pepper e Olinger (1988), o corpo humano produz de 5 a 15 g de xilitol por dia durante o metabolismo normal.

O xilitol possui poder adoçante similar ao da sacarose, porém com menor poder calórico (2,4 kcal/g). O xilitol também possui propriedades físico-químicas e fisiológicas importantes, que o coloca como produto em potencial para aplicações em diversos setores industriais (alimentos, cosméticos e fármacos). A maior aplicação do xilitol ainda é na saúde bucal, uma vez que já foi comprovada sua eficiência na redução e estabilização de cáries e na remineralização dos dentes (BASTOS et al., 2005; ELIAS, 2005; NONAKA et al., 2005). Atualmente, com um grande número de trabalhos já concluídos, sabe-se que o xilitol traz benefícios à saúde humana e pode ser utilizado na área médica para tratamento ou prevenção de doenças, com destaque para o tratamento de otites médias agudas e infecções respiratórias e na prevenção de osteoporose (MUSSATTO; ROBERTO, 2002a).

O xilitol pode ser obtido pela hidrogenação da xilose por via química ou biotecnológica. O processo de obtenção de xilitol a partir da xilose, por via química, consiste na hidrólise ácida do material lignocelulósico, seguida da purificação e hidrogenação da xilose, e, finalmente, na purificação do xilitol (MELAJA; HÄMÄLÄINEN, 1977). A hidrogenação da solução purificada de xilose é realizada em presença de catalisador metálico (Ni/Al_2O_3), sob temperatura de 80-140 ºC e alta pressão de hidrogênio (até 50 atm). Segundo Lu et al. (1995), os extensivos procedimentos de purificação da xilose, bem como de separação do xilitol de outros açúcares-álcoois formados durante o processo de hidrogenação, eleva os custos do produto, limitando, assim, a sua utilização.

De acordo com Prakasham, Rao e Hobbs (2009), o mercado de xilitol é crescente. Este fato tem encorajado o desenvolvimento de tecnologias alternativas, capazes de diminuir os custos de produção e diminuir o impacto ambiental inerente aos processos químicos. Neste campo, os processos biotecnológicos de produção de xilitol têm sido considerados como uma alternativa ao processo químico, uma vez que estes não requerem a purificação inicial da xilose e podem ser operados sob condições amenas de temperatura e pressão.

Os métodos biotecnológicos para a produção de xilitol são baseados na utilização de microrganismos e/ou enzimas, em processos fermentativos ou enzimáticos. De uma forma geral, entre os microrganismos, as leveduras pertencentes ao gênero *Candida* são consideradas os melhores produtores de xilitol, e por isso tem sido extensivamente estudadas.

Barbosa et al. (1988) durante uma seleção de leveduras para a produção de xilitol a partir de xilose, constataram que dentre as 44 leveduras avaliadas, 42 acumularam algum xilitol no meio de cultivo, o que significa que sua produção é uma característica relativamente comum dentre as leveduras que utilizam xilose. Neste trabalho, *Candida tropicalis* 1004 e *Candida guilliermondii* FTI 20037 foram selecionadas como potenciais candidatas para a

bioprodução de xilitol a partir da xilose. Também foi constatado que para *C. guilliermondii* FTI 20037 o rendimento em subproduto (etanol) foi muito baixo, em especial com o aumento da limitação de oxigênio. De acordo com os autores, *C. guilliermondii* FTI 20037 apresentou um elevado rendimento em xilitol (81% do rendimento teórico), quando empregado um meio de cultivo composto por uréia como fonte de nitrogênio. Com base nestes resultados promissores, esta levedura tem sido amplamente empregada para bioprodução de xilitol em hidrolisados de biomassa vegetal. Além do estudo dos parâmetros ambientais que influenciam esta bioconversão, são também enfocados os aspectos relacionados com as formas de obtenção e tratamento do meio hidrolisado bem como a condução do bioprocesso (FELIPE et al., 1997; LEATHERS, 2003; MUSSATTO; ROBERTO, 2002b, 2004; ROBERTO et al., 1995; RODRIGUES et al., 2003; SAHA, 2003; SILVA et al., 1996; SILVA; ROBERTO, 2001).

O processo enzimático para a síntese de xilitol empregando a enzima XR recuperada, quando comparado aos processos fermentativos anteriormente mencionados, pode representar um aumento no rendimento em xilitol, uma vez que a enzima responsável pela reação de degradação do xilitol (XD) não está presente. A produção enzimática deste poliol pode também resultar em um aumento substancial da produtividade, decorrente da redução nas limitações de transferência de massa, que são muitas vezes limitantes no processo microbiológico (NIDETZKY et al., 1996). Alguns estudos realizados visando a produção de xilitol por processo enzimático apresentaram uma eficiência da conversão de xilose em xilitol de 100% (NIDETZKY et al., 1996; KITPREECHAVANICH et al., 1984). No entanto, uma limitação do processo enzimático de conversão de xilose em xilitol é a necessidade do reciclo da forma reduzida da coenzima (NADPH ou NADH). A redução da coenzima nos estudos de produção de xilitol por processo enzimático tem sido realizada através do emprego de membranas eletricamente carregadas ou por acoplamento de microrganismos metanogênicos capazes de regenerar a coenzima (NIDETZKY et al., 1996; KITPREECHAVANICH et al., 1984). Uma alternativa ao processo enzimático com enzimas purificadas seria o uso de células permeabilizadas em processo de biotransformação, o qual, até o momento não foi relatado pela comunidade científica no que se refere à produção de xilitol.

3. OBJETIVOS

Geral

O principal objetivo deste trabalho foi estudar a permeabilização celular de *Candida guilliermondii* por processo químico e físico e verificar o potencial uso da levedura permeabilizada como biocatalisador do processo de redução de xilose em xilitol.

Específicos

Estudo da permeabilização de *C. guilliermondii* por processo químico:

✓ Através da metodologia do planejamento experimental, avaliar o efeito da concentração de CTAB (ou Triton X-100), agitação e tempo de contato sobre a permeabilidade da membrana de *C. guilliermondii* e estabelecer as condições de permeabilização que maximizaram a atividade *in situ* da enzima marcador glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), da xilose redutase (XR) e da xilitol desidrogenase (XD);

✓ Verificar o efeito do CTAB (ou Triton X-100), nas condições que promoveram a máxima permeabilização celular de *C. guilliermondii*, sobre a atividade das enzimas G6PD, XR e XD, no homogenato resultante do rompimento mecânico das células não tratadas e

✓ Avaliar a capacidade de crescimento das células de *C. guilliermondii* previamente permeabilizadas com CTAB (ou Triton X-100), nas condições otimizadas de tratamento de permeabilização.

Estudo da permeabilização de *C. guilliermondii* por processo físico:

✓ Avaliar a permeabilização de *C. guilliermondii* por congelamento-descongelamento, através da determinação da atividades *in situ* e no sobrenadante das enzimas G6PD, XR e XD e

✓ Avaliar a capacidade de crescimento das células de *C. guilliermondii* previamente permeabilizadas por congelamento-descongelamento.

Estudo inicial de biotransformação de xilose em xilitol empregando as células permeabilizadas

✓ Verificar o potencial uso das células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com CTAB, Triton X-100 ou por congelamento-descongelamento na biotransformação de xilose em xilitol empregando *resting process*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo e condições de cultivo

Foi utilizada a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, da coleção de culturas do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos do Departamento de Biotecnologia da EEL-USP, selecionada para produção de xilitol (BARBOSA et al., 1988). A cultura foi repicada em tubos de ensaio contendo ágar malte inclinado e conservada em geladeira a 4 ºC.

Para preparo do meio de cultivo, foram utilizadas soluções concentradas de cada componente, preparadas separadamente e autoclavadas a 112 °C por 15 min (g/L, xilose: 400 e glicose: 150) e 121 °C por 20 min (g/L, sulfato de amônio: 70, cloreto de cálcio di-hidratado: 10 e extrato de farelo de arroz: 100). Os componentes foram então misturados assepticamente, de forma a se obter a concentração desejada de cada nutriente no meio de cultivo. O extrato de farelo de arroz foi preparado a partir de uma suspensão de farelo em água destilada (10,0%, p/v). Após a autoclavagem da suspensão, esta foi centrifugada em condições assépticas a 2000 x g por 20 min, sendo o extrato constituído pela fração líquida.

As células foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio de cultivo composto por: g/L, xilose: 30; glicose: 1,5; sulfato de amônio: 3; cloreto de cálcio di-hidratado: 0,1 e extrato de farelo de arroz: 20% (v/v). Os frascos foram incubados a 30 ºC em agitador rotatório a 200 rpm durante 24 h. As células de *C. guilliermondii*, foram separadas por centrifugação (5600 x g por 20 min) e lavadas (2 vezes) em solução tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7.

4.2. Permeabilização com tensoativo catiônico CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio)

Para este estudo, células de *C. guilliermondii* previamente cultivadas sob as condições descritas no item 4.1, foram separadas por centrifugação (5600 x g por 20 min) e lavadas por 2 vezes em solução tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7. Após lavagem, as células foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio de permeabilização composto por CTAB solubilizado em solução tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7. Os ensaios foram realizados a temperatura de 30 °C e com uma concentração celular de 2 g/L.

Foram avaliados os efeitos estimados da concentração de CTAB (0,14, 0,28 e 0,41 mM), velocidade de agitação (0, 100 e 200 rpm) e tempo de contato (10, 30 e 50 min) e suas possíveis interações sobre a permeabilização de *C. guilliermondii*. Para tal propósito, foi

empregado planejamento fatorial completo de dois níveis 2^3 com 3 repetições no ponto central (Tabela 4.1) e o monitoramento da permeabilidade celular foi feito através da dosagem *in situ* da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), selecionada como marcador do tratamento. As enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD) também foram dosadas. Todas as enzimas avaliadas também foram dosadas no sobrenadante, o qual foi resultante da centrifugação (5600 x g por 20 min) da suspensão de células permeabilizadas.

Tabela 4.1 - Matriz de planejamento experimental 2^3 com 3 repetições no ponto central, utilizada para investigar o efeito da concentração de CTAB (X_1), da agitação (X_2) e do tempo de contato (X_3) sobre a atividade *in situ* das enzimas G6PD, XR e XD

Ensaios	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	X_1	X_2	X_3	CTAB (mM)	Agitação (rpm)	Tempo de contato (min)
1	-1	-1	-1	0,14	0	10
2	+1	-1	-1	0,41	0	10
3	-1	+1	-1	0,14	200	10
4	+1	+1	-1	0,41	200	10
5	-1	-1	+1	0,14	0	50
6	+1	-1	+1	0,41	0	50
7	-1	+1	+1	0,14	200	50
8	+1	+1	+1	0,41	200	50
9	0	0	0	0,28	100	30
10	0	0	0	0,28	100	30
11	0	0	0	0,28	100	30

Os valores das variáveis independentes foram codificados no planejamento fatorial de acordo com a Equação 4.1:

$$V_C = \frac{(V_R - V_O)}{\Delta V_R} \qquad (4.1)$$

Em que: V_C = valor codificado da variável independente; V_R = valor real da variável independente; V_O = valor real da variável independente no ponto central; ΔV_R = valor do passo, isto é $(V_{Rmáx} - V_{Rmín})/2$.

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa STATISTICA versão 8.0. A significância dos fatores experimentais foi determinada pelo teste *t* de Student. Neste teste, se o valor de $t_{calculado}$ for superior ao $t_{tabelado}$, ou seja, $t_{(1-\alpha,\ \lambda)}$, para um nível de significância de α e λ graus de liberdade, então o termo em causa contribui significativamente para a resposta.

A relevância estatística do modelo matemático foi determinada pela análise de variância (ANOVA), levando-se em conta o coeficiente de determinação (R^2) e teste F de Fisher. O teste F foi também utilizado para determinar a adequação do modelo aos dados obtidos nos ensaios experimentais. Neste teste, o valor de $F_{calculado}$ foi comparado com o $F_{tabelado}$, ou seja, $F_{(\alpha,\ p-1,\ n-p)}$, em que α é o risco escolhido, n é o número total de ensaios e p é o número de temos do modelo. O modelo matemático foi então determinado através de análise de regressão aplicada aos resultados experimentais obtido no planejamento fatorial completo. Este modelo foi representado pela Equação 4.2:

$$Y_i = b_0 + \sum_{i=1}^{n} b_i X_i + \sum_{i=1}^{n} b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} b_{ij} X_i X_j \qquad (4.2)$$

Em que: *Yi* = representa a variável de resposta; b_0, b_i, b_{ii} e b_{ij} = representam os coeficientes; *Xi* e *Xj* = representam as variáveis estudadas.

Uma vez obtidas as condições otimizadas (0,41 mM de CTAB, 200 rpm de agitação e 50 min de tempo e contato), dentro da faixa experimental avaliada, foi realizado um ensaio para confirmação do modelo.

4.2.1. Efeito do CTAB sobre as atividades das enzimas G6PD, XR e XD em extrato livre de células (homogenato), nas condições de permeabilização

Visando avaliar o efeito do CTAB nas condições de permeabilização previamente otimizadas (CTAB 0,41 mM, agitação em 200 rpm, tempo de contato de 50 min e temperatura de 30 ºC) sobre as atividades das enzimas G6PD, XR e XD, ensaios foram realizados em duplicata com o homogenato sob as mesmas condições descritas para a permeabilização das células. O homogenato foi obtido após o rompimento de 2 g/L de células sob as condições determinadas por Gurpilhares et al. (2006). Os ensaios foram realizados em Erlenmeyer de 125 mL, sob temperatura de 30 °C. Para este procedimento, 3 mL da suspensão celular de *C.*

guilliermondii (2 g/L) foram transferidas para um tubo tipo Falcon de 15 mL contendo 3 mL de esferas de vidro. A mistura foi agitada em vórtice durante 5 min sendo adotados 5 ciclos de agitação de 1 min intercalados por intervalos de 30 s de resfriamento em banho de gelo. Ao término do último ciclo, a mistura foi centrifugada (5600 x g por 20 min) para a recuperação do sobrenadante (homogenato celular). A eficiência do rompimento foi avaliada através da leitura de densidade ótica, DO_{600nm}, antes e após o rompimento. O CTAB (0,41 mM) foi então solubilizado no homogenato, o qual foi submetido à agitação de 200 rpm por 50 min a 30 ºC. Durante este período, foram analisadas as atividades das enzimas G6PD, XR e XD, adotando-se como controle o homogenato tratado sem adição de CTAB.

4.2.2. Determinação da viabilidade celular de *C. guilliermondii* permeabilizada com CTAB

Nesta estapa foi verificada a capacidade de crescimento das células de *C. guillermondii* previamente permeabilizadas com CTAB. Para tal propósito, 2 g/L de células da levedura foram tratadas nas condições que permitiram a sua permeabilização máxima, dentro da faixa experimental avaliada (0,41 mM de CTAB, velocidade de agitação de 200 rpm, tempo de contato de 50 min e temperatura de 30ºC). As células permeabilizadas foram lavadas em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7 por 2 vezes e posteriormente, foram utilizadas como inóculo em cultivo empregando meio semi-sintético. Foram realizados dois ensaios experimentais em frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL do meio composto por (g/L): xilose: 30; glicose: 1,5; sulfato de amônio: 3; e cloreto de cálcio di-hidratado: 0,1 e extrato de farelo de arroz: 20% (v/v). Os ensaios foram realizados sob assepsia. Os frascos foram incubados a 30 ºC em agitador rotatório a 200 rpm durante 24 h. Os ensaios com células permeabilizadas foram comparados com cultivo em meio inoculado com células sem tratamento (controle). O acompanhamento do cultivo foi feito através de amostragem em 0, 5, 10, 18 e 24 horas e foram analisados o crescimento celular, pH, consumo de açúcares e formação de xilitol.

Ainda nesta etapa, as células sem tratamento e permeabilizadas com CTAB foram submetidas à coloração com solução de azul de metileno 0,01% (p/v) contendo citrato de sódio di-hidratado (2%, p/v). Para ambas suspensões celulares, foram empregadas relação células:solução de azul de metileno de 1:1 (v/v) e as mesmas foram fotografadas através de microscopia óptica (aumento de 100 vezes).

4.3. Permeabilização celular empregando o agente tensoativo Triton X-100

Para este estudo, células de *C. guilliermondii* previamente cultivadas sob as condições descritas no item 4.1, foram separadas por centrifugação (5600 x g por 20 min) e lavadas por 2 vezes em solução tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7. Após lavagem, as células foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio de permeabilização composto por Triton X-100 solubilizado em solução tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7. Os ensaios foram realizados a temperatura de 30 °C e com uma concentração celular de 2 g/L. As variáveis utilizadas no estudo de permeabilização com Triton X-100 foram as mesmas empregadas no estudo com CTAB, ou seja, relação células:tensoativo, agitação e tempo de contato.

Numa etapa inicial, o tratamento de *C. guilliermondii* com Triton X-100 foi conduzido exatamente com os níveis das variáveis empregados nos ensaios realizados com CTAB, ou seja, relação célula: tensoativo (1:0,02, 1:0,05 e 1:0,08, g/g), agitação (0, 100 e 200 rpm) e tempo de contato (10, 30 e 50 min). Como foram empregadas suspensões celulares de aproximadamente 2 g/L, as concentrações de Triton X-100 utilizadas para manter constante a relação célula: tensoativo foram 0,08, 0,15 e 0,23 mM.

Foram avaliados os efeitos estimados da concentração de Triton X-100, velocidade de agitação e tempo de contato e suas possíveis interações sobre a permeabilização de *C. guilliermondii*. Para tal propósito, foi empregado planejamento fatorial completo de dois níveis 2^3 com 3 repetições no ponto central (Tabela 4.2) e o monitoramento da permeabilidade celular foi feito através da dosagem *in situ* e no sobrenadante da atividade da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), selecionada como marcador do tratamento. As enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD) também foram dosadas. Todas as enzimas avaliadas também foram dosadas no sobrenadante, o qual foi resultante da centrifugação (5600 x g por 20 min) da suspensão de células permeabilizadas.

Tabela 4.2 - Matriz de planejamento experimental 2^3 com 3 repetições no ponto central, utilizada para investigar o efeito da concentração de Triton X-100 (X_1), da agitação (X_2) e do tempo de contato (X_3) sobre a atividade *in situ* das enzimas G6PD, XR e XD

Ensaios	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	X_1	X_2	X_3	Triton X-100 (mM)	Agitação (rpm)	Tempo de contato (min)
1	-1	-1	-1	0,08	0	10
2	+1	-1	-1	0,23	0	10
3	-1	+1	-1	0,08	200	10
4	+1	+1	-1	0,23	200	10
5	-1	-1	+1	0,08	0	50
6	+1	-1	+1	0,23	0	50
7	-1	+1	+1	0,08	200	50
8	+1	+1	+1	0,23	200	50
9	0	0	0	0,15	100	30
10	0	0	0	0,15	100	30
11	0	0	0	0,15	100	30

Os resultados obtidos a partir da matriz do planejamento 2^3 (Tabela 4.2) mostraram que a faixa de concentração de Triton X-100 avaliada (0,08 a 0,23 mM), não foi adequada para promover a permeabilidade da membrana celular de *C. guilliermondii*. Desta forma optou-se por elevar as concentrações de Triton X-100 em 2 e 12 vezes, ou seja, 0,46 e 2,78 mM. Os novos ensaios foram realizados variando-se a agitação em 0 e 200 rpm e o tempo de contato em 10, 30 e 50 min, mantendo-se constante concentração celular em 2 g/L, temperatura em 30 ºC e pH em 7. Para estes ensaios foi empregado planejamento experimental 2^3 (Tabela 4.3) e o monitoramento do tratamento foi realizado com base na atividade *in situ* e no sobrenadante da enzima G6PD (marcador) e das enzimas XR e XD.

Tabela 4.3 - Matriz de planejamento experimental 2^3, utilizada para investigar o efeito da concentração de Triton X-100 (X_1), da agitação (X_2) e do tempo de contato (X_3) sobre a atividade *in situ* das enzimas G6PD, XR e XD

Ensaios	Variáveis codificadas			Variáveis reais		
	X_1	X_2	X_3	Triton X-100 (mM)	Agitação (rpm)	Tempo de contato (min)
1	-1	-1	-1	0,46	0	10
2	+1	-1	-1	2,78	0	10
3	-1	+1	-1	0,46	200	10
4	+1	+1	-1	2,78	200	10
5	-1	-1	+1	0,46	0	50
6	+1	-1	+1	2,78	0	50
7	-1	+1	+1	0,46	200	50
8	+1	+1	+1	2,78	200	50
9	-1	-1	0	0,46	0	30
10	+1	-1	0	2,78	0	30
11	-1	+1	0	0,46	200	30
12	+1	+1	0	2,78	200	30

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa STATISTICA versão 8.0. A significância dos fatores experimentais foi determinada pelo teste *t* de Student. Neste teste, se o valor de $t_{calculado}$ for superior ao $t_{tabelado}$, ou seja, $t_{(1-\alpha,\ \lambda)}$, para um nível de significância de α e λ graus de liberdade, então o termo em causa contribui significativamente para a resposta.

A partir da análise estatística foi observado efeito positivo e significativo da concentração de Triton X-100 e tempo de contato sobre a permeabilidade da membrana de *C. guilliermondii*. Portanto, visando melhorar a permeabilização celular, ou seja, obter uma maior detecção dos níveis *in situ* da enzima G6PD, optou-se novamente por elevar os níveis do tensoativo. Nesta etapa, os ensaios de permeabilização foram realizados variando-se a concentração de Triton X-100 (2,78, 6,18 e 7,73 mM) e o tempo de contato (10, 30 e 50 min). Foram mantidos constantes: concentração celular (2 g/L), agitação (200 rpm), temperatura (30 ºC) e pH (7). Os ensaios foram realizados conforme matriz do planejamento 2^2 com 3 repetições no ponto central (Tabela 4.4) e os resultados de permeabilidade foram monitorados através da atividade *in situ* da enzima marcador G6PD e das enzimas XR e XD.

Tabela 4.4 - Matriz de planejamento experimental 2^2 com 3 repetições no ponto central, utilizada para investigar o efeito da concentração de Triton X-100 (X_1), da agitação (X_2) e do tempo de contato (X_3) sobre a atividade *in situ* das enzimas G6PD, XR e XD

Ensaios	Variáveis codificadas		Variáveis reais	
	X_1	X_2	Triton X-100 (mM)	Tempo de contato (min)
1	-1	-1	2,78	10
2	+1	-1	7,73	10
3	-1	+1	2,78	50
4	+1	+1	7,73	50
5	0	0	6,18	30
6	0	0	6,18	30
7	0	0	6,18	30

Os dados de permeabilização celular de *C. guilliermondii* com Triton X-100 a partir da matriz do planejamento (Tabela 4.4) foram analisados estatisticamente utilizando-se o programa STATISTICA versão 8.0. A significância dos fatores experimentais foi determinada pelo teste *t* de Student. Os resultados revelaram efeito positivo e significativo somente da variável tempo de contato. Também foi constatado que o aumento da concentração do tensoativo de 2,78 para 7,73 mM não favoreceu a permeabilidade da membrana de *C. guilliermondii*. Desta forma, optou-se por não prosseguir com os ensaios de permeabilização com Triton X-100.

A relevância estatística do modelo matemático foi então determinada pela análise de variância (ANOVA), levando-se em conta o coeficiente de determinação (R^2) e teste F de Fisher. O modelo matemático foi então determinado através de análise de regressão aplicada aos resultados experimentais obtido no planejamento fatorial completo.

Uma vez obtidas as condições que promoveram a máxima permeabilidade celular (2,78 mM de Triton X-100, 200 rpm de agitação e 50 min de tempo e contato), dentro da faixa experimental avaliada, foi realizado um ensaio para confirmação do modelo.

4.3.1. Efeito do Triton X-100 sobre as atividades das enzimas G6PD, XR e XD em extrato livre de células (homogenato)

Visando avaliar o efeito do Triton X-100 nas condições de permeabilização previamente otimzadas (Triton X-100 2,78 mM, agitação em 200 rpm, tempo de contato de 50 min e temperatura de 30 ºC) sobre as atividades das enzimas G6PD, XR e XD, ensaios foram

realizados em duplicata com o homogenato sob as mesmas condições descritas para a permeabilização das células. O homogenato foi obtido após o rompimento de 2 g/L de células sob as condições descritas no item 4.2.1. Os ensaios foram realizados em Erlenmeyer de 125 mL, sob temperatura de 30 °C. O Triton X-100 (2,78 mM) foi então solubilizado no homogenato, o qual foi submetido à agitação de 200 rpm por 50 min a 30 ºC. Durante este período, foram analisadas as atividades das enzimas G6PD, XR e XD, adotando-se como controle o homogenato tratado sem adição do tensoativo.

4.3.2. Determinação da viabilidade celular de *C. guilliermondii* permeabilizada com Triton X-100

Foi verificada a capacidade de crescimento das células de *C. guillermondii* previamente permeabilizadas com Triton X-100. Para tal propósito, 2 g/L de células da levedura foram tratadas nas condições que permitiram a sua permeabilização máxima, dentro da faixa experimental avaliada (2,78 mM de CTAB, velocidade de agitação de 200 rpm, tempo de contato de 50 min e temperatura de 30 ºC). As células permeabilizadas foram lavadas em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7 por 2 vezes e posteriormente, foram utilizadas como inóculo em cultivo empregando meio semi-sintético. Foram realizados dois ensaios experimentais conforme descrito no item 4.2.2.

Ainda nesta etapa, as células sem tratamento e permeabilizadas com Triton X-100 foram submetidas à coloração com solução de azul de metileno 0,01% (p/v) contendo citrato de sódio di-hidratado (2%, p/v). Para ambas suspensões celulares, foram empregadas relação células:solução de azul de metileno de 1:1 (v/v) e as mesmas foram fotografadas através de microscopia óptica (aumento de 100 vezes).

4.4. Permeabilização por congelamento-descongelamento

Os ensaios de permeabilização por congelamento-descongelamento foram baseados no procedimento descrito por NG (2001) com algumas adaptações. Nesta etapa, células de *C. guilliermondii* provenientes do cultivo em meio semi-sintético conforme descrito no item 4.1 foram separadas por centrifugação. Após duas lavagens com tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7, as células foram ressuspensas no mesmo tampão de forma a se obter uma suspensão celular de 2 g/L, a qual foi congelada em freezer a -18 ºC por um período de 48 h, seguido do descongelamento em banho-maria a 30 ºC. Foram monitoradas as atividades das enzimas G6PD, XR e XD *in situ* e no sobrenadante após permeabilização.

4.4.1. Determinação da viabilidade celular de *C. guilliermondii* permeabilizada por congelamento-descongelamento

Foi verificada a capacidade de crescimento das células de *C. guillermondii* previamente permeabilizadas pro congelamento-descongelamento. Para tal propósito, 2 g/L de células da levedura permeabilizadas por congelamento (-18ºC/48h) seguido do descongelamento (banho-maria a 30 ºC) foram lavadas em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7 por 2 vezes e posteriormente, foram utilizadas como inóculo em cultivo empregando meio semi-sintético. Foram realizados dois ensaios experimentais conforme descrito no item 4.2.2.

Ainda nesta etapa, as células sem tratamento e permeabilizadas por congelamento-descongelamento foram submetidas à coloração com solução de azul de metileno 0,01% (p/v) contendo citrato de sódio di-hidratado (2%, p/v). Para ambas suspensões celulares, foram empregadas relação células: solução de azul de metileno de 1:1 (v/v) e as mesmas foram fotografadas através de microscopia óptica (aumento de 100 vezes).

4.5. Ensaios de biotransformação de xilose em xilitol empregando células permeabilizadas

Os meios de biotransformação foram preparados em meio reacional constituído por tampão Tris-HCl 0,1M pH 7 adicionado apenas de xilose 30 g/L. Foram utilizadas suspensões celulares (20 g/L) de *C. guilliermondii* permeabilizadas por Triton X-100, CTAB e por congelamento-descongelamento, conforme condições previamente estabelecidas (itens 4.2, 4.3 e 4.4, respectivamente). Os ensaios foram realizados sob condições assépticas, utilizando frasco Erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL do meio reacional, a uma temperatura de 30 ^{o}C, agitação de 200 rpm por um período de 10h. Os ensaios de bioredução com células permeabilizadas foram comparados ao controle, ou seja, células sem tratamento preparadas conforme descrito no item 4.1.

A cinética de catálise enzimática com células sem tratamento e permeabilizadas foi acompanhada através da determinação quantitativa da xilose consumida e do xilitol e/ou sub-produto(s) formado(s) durante o processo. Os resultados foram usados para o cálculo da taxa de conversão e de rendimento em xilitol, parâmetros estes que permitiram avaliar o bioprocesso.

4.6. Métodos analíticos

4.6.1. Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada através de uma curva de calibração que correlaciona absorbância (densidade ótica) com a massa seca de células, utilizando o aparelho espectrofotômetro Beckman DU 640B. Para a elaboração da curva, foram obtidos 50 mL de suspensão celular (conforme descrito no item 4.1). Após centrifugação (2000 x g por 20 min) desta suspensão, o sobrenadante foi descartado, os pellets lavados 2 vezes com água destilada e finalmente ressuspensos também em água destilada de forma a se obter uma suspensão homogênea densa. Através de diversas diluições, foram obtidas suspensões celulares que foram submetidas à leitura de absorbância em espectrofotômetro a 600 nm, utilizando-se água destilada como branco. A massa seca foi determinada a partir da secagem de alíquotas de 5 mL da suspensão densa, em estufa a 105°C por 24 h.

4.6.2. Determinação da concentração de glicose, xilose, xilitol e etanol

As concentrações de xilose, xilitol e etanol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), em equipamento WATERS, nas seguintes condições: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura: 45ºC; eluente: ácido sulfúrico 0,01 N desgaseificado; fluxo: 0,6 mL/min; volume de amostra: 20 µL; detector: índice de refração.

4.6.3. Determinação da atividade enzimática

4.6.3.1. Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD)

O ensaio se baseia na oxidação da glicose-6-fosfato em 6-fosfogliconato catalisada pelo $NADP^+$. O NADPH produzido é medido em modo cinético a 340 nm. Para a determinação da atividade de G6PD foram adicionados a uma cubeta de quartzo de 1 mL com passo ótico de 1 cm, os seguintes reagentes: 500 µL de tampão Tris-HCl (0,071 M pH 7,5), 5 µL de $NADP^+$ (131 mM), 10 µL de glicose-6-fosfato (500 mM), 100 µL cloreto de magnésio hexa-hidratado (35 mM). Os reagentes foram pré-incubados em banho-maria a 30ºC. A reação foi iniciada com a adição de 100 µL de amostra (células permeabilizadas, homogenato ou sobrenadante) e a velocidade de formação de NADPH foi acompanhada em Espectrofotômetro Beckman DU-640B a 340 nm. Uma unidade (U) de G6PD foi definida

como a quantidade da enzima capaz de catalisar a redução de 1 μmol de $NADP^+$/min nas condições do ensaio. A atividade volumétrica foi determinada pela seguinte Equação 4.3:

$$Av = \left(\frac{\Delta a}{\Delta t} \times \frac{1 \times 10^6}{6220} \right) \times 7,15 \times \text{diluição} \qquad (4.3)$$

Em que:

Av = atividade volumétrica (U/L);

$\Delta a/\Delta t$ = velocidade de formação de NADPH por min (340 nm);

6220 = coeficiente de extinção molar ou índice de absorbância ($M^{-1}cm^{-1}$) para NADPH;

7,15 = fator de diluição da cubeta.

4.6.3.2. Xilose redutase (XR)

O ensaio se baseia na redução da xilose em xilitol catalisada pelo NADPH. O NADPH consumido é medido em modo cinético a 340nm. Para a determinação da atividade de XR foram adicionados a uma cubeta de quartzo de 1 mL com passo ótico de 1 cm, os seguintes reagentes: 300 μL de tampão Tris-HCl (0,071 M pH 7,2), 50 μL de NADPH (1,2 mM), 50 μL de β-mercaptoetanol (10 mM), 50 μL de xilose (2 M). Os reagentes foram pré-incubados em banho-maria a 30°C . A reação foi iniciada com a adição de 150 μL de amostra (células permeabilizadas, homogenato ou sobrenadante) e a velocidade de consumo de NADPH foi acompanhada em Espectrofotômetro Beckman DU-640B a 340 nm. Uma unidade (U) de XR foi definida como a quantidade da enzima capaz de catalisar a oxidação de 1 μmol de NADPH/min nas condições do ensaio. A atividade volumétrica foi determinada pela seguinte Equação 4.4:

$$Av = \left(\frac{\Delta a}{\Delta t} \times \frac{1 \times 10^6}{6220} \right) \times 4 \times \text{diluição} \qquad (4.4)$$

Em que:

Av = atividade volumétrica (U/L);

$\Delta a/\Delta t$ = velocidade de formação de $NADP^+$ por min (340 nm);

6220 = coeficiente de extinção molar ou índice de absorbância ($M^{-1}cm^{-1}$) para NADPH;

4 = fator de diluição da cubeta.

4.6.3.3. Xilitol desidrogenase (XD)

O ensaio se baseia na oxidação do xilitol em xilulose catalisada pelo NAD^+. O NADH produzido é medido em modo cinético a 340nm. Para a determinação da atividade de XD foram adicionados a uma cubeta de quartzo de 1 mL com passo ótico de 1 cm, os seguintes reagentes: 350 μL de tampão Tris-HCl (0,071 M pH 8,6), 50 μL de NAD^+ (1,2 mM), 50μL de xilitol (500 mM). Os reagentes foram pré-incubados em banho-maria a 30°C. A reação foi iniciada com a adição de 150 μL de amostra (células permeabilizadas, homogenato ou sobrenadante) e a velocidade de formação de NADH foi acompanhada em Espectrofotômetro Beckman DU-640B a 340 nm. Uma unidade (U) de XD é definida como a quantidade da enzima capaz de catalisar a redução de 1 μmol de NAD^+/min nas condições do ensaio. A atividade volumétrica foi determinada pela seguinte Equação (4.5):

$$\mathrm{Av} = \left(\frac{\Delta \mathrm{a}}{\Delta \mathrm{t}} \times \frac{1 \times 10^6}{6220} \right) \times 4 \times \text{diluição} \qquad (4.5)$$

Em que:

Av = atividade volumétrica (U/L);

$\Delta a/\Delta t$ = velocidade de formação de NADH por min (340 nm);

6220 = coeficiente de extinção molar ou índice de absorbância ($M^{-1}cm^{-1}$) para NADPH;

4 = fator de diluição da cubeta.

A atividade específica em termos de $U/g_{células}$ foi obtida relacionando a atividade volumétrica (U/L) com a concentração de células íntegras antes do tratamento de permeabilização (g/L).

4.7. Metodologia de análise dos resultados

Para a análise dos resultados de cultivo e de biotransformação foram determinados os parâmetros de rendimento e produtividades conforme equações apresentadas a seguir:

4.7.1. Parâmetros de cultivo e biotransformação:

- Consumo de xilose (%)

$$\Delta S_2 = \frac{(S_{2i} - S_{2f})}{S_{2i}} \mathrm{x}100 \qquad (4.6)$$

Em que:

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

- Formação de xilitol (g/L)

$$\Delta P = (P_f - P_i) \qquad (4.7)$$

Em que:

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

- Fator de conversão de substrato em células – $Y_{X/S}$ ($g_{células\ formadas}$ / $g_{substrato\ consumida}$)

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{(X_f - X_i)}{(S_{1i} - S_{1f}) + (S_{2i} - S_{2f})} \qquad (4.8)$$

Em que:

X_i e X_f = concentração inicial e final de células (g/L);
S_{1i} e S_{1f} = concentração inicial e final de glicose (g/L) e
S_{2i} e S_{2f} = concentração inicial e final de xilose (g/L).

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

$$Y_{P/S_2} = \frac{\Delta P}{\Delta S_2} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_{2i} - S_{2f})} \qquad (4.9)$$

Em que:

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

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

$$Q_P = \frac{\Delta P}{t} = \frac{(P_f - P_i)}{t} \qquad (4.10)$$

Em que:

P_i e P_f = concentração inicial e final de xilitol (g/L) e
t = tempo de reação (h).

- Produtividade específica em xilitol no cultivo - r_{Pc} ($g_{xilitol\ formado}$ / $g_{células}$.h)

$$r_P = \frac{\left(\frac{\Delta P}{\Delta X}\right)}{t} = \frac{\left(\frac{P_f - P_i}{X_f - X_i}\right)}{t} \qquad (4.11)$$

Em que:

P_i e P_f = concentração inicial e final de xilitol (g/L); e
X_i e X_f = concentração inicial e final de células (g/L) e
t = tempo de reação (h).

- Rendimento em xilitol no cultivo – R_c (%)

$$R_c\ (\%) = \frac{\text{fator de conversão}_{\text{experimental}}}{\text{fator de conversão}_{\text{teórico}}} = \frac{\left(Y_{P/S_2}\right)_{experimental}}{\left(Y_{P/S_2}\right)_{teórico}} \times 100 \qquad (4.12)$$

Em que:

$Y_{P/Sexperimental}$ = fator de conversão de xilose em xilitol obtido durante ensaio experimental e
$Y_{P/Steórico}$ = fator de conversão de xilose em xilitol de 0,92 (g/g) para ensaios de cultivo (BARBOSA et al., 1988).

- Rendimento em xilitol na biotransformação - R_b (%)

$$\text{rendimento}_{\text{experimental}} = \frac{xilitol_{formado}}{xilose_{convertida}} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \qquad (4.13)$$

$$R_b\ (\%) = \left(\frac{\text{rendimento}_{experimental}}{\text{rendimento}_{teórico}}\right) x100 \qquad (4.14)$$

Em que:

Pi e Pf = número de mols inicial e final de xilitol (mol);
Si e Sf = número de mols inicial e final de xilose (mol) e
Rendimento teórico = 1,01 (g/g), supondo que 1 mol de xilose seja totalmente convertido a 1 mol de xilitol.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O emprego de células animais ou microbianas permeabilizadas em processos biotecnológicos já vem sendo relatado desde meados da década de 60. A permeabilização celular, que pode ser química (ou física), é uma técnica empregada primariamente na recuperação de biomoléculas, incluindo enzimas, proteínas e produtos farmacêuticos. Porém, dependendo das condições de tratamento, a permeabilização é capaz de promover alterações na parede e/ou membrana celular sem, contudo, promover liberação de seus componentes intracelulares. Nestas condições, pode-se então obter um sistema de biotransformação, ou seja, um sistema celular intacto com seus componentes intracelulares (enzimas e cofatores) ativos e capazes de realizarem bioconversões. Pode-se dizer de uma forma geral, que nestas células, o sistema enzimático ativo encontra-se imobilizado em seu ambiente natural. Como permeabilização celular promove uma melhor mobilidade intra/extracelular de substrato(s) e/ou produto(s), estes sistemas são muito empregados para o estudo e monitoramento de enzimas *in situ* e também como catalisadores em diferentes processsos de biotransformação. A levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 há anos se destaca pelos resultados promissores de conversão de xilose em xilitol, sendo considerada pela literatura como uma das melhores leveduras produtoras deste poliol. Além disto, esta levedura é uma fonte potencial da enzima intracelular glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), quando cultivada em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz.

Dentro deste contexto, o presente trabalho propõe um estudo inicial da permeabilização de células de *C. guilliermondii*, visando analisar a atividade *in situ* de algumas importantes enzimas do metabolismo de xilose e também visando à obtenção de um sistema catalítico capaz de converter xilose em xilitol através do processo de biotransformação.

Parte 1A: ESTUDO DA PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *C. guilliermondii* FTI 20037 POR PROCESSO QUÍMICO

5.1. Permeabilização de *C. guilliermondii* com o tensoativo catiônico CTAB

Dentre os diferentes métodos de obtenção de células permeabilizadas, o método químico empregando tensoativo catiônico CTAB (Brometo de cetiltrimetilamônio) há anos se destaca por promover sistemas de células permeabilizadas para estudo *in situ* de enzimas intracelulares ou como biocatalisadores com alta atividade catalítica (ALAMÄE; JÄRVISTE, 1995; GOWDA; BACCHAWAT; BHAT, 1991; JOSHI; GOWDA; BHAT, 1987; SEKHAR; BHAT, N.; BHAT, S., 1999; YU et al., 2007). Desta forma, o CTAB foi selecionado como um dos agentes permeabilizantes para o estudo inicial com *C. guilliermondii*.

5.1.1. Efeito da concentração de CTAB, agitação e tempo de contato sobre a permeabilização de *C. guilliermondii*

Esta etapa teve como objetivo verificar o efeito da concentração de CTAB, agitação e tempo de contato sobre a permeabilidade da membrana celular de *C. guilliermondii*. Para esta finalidade, suspensões celulares (~2 g/L) foram submetidas a uma série de tratamentos que combinaram as variáveis concentração de CTAB (0,14, 0,28 e 0,41 mM), agitação (0, 100 e 200 rpm) e tempo de contato (10, 30 e 50 min). Todos os ensaios foram realizados em pH 7 a temperatura de 30 ºC. Estes tratamentos foram conduzidos de acordo com a metodologia do planejamento experimental e o monitoramento da permeabilidade celular foi feito através da dosagem da atividade (*in situ* e no sobrenadante) da enzima citoplasmática glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), que foi selecionada como marcador do tratamento. As enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD) também foram dosadas e os resultados estão apresentados na Tabela 5.1 e Figura 5.1 A e B. Observa-se que as atividades *in situ* das enzimas G6PD, XR e XD não foram detectadas na suspensão de células do controle (não permeabilizadas). Observa-se ainda que os níveis *in situ* das enzimas G6PD e XD variaram com as condições de tratamento empregadas, e que a enzima XR não foi detectada em nenhuma das condições avaliadas.

Tabela 5.1 - Matriz do planejamento experimental 2^3 com 3 pontos centrais com resultados de atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), xilitol desidrogenase (XD) e xilose redutase (XR) a partir de células de *C. guilliermondii* FTI 20037 tratadas com o tensoativo catiônico CTAB

Ensaios	Variáveis reais avaliadas			Resultados de atividade *in situ*					
				G6PD		XD		XR	
	[CTAB] (mM)	Agitação (rpm)	Tempo de contato (min)	Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)	Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)	Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)
Controle	-	-	-	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*
1	0,14	0	10	57,9	27,6	9,2	4,4	nd	nd
2	0,41	0	10	175,7	79,9	29,4	13,4	nd	nd
3	0,14	200	10	150,0	75,0	17,5	8,8	nd	nd
4	0,41	200	10	185,7	88,4	47,0	22,4	nd	nd
5	0,14	0	50	97,9	44,5	31,8	14,5	nd	nd
6	0,41	0	50	244,0	110,9	44,6	20,3	nd	nd
7	0,14	200	50	97,1	42,2	22,3	9,7	nd	nd
8	0,41	200	50	270,5	128,8	34,2	16,3	nd	nd
9	0,28	100	30	183,9	80,0	26,3	11,4	nd	nd
10	0,28	100	30	186,2	88,7	26,8	12,8	nd	nd
11	0,28	100	30	184,2	80,1	25,3	11,0	nd	nd

Controle = células de *C. guilliermondii* sem tratamento (não permeabilizadas); nd = atividade enzimática não detectada.

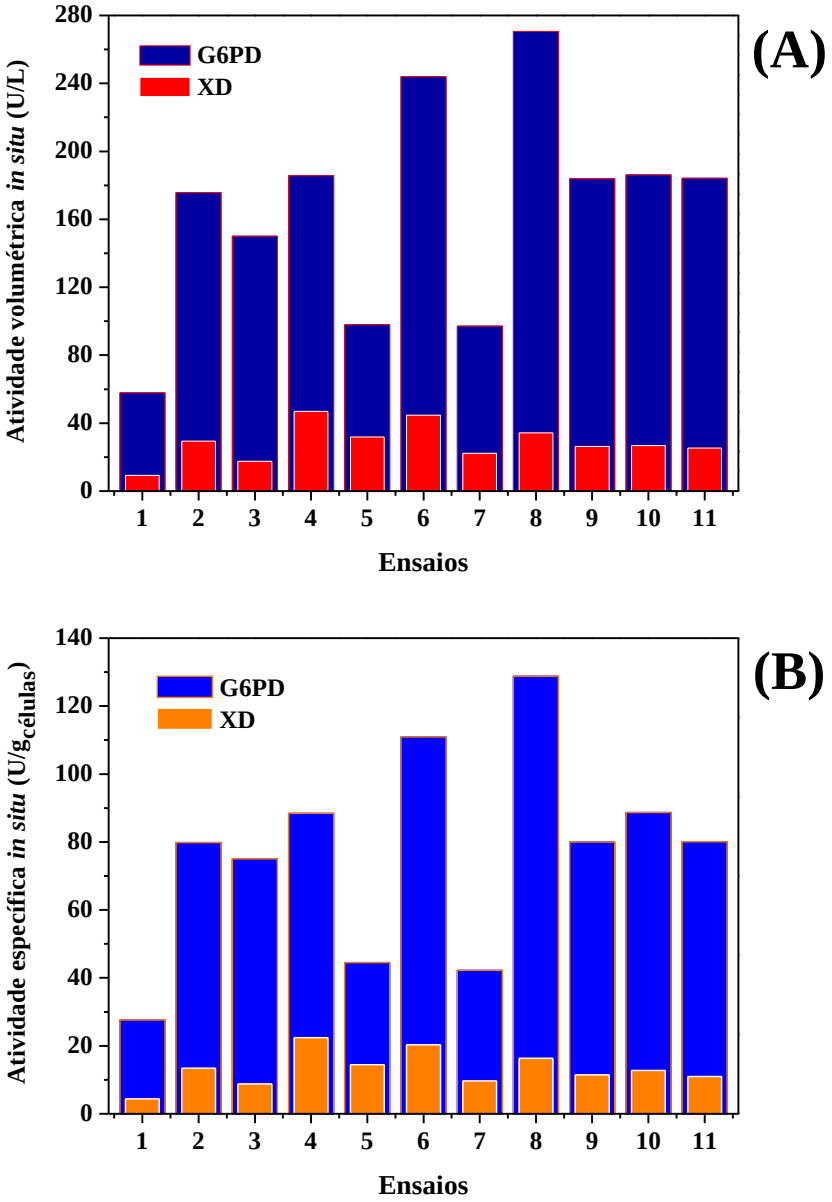


Figura 5.1. Atividade *in situ* das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e xilitol desidrogenase (XD) de *C. guilliermondii*, obtidas após o tratamento de permeabilização com CTAB nas diferentes condições propostas no planejamento experimental: (A) atividade volumétrica e (B) atividade específica

Quando o tratamento foi conduzido com 10 min na ausência de agitação, nota-se que o aumento da concentração de CTAB de 0,14 mM (ensaio 1) para 0,41 mM (ensaio 2) promoveu aumento expressivo (203%) nos níveis *in situ* da enzima G6PD (de 57,9 para 175,7 U/L). Nestas mesmas condições, a atividade da enzima XD também foi significativamente favorecida (220%), elevando de 9,2 para 29,4 U/L, respectivamente. Este mesmo

comportamento foi também observado nos ensaios 5 e 6, os quais foram realizados também em ausência de agitação, mas no maior tempo de contato (50 min).

A elevação da concentração de CTAB do ensaio 5 (0,14 mM) para o ensaio 6 (0,41 mM) promoveu acréscimo no nível *in situ* de G6PD em 149% (de 97,9 U/L para 244,0 U/L) e de XD em 40% (de 31,8 para 44,6 U/L). Estes resultados revelam que a concentração de CTAB apresentou grande influência sobre a permeabilidade da membrana em ensaios estáticos, e que o efeito do tratamento de permeabilização foi dependente do tempo de contato, uma vez que para ambas concentrações de CTAB avaliadas (0,14 e 0,41 mM) os níveis *in situ* de G6PD e XD aumentaram quando o tempo de contato foi elevado de 10 para 50 min (ensaios 1 e 5 e ensaios 2 e 6).

Ainda de acordo com a Figura 5.1 A, ao se observar os ensaios 3 e 4, os quais foram realizados sob agitação (200 rpm) e 10 min de tempo de contato, nota-se que o aumento da concentração de CTAB de 0,14 mM (ensaio 3) para 0,41 mM (ensaio 4) promoveu incremento de apenas 24% nos níveis *in situ* da enzima marcador G6PD (de 150,0 para 185,7 U/L, respectivamente) e de 169% nos níveis *in situ* da enzima XD (de 17,5 para 47,0 U/L, respectivamente). Por outro lado, nos ensaios 7 e 8, os quais foram realizados durante 50 min sob agitação (200 rpm), este mesmo aumento de concentração do tensoativo também favoreceu as atividades *in situ* de ambas enzimas, no entanto, o efeito do tratamento foi mais pronunciado em termos da atividade de G6PD que variou de 97,1 para 270,5 U/L (aumento de 179%), quando comparado à enzima XD, que variou de 22,3 para 34,2 U/L (aumento de 53%). Estes resultados revelam que nos sistemas agitados a 200 rpm o aumento da concentração do tensoativo de 0,14 para 0,41 mM favoreceu a permeabilidade da membrana quando adotados 50 min para atividade *in situ* de G6PD (ensaios 7 e 8) e 10 min de tratamento para atividade *in situ* de XD (ensaios 3 e 4).

Segundo Abraham e Bhat (2008), a concentração do tensoativo e o tempo de contato deste com as células são parâmetros importantes no processo de permeabilização celular. Ainda de acordo com os autores, se o objetivo for obtenção de células permeabilizadas para aplicação em catálise enzimática (reações de biotransformação), as condições de tratamento devem ser selecionadas de forma a não promover a liberação das enzimas intracelulares envolvidas na reação de interesse para o sobrenadante nem a lise celular.

No presente estudo foi constatado que, nas condições experimentais avaliadas, a enzima XR, assim como as enzimas G6PD e XD não foram detectadas no sobrenadante. Esta verificação pode ser um indicativo de que as enzimas permaneceram no interior das células permeabilizadas. Também foi constatado que as atividades *in situ* das três enzimas avaliadas

não foram detectadas quando cofatores e/ou substratos específicos não foram adicionados ao meio reacional de dosagem. Estes resultados sugerem que os cofatores e/ou substratos endógenos podem ter sidos liberados para o meio externo (sobrenadante). Outra hipótese para falta de atividade *in situ* das enzimas na ausência de cofatores e/ou substratos seria a baixa concentração de um ou ambos compostos endógenos no interior das células. Segundo Lehninger (1997), em muitos casos, senão na maioria, a concentração de substratos endógenos é insuficiente para saturar as enzimas.

Ainda com relação aos resultados de permeabilização de *C. guilliermondii* com CTAB (Figura 5.1 A e B) observa-se que as melhores condições de permeabilidade celular, em termos da atividade *in situ* da enzima G6PD, foram obtidas nos ensaios 6 e 8, nos quais as celulas foram tratadas com 0,41 mM de CTAB durante 50 min na ausência ou presença de agitação. Nestes ensaios o valor médio de atividade específica *in situ* da enzima G6PD foi de120 $U/g_{células}$.

Durante estudo de permeabilização de cerca de 20 g/L (peso seco) de células de *S. cerevisiae* com CTAB, Gowda, Bacchawat e Bhat (1991) obtiveram a máxima permeabilidade celular, ou seja, as máximas atividades *in situ* das enzimas G6PD (7,2 $U/g_{células}$), álcool desidrogenase (374,2 $U/g_{células}$) e hexoquinase (5,5 $U/g_{células}$), quando adotada uma relação concentração celular:CTAB de 1:0,1 (g/g). Embora a relação células: tensoativo empregada por Gowda, Bacchawat e Bhat (1991) para permeabilização de *S. cerevisiae,* seja similar a utilizada no presente estudo (1:0,08 g/g) para o tratamento de *C.guilliermondii,* o nível de atividade *in situ* de G6PD obtido foi de aproximadamente 17 vezes superior ao nível desta enzima em *S. cerevisiae*. Estes resultados revelam que as células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com CTAB são fontes potenciais de G6PD e que possivelmente o grau de permeabilização é dependente do microrganismo empregado.

5.1.1.1. Análise estatística dos dados de permeabilização com CTAB a partir da matriz do planejamento experimental 2^3

Para estabelecer as condições de tratamento com CTAB que maximizam a permeabilização de *C.guilliermondii,* é necessário inicialmente identificar as variáveis que exercem maior influência sobre a resposta. Os efeitos estimados das variáveis: concentração do tensoativo, agitação e tempo de contato e suas interações sobre a atividade volumétrica e específica *in situ* da enzima G6PD (marcador do tratamento) foram então analisados estatisticamente. A significância estatística dos principais efeitos e suas interações sobre as

atividades foi determinada pelo teste *t* de Student e os resultados estão apresentados em gráficos de Pareto (Figura 5.2 A e B).

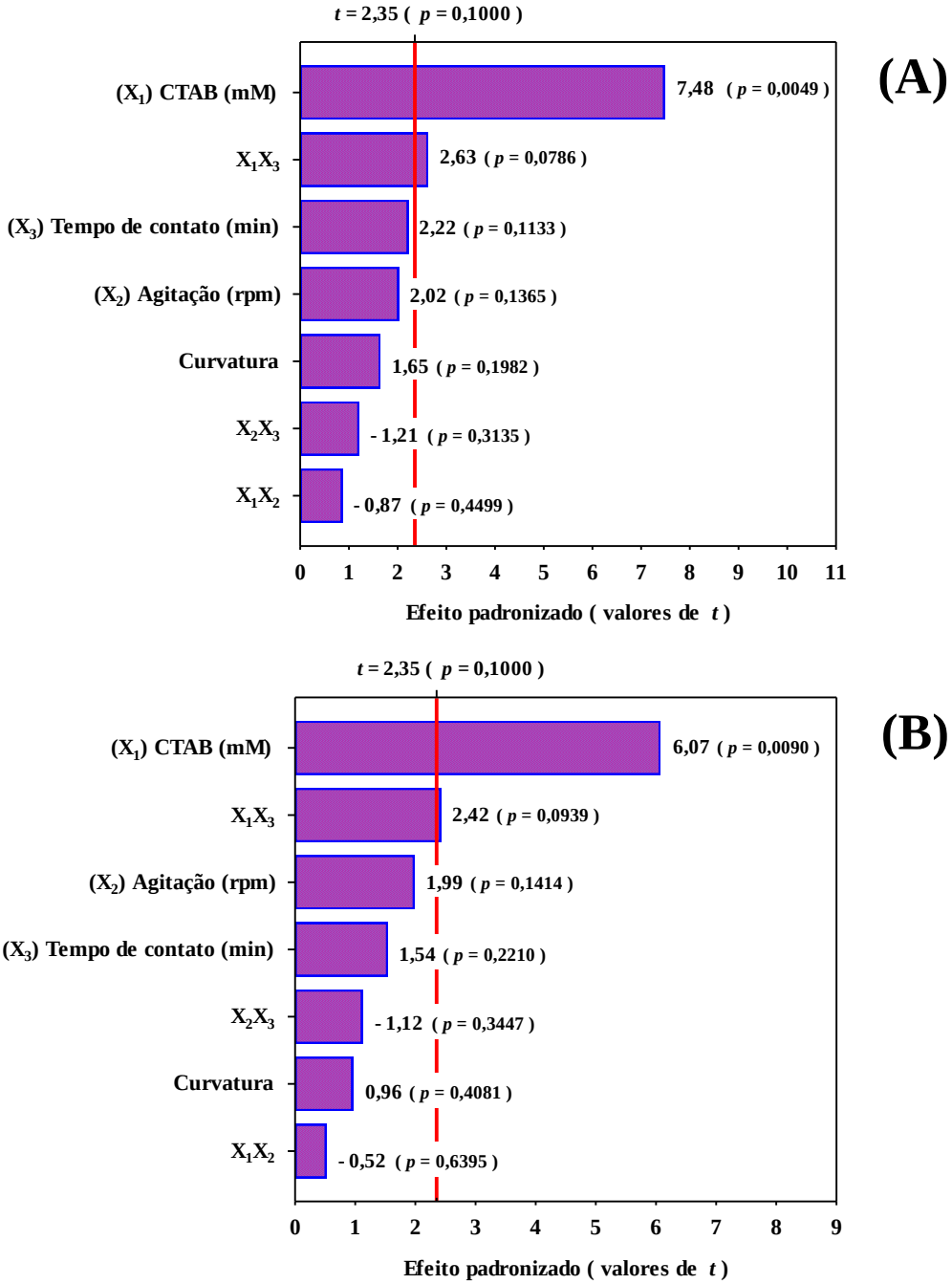


Figura 5.2. Gráficos de Pareto representando o efeito do CTAB sobre a permeabilidade da membrana de *C. guilliermondii*. Atividade *in situ* da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase: (A) volumétrica e (B) específica. O valor referencial de *t* (2,35) foi determinado ao nível de confiança de 90%

O gráfico de Pareto mostra as magnitudes dos efeitos a partir de um conjunto de dados e nos ajuda a ter um entendimento claro dos efeitos relativos dos fatores experimentais, independentemente de sua significância estatística. Neste gráfico a linha vertical serve para avaliar quais efeitos são estatisticamente significativos e as barras estendidas para além desta linha correspondem a destes próprios efeitos, a um nível de confiança avaliado (HAALAND, 1989).

Observa-se na Figura 5.2 A que para atividade volumétrica (Av), o fator concentração de CTAB apresentou o maior valor de t a um nível de significância de 5% (t = 7,48 e p = 0,0049, respectivamente). Nota-se também que a interação entre concentração de tensoativo e tempo de contato também apresentou efeito positivo e significativo ao nível de 90% de confiança (t = 2,63 e p = 0,0786). A agitação do sistema não apresentou efeito significativo (t = 2,02 e p = 0,1365). Estes resultados confirmam os efeitos sugeridos pela análise direta dos dados, os quais sugerem que uma maior atividade volumétrica *in situ* de G6PD, ou, uma maior permeabilidade da membrana celular da levedura pode ser obtida quando adotados CTAB e tempo de contato, ambos, nos maiores níveis (0,41 mM e 50 min) e independente de agitação do sistema a 200 rpm.

Com relação à resposta atividade específica de G6PD (Ae), nota-se na Figura 5.2 B efeito positivo e significativo (ao nível de 95% de confiança) da concentração de CTAB (t = 6,07 e p = 0,0090) e da interação concentração do tensoativo e tempo de contato, ao nível de 10% de significância (t = 2,42 e p = 0,0939). A agitação também não apresentou efeito significativo (t = 0,96 e p = 0,4081). Nota-se também que para ambas as variáveis respostas analisadas a curvatura não apresentou efeito significativo, o que quer dizer que o tratamento de permeabilização da levedura com CTAB, nas condições experimentais avaliadas, pode ser descrito por um modelo linear.

Visando ajustar os dados experimentais à equações polinomiais de primeira ordem, foi realizada uma análise de regressão múltipla para representar a permeabilidade da membrana celular da levedura em termos das atividades volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* da enzima G6PD. Para ambas as respostas avaliadas foram ajustados modelos estatísticos reduzidos contendo os termos significativos identificados a partir da análise dos efeitos estimados (Tabela 5.2 e Tabela 5.3).

Tabela 5.2 - Análise de regressão múltipla para os fatores que representam a atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* da enzima G6PD a partir de células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com CTAB

Resposta	Fatores	Coeficientes	Erros-padrão	$t_{calculado}$	p
	Constante	166,65	+/- 8,83	18,88	< 0,0000*
Av (U/L)	(X_1) CTAB	59,13	+/- 10,35	5,71	0,0007*
	(X_3) Tempo de contato	17,53	+/- 10,35	1,69	0,1343
R^2 = 0,85	X_1X_3	20,75	+/- 10,35	2,00	0,0850**
	Constante	76,92	+/- 4,45	17,30	< 0,0000*
Ae ($U/g_{células}$)	(X_1) CTAB	27,34	+/- 5,21	5,25	0,0012*
	(X_3) Tempo de contato	6,94	+/- 5,21	1,33	0,2249
R^2 = 0,83	X_1X_3	10,91	+/- 5,21	2,09	0,0746**

* sigficativo ao nível de 95 % de confiança - $t_{tabelado}$ (5,7) = 2,37; ** sigficativo ao nível de 90 % de confiança - $t_{tabelado}$ (10,7) = 1,90.

Tabela 5.3 - Análise de variância de regressão para o modelo que representa a atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) in situ da enzima G6PD em células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com CTAB

Resposta	Fonte	SQ	GL	MQ	*F*	*p*
Av (U/L)	Modelo	33867,63	3	11289,21	13,17	0,0029*
	Resíduo	6000,34	7	857,19		
R^2 = 0,85	Total	39867,97	10			
Ae ($U/g_{células}$)	Modelo	7316,40	3	2438,80	11,22	0,0046*
	Resíduo	1521,49	7	217,36		
R^2 = 0,83	Total	8837,90	10			

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; * significativo ao nível de 95% de confiança - $F_{tabelado}$ (5,3,7) = 4,35.

Nota-se na Tabela 5.3 que ambos os modelos ajustados apresentaram coeficientes de determinação satisfatórios (R^2 igual a 0,85 e 0,83), os quais explicam 85 e 83% da variabilidade nas respostas de atividade volumétrica e específica *in situ* de G6PD a partir de células permeabilizadas com CTAB, respectivamente. Com base na análise de regressão para os modelos, foram estabelecidas as equações matemáticas (Equação 5.1 e 5.2).

$$Y_1 = 166{,}6 + 59{,}1X_1 + 17{,}5X_3 + 20{,}7X_1X_3 \qquad (5.1)$$

$$Y_2 = 76{,}9 + 27{,}3X_1 + 6{,}9X_3 + 10{,}9X_1X_3 \qquad (5.2)$$

Em que: Y_1 e Y_2 = representam os valores previstos para atividade volumétrica e específica *in situ* da enzima G6PD, respectivamente; X_1 e X_3 = representam os níveis codificados das variáveis concentração de CTAB e tempo de contato, respectivamente.

O modelo representando a atividade volumétrica *in situ* de G6PD a partir das células permeabilizadas prevê um valor máximo de 264,0 ± 37,9 U/L quando tratada uma suspensão de aproximadamente 2 g/L de células de *C. guilliermondii* com 0,41 mM de CTAB durante 50 min, independente da agitação do sistema em 200 rpm. Nestas mesmas condições, o modelo representativo da atividade específica *in situ* de G6PD prevê um valor máximo de 122,1 ± 19,1 $U/g_{células}$. Baseado nas equações dos modelos foram plotadas curvas de contornos representando iso-respostas para o tratamento de permeabilização da membrana celular, em termos das atividades (volumétrica e específica) *in situ* de G6PD (Figura 5.3 A e B). Os perfis de contorno mostram como as atividades mudam como uma função dos fatores concentração de CTAB e tempo de contato (X_1X_3).

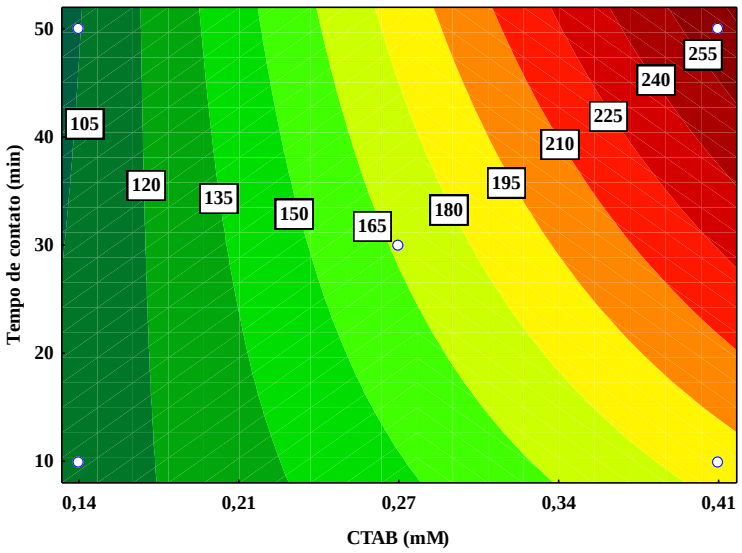


Figura 5.3 A. Curvas de contorno representando iso-respostas para atividade volumétrica *in situ* de G6PD obtidas com tratamento de aproximadamente 2 g/L de células de *C. guilliermondii* com CTAB, independentemente da agitação do sistema em 200 rpm a 30 ºC

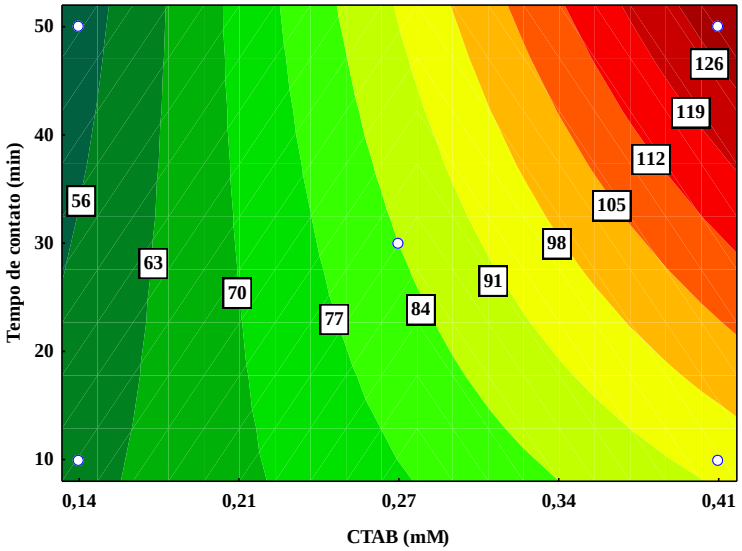


Figura 5.3 B. Curvas de contorno representando iso-respostas para atividade específica *in situ* de G6PD obtidas com tratamento de aproximadamente 2 g/L de células de *C. guilliermondii* com CTAB, independentemente da agitação do sistema em 200 rpm a 30 ºC

5.1.1.2. Validação do modelo que representa a atividade *in situ* da enzima G6PD a partir das células permeabilizadas com CTAB

Visando validar o modelo que representa o tratamento de permeabilização celular de *C. guilliermondii* com CTAB (em termos da atividade *in situ* de G6PD), foram realizados dois ensaios experimentais, nos quais suspensões celulares de aproximadamente 2 g/L foram tratadas com o tensoativo (0,41 mM) durante 50 min sob agitação a 200 rpm e os resultados estão apresentados na Tabela 5.4. O valor médio de atividade *in situ* de G6PD foi de 283,4 ± 60,7 U/L (122,4 ± 15,7 U/$g_{células}$). Estes resultados demonstram que o modelo descreve bem a região em estudos, uma vez que estes valores de atividade se encontram dentro da faixa de variação prevista por este mesmo modelo (264,0 ± 37,9 U/L e 122,1 ± 19,1 U/$g_{células}$). Nestas mesmas condições, a enzima XD foi detectada em níveis correspondentes a 60,3 ± 0,7 U/L (26,2 ± 0,3 U/$g_{células}$); a enzima XR não foi detectada *in situ*.

As suspensões permeabilizadas foram então rompidas mecanicamente com pérolas de vidro e as enzimas avaliadas foram dosadas nos homogenatos resultantes (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Atividades volumétrica (Av) e específica (Ae) das enzimas G6PD, XD e XR, obtidas *in situ* e no homogenato proveniente das células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com CTAB

Atividade Enzimática	G6PD		XR		XD	
	Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)	Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)	Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)
In situ	283,4±60,7	*122,4±15,7*	nd	nd	60,3 ± 0,7	26,2 ± 0,3
Homogenato	282,4±6,2	122,8±2,7	83,3±3,6	*36,2±1,5*	66,3±0,2	*28,8±0,1*

X= 2,3 g/L; homogenato resultante do rompimento da suspensão celular com pérolas de vidro, conforme descrito no item 4.2.1; média de dois ensaios experimentais ± erro padrão; eficiência de rompimento = 70%.

Nota-se que os níveis *in situ* da enzima G6PD foram similares aos níveis da enzima no homogenato (~280 U/L e 120 $U/g_{células}$). Estes resultados revelam inicialmente que as condições de permeabilização não promoveram liberação de G6PD a partir das células tratadas. Gurpilhares et al. (2006) romperam 3 g/L de *C. guilliermondii* com pérolas de vidro (proporção células:pérolas de 1:1) durante 5 ciclos de agitação em vórtice e obtiveram no homogenato resultante 76,3 $U/g_{células}$. Os níveis de G6PD obtidos pelos autores foram 37% inferiores aos obtidos no presente trabalho. Desta forma, estes resultados também mostram que o tratamento das células de *C. guilliermondii* com CTAB não somente promoveu a manutenção de níveis consideráveis da desidrogenase no interior das células permeabilizadas, mas também favoreceu a liberação da enzima durante procedimento de rompimento celular.

Ainda com relação aos resultados apresentados na Tabela 5.4, sugere-se também que a enzima XD (~ 65 U/L e 27 $U/g_{células}$) foi mantida no interior das células permeabilizadas, isto porque os níveis da biomolécula *in situ* e no homogenato foram similares. Verifica-se também que o homogenato apresentou atividade de XR em níveis de aproximadamente 80 U/L e 36 $U/g_{células}$. Gurpilhares et al. (2009) durante cultivo de *C. guilliermondii* em hidrolisado de palha de arroz composto por 33,8 g/L de xilose e pH inicial de 7,6, obtiveram após 48h de cultivo ~36 $U/g_{células}$ de atividade de XR, níveis estes similares aos níveis da enzima obtidos no presente trabalho. Desta forma, sugere-se que assim como as enzimas G6PD e XD, a enzima XR não foi liberada a partir das células permeabilizadas com CTAB. Ressalta-se ainda que os níveis de atividade de XD foram superiores aos níveis da enzima obtidos por Gurpilhares et al. (2009), ou seja, ~27 e 8 $U/g_{células}$, respectivamente.

5.1.2. Efeito do CTAB sobre a atividade das enzimas G6PD, XR e XD

Nos ensaios iniciais de permeabilização de *C. guilliermondii* com CTAB foi verificado que os níveis *in situ* das enzimas G6PD e XD variaram com as condições de tratamento, enquanto que a enzima XR não foi detectada. Também foi constatado que todas as enzimas avaliadas não foram detectadas no sobrenadante. De acordo com a literatura, os agentes tensoativos podem interagir com enzimas causando sua ativação ou desativação (LALITHA; MULIMANI, 1997; SAVELLI; SPRETI; DI PROFIO, 2000). Dentro deste contexto, ensaios foram realizados com homogenato celular para avaliar o efeito do CTAB sobre a atividade catalítica das enzimas G6PD, XR e XD.

Nesta etapa, o homogenato proveniente do rompimento mecânico de uma suspensão de aproximadamente 2 g/L de *C. guilliermondii* foi suplementado com 0,41 mM CTAB. A mistura foi submetida à agitação de 200 rpm por um período de 50 min a 30ºC, condição esta correspondente àquela que promoveu máxima permeabilidade celular da levedura, dentro da faixa experimental avaliada. Os resultados foram comparados a um controle, ou seja, homogenato de células na ausência de CTAB (Tabela 5.5 e Figura 5.4).

As enzimas são moléculas de proteína de configuração complexa que podem ser desestabilizadas por forças relativamente fracas (DORAN, 1998). Além disto, a desativação da enzima depende da estrutura da biomolécula e das condições ambientais e operacionais.

Os resultados apresentados na Tabela 5.5 e Figura 5.4, mostram inicialmente que na ausência de CTAB (A_0) as enzimas G6PD (122,9 ± 1,9 U/L) e XR (67,5 ± 0,0 U/L) se apresentaram estáveis aos 50 min de incubação a 30ºC sob agitação de 200 rpm, com decréscimos inferiores a 5% após 15 e 40 min, respectivamente. Nas mesmas condições, a enzima XD (47,6 ± 0,0 U/L) apresentou um decréscimo de aproximadamente 20% nos primeiros 15 min, atingindo 34,2 ± 0,7 U/L ao final dos 50 min de incubação, o qual corresponde a um decréscimo por volta de 28% com relação ao nível da enzima no início do tratamento.

Tabela 5.5 - Atividades volumétricas das enzimas G6PD, XD e XR, obtidas no homogenato de *C. guilliermondii* submetido à agitação de 200 rpm a 30ºC, durante 50 min na ausência (A_0) e presença de CTAB 0,41 mM (A)

Tempo (min)	G6PD (U/L)		XD (U/L)		XR (U/L)	
	A_0	A	A_0	A	A_0	A
0	*122,9 ± 1,9*	*134,7 ± 0,5*	*47,6 ± 0,0*	*57,3 ± 0,4*	*67,5 ± 0,0*	*59,1 ± 1,2*
15	122,2 ± 0,5	93,7 ± 1,9	38,3 ± 0,1	39,2 ± 0,5	66,5 ± 0,3	50,2 ± 0,2
30	118,4 ± 0,0	61,2 ± 3,6	35,5 ± 0,0	25,4 ± 0,4	66,5 ± 0,0	51,6 ± 0,3
40	118,0 ± 0,0	32,8 ± 0,0	35,5 ± 0,0	18,2 ± 0,4	66,3 ± 0,0	49,0 ± 0,3
50	117,3 ± 0,1	32,2 ± 0,0	34,2 ± 0,7	6,8 ± 0,3	65,1 ± 0,0	46,0 ± 2,2

Média de dois ensaios experimentais ± erro padrão; eficiência de rompimento > 70%.

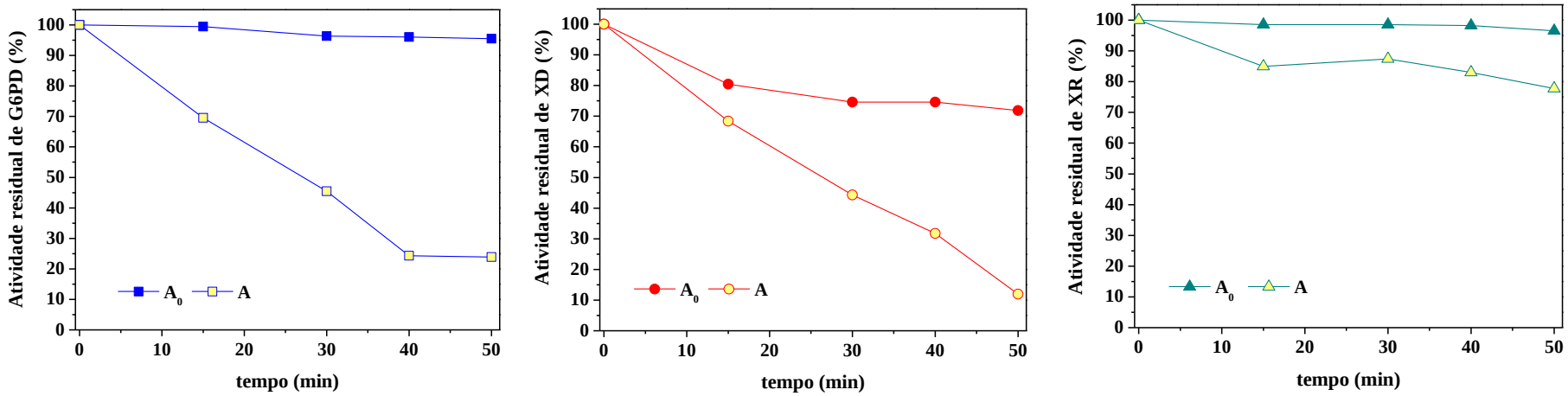


Figura 5.4. Perfis de atividades residuais das enzimas G6PD, XD e XR, obtidas durante incubação do homogenato celular sob agitação de 200 rpm durante 50 min a 30ºC, na ausência (A_0) ou presença (A) de CTAB 0,41 mM

Quando o homogenato foi suplementado com CTAB (A), nota-se que a atividade da enzima G6PD (134,7 ± 0,5 U/L) decresceu linearmente com o tempo e atingiu uma perda de 75% após 40 min de incubação. Após este período a atividade da enzima permaneceu constante em aproximadamente 32 U/L. Com relação a enzima XD, observa-se que na presença do tensoativo, a queda de atividade foi ainda superior a da G6PD (cerca de 90%) após 50 min de incubação. O efeito do CTAB sobre a enzima XR foi menos pronunciado. Nota-se que a XR apresentou um decréscimo de atividade da ordem de 15% após 15 min de incubação (decresceu de 59,1 ± 1,2 para 50,2 ± 0,2 U/L). Após este período a variação nos níveis de XR foi inferior a 10%.

Segundo Savelli, Spreti e Di Profio (2000), os tensoativos podem afetar a atividade enzimática através da competição com o substrato pelo sítio ativo e da alteração do ambiente natural da biomolécula. Ainda de acordo com estes autores, o efeito do tensoativo sobre a estrutura e atividade da enzima é o resultado de uma interação quimicamente seletiva que pode ser influenciada por ambos, a composição química do tensoativo e a estrutura da biomolécula. Desta forma, as diferenças estruturais entre as desidrogenases (G6PD e XD) e a redutase (XR) podem justificar o efeito diferenciado do CTAB sobre as enzimas.

De uma forma geral, os resultados obtidos revelam que o CTAB nas condições avaliadas afetou negativamente a atividade das enzimas G6PD e XD. Foi também constatado que o efeito do tensoativo sobre a enzima XR foi menos pronunciado. Estes resultados sugerem, à princípio, que nos ensaios de permeabilização celular a ausência de atividade de G6PD e XD no sobrenadante poderia estar relacionada à desnaturação das enzimas causada pelo tratamento das células com CTAB. Por outro lado, se considerarmos que após o tratamento de permeabilização ocorreu formação de poros suficientes para extravasar as enzimas desidrogenases do interior das células, provavelmente a enzima XR também teria sido liberada, tendo em vista as massas molares destas biomoléculas (~102, 80 e 36 kDa para G6PD, XD e XR, respectivamente). No entanto, se a enzima XR tivesse realmente sido liberada no sobrenadante, provavelmente teria sido detectada, uma vez que a mesma apresentou estabilidade frente ao tratamento com CTAB. Ressalta-se que em estudo anterior (item 5.1.1.2), foi sugerido que as enzimas foram mantidas no interior das células permeabilizadas.

A partir destas constatações, não se descarta a liberação dos cofatores e/ou (co)substratos endógenos durante a permeabilização com CTAB. Além disto, sugere-se que a enzima XR se encontra protegida por alguma organela ou sistema de membranas.

5.1.3. Ensaios de viabilidade das células de *C. guilliermondii* permeabilizadas por CTAB

Esta etapa teve como objetivo avaliar a capacidade de crescimento das células de *C. guilliermondii* previamente permeabilizadas com CTAB. As células do inóculo foram tratadas sob as condições de máxima permeabilização (2 g/L de células, 0,41 mM de CTAB, tempo de 50 min, agitação de 200 rpm, temperatura de 30ºC e pH 7). O cultivo foi realizado em meio semi-sintético contendo xilose e glicose como fontes de carbono e os ensaios foram conduzidos a 30ºC sob agitação a 200 rpm durante 24 h. Os resultados obtidos foram comparados ao controle (células não tratadas) e estão apresentados na Figura 5.5. Os resultados foram tabelados e estão apresentados no Apêndice 2.

Nota-se que o durante o cultivo das células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com CTAB não ocorreu consumo da fonte de carbono e conseqüentemente nenhuma formação de biomassa, o que sugere que o tratamento das células com o tensoativo causou total perda de viabilidade celular. Segundo Hugo[2] (1967 apud UENO, 1992), após adsorção do tensoativo na membrana celular, processos secundários podem ocorrer, e estes contribuem para uma maior ou menor extensão da inibição dos processos metabólicos e reprodutivos da célula e até para uma rápida perda de viabilidade. Uma maneira de verificar se a células se encontram viáveis ou não, é submetê-la à técnica de coloração com azul de metileno. Nesta técnica, as células com alta atividade fisiológica não se coram, ao contrário das células que perdem a capacidade reprodutiva, as quais se tornam azuladas (ANTONINI, 2004).

---

[2] HUGO, W.B. The modo of action of antibacterial agents. **Journal of Applied Bacteriology**, v.30, p. 17-50, 1967.

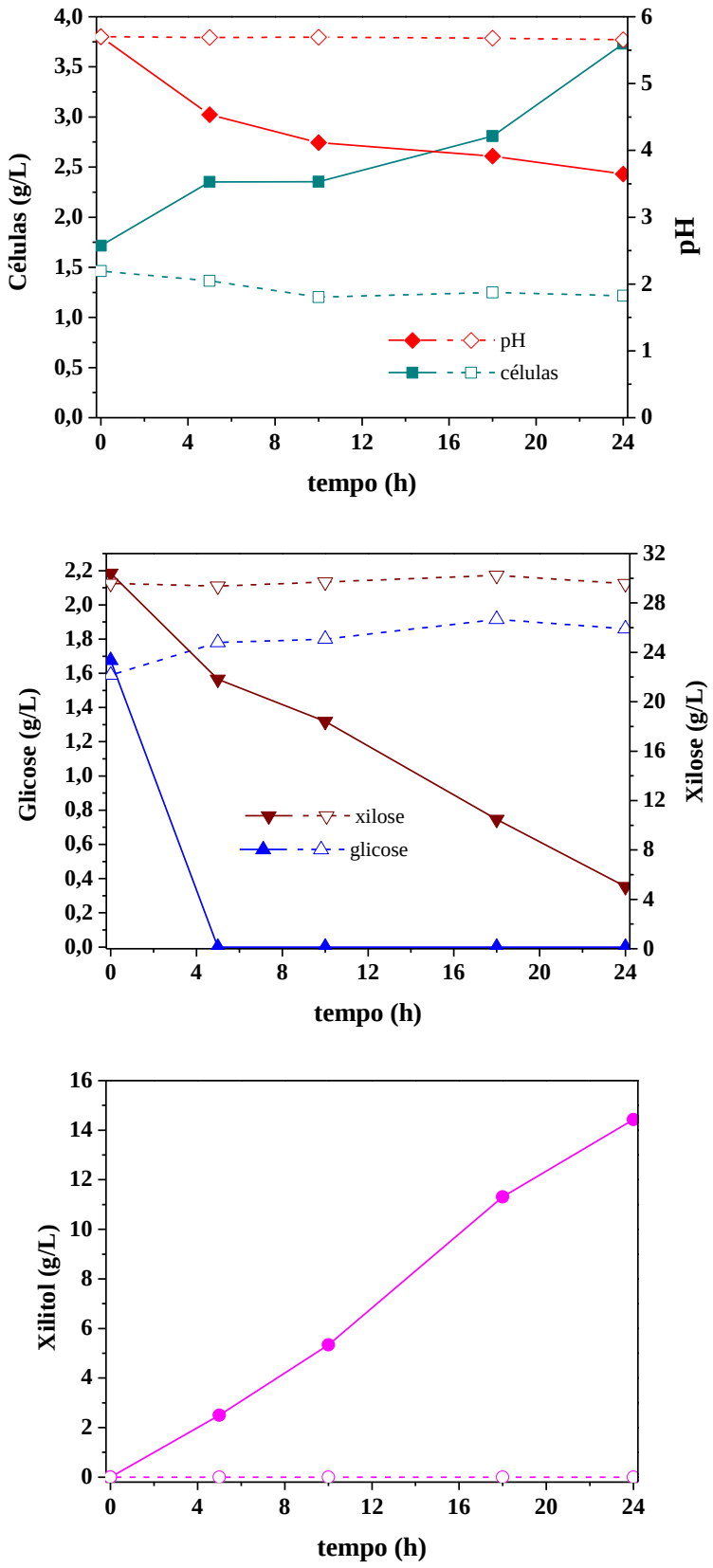


Figura 5.5. Variação da concentração celular de *C. guilliermondii*, de açúcares e de xilitol, obtidos durante as 24 h de cultivo de aproximadamente 2 g/L de células não tratadas (símbolo fechado) e permeabilizadas com CTAB 0,41 mM (símbolo aberto), sob agitação de 200 rpm a 30 ºC durante 50 min

Nesta etapa, amostras de suspensões de *C. guilliermondii*, antes e após tratamento de permeabilização, foram submetidas à coloração com azul de metileno (Figura 5.6 A e B, respectivamente).

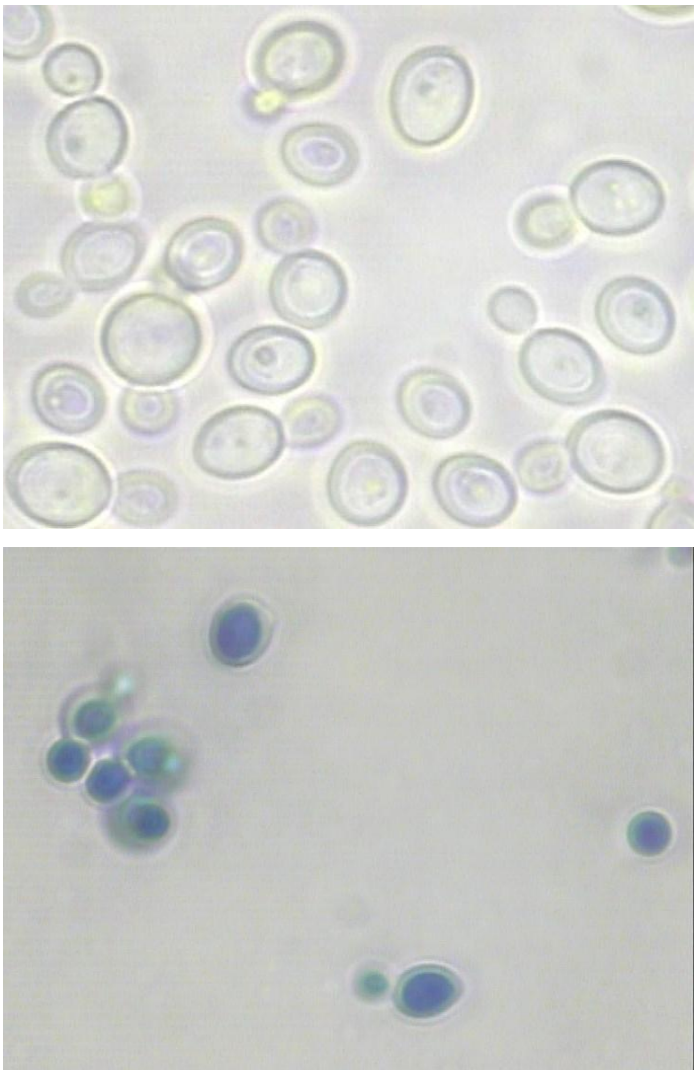


Figura 5.6. Microscopia óptica da suspensão de *C. guilliermondii* coradas com azul de metileno, antes (A) e após (B) tratamento de permeabilização celular com CTAB 0,41 mM durante 50 min sob agitação de 200 rpm. As fotos foram tiradas ao microscópio com aumento de 100 vezes

A Figura 5.6 mostra que as células submetidas ao tratamento de permeabilização foram totalmente coradas pelo azul de metileno, o que comprova a perda de viabilidade das células tratadas com CTAB. Não foi possível verificar mudanças morfológicas, no entanto, foi constatada uma redução no tamanho e no valor de absorbância das células permeabilizadas.

Raicu et al. (1998) verificaram que o tratamento de *S. cerevisiae* com CTAB (0 a 1 mM) durante 30 min a temperatura ambiente não afetou a forma das células, mas promoveu uma redução no volume e na área superficial da membrana. De acordo com os autores, o tratamento da levedura com CTAB 0,5 mM, promoveu uma redução de aproximadamente 30% na área superficial da membrana e no volume celular e sugeriram que este comportamento está relacionado à liberação de material citoplasmático.

5.2. Permeabilização de *C. guilliermondii* com tensoativo não iônico Triton X-100

Os tensoativos não-iônicos por não possuírem carga e também devido à estrutura rígida de sua cauda hidrofóbica são considerados não-desnaturantes e normalmente não induzem alterações conformacionais nas proteínas promovendo perdas das suas propriedades biológicas (ROCHA, 1999). De acordo com Bhairi e Mohan (2007), os tensoativos não-iônicos normalmente atuam melhor na quebra de interações entre lipídeos e entre lipídeos e proteínas, do que entre proteínas. Entre os tensoativos não-iônicos comercialmente disponíveis, destaca-se o Triton X-100 que é amplamente utilizado na extração e purificação de proteínas de membrana e compostos intracelulares (CHAIYARIT; THONGBOONKERD, 2009; KALIPATNAPU; CHATTOPADHYAY, 2005), na estabilização de enzimas (HUIZHOU et al., 1998) e na permebilização de células microbianas para determinação de atividade *in situ* de enzimas intracelulares (CÁNOVAS; TORROGLOSA; IBORRA, 2005; GALABOVA; TULEVA; SPASOVA, 1996; YUAN; HEINZLE, 2009). Este tensoativo também foi selecionado para o estudo inicial do tratamento de permeabilização da membrana celular de *C. guilliermondii*.

5.2.1. Efeito da concentração de Triton X-100, agitação e tempo de contato sobre a permeabilização *C. guilliermondii*.

Para o estudo da permeabilização celular de *C. guilliermondii* com Triton X-100 empregou-se as mesmas variáveis (relação célula:tensoativo; agitação e tempo de contato) utilizadas durante o estudo com CTAB. Numa primeira etapa os níveis destas variáveis foram também os mesmos, ou seja, relação célula:tensoativo (1:0,02, 1:0,05 e 1:0,08, g/g), agitação (0, 100 e 200 rpm) e tempo de contato (10, 30 e 50 min). Foram empregadas suspensões celulares de aproximadamente 2 g/L e, desta forma, as concentrações de Triton X-100 para

manter constante a relação célula:tensoativo foram 0,08, 0,15 e 0,23 mM. Todos os experimentos foram realizados em pH 7 a 30 ºC.

Os ensaios de permeabilização foram conduzidos de acordo com a metodologia do planejamento experimental, de forma a investigar os efeitos da concentração do tensoativo, agitação e tempo de contato sobre a permeabilidade da membrana celular. O monitoramento da permeabilização foi feito através da dosagem (*in situ* e no sobrenadante) da enzima G6PD (glicose-6-fosfato desidrogenase). As enzimas XR (xilose redutase) e XD (xilitol desidrogenase) também foram analisadas. A matriz do planejamento com os níveis reais das variáveis, bem como o resultado de atividade enzimática nas células tratadas com Triton X-100 estão apresentados na Tabela 5.6. Os resultados de permeabilização de *C. guilliermondii* com Triton X-100 mostraram que a enzima G6PD bem como as enzimas XR e XD não foram detectadas *in situ*. Além disto, estas enzimas não apresentaram atividade no sobrenadante. Estes resultados sugerem, a princípio, que o tensoativo na faixa de concentração avaliada, não foi adequado para promover a permeabilização da membrana celular de *C. guilliermondii*.

Galabova, Tuleva e Spasova (1996) ao estudarem a permeabilização celular de *Yarrowia lipolytica* com Triton X-100 sobre a atividade da enzima fosfatase (ácida e alcalina) constataram que os níveis *in situ* destas enzimas foi dependente da concentração do tensoativo. Além disto, estes autores verificaram que o Triton X-100 é pouco agressivo e seu efeito sobre a permeabilidade da levedura foi mais pronunciado quando utilizado em nível igual ou superior ao valor da sua concentração micelar crítica ou CMC[3] (~0,23 mM).

Segundo Bhairi e Mohan (2007), em concentração igual ou superior à CMC, pode ocorrer a incorporação das proteínas de membrana às micelas via interações hidrofóbicas, ou seja, ocorre a extração das biomoléculas à partir da estrutura, e portanto, a abertura de poros. Desta forma, sugere-se que nestas condições, o tratamento pode ser mais efetivo na permeabilização do que somente a incorporação dos monômeros do tensoativo à membrana, o qual ocorre quando este está presente em concentrações abaixo da CMC.

[3] A CMC pode ser definida como a mínima concentração de tensoativo para que ocorra o agrupamento de seus monômeros via interação hidrofóbica, formando um agregado molecular chamado micela.

Tabela 5.6 - Matriz do planejamento experimental com resultados de atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), xilitol desidrogenase (XD) e xilose redutase (XR) a partir de células de *C. guilliermondii* FTI 20037 tratadas com o tensoativo não iônico Triton X-100 0,08 a 0,23 mM

Ensaios	Variáveis reais avaliadas			Resultados de atividade *in situ*					
	[Triton X-100] (mM)	Agitação (rpm)	Tempo de contato (min)	G6PD		XD		XR	
				Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)	Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)	Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)
Controle	-	-	-	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*
1	0,08	0	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	0,23	0	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3	0,08	200	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	0,23	200	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd
5	0,08	0	50	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6	0,23	0	50	nd	nd	nd	nd	nd	nd
7	0,08	200	50	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8	0,23	200	50	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9	0,15	100	30	nd	nd	nd	nd	nd	nd
10	0,15	100	30	nd	nd	nd	nd	nd	nd
11	0,15	100	30	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Controle = células de *C. guilliermondii* sem tratamento (não permeabilizadas); nd = atividade enzimática não detectada.

No presente trabalho, o maior nível de Triton X-100 empregado (0,23 mM), correspondeu à CMC deste tensoativo (ensaios 2, 4, 6 e 8) e mesmo nesta concentração, a permeabilização celular não foi efetiva uma vez que nenhuma atividade *in situ* das enzimas avaliadas foi detectada. Provavelmente, a concentração de Triton-X100 empregada no presente estudo está abaixo da necessária para promover alterações na membrana celular capazes de promover sua permeabilização. De fato, a literatura tem reportado bons resultados de permeabilização de leveduras com Triton X-100 empregando concentrações acima da CMC deste tensoativo. Por exemplo, Laouar, Mulligan e Lowe (1992) durante estudo de permeabilização celular de *S. cerevisiae* com Triton X-100 obtiveram níveis *in situ* da enzima álcool desidrogenase (ADH) de 350 $U/g_{células}$ quando suspensões celulares de aproximadamente 40 g/L (peso seco) foram tratadas com 0,2% (3,09 mM) de Triton X-100 durante 30 min a 26 ºC. Vale destacar que a concentração de Triton X-100 adotada pelos autores foi aproximadamente 13 vezes superior à sua CMC (0,015% ou ~0,23 mM).

Visando a continuidade do estudo de permeabilização de *C. guilliermondii* com Triton X-100, optou-se então por elevar a concentração do tensoativo. Para isto, foi mantida a concentração celular em 2 g/L e a concentração do Triton X-100 foi elevada em 2 e 12 vezes o valor da CMC, ou seja, 0,46 e 2,78 mM. Os ensaios foram realizados variando-se o tempo de contato e o nível de agitação. A temperatura foi mantida em 30 ºC e o pH em 7. Os ensaios foram conduzidos segundo um planejamento experimental 2^3 e o monitoramento da permeabilização celular foi baseado na dosagem *in situ* e no sobrenadante da enzima G6PD (marcador) e das enzimas XR e XD.

Os resultados dos diferentes tratamentos de *C. guilliermondii* com níveis mais elevados de Triton X-100 estão apresentados na Tabela 5.7 e Figura 5.7. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 5.7, observa-se que na suspensão de células de *C. guilliermondii* não tratadas (controle), as atividades *in situ* das enzimas G6PD, XR e XD não foram detectadas. Observa-se também que apenas a enzima G6PD foi detectada *in situ* quando as células de *C. guilliermondii* foram submetidas aos diferentes tratamentos com Triton X-100.

Tabela 5.7 - Matriz do planejamento experimental com resultados de atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), xilitol desidrogenase (XD) e xilose redutase (XR) a partir de células de *C. guilliermondii* FTI 20037 tratadas com Triton X-100 0,46 e 2,78 mM

Ensaios	Variáveis reais avaliadas			Resultados de atividade *in situ*					
	[Triton X-100] (mM)	Agitação (rpm)	Tempo de contato (min)	G6PD		XD		XR	
				Av (U/L)	Ae (U/$g_{células}$)	Av (U/L)	Ae (U/$g_{células}$)	Av (U/L)	Ae (U/$g_{células}$)
Controle	-	-	-	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1	0,46	0	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd
2	2,78	0	10	23,6	11,8	nd	nd	nd	nd
3	0,46	200	10	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	2,78	200	10	24,4	11,1	nd	nd	nd	nd
5	0,46	0	50	9,4	4,7	nd	nd	nd	nd
6	2,78	0	50	32,1	16,0	nd	nd	nd	nd
7	0,46	200	50	25,0	12,5	nd	nd	nd	nd
8	2,78	200	50	40,5	21,3	nd	nd	nd	nd
9	0,46	0	30	17,1	9,0	nd	nd	nd	nd
10	2,78	0	30	16,1	8,0	nd	nd	nd	nd
11	0,46	200	30	15,1	8,4	nd	nd	nd	nd
12	2,78	200	30	16,7	8,3	nd	nd	nd	nd

Controle = células de *C. guilliermondii* sem tratamento (não permeabilizadas); nd = atividade enzimática não detectada.

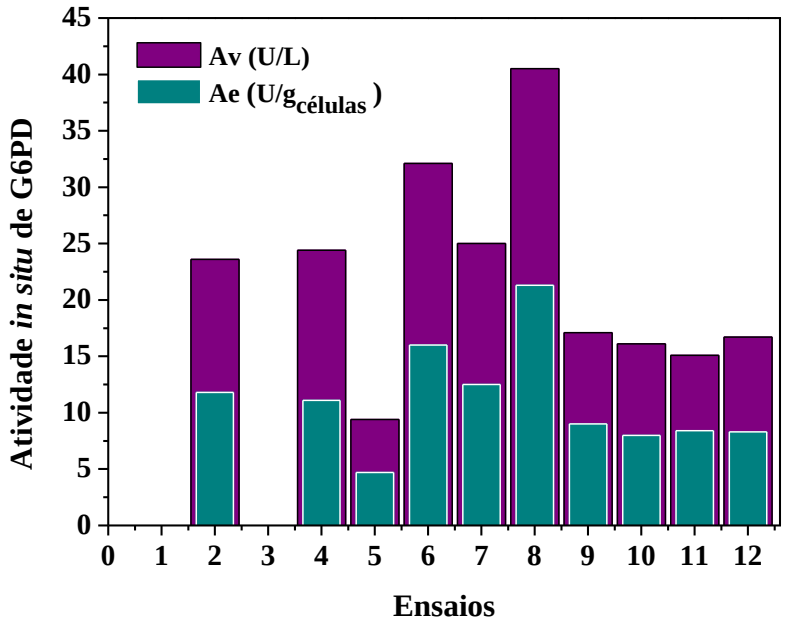


Figura 5.7. Atividade *in situ* da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) de *C. guilliermondii*, obtidas após o tratamento de permeabilização com Triton X-100 nas diferentes condições propostas no planejamento experimental

Observa-se na Tabela 5.7 que o aumento da concentração de Triton X-100 de 0,46 para 2,78 mM foi essencial para promover a permeabilização celular nos ensaios realizados com menor tempo de contato (10 min) sob condição estática (ensaios 1 e 2). Quando o tratamento foi realizado com 0,46 mM de Triton X-100 (ensaio 1), a permeabilização celular não foi suficiente para a dosagem da G6PD. O aumento da concentração do tensoativo para 2,78 mM (ensaio 2), provavelmente causou alteração na membrana celular, permitindo assim a determinação da atividade *in situ* da enzima G6PD (em torno de 24 U/L). Este mesmo comportamento foi observado nos ensaios 3 e 4, os quais foram também realizados no menor tempo de tratamento (10 min), porém, sob agitação de 200 rpm. Estes resultados revelam que a concentração de Triton X-100 influenciou positivamente a permeabilidade da membrana quando o tempo de contato da suspensão com o tensoativo foi de 10 min. Além disto, os resultados revelam que o efeito do tratamento de permeabilização foi independente da agitação do sistema, uma vez que para ambas concentrações avaliadas de Triton X-100 foram obtidos níveis similares de atividade de G6PD em sistemas agitados ou estáticos.

Nos ensaios de permeabilização empregando 50 min de contato (ensaios 5, 6, 7 e 8) verifica-se que sob condições estáticas, o aumento da concentração do Triton X-100 de 0,46 mM (ensaio 5) para 2,78 mM (ensaio 6) promoveu um aumento expressivo na atividade *in situ* de G6PD, ou seja, de 9,4 para 32,1 U/L (acréscimo em torno de 240 %). Por outro lado,

em sistema agitado, o aumento de nível de tensoativo favoreceu a atividade *in situ* da enzima de forma menos pronunciada (acréscimo de 62%) passando de 25,0 U/L (ensaio 7) para 40,5 U/L (ensaio 8). Estes resultados revelam que o aumento da concentração do tensoativo no maior tempo de contato favoreceu em maior grau a permeabilidade da membrana quando empregado o tratamento conduzido na ausência de agitação.

No presente estudo, foi também constatado que nas condições experimentais avaliadas, a enzima G6PD, assim como as enzimas XR e XD não foram detectadas no sobrenadante. Esta verificação juntamente com o fato de que o Triton X-100 não possui caráter desnaturante, sugerem que as enzimas permaneceram no interior das células permeabilizadas.

Conforme apresentado na Figura 5.7, os maiores valores de atividade *in situ* de G6PD (32,1 e 40,5 U/L) foram obtidos após tratamento da suspensão celular de *C. guiliermondii* com 2,78 mM de Triton X-100 durante 50 min de tratamento na ausência (ensaio 6) e presença de agitação a 200 rpm (ensaio 8), respectivamente. Nestas condições, a atividade específica média *in situ* da enzima G6PD correspondeu a 18,6 $U/g_{células}$. Yuan e Heinzle (2009) obtiveram níveis similares de G6PD *in situ* (24,1 ± 2,0 $U/g_{células}$), no entanto, a partir do tratamento de 10 g/L (peso seco) de *Corynebacterium glutamicum* com 0,77 mM de Triton X-100 durante 30 min à temperatura ambiente.

5.2.1.1. Análise estatística dos dados a partir da matriz do planejamento experimental 2^3

Para estabelecer as condições de tratamento com Triton X-100 que maximizam a permeabilização de *C.guilliermondii*, é necessário inicialmente identificar as variáveis que exercem maior influência sobre a resposta. Os efeitos estimados das variáveis: concentração do tensoativo, agitação e tempo de contato e suas interações sobre a atividade volumétrica e específica *in situ* da enzima G6PD (marcador do tratamento) foram então analisados estatisticamente. A significância estatística dos principais efeitos e suas interações sobre as atividades foi determinada pelo teste *t* de Student e os resultados estão apresentados em gráficos de Pareto (Figura 5.8 A e B).

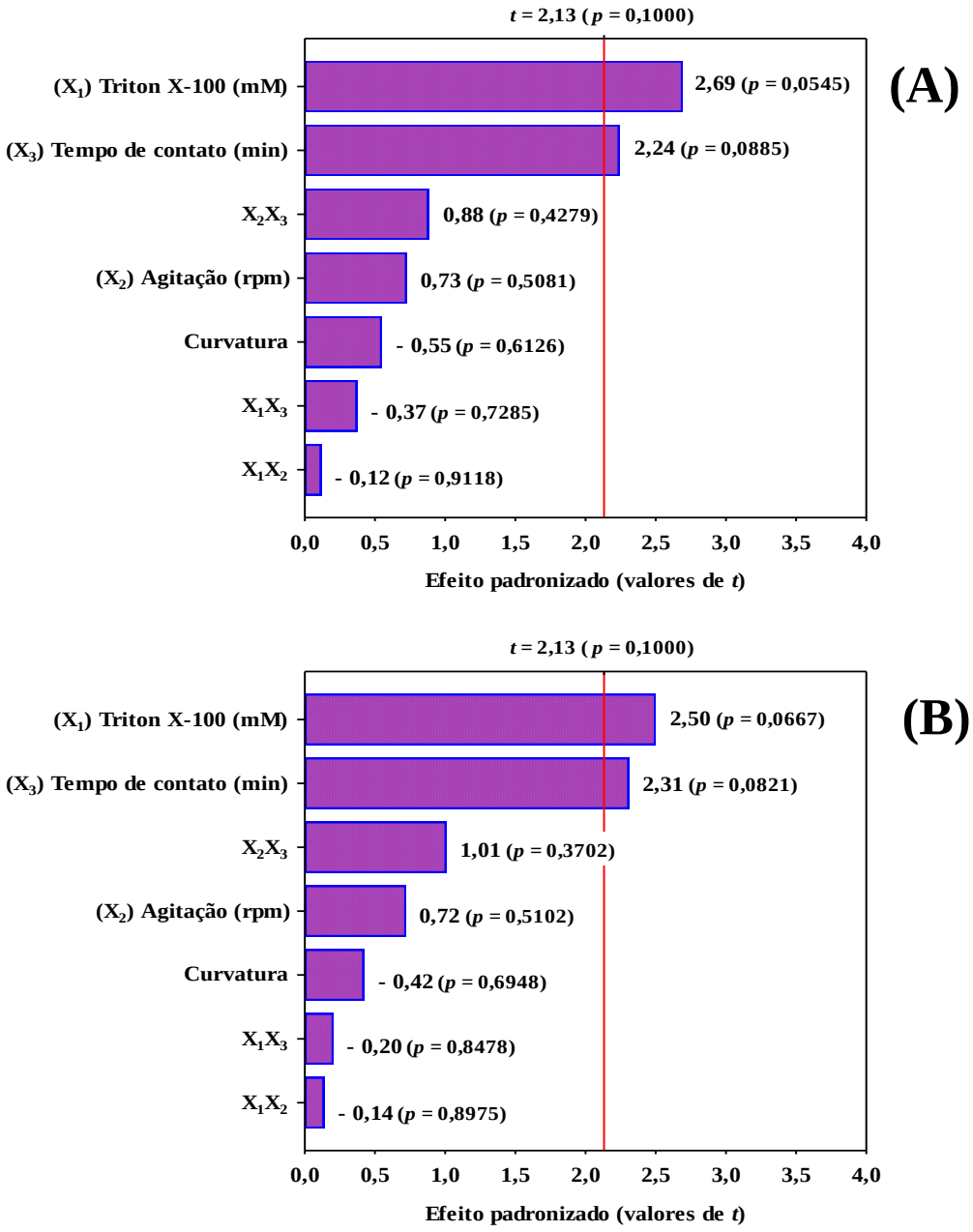


Figura 5.8. Gráficos de Pareto representando o efeito do tratamento de permeabilização da membrana celular de *C. guilliermondii* com Triton X-100 sobre as atividades volumétrica (A) e específica (B) *in situ* da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). O valor referencial de t (2,13) foi determinado ao nível de confiança de 90%

Observa-se na Figura 5.8 A que para atividade volumétrica, o fator concentração de Triton X-100 apresentou o maior valor de *t* a um nível de significância de 10% (t = 2,69 e p = 0,0545, respectivamente). Nota-se também efeito positivo e significativo ao nível de 90% de confiança para o tempo de contato (t = 2,24 e p = 0,0885). Estes resultados confirmam os efeitos sugeridos pela análise direta dos dados, os quais sugerem que uma maior atividade volumétrica *in situ* de G6PD, ou, uma maior permeabilidade da membrana celular da levedura pode ser obtida quando empregados Triton X-100 e tempo de contato, ambos, nos maiores níveis (2,78 mM e 50 min).

Com relação à resposta atividade específica de G6PD, nota-se na Figura 5.8 B efeito positivo e significativo (ao nível de 90% de confiança) da concentração do tensoativo (t = 2,50 e p = 0,0667) e do tempo de contato (t = 2,31 e p = 0,0821). Nota-se também que para ambas as variáveis respostas analisadas a curvatura não apresentou efeito significativo.

Diferentemente do CTAB, o Triton X-100 normalmente não induz alterações conformacionais nas proteínas a ponto de causar a perda nas suas propriedades biológicas, sendo, portanto, o agente de solubilização mais usado para permeabilizar células (ROCHA, 1999). Desta forma, visando melhorar os níveis *in situ* da enzima G6PD a partir de células permeabilizadas de *C. guilliermondii*, optou-se realizar novos ensaios elevando os níveis do tensoativo (2,78, 6,18 e 7,73 mM), sob agitação do sistema em 200 rpm a uma temperatura de 30ºC e pH 7. Para tal finalidade, um novo planejamento experimental foi estabelecido e permeabilidade da membrana foi avaliada através da dosagem *in situ* da enzima G6PD (marcador) e das enzimas XR e XD. A nova matriz do planejamento e os resultados dos obtidos estão apresentados na Tabela 5.8 e Figura 5.9. Observa-se que as enzimas G6PD, XR e XD não foram detectadas *in situ* a partir das células não tratadas e que sob as diferentes condições de tratamento, apenas a enzima G6PD teve sua atividade *in situ* detectada.

Tabela 5.8 - Matriz do planejamento experimental com resultados de atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), xilitol desidrogenase (XD) e xilose redutase (XR) a partir de células de *C. guilliermondii* FTI 20037 tratadas com Triton X-100 2,78 a 7,73 mM, sob agitação de 200 rpm

Ensaios	Variáveis reais avaliadas		Resultados de atividade *in situ*					
	[Triton X-100] (mM)	Tempo de contato (min)	G6PD		XD		XR	
			Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)	Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)	Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)
Controle	-	-	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*
1	2,78	10	24,4	11,1	nd	nd	nd	nd
2	7,73	10	23,7	11,3	nd	nd	nd	nd
3	2,78	50	40,5	21,3	nd	nd	nd	nd
4	7,73	50	45,5	22,7	nd	nd	nd	nd
5	6,18	30	41,6	20,8	nd	nd	nd	nd
6	6,18	30	40,3	21,2	nd	nd	nd	nd
7	6,18	30	39,5	20,8	nd	nd	nd	nd

Controle = células de *C. guilliermondii* sem tratamento (não permeabilizadas); nd = atividade enzimática não detectada.

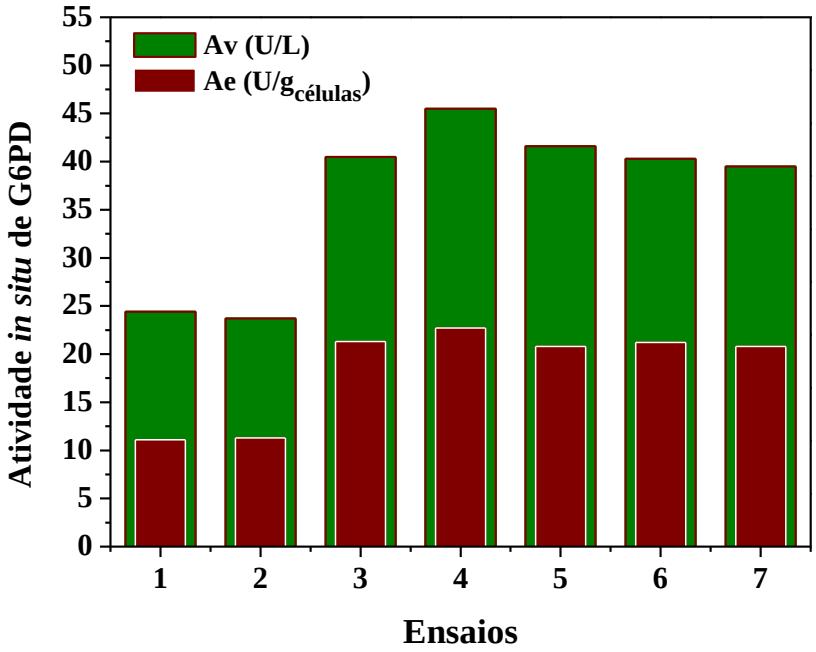


Figura 5.9. Atividade *in situ* da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) de *C. guilliermondii*, obtidas após o tratamento de permeabilização com Triton X-100 nas diferentes condições propostas no planejamento experimental

Observa-se na Figura 5.9 que as atividades de G6PD foram semelhantes nos ensaios 1 e 2, os quais foram realizados no menor tempo de contato (10 min), porém com diferentes concentrações de tensoativo. Estes resultados revelam que o aumento da concentração de Triton X-100 de 2,78 mM (ensaio 1) para 7,73 mM (ensaio 2) não apresentou efeito sobre a permeabilidade da membrana de *C. guilliermondii*, ou seja, não houve favorecimento na atividade *in situ* da enzima G6PD. O mesmo comportamento foi observado nos ensaios 3 e 4, os quais foram realizados em 50 min de tratamento. Estes resultados sugerem que o efeito do tratamento de permeabilização foi mais dependente do tempo de contato do que da concentração de tensotivo, uma vez que para ambas as concentrações de Triton X-100 avaliadas (2,78 e 7,73 mM) os níveis *in situ* de G6PD aumentaram quando o tempo de contato foi elevado de 10 para 50 min (ensaios 1 e 3 e ensaios 2 e 4). As enzimas G6PD, XR e XD não foram detectadas no sobrenandante.

Para que haja permeabilização celular torna-se necessário que a parte hidrofóbica do agente tensoativo ocupe a área hidrofóbica da proteína de membrana. No entanto, para que isso aconteça há todo um processo de competição entre esta associação (tensoativo: proteína) e a formação de micelas. No caso do Triton X-100, a tendência para formação de micelas é mais forte do que sua associação com proteínas (MAKINO; REYNOLDS; TANFORD, 1973). Desta forma, sugere-se que quanto maior concentração de tensoativo no meio, maior é

a formação de micelas, menor a chance de permeabilização da membrana celular. Estas informações vêm a corroborar com os resultados de permeabilização de *C. guilliermondii* por Triton X-100, nos quais o aumento da concentração do tensoativo de 2,78 para 7,73 mM não favoreceu a permeabilidade da membrana celular da levedura. Nota-se, portanto, que a condição de tratamento de *C. guilliermondii* com Triton X-100 que promoveu melhor permeabilidade celular, dentro das condições experimentais avaliadas, foi quando empregado 2,78 mM do tensoativo durante 50 min sob agitação de 200 rpm. Neste tratamento foram obtidos 40,5 U/L ou 21,3 $U/g_{células}$ de atividade *in situ* de G6PD.

5.2.1.2. Análise estatística dos dados de permeabilização com Triton X-100 a partir da matriz do planejamento experimental 2^2

Os dados de permeabilização de *C. guilliermondii* com Triton X-100 a partir da matriz do planejamento experimental 2^2 (Tabela 5.8) foram então analisados estatisticamente. Nesta etapa, os efeitos das variáveis: concentração do tensoativo e tempo de contato e suas interações sobre a atividade volumétrica e específica *in situ* da enzima G6PD foram estimados pelo teste *t* de Student e os resultados estão apresentados na Figura 5.10 A e B.

Observa-se na Figura 5.10 A que para atividade volumétrica (Av), dentre os fatores avaliados, o tempo de contato foi o único a apresentar efeito positivo e significativo a um nível de confiança de 95% (t = 17,88 e p = 0,0031, respectivamente). Este resultado confirma os efeitos sugeridos pela análise direta dos dados, nos quais foi sugerido que o tratamento com Triton X-100, nas condições avaliadas, foi mais dependente do tempo de contato das células com o tensoativo do que a concentração do mesmo no meio. Nota-se também na Figura 5.10 A que a curvatura também apresentou efeito significativo ao nível de 95% de confiança (t = 7,86 e p = 0,0158).

Com relação à resposta atividade específica de G6PD (Ae), nota-se na Figura 5.10 B efeito positivo e significativo (ao nível de 95% de confiança) também do tempo de contato (t = 46,76 e p = 0,0005). Verifica-se também efeito de curvatura (t = 23,06 e p = 0,0019).

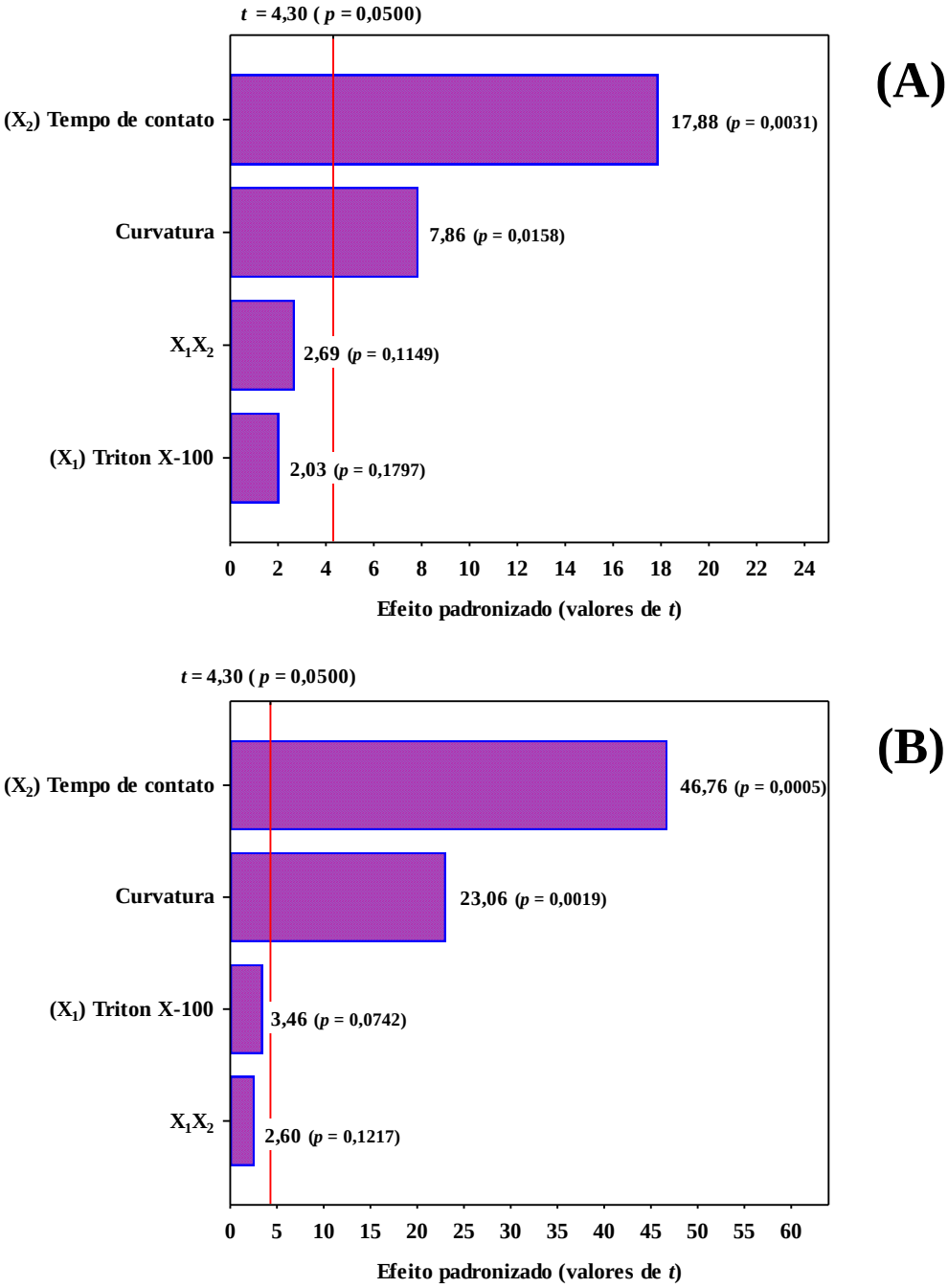


Figura 5.10. Gráficos de Pareto representando o efeito do Triton X-100 sobre a permeabilidade da membrana de *C. guilliermondii*. Atividade *in situ* da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase: (A) volumétrica e (B) específica. O valor referencial de t (4,30) foi determinado ao nível de confiança de 95%

A análise estatística aponta efeito positivo e significativo somente para a variável tempo de contato, sobre a pemeabilidade celular de *C. guilliermondii*. Também foi constatado efeito de curvatura para ambas as respostas avaliadas. O efeito de curvatura significa que o modelo estatístico pode ser representado por termos quadráticos, ou seja, há uma expansão do modelo de linear para quadrático (HAALAND, 1989). No entanto, para a determinação dos efeitos quadráticos, seria necessária a realização de ensaios adicionais modificando os níveis dos fatores. Como foi verificado anteriormente que o aumento da concentração do tensoativo em aproximadamente 3 vezes (2,78 para 7,73 mM) não favoreceu a permeabilidade da membrana, e considerando o fato de que Triton X-100, quando em concentrações muito acima da CMC apresenta forças de interação entre os monômeros muito maior do que entre monômeros e proteínas da membrana, sugere-se que, em meio saturado de micelas, o aumento do tempo de exposição dificilmente aumentará a reatividade do tensoativo com relação às proteínas de membrana. Desta forma, optou-se por não prosseguir com os ensaios de permeabilização com Triton X-100.

Visando ajustar os dados experimentais às equações polinomiais de primeira ordem, foi realizada uma análise de regressão múltipla para representar a permeabilidade da membrana celular da levedura em termos das atividades volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* da enzima G6PD. Para ambas as respostas avaliadas foram ajustados modelos estatísticos reduzidos contendo os termos significativos identificados a partir da análise dos efeitos estimados (Tabela 5.9 e Tabela 5.10).

Tabela 5.9 - Análise de regressão múltipla para os fatores que representam a atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* das enzimas G6PD e XD a partir de células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100

Resposta	Fatores	Coeficientes	Erros-padrão	$t_{calculado}$	p
Av (U/L)	Constante	36,2	+/- 1,72	21,01	< 0,0001*
	(X_1) Triton X-100	2,1	+/- 2,17	0,95	0,3971
R^2 = 0,82	(X_2) Tempo de contato	9,5	+/- 2,23	4,24	0,0132*
Ae ($U/g_{células}$)	Constante	18,3	+/- 1,03	17,66	0,0001*
	(X_1) CTAB	1,0	+/- 1,30	0,79	0,4752
R^2 = 0,81	(X_2) Tempo de contato	5,4	+/- 1,34	4,02	0,0158*

* Significativo ao nível de 95 % de confiança - $t_{tabelado}$ (5,4) = 2,78.

Tabela 5.10 - Análise de variância da regressão para o modelo que representa a atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* da enzima G6PD em células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100

Resposta	Fonte	SQ	GL	MQ	*F*	*p*
	Modelo	377,0	2	188,5	9,46	0,0305*
Av (U/L)	Resíduo	79,7	4	19,9		
	Falte de ajuste	*77,5*	*2*	*38,7*	*34,48*	*0,0282**
	Erro puro	*2,2*	*2*	*1,1*		
R^2 = 0,82	Total	456,7	6			
	Modelo	121,1	2	60,5	8,40	0,0370*
Ae ($U/g_{células}$)	Resíduo	28,8	4	7,2		
	Falte de ajuste	*28,7*	*2*	*14,4*	*269,30*	*0,0037**
	Erro puro	*0,1*	*2*	*0,05*		
R^2 = 0,81	Total	149,9	6			

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática; * significativo ao nível de 95% de confiança - $F_{tabelado}$ (5,2,4) = 6,94.

Nota-se na Tabela 5.10 que ambos os modelos ajustados apresentaram coeficientes de determinação satisfatórios (R^2 igual a 0,82 e 0,81), os quais explicam 82 e 81% da variabilidade nas respostas de atividade volumétrica e específica *in situ* de G6PD a partir de células permeabilizadas com Triton X-100, respectivamente. Com base na análise de regressão para os modelos, foram estabelecidas as equações matemáticas (Equação 5.3 e 5.4).

$$Y_3 = 36{,}2 + 2{,}1X_1 + 9{,}5X_2 \qquad (5.3)$$

$$Y_4 = 18{,}3 + 1{,}0X_1 + 5{,}4X_2 \qquad (5.4)$$

Em que: Y_3 e Y_4 = representam os valores previstos para atividade volumétrica e específica *in situ* da enzima G6PD, respectivamente; X_1 e X_2 e X_3 = representam os níveis codificados das variáveis concentração de Triton X-100 e tempo de contato, respectivamente.

O modelo representando a atividade volumétrica *in situ* de G6PD a partir das células permeabilizadas prevê um valor máximo de 43,6 ± 10,4 e 47,7 ± 9,3 U/L quando tratada uma suspensão de aproximadamente 2 g/L de células de *C. guilliermondii* 2,78 e 7,73 mM de Triton X-100 durante 50 min sob agitação de 200 rpm, respectivamente. Nestas mesmas

condições, o modelo representativo da atividade específica *in situ* de G6PD prevê um valor máximo de 22,7 ± 6,3 e 24,7 ± 5,6 U/$g_{células}$, respectivamente.

Baseado nas equações dos modelos, foram plotados curvas de contornos representando iso-respostas para o tratamento de permeabilização da membrana celular, em termos das atividades (volumétrica e específica) *in situ* de G6PD (Figura 5.11 A e B). Os perfis de contorno mostram como as atividades mudam como uma função dos fatores concentração de Triton X-100 (X_1) e tempo de contato (X_2).

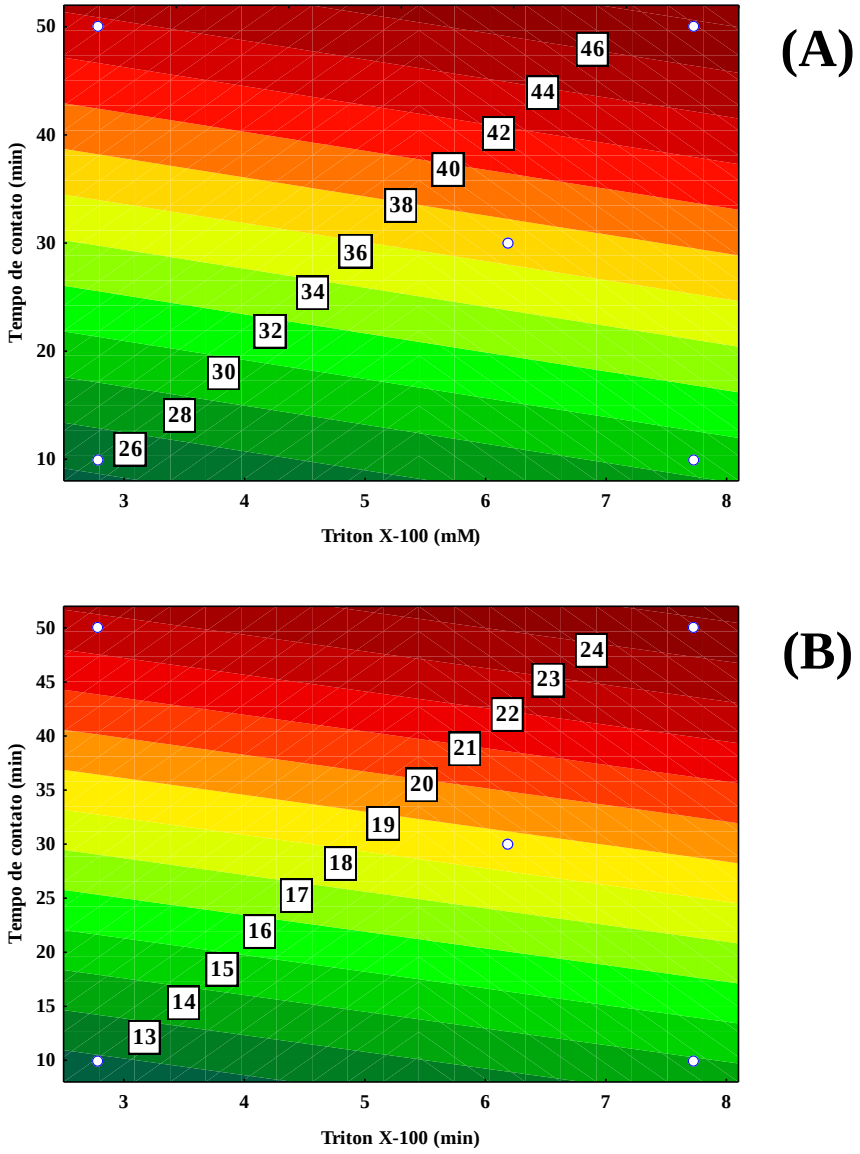


Figura 5.11. Curvas de contorno representando iso-respostas para atividade volumétrica (A) e específica (B) *in situ* de G6PD obtidas com tratamento de aproximadamente 2 g/L de células de *C. guilliermondii* com Triton X-100 sob agitação de 200 rpm a 30 ºC

5.2.1.3. Validação do modelo que representa a atividade *in situ* da enzima G6PD a partir das células permeabilizadas com Triton X-100

Visando validar o modelo matemático proposto para representar o tratamento de permeabilização celular de *C. guilliermondii* com Triton X-100 (em termos da atividade *in situ* G6PD), foram realizados dois ensaios experimentais, nos quais suspensões celulares de aproximadamente 2 g/L foram tratadas com o tensoativo (2,78 mM) durante 50 min sob agitação a 200 rpm e os resultados estão apresentados na Tabela 5.11. Nota-se inicialmente que os valores de atividade *in situ* de G6PD obtidos nos ensaios de validação (44,7 ± 0,0 U/L e 16,9 ± 0,0 $U/g_{células}$), se encontram dentro da faixa de variação prevista para este modelo (43,6 ± 10,4 U/L e 22,7 ± 6,3 $U/g_{células}$), o qual se revela por descrever bem a região em estudo. Nestas mesmas condições, as enzimas XR e XD não foram detectadas *in situ*.

As suspensões permeabilizadas foram então rompidas mecanicamente com pérolas de vidro e as enzimas avaliadas foram dosadas nos homogenatos resultantes (Tabela 5.11).

Tabela 5.11 - Atividades volumétrica (Av) e específica (Ae) das enzimas G6PD, XR e XD, obtidas *in situ* e no homogenato proveniente das células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100

Atividade Enzimática	G6PD		XR		XD	
	Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)	Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)	Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)
In situ	44,7 ± 0,0	16,9 ± 0,0	nd	nd	nd	nd
Homogenato	152,8±2,1	78,3 ± 1,1	194,4±1,5	99,7 ± 0,7	35,2 ± 0,5	18,1 ± 0,2

X = 1,9 g/L; homogenato resultante do rompimento da suspensão celular com pérolas de vidro, conforme descrito no item 4.2.1; média de dois ensaios experimentais ± erro padrão; eficiência de rompimento = 80%.

Nota-se inicialmente que os níveis de atividade de G6PD no homogenato (~153 U/L e 78 $U/g_{células}$) foram aproximadamente 4 vezes maior do que a atividade da enzima detectada *in situ* (~45 U/L e 17 $U/g_{células}$). Estes resultados sugerem inicialmente que o tratamento da suspensão celular com Triton X-100 não promoveu permeabilização adequada de *C. guilliermondii*. Estes níveis de G6PD, em termos da atividade específica, foram similares aos níveis da enzima em homogenato de *C. guilliermondii* sem tratamento (79,7 ± 0,1 $U/g_{células}$). Gupilhares et al. (2006) também obtiveram aproximadamente 70 $U/g_{células}$ de atividade de G6PD a partir de uma suspensão de 3 g/L da mesma levedura.

Ainda de acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.11, nota-se que o homogenato das células tratadas com Triton X-100 apresentou aproximadamente 100 e 18 $U/g_{células}$ de atividade de XR e XD, respectivamente. Quando comparado aos níveis da enzima em homogenato sem tratamento, 33,6 ± 1,5 $U/g_{células}$ para XR e 14,5 ± 0,3 $U/g_{células}$ para XD, evidencia-se que o tratamento da suspensão com o tensoativo não-iônico favoreceu a liberação da enzima XR durante procedimento de rompimento celular em cerca de 3 vezes. O mesmo pode ser observado quando comparado o homogenato destas células de *C. guilliermondii* tratadas com Triton X-100 com o homogenato proveniente do rompimento de *C. moggi* por ultrasson, realizado por Mayerhoff, Roberto e Franco (2006). Estes autores obtiveram ~32 $U/g_{células}$ de atividade de XR a partir de rompimento de uma suspensão celular de 15 g/L.

5.2.2. Efeito do Triton X-100 sobre as enzimas G6PD, XR e XD

Nos ensaios iniciais de permeabilização de *C. guilliermondii* com Triton X-100 foi verificado que os níveis *in situ* das enzimas G6PD variaram com as condições de tratamento, enquanto que as enzimas XD e XR não foram detectadas. Constatou-se ainda que as enzimas avaliadas não apresentaram atividade no sobrenadante e que comparado ao CTAB, o Triton X-100 foi menos eficiente na permeabilização celular. Dentro deste contexto, ensaios foram realizados com homogenato celular para avaliar o efeito do Triton X-100 sobre a atividade catalítica das enzimas G6PD, XR e XD.

Nesta etapa, o homogenato proveniente do rompimento mecânico de uma suspensão de aproximadamente 2 g/L de *C. guilliermondii* (não tratada) foi suplementado com 2,78 mM de Triton X-100. A mistura foi submetida à agitação de 200 rpm por um período de 50 min a 30 ºC, condição esta correspondente àquela que promoveu máxima permeabilidade celular da levedura, dentro da faixa experimental avaliada. Os resultados foram comparados a um controle, ou seja, ao homogenato de células na ausência de Triton X-100 (Tabela 5.12 e Figura 5.12).

Observando os resultados de atividade de G6PD, XD e XR na ausência de Triton X-100 (A_0), nota-se que durante os 50 min de incubação a 30 ºC sob agitação (200 rpm) as enzimas G6PD (126,3 ± 0,1 U/L) e XR (68,4 ± 1,7 U/L) apresentaram decréscimos de aproximadamente 6% após 40 min. Nas mesmas condições, a enzima XD (46,8 ± 1,5 U/L) foi negativamente afetada, apresentando um decréscimo de aproximadamente 20% nos primeiros 15 min, atingindo 29% (31,2 ± 0,4 U/L) após 30 min de incubação.

Tabela 5.12 - Atividades volumétricas das enzimas G6PD, XD e XR, obtidas no homogenato de *C. guilliermondii* submetido à agitação de 200 rpm a 30ºC, durante 50 min na ausência (A0) e presença de Triton X-100 2,78 mM (A)

Tempo (min)	G6PD (U/L)		XD (U/L)		XR (U/L)	
	A_0	A	A_0	A	A_0	A
0	*126,3 ± 0,1*	*124,1 ± 1,1*	*46,8 ± 1,5*	*40,2 ± 0,3*	*68,4 ± 1,7*	*70,5 ± 0,9*
15	121,7 ± 0,5	123,6 ± 4,1	36,0 ± 0,3	39,7 ± 0,2	68,4 ± 0,3	69,5 ± 0,3
30	121,3 ± 0,5	123,1 ± 3,3	33,1 ± 0,4	36,4 ± 0,3	68,3 ± 1,8	69,6 ± 0,1
40	119,1 ± 0,1	120,7 ± 4,5	33,1 ± 0,0	35,9 ± 0,1	64,2 ± 1,8	69,2 ± 0,4
50	119,7 ± 0,2	123,3 ± 0,5	33,1 ± 0,1	35,3 ± 0,1	64,1 ± 2,2	68,2 ± 0,8

Média de dois ensaios experimentais ± erro padrão; eficiência de rompimento >75%.

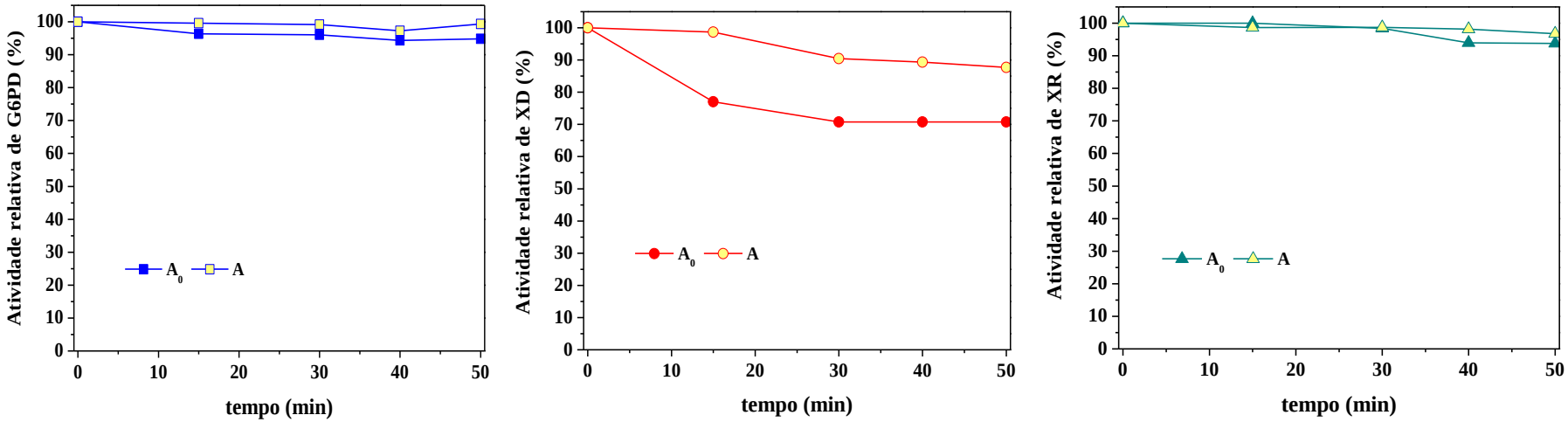


Figura 5.12. Perfis de atividades residuais das enzimas G6PD, XD e XR, obtidas durante exposição do extrato livre de células à incubação sob agitação de 200 rpm durante 50 min a 30ºC, na ausência (A_0) ou presença (A) de Triton X-100 2,78 mM

Ainda de acordo com a Tabela 5.12, observa-se que a presença de Triton X-100 no meio promoveu uma maior estabilidade das biomoléculas durante os 50 min de tratamento sob agitação, principalmente com relação à enzima XD. Yoon e Robyt (2005) também constataram efeito estabilizador do Triton X-100 sobre 10 diferentes enzimas que participam da degradação de amido. Segundo Singh, Van Hamme e Ward (2006), os tensoativos podem complexar diretamente com a enzima de forma a alterar sua estrutura terciária, e portanto, modulando a atividade e/ou especificidade e/ou estabilidade da biomolécula. De acordo com Savelli, Spreti e Di Profio (2000) a estabilização de enzimas constitui um dos principais objetivos no campo da enzimologia micelar.

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que Triton X-100, nas condições experimentais de permeabilização avaliadas, não afeta as atividades das enzimas G6PD e XR. No entanto, vale ressaltar que o tensoativo promoveu uma maior estabilidade da enzima XD, quando comparada às demais enzimas estudadas.

5.2.3. Ensaios de viabilidade das células de *C. guilliermondii* permeabilizadas por Triton X-100 quando cultivadas em meio semi-sintético

Esta etapa teve como objetivo avaliar a capacidade de crescimento das células de *C. guilliermondii* previamente permeabilizadas com Triton X-100. As células do inóculo foram tratadas sob as condições de máxima permeabilização (2 g/L de células permeabilizadas, 2,78 mM de Triton X-100, tempo de 50 min, agitação de 200 rpm, temperatura de 30 ºC e pH 7). O cultivo foi realizado em meio semi-sintético contendo xilose e glicose como fontes de carbono e os ensaios foram conduzidos a 30ºC sob agitação a 200 rpm durante 24 h. Os resultados obtidos foram comparados ao controle (células não tratadas) e estão apresentados na Figura 5.13. Os resultados foram tabelados e estão apresentados no Apêndice 4.

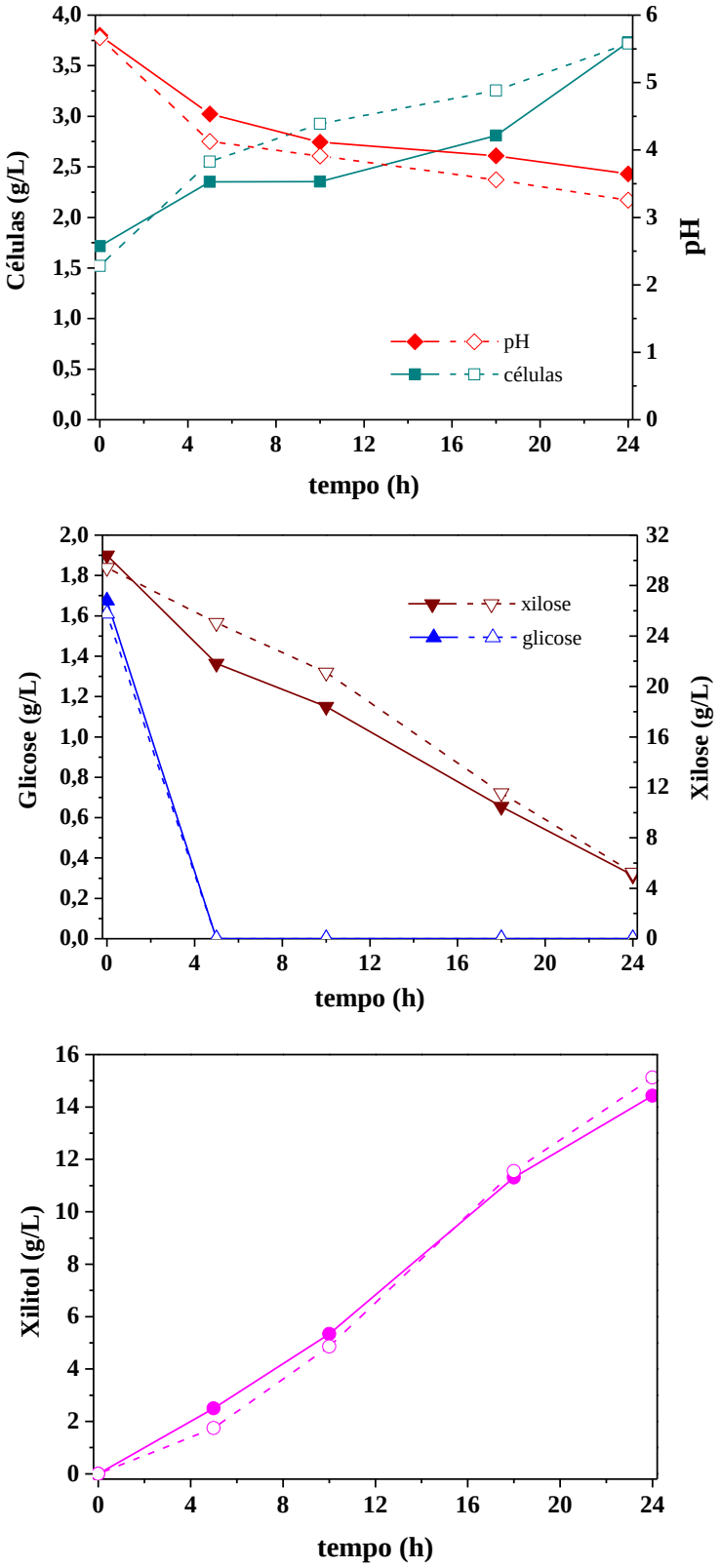


Figura 5.13. Variação da concentração celular de *C. guilliermondii*, de açúcares e de xilitol, obtidos durante as 24 h de cultivo de aproximadamente 2 g/L de células não tratadas (símbolo fechado) e permeabilizadas com Triton X-100 2,78 mM (símbolo aberto), sob agitação de 200 rpm a 30 ºC durante 50 min

Nota-se inicialmente que a suspensão de aproximadamente 2 g/L de células permeabilizadas com Triton X-100 apresentou crescimento celular, o que significa que as condições de tratamento que promoveram a máxima permeabilidade da levedura, dentro da faixa experimental avaliada, não foi suficiente para causar a perda da sua viabilidade celular.
De fato, quando as amostras de suspensões de *C. guilliermondii*, antes e após tratamento de permeabilização foram submetidas à coloração com azul de metileno (Figura 5.14 A e B, respectivamente) verificou-se que ambas as suspensões celulares não foram coradas. Não foi possível verificar mudanças morfológicas e também não foi observada alteração significativa no tamanho das células permeabilizadas.

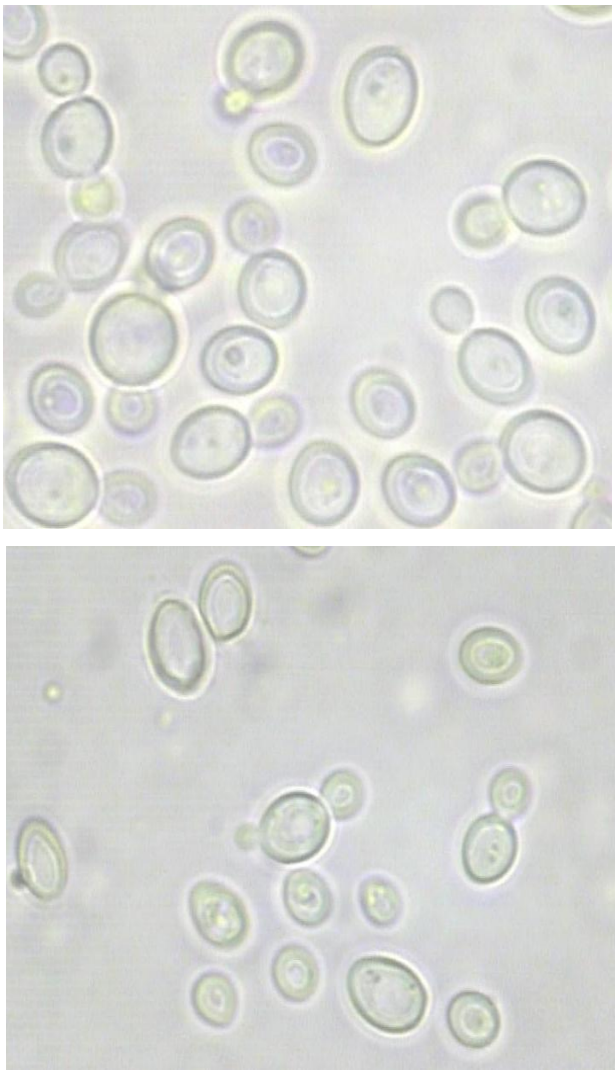


Figura 5.14. Microscopia óptica da suspensão de *C. guilliermondii* coradas com azul de metileno, antes (A) e após (B) tratamento de permeabilização celular com Triton X-100 2,78 mM durante 50 min sob agitação de 200 rpm. As fotos foram tiradas ao microscópio com aumento de 100 vezes

Ainda com relação aos ensaios de viabilidade (Figura 5.13) observou-se que as células tratadas com Triton X-100 apresentaram perfis de crescimento celular, consumo de açúcares e formação de xilitol similares aos obtidos no controle (células não tratadas). Os parâmetros de bioconversão dos ensaios foram determinados e estão apresentados na Tabela 5.13. Segundo Laouar, Lowe e Mulligan (1996), Triton X-100 pode permeabilizar a membrana celular e atuar nos processo de transporte de membrana, no entanto, foi verificado no presente estudo que o tensoativo não afetou a atividade metabólica de *C. guilliermondii*.

Tabela 5.13 - Parâmetros de bioconversão obtidos no cultivo de células de *C. guilliermondii* intactas (controle) e permeabilizadas com Triton X-100 2,78 mM, em meio semi-sintético composto por xilose e glicose como fontes de carbono

Parâmetros	Controle	Células permeabilizadas
	1,7 g/L	1,5 g/L
Tempo de cultivo (h)	24	24
Consumo percentual de xilose	83	82
Consumo percentual de glicose	100	100
Concentração de xilitol (g/L)	14,4 ± 0,4	15,1 ± 0,4
Concentração de etanol (g/L)	-	-
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,08	0,09
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,57	0,63
Q_P (g/L.h)	0,60	0,63
r_P (g/g.h)	0,29	0,29
Rendimento em xilitol (% do teórico)	62	68

$Y_{P/S}$ teórico = 0,92 g/g (Barbosa et al., 1988).

Parte 1B: ESTUDO DA PERMEABILIZAÇÃO DE CÉLULAS DE *C. guilliermondii* FTI 20037 POR PROCESSO FÍSICO

5.3. Permeabilização celular de *C. guilliermondii* por congelamento-descongelamento

O congelamento-descongelamento da suspensão celular constitui uma técnica freqüentemente empregada para recuperação de produtos intracelulares (NG, 2001; SOUZU, 1980), na permeabilização visando a dosagem *in situ* de enzimas intracelulares (BINDU; SOMASHEKAR; JOSEPH, 1988; DOOLAN; WILKINSON, 2009; SEKHAR; BHAT, N.; BHAT, S., 1999) e também como etapa auxiliar ao procedimento de rompimento celular por ultrasson (MAYERHOFF, ROBERTO; FRANCO, 2006).

Segundo Park et al. (1997) o grau de permeabilização e/ou lise é dependente das taxas de congelamento-descongelamento e do tipo de microrganismo empregado. Quando se emprega taxas elevadas de congelamento, ocorre formação de cristais de gelo intracelularmente, levando a danos celulares. Por outro lado, quando as taxas de congelamento são baixas, predomina a formação de gelo extracelular, levando à desidratação intracelular. Portanto, cada célula terá uma resposta própria quanto ao grau de permeabilização quando submetidas ao congelamento rápido ou lento.

No presente trabalho, a técnica de congelamento-descongelamento foi também avaliada com vistas ao estudo da permeabilização de *C. guilliemondii*.

5.3.1. Efeito do congelamento-descongelamento sobre a permeabilização de *C. guilliermondii*

Nesta etapa, uma suspensão celular de aproximadamente 2 g/L foi submetida a congelamento lento em freezer (-18ºC) por um período de 48h, seguido do descongelamento em banho-maria (30 ºC). O monitoramento do tratamento foi feito através da dosagem da atividade (*in situ* e no sobrenadante) da enzima marcador G6PD, e também das enzimas XR e XD (Tabela 5.14). Os resultados foram comparados ao controle (células não tratadas).

Os resultados mostram que o tratamento da suspensão celular por congelamento-descongelamento permitiu a dosagem *in situ* das enzimas G6PD (108,7 ± 3,8 U/L e 50,1 ± 1,0 U/$g_{células}$) e XR (75,9 ± 2,5 U/L e 38,0 ± 1,3 U/$g_{células}$), mas não da enzima XD.

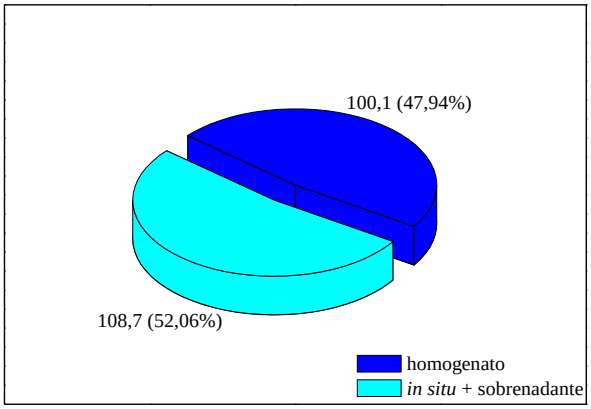
Tabela 5.14 - Resultados de atividade volumétrica (Av) e específica (Ae) *in situ* e no sobrenadante das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), xilitol desidrogenase (XD) e xilose redutase (XR) a partir de células de *C. guilliermondii* FTI 20037 tratadas por congelamento (-18 ºC) durante 48 h, seguido descongelamento em banho-maria (30 ºC)

Ensaios		Resultados de atividade enzimática					
		G6PD		XD		XR	
		Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)	Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)	Av (U/L)	Ae ($U/g_{células}$)
Células sem tratamento (Controle)	*In situ*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*	*nd*
Células tratadas por congelamento/descongelamento	*In situ*	108,7 ± 3,8	54,3 ± 1,9	nd	nd	26,4 ± 0,1	13,2 ± 0,1
	Homogenato	*100,1 ± 1,9*	*50,1 ± 1,0*	*21,2 ± 0,0*	*10,6 ± 0,0*	*75,9 ± 2,5*	*38,0 ± 1,3*
	Sobrenadante	nd	nd	nd	nd	47,1 ± 0,4	23,6 ± 0,2

nd = atividade enzimática não detectada; média de dois ensaios experimentais ± erro padrão; eficiência de rompimento = 80%.

Quando comparados os níveis de G6PD *in situ* das células permeabilizadas por congelamento/descongelamento (tratadas) com os valores de atividade obtidos no homogenato das células não tratadas, verificou-se que os valores foram similares (~100 U/L). Estes resultados sugerem que o tratamento promoveu eficiente permeabilização celular e que a enzima G6PD não foi liberada para o meio extracelular. Foi também observado que cerca de 60% da enzima XR foi liberada para o sobrenadante (~47 U/L) e que a enzima XD não apresentou atividade *in situ* e nem no sobrenadante.

Com relação ao tratamento de permeabilização de *C. guilliermondii* por congelamento-descongelamento, foi também possível determinar o balanço de atividade das enzimas G6PD e XR. Este balanço apresenta uma estimativa dos níveis intracelulares das enzimas a partir dos níveis das biomoléculas detectados *in situ* e no sobrenadante (Figura 5.15). Este tipo de acompanhamento não pode ser realizado nos estudos anteriores de permeabilização com os tensoativos devido à interferência destes agentes químicos sobre as biomoléculas.



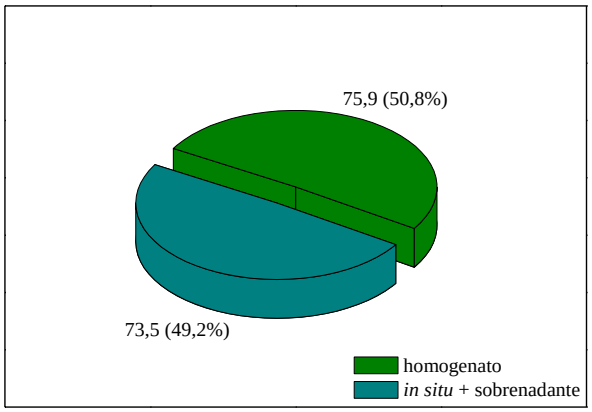


Figura 5.15. Balanço de atividade das enzimas G6PD (A) e XR (B) após tratamento da suspensão de *C. guilliermondii* por congelamento-descongelamento

O nível de atividade específica *in situ* de G6PD obtido a partir das células permeabilizadas por congelamento-descongelamento correspondeu a 54,3 ± 1,9 U/$g_{células}$. Este resultado de atividade de G6PD foi similar ao nível da enzima obtido por Gurpilhares et al. (2006) no homogenato resultante de 3 min de rompimento mecânico de 3 g/L de células de *C. guilliermondii* empregando pérolas de vidro (52,7 U/$g_{células}$). Desta forma, sugere-se que o tratamento da suspensão celular por congelamento-descongelamento, nas condições experimentais avaliadas, constitui método alternativo e promissor de permeabilização celular de *C. guilliermondii*, principalmente quanto aos níveis de G6PD retidos no interior das células tratadas. No entanto, o método deve ser melhor avaliado, principalmente com relação a enzima XR, uma vez que aproximadamente 60% desta enzima foi liberada para o sobrenadante nas condições de tratamento empregadas. Com relação à falta de atividade *in situ* da enzima XD após o congelamento-descongelamento, sugere-se uma possível liberação e desnaturação da biomolécula pelo tratamento.

5.3.2. Ensaios de viabilidade das células de *C. guilliermondii* permeabilizadas por congelamento-descongelamento quando cultivadas em meio semi-sintético

Esta etapa teve como objetivo avaliar a capacidade de crescimento das células de *C. guilliermondii* previamente permeabilizadas por congelamento-descongelamento. O inóculo foi preparado a partir de suspensões celulares de 2 g/L, as quais foram submetidas a congelamento lento em freezer (-18 ºC) por um período de 48h, seguido do descongelamento em banho-maria (30 ºC). O cultivo foi realizado em meio semi-sintético contendo xilose e glicose como fontes de carbono e os ensaios foram conduzidos a 30 ºC sob agitação a 200 rpm durante 24 h.Os resultados obtidos foram comparados ao controle (células não tratadas), nas mesmas condições de cultivo e estão apresentados na Figura 5.16. Os resultados foram tabelados e estão apresentados no Apêndice 5.

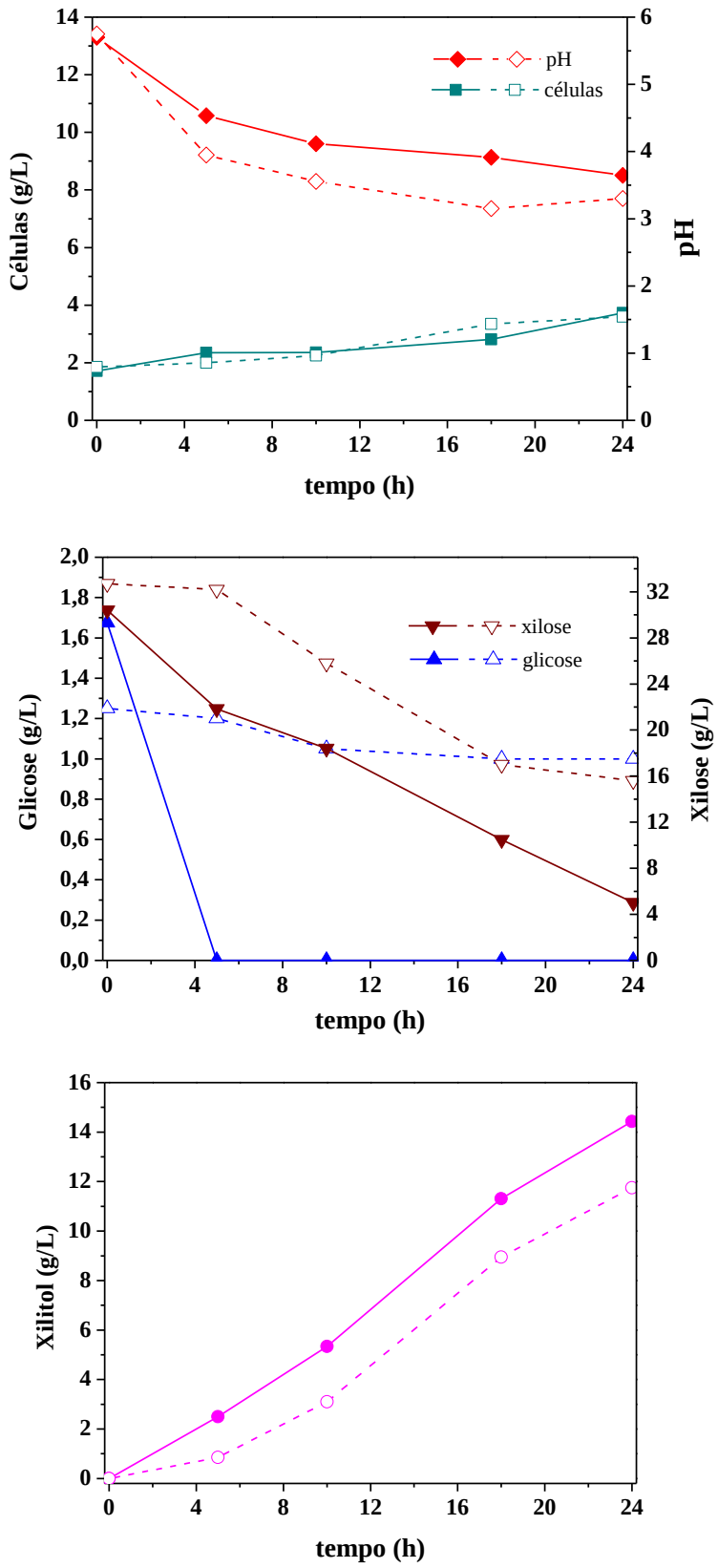


Figura 5.16. Variação da concentração celular de *C. guilliermondii*, de açúcares e de xilitol, obtidos durante as 24 h de cultivo de aproximadamente 2 g/L de células não tratadas (símbolo fechado) e permeabilizadas por congelamento-descongelamento (símbolo aberto), sob agitação de 200 rpm a 30 ºC

Nota-se inicialmente na Figura 5.16 que as células permeabilizadas por congelamento-descongelamento apresentaram formação de biomassa, indicando que o tratamento empregado não foi suficiente para afetar sua viabilidade. Quando as células (antes e após tratamento de permeabilização) foram submetidas à coloração com azul de metileno (Figura 5.17 A e B, respectivamente) verificou-se a coloração azul de algumas células tratadas, indicando perda parcial de viabilidade.

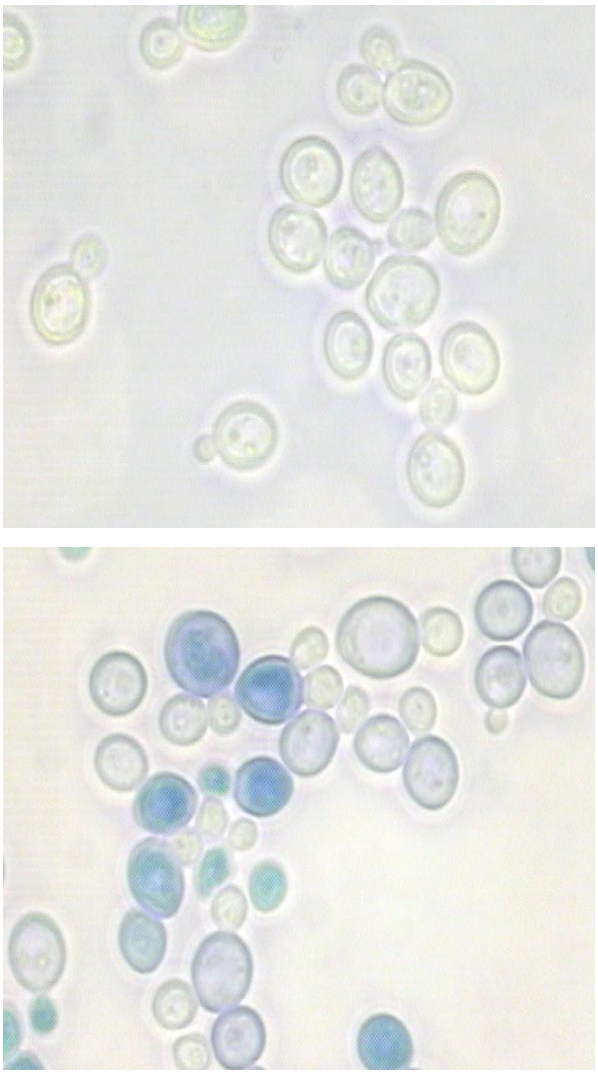


Figura 5.17. Microscopia óptica da suspensão de *C. guilliermondii* coradas com azul de metileno, antes (A) e após (B) tratamento de permeabilização celular por congelamento-descongelamento. As fotos foram tiradas ao microscópio com aumento de 100 vezes

Segundo Dumont, Marechal e Gervais (2004) em processo de congelamento-descongelamento a viabilidade celular está relacionada à taxa de resfriamento da suspensão. De acordo com Park et al. (1997), assim como outras situações de *stress*, as células de levedura podem responder ao *stress* causado pelo congelamento-descongelamento através da síntese de proteínas ou metabólitos, tais como trealose e glicerol, os quais podem agir de forma a estabilizar o meio intracelular e membranas celulares. Segundo os mesmos autores, as células podem se adaptar ao *stress* pelo congelamento, além disto, algumas células podem ser mais resistentes ao tratamento.

Ainda com relação ao ensaio de viabilidade (Figura 5.16 e Tabela 5.15) observa-se que as células permeabilizadas por congelamento-descongelamento apresentaram um perfil de crescimento celular similar ao obtido no controle (células não tratadas). Observa-se ainda que apesar do menor consumo de açúcares e de formação de xilitol a partir das células tratadas, a conversão de xilose em xilitol e a produtividade específica em xilitol (0,68 g/g e 0,56 g/g.h, respectivamente), foram mais elevados quando comparado ao controle (0,57 g/g e 0,29 g/g.h, respectivamente). Ressalta-se, porém que o rendimento em xilitol foi de apenas 48%, quando comparado ao valor teórico.

Tabela 5.15 - Parâmetros de bioconversão obtidos no cultivo de células de *C. guilliermondii* não tratadas (controle) e permeabilizadas por congelamento-descongelamento em meio semi-sintético composto por xilose e glicose como fontes de carbono

Parâmetros	Controle	Células permeabilizadas
	1,7 g/L	1,8 g/L
Tempo de cultivo (h)	24	24
Consumo percentual de xilose	83	52
Consumo percentual de glicose	100	17
Concentração de xilitol (g/L)	14,4 ± 0,4	11,7 ± 0,2
Concentração de etanol (g/L)	-	-
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,08	0,10
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,57	0,68
Q_P (g/L.h)	0,60	0,48
r_P (g/g.h)	0,29	0,56
Rendimento em xilitol (% do teórico)	62	48

$Y_{P/S}$ teórico = 0,92 g/g (Barbosa et al., 1988).

Parte 2: ENSAIOS INICIAIS DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE XILOSE EM XILITOL EMPREGANDO AS CÉLULAS PERMEABILIZADAS DE *C. guilliermondii*

Reações de biotransformação são reações químicas catalisadas por microrganismos: células em crescimento, *resting cells* (íntegras ou permeabilizadas) ou suas enzimas. Em geral, em biotransformações usando células íntegras (não fragmentadas) a(s) enzima(s) envolvida(s) na reação permanece(m) ativa(s) e estável(is) em seu interior. Além disto, as biomoléculas encontram-se em seu ambiente natural. Quando são empregadas células permeabilizadas, os ensaios são divididos em duas partes: o cultivo prévio para ativação e/ou indução das enzimas alvo e o tratamento de permeabilização celular. Nestes sistemas são obtidas células não viáveis (ou parcialmente viáveis) e para garantir rendimentos satisfatórios de conversão, normalmente se empregam suspensões em concentrações que variam de 10 a 140 g/L.

Processos de biotransformação nos quais o(s) substrato(s) específico(s) é/são solubilizado(s) em tampão, ou os chamados *resting process*, apresentam vantagens quanto aos processos fermentativos envolvendo células em crescimento. Em *resting process* são utilizadas condições experimentais que favoreçam a catálise enzimática e estas condições para crescimento celular são mínimas. Desta forma, as células íntegras ou permeabilizadas, as quais são metabolicamente ativas, promovem conversão mais efetiva do(s) substrato(s) no(s) produto(s) de interesse.

No presente trabalho, células de *C. guilliermondii* tratadas com CTAB, Triton X-100 e por congelamento-descongelamento foram avaliadas como potenciais biocatalisadores da conversão de xilose em xilitol. O meio reacional composto por xilose (~30 g/L) em tampão Tris-HCl 0,1M pH 7 foi adicionado de 20 g/L de células. A reação foi conduzida a 30 ºC sob agitação a 200 rpm durante 10 h. Os resultados estão apresentados na Figura 5.18. Os resultados de biotransformação foram tabelados e estão apresentados no Apêndice 6.

Verifica-se na Figura 5.18 que os maiores níveis de xilitol foram obtidos a partir de *resting cells* de *C. guilliermondii* sem tratamento (controle). Nota-se ainda que células permeabilizadas com Triton X-100 apresentaram melhores resultados de produção de xilitol quando comparadas as células permeabilizadas por congelamento-descongelamento, enquanto que células permeabilizadas com CTAB foram incapazes de produzir xilitol nas condições empregadas. Na tabela 5.16 estão apresentados os parâmetros de biotransformação obtidos

durante os ensaios empregando *resting cells* de *C. guilliermondii*. Estes resultados foram comparados aos resultados de conversão de xilose em condições normais de cultivo.

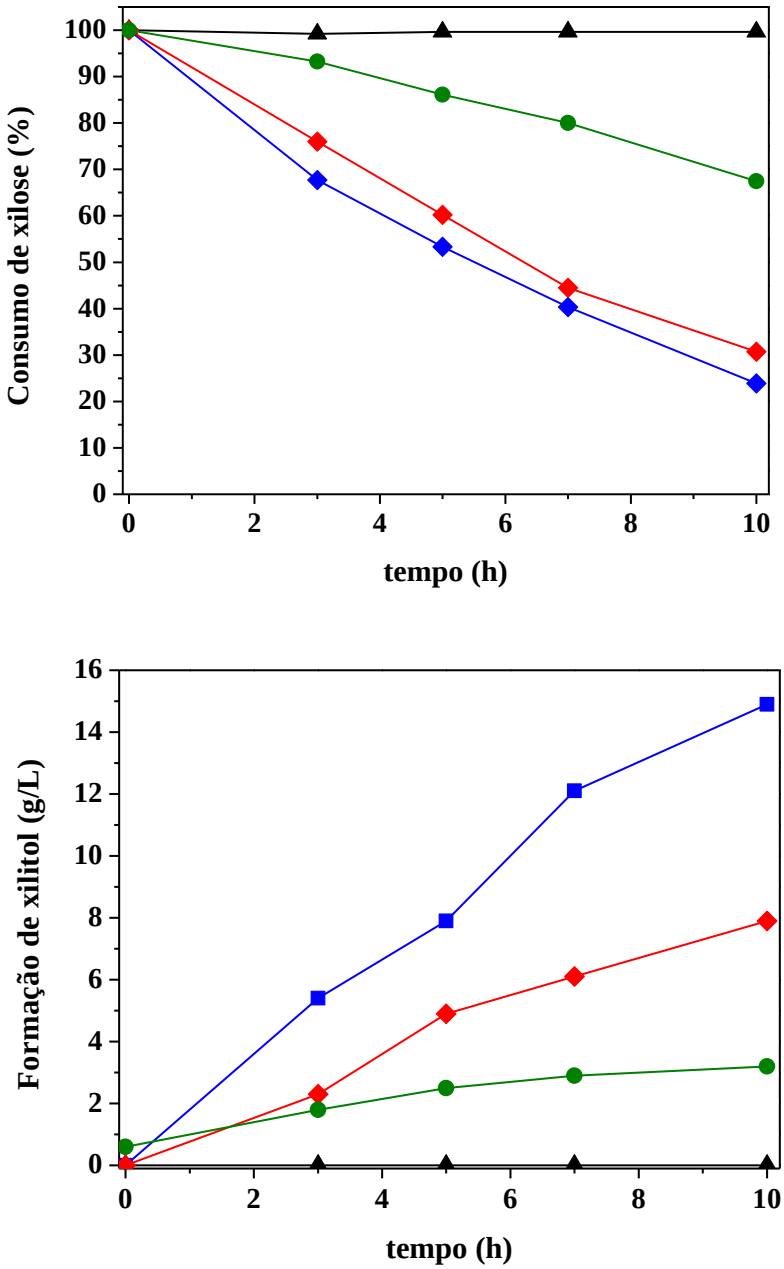


Figura 5.18. Consumo de xilose e formação de xilitol em ensaios de biotransformação empregando *resting cells* de *C. guilliermondii*: células sem tratamento (quadrado) e permeabilizadas com Triton X-100 (losango), CTAB (triângulo) e congelamento-descongelamento (círculo)

Tabela 5.16 - Parâmetros da bioredução de xilose em xilitol obtidos durante as condições normais de cultivo e em ensaios de biotransformação empregando células de *C. guilliermondii*. Ensaios realizados com ~ 30 g/L de xilose em tampão Tris-HCl 0,1M pH 7

	Tratamento da suspensão celular	X_{0h} (g/L)	X_{10h} (g/L)	Xilose consumida (%)	Xilitol formado (g/L)	Produtividade (g/L.h)	Rendimento* (%)	Etanol (g/L)
Condições normais de cultivo (células em crescimento)	Sem tratamento	18,1	14,8	72	10,9	1,09	60	3,7
Biotransformação (*resting process)*	Sem tratamento	20,9	28,5	90	14,9	1,49	57	nd
	Triton X-100	19,4	19,5	69	7,9	0,79	45	3,1
	Congelamento-descongelamento	18,6	18,6	32	2,6	0,26	27	nd
	CTAB	17,7	17,5	0	nd	0	0	nd

X_{0h} eX_{10h} = concentrações celulares nos tempos inicial (0h) e final (10h); nd = não detectado; * Conversão máxima teórica para condições normais de cultivo = 0,92 g/g (BARBOSA et al., 1988); conversão máxima teórica para ensaios de biotrasformação = 1,01 g/g (calculado em base molar, supondo que 1 mol de xilose seja totalmente convertido a 1 mol de xilitol).

Os dados apresentados na Tabela 5.16 revelam que durante a bioconversão de xilose em xilitol a partir das células não tratadas (controle) ocorreu um aumento de massa celular (em torno de 40%). Estes resultados sugerem que o xilitol foi parcialmente catabolizado na via oxidativa das pentoses para formação de biomassa. Este mesmo comportamento não foi observado para os ensaios realizados com a levedura previamente permeabilizada com Triton X-100, CTAB e por congelamento-descongelamento. As células de *C. guilliermondii* sem tratamento de permeabilização converteram xilose em xilitol com rendimento e produtividade de aproximadamente 60% e 1,50 g/L.h, respectivamente. Estes valores decresceram para ~45% e 0,80 g/L.h. quando o bioprocesso foi conduzido com as células permeabilizadas com Triton X-100. Nestas condições, nota-se ainda um desvio de substrato para formação de etanol (~3 g/L) após 5h de reação. Nota-se ainda que a atividade catalítica das células permeabilizadas por congelamento-descongelamento foi ainda inferior do que a observada para as células tratadas com Triton (27% e 0,26 g/L.h) e que nenhuma conversão de xilose em xilitol foi obtida com as células permeabilizadas com CTAB.

Quando comparados os resultados obtidos na biotransformação com os resultados obtidos nas condições normais de cultivo, nota-se inicialmente que as *resting cells* não permeabilizadas apresentaram um consumo mais eficiente (90 e 72%, respectivamente). Observa-se também que ambos ensaios apresentaram valores similares de rendimento em xilitol (~60%), no entanto, no ensaio empregando as *resting cells* não tratadas foi obtido uma produtividade volumétrica em xilitol superior em cerca de 37%, quando comparado ao cultivo. Nota-se ainda que as células do cultivo apresentaram desvio metabólico para formação de etanol, o qual não foi observado nas *resting cells* não tratadas.

Com relação às células permeabilizadas com Triton X-100, nota-se que apesar de apresentarem consumo de xilose similar ao resultado obtido no cultivo (~70%), estas células apresentaram níveis de formação e produtividade em xilitol inferiores aos obtidos no cultivo (queda de 30%). Observa-se também que estas células tratadas com Triton X-100 apresentaram niveis de etanol similares à concentração do álcool obtida no cultivo (~3 g/L). Quando as suspensões foram tratadas por congelamento-descongelamento e CTAB, foi observado que todos os parâmetros de bioconversão foram decrescidos.

De acordo com a literatura, vários são os fatores que influenciam os rendimentos e produtividades dos *resting process*, ou seja, das bioconversões empregando *resting cells* (CÁNOVAS; IBORRA, 2005). Khan, Bhide e Gadre (2009) estudando a produção de manitol a partir de glicerol empregando *resting cells* de *Candida magnoliae* observaram que a conversão foi afetada adversamente pela adição de nutrientes, elevada concentração do

biocatalisador e baixo nível de aeração. Os autores relataram um rendimento em manitol de 50% a partir de 100 g/L de glicerol e 120 g/L de resting cells. A produção de L-xilulose (uma pentose rara) a partir de xilitol por *resting process* foi relatada por Poonperm et al. (2007). De acordo com os autores o rendimento da reação foi dependente da temperatura, concentração inicial do biocatalisador e de substrato. Neste trabalho, elevados rendimentos em L-xilulose (> 80%) foram obtidos quando a reação foi conduzida com *resting cells* de *Bacillus pallidus* (DO_{660nm} = 30), 2% de xilitol a uma temperatura de 50 ^{o}C por 24h.

De uma forma geral, os estudos iniciais de biotransformação de xilose em xilitol partir de *resting cells* de *C. guilliermondii* (sem tratamento, e permeabilizadas com Triton X-100) são promissores. Portanto, é de fundamental importância a realização de ensaios futuros com o objetivo de se encontrar uma condição otimizada de produção de xilitol empregando *resting process*.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, foi possível concluir que:

Estudo da permeabilização celular com CTAB:

- ✓ A permeabilização de *C. guilliermondii* com CTAB permite a dosagem *in situ* das desidrogenases (G6PD e XD), mas não da redutase (XR);
- ✓ A permeabilização de *C. guilliermondii* com CTAB em termos da atividade in situ da enzima G6PD foi favorecida com aumento da concentração do tensoativo e do tempo de contato;
- ✓ As condições que promoveram máxima permeabilidade da membrana celular, foram: 0,41 mM de CTAB, 50 min de tempo de contato e agitação de 200 rpm. Nestas condições as atividades in situ de G6PD e XD foram de 283,4 e 60,3 U/L, respectivamente;
- ✓ As enzimas G6PD, XR e XD não são liberadas para o sobrenadante durante a permeabilização com CTAB;
- ✓ Nas condições de máxima permeabilidade celular, o CTAB influencia negativamente a atividade catalítica das enzimas G6PD, XR e XD presentes no homogenato. O efeito do tensoativo é mais pronunciado nas desidrogenases do que na redutase;
- ✓ O CTAB comprometeu a atividade metabólica de *C. guilliermondii* causando perda total de viabilidade celular.

Estudo da permeabilização celular com Triton X-100:

- ✓ A permeabilização de *C. guilliermondii* com Triton X-100 é pouco efetiva e permite a dosagem *in situ* apenas da enzima G6PD;
- ✓ A permeabilização de *C. guilliermondii* com Triton X-100 em termos da atividade *in situ* da enzima G6PD foi favorecida com aumento da concentração do tensoativo e do tempo de contato;
- ✓ As condições que promoveram máxima permeabilidade da membrana celular, foram: 2,78 mM de Triton X-100 , 50 min de tempo de contato e agitação de 200 rpm. Nestas condições a atividades *in situ* de G6PD foi de (44,7 ± 0,0 U/L e 16,9 ± 0,0 U/$g_{células}$);

- ✓ O permeabilização de *C. guilliermondii* com Triton X-100 favorece a atividade de G6PD e XR no homogenato celular após rompimento mecânico com pérolas de vidro;
- ✓ O Triton X-100 não afeta a atividade catalítica das enzimas G6PD, XR e XD presentes no homogenato;
- ✓ O tratamento com Triton X-100 não foi suficiente para causar perda de viabilidade e atividade metabólica de *C. guilliermondii.*

Estudo da permeabilização celular por congelamento-descongelamento:

- ✓ A permeabilização de *C. guilliermondii* por congelamento-descongelamento permite a dosagem *in situ* das enzimas (G6PD e XR), mas não da XD;
- ✓ O congelamento-descongelamento foi capaz de manter o nível *in situ* de G6PD, mas promoveu liberação acentuada da enzima XR. Os níveis encontrados para G6PD e XR foram de (108, 7± 3,8 U/L e 54,3 ± 1,9 $U/g_{células}$) e (75,9 ± 2,5 U/L e 38,0 ± 1,3 $U/g_{células}$), respectivamente;
- ✓ O congelamento-descongelamento promove perda parcial de viabilidade celular.

Ensaios de biotransformação com as células permeabilizadas:

- ✓ A conversão de xilose em xilitol, nas condições avaliadas; foi dependente do tipo do tratamento de permeabilização do biocatalisador;
- ✓ *Resting cells* de *C. guilliermondii* (sem tratamento de permeabilização) foi capaz de converter xilose em xilitol com rendimento 57% em meio contendo apenas xilose;
- ✓ As células permeabilizadas com Triton X-100 e por congelamento-descongelamento constituem biocatalisadores promissores para conversão de xilose em xilitol. Portanto é de fundamental importância a realização de ensaios futuros com o objetivo de se encontrar uma condição otimizada de produção de xilitol empregando *resting process* (com células permeabilizadas ou não).

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho e dando continuidade ao estudo de biotransformação de xilose em xilitol a partir de células de *C. guilliermondii* não tratadas ou permeabilizadas com Triton X-100 e por congelamento-descongelamento, sugere-se:

- ✓ Aprofundar os estudos de biotransformação de xilose em xilitol empregando células de *C. guilliermondii* não tratadas ou permeabilizadas, avaliando os seguintes parâmetros: adição de co-substratos (glicose-6-fosfato ou glicose) e/ou cofatores ($NADP^+$ ou NADPH), concentração de biocatalisador, concentração inicial de xilose, da temperatura e pH;

- ✓ Estudos relativos a estabilização da enzima xilose redutase (XR) no interior das células permeabilizadas por congelamento-descongelamento, através da adição de agente estabilizante;

- ✓ Estudos empregando células de *C. guilliermondii* (não tratadas ou permeabilizadas) como biocatalisadores em ensaios de biotransformação em hidrolisado hemicelulósico de biomassa vegetal, empregando as condições previamente otimizadas.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J.; BHAT, S.G. Permeabilization of baker's yeast with N-lauroyl sarcosine. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, n.8, p.1367-5435, 2008.

ALAMÄE, T.; JÄRVISTE, A. Permeabilization of the methylotropic yeast *Pichia pinus* for intracellular enzyme analysis: a quantitative study. **Journal of Microbiological Methods**, v. 22, p.193-205, 1995.

ALCALDE, M.; FERRER, M.; PLOU, F. J.; BALLESTEROS, A. Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes. **TRENDS in Biotechnology**, v.24, n.6, p.281-287, 2006.

ANTONINI, S.R.C. Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria: Apostila de curso. Universidade de Campinas, 2004.

BARBOSA, M.F.S.; MEDEIROS, M.B.; MANCILHA, I.M.; SCHNEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors wich affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, p. 241-251, 1988.

BASTOS, J.R.M.; CUNHA, L.S.C.; SILVA, R.H.A.; ELIAS, F.; RODRIGUES, H.J.G. Utilization of xylitol as a preventive substance in dentistry. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v. 4, n. 15, p. 891-893, 2005.

BÄUMCHEN, C.; ROTH, A.H.F.J.; BIEDENDIECK, R.; MALTEN, M.; FOLLMANN, M., SAHM, H.; BRINGER-MEYER, S.; JAHN, D. D-Mannitol production by resting state whole cell biotransformation of D-fructose by heterologous mannitol and formate dehydrogenase gene expression in *Bacillus megaterium*. **Biotechnology Journal**, v.2, p.1408–1416, 2007.

BERGMEYER, H.U. **Methods of Enzymatic Analysis**. 3.ed. Weinheim: Ed. Verlag Chimie, 1984. 539 p.

BERTAU, M. How cell physiology affects enantioselectivity of the biotransformation of ethyl 4-chloro-acetoacetate with *Saccharomyces cerevisiae*. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.20, n. 5, p. 363–367, 2002.

BHAIRI, S.M.; MOHAN, C.M. Calbiochem. Detergents: a guide to the properties and uses of detergents in biological systems, 2007. Disponível em: <http:// www.merckbiosciences.com>. Acesso em: 03 jan. 2008.

BHAT, N.; NAINA, N.S.; GOWDA, L.R.; BHAT, S.G. Detergent permeabilized yeast cells as the source of intracellular enzymes for estimation of biomolecules. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.15, p.796-800, 1993.

BINDU, S.; SOMASHEKAR, D.; JOSEPH, R. A comparative study on permeabilization treatments for *in situ* determination of phytase of *Rhodotorula gracilis*. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.336-340, 1998.

BOLEN, P.L.; MCCRACKEN, D.A. Properties of aldose reductase from the methanol yeast *Candida boidinii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.69, n.4, p.211-214, 1990.

BOMMARUS, A.S.; POLIZZI, K.M. Novel biocatalysts: Recent developments. **Chemical Engineering Science**, v.61, p.1004-1016, 2006.

CÁNOVAS, M.; TORROGLOSA, T.; IBORRA, J.L. Permeabilization of *Escherichia coli* cells in the biotransformation of trimethylammonium compounds into L-carnitine. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.300-308, 2005.

CÁNOVAS, M.; IBORRA, J.L. Whole cell biocatalysts stabilization for L-carnitine production. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.23, n.3/4, p. 149-158, 2005.

Catálogo Merck on line. Disponível em:<http://www.merck.com.br>. Acesso em: 08 jan 2008.

Catálogo Vetec on line. Disponível em: <http://www.vetec.com.br>. Acesso em: 08 jan 2008.

CHAIYARIT, S.; THONGBOONKERD, V. Comparative analyses of cell disruption methods for mitochondrial isolation in high-throughput proteomics study. **Analytical Biochemistry**, v.394, p.249–258, 2009.

CHIANG, C.; KNIGHT, S.G. Metabolism of the D-xylose by moulds. **Nature**, v.188, p.79-81, 1960.

DE CONTI, R.; RODRIGUES, J.A.R.; MORAN, e P.J.S. Biocatálise: avanços recentes. **Química Nova**, v.24, n.5, p.672-675, 2001.

DE LEÓN, A.; GARCÍA, B.; BARBA DE LA ROSA, A.P.; VILLASEÑOR, F.; ESTRADA, A.; LÓPEZ-REVILLA, R. Periplasmic penicillin G acylase activity in recombinant *Escherichia coli* cells permeabilized with organic solvents. **Process Biochemistry**, v.39, p.301-305, 2003.

DOOLAN, I.A.; WILKINSON, M.G. Comparison of the effects of various attenuation methods on cell permeability and accessibility of intracellular enzymes in *Lactococcus lactis* strains. **International Dairy Journal**, v.19, p.215–221, 2009.

DORAN, P.M. **Bioprocess Engineering Principles**. 3.ed. San Diego: Academic Press, 1998. 439p.

DUMONT, F.; MARECHAL, P.-A.; GERVAIS, P. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. **Applied And Environmental Microbiology**, v.70, n.1, p. 268–272, 2004

ELIAS, F. **Influência do complexo flúor-xilitol no controle da placa dentária e sangramento gengival em pacientes herbiátricos com aparelho ortodôntico fixo**. 2005. 87f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, 2005.

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 and Biotechnology**, v.18, p.251-254, 1997.

FELIX, H. Permeabilized cells. **Analytical Biochemistry**, v.120, p.211-234, 1982.

FLEURI, L.F.; SATO, H.H. Produção, purificação e aplicação de enzimas líticas. **Química Nova**, v.28, n.5, p.871-879, 2005.

GALABOVA, D.; TULEVA, B.; SPASOVA, D. Permeabilization of *Yarrowia lipolytica* cells by Triton X-100. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.18-22, 1996.

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

GOWDA, L.R.; BACHHAWAT, N.; BHAT, S.G. Permeabilization of Bakers' yeast by cetyltrimethylammonium bromide for intracellular enzyme catalysis. Enzyme and Microbial Technology, v. 13, p. 154-157, 1991.

GRANSTRÖM, T.; AIRAKSINEN, U.; WU, X.Y.; LEISOLA, M. *Candida guilliermondii* grows on rare pentoses – implications for production of pure xylitol. **Biotechnology Letters**, v.24, p.507-510, 2002.

GURPILHARES, D.B.; HASMANN, F.A.; PESSOA JUNIOR, A.; ROBERTO, I.C. Optimization of glucose-6-phosphate dehydrogenase releasing from *Candida guilliermondii* by disruption with glass beads**. Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.591-595, 2006.

Gurpilhares, D.B.; · Hasmann, F.A.; Pessoa Junior, A.; ·Roberto, I.C. The behavior of key enzymes of xylose metabolism on the xylitol production by *Candida guilliermondii* grown in hemicellulosic hydrolysate. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.36, p.87–93, 2009.

HAALAND, P.D. Experimental Design in Biotechnology. New York: Marcel Dekker, 1989.

HO, N.W.Y.; LIN, F.P.; HUANG, S.; ANDREWS, P.C.; PSAO, G.T. Purification, characterization, and amino terminal sequence of xylose reductase from *Candida shehatae*. **Enzyme Microbial Technology**, v.12, p.33-39, 1990.

HUIZHOU, L.; WEIJING, Y.; JIAYONG, C. Effects of surfactants on emulsification and secondary structure of lysozyme in aqueous solutions. **Biochemical Engineering Journal**, v.2, p.187-196, 1998.

JOSHI, M.S.; GOWDA, L.R.; BHAT, S.G. Permeabilization of yeast cells (*Kluyveromyces fragilis*) to lactose by cetyltrimethylammonium bromide. **Biotechnology Letters**, v.9, n.8, p.549-554, 1987.

KALIPATNAPU, S.; CHATTOPADHYAY, A. Membrane Protein Solubilization: Recent Advances and Challenges in Solubilization of Serotonin1A Receptors. **Life**, v.57, n. 7, p.505-512, 2005.

KHAN, A.; BHIDE, A.; GADRE, R. Mannitol production from glycerol by resting cells of *C. magnolia*. **Bioresource Technology**, v.100, p.4911-4913, 2009.

KING, A.T.; DAVEY, M.R.; MELLOR, I.R.; MULLIGAN, B.J.; LOWE, K.C. Surfactant effects on yeast cells. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.13, p.148-153, 1991.

KISE, S.; KOIZUMI, N.; MAEDA, H. Properties of NAD(P)H-linked aldose reductase from *Cryptococcus lactativorus*. **Journal of Fermentation Technology**, v.66, n.6, p.615-623, 1988.

KITPREECHAVANICH, V.; HAYASHI, M.; NISHIO, N.; NAGAI, S. Conversion of D-xylose into xylitol by xylose reductase from methanogen strain. **Biotechnology Letters**, v.6, n.10, p. 651-656, 1984.

KWON, D.-H.; KIM, M.-D.; LEE, T.-H.; OH, Y.-J.; RYU, Y.-W.; SEO, J.-H. Elevation of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity increases xylitol production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.43, p.86-89, 2006

LALITHA J.; MULIMANI, V.H. Stability and activity of potato acid phosphatase in aqueous surfactant media. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v.41, n.4, p.797-803, 1997.

LAOUAR, L.; MULLIGAN, B.J.; LOWE, K.C. Yeast permeabilization with surfactants. **Biotechnology Letters**, v.14, n.8, p.719-720, 1992.

LEATHERS, T.D. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. **FEMS Yeast Research**, v.3, p.133-140, 2003.

LEHNINGER, A.L. **Bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Edgard Blücher, 1997, 261p.

LU, J.; TSAI, L.B.; GONG, C-S.; TSAO, G.T. Effect of nitrogen sources on xylitol production from D-xylose by *Candida* sp. L 102. Biotechnology Letters, v.17, n.2, p.167-170, 1995.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10 ed. Prentice Hall, 2004. p. 62-66.

MANJARREZ, N.; PÉREZ, H.I.; SOLÍS, A.; LUNA, H.; LIÉVANO, R.; RAMÍREZ, M. Biotransformation of (S)-cis-verbenol with Nocardia corallina B-276. **Brazilian Journal of Chemical Society**, v. 18, n. 4, p.709-713, 2007.

MARINHO, H.S.; FERNANDES, L.; ANTUNES, F.; COUTINHO, A.; CYRNE, L. Protocolos experimentais - Bioquímica Experimental III da Licenciatura em Bioquímica, 2006. Disponível em: <http://www.dqb.fc.ul.pt/cup/44317/pdf/protocolo2006.pdf>

MAYERHOFF, Z.D.V.L.; ROBERTO, I.C.; FRANCO, T.T. Response surface methodology as an approach to determine the optimal activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase enzymes from *Candida mogii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n.70, p.761–767, 2006.

MAKINO, S.; REYNOLDS, J.A.; TANFORD, C. The binding of deoxycholate and Triton X-100 to proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v.248, n.14, p.4926-4932, 1973.

MELAJA, A.J.; HAMÄLÄINEN, L. **Process for making xylitol**. U.S. Patent n. 4.008.285. 18 jun. 1975. Publ. 15/fev/1977.

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

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, n.4, p. 401-413, 2002a.

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

NAINA, N.S.; GOWDA, L.R.; BHAT, S.G. Preparation of NADH/NADPH using Cetyltrimethylammonium Bromide Permeabilized Baker's Yeast Cells. **Analytical Biochemistry**, v.196, p.234-237, 1991.

NEUHAUSER, W.; HALTRICH D.; KULBE K.D.; NIDETZKY B. NAD(P)H-dependent aldose reductase from the xylose-assimilating yeast *Candida tenuis*: Isolation, characterization and biochemical properties of the enzyme. **Biochemical Journal**, v.326, p.683-692, 1997.

NG, M. **Cell permeabilization using supercritical carbon dioxide**. 2001. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciência Aplicada em Engenharia Química) - Universidade de Waterloo, Waterloo, 2001.

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v.25, n.5, p.772-776, 2002.

NONAKA, C.F.W.; GOULART FILHO, J.A.V.; PEREIRA, K.M.A.; QUEIROZ, L.M.G.; PEREIRA PINTO, L. Metabolismo dos açúcares por bactérias orais envolvidas no processo de cárie – uma revisão dos aspectos atuais. **Revista Brasileira de Patologia Oral**, v. 4, n. 2, p. 107-113, 2005.

PARK ,J.-I.; GRANT, C.M.; ATTFIELD, P.V.; DAWES, I.W. The Freeze-Thaw Stress Response of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Is Growth Phase Specific and Is Controlled by Nutritional State via the RAS-Cyclic AMP Signal Transduction Pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.10, 1997.

PEPPER, T.; OLINGER, P.M. Xylitol in sugar-free confections. **Food Technology**, p.98-106, 1988.

PESSOA JUNIOR. Rompimento celular. In: PESSOA JUNIOR, W.; KILIKIAN, B.V. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. Capitulo 2 (6-24).

POONPERM, W.; TAKATA, G.; MORIMOTO, K.; GRANSTRÖM, T.B.; IZUMORI, K.. Production of L-xylulose from xylitol by a newly isolated strain of *Bacillus pallidus* Y25 and characterization of its relevant enzyme xylitol dehydrogenase. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.1206-1212, 2007.

PRAKASHAM, R. S.; RAO, R.S.; HOBBS, P.J. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v. 3, n. 1, p. 8-36, 2009.

PRETÉ, P.S.C. **Solubilização de membranas eritrocitárias: análise quantitativa do efeito hemolítico induzido por surfatantes**. 2006. 123f. Tese (Doutorado em Biologia Funcional e Molecular) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

Quaternary Ammonium Compounds. Disponível em: <www.fefchemicals.com>. Acesso em: 08 jan 2008.

RAICU, V.; GUSBETH, C.; ANGHEL,D.F.; TURCU, G. Effects of cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) surfactant upon the dielectric properties of yeast cells. **Bichimica et Biophysica Acta**, v.1379, p.7-15, 1998.

REHR, B.; WILHELM, C.; SAHM, H. Production of sorbitol and gluconic acid by permeabilized cells of *Zymomonas mobilis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.144-148, 1991.

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

ROCHA, J.M.S. Aplicações de agentes tensioactivos em biotecnologia. In: **Tensioactivos em Biotecnologia, Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia**, n.64, p.5-11, 1999.

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 hemicellulosic hydrolysate at controlled pH values. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.26, p.103-107, 2003.

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

SAVELLI, G.; SPRETI, N.; DI PROFIO, P. Enzyme activity and stability control by amphiphilic self-organizing systems in aqueous solutions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.5, n.1/2, p.111-117, 2000.

SEKHAR, S.; BHAT, N.; BHAT, S.G. Preparation of detergent permeabilized Bakers' yeast whole cell catalase. **Process Biochemistry**, v.34, p.349-354, 1999.

SERRANO, R.; GANCEDO, J.M.; GANCEDO, C. Assay of yeast enzymes *in situ*. A potential tool in regulation studies. **European Journal of Biochimistry**, v.34, p.479-482, 1973.

SHEPARD, S.R.; STONE, C.; COOK, S.; BOUVIER, A.; BOYD, G.; WEATHERLY, G., LYDIARD, D.; SCHRIMSHER, J. Recovery of intracellular recombinant proteins from the yeast *Pichia pastoris* by cell permeabilization. **Journal of Biotechnology**, v. 99, p. 149-160, 2002.

SILVA, C.J.S.M.; ROBERTO, I.C. Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, p. 1-5, 2001.

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

SINGH, A.; VAN HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, p.99-116, 2006.

SOUZA, M.A.; RIBEIRO, M.Z.; SILVA, D.P.; PESSOA JUNIOR, A.; VITOLO, M. Effect of pH on the stability of hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98-100, p.265-272, 2002.

SOUZU, H., Studies on the damage to *Escherichia coli* cell membrane caused by different rates of freeze-thawing. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v.603, n.1, p.13-26,1980.

TANAKA T.; XING, X.-H. ; MATSUMOTO K.; UNNOC, H. Preparation and characteristics of resting cells of bioluminescent *Pseudomonas putida* BLU. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, p. 29–36, 2002.

UENO, M. Efeito do brometode cetiltrimetilamônio no metabolismo e na fisiologia de bactérias e levedura. 1992. 149f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1992.

WILBERG, K.Q., ALVES, T.L.M., NOBREGA, R. Enzymatic catalysis by permeabilized cells. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.14, n.4, 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010466321997000400008&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0104-6632.

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

Wikipédia.com. Disponível em: <http://www.wikipedia.com>. Acesso em: 08 jan 2008.

YABLOCHKOVA, E.N.; BOLOTNIKOVA, O.I.; MIKHAILOVA, N.P.; NEMOVA, N.N.; GINAK, A.I. The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. **Microbiology**, n.4, v.72, p.414-417, 2003.

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.

YLIKARI, R. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. **Advances in Food Research**, v.25, p.159-180, 1979.

YOKOYAMA, S.-I.; SUZUKI, T.; KAWAI, K.; HORITSU, H.; TAKAMIZAWA, K.. Purification, characterization and structure analysis of NADPH-dependent D-xylose reductases from *Candida tropicalis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.79, n.3, p.217-223, 1995.

YOON, S.-H.; ROBYT, J.F. Activation and stabilization of 10 starch-degrading enzymes by Triton X-100, polyethylene glycols, and polyvinyl alcohols. **Enzyme and Microbial Technology**, v.37, p.556-562, 2005.

YU, M.-A.; WEI, Y.-M.; ZHAO, L.; JIANG, L.; ZHU, X.B.; QI, W. Bioconversion of ethyl 4-chloro-3-oxobutanoate by permeabilized fresh brewer's yeast cells in the presence of allyl bromide. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 151-156, 2007.

YUAN, Y.; HEINZLE, E. Permeabilization of *Corynebacterium glutamicum* for NAD(P)H-dependent intracellular enzyme activity measurement. **ComptesRendus Chimie**, v.12, p.1154-1162, 2009.

ZAITSEVA, E.A.; CHUKHRAI, E.S.; POLTORAK, O.M. Stabilization mechanism of glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Biocatalysis - 2000: Fundamentals & Applications**, v.41, n.6, p.127-129, 2000.

ZHANG, J.; WITHOLT, B.; LI, Z. Coupling of permeabilized microorganisms for efficient enantioselective reduction of ketone with cofactor recycling. **Chemical Communications**, p.398-400, 2006.

APÊNDICES

Apêndice 1: Tabelas dos valores de absorbância (340nm) do mix de atividade enzimática de G6PD, XR E XD em presença das diferentes concentrações de CTAB avaliadas

Visando avaliar a interferência do CTAB na determinação das atividades enzimáticas de G6PD, XR e XD, foram realizadas medidas de absorbância a 340 nm do tensoativo nas concentrações selecionadas para o estudo de permeabilização (0,14, 0,28 e 0,41 mM) na presença ou ausência dos cofatores ($NADP^+$, NADPH e NAD^+) nos valores de pH para as dosagens enzimáticas (7,5, 7,2 e 8,6). Os resultados mostraram que para todas as concentrações avaliadas do CTAB e independentemente da presença dos cofatores, a variação nos valores de absorbância foi muito discreta, podendo ser atribuída a erros experimentais. Isto significa que as concentrações do tensoativo empregadas no presente estudo não interferem na análise da atividade das enzimas.

Tabela A.1 - Valores de absorbância (340 nm) de diferentes concentrações de CTAB nos valores de pH correspondentes para a dosagem das atividades das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD)

CTAB (mM)	Abs (340 nm)					
	XR (pH 7,2)		G6PD (pH 7,5)		XD (pH 8,6)	
	Sem cofator	Com cofator	Sem cofator	Com cofator	Sem cofator	Com cofator
0	-	***0,4336***	-	***0,0503***	-	***0,0153***
0,14	0,0010	0,4122	0,0010	0,0482	0,0033	0,0202
0,28	0,0024	0,3559	0,0026	0,0640	0,0016	0,0179
0,41	0,0019	0,4470	0,0070	0,0579	0,0026	0,0216

(-) = valor de absorbância não determinado; branco = tampão ausente de CTAB

Apêndice 2: Tabelas dos resultados do cultivo empregando células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com CTAB, obtidos nos ensaios em meio semi sintético

Nesta seção, encontra-se representado por tabela, os valores de variação do crescimento celular, pH, consumo de açúcares, formação de xilitol, obtidos no cultivo de células permeabilizadas de *C. guilliermondii* FTI 20037 em meio semi sintético.

Tabela A.2 - Ensaios de viabilidade de aproximadamente 2 g/L de células de *C. guilliermondii* sem tratamento (controle) e permeabilizadas por CTAB 0,41 mM, cultivadas em meio semi-sintético durante 24 h a 200 rpm e 30ºC

Tempo (h)	Controle[a]					Células permabilizadas[b]				
	Células (g/L)	pH	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	pH	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)
0	1,7 ± 0,0	5,7 ± 0,0	1,7 ± 0,0	30,4 ± 0,5	nd	1,5 ± 0,0	5,7 ± 0,0	1,8 ± 0,0	29,6 ± 0,6	nd
5	2,6 ± 0,0	4,5 ± 0,0	nd	21,8 ± 0,3	2,5 ± 0,4	1,4 ± 0,1	5,7 ± 0,0	1,8 ± 0,0	29,4 ± 0,5	nd
10	2,7 ± 0,0	4,1 ± 0,1	nd	18,4 ± 0,2	5,3 ± 0,3	1,2 ± 0,0	5,7 ± 0,0	1,8 ± 0,0	29,7 ± 0,0	nd
18	3,3 ± 0,0	3,9 ± 0,0	nd	10,5 ± 0,3	11,3 ± 0,3	1,2 ± 0,0	5,7 ± 0,0	1,9 ± 0,0	29,7 ± 0,0	nd
24	3,8 ± 0,0	3,6 ± 0,1	nd	5,0 ± 0,0	14,4 ± 0,4	1,1 ± 0,0	5,7 ± 0,0	1,9 ± 0,0	29,6 ± 0,5	nd

[a,b] As suspensões celulares foram preparadas conforme descrito nos itens 4.1 e 4.2; média de dois ensaios experimentais ± erro-padrão; (nd) = não detectado.

Apêndice 3: Tabelas dos valores de absorbância (340nm) do mix de atividade enzimática de G6PD, XR e XD empresença das diferentes concentrações de Triton X-100 avaliadas

Com o intuito de avaliar a interferência do tensoativo na determinação das atividades enzimáticas, foram realizadas medidas de absorbância a 340 nm das concentrações selecionadas de Triton X-100 na presença ou ausência dos cofatores (NADPH, $NADP^+$ e NAD^+), de acordo com os valores de pH (7,2, 7,5 e 8,6), empregados nas dosagens enzimáticas de XR, G6PD e XD, respectivamente. Os resultados mostraram que para todas as concentrações avaliadas do Triton X-100 e independentemente da presença dos cofatores, a variação nos valores de absorbância foi muito discreta, podendo ser atribuída a erros experimentais. Isto significa que as concentrações do tensoativo empregadas no presente estudo não interferem na análise da atividade das enzimas.

Tabela A.3 - Valores de absorbância (340 nm) de diferentes concentrações de Triton X-100 nos valores de pH correspondentes para a dosagem das atividades das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD)

Triton (mM)	Abs (340 nm)					
	XR (pH 7,2)		G6PD (pH 7,5)		XD (pH 8,6)	
	Sem cofator	Com cofator	Sem cofator	Com cofator	Sem cofator	Com cofator
0	-	***0,4946***	-	***0,0398***	-	***0,0133***
0,08	-	0,4756	-	0,0474	-	0,0092
0,15	-	0,4648	-	0,0444	-	0,0178
0,23	-	0,4891	-	0,0389	-	0,0149
0,46	-	0,5249		0,0663	-	0,0197
2,78	-	0,5220		0,0536	-	0,0201
6,18	-	0,5057	-	0,0443	-	0,0209
7,73	-	0,5111	-	0,0454	-	0,0174

(-) = valor de absorbância não determinado; branco = tampão ausente de Triton X-100

Apêndice 4: Tabelas dos resultados do cultivo empregando células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com Triton X-100, obtidos nos ensaios em meio semi sintético

Nesta seção, encontram-se representados por tabelas, os valores de variação do crescimento celular, pH, consumo de açúcares, formação de xilitol, obtidos no cultivo de células permeabilizadas de *C. guilliermondii* FTI 20037 em meio semi sintético.

Tabela A.4 - Ensaios de viabilidade de aproximadamente 2 g/L de células de *C. guilliermondii* sem tratamento (controle) e permeabilizadas por Triton X-100 2,78 mM, cultivadas em meio semi-sintético durante 24 h a 200 rpm e 30ºC

Tempo (h)	Controle[a]					Células permabilizadas[b]				
	Células (g/L)	pH	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	pH	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)
0	1,7 ± 0,0	5,7 ± 0,0	1,7 ± 0,0	30,4 ± 0,5	nd	1,5 ± 0,0	5,7 ± 0,0	1,6 ± 0,0	29,4 ± 0,4	nd
5	2,6 ± 0,0	4,5 ± 0,0	nd	21,8 ± 0,3	2,5 ± 0,4	2,5 ± 0,1	4,1 ± 0,0	nd	25,0 ± 0,2	1,7 ± 0,1
10	2,7 ± 0,0	4,1 ± 0,1	nd	18,4 ± 0,2	5,3 ± 0,3	2,9 ± 0,0	3,9 ± 0,0	nd	21,1 ± 0,7	4,8 ± 0,1
18	3,3 ± 0,0	3,9 ± 0,0	nd	10,5 ± 0,3	11,3 ± 0,3	3,2 ± 0,0	3,6 ± 0,0	nd	11,5 ± 0,6	11,5 ± 0,1
24	3,8 ± 0,0	3,6 ± 0,1	nd	5,0 ± 0,0	14,4 ± 0,4	3,7 ± 0,2	3,2 ± 0,0	nd	5,3 ± 0,2	15,1 ± 0,4

[a,b] As suspensões celulares foram preparadas conforme descrito nos itens 4.1 e 4.3; média de dois ensaios experimentais ± erro-padrão; (nd) = não detectado.

Apêndice 5: Tabelas dos resultados do cultivo empregando células de *C. guilliermondii* permeabilizadas por congelamento-descongelamento, obtidos nos ensaios em meio semi sintético

Nesta seção, encontram-se representados por tabelas, os valores de variação do crescimento celular, pH, consumo de açúcares, formação de xilitol, obtidos no cultivo de células permeabilizadas de *C. guilliermondii* FTI 20037 em meio semi sintético.

Tabela A.5 - Ensaios de viabilidade de aproximadamente 2 g/L de células de *C. guilliermondii* sem tratamento (controle) e permeabilizadas por congelamento-descongelamento, cultivadas em meio semi-sintético durante 24 h a 200 rpm e 30ºC

tempo (h)	Controle[a]					Células permabilizadas[b]				
	Células (g/L)	pH	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	pH	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)
0	1,7 ± 0,0	5,7 ± 0,0	1,7 ± 0,0	30,4 ± 0,5	nd	1,8 ± 0,0	5,7 ± 0,0	1,2 ± 0,0	32,7 ± 0,0	nd
5	2,6 ± 0,0	4,5 ± 0,0	nd	21,8 ± 0,3	2,5 ± 0,4	2,0 ± 0,0	3,9 ± 0,1	1,2 ± 0,1	32,2 ± 0,0	0,8 ± 0,0
10	2,7 ± 0,0	4,1 ± 0,1	nd	18,4 ± 0,2	5,3 ± 0,3	2,2 ± 0,2	3,5 ± 0,0	1,0 ± 0,0	25,8 ± 0,0	3,1 ± 0,1
18	3,3 ± 0,0	3,9 ± 0,0	nd	10,5 ± 0,3	11,3 ± 0,3	3,3 ± 0,1	3,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0	17,0 ± 1,0	8,9 ± 0,0
24	3,8 ± 0,0	3,6 ± 0,1	nd	5,0 ± 0,0	14,4 ± 0,4	3,6 ± 0,0	3,3 ± 0,1	1,0 ± 0,0	15,6 ± 0,4	11,7 ± 0,2

[a,b] As suspensões celulares foram preparadas conforme descrito nos itens 4.1 e 4.4; média de dois ensaios experimentais ± erro-padrão; (nd) = não detectado.

Apêndice 6: Tabelas dos resultados dos ensaios de biotransformação empregando células de *C. guilliermondii* permeabilizadas com CTAB, Triton X-100 e por congelamento-descongelamento

Nesta seção, encontram-se representados por tabelas, os valores de variação do crescimento celular, pH, consumo de açúcares, formação de xilitol (e etanol), obtidos nos ensaios de biotransformação empregando aproximadamente 20 g/L de células permeabilizadas de *C. guilliermondii* FTI 20037.

Tabela A.6.1 - Bioredução de xilose em xilitol a partir de células de *C. guilliermondii* permeabilizadas. Ensaios realizados com ~ 30 g/L de xilose em tampão Tris-HCl 0,1M pH 7

tempo (h)	Controle[a]				CTAB[b]				Triton X-100[c]					Congelamento-descongelamento[d]			
	X (g/L)	pH	*Xil (g/L)*	*Xol (g/L)*	X (g/L)	pH	*Xil (g/L)*	*Xol (g/L)*	X (g/L)	pH	*Xil (g/L)*	*Xol (g/L)*	*Etol (g/L)*	X (g/L)	pH	*Xil (g/L)*	*Xol (g/L)*
0	20,9	6,3	*28,5*	*nd*	17, 7	6,3	*25,8*	*nd*	19,6	6,1	*25,4*	*nd*	*nd*	18,6	6,1	*29,5*	*0,6*
3	27,0	5,6	*19,3*	*5,4*	17,6	6,2	*25,6*	*nd*	19,6	6,0	*19,3*	*2,3*	*nd*	18,6	6,1	*27,5*	*1,8*
5	27,8	5,4	*15,2*	*7,9*	17,6	6,1	*25,7*	*nd*	19,6	5,8	*15,3*	*4,9*	*2,2*	18,6	6,0	*25,4*	*2,5*
7	27,9	4,8	*11,5*	*12,1*	17,5	6,1	*25,7*	*nd*	19,8	4,7	*11,3*	*6,1*	*3,0*	18,6	5,9	*23,6*	*2,9*
10	28,5	4,7	*2,8*	*14,9*	17,5	6,0	*25,7*	*nd*	19,8	4,8	*7,8*	*7,9*	*3,4*	18,6	5,8	*19,9*	*3,2*

[a,b,c,d] As suspensões celulares foram preparadas conforme descrito nos itens 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4; média de dois ensaios experimentais ± erro-padrão; (nd) = não detectado; X = células; Xil = xilose; Xol = xilitol e Etol = etanol.

Tabela A.6.2 - Ensaios de cultivo de *C. guilliermondii* sem tratamento (controle) em meio semi-sintético contendo ~30 g/Lde xilose e 1,5 g/L de glicose

tempo (h)	Células (g/L)	pH	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Etanol (g/L)
0	18,1±0,0	6,8±0,0	1,2±0,0	27,1±0,2	nd	nd
3	18,3±0,1	6,2±0,0	nd	18,3±0,0	6,2±0,0	nd
5	20,3±0,2	6,2±0,0	nd	14,3±0,3	7,9±0,1	2,6±0,2
7	15,8±0,3	6,0±0,0	nd	11,8±0,1	9,2±0,2	3,2±0,0
10	14,8±0,1	5,7±0,3	nd	7,5±0,1	10,9±0,1	3,7±0,0

Média de dois ensaios experimentais ± erro-padrão; (nd) = não detectado.

Apêndice 7: Tabelas dos resultados de atividade de G6PD, XR e XD homogenato de células de *C. guilliermondii* não tratadas e permeabilizadas por CTAB e Triton X-100

Nesta seção, encontram-se representados por tabelas, os valores de atividade enzimática no homogenato resultante do rompimento mecânico com pérolas de vidro de células de *C. guilliermondii* FTI 20037 não tratadas ou permeabilizadas com CTAB 0,41 mM e Triton X-100 2,78 mM.

Tabela A.7.1 - Atividades volumétrica (Av) e específica (Ae) da enzima G6PD, XR e XD obtidas no homogenato proveniente das células de *C. guilliermondii* não tratadas e permeabilizadas com CTAB 0,41 mM

Tratamento	Atividade enzimática no homogenato					
	G6PD		XR		XD	
	U/L	$U/g_{células}$	U/L	$U/g_{células}$	U/L	$U/g_{células}$
Sem tratamento (controle)	88,7±3,5	38,8±1,6	25,6±2,1	11,2±0,9	64,8±1,7	28,4±0,8
CTAB	282,4±6,2	122,8±2,7	83,3±3,6	36,2±1,5	66,3±0,2	28,8±0,1

X= 2,3 g/L; homogenato resultante do rompimento da suspensão celular com pérolas de vidro, conforme descrito no item 4.2.1; média de dois ensaios experimentais ± erro padrão; eficiência de rompimento = 70%.

Tabela A.7.2 - Atividades volumétrica (Av) e específica (Ae) da enzima G6PD, XR e XD obtidas no homogenato proveniente das células de *C. guilliermondii* não tratadas e permeabilizadas com Triton X-100 2,78 mM

Tratamento	Atividade enzimática					
	G6PD		XR		XD	
	U/L	$U/g_{células}$	U/L	$U/g_{células}$	U/L	$U/g_{células}$
Sem tratamento (controle)	89,4±0,2	44,7±0,09	25,6±2,1	12,8±0,9	60,6±2,7	30,3±1,5
Triton X-100	152,8±2,1	78,3 ± 1,1	194,4±1,5	99,7 ± 0,7	35,2 ± 0,5	18,1 ± 0,2

X= 2,0 g/L; homogenato resultante do rompimento da suspensão celular com pérolas de vidro, conforme descrito no item 4.2.1; média de dois ensaios experimentais ± erro padrão; eficiência de rompimento = 80%.