



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS
CAMPUS DE PATOS - PB



FRANCIANDRO DANTAS DOS SANTOS

BIOCONVERSÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE MADEIRA DE
MIMOSA TENUIFLORA WILD. PARA EM XILITOL

Patos - Paraíba - Brasil

2016

FRANCIANDRO DANTAS DOS SANTOS

BIOCONVERSÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE MADEIRA DE
MIMOSA TENUIFLORA WILD. POIR EM XILITOL

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Florestais da
UFCG, no CSTR, como requisito parcial
para obtenção do Título de Mestre.

Área de Concentração: Ecologia e Manejo
de Recursos Florestais.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Alves
Soares.

Patos - Paraíba - Brasil

2016

S237b Santos, Franciandro Dantas dos
Bioconvers²o do Hidrolisado hemicelul⁴sico de madeira de mimosa
tenuiflora wild. Poir em Xilitol / Franciandro Dantas dos Santos - Patos,
2016.

60f.: il. color.

Disserta²o (Mestrado em Ci³ncias Florestais) - Universidade Federal
de Campina Grande, Centro de Sa³de e Tecnologia Rural, 2016.

"Orienta²o: Prof. Dr. Carlos Eduardo Alves Soares_.

Refer³ncias.

1. Jurema-preta. 2. Serragem. 3. Xilitol. 4. Fermenta²o. 5. C^ondida
tropicalis. I. T^otulo.

CDU 574

FRANCIANDRO DANTAS DOS SANTOS

BIOCONVERSÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE MADEIRA DE
MIMOSA TENUIFLORA WILD. POR EM XILITOL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais da
Universidade Federal de Campina Grande, no CSTR, como requisito parcial para obtenção do
Título de MESTRE em CIÊNCIAS FLORESTAIS.

Aprovado em: 26 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Alves Soares

Universidade Federal Rural do Semiárido (DCAN/UFERSA)

(Orientador)

Prof^a. Dr^a. Maria Valderez Ponte Rocha

Universidade Federal do Ceará (DEQ/UFC)

(1^o examinador)

Prof. Dr. Leandro Calegari

Universidade Federal de Campina Grande (UAEF/CSTR/UFCG)

(2^o examinador)

A minha sobrinha Maria Elo^osa e a minha afilhada Maria Isadora,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus. A Ele sou grato pela minha saúde. A Ele devo minha existência.

Aos professores do PPGCF, que me conduziram tão bem até aqui.

Ao professor Leandro Calegari, pela valorosa contribuição verso final da dissertação.

Aos colegas Edjane Lucena e Marllus Pimenta, pela ajuda em campo, sem os quais a seleção e coleta do material vegetal para esse trabalho seria inviável.

A Carlos Eduardo Alves Soares, pela oportunidade de continuar com a parceria que se estabeleceu na graduação, por me ensinar a nunca desistir e sempre correr atrás dos meus sonhos, por ter me apresentado à UFC e ao DEQ, bem como a professora Valdeez, ao GPBio e a sua família, por permitir que eu residisse em seu imóvel durante todo o experimento laboratorial, pela brilhante orientação no decorrer do mestrado, pelos ensinamentos nas disciplinas, pela ajuda na seleção do doutorado e principalmente pela confiança, carinho, cuidado e expectativas em mim depositados. Você, meu maior exemplo de professor, pesquisador e ser humano. Muito obrigado por tudo!

A Maria Valdeez Ponte Rocha, por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa e nos laboratórios do DEQ, pelos cuidados, ensinamentos e orientações no desenvolvimento desse trabalho, por ter se deslocado até a Paraíba para participar como membro examinador da banca e principalmente por me receber de forma tão carinhosa em sua vida. A senhora é uma das melhores pessoas que já conheci. Muito obrigado por tudo!

A Tiago Albuquerque, pelo treinamento laboratorial, pelas caronas e por toda a ajuda na parte escrita desse trabalho, desde a elaboração do projeto até a versão final.

A Renata Jerônimo, por todas as caronas, pelo apoio e pela parceria e amizade estabelecidos no laboratório.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Ju Serpa, Carlinha, Breno, Jéssyca, Joci, Tici, Natália, Fátima, Emanuel, Brenda, Dayala, Cris, Mary, Ed, Sandy e Camilla. Cada um de vocês sempre terá um lugar especial no meu coração. Muito obrigado! Sem vocês eu não teria conseguido!

Aos meus amigos Augusta Rodrigues (mãe), Juliana Mirella e Evandro de Brito, pela amizade, por todas as vezes que foram me deixar ou me buscar no Pici tarde da noite ou

na rodoviária e principalmente por me adotarem como membro de sua família em Fortaleza - CE.

Ao meu primo Rodolfo Soares, pela grande ajuda nas correções e formatação desse trabalho.

A minha família: Nenzilda, minha mãe, e Mazinho, meu pai, ao meu irmão Elton, avós, tias e primos pela confiança, expectativas e entusiasmo depositados em mim e por entenderem minha ausência em momentos tão conturbados. Vocês são o motivo das minhas lutas e batalhas diárias, tudo o que sou devo a vocês. Muito obrigado por tudo, amo vocês!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelos auxílios concedidos ao Grupo de Pesquisa em Bioprocessos (GPBio).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Efeito das variáveis estudadas através do Gráfico de Pareto a 95% de confiança na liberação de xilose da hidrólise ácida da serragem de *M. tenuiflora* (SMT).

Figura 2 - Valores preditos pelo modelo polinomial de 1ª ordem versus valores observados experimentalmente para a liberação de açúcares fermentescíveis da SMT.

Figura 3 - Superfície de resposta para as concentrações obtidas de xilose da hidrólise ácida da serragem de *M. tenuiflora*(SMT) em função das variáveis: concentração de ácido (em M) e concentração de biomassa (em %, m/v).

Figura 4 - Perfil do crescimento celular, concentração de xilose e xilitol no bioprocesso utilizando o meio sintético de crescimento (SGM) por *Candida tropicalis* ATCC 750 em diferentes temperaturas: (A) 25 °C, (B) 30 °C e (C) 35 °C. Os dados experimentais são os seguintes: (I) Crescimento celular (g.L^{-1}); (II) Xilose (g.L^{-1}); (III) Xilitol (g.L^{-1}).

Figura 5 - Perfil do crescimento celular, concentração de glucose e xilose, concentração de xilitol no bioprocesso utilizando como meio o HSMT por *Candida tropicalis* ATCC 750 em diferentes temperaturas: (A) 25 °C, (B) 30 °C e (C) 35 °C. Os dados experimentais são os seguintes: (I) Concentração celular (g.L^{-1}); (II) Glucose (g.L^{-1}); (III) Xilose (g.L^{-1}); e (IV) Xilitol (g.L^{-1}).

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1 - Composição química percentual (da massa total) da serragem de *M. tenuiflora* (SMT) in natura e após hidrólise ácida (20% m/v de biomassa, H_2SO_4 0,6 mol.L⁻¹, 121 °C por 30 minutos).

Tabela 2 - Composição monossacarídica (em g.L⁻¹) do HSMT sem ajuste de pH e com ajuste de pH utilizando $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Tabela 3 - Concentração de xilose liberada a partir da hidrólise ácida da biomassa da serragem de *M. tenuiflora*.

Tabela 4 - Estimativa dos efeitos principais e suas interações na liberação de xilose da hidrólise ácida da serragem de *M. tenuiflora*, com nível de confiança de 95%.

Tabela 5 - Análise de variância (ANOVA) para a liberação de açúcares fermentescíveis da serragem de *M. tenuiflora* (SMT).

Tabela 6 - Influência da temperatura no crescimento celular e nos parâmetros da produção de xilitol ($Y_{P1/S1}$, $P_{1m\text{ax}}$ e Q_{P1}) por *Candida tropicalis* ATCC 750 utilizando o meio sintético de produção (SGM).

Tabela 7 - Influência da temperatura no crescimento celular e nos parâmetros da produção de xilitol ($Y_{P1/S1}$, $P_{1m\text{ax}}$ e Q_{P1}) por *Candida tropicalis* ATCC 750 utilizando o meio do hidrolisado hemicelulósico da serragem de jurema preta (HSMT).

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E DEFINIÇÕES

ANOVA - Análise de Variância.

Ca(OH)_2 - Hidróxido de cálcio.

5-HMF - 5-hidroximetilfurfural

DAP - Diâmetro - Altura do Peito.

DCC - Delineamento Compósito Central.

H_2SO_4 - Ácido Sulfúrico.

HSMT - Hidrolisado de Serragem de Mimosa tenuiflora.

LIA - Lignina Insolúvel em água

LSA - Lignina Solúvel em água.

$P_{1m\%}$ - Concentração máxima de xilitol observada na fermentação.

Q_{P1} - Produtividade de xilitol observada na fermentação.

SGM - Do inglês Synthetic Growth Medium, Meio Sintético de Crescimento.

SMT - Serragem de Mimosa tenuiflora.

YEPD - Do inglês Yeast-Extract-Peptone-Dextrose, Extrato de Levedura-Peptona-Dextrose.

$Y_{P1/S1}$ - Rendimento de xilitol observado na fermentação.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL.....	15
REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
Região semiárida brasileira: biodiversidade de espécies arbóreas.....	17
Espécie <i>Mimosa tenuiflora</i> [Wild.] Poir.	17
Aproveitamento de resíduos agroindustriais.....	18
Matérias-primas hemicelulósicas: celulose, hemicelulose e lignina.....	19
Celulose.....	19
Hemicelulose.....	19
Lignina.....	20
Xilitol: propriedades e aplicações.....	20
Aspectos gerais da produção de xilitol: via química versus via biotecnológica.....	22
O gênero <i>Candida</i> : leveduras usadas na produção de xilitol.....	23
REFERÊNCIAS.....	25
CAPÍTULO I - BIOCONVERSÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE MADEIRA DE MIMOSA TENUIFLORA EM XILITOL.....	32
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	33
INTRODUÇÃO.....	34
MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
Área de estudo e coleta de indivíduos de <i>M. tenuiflora</i>	35
Caracterização da serragem de <i>M. tenuiflora</i>	36
Determinação dos sólidos totais.....	36
Determinação de extraíveis.....	36
Determinação do teor de celulose, hemicelulose e lignina.....	37
Hidratação da SMT com ácido sulfúrico e preparação para análises.....	37
Lignina insolúvel em água (LIA).....	37
Lignina solúvel em ácido (LSA).....	38
Análise dos carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural para determinação de celulose e hemiceluloses.....	38
Delimitação Compósito Central (DCC) e condições de hidratação da SMT.....	39

Microrganismo <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750.....	40
Armazenamento do microorganismo.....	40
Prepara ^{ção} do meio de inóculo do microorganismo.....	40
Sele ^{ção} do HSMT a partir do DCC para estudo da influ ^{ência} da temperatura na produ ^{ção} de xilitol	41
Cóculo da concentra ^{ção} máx ^{ima} (P), produtividade (Q) e rendimento de xilitol ($Y_{P1/S1}$)	41
Métodos Anal ^{íticos}	42
Determi ^{nação} do Crescimento Celular de <i>C. tropicalis</i>	42
Determi ^{nação} de carboidratos, inibidores e xilitol	42
Métodos Estat ^{ísticos}	43
RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
Planejamento experimental para obten ^{ção} de xilose.....	46
Estudo da influ ^{ência} da temperatura na produ ^{ção} de xilitol utilizando meio sint ^{ético} de crescimento (SGM).....	50
Estudo da influ ^{ência} da temperatura na produ ^{ção} de xilitol utilizando HSMT	53
CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57

BIOCONVERSÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE MADEIRA DE MIMOSA TENUIFLORA EM XILITOL Franciandro Dantas dos Santos. 2016. Dissertação de Mestrado em Ciências Florestais. CSTR/UFCG, Patos - PB. 2016. 60 fls.il.

RESUMO

Este trabalho objetivou estudar a bioconversão da serragem de *Mimosa tenuiflora* (SMT) através de hidrólise ácida, visando maior concentração de xilose por meio de um Delineamento Compósito Central (DCC) para posterior produção de xilitol por via biotecnológica, utilizando a levedura *Candida tropicalis* ATCC750. No DCC, foram avaliadas as variáveis concentração de H_2SO_4 (M) e de biomassa (% m/v). As condições da hidrólise foram 121 °C por 15 minutos, realizada em autoclave. As concentrações testadas foram 0,2; 0,6; 1,0 e 1,16 M de H_2SO_4 e 15%, 20%, 25% e 27,07 % de biomassa de serragem in natura. As variáveis que mostraram efeitos significativos foram concentração de ácido e a interação entre concentração de ácido e concentração de biomassa. A composição do hidrolisado obtido nas melhores condições do DCC (1,0 M H_2SO_4 e 25% biomassa) foi glucose (2,2 g.L⁻¹), xilose (19,2 g.L⁻¹), arabinose (9,9 g.L⁻¹), ácidos acético (0,08 g.L⁻¹) e fórmico (6,9 g.L⁻¹). A fermentação de HSMT e meio sintético de crescimento (SGM) foram realizadas em distintas temperaturas (25, 30 e 35 °C), a 150 rpm e 100 mL de volume reacional por 72h. O melhor rendimento de xilose sem a presença de compostos inibidores (furfural e hidroximetilfurfural) foi obtido com 0,6M de ácido sulfúrico, utilizando uma biomassa de 20% (m/v) (19,20 g.L⁻¹). Comparado ao SGM, a fermentação do HSMT mostrou maior crescimento celular (8,51 g.L⁻¹) e produção de xilitol (12,68 g.L⁻¹). Com o aumento da temperatura, foi observada redução no crescimento celular, bem como na produção de xilitol, sendo a temperatura de 25 °C a mais favorável para obtenção dos maiores valores de xilitol com o hidrolisado. Diante do exposto, a serragem de *M. tenuiflora* representa um substrato com potencial biotecnológico promissor para obtenção de xilitol.

Palavras-chave: Jurema-preta, Serragem, Xilitol, Fermentação, *Candida tropicalis*.

BIOCONVERSION OF HEMICELULOSIC HYDROLISATE FROM WOOD FROM MIMOSA TENUIFLORA INTO XYLITOL Franciandro Dantas dos Santos. 2016. Disserta²o de Mestrado em Ci³ncias Florestais. CSTR/UFCG, Patos - PB. 2016. 107fls.il.

ABSTRACT

This study investigated the bioconversion of sawdust *Mimosa tenuiflora* (SMT) by acid hydrolysis and subsequent biotechnological production of xylitol, using yeast *Candida tropicalis* ATCC750. The higher concentration of xylose was estimated by a Central Composite Design (DCC). In the DCC, the varying concentrations of xylose of H₂SO₄ (in M) and SMT biomass (% w/v) were evaluated. In autoclaving, the hydrolysis conditions were 121°C for 15 minutes. The concentrations tested were 0.2; 0.6; 1.0 and 1.16 M of H₂SO₄ and 15%, 20%, 25%, and 27.07% of biomass sawdust in nature. The variables that showed significant effects were the acid concentration and the interaction acid between biomass concentrations. The composition of *M. tenuiflora* hydrolyzate obtained (HMST) in the statistical significant condition of DCC (1.0 M H₂SO₄ and 25% biomass) was glucose (2.2 g.L⁻¹), xylose (19.2 g.L⁻¹), arabinose (9.9 g.L⁻¹) acetic acid (0.08 g.L⁻¹) and formic acid (6.9 g.L⁻¹). The fermentation of HSMT and synthetic growth medium (SGM) were performed at different temperatures (25, 30 and 35°C), 150 rpm and 100 mL of reaction volume for 72 hours. The significant xylose yield without the presence of inhibitor compounds (furfural and hydroxymethylfurfural) was obtained at 0.6 M of sulfuric acid and 20% (w/v) (19.20 g.L⁻¹) of biomass. When we compared to the SGM, the fermentation of HMST showed greater the cell growth and production of xylitol (8.51 g.L⁻¹ and 12.68 g.L⁻¹, respectively). Temperature increase caused reduction in cell growth as well as in the production of xylitol. At 25°C, we obtained more favorable conditions for larger production of xylitol, using the hydrolyzate as a substrate. Finally, the sawdust *M. tenuiflora* represented a promising biotechnological source to obtain xylitol.

Keywords: Jurema-preta, Sawdust, Xylitol, Fermentation, *Candida tropicalis*.

INTRODUÇÃO GERAL

A crescente preocupação com o uso inadequado de recursos ambientais, bem como o avanço tecnológico dos vários setores que compõem a economia mundial, despertam no mercado consumidor interesse pela sustentabilidade. Isso desencadeia no empresariado a necessidade de encontrar meios eficientes de reaproveitamento, em determinados casos, dos resíduos resultantes dos processos industriais. Neste contexto, encaixam-se os materiais lignocelulósicos, que podem ser encontrados sob a forma de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais.

Os materiais lignocelulósicos são os compostos orgânicos de maior predominância na biosfera. O acúmulo desses resíduos na natureza representa uma ameaça ao meio ambiente causando poluição ambiental. Por outro lado, esses compostos representam a maior fonte de carbono e, assim, energia renovável da Terra.

Os resíduos ou subprodutos hemicelulósicos, quando acumulados no meio ambiente, geram poluição. Aproveitar essa biomassa como matéria-prima de processos industriais, possibilita agregar valor ao que é descartado e constitui, do ponto de vista acadêmico-tecnológico, uma inovação (PARAJΦ et al., 1998; RAFIQUL; SAKINAH, 2012a; 2012b; RAFIQUL et al., 2015a; 2015b). Depois do papel, a serragem proveniente do corte de madeiras é um dos tipos de resíduos hemicelulósicos mais abundantes do planeta. As hemiceluloses, quando hidrolisadas, liberam monossacarídeos como xilose e glucose. Estes podem ser facilmente utilizados como substratos em processos fermentativos para síntese de outros açúcares tais como o xilitol (LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002). Sendo assim, a utilização de lignoceluloses presentes no hidrolisado da serragem de madeira de jurema preta, uma espécie arbórea do semiárido brasileiro, representa uma alternativa como fonte importante e de baixo custo de açúcares para produção de produtos com alto valor agregado, tais como o xilitol.

A xilose é o monossacarídeo predominante na fração hemicelulósica de diversos resíduos de materiais lignocelulósicos. O uso desse carboidrato para obtenção de produtos de interesse da indústria é de suma importância no processo global de (re)aproveitamento desses materiais. Um dos produtos obtidos a partir da bioconversão de xilose é o xilitol, que merece destaque, por tratar-se de um carboidrato com poder adoçante semelhante à sacarose e ainda com propriedades anticariogênicas. O xilitol é utilizado, principalmente, em alimentos dietéticos, preparações farmacêuticas e em produtos cosméticos (MUSSATO; ROBERTO,

2002a;ANTONIO; PIERRO; MAIA, 2011; L. C; LEE, CHOI; KIM, 2012; ALBUQUERQUE, 2014; ALBUQUERQUE et al., 2014).

Devido ao alto custo da produção de xilitol por via química, vários centros e grupos de pesquisa no Brasil e no exterior estudam alternativas de produção desse polícool por processo biotecnológico, objetivando desenvolver uma técnica menos dispendiosa, que possa ser utilizada em escala industrial (ALBUQUERQUE, 2014; ALBUQUERQUE et al., 2014). Desse modo, a via biotecnológica de xilitol, a partir da xilose obtida da hemicelulose de resíduos florestais, não representa apenas a agregação de valor aqueles resíduos, mas também uma alternativa sustentável e mais acessível para produção desse polícool (xilitol).

A bioconversão do monossacarídeo xilose em xilitol depende da ação de microrganismos. As leveduras, em especial as do gênero *Candida*, são consideradas boas produtoras de xilitol, pois são fermentadores de pentoses, em particular da xilose (SILVA et al., 2004). A via bioquímica de síntese de xilitol a partir de xilose é conhecida e bem caracterizada nos fungos leveduriformes, especialmente os do gênero *Candida*. Essa rota consiste na redução do β-líbio a líbio por intermédio da enzima xilose redutase. A etapa seguinte envolve a oxidação da xilulose pela enzima xilitol desidrogenase.

Diante do exposto, este trabalho objetivou avaliar a aplicação do hidrolisado hemicelulósico da serragem de madeira de jurema preta (*Mimosatenuiflora*), uma espécie abundante na caatinga nordestina, na biossíntese de xilitol pela levedura *Candida tropicalis* ATCC 750.

REFERENCIAL TEÓRICO

Região semiárida brasileira: biodiversidade de espécies arbóreas

A região Nordeste do Brasil possui grande diversidade agroecológica presente em áreas úmidas e semiáridas (LEAL; TABARELLI; SILVA, 2003; SIQUEIRA-FILHO, 2012). Os nove estados da federação que formam a região Nordeste do país, o norte do estado de MG e a ilha de Fernando de Noronha constituem, especificamente, uma das áreas mais representativas do território, o semiárido brasileiro, apresentando aspectos marcantes de sua vegetação ao longo do ano, com riqueza em espécies lenhosas e herbáceas (CASTRO; CAVALCANTE, 2010; SILVA, 2011; SUDENE, 2015).

A região semiárida, por sua vez, caracteriza-se por um clima quente e seco, com evapotranspiração em torno de 2.700 mm/ano, cujos solos são geralmente descritos como pobres e com baixa retenção de umidade (SILVA; GUIMARÃES-FILHO, 2006). Considera-se a região semiárida mais densamente habitado do mundo, e por isso, tem-se acentuado sobre ela um forte impacto causado pela ação do homem, principalmente no que se refere ao corte indiscriminado de espécies arbóreas nativas (DRUMOND et al., 2008).

A flora do semiárido é composta por outros biomas, mas predominantemente pela Caatinga. Trata-se, portanto, de uma cobertura vegetal que inclui grande variedade de espécies nativas. Muitas destas são utilizadas para a produção de forragem (DAMASCENO, 2007), lenha, carvão, estacas, pequenas construções e materiais rústicos. Todos esses produtos são obtidos a partir da exploração da riqueza de espécies desse bioma. Por outro lado, essa utilização não é praticada de acordo com o real conhecimento científico do potencial produtivo e tecnológico dessas espécies (DRUMOND et al., 2008).

Espécie *Mimosa tenuiflora* [Wild.] Poir.

Conhecida vulgarmente como jurema-preta, *M. tenuiflora* trata-se de uma árvore que pertence à família Fabaceae, com ocorrência em quase toda região Nordeste brasileira. É característica da Caatinga, com dispersão descontínua e irregular ao longo de sua área de distribuição. Essa espécie apresenta madeira com alburno castanho-avermelhado-escuro e cerne amarelado, textura média, alta resistência mecânica e durabilidade natural. Sua raiz é pivotante e também do tipo superficial (LEAL et al., 2003; MAIA, 2004).

Por apresentar madeira altamente resistente, a jurema-preta, é bastante utilizada para a produção de estacas, mourões e madeiras rústicas. Além disso, fornece lenha, forragem para o gado e carvão de grande valor energético (SILVEIRA, 2010). Salienta-se que todos esses processos acabem gerando resíduos que tendem a se acumular no ambiente.

Aproveitamento de resíduos agroindustriais

A comunidade científica internacional tem demonstrado cada vez mais interesse na busca por energias renováveis, bem como na utilização de novas fontes energéticas. Atualmente, o uso de resíduos agroindustriais é destaque como uma fonte promissora de energia renovável devido aos danos ambientais causados pela queima dos combustíveis fósseis, bem como seu futuro esgotamento (CHOI et al., 2012).

Por outro lado, o Brasil destaca-se por ser um país de intensa atividade agropecuária-agrícola e de exploração dos recursos florestais. Em decorrência disso, a cobertura vegetal é explorada de maneira abusiva e grande quantidade de resíduo é gerada anualmente. Esses subprodutos são diversificados, tais como cascas, cavacos, costaneiras, pás de serragem, maravalhas (restos de madeiras); bagaços de frutas (laranja, caju, abacaxi, cana-de-açúcar), resíduos de indústrias de sucos e aguardentes, palhas e sabugo, provenientes do processamento de arroz, café, milho e trigo (ALBUQUERQUE et al., 2014).

Infmeros materiais de origem vegetal representam fontes de matéria-prima para produção de energia e produtos de alto valor agregado. Cerca de 180 bilhões de toneladas são produzidas anualmente, dos quais 40% são celulose e 30% hemicelulose (MIRANDA et al., 2011; ROCHA et al., 2011). A penas uma pequena quantidade de celulose, hemicelulose e lignina, produzida como subproduto na agricultura é reaproveitada, sendo que boa parte do resíduo da indústria madeireira é desperdiçado (BRANCO; SANTOS; SILVA, 2011).

Nesse cenário, o Brasil desponta como um forte candidato a assumir a liderança no planeta referente ao aproveitamento integral das biomassas, pois apresenta grande potencial de cultivo de matérias-primas renováveis, dispondo de vantagens comparativas e competitivas tais como: área territorial de grande extensão, maior biodiversidade mundial, possui regiões localizadas em zona intertropical de intensa radiação solar, água em abundância e diversidade de clima (CGEE, 2010).

Matérias-primas hemicelulósicas: celulose, hemicelulose e lignina

A biomassa lignocelulósica é formada por celulose, hemicelulose e lignina, definindo a estrutura da maioria das plantas. De acordo com a natureza dos vegetais, há uma variação na composição desses constituintes, sendo que o maior componente é a celulose (35 - 50 %), seguido da hemicelulose (20 - 35%) e da lignina (10 - 25%). Contudo, outros compostos em menores quantidades podem ser encontrados, tais como proteínas, gorduras e cinzas (BALAT, 2011).

Os fragmentos de celulose e hemicelulose são polímeros de carboidratos que apresentam um grande potencial para a produção de açúcares fermentáveis (DUSSAN, 2013). Esses substratos lignocelulósicos, através da ação de microorganismos são utilizados como matérias-primas em diversas vias biotecnológicas. Esses materiais representam uma grande quantidade de compostos orgânicos e, possuem amplo potencial de uso como matéria-prima através de processos industriais na produção de insumos químicos, alimentos, enzimas e diversos outros bens de consumo (LATIF; RAJOCA, 2001).

Celulose

A celulose é o constituinte de maior abundância na composição da madeira, totalizando aproximadamente a metade da formação de coníferas e angiospermas. Acredita-se ainda, que a celulose é o principal componente da parede celular dos vegetais (KLOCK, 2005). É classificada como um polímero linear de alto peso molecular, formada exclusivamente de β-D-glucose com grau de polimerização que varia entre 1.000 até 5.000 unidades, dependendo da origem da planta (HATFIELD et al., 1999).

Existem vários métodos de pré-tratamento que destroem as paredes celulares expondo os polímeros de açúcares. Nos tratamentos da hidrólise ácida da celulose, por exemplo, a glucose é liberada e pode ser usada para posterior biossíntese de diversos produtos com valor agregado (ROCHA, 2010; ROCHA et al., 2011).

Hemicelulose

A hemicelulose é considerada um heteropolímero menor que a celulose, apresentando grau de polimerização entre 100 e 200 unidades. Possui ramificações com diversos carboidratos como arabinose, xilose, galactose, manose, além de ácidos urônicos (HATFIELD et al., 1999; STAMBUK et al., 2008). Diferente da celulose, sua estrutura pode variar, assim como sua organização estrutural e composição. Apresenta baixa cristalinidade em relação

celulose, sendo hidrolisada com mais facilidade, como resultado da interação entre os diferentes açúcares (SAHA, 2003).

Utilizando a hidrólise ácida (com ácido diluído), ocorre a liberação de hexoses (manose, glucose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose) constituintes da hemicelulose. A xilose é considerada o segundo açúcar mais abundante na Terra. Neste contexto, observa-se, em geral, que os hidrolisados obtidos por essa técnica são caracterizados por apresentarem a xilose como componente de maior constituição. Desse modo, os hidrolisados hemicelulósicos utilizados em processos biotecnológicos tornam-se ideais para a produção de diversos produtos, dentre eles destaca-se o xilitol (MICHEL, 2007).

Lignina

A lignina é um polímero complexo formado de compostos fenólicos, que são também chamados de monolignais. As ligações aleatórias carbono-carbono entre os monolignais resultam na formação de dímeros, trímeros e tetrameros que definem a estrutura complexa da lignina. Essas ligações carbono-carbono constituem o principal obstáculo à ruptura da cadeia de lignina (GOSSEILINK et al., 2004; KESHWANI, 2009).

A lignina é outro importante constituinte lignocelulósico da parede celular vegetal e, conseqüentemente, da madeira, possuindo como principal função sustentar toda a estrutura desses materiais. Este composto está associado às polioses ao longo de ligações covalentes e interações físicas através da parede celular (READING; WELCH; AUST, 2003). As ligninas são consideradas polímeros altamente condensados e compostos por subunidades de ácidos p-hidroxifenil (p-coumárico), coniferil (referente as unidades de guaiacil) e sinapil (referentes a unidades siringil) (HATFIELD et al., 1999).

Xilitol: propriedades e aplicações

O aumento da ingestão de açúcares na dieta, especialmente da sacarose, aumentaram consideravelmente os riscos de problemas de saúde, tais como obesidade e cáries, em escala mundial. Entre os países cuja população é apontada como maiores consumidores de açúcar (sacarose), encontram-se Índia (23.500t), União Europeia (19.742t), Brasil (15.000t) e Estados Unidos (12.620t) (ANUÁRIO ESTATÍSTICO DE AGROENERGIA, 2016). Desse modo, essas populações estão mais susceptíveis a problemas de saúde causados por esse consumo exacerbado (LIMA; BERLINCK, 2003).

Recentes pesquisas têm sido realizadas para viabilizar a substituição dos açúcares que contêm elevado nível calórico por edulcorantes, naturais ou artificiais, como o xilitol. Este é um carboidrato que sob hidrogenação química ou por processo biotecnológico pode ser convertida a xilitol (M. KI-ARVELA et al., 2011; ZHANG et al., 2012).

No ano de 1991, Emil Fisher e sua equipe foram os pioneiros na síntese e descrição do xilitol, classificando-o como um composto orgânico penta-hidroxipentano, além de um cristal branco rúbico. Os mamíferos o produzem em pequena quantidade, sendo assim, considerado como intermediário no metabolismo de carboidratos (MAIA et al., 2008; PEPPER; OLINGERI, 1988). Devido à sua estabilidade física e biológica, torna-se adequado nas aplicações alimentícias e farmacêuticas (MUSSATO; ROBERTO, 2002a; 202b).

O xilitol tem um importante emprego na indústria alimentícia, devido as características como alto poder adoçante (comparado ao da sacarose), baixo teor de calorias (2,4 Kcal/g) e propriedade cariostática. Além disso, o xilitol não participa das reações de Maillard (a qual ocasiona a formação de substâncias escuras nos alimentos) e, dessa forma, não reduz o valor nutricional das proteínas presentes (SANTOS, 2004). Suas características o tornam bastante aplicável no processamento de alimentos como balas, pastilhas, gomas de mascar, caramelos, confeitos, chocolates, sorvetes, geleias, marmeladas, bebidas, etc. (SILVA et al., 1994).

Uma característica marcante que o xilitol apresenta é a sua capacidade de deixar a boca com a sensação de refrescância, que é bastante encontrada em produtos alimentícios, como gomas de mascar e balas. Essa sensação é causada devido ao seu alto calor de dissolução ($34,8 \text{ cal.g}^{-1}$), tornando-o de maior refrescância bucal entre os polissacarídeos (MUSSATO; ROBERTO, 2002a).

O xilitol também foi relatado como de grande eficiência no auxílio ao tratamento de várias doenças como: diabetes (ISLAM, 2001), osteoporose (MATTILA, KANGASMAA; KNUUTTILA, 2005), anemia (WANG; PATTERSON; VAN EYS 1971) e infecções respiratórias (DURAIRAJ et al., 2007), citados por Albuquerque (2014). Além disso, pode ser indicado para pacientes portadores de deficiência da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (BAR, 1991). Foi identificado como um dos 12 constituintes químicos de grande importância em uma lista de mais de 300, de acordo com o Departamento de Energia dos EUA (DOE), podendo ser produzido através de distintas biomassas (WERPY et al., 2014).

Outra alternativa de aplicação do xilitol é na composição alimentícia (MAIA et al., 2008), como na produção de sorvetes contendo esse açúcar em sua fórmula. Os resultados

foram comparados com sorvetes preparados com sacarose, os quais foram mais bem aceitos pelos consumidores. Entretanto, os sorvetes fabricados com xilitol tiveram aceita²o satisfat²ria, o que n^o impede de futuramente serem produzidos. (ALBUQUERQUE et al., 2014). O xilitol e considerado um edulcorante alternativo, podendo ser ingerido por diab²ticos e tamb²m como preventivo de c²ries dent²rias (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

O uso de xilitol na ind²stria farmac²utica e de tratamento odontol²gico e bastante difundido devido a suas propriedades anticariog²nicas j² comprovadas (M² KINEN et al., 2013). Muitos estudos cl²nicos t²m mostrado que o consumo cont²nuo de xilitol pode reduzir o n²mero de c²ries em at²m 100% (BOND, 2016). Outros estudos mostram a efetividade desse a cool-a²scar contra a forma²o de biofilmes bucais, principalmente contra a bact²ria *Streptococcus mutans* (LEE, CHOI; KIM, 2012; MISRA et al., 2012; CAMPUS et al., 2013).

Al²m de *Streptococcus mutans*, estudos revelaram a efic²cia da utiliza²o de xilitol contra outros microorganismos prejudiciais a sa²de bucal, como: *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* (TAPIAINEN et al., 2004), *Escherichia coli* ATCC 8739 e uma cepa de *E. coli* enteropatog²nica (SILVA et al., 2011), *Staphylococcus aureus* (AKIYAMA et al., 2002; MITIPI-PULAFIC et al., 2013), *Pseudomonas aeruginosa* (AMMONS et al., 2011) e *Burkholderia cepacia* (SAJJAN et al., 2004).

De acordo com v²rios estudos, o consumo regular de chicletes contendo xilitol e capaz de reduzir a incid²ncia de c²ries, desse modo, esses efeitos anticariog²nicos impulsionam o uso de xilitol em cremes dentais, gomas de mascar, pastilhas e outros produtos capazes de evitar e prevenir as c²ries (ALBUQUERQUE, 2014; ALBUQUERQUE et al., 2014). Ent²o, em virtude dessas e outras aplica²es nota-se que o xilitol e um produto de valor comercial de grande interesse.

Aspectos gerais da produ²o de xilitol: via qu²mica versus via biotecnol²gica

A produ²o de xilitol pode ser realizado por meio de tr²s processos distintos: (1) qu²mico, atrav²es de redu²o qu²mica de xilose por interm²edio de rea²es de hidrogena²o; (2) microbiol²gico, no qual ocorre a a²o de microorganismos que s²o respons²veis por converter xilose em xilitol e (3) enzim²ico, que est²sendo bastante estudado para a produ²o de xilitol por meio da enzima xilose redutase - XR (PAL et al., 2013). Vale destacar que esse a²scar e comumente fabricado pelas ind²strias por redu²o catal²tica de xilose pura (LEE, KOO; KIM, 2013). A produ²o tradicional de xilitol atrav²es de via qu²mica necessita tamb²m do uso de altas temperaturas e press²es, bem como a exig²ncia de elevado n²vel de purifica²o

(MILESSI, et al., 2009). Isso oferece grandes riscos ambientais, uma vez que se utiliza um catalisador de níquel Raney tóxico (RAFIQUL; SAKINAH, 2012a; 2012b).

Por outro lado, o xilitol pode ser obtido de fontes naturais, como vegetais (banana, alface, morango, couve flor, cenoura, ameixas, framboesas, espinafre e berinjela, entre outros), fungos ou líquidos por extração seguido de líquido. Portanto, como está presente em pequenas proporções (menos de 900 mg em cada 100 g de matéria-prima), esse processo torna-se economicamente inviável (TAMANINI; HAULY, 2004).

O Brasil é conhecido por seu grande potencial de produção de recursos renováveis tais como produtos agrícolas e florestais. Diferentes estudos são reportados na literatura em relação ao uso de resíduos lignocelulósicos para a produção de xilitol. Dentre os resíduos, pode-se citar o bagaço de cana-de-açúcar, a palha de arroz, a palha de trigo, a casca de aveia e as aparas de madeira (TAMANINI; HAULY, 2004; MORAES et al., 2014).

Devido ao seu elevado custo por via tradicional, a produção biotecnológica de xilitol a partir da xilose de hemicelulose oriunda de resíduos florestais, é uma alternativa viável. Além de agregar valor aos resíduos, representaria uma forma mais barata para obtenção de xilitol. Este produto é gerado através da diminuição química da xilose pura obtida, especialmente de hidrolisados hemicelulósicos de madeiras resignadas a consecutivas etapas de purificação (MICHEL, 2007).

Recentes pesquisas objetivam encontrar novas formas de disponibilizar a produção de xilitol em larga escala (MUSSATO; ROBERTO, 2002a; 2002b; ALBUQUERQUE et al., 2014; RAFIQUL; SAKINAH; ZULARISAM, 2015a; 2015b). Um processo que ganhou importância nos últimos anos foi através da via biotecnológica, por meio da ação de microrganismos ou de suas enzimas, na qual verifica-se a conversão da xilose em xilitol, sendo a que a xilose utilizada como substrato é proveniente de materiais lignocelulósicos e pode ser encontrada em grande quantidade (MICHEL, 2007).

O gênero *Candida*: leveduras usadas na produção de xilitol

As leveduras produzem xilitol como um intermediário durante o metabolismo da D-xilose. A xilose redutase (XR) é tipicamente uma enzima dependente de NADPH, enquanto xilitol desidrogenase (XDH) requer NADP⁺. Dessa forma, a conversão do D-xilitol ocorre em duas etapas, uma de redução seguida por outra de oxidação. D-xilose é primeiramente reduzida a D-xilulose por NADPH e posteriormente esse metabólito é oxidado a D-xilitol por

NADP⁺. Essas duas reações são consideradas limitantes na fermentação de D-xilose e produção de xilitol (ALBUQUERQUE et al., 2014).

O gênero *Candida* é formado por ascomicetos geralmente unicelulares. Dentro desse gênero, encontra-se a levedura *Candida tropicalis*, que pode ser empregada em biorremediação, uma vez que possui eficiência para absorver e metabolizar hidrocarbonetos. Além disso, esses microorganismos produzem xilitol (LIMA, 2006).

Essa espécie, assim como outras espécies microbianas, possui um sistema metabólico com XR dependente de NADPH e XDH dependente de NAD⁺ como cofatores e essas enzimas são induzidas por xilose (SENE et al., 2000). Além disso, quando esse microorganismo é previamente cultivado em meio contendo xilose e glicose a atividade das enzimas XR e XDH é aumentada (ARRUDA et al., 2011).

Em muitos casos, sob condições microaeróbicas, leveduras são capazes de transformar resíduos de D-xilose em xilitol. Essa produção varia de acordo com o microorganismo em questão, sugerindo uma regulação de vários níveis (YABLOCHKOVA et al., 2003). Diversos estudos enfatizam a produção de xilitol por meio do metabolismo microbiano. Dentre os gêneros capazes de produzir xilitol, *Candida* sp. é um dos mais extensivamente estudados, mostrando-se como um microorganismo promissor em relação à produção de xilitol (TADA; KANNO; HOURIUCHI, 2012; AHMAD et al., 2013).

Para a obtenção biotecnológica de xilitol, a levedura *Candida tropicalis* é comumente utilizada em virtude de possuir capacidade de sintetizar as enzimas xilose redutase e xilose desidrogenase, ambas envolvidas no processo de conversão de xilose em xilitol (SILVA et al., 2004).

REFERÊNCIAS

AKIYAMA, H.; OONO, T.; HUH, W. K.; YAMASAKI, O.; OGAWA, S., KATSUYAMA, M., ICHIKAWA, H., IWATSUKIA, K. Actions of Farnesol and xylitol against *Staphylococcus aureus*. *Chemotherapy*, v. 48, p. 122-128, 2002.

ALBUQUERQUE, T. L. Produção biotecnológica de xylitol a partir de hidrolizado de bagaço de caju. 148 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará Fortaleza-CE, 2014.

ALBUQUERQUE, T. L.; SILVA-Jr, I. J.; MACEDO, G. R.; ROCHA, M. V. P. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: a review. *Process Biochemistry* v. 49, p. 1779-1789, 2014.

AMMONS, M. C. B.; WARD, L. S.; DOWD, S.; JAMES, G. Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm with lactoferrin and xylitol inhibits the ability of bacteria to respond to damage resulting from lactoferrin iron chelation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 37, n.4, p. 316-23, 2011.

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DE AGROENERGIA. DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DOS ESTADOS UNIDOS (USDA). - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Brasília-DF - 2009. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/> Acesso em: 17 de fevereiro de 2016.

ANTONIO, A. G.; PIERRO, V. S. S.; MAIA, L. C. Caries preventive effects of xylitol-based candies and lozenges: a systematic review. *Journal of Public Health Dentistry*, v. 71, n.13, p.117-124, 2011.

AHMAD, I.; SHIM, W. Y.; KIM, J.H. Enhancement of xylitol production in glycerol kinase disrupted *Candida tropicalis* by co-expression of three genes involved in glycerol metabolic pathway. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 36, p. 1279-84, 2013.

ARRUDA, P.V.; SILVA, D.D.V.; FELIPE, M.G.A. Efeito do glicerol na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii*. Anais do VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação - Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos, São Paulo, Brasil. 2004

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. D. C. L.B.; SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. D. G. D. A. Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. *Biodegradation*, v. 22, n. 4, p. 815 - 22, 2011.

BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*, v. 52, p.858-875, 2011.

BAR, A. Xylitol. In: O'BREEN NABORS, L., GELARDI, R.C. Alternative sweeteners. New York: Marcel Deckers, p.349-79, 1991.

BOND, M. Xylitol: A natural approach to caries prevention. Danisco Sweeteners Ltda. Disponível em: http://www.naturallysweet.com.au/uploads/50072/ufiles/download_info/Xylitol_A_Natural_Approach_To_Caries_Prevention.pdf. Acesso em: 18 de fevereiro de 2016.

BRANCO, F.R., SANTOS, J.C., SILVA, S.S., A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: Xylitol enzymatic production. *Biomass and Bioenergy*, v. 35, n. 7, p. 3241-3246, 2011.

CAMPUS, G.; CAGETTI, M. G.; SALE, S.; PETRUZZI, M.; SOLINAS, G.; STROHMENGER, L.; LINGSTR^a M, P. Six months of high-dose xylitol in high-risk caries subjects a 2-year randomised, clinical trial. *Clinical oral investigations*, v. 17, n. 3, p. 785-91, 2013.

CASTRO, A.S.; CAVALCANTE, A. Flores da caatinga = Caatinga flowers. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido (INSA), 116p., 2010.

CENTRO DE GESTÃO E RECURSOS ESTRATÉGICOS - CGEE. Química Verde no Brasil: 2010-2030. Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, v.438p., 2010.

CHOI, H. S.; CHOI, Y. S.; PARK, H. C. Fast pyrolysis characteristics of lignocellulosic biomass with varying reaction conditions. *Renewable Energy*, v. 42, p. 131-135, 2012.

DAMASCENO, M.M. Composição bromatológica de forragem de espécies arbóreas da Caatinga Paraibana em diferentes altitudes. 61 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, 2007.

DRUMOND, M.A. Produção e distribuição de biomassa de espécies arbóreas no semiárido brasileiro. *Revista Árvore*, v.32, n.4, p.665-669, 2008.

DURAIRAJ, L.; LAUNSPACH, J.; WATT, J. L.; MOHAMAD, Z.; KLINE, J.; ZABNER, J. Safety assessment of inhaled xylitol in subjects with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis: Official Journal of the European Cystic Fibrosis Society*, v. 6, n. 1, p. 31-4, 2007.

DUSSAN, K.J. Produção de bioetanol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Scheffersomyces (Pichia) stipitis* NRRL Y-7124 e *Candida shehatae* UFMG HM 52.2 visando aplicação em bioprocessos com campo eletromagnético. 171 p. Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, SP, 2013

HATFIELD, R. D.; RALPH, J.; GRABBER, J. H. Cell wall structural foundations: molecular basics for improving forage digestibilities. *Crop Science*, 39:27-37. 1999.

ISLAM, S. Effects of xylitol as a sugar substitute on diabetes-related parameters in nondiabetic rats. *Journal of Medicinal Food*, v. 14, n. 5, p.505-511, 2001.

KESHWANI, D. R. Microwave pretreatment of switchgrass for bioethanol production. Tese de Doutorado. Universidade Estadual da Carolina do Norte, Carolina do Norte, Estados Unidos da América - EUA, 2009.

KLOCK, U.; MUIZ, G.I.B; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. Química da madeira. Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências Agrárias, Curitiba-PR, 2005.

LATIF, F; RAJOCA, M.I. Production of ethanol and xylitol from corn by yeasts. *Bioresource technology*, v.77, p.57-63, 2001.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xilose, arabinose, glucose and other products. *Biomass and Bioenergy*, 23, 367-380, 2002.

LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (editores). Ecologia e conservação da caatinga. Ed. Universidade da UFPE, Recife-PE, 822 p, 2003.

LEE, S.H.; CHOI, B. K.; KIM, Y. J. The cariogenic characters of xylitolresistant and xylitol-sensitive *Streptococcus mutans* in biofilm formation with salivary bacteria. *Archives of Oral Biology*, v. 57, n. 6, p. 697-703, 2012.

LEE, J. K., KOO, B. S.; KIM, S. Y. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 7, p. 6170 - 6188, 2013.

LIMA, L. H. A.; BERLINCK, C. N. Xilitol, o adoçante do futuro. *Ciência hoje*, v. 33, n. 95, p. 66-69, 2003.

LIMA, L.H.A. Estudos moleculares dos genes XY L 1 e XY L 2 de *Candida tropicalis* visando a produção de xilitol. 177 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, 2006.

MAIA, G.N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. 1ª ed. Editora leitura & arte, São Paulo-SP, 2004.

MAIA, M. C. A., GALVÃO, A. P. G. L. K., MODESTA, R. C. D.; PEREIRA Jr., A. Avaliação do consumidor sobre sorvetes com xilitol. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, p. 146-151, 2008.

MARVELA, P.; SALMI, T.; HOLMBOM, B.; WILLFORS, S.; MURZIN, D. Y. Synthesis of sugars by hydrolysis of hemicelluloses- A Review. *Chemical Reviews*, v. 111, p. 5638-5666, 2011.

MÄKINEN, K. K.; JÄRVINEN, K. L.; ANTTILA, C. H.; LUNTAMO, L. M.; VAHLBERG, T. Topical xylitol administration by parents for the promotion of oral health in infants: a caries prevention experiment at a Finnish Public Health Centre. *International Dental Journal*, v. 63, n. 4, p. 210-224, 2013.

MATTILA, P. T.; KANGASMAA, H.; KNUUTTILA, M. L. E. The effect of a simultaneous dietary administration of xylitol and ethanol on bone resorption. *Metabolism: clinical and experimental*, v. 54, n. 4, p. 548-51, 2005.

MICHEL, A.C.S. Produção biotecnológica de xilitol e etanol a partir de hidrolisado de casca de soja. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MILESSI, T. S. S.; MORAES, A. S. L.; BRANCO, R. F. SILVA, S. S. Avaliação da concentração inicial de células de *Candida guilliermondii* na produção de xilose redutase a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. 27 a 30 de julho, 2009. Uberlândia, Brasil, 2009.

MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; GUPTA, P.; DUTT, K.; SAXENA, R. K. Fermentation behavior of osmophilic yeast *Candida tropicalis* isolated from the nectar of *Hibiscus rosa sinensis* flowers for xylitol production. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 101, n. 2, p. 393-402, 2012.

MITIP-PULAFIC, D. S.; PAVLOVIĆ, M.; OSTOJIĆ, S.; KNEŽEVIĆ UKCEVIĆ. Antimicrobial effect of natural food preservatives in fresh basil-based pesto spreads. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 38, n.3, p. 1298-1306, 2013.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 38, n. 4, p. 401-413, 2002a.

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

MORAES, B. S.; JUNQUEIRA, T. L.; PAVANELLO, L. G.; CAVALETTI, O.; MANTELATTO, P. E.; BONOMI, A.; ZAIAT, M. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane biorefineries in Brazil from energy, environmental, and economic perspectives: Profit or expense? *Applied Energy*, v. 113, p. 825-835, 2014.

PARAJÓ, J.C., DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*, v. 66, p. 25-40, 1998.

PAL, S.; CHOUDHARY, V.; KUMAR, A.; BISWAS, D.; MONDAL, A. K.; SAHOO, D. K. Studies on xylitol production by metabolic pathway engineered *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource technology*, v.147, p. 449-445, 2013.

PEPPER, T.; OLINGERI, P. M. Xylitol in sugar-free confections. *Food technology*, v. 42, p.98-106, 1988.

RAFIQUL, I. S. M.; SAKINAH, A. M. M. Kinetic studies on acid hydrolysis of Meranti wood sawdust for xylose production. *Chemical Engineering Science*, v. 71, p. 431-437, 2012a.

RAFIQUL, I. S. M. ; SAKINAH, A. M. M. Design of process parameters for the production of xylose from wood sawdust. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 90, n. 9, p. 1307-1312, 2012b.

RAFIQUL, I.S.M., SAKINAH, A.M.M., ZULARISAM, A.W. Evaluation of sawdust hemicellulosic hydrolysate for bioproduction of xylitol by enzyme xylose reductase. *Food and Bioproducts Processing*, v. 94, p. 82-89, 2015a.

RAFIQUL, I.S.M.; SAKINAH, A.M.M.; ZULARISAM, A.W. Inhibition by toxic compounds in the hemicellulosic hydrolysates on the activity of xylose REDUTASE from *Candida tropicalis*. *Biotechnology Letters*, v. 37, p. 191-196, 2015b.

READING, N. S.; WELCH, K. D.; AUST, S. D. Free radical reactions of Wood degrading fungi. In: *Wood Deterioration and Preservation: Advances in Our Changing World*, Washing: ACS Symposium Series, v. 845, p.16-31, 2003.

ROCHA, M. V.P. Produção de bioetanol a partir de pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) por fermentação submersa. 170 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; MACEDO, G. R. Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 38, n. 8, p. 1099-107, 2011.

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

SAJJAN, U.; MOREIRA, J.; LIU, M.; HUMAR, A.; CHAPARRO, C.; FORSTNER, J.; KESHAVJEE, S. A novel model to study bacterial adherence to the transplanted airway: inhibition of *Burkholderia cepacia* adherence to human airway by dextran and xylitol. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, v. 23, n. 12, p. 1382-1391, 2004.

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

SENE, L.; VITOLO, M.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Effect of environmental conditions on xylose reductase and xylitol dehydrogenase production in *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 84, n. 86, p. 371-380, 2000.

- SILVA, S. S.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A. Xilitol: um adoçante alternativo para indústria de alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v. 5, p. 109-117, 1994.
- SILVA, D.D.V.; ARRUDA, P.V.; HASMANN, F.A.; FELIPE, M.G. A. Influência da relação glicose: xilose no crescimento celular de *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado de bagaço de cana. *Anais do VIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação - Universidade do Vale do Paraíba*. São José dos Campos, São Paulo, Brasil. 2004.p.1204-1207.
- SILVA, P.C.G; GUIMARÃES- FILHO, C. Eixo tecnológico da Região Nordeste. In: SOUSA, I. S. F. de (Ed.). *Agricultura familiar na dinâmica da pesquisa agropecuária*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, cap. 3. p. 109-161, 2006.
- SILVA, M.A. Caracterização de leguminosas arbustivo-herbáceas em Pernambuco. 2011. 130 f. Tese (Doutorado em zootecnia) - Universidade Federal Rural do Pernambuco, Recife, 2011.
- SILVEIRA, P.F. Efeito alelopático do extrato aquoso da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild.) Poir.) sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). 48 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró/Rio Grande do Norte, 2010.
- SIQUEIRA-FILHO, J. A. (organização). *A flora das caatingas do Rio São Francisco: história natural e conservação*. 1ª ed. Andrea Jakobsson Estúdio. Rio de Janeiro-RJ. 552p. 2012.
- SUDENE. Superintendência do Desenvolvimento do Nordeste. <http://www.sudene.gov.br/aceso-a-informacao/institucional/area-de-atuacao-da-sudene/regiao-nordeste/vegetacao> Recife-PE. Acesso em 19 de fevereiro de 2015.
- TADA, K.; KANNO, T.; HORIUCHI, J. Enhanced production of bioxylitol from corn cobs by *Candida magnolia*, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 51, p. 10008-10014, 2012.
- TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol*. *Semina: Ciências Agrárias*, Maringá v. 25, n. 4, p. 315-330. 2004.
- TAPIAINEN, T.; SORMUNEN, R.; KAIJALAINEN, T.; KONTIOKARI, T.; IKHEIMO, I.; UHARI, M. Ultrastructure of *Streptococcus pneumoniae* after exposure to xylitol. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, v. 54, n.1, p. 225-8, 2004.
- WANG, Y. M.; PATTERSON, J. H.; VAN EYS, J. The potential use of xylitol in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency anemia. *The Journal of clinical investigation*, v. 50, n. 7, p. 1421-8, 1971.

WERPY, T.; PETERSON, G.; ADEN, A.; BOZELL, J.; HOLLADAY, J.; WHITE, J.; MANHEIM, A.; ELIOT, D.; LASURE, L.; JONES, S. Top value added chemicals from biomass. Volume 1- Results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. US Depart of Energy, Washington, DC, 2014.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S.; Microbial conversion of D-xylose to xylitol. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 87, p. 1-14, 1998.

YABLOCHKOVA, E. N.; BOLOTNIKOVA, O. I.; MIKHAILOVA, N.P.; NEMOVA, N. N.; GINAK, A. I. Specific Features of Fermentation of D-Xylose and D-Glucose by Xylose-Assimilating Yeasts. Applied Biotechnology and Microbiology, v. 39, n. 3, p. 265 - 269, 2003.

ZHANG, J.; GENG, A., YAO, C., LU, Y., LI, Q. Xylitol production from dxylose and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of *Candida athensensis* SB18. Bioresource technology, v.105, p. 134-41, 2012.

CAPÍTULO I - BIOCONVERSÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE
MADEIRA DE MIMOSA TENUIFLORA EM XILITOL
(A ser submetido ao periódico Revista Caatinga)

BIOCONVERSÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE MADEIRA DE Mimosa tenuiflora EM XILITOL

RESUMO

A hidrólise de hemicelulose libera açúcares como glucose e xilose, que podem ser usados como um substrato fermentável para a bioprodução de materiais com valor agregado. Assim, o objetivo desse trabalho foi estudar a bioconversão da serragem de *Mimosa tenuiflora* (SMT) através de hidrólise ácida, visando maior concentração de xilose por meio de um Delineamento Compósito Central (DCC) para posterior produção de xilitol por via biotecnológica, utilizando a levedura *Candida tropicalis* ATCC750. No DCC, foram avaliadas as variáveis concentração de H_2SO_4 (M) e de biomassa (% m/v). As condições da hidrólise foram 121 °C por 15 minutos, realizada em autoclave. A composição do hidrolisado foi glucose (2,2 g.L⁻¹), xilose (19,2 g.L⁻¹), arabinose (9,9 g.L⁻¹), ácido acético (0,08 g.L⁻¹) e fórmico (6,9 g.L⁻¹). A fermentação do Hidrolisado da Serragem de *Mimosa tenuiflora* (HSMT) e meio sintético de crescimento (SGM) foram realizadas em distintas temperaturas (25, 30 e 35 °C), a 150 rpm e 100 mL de volume reacional por 72h. Comparado ao SGM, a fermentação do HSMT mostrou maior crescimento celular (8,51 g.L⁻¹) e produção de xilitol (12,68 g.L⁻¹). Com o aumento da temperatura, foi observada redução no crescimento celular, bem como na produção de xilitol, sendo a temperatura de 25 °C a mais favorável para obtenção dos maiores valores de xilitol com o hidrolisado. Diante do exposto, a serragem de *M. tenuiflora* representa um substrato com potencial biotecnológico promissor para obtenção de xilitol.

Palavras-chave: Jurema-preta. Serragem. Fermentação. *Candida tropicalis*.

BIOCONVERSION OF HEMICELULOSIC HYDROLISATE FROM WOOD SAWDUST FROM *Mimosa tenuiflora* INTO XILITOL

ABSTRACT

Hemicellulose acid hydrolysis releases sugars such as glucose and xylose, which can be used as a fermentable substrate for the bioproduction of important materials. The objective of this work was to study the bioconversion of sawdust *Mimosa tenuiflora* (SMT) by acid hydrolysis to subsequent biotechnological production of xylitol, using yeast *Candida tropicalis* ATCC750. The concentration of xylose released was evaluated by a Central Composite Design (DCC). In the DCC, we evaluated different concentrations of H_2SO_4 (in M) and biomass (% w/v). In autoclaving, the hydrolysis conditions were 121 °C, for 15 minutes. The composition obtained by the hydrolyzate of sawdust *Mimosa tenuiflora* (HSMT) was glucose (2.2 g.L⁻¹), xylose (19.2 g.L⁻¹), arabinose (9.9 g.L⁻¹) acetic acid (0.08 g.L⁻¹) and formic acid

(6.9 g.L⁻¹). The fermentations of the HSMT and synthetic growth medium (SGM) were performed at different temperatures (25, 30 and 35 °C), 150 rpm and 100 mL of reaction volume for 72 hours. When we compared to the SGM, the fermentation of HSMT showed greater the cell growth and production of xylitol (8.51 g.L⁻¹ and 12.68 g.L⁻¹, respectively). Temperature increase reduced cell growth as well as the production of xylitol. At 25 °C, we obtained better conditions for larger production of xylitol using the hydrolyzate as a substrate. Thus, the sawdust *M. tenuiflora* represented a promising biotechnological source to obtain xylitol.

Keywords: Jurema-preta. Sawdust. Fermentation. *Candida tropicalis*.

INTRODUÇÃO

A flora do semiárido brasileiro é composta por diversos biomas, contudo, um a Caatinga representa seu bioma predominante. Trata-se, portanto, de uma cobertura vegetal que inclui grande variedade de espécies nativas. Muitas destas são utilizadas para a produção de forragem (DAMASCENO, 2007), lenha, carvão, estacas, pequenas construções e móveis rústicos. Todos esses produtos são obtidos a partir da exploração da riqueza de espécies desse bioma. Por outro lado, essa utilização não é praticada de acordo com o real conhecimento científico do potencial produtivo e tecnológico dessas espécies (DRUMOND et al., 2008).

Conhecida vulgarmente como jurema-preta, *M. tenuiflora* trata-se de uma árvore que pertence à família Fabaceae, com ocorrência em quase toda região Nordeste brasileira. É característica da Caatinga, com dispersão descontínua e irregular ao longo de sua área de distribuição. Essa espécie apresenta uma madeira com alburno castanho-avermelhado-escuro e cerne amarelado, textura média, alta resistência mecânica e durabilidade natural (LEAL et al., 2003; MAIA, 2004). Por apresentar madeira altamente resistente, a jurema-preta, é bastante utilizada para a produção de estacas, mourões e móveis rústicos. Além disso, fornece lenha, forragem para o gado e carvão de grande valor energético (SILVEIRA, 2010).

Utilizando hidrólise ácida aliada a alta temperatura, resíduo de madeiras pode servir como substrato para uma reação química que favorece a liberação de hexoses (manose, glucose e galactose) e pentoses (xilose e arabinose), constituintes da fração hemicelulósica. A xilose é considerada o segundo açúcar mais abundante na Terra. Neste contexto, observa-se, em geral, que os hidrolisados obtidos por essa técnica são caracterizados por apresentarem a xilose como componente de maior constituição. Desse modo, os hidrolisados

hemicelulósicos podem ser utilizados em processos biotecnológicos e tornam-se ideais para a produção de diversos produtos, dentre eles destaca-se o xilitol (MICHEL, 2007; RAFIQUIL; SAKINAH, 2012a; 2012b; RAFIQUIL et al., 2015a; 2015b).

O xilitol é um composto de estrutura linear aberta e fórmula molecular $C_5H_{12}O_5$, extremamente solúvel em água. Esse poliól apresenta propriedades anticariogênicas e poder adoçante, sendo assim, importante para as indústrias farmacêuticas, alimentícias e odontológicas (MILESSI et al., 2009). É um açúcar largamente encontrado na natureza, além de ser um intermediário para o metabolismo humano. Trata-se de um adoçante natural que pode ser encontrado nas fibras de alguns vegetais, como ameixa, framboesa e milho (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

Devido ao seu elevado custo por via química, a produção biotecnológica de xilitol a partir da xilose de hemicelulose oriunda de resíduos florestais, é uma alternativa viável. Além de agregar valor aos resíduos, representaria uma forma mais barata para obtenção de xilitol. Este produto é gerado através da redução química da xilose pura obtida, especialmente de hidrolisados hemicelulósicos de madeiras resignadas a consecutivas etapas de purificação (MICHEL, 2007). A fração hemicelulósica, por exemplo, pode ser hidrolisada para liberação de xilose e, em seguida, ser fermentada para produzir xilitol (ZHANG et al., 2012).

Diante do exposto, este trabalho objetivou estudar a bioconversão da serragem de *Mimosa tenuiflora* (SMT) através de hidratação visando a obtenção de xilose para posterior produção de xilitol por via biotecnológica utilizando a levedura *Candida tropicalis* ATCC750.

MATERIAIS E MÉTODOS

Área de estudo e coleta de indivíduos de *M. tenuiflora*

As coletas de madeira foram realizadas na Fazenda NUPEARIDO (Núcleo de Pesquisa para o Semiárido), que pertence à Universidade Federal de Campina Grande, Campus de Patos, localizada a seis quilômetros de distância da cidade de Patos-PB, nas coordenadas geográficas 07°05'10" Sul e 37°15'43" Oeste (SALES, 2008).

A identificação e a seleção dos indivíduos de *M. tenuiflora* foi realizada no campo, em área de Caatinga. Foram escolhidos indivíduos nativos dessa espécie, com base na altura comercial, uniformidade dos troncos, medição do Diâmetro à Altura do Peito (DAP) variando de 08 a 10 cm, nível de bifurcação e condições fitossanitárias. A partir desses critérios de

seleção, cinco ramos de jurema-preta foram abatidas com auxílio de motosserra – base da planta e os ramos mais finos (copa) foram retirados.

A serragem foi seca a 50 °C durante 24 h. Decorrido este procedimento, o material foi peneirado e armazenado até o uso, – temperatura ambiente. As partículas retidas entre 20-80 mesh (0,25 mm a 0,84 mm) de malha foram usadas como matéria-prima para os experimentos.

Caracterização da serragem de *M. tenuiflora*

A serragem de *M. tenuiflora* (SMT) in natura e após hidrólise com ácido sulfúrico foram caracterizadas quanto – sua composição de celulose, hemicelulose e lignina, de acordo com as metodologias de Rocha et al. (1997) e validada por Gouveia et al. (2009). As análises dos extraíveis foram descritas conforme o protocolo NREL/TP-51042619 (SLUITER et al., 2008a) e a determinação de sólidos totais e cinzas segundo NREL/TP-510-42621 (SLUITER et al., 2008b).

Determinação dos sólidos totais

Para a determinação do teor de sólidos totais, tomou-se como base a metodologia do National Renewable Energy Laboratory NREL/TP-510-42621 (SLUITER et al., 2008b). Foram adicionados 0,5 g de SMT em cadinhos de 25 mL, previamente pesados. Em seguida, foram levados para estufa (Tecnal TE-394/1) a 105 °C por 4 h. Decorrido esse período, o material foi transferido para um dessecador por uma hora, a fim de que que atingisse – temperatura ambiente, para logo após isso serem pesados. A amostra foi adicionada novamente em estufa a 105 °C até alcançar peso constante. Determinou-se a percentagem de sólidos totais de acordo com a Equação 1.

$$\% \text{ Sólidos Totais} = 1 - \left(\frac{m_{\text{MIDA}} - m_{\text{SECA}}}{m_{\text{MIDA}}} \right) * 100 \quad (1)$$

Determinação de extraíveis

A percentagem dos extraíveis do material lignocelulósico foi determinada usando-se 3 g de amostra (SMT) adicionada em cartuchos de papel através do método de Sohlex, com extração realizada com 80 mL de etanol 95 % (v/v) a 80 °C por 8 h, no determinador de ácidos e gorduras (Tecnal, TE-044-5/50). A seguir, os emboilers, previamente pesados, seguiram com o solvente e extrato para estufa com circulação de ar (Tecnal TE-394/1) a 60 °C por 24 h. Logo após, foram adicionados ao dessecador durante 1 h – temperatura ambiente para

pesagem. Através da Equação 2 foi possível calcular a percentagem de extraíveis no material lignocelulósico.

$$\% \text{ Sólidos Extraíveis} = (m_i - m_f) / ST * 100 \quad (2)$$

Sendo:

m_i = massa inicial do emboiler;

m_f = massa final do emboiler;

ST = percentagem de sólidos totais.

Determinação do teor de celulose, hemicelulose e lignina

Análise estrutural de carboidratos (celulose e hemicelulose) e lignina, da SMT in natura e após a hidrólise com ácido sulfúrico diluído, foi realizada de acordo com a metodologia do protocolo NREL/TP-510-42618 (SLUITER et al., 2008c) com algumas modificações, de acordo com as etapas a seguir.

Hidrólise da SMT com ácido sulfúrico e preparação para análises

Com 1 g da amostra extraída com etanol de acordo com o item 2.2.2, a hidrólise rápida do material lignocelulósico foi iniciada, no qual foi adicionado 1 g da amostra em tubos de ensaios de 100 mL rosqueado com tampa e 3 mL de H_2SO_4 72 % (v/v), homogeneizado em vortex por 1 min. A seguir, a amostra passou por um processo de agitação durante 1 h em banho (Banho Dudnoff Orbital TE-0532) a 30 °C. Após 60 min de hidrólise, o ácido sulfúrico foi diluído com 84 mL de água deionizada. Em seguida, o tubo de ensaio foi invertido várias vezes para homogeneizar todo o líquido. A hidrólise foi completada em autoclave a 121 °C por 1 h. Após autoclavagem, os tubos foram retirados, resfriados à temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração a vácuo. Os experimentos foram realizados em triplicata. Depois de filtrado, o líquido resultante foi armazenado para análises de açúcares (xilose, glucose e arabinose), ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural.

Lignina insolúvel em água (LIA)

O material retido com a lignina insolúvel no funil de separação com placa porosa de número 02, previamente pesado, foi seco em estufa a 105 °C por 4 h. A seguir, o funil com a amostra em dessecador foi resfriado à temperatura ambiente por 1 h. Em seguida, o funil foi pesado e levado para estufa a 105 °C até atingir peso constante. As amostras foram feitas em triplicata. Posteriormente, os funis com a lignina residual foram adicionados em mufla a 575

éC por 24 h, aproximadamente, seguindo o programa de rampa de temperatura: a partir da temperatura ambiente a 105 éC com posterior aquecimento a 105 éC durante 12 minutos, rampa de 250 éC a 10 éC/minuto, rampa de 575 éC a 20 éC/minuto com aquecimento a 575 éC por 180 minutos e após resfriamento para 105 éC até as amostras serem removidas para um dessecador. As amostras foram resfriadas por 1 h para pesagem dos funis mais as cinzas (cinzas insolúveis em ácido). É denominado RIA, a percentagem de resíduo insolúvel em ácido, estando incluídas lignina e cinzas. Por outro lado, a LIA refere-se à lignina insolúvel. Ambas, RIA e LIA, foram calculadas de acordo com as Equações 3 e 4, respectivamente:

$$\% \text{ RIA} = (m_{\text{filtro+resíduo}} - m_{\text{filtro}}) / \text{ST} * 100 \quad (3)$$

$$\% \text{ LIA} = ((m_{\text{filtro+RIA}} - m_{\text{filtro}}) - (m_{\text{filtro+cinza}} - m_{\text{filtro}})) / \text{ST} * 100 \quad (4)$$

Lignina solúvel em ácido (LSA)

Através de espectofotometria foi possível determinar a percentagem de lignina solúvel em ácido presente no hidrolisado, de acordo com a Equação 5. O comprimento de onda de 240 nm foi utilizado e a absorbância do espectofotômetro foi tomada como referência com água deionizada.

$$\% \text{ LSA} = (UV_{\text{abs}} \cdot V_{\text{filtrado}} \cdot f_D) / \text{ST} * 100 \quad (5)$$

Sendo:

UV_{abs} = média da absorbância da amostra a 240 nm;

V_{filtrado} = volume final utilizado na hidrólise;

f_D = fator de diluição utilizado para diluir a solução caso a absorbância seja maior que 1,0;

ST = sólidos totais.

Análise dos carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural para determinação de celulose e hemiceluloses

A fração líquida do hidrolisado foi utilizada para analisar carboidratos, furfural, hidroximetilfurfural e ácidos orgânicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, utilizando um sistema de HPLC (Waters, Milford, MA, E.U.A.) equipado com um detector de índice de refração Waters 2414 e com uma coluna Aminex HPX-87H (Bio Rad, Hercules, CA, USA). H_2SO_4 (solução em água deionizada a 5mM) foi utilizada como fase móvel, com vazão de 0,5 mL.min⁻¹ a 65 éC. Foram construídas curvas de calibração usadas nas

concentrações de cada componente, através da relação das concentrações dos padrões com as áreas dos cromatogramas.

A celulose e hemicelulose foram determinadas através das concentrações de carboidratos e ácidos orgânicos obtidos, utilizando-se fatores de conversão para converter a massa desses compostos em massa de celulose e hemicelulose. Tais fatores baseiam-se na estequiometria de conversão em seus compostos percursores (celulose e hemicelulose). A percentagem calculada na obtenção da celulose depende de fatores que são 0,95, 0,90, 3,09 e 1,29 para celobiose, glucose, ácido fórmico e hidroximetilfurfural, respectivamente. Para determinar a percentagem de hemicelulose os valores de 0,88, 0,88, 1,37 e 0,72 para xilose, arabinose, furfural e ácido acético, respectivamente, foram utilizados. As Equações 6 e 7 apresentam o cálculo da percentagem de celulose e hemiceluloses, respectivamente.

$$\% \text{ Celulose} = (m_{\text{celobiose}} \cdot 0,95 + m_{\text{glucose}} \cdot 0,90 + m_{\text{ácido fórmico}} \cdot 3,09 + m_{\text{HMF}} \cdot 1,29) / ST \cdot 100 \quad (6)$$

$$\% \text{ Hemicelulose} = (m_{\text{xilose}} \cdot 0,88 + m_{\text{arabinose}} \cdot 0,88 + m_{\text{ácido acético}} \cdot 1,37 + m_{\text{furfural}} \cdot 0,72) / ST \quad (7)$$

Sendo:

m_{celulose} = massa da celobiose;

m_{glucose} = massa da glucose;

$m_{\text{ácido fórmico}}$ = massa do ácido fórmico;

m_{HMF} = massa do hidroximetilfurfural;

m_{xilose} = massa da xilose;

$m_{\text{arabinose}}$ = massa da arabinose;

$m_{\text{ácido acético}}$ = massa do ácido acético;

m_{furfural} = massa do furfural.

Delineamento Compósito Central (DCC) e condições de hidratação da SMT

Com o intuito de verificar as melhores condições da hidratação ótima da serragem obtida, visando a liberação de xilose foi realizado idealizado um Planejamento Experimental para avaliar a concentração de H_2SO_4 utilizado (0,2; 0,6; 1,0 e 1,16 M) e de biomassa, isto é, a serragem produzida conforme o item 2.1 (15, 20, 25 e 27,07%, m/v), sendo a variável resposta a concentração de xilose liberada (em g.L^{-1}) após a hidratação ótima. Os efeitos de cada

uma das variáveis selecionadas foram analisados em relação à concentração de xilose obtida, utilizando o programa computacional STATISTICA versão 7.0. Os efeitos significantes foram avaliados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste F ($p < 0.05$).

As biomassas de serragem foram hidrolizadas com H_2SO_4 nas concentrações acima descritas em autoclave a $121\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos, em frasco Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de volume de reação. Decorrida a hidrólise, o líquido resultante foi separado da fase sólida por filtração a vácuo. O pH foi ajustado a 6.0 usando hidróxido de cálcio em pó ($Ca(OH)_2$) e, então, filtrado para separar o precipitado resultante (ROCHA, 2010; ROCHA et al., 2011).

Microrganismo *Candida tropicalis* ATCC 750

A cultura pura de *Candida tropicalis* ATCC 750 utilizada nos ensaios fermentativos foi proveniente de uma cultura estoque da levedura originária do Laboratório de Bioengenharia do Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (GPBio) do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Armazenamento do microrganismo

A cultura foi armazenada em meio Σ gar YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) em tubos inclinados contendo 20 g.L^{-1} de D (+) glucose anidra (dextrose), 5 g.L^{-1} de extrato de levedura, 5 g.L^{-1} de peptona bacteriológica, 1 g.L^{-1} de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), 5 g.L^{-1} de sulfato de magnésio mono-hidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) e 20 g.L^{-1} de Σ gar dissolvidos em água, esterilizados a $121\text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 minutos e mantidos a $-4\text{ }^\circ\text{C}$. Posteriormente, a levedura *Candida tropicalis* ATCC 750, foi replicada em placas de Petri que continham o meio Σ gar YEPD, sendo incubada a $30\text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h em estufa microbiológica.

Preparação do meio de inóculo do microrganismo

Foram utilizados dois meios de inóculo: o primeiro deles foi denominado meio sintético (SGM), composto por 3 g.L^{-1} de extrato de levedura, 3 g.L^{-1} de fosfato de potássio dibásico anidro P.A. (K_2HPO_4) e 1 g.L^{-1} de sulfato de magnésio hepta-hidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), esterilizados a $121\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 minutos. Separadamente $18,8\text{ g.L}^{-1}$ de xilose foi esterilizado a $110\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos, posteriormente, misturou-se as substâncias das duas condições. O outro meio de inóculo foi o HSMT, suplementado com 3 g.L^{-1} de extrato de levedura, 3 g.L^{-1}

de fosfato de potássio dibásico anidro P.A. (K_2HPO_4) e 1 g.L^{-1} de sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), esterilizado a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos.

Após o crescimento em placa Petri, três alíquotas de células foram transferidas para 100 mL de meio de inóculo (SGM ou HSMT), contidos em frascos Erlenmeyers de 250 mL, funcionando como o meio de adaptação das células para, posteriormente, serem transferidas para os seus respectivos meios de produção.

O inóculo foi incubado em agitador orbital (TECNAL, TE-420) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h. Após 24 h, o meio foi centrifugado (REFRIGERATED CENTRIFUGUE MOD.280 R) a 6.000 rpm por 15 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, para obter células para os ensaios de produção.

Seleção do HSMT a partir do DCC para estudo da influência da temperatura na produção de xilitol

A seleção das melhores condições de produção de HSMT para estudo da biossíntese de xilitol fundamentou-se no critério de escolha do meio com mais xilose liberada sem a presença de inibidores, observado no item 2.3. A concentração inicial do microorganismo inoculado no meio de cultura foi de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ (concentração celular úmida). Essa fermentação foi realizada em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL de meio em agitador rotativo a 150 rpm e diferentes temperaturas (25 , 30 e $35 \text{ }^\circ\text{C}$). Durante o processo, amostras foram previamente coletadas do meio de cultivo e submetidas a análises de teor de açúcares, concentração de xilitol e concentração celular. Meio SGM também foi produzido de acordo com o item anterior e avaliado em diferentes temperaturas (25 , 30 e $35 \text{ }^\circ\text{C}$), com o intuito de investigar a influência desse fator na produção biotecnológica de xilitol. Os efeitos de cada temperatura foram analisados para observar o maior rendimento de xilitol, bem como o maior consumo de açúcares e ausência ou presença de compostos inibidores. Os meios SGM e HSMT foram acondicionados em frascos tipo Erlenmeyer de 250 mL e esterilizados a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ por 10 minutos em autoclave. Após esta etapa, foi adicionado o inóculo ($0,2 \text{ g.L}^{-1}$). Os ensaios foram conduzidos em duplicata a 150 rpm em diferentes temperaturas. Amostras foram coletadas a cada 12h até um tempo total de 72h de fermentação para quantificação de concentração celular, análise de açúcares consumidos e produtos formados.

Cálculo da concentração máxima (P), produtividade (Q) e rendimento de xilitol ($Y_{P1/S1}$)

A produtividade de xilitol com base no consumo de xilose (Q) pelo microorganismo avaliado foi calculada por meio da equação 8:

$$1 = \frac{P}{t} \quad (8)$$

Sendo:

P : concentraç^o máxima de xilitol (g.L^{-1});

t : Tempo em horas que foi obtido P .

O rendimento em xilitol com base no consumo de xilose ($Y_{P1/S1}$) pelo microorganismo avaliado foi calculado por meio da Equaç^o 8:

$$Y_{P1/S1} = \frac{(P_1 - P_0) / S_{10}}{S_1 - S_0} \quad (9)$$

Sendo:

$Y_{P1/S1}$: rendimento de xilitol por xilose (g.g^{-1});

P_1 : concentraç^o de xilitol final (g.L^{-1});

P_0 : concentraç^o inicial de xilitol (g.L^{-1});

S_{10} : concentraç^o inicial de xilose (g.L^{-1});

S_1 : concentraç^o final de xilose (g.L^{-1}).

Métodos Analíticos

Determinaç^o do Crescimento Celular de *C. tropicalis*

O crescimento celular de *C. tropicalis* foi determinado medindo a densidade óptica das amostras, utilizando um espectrofotômetro de UV-visível (20 Genesys, BR) a 600 nm, e a concentraç^o de células (g.L^{-1}) foi determinada por uma curva de calibraç^o de peso seco (g.L^{-1}) em funç^o da densidade óptica (600 nm).

Determinaç^o de carboidratos, inibidores e xilitol

As concentrações de glucose, xilose, arabinose, inibidores (ácidos orgânicos, furfural e hidroximetilfurfural (5-HMF)) e xilitol foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando o sistema de HPLC (Waters, Milford, MA, E.U.A.). O efluente era 5 mmol L^{-1} de H_2SO_4 em água MilliQ (Simplicidae 185, Milipore, Billerica, MA) a uma taxa de fluxo de 0,5 mL min^{-1} a 65 $^{\circ}\text{C}$. As amostras foram identificadas por comparaç^o dos tempos de retenç^o dos carboidratos, dos inibidores e do xilitol, pelas curvas padrão.

Métodos Estatísticos

Os efeitos significativos avaliados no trabalho foram analisados através da análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$), utilizando software Microcal Origin 8.1 (Microcal Sttwar Inc., Northan, MA, USA). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata ou duplicata

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do hidrolisado hemicelulósico da serragem de *M. tenuiflora* (SMT) antes e após tratamento com hidrólise ácida

Tabela 1 - Composição química percentual (da massa total) da serragem de *M. tenuiflora* (SMT) in natura e após hidrólise ácida (20% m/v de biomassa, H_2SO_4 0,6 mol.L⁻¹, 121 °C por 30 minutos).

Constituintes da Biomassa	SMT in natura (em %)	SMT após Hidrólise Ácida (em %)
Celulose	30,68	27,78
Hemicelulose	23,09	20,91
Lignina Total	40,94	49,73
Extraíveis	7,47	1,825
Cinzas	4,15	3,20

A Tabela 1 apresenta a caracterização da serragem de *M. tenuiflora* (SMT) in natura e após a hidrólise com ácido sulfúrico. A serragem in natura apresentou 30,68 % de celulose, 23,09 % de hemicelulose, 40,94 % de lignina total, 7,47 % de extraíveis e 4,15 % de cinzas. A SMT utilizada possui teor de hemicelulose, fração oriunda da xilose, inferior ao de outros resíduos citados na literatura. Por exemplo, Cheng et al. (2009) relataram uma quantidade de 34,32 % de hemicelulose na composição de espiga de milho, Boussarsar et al. (2009) citaram que o bagaço de cana-de-açúcar apresentou 26 % de hemicelulose em sua composição e Rafiqul et al. (2015a) relataram que a serragem de madeira Meranti continha em sua

composi o 30,64 % de hemicelulose. Na serragem tratada com ácido sulfúrico (HSMT), observou-se uma redu o não significativa da fra o hemicelulósica. Portanto, devido   disponibilidade da SMT na região semiárida do Nordeste brasileiro e por não haver trabalhos disponíveis na literatura para a produ o de xilitol utilizando a serragem dessa espécie de leguminosa como substrato, este resíduo tem potencial como matéria-prima na síntese de produtos de alto valor agregado, tais como o xilitol. Rocha et al. (2011) e Kamat et al. (2013) investigaram na última década a produ o biotecnológica de xilitol a partir de matérias lignocelulósicas, visto a importância do aproveitamento desses resíduos e a possibilidade de produ o de produtos com valor agregado, tais como o xilitol. Rocha et al. (2011) e Kamat et al. (2013) investigaram na última década a produ o biotecnológica de xilitol a partir de matérias lignocelulósicas, visto a importância do aproveitamento desses resíduos e a possibilidade de produ o de produtos com valor agregado.

A hidrólise árida realizada foi capaz de liberar glicose, xilose e arabinose a partir da celulose e hemiceluloses presentes na SMT. Além disso, ácido acético também foi formado durante a hidrólise árida. O hidrolisado da serragem de *M. tenuiflora* (HSMT) continha 2,56 g.L⁻¹ de glicose, 24,82 g.L⁻¹ de xilose, 6,22 g.L⁻¹ de arabinose, 6,57 g.L⁻¹ de celobiose e 0,04 g.L⁻¹ de ácido acético (ver Tabela 2). A concentra o total de a c ares fermentáveis obtidos por hidrólise árida, incluindo glicose, xilose e arabinose foi aproximadamente 33,61 g.L⁻¹. Assim, o HSMT   sugerido aqui como um substrato para crescimento microbiano, em virtude da presença dessas fontes de carbono. Comparando-se com dados da literatura, pode-se salientar que a hidrólise árida realizada foi um tratamento eficiente na obten o dos a c ares de interesse. Alguns autores que realizaram tratamento semelhante, obtiveram resultados inferiores ao hidrolisar materiais lignocelulósicos diversos. Mateo et al. (2013) obtiveram aproximadamente 25 g.L⁻¹ de xilose, glicose e arabinose a partir de resíduos de poda de oliveira. Branco et al. (2011), por sua vez, hidrolisaram bagaço de cana-de-a c ar e obtiveram 28,5 g.L⁻¹ de a c ares fermentescíveis. Castro et al. (2013), hidrolisando lascas de madeira de eucalipto com utiliza o de ácido sulfúrico, obtiveram 8,1 g.L⁻¹ de carboidratos (glicose, xilose e arabinose).

Foi observado que após o ajustamento do pH com Ca(OH)₂, a quantidade total de a c ares foi reduzida (33,61   32,19 g.L⁻¹) no HSMT. De fato, isso não representa uma redu o significativa no processo. Em rela o   xilose, ocorreu um decréscimo de apenas 0,06 g.L⁻¹ após o ajuste de pH. Essa pequena redu o de a c ares presentes no hidrolisado em estudo não

é prejudicial, pois para se estabelecer um processo visando a destoxificação de hidrolisados, tratamentos de adsorção em carvão ativado tem sido comumente empregados (ROCHA, 2010; ALBUQUERQUE et al., 2014). Alguns autores (MARTON, 2002; VILLARREAL, 2005) afirmam que a metodologia de adsorção por carvão ativado durante o tratamento de hidrolisados embora propicie a remoção de compostos tóxicos e clarificação dos meios pode, em certos casos, resultar na perda de açúcares, o que representa um grande inconveniente nos ensaios de fermentações posteriores. No HSMT foi observada redução na concentração de ácido acético após o ajuste de pH do hidrolisado com Ca(OH)_2 . Vale salientar que não foram encontrados compostos inibidores como furfural e 5 HMF, em quaisquer concentrações, tomando como base o nível de detecção do cromatógrafo.

É importante ressaltar que a alcalinização do HSMT que ocorre durante o ajuste de pH, também pode ser considerado um método de destoxificação por tratamento químico com Ca(OH)_2 ou CaO . Através da adição destes reagentes no tratamento do hidrolisado, ocorre aumento de pH acima de 10, sob condições de temperatura e tempo de reação controlados (chamado de overliming, que significa alcalinização). Após todo esse processo, o pH da mistura é ajustado ao valor de cultivo do microrganismo com H_2SO_4 e o precipitado formado é removido por filtração. As vantagens desse método são: baixo custo, remoção parcial de compostos como ácido acético e fenólicos, precipitação de íons metálicos tóxicos de Fe, Ni, Cr e conversão de compostos menos tóxicos (tais como ácido furfural), metabolizável por fermentação de microrganismos (PARAJÓ et al., 1998).

Tabela 2 - Composição monossacarídica (em g.L^{-1}) do HSMT sem ajuste de pH e com ajuste de pH utilizando Ca(OH)_2 .

Monossacarídeo	Concentração no HSMT sem ajuste de pH (g.L^{-1})	Concentração no HSMT com ajuste de pH (g.L^{-1})
Glucose	2,56	2,44
Xilose	24,82	24,76
Arabinose	6,22	4,99

Celobiose	6,57	5,75
Ácido Acético	0,04	0,03

Planejamento experimental para obtenção de xilose

A Tabela 3 apresenta os valores obtidos para o planejamento experimental, no qual foram avaliadas a influência das variáveis concentração de H_2SO_4 (em M) e concentração de biomassa de serragem (em %, m/v) na obtenção de xilose da SMT. A hidrólise ácida auxiliou a obtenção de açúcares fermentescíveis, especialmente xilose, a partir do resíduo de madeira nas condições testadas.

Tabela 3 - Concentração de xilose liberada a partir da hidrólise ácida da biomassa da serragem de *M. tenuiflora*.

Experimento	Conc. de H_2SO_4 (M)	Conc. de biomassa (% m/v)	Conc. de xilose ($g \cdot L^{-1}$)
1	0,20	15,00	4,02
2	0,20	25,00	4,20
4	1,00	25,00	19,20
9 (C)	0,60	20,00	14,77
11 (C)	0,60	20,00	13,55
6	1,16	20,00	16,04
3	1,00	15,00	11,83
5	0,03	20,00	0,42
10 (C)	0,60	20,00	12,40
7	0,60	12,92	10,16
8	0,60	27,07	15,01

(C) representa os pontos centrais do delineamento.

Na Tabela 3 é possível observar que a liberação de xilose dos pontos centrais apresentou valores relativamente próximos, variando de 12,40 a 14,77 g.L⁻¹. Isso evidencia uma regularidade na reprodução dos experimentos. Observou-se também que a maior liberação foi obtida no experimento 4, revelando o valor máximo de xilose obtida (19,20 g.L⁻¹).

Rafiqul; Sakinah (2012a) realizaram um estudo cinético da hidrólise ácida da serragem de madeira Meranti em autoclave (130 °C), variando as concentrações de H₂SO₄ (2 - 6%, m/m) e o tempo de exposição (0 - 120 minutos). Esses autores observaram que a maior liberação de xilose (18,65 g.L⁻¹) ocorreu nas condições de 6% de H₂SO₄ e 20 minutos de tempo de exposição. O valor obtido da extração de xilose, quando esses autores utilizaram a hidrólise ácida em autoclave foi próximo ao obtido nesse trabalho, porém vale destacar que os referidos autores realizaram um procedimento em que a temperatura foi mais alta com uma concentração de ácido também superior a utilizada nesse trabalho.

Com base na análise estatística dos resultados da Tabela 3 foi possível obter os efeitos estimados (Tabela 4). Foram considerados os resultados das variáveis isoladamente e da interação entre as variáveis estudadas.

Tabela 4 - Estimativa dos efeitos principais e suas interações na liberação de xilose da hidrólise ácida da serragem de *M. tenuiflora*, com nível de confiança de 95%.

Fatores	Efeitos	Desvio Padrão	t(3)	P
Média	13,58	0,49	27,59	0,000001*
(1) Conc. de H ₂ SO ₄ (L)	11,22	0,60	18,62	0,000008*
Conc. de H ₂ SO ₄ (Q)	-5,64	0,71	-7,86	0,000532*
(2) Conc. de biomassa (L)	3,60	0,60	5,97	0,001878*
Conc. de biomassa (Q)	-1,28	0,71	-1,79	0,132369
Conc. de H ₂ SO ₄ x Conc. de biomassa	3,60	0,85	4,22	0,008284*

* Efeitos estatisticamente significativos a nível de p<0,05.

A análise dos efeitos mostrados na Tabela 4 sugere que as variáveis concentração de ácido, concentração de biomassa e a interação entre ambas, apresentaram efeitos significativos na liberação de xilose. Porém, apenas a concentração de biomassa não

apresentou significância ao nível de confiança de 95%. Esse fato foi facilmente observado através do valor de p menor que 0,05. Dessa maneira, a variável concentração de ácido apresenta uma extrema significância, ou seja, quanto maior for seu valor (em M) e a interação entre concentração de ácido versus concentração de biomassa, maior será sua influência na liberação de xilose (variável resposta).

O Gráfico de Pareto (Figura 1) corrobora com os resultados descritos anteriormente, pois a concentração de ácido exerce maior influência sobre a variável resposta. Esse fato pode ser explicado através da observação de que o aumento da concentração de H₂SO₄ para a produção de xilose atingiu um valor máximo, mas diminuiu com a concentração de biomassa mais elevada, sugerindo a existência de reações de decomposição, as quais conduzem a desidratação de xilose em furfural e 5-hidroximetilfurfural (5-HMF). Do mesmo modo, a quantidade de produtos indesejáveis no hidrolisado se elevou com o aumento da concentração do ácido. Estas observações igualmente foram reportadas por Rafiqul; Sakinah (2012a).

A partir da análise de regressão linear dos resultados obtidos foi possível a formulação de um modelo polinomial para descrever a variável resposta. A Equação 10 mostra o modelo de primeira ordem para as variáveis, considerando todos os coeficientes de regressão para 95% de confiança.

$$\text{Concentração de xilose (g.L}^{-1}\text{)} = 13,5795 + 5,6129.x_1 - 2,8233.x_1^2 + 1,8016.x_2 - 0,6445.x_2^2 + 1,80124.x_1.x_2 \quad (10)$$

O teste ANOVA (Tabela 5), equivalente a variável resposta liberação de xilose, revela um coeficiente de determinação (R²) de 0,98931, o que indica um ajustamento eficiente dos dados experimentais, pois quanto mais próximo de 1 esse valor, mais bem ajustados serão os dados ao modelo. Observa-se também que o F calculado, corresponde a regressão ao nível de 95% de confiança, ao ser comparado com o F tabelado. Isso é indicativo de um modelo de regressão significativo, pois seu valor apresenta-se maior que o F tabelado = 9,28. Essa relação entre o F calculado e o F tabelado é denominada de teste F e exibe a significância estatística dos dados, mostrando que para F_{calculado} > F_{tabelado} foi apresentado uma regressão significativa. O ajuste destes dados podem ser observados também na Figura 2 que nos mostra os valores preditos pelo modelo polinomial de 1ª ordem versus valores observados.

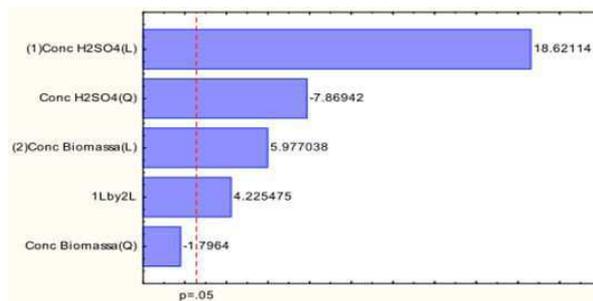


Figura 1 - Efeito das variáveis estudadas através do Gráfico de Pareto - 95% de confiança na liberação de xilose da hidrólise ácida da serragem de *M. tenuiflora* (SMT).

Tabela 5 - Análise de Variância (ANOVA) para a liberação de açúcares fermentescíveis da serragem de *M. tenuiflora* (SMT).

Fonte de variação	Soma Quadrados	Graus de liberdade	Quadrado Médio	F Calculado
(1) Conc. de H ₂ SO ₄ (L)	252,03	1	252,03	346,74
Conc. de H ₂ SO ₄ (Q)	45,01	1	45,01	61,92
(2) Conc. de biomassa (L)	25,96	1	25,96	35,72
Conc. de biomassa (Q)	2,34	1	2,34	3,22
Conc. de H ₂ SO ₄ x Conc. de biomassa	12,97	1	12,97	17,85

R²(coeficiente de determinação) = 0,98931; F_{3,3,0,05} = 9,78

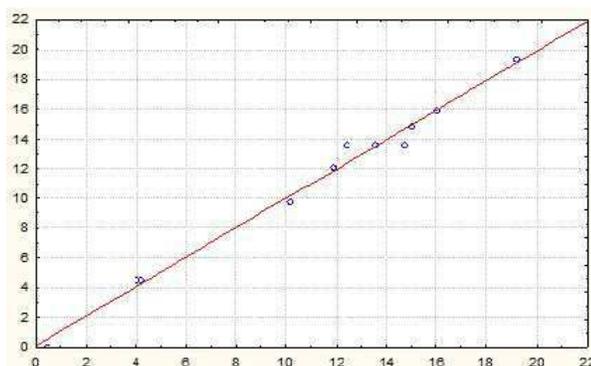


Figura 2 - Valores preditos pelo modelo polinomial de 1ª ordem versus valores observados experimentalmente para a liberação de açúcares fermentescíveis da SMT.

A Figura 3 mostra a superfície de resposta para a variável dependente concentração de xilose em função da concentração de açúcar e da concentração de biomassa. A análise da Figura 3 exibe influência da variável concentração de açúcar sobre a liberação de xilose, pois para maiores concentrações de açúcar, a concentração de xilose liberada tende a ser maior. Em relação à concentração de biomassa, pode ser observado que esta não influencia de forma significativa a variável resposta. Esse fato pode ser explicado, pois em processos que utilizam açúcar forte diluído, o aumento da biomassa não causa uma influência significativa (MARTON, 2002). A Figura 3 mostra ainda que o efeito da interação entre a temperatura e a razão molar provoca efeito positivo sobre o rendimento, porém não é significativo com o nível de confiança de 95%, ficando evidenciado no gráfico de Pareto (ver Figura 1).

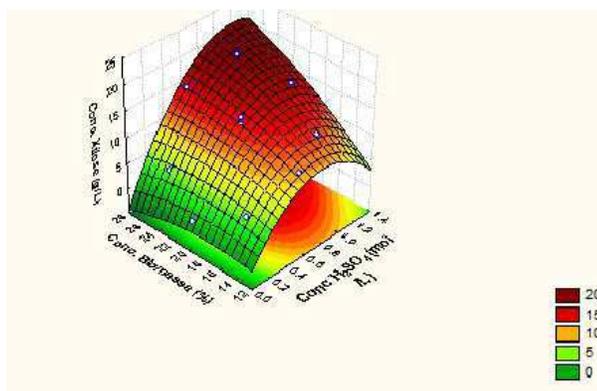


Figura 3 - Superfície de resposta para as concentrações obtidas de xilose da hidrólise ácida da serragem de *M. tenuiflora* (SMT) a 121°C por 15 min em função das variáveis: concentração de açúcar (em M) e concentração de biomassa (em %, m/v).

Estudo da influência da temperatura na produção de xilitol utilizando meio sintético de crescimento (SGM)

Inicialmente foi avaliado o potencial da levedura *Candida tropicalis* ATCC 750 no metabolismo de xilose para a síntese de xilitol em meio sintético de crescimento (SGM). Para tanto, a influenciada temperatura na produção do xilitol pela levedura *C. tropicalis* ATCC 750 foi estudada. O bioprocesso foi realizado num tempo total de 72h. O perfil do consumo de xilose, crescimento celular e produção de xilitol estão apresentados na Figura 4 e os resultados em respeito da xilose remanescente, máxima concentração de xilitol ($P_{1m\%}$), rendimento ($Y_{P1/S1}$) e produtividade (Q_{P1}) são mostrados na Tabela 6.

A levedura *Candida tropicalis* ATCC 750 consumiu xilose em todas as temperaturas avaliadas com concentrações finais inferiores a 1 g.L⁻¹ (Tabela 6). O maior crescimento

celular ($6,90 \text{ g.L}^{-1}$) foi obtido na temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Nas demais temperaturas, o crescimento microbiano diminuiu e manteve-se mais ou menos constante obtendo $4,35 \text{ g.L}^{-1}$, e $4,25 \text{ g.L}^{-1}$ a 30°C e 35°C , respectivamente.

Comportamento similar de crescimento foi obtido no estudo realizado por Albuquerque et al. (2014), que avaliaram o crescimento celular de *C. tropicalis* em meio contendo xilose como fonte de carbono na concentração inicial de 40 g.L^{-1} obtendo uma concentração celular de $14,12 \text{ g.L}^{-1}$ ao final de 120 horas de fermentação. Por outro lado, o crescimento celular no meio SGM, com base na concentração inicial de xilose, foi significativo quando comparado ao estudo realizado por Arruda et al. (2011) que avaliaram a produção das enzimas XR e XDH para produção de xilitol por *Candida guilliermondii* em meio composto por hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (com 75 g.L^{-1} de xilose). Esses autores verificaram uma produção máxima de crescimento celular de $10,6 \text{ g.L}^{-1}$, contudo, ao longo de 120 horas de fermentação.

A levedura avaliada produziu xilitol, obtendo $11,03 \text{ g.L}^{-1}$ a 25°C . Isso corresponde a um rendimento de $0,69 \text{ g}_{\text{XILITOL}}.\text{g}_{\text{XILOSE}}^{-1}$ e $0,15 \text{ g}.\text{(L.h)}^{-1}$, conforme apresentado na Tabela 6. Analisando os resultados obtidos, foi possível estabelecer uma correlação com o crescimento celular bem como com a disponibilidade de xilose, uma vez que ambos obtiveram maiores concentrações na temperatura de 25°C . Não foi observada a produção de etanol, uma vez que não havia disponibilidade de glicose no meio SGM, indicando que a levedura utilizou a rota da via das Pentoses para a produção de xilitol.

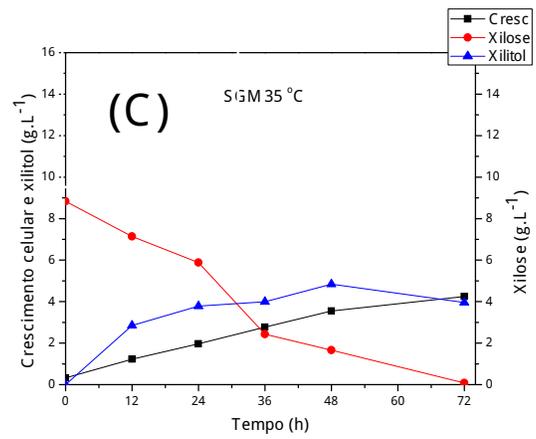
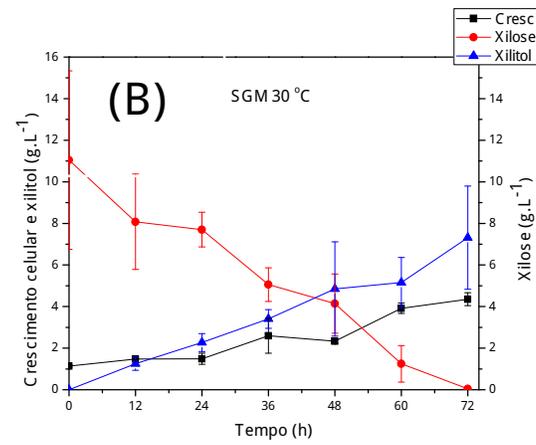
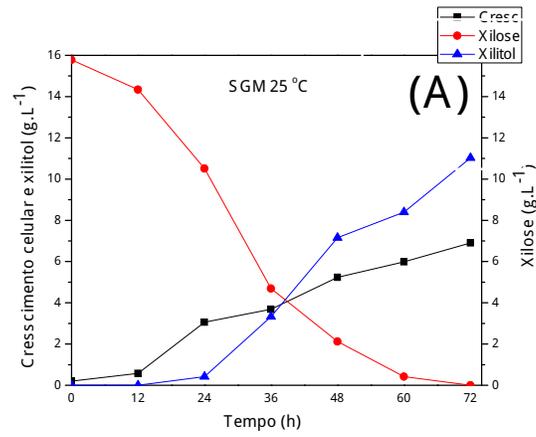


Figura 4 - Perfil do crescimento celular, concentra o de xilose e xilitol no bioprocesso utilizando o meio sintético de crescimento (SGM) por *Candida tropicalis* ATCC 750 em diferentes temperaturas: (A) 25  C, (B) 30  C e (C) 35  C. Os dados experimentais são os seguintes: (I) Crescimento celular (g.L⁻¹); (II) Xilose (g.L⁻¹); (III) Xilitol (g.L⁻¹).

Tabela 6 - Influência da temperatura no crescimento celular e nos parâmetros da produ o de xilitol ($Y_{P1/S1}$, $P_{1m\&}$ e Q_{P1}) por *Candida tropicalis* ATCC 750 utilizando o meio sintético de produ o (SGM).

Temperatura (�C)	Crescimento celular (g.L ⁻¹)	Xilose remanescente (g.L ⁻¹)	$Y_{P1/S1}$ (g.g ⁻¹)	$P_{1m\&}$ (g.L ⁻¹)	Q_{P1} (g.(L.h) ⁻¹)
25 �C	6,90	0,41	0,69	11,03	0,15
30 �C	4,35	0,07	0,39	8,11	0,11
35 �C	4,25	0,08	0,22	4,84	0,06

Estudo da influência da temperatura na produ o de xilitol utilizando HSMT

Após o estudo com meio sintético de crescimento, a influência da temperatura na produ o do xilitol pela levedura *Candida tropicalis* ATCC 750 no hidrolisado hemicelulósico (HSMT) foi avaliada. Os parâmetros perfil de crescimento celular, consumos de glicose e xilose, e produ o de xilitol estão representados pela Figura 5.

A temperatura que favoreceu o maior crescimento celular comparado ao meio sintético (SGM) também foi 25 C (8,51 g.L⁻¹). Com o aumento da temperatura, uma diminui o do crescimento microbiano foi observada, obtendo 4,75 g.L⁻¹ a 30 C e 4,28 g.L⁻¹ a 35 C (Tabela 7). As concentra es celulares obtidas no HSMT foram superiores às concentra es obtidas no meio sintético, devido   maior concentra o de carboidratos iniciais, pois o hidrolisado continha glicose e xilose. Com isso, pode-se afirmar que o HSMT tornou-se mais propício para o crescimento da *C. tropicalis* em rela o ao meio sintético.

A levedura consumiu preferencialmente xilose em todas as temperaturas analisadas. Aproximadamente 96 % da xilose foi consumida em 72 h, a 25  C, contra 4,5 % de glicose consumida nesse bioprocesso. O menor consumo de xilose foi obtido na temperatura de 35 C,

restando no meio 1,23 g.L⁻¹ de xilose. Esses resultados mostram que a levedura *C. tropicalis* ATTC 750, nas condições experimentais comporta-se como um microorganismo mesófilo.

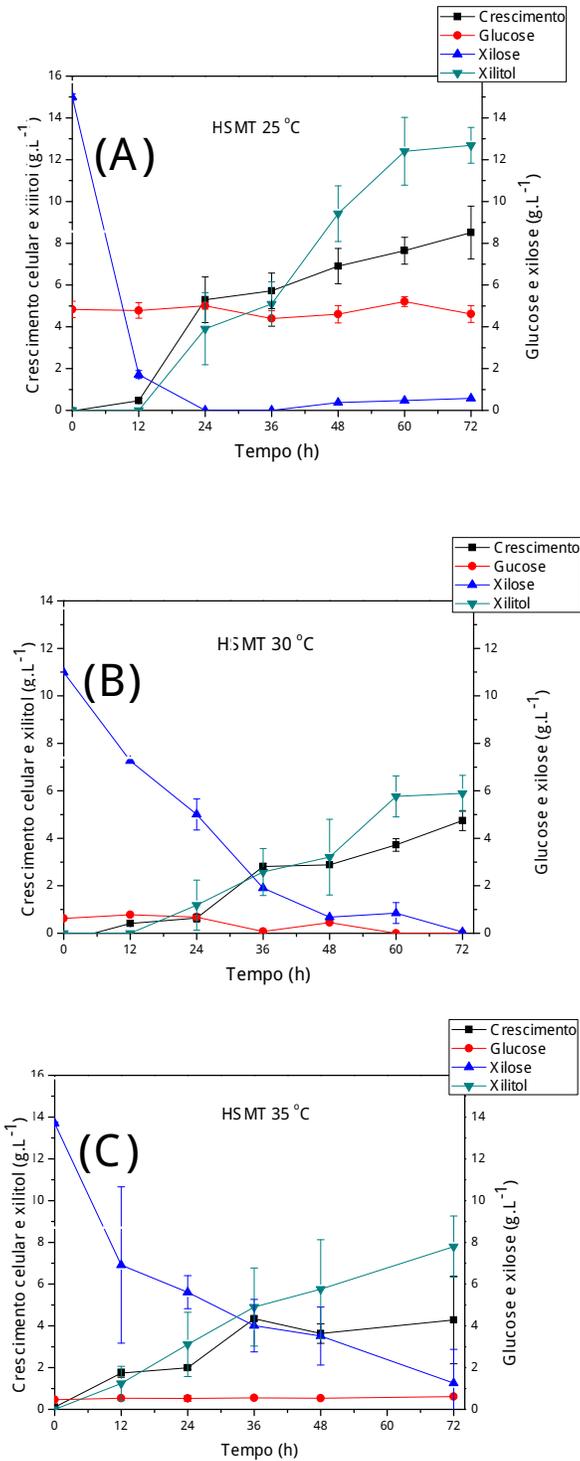


Figura 5 - Perfil do crescimento celular, concentra o de glicose e xilose, concentra o de xilitol no bioprocesso utilizando como meio o HSMT por *Candida tropicalis* ATCC 750 em diferentes temperaturas: (A) 25  C, (B) 30  C e (C) 35  C. Os dados experimentais são os seguintes: (II) Concentra o celular (g.L⁻¹); (III) Glucose (g.L⁻¹); (IV) Xilose (g.L⁻¹); e (VI) Xilitol (g.L⁻¹).

Tabela 7 - Influência da temperatura no crescimento celular e nos parâmetros da produ o de xilitol ($Y_{P1/S1}$, $P_{1m\&}$ e Q_{P1}) por *Candida tropicalis* ATCC 750 utilizando o meio do hidrolisado hemicelulósico da serragem de jurema preta (HSMT).

Temperatura (�C)	Crescimento celular (g.L ⁻¹)	Xilose remanescente (g.L ⁻¹)	$Y_{P1/S1}$ (g.g ⁻¹)	$P_{1m\&}$ (g.L ⁻¹)	Q_{P1} (g.(L.h) ⁻¹)
25 �C	8,51	0,57	0,60	12,68	0,17
30 �C	4,75	0,05	0,43	5,89	0,08
35 �C	4,28	1,25	0,52	7,79	0,10

No HSMT utilizado como meio fermentativo não foi observado produ o de etanol, entretanto, xilitol foi produzido em todas as temperaturas, com a maior concentra o sendo observada a 25 C (12,68 g.L⁻¹). Diante dos resultados obtidos, foi possível determinar que nas condi es avaliadas, o microorganismo prefere a rota bioquímica de consumo de xilose em rela o   glicose, desviando a rota de produ o do etanol devido   repressão da xilose presente no hidrolisado hemicelulósico.

Albuquerque et al. (2014) e Rafiqul et al. (2015b) constataram que a presença de substâncias inibidoras tais como ácido acético e ácido fórmico, podem diminuir o metabolismo da xilose, por se tratar de substâncias tóxicas   a o da enzima xilose redutase. Como foi mencionado anteriormente, essa enzima   importante na via de síntese de xilitol a partir da xilose.

Walther et al. (2001) verificaram que para a produ o de xilitol utilizando hidrolisados hemicelulósicos, o processo   afetado pela concentra o dos  s cares no meio de fermenta o, pelas propor es nas quais eles ocorrem, bem como dos compostos tóxicos

liberados durante a hidrólise hemicelulósica. De acordo com esses autores, altas concentrações de açúcares monossacarídicos podem ocasionar estresse osmótico ou levar a uma produção de etanol em concentrações intoleráveis pela levedura. Ainda segundo Walther et al. (2001), baixas concentrações iniciais de glicose (entre 10 e 20 g.L⁻¹) não demonstraram nenhum efeito na produção de xilitol. Porém, nas concentrações acima de 20 g.L⁻¹, a produção de xilitol foi consideravelmente reduzida.

Wang et al. (2013) estudaram a melhoria do processo de assimilação de xilose por *K. marxianus* YRL005, uma cepa modificada geneticamente. Os autores averiguaram que a glicose foi consumida primeiro e mais rapidamente que a xilose, mostrando que esse microorganismo possui genes que coordenam a metabolização da xilose, mas que podem ser reprimidos pela presença de glicose, embora não seja um mecanismo completamente esclarecido.

CONCLUSÕES

O estudo de otimização da liberação de xilose a partir da hidrólise ácida da serragem de *M. tenuiflora* (SMT) mostrou que a concentração de ácido apresentou efeitos significativos e não houve influência da concentração de biomassa na extração de xilose, na faixa de valores estudados através do Delineamento Compósito Central.

O melhor rendimento de xilose foi obtido a 1,0M de ácido sulfúrico, utilizando uma biomassa de 20% (m/v). Por outro lado, a xilose extraída do hidrolisado de serragem de *M. tenuiflora* 20% com 0,6M de H₂SO₄ apresentou considerável concentração (19,20 g.L⁻¹), bem como ausência de compostos inibidores.

Comparado ao SGM, a fermentação do HMST mostrou maior crescimento celular e produção de xilitol (12,68 g.L⁻¹). A temperatura de 25 °C foi a mais adequada para obtenção dos maiores valores de xilitol com o hidrolisado.

Diante do exposto, a serragem de *M. tenuiflora* representa um substrato com potencial biotecnológico promissor para obtenção de xilitol.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, T. L. Produção biotecnológica de xylitol a partir de hidrolizado de bagaço de caju. 148 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Ceará Fortaleza-CE, 2014.
- ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R. D. C. L.B.; SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. D. G. D. A. Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. *Biodegradation*, v. 22, n. 4, p. 815 - 22, 2011.
- BOUSSARSAR, H., ROGS, B., MATHLOUTHI, M. Optimization of sugarcane bagasse conversion by hydrothermal treatment for the recovery of xylose. *Bioresource technology*, 100, 6537-42, 2009.
- BRANCO, F.R., SANTOS, J.C., SILVA, S.S., A novel use for sugarcane bagasse hemicellulosic fraction: Xylitol enzymatic production. *Biomass and Bioenergy* v. 35, n. 7, p. 3241-3246, 2011.
- CASTRO, A.S.; CAVALCANTE, A. Flores da caatinga = Caatinga flowers. Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido (INSA), 116p., 2010.
- CASTRO, J. F.; PARRA, C.; YA, M.; ROJAS, J.; TEIXEIRA, R.; BAEZA, J.; FREER, J. Optimal pretreatment of *Eucalyptus globulus* by hydrothermolysis and alkaline extraction for microbial production of ethanol and xylitol, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v.52, p. 5713-5720, 2013.
- CHENG, K-K.; ZHANG, J-A; LING, H-Z.; PING, W-XI; HUANGA, W; GE, J-P., XU, J-M. Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicellulose from corncobs to xylitol by *Candida tropicalis*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 43, p. 203-207, 2009.
- DAMASCENO, M.M. Composição bromatológica de forragem de espécies arbóreas da Caatinga Paraibana em diferentes altitudes. 61 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, 2007.
- DRUMOND, M.A. Produção e distribuição de biomassa de espécies arbóreas no semiárido brasileiro. *Revista Trópicos*, v.32, n.4, p.665-669, 2008.
- KAMAT, S.; GAIKWAD, S.; KUMAR, A. R.; GADE, W. N. Xylitol production by *Cyberlindnera (Williopsis) saturnus*, a tropical mangrove yeast from xylose and corn cob hydrolysate. *Journal of Applied Microbiology*, 2013.
- LEAL, I.R.; TABARELLI, M.; SILVA, J.M.C. (editores). *Ecologia e conservação da caatinga*. Ed. Universidade da UFPE, Recife-PE, 822 p, 2003.

MAIA, G.N. Caatinga: Árvores e arbustos e suas utilidades. 1ª ed. Editora leitura & arte, São Paulo-SP, 2004.

MARTON, J.M. Avaliação de diferentes carbões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção de xilitol. 2002. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2002.

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

MICHEL, A.C.S. Produção biotecnológica de xilitol e etanol a partir de hidrolisado de casca de soja. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

MILESSI, T. S. S.; MORAES, A. S. L.; BRANCO, R. F. SILVA, S. S. Avaliação da concentração inicial de células de *Candida guilliermondii* na produção de xilose redutase a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Anais do VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. 27 a 30 de julho de 2009. Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

PARAJÓ, J. C., DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*, v. 66, p. 25-40, 1998.

RAFIQUL, I. S. M.; SAKINAH, A. M. M. Kinetic studies on acid hydrolysis of Meranti wood sawdust for xylose production. *Chemical Engineering Science*, v. 71, p. 431-437, 2012a.

RAFIQUL, I. S. M. ; SAKINAH, A. M. M. Design of process parameters for the production of xylose from wood sawdust. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 90, n. 9, p. 1307-1312, 2012b.

RAFIQUL, I.S.M., SAKINAH, A.M.M., ZULARISAM, A.W. Evaluation of sawdust hemicellulosic hydrolysate for bioproduction of xylitol by enzyme xylose reductase. *Food and Bioprocess Technology*, v. 94, p. 82-89, 2015a.

RAFIQUL, I.S.M.; SAKINAH, A.M.M.; ZULARISAM, A.W. Inhibition by toxic compounds in the hemicellulosic hydrolysates on the activity of xylose REDUTASE from *Candida tropicalis*. *Biotechnol Lett*, v. 37, p. 191-196, 2015b.

ROCHA, G. J. M.; SILVA, F. T.; ARAÚJO, G. T., CURVELO, A. A. S. A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: PROCEEDINGS OF THE FIFTH BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, v. 6, p. 3-8, 1997.

ROCHA, M. V.P. Produção de bioetanol a partir de pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.) por fermentação submersa. 170 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T. H. S.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; MACEDO, G. R. Cashew apple bagasse as a source of sugars for ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* CE025. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 38, n. 8, p. 1099-107, 2011.

SALES, F.C.V. Revegetação de área degradada da caatinga por meio da semeadura ou transplante de mudas de espécies arbóreas em substrato enriquecido com matéria orgânica. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, Paraíba, 2008.

SIQUEIRA-FILHO, J. A. (organização). A flora das caatingas do Rio São Francisco: história natural e conservação. 1ª ed. Andrea Jakobsson Estúdio. Rio de Janeiro-RJ. 552p. 2012.

SLUITER, A.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. Determination of Extractives in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date: 7/17/2005, Technical Report NREL/TP-510-42619, January 2008a.

SLUITER, A.; HAMES, B.; HYMAN, D.; PAYNE, C.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, A.; SLUITER, J.; TEMPLETON D.; WOLFE, J. Determination of Total Solids in Biomass and Total Dissolved Solids in Liquid Process Samples Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date: 3/31/2008. Technical Report NREL/TP-51042621 Revised March 2008b.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D.; CROCKER, D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date: 4/25/2008 Technical Report NREL/TP-510-42618 Revised April 2008c.

VILLARREAL, M. L. M. Avaliação do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de resíduos de eucalipto, com carvão ativo e resinas de troca iônica, para a produção de xilitol. 2005. 132p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2005.

WALTHER, T., HENSIRISAK, P., AGBLEVOR, F. A. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. *Bioresource technology*, v. 76, n. 213-20, 2001.

WANG, Y. M.; PATTERSON, J. H.; VANEYS, J. The potential use of xylitol in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency anemia. *The Journal of clinical investigation*, v. 50, n. 7, p. 1421-8, 1971.

WANG, R.; LI, L., ZHANG, B., GAO, X., WANG, D., HONG, J. Improved xylose fermentation of *Kluyveromyces marxianus* at elevated temperature through construction of a

xylose isomerase pathway. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, v. 40, p. 841-54, 2013.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S.; Microbial conversion of D-xylose to xylitol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 87, p. 1-14, 1998.

ZHANG, J.; GENG, A., YAO, C., LU, Y., LI, Q. Xylitol production from dxylose and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of *Candida athensensis* SB18. *Bioresource technology*, v.105, p. 134-41, 2012.