



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

LORENA LUCENA DE MEDEIROS

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO DE PRODUÇÃO DE
EDULCORANTES A PARTIR DO HIDROLISADO DO
SISAL (*Agave sisalana*)

João Pessoa – PB
2019

LORENA LUCENA DE MEDEIROS

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO DE PRODUÇÃO DE EDULCORANTES A
PARTIR DO HIDROLISADO DO SISAL (*Agave sisalana*)

João Pessoa – PB
2019

LORENA LUCENA DE MEDEIROS

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO DE PRODUÇÃO DE EDULCORANTES A
PARTIR DO HIDROLISADO DO SISAL (*Agave sisalana*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva

Co-orientadora: Dr^a. Marta Maria da Conceição

João Pessoa – PB
2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

M488p Medeiros, Lorena Lucena de.

Processo biotecnológico de produção de edulcorantes a partir do hidrolisado do sisal (Agave sisalana) / Lorena Lucena de Medeiros. - João Pessoa, 2019. 137 f. : il.

Orientação: Flávio Luiz Honorato da Silva.
Tese (Doutorado) - UFPB/CT.

1. Debaryomyces hansenii. 2. Candida guilliermondii.
3. Bioprodutos. 4. Planejamento experimental fatorial.
I. Silva, Flávio Luiz Honorato da. II. Título.

UFPB/BC

LORENA LUCENA DE MEDEIROS

PROCESSO BIOTECNOLÓGICO DE PRODUÇÃO DE EDULCORANTES A
PARTIR DO HIDROLISADO DO SISAL (*Agave sisalana*)

Tese Aprovada em 07 de Março de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva
DEQ/CT/UFPB
-Orientador-

Profª. Drª. Marta Maria da Conceição
DTA/CTDR/UFPB
-Co-orientador-

Profª. Drª. Marta Suely Madruga
DEA/CT/UFPB
-Examinador Interno-

Profª. Drª. Sharline Florentino de Melo Santos
DEQ/CT/UFPB
- Examinador Externo-

Profª. Drª. Josilene de Assis Cavalcante
DEQ/CT/UFPB
- Examinador Externo-

Profª. Drª. Andrea Lopes de Oliveira Ferreira
DEQ/CT/UFPB
-Examinador Externo-

A Deus, autor do meu destino.
Aos meus pais, Edileuza e Pedro, exemplos de amor, simplicidade, força e fé.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que é meu refúgio e minha fortaleza, a Ele por estar sempre presente guiando e iluminando todos os meus passos.

Aos meus pais Edileuza Lucena de Medeiros e Pedro de Medeiros Costa, pelo amor incondicional, carinho e compreensão, indispensáveis nessa trajetória.

Aos meus irmãos (Ismênia, Edson, Pettyjane e Cynara), pela força, incentivo e companheirismo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro que possibilitou a conclusão desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA) e à Universidade Federal da Paraíba (UFPB) pela infraestrutura.

Ao Professor Flávio Luiz Honorato da Silva, pela orientação, paciência, amizade, confiança e pelos conhecimentos compartilhados. Agradeço especialmente à dedicação, o incentivo, a disponibilidade, compreensão e o apoio incondicional.

A Professora Marta Maria da Conceição, pela co-orientação e pelo auxílio durante a realização da tese.

À professora Marta Suely Madruga pelo apoio, pela confiança, pela contribuição, pelas experiências transmitidas e disponibilidade dos laboratórios indispensáveis para realização deste trabalho.

À professora Líbia de Sousa Conrado Oliveira pelo suporte e disponibilização de recursos e infraestrutura de laboratório.

Às Professoras Susana Juliano Kalil, Sharline Florentino de Melo Santos, Josilene de Assis Cavalcante e Andrea Lopes de Oliveira Ferreira, pela contribuição e conhecimentos compartilhados a esta pesquisa.

Ao professor André Luiz de Sousa Vasconcelos (*in memoriam*), pelo encorajamento, pela amizade e por ter acreditado em meu potencial desde o início acadêmico.

Aos sobrinhos Luana, Lucas, Iandra, Pedro Neto, Caio e Maitê, pela confiança, pela leveza e felicidade constante.

À tia Querubina Francisca (*in memoriam*) pelas orações e pelo exemplo de humildade, alegria e perseverança.

Aos cunhados Marconi e Rivania, pelo suporte, pela generosidade, pela consideração e pela benevolência.

Aos funcionários Fernanda, Mércia, Débora, Lindalva, Rafael, Ari e Juliana pela colaboração, disposição e paciência.

Aos amigos Débora Jamila, Mércia, Bruna, Narciza, Edilza, Ângela, Taliana, Fernanda, Ana Caroliny, Rayssa, Geany, Leanderson, Willyan, José Evangelista, Clebson, Marcio, Douglas, Josevan, Dayanne, Rone, Aline, Marielle e Liza pela amizade e presença constante durante todo percurso, transmitindo entusiasmo, confiança e motivação nos momentos difíceis.

Aos professores, colegas e amigos que participaram e contribuíram para minha formação, com o qual tive a oportunidade de compartilhar experiências, cujo acolhimento e companheirismo foram importantes no decorrer desses anos.

A Fundação André Tosselo (FAT) localizada em Campinas/SP que forneceram as leveduras, fundamentais para este estudo.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

ETERNA GRATIDÃO!

RESUMO

A preocupação com a quantidade de resíduos gerados pelas indústrias e os compromissos assumidos com o meio ambiente tem despertado um crescente interesse pela utilização de fontes alternativas de energia para geração de edulcorantes, como arabitol e xilitol. Neste contexto, o bagaço do sisal tem sido considerado biomassa promissora para atender à demanda de forma sustentável. Em vista disso, o objetivo da pesquisa foi estudar a produção biotecnológica de edulcorantes utilizando o licor hidrolisado do bagaço do sisal (*Agave sisalana*) como substrato e como agentes de fermentação as leveduras *Candida guilliermondii* e *Debaryomyces hansenii*, espécies capazes de metabolizarem arabinose e xilose. O bagaço do sisal foi lavado, seco, moído e caracterizado. Em seguida, realizou-se um planejamento experimental fatorial $2^3 + 3$ pontos centrais com o intuito de verificar as influências das variáveis: temperatura, proporção bagaço/ácido diluído e concentração do ácido na liberação de pentoses dos licores hidrolisados. Após hidrólise o licor na melhor concentração (0,001 g.L⁻¹ de glicose, 2,86 g.L⁻¹ xilose e 1,14 g.L⁻¹ de arabinose) foi submetido a fermentação preparado em frascos de erlenmeyer com 400 mL do meio com licor hidrolisado, agitados a 200 rpm, 30 °C de 0 a 120 h, utilizando-se a levedura *D. hansenii* CCT 2371. A caracterização da composição lignocelulósica mostrou a presença de 18,28% de celulose, 14,80% de hemicelulose e 29,42% de lignina. Verificou-se que o licor do tratamento ácido deve operar sob condições de temperatura, concentração de ácido e proporção bagaço/ácido diluído ao nível -1 (110 °C, 1,5% e 1:12 respectivamente). O fermentado do hidrolisado do bagaço do sisal obteve 100% de consumo de substrato (arabinose e xilose), 0,9913 g.g⁻¹ de rendimento teórico de conversão de arabinose em arabitol e 0,0387 g.g⁻¹ de xilose em xilitol e produtividade volumétrica 0,0095 g.L⁻¹.h⁻¹ para o arabitol e 0,0009 g.L⁻¹.h⁻¹ para o xilitol. A máxima produção de arabitol foi obtida com 96 h de fermentação, já para o xilitol com 120 horas. Desse modo, o bagaço de sisal apresentou quantidades consideráveis de compostos lignocelulósicos, demonstrando seu potencial da matéria-prima na obtenção de açúcares fermentescíveis. Análises químicas estruturais realizadas demonstraram a eficiência do processo de hidrólise. A levedura *Debaryomyces hansenii* foi capaz de obter altos valores de produção de arabitol em meio hidrolisado de bagaço de sisal, agregando valor econômico ao bagaço de sisal e reduzindo o impacto ambiental.

Palavras-chave: *Debaryomyces hansenii*, *Candida guilliermondii*, bioprodutos, planejamento experimental fatorial, fermentação, polióis

ABSTRACT

Concern about the amount of waste generated by industries and the commitments made to the environment has aroused a growing interest in the use of alternative energy sources for the generation of sweeteners, such as arabitol and xylitol. In this context, sisal bagasse has been considered promising biomass to meet demand sustainably. Therefore, the objective of this research was to study the biotechnological production of sweeteners using sisal bagasse hydrolyzed liquor (Agave sisalana) as substrate and as fermentation agents *Candida guilliermondii* and *Debaryomyces hansenii* yeasts, species capable of metabolizing arabinose and xylose. The sisal bagasse was washed, dried, ground and characterized. Then, a $2^3 + 3$ central points factorial design was performed to verify the influence of the variables: temperature, bagasse/dilute acid ratio and acid concentration on the release of pentoses from hydrolysed liquors. After hydrolysis the liquor in the best concentration (0.001 gL⁻¹ glucose, 2.86 gL⁻¹ xylose and 1.14 gL⁻¹ arabinose) was subjected to fermentation prepared in erlenmeyer flasks with 400 ml of hydrolyzed liquor medium, stirred at 200 rpm, 30 °C from 0 to 120 h using *D. hansenii* CCT 2371 yeast. Characterization of the lignocellulosic composition showed the presence of 18.28% cellulose, 14.80% hemicellulose and 29.42% lignin. It has been found that the acid treatment liquor should operate under conditions of temperature, acid concentration and bagasse/dilute acid ratio at level -1 (110 °C, 1.5% and 1:12 respectively). The fermentation of sisal bagasse hydrolyzate obtained 100% substrate consumption (arabinose and xylose), 0.9913 g.g⁻¹ of theoretical yield of conversion of arabinose to arabitol and 0.0387 g.g⁻¹ of xylose to xylitol and volumetric productivity. 0.0095 g·L⁻¹·h⁻¹ for arabitol and 0.0009 g·L⁻¹·h⁻¹ for xylitol. The maximum production of arabitol was obtained with 96 h of fermentation, while for xylitol with 120 hours. Thus, sisal bagasse presented considerable quantities of lignocellulosic compounds, demonstrating its potential as raw material in obtaining fermentable sugars. Structural chemical analyzes performed demonstrated the efficiency of the hydrolysis process. *Debaryomyces hansenii* yeast was able to obtain high values of arabitol production in sisal bagasse hydrolyzed medium, adding economic value to sisal bagasse and reducing the environmental impact.

Keywords: *Debaryomyces hansenii*, *Candida guilliermondii*, bioproducts, factorial experimental design, fermentation, polyols

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura de uma microfibrila, que contém 36 moléculas de celulose	21
Figura 2: Sisal (<i>Agave Sisalana</i>)	23
Figura 3: Produção mundial de sisal em 10 anos	23
Figura 4: Fibras de sisal extraída da folha e após secagem pronta para exportação	24
Figura 5: Processo de desfibramento	25
Figura 6: Bagaço de sisal (resíduo descartado no meio ambiente)	25
Figura 7: Produtos resultantes da hidrólise de material lignocelulósico	28
Figura 8: Reação de conversão de glicose a HMF	29
Figura 9: Reação de conversão de xilose e arabinose a furfural	29
Figura 10: Esquema do metabolismo de glicose, xilose e arabinose em etanol, xilitol e arabitol por leveduras	37
Figura 11: Esquema do metabolismo do xilitol e arabitol por leveduras	38
Figura 12: Comparação de sacarose com polióis em termos de doçura, índice glicêmico e calorias	47
Figura 13: Estrutura química de xilitol e arabitol	47
Figura 14: Primeira etapa do processo de obtenção biotecnológica de arabitol e xilitol proveniente do bagaço do sisal por <i>Debaryomyces hansenii</i>	53
Figura 15: Segunda etapa do processo de obtenção biotecnológica de arabitol e xilitol proveniente do bagaço do sisal por <i>Debaryomyces hansenii</i>	54
Figura 16: Bagaço de sisal lavado, seco e moído	55
Figura 17: Leveduras (<i>Candida guilliermondii</i> e <i>Debaryomyces hansenii</i>) em placa de petri após repicagem	59
Figura 18: Preparo do inóculo da <i>Debaryomyces hansenii</i>	60
Figura 19: Cultivo teste em meios sintético (1 e 2)	61
Figura 20: Cultivo em hidrolisado do bagaço do sisal	62

ARTIGO 1

Figura 1: Response surface for the concentration (cellobiose, xylose, acetic acid and furfural) fixing the bagasse / diluted acid ratio in the upper level -1 (1:12)	137
---	-----

Figura 2: Thermal characterization TG/DTG curves of sisal bagasse before treatment (A) and prehydrolysis residue (B) after treatment 138

ARTIGO 2

Figura 1. Diffractograms of dry untreated sisal bagasse (A) and treated sisal bagasse (B)..... 92

Figura 2. Infrared spectra of untreated sisal bagasse and sisal treated sisal bagasse. 93

Figure 3. Scanning electron microscopy of untreated (A) and treated (B) sisal bagasse with magnifications of 200x (1), 500x (2), 1000x (3) and 2000x (4)..... 95

Figura 4. Cellular kinetics of the yeast *Debaryomyces hansenii* in synthetic media (1 and 2). 96

Figura 5. Consumption of xylose (A), consumption of arabinose (B), production of xylitol (C) and production of arabitol (D) for fermentation in the synthetic media using *Debaryomyces hansenii*. Arabinose consumption and arabitol production (E) and xylose consumption and xylitol production (F) by *Debaryomyces hansenii* in sisal bagasse hydrolysate. (C/C_0) represents the value of the final substrate /value of the initial substrate (xylose in figure 5A-5E and arabinose in 5B-5F). 101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produção microbiológica de xilitol	33
Tabela 2: Composição do meio de cultura extrato de malte-levedura (YM) para reativação das leveduras.....	58
Tabela 3: Meio de cultura quimicamente definido para manutenção das leveduras.....	59
Tabela 4: Composição dos meios utilizados para crescimento do inóculo das leveduras <i>Candida guilliermondii</i> e <i>Debaryomyces hansenii</i>	60

ARTIGO 1

Tabela 1: Concentrations of sugars and inhibitors in the liquor from acid treatment	134
Tabela 2: Regression model for cellobiose, glucose, xylose, arabinose, 5-HMF, furfural and acetic acid concentrations in the liquor from acid treatment of sisal bagasse.....	135
Tabela 3: Comparison of predicted values by the regression models of the experimental data.....	136

ARTIGO 2

Tabela 1: Compositions of the synthetic media used for growth of the inoculum of <i>Debaryomyces hansenii</i>	87
Tabela 2: Mean values (\pm standard deviation) of the physico-chemical characterization of sisal bagasse in the present study and lignocellulosic biomasses reported in literature.....	91
Tabela 3: Parameters of the fermentative kinetics in synthetic medium (1 and 2)	97
Tabela 4: Fermentative parameters for the production of polyols by <i>Debaryomyces hansenii</i> in synthetic medium (1 and 2).	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DO	Densidade Ótica
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazila
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FDA	Food and Drug Administration
GRAS	Generally Recognized as Safe
HMF	5-Hidroxiacetilfurfural
LAD	L-arabitol desidrogenase
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OD	Oxigênio Dissolvido
OMS	Organização Mundial da Saúde
PET	Poli(Tereftalato de Etileno)
PSP	Polissacarídeo solúvel em água
P_x	Produtividade em células
Q_P	Produtividade volumétrica
r_s	Velocidade volumétrica de consumo de substrato
SDA	Sabouraud Dextrose Ágar
T_g	Tempo de geração
t	Toneladas
X	Concentração de células
XDH	Xilitol-desidrogenase
XKS	Xilulose quinase
XR	Xilose redutase
x	<i>versus</i>
YM	Extrato de Malte-Levedura
YMA	Extrato de Malte-Levedura Ágar
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de substrato em produto
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em células
Y	Porcentagem de Consumo
$\mu_{m\acute{a}x}$	Velocidade máxima de crescimento celular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA.....	20
2.1.1 Estrutura e composição da biomassa lignocelulósica	21
2.1.2 Biomassa lignocelulósica do semiárido: Sisal (<i>Agave sisalana</i>)	22
2.2 BIOCONVERSÃO	26
2.2.1 Obtenção de açúcares fermentescíveis	26
2.2.2 Produção biotecnológica de edulcorantes	30
2.2.3 Leveduras produtores de arabitol e xilitol	31
2.2.4 Metabolismo de leveduras produtoras de arabitol e xilitol	34
2.2.5 Fatores que influenciam o metabolismo das leveduras produtoras de arabitol e xilitol	38
2.3 EDULCORANTES.....	45
2.4 OUTROS ESTUDOS SOBRE A PRODUÇÃO DE EDULCORANTES.....	49
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 MATÉRIA-PRIMA	54
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DO BAGAÇO DO SISAL SECO	55
3.3 HIDRÓLISE DO BAGAÇO DO SISAL.....	56
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS DO BAGAÇO DO SISAL	57
3.5 ESTUDO DO PROCESSO FERMENTATIVO	58
3.5.1 Microrganismo	58
3.5.2 Preparo do inóculo	59
3.5.3 Cultivo em meio sintético	60
3.5.4 Cultivo com meio de hidrolisado do bagaço do sisal em mesa agitadora (shaker)	61
3.5.5. Análise da concentração de células	62
3.6 PARÂMETROS DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO	63
3.6.1 Cálculo da velocidade específica de crescimento	63
3.6.2 Produtividade em células	64
3.6.3 Fator de conversão de substrato em células	64

3.7 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS DO HIDROLISADO DO BAGAÇO DO SISAL	64
3.7.1 Rendimento teórico de conversão de substrato em produto	65
3.7.2 Produtividade volumétrica	65
3.7.3 Velocidade volumétrica de consumo de substrato.....	65
3.7.4 Porcentagem de consumo dos substratos	66
3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	66
REFERÊNCIAS	67
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.1 ARTIGO 1: EFFICIENT HYDROLYSIS OF CELLULOSIC BIOMASS INTO FREE SUGARS FOR A FUTURE DEVELOPMENT PROCESSING A BIOREFINERY CONTEXT	80
(ANEXO A).....	80
4.2 ARTIGO 2: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA ESTRUTURAL E POTENCIALIDADE DO BAGAÇO DO SISAL PARA PRODUÇÃO DE POLIÓIS DE INTERESSE INDUSTRIAL.....	81
4.3 PATENTE 1: BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE ARABITOL A PARTIR DO SISAL (AGAVE SISALANA).....	107
4.4 PATENTE 2: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE EDULCORANTES POR FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA UTILIZANDO HIDROLISADO DE SISAL	114
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	121

1 INTRODUÇÃO

O processamento de matérias-primas pelas grandes indústrias do mundo ocorre com interesse na produção de um produto principal, muitas vezes desvalorizando a biomassa resultante que geralmente é subutilizada. Na maioria dos casos, o descarte ineficaz dessas biomassas geram problemas ambientais (NUNES et al., 2013).

Além desses problemas, a disponibilidade de água é condição primordial que restringe a manutenção de várias culturas de biomassas lignocelulósicas (DAUBER et al., 2012). Dessa forma, o cultivo de plantas potenciais que apresentam características de crescimento em áreas limitadas de água como as espécies do gênero *Agave* (Agavaceae) e *Opuntia* (Cactaceae, "cacto"), tornam-se oportunidade para produção de bioenergia e bioprodutos (BORLAND et al., 2009; YANG et.al., 2015).

Nesse contexto, verifica-se que o sisal (*Agave sisalana*) planta originária do México apresenta quantidades consideráveis de açúcares como fontes renováveis para geração de produtos de interesse industrial, como, por exemplo, os edulcorantes. De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, em 2011, a produção mundial de sisal atingiu 408.518 toneladas (ZHANG; LIU; LIN, 2014). No entanto, os valores caíram para 202.223 toneladas em 2017 em decorrência da crise econômica mundial e da baixa valorização da matéria-prima comercial (FAOSTAT, 2019).

A fibra do sisal apresenta alto teor de celulose, cerca de 10% a mais do que o bagaço de cana, a hemicelulose da fibra de sisal tem cerca de 90% de material gerador de açúcares fermentáveis (DEBNATH et al., 2010). Estima-se que apenas 4% das folhas de sisal são usadas para produzir fibra, ou seja, 96% do material restante são resíduos não tratados que geralmente são despejados próximos aos rios onde os microrganismos o degradam (BOTURA et al., 2013). Como resultado, tem-se o consumo de oxigênio que proporciona uma alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), sendo extremamente negativo sobre a fauna e a flora dos corpos hídricos (MARAN; PRIYA, 2015). Visto que esse cenário se tornou motivo de preocupação, a comunidade científica despertou o interesse pelo aproveitamento desses resíduos lignocelulósicos (NUNES et al., 2013).

Considerando as circunstâncias abordadas, a pesquisa se fundamenta no aproveitamento alternativo dos resíduos lignocelulósicos do agave e na grande disponibilidade da matéria-prima em nossa região, evidenciando o Brasil como maior produtor e exportador global do sisal

com 79.629 toneladas em 2017, já a região Nordeste possui a maior plantação do Brasil (FAOSTAT, 2019).

Em virtude da sua natureza heterogênea, a utilização de biomassas lignocelulósicas é bastante desafiadora, tornando necessária a utilização de tratamentos que são, frequentemente, empregados para desconstruir o complexo de celulose-hemicelulose-lignina e realizar a conversão em açúcares (hexoses e pentoses), tornando a celulose e hemicelulose mais acessível para geração de novos produtos de valor agregado como o etanol de segunda geração, produção de edulcorantes (xilitol e arabitol) (CHEN et al., 2011, ROCHA et al., 2012).

O processo de obtenção convencional de polióis, processo químico, ainda apresenta altos custos de produção e como alternativa tem-se evidenciado a produção biotecnológica que utiliza microrganismos, sendo as leveduras de fundamental importância na geração de bioprodutos a partir dos licões hidrolisados da fração hemicelulósica das biomassas vegetais (ALBUQUERQUE et al., 2014).

A bioconversão por leveduras é considerada uma alternativa atraente, já que a rota biológica tem menor necessidade de energia (condições mais suaves de pressão e temperatura), é mais sustentável e ecologicamente correta. Diversas linhagens de leveduras são reportadas na literatura como bioprodutoras, no entanto, *Debaryomyces hansenii* e *Candida guilliermondii* são bastante consideradas por serem capazes de metabolizar pentoses como arabinose e xilose (BALAT et al., 2011; CORTEZ; MUSSATO; ROBERTO, 2016).

Da produção mundial de polióis, também conhecidos como edulcorantes, 42% são utilizados no processamento de alimentos. Dentre os edulcorantes, encontram-se o xilitol e o arabitol que apresentam poder adoçante similar à sacarose e pode ser utilizado como substituto de açúcar para pacientes diabéticos. Como enantiômeros, o xilitol e o arabitol possuem algumas propriedades semelhantes como seu poder anticariogênico, no entanto, o arabitol contém valor muito baixo de calorias quando comparado ao xilitol e, conseqüentemente a sacarose (KOGANTI; JU, 2013).

A obtenção de produtos biotecnológicos utilizando resíduos lignocelulósicos do sisal apresenta-se como alternativa de grande importância para a indústria alimentícia na produção de edulcorantes naturais, pois o resíduo de sisal possui baixo valor econômico e não concorre com matéria-prima de caráter alimentício, demonstrando assim assegurar alternativas para minimizar os impactos ambientais e valorizar a manutenção da produtividade agrícola de sisal alcançando por sua vez os desafios de sustentabilidade.

Em decorrência dos fatores mencionados, esta pesquisa foi desenvolvida com o objetivo de estudar a produção biotecnológica de edulcorantes utilizando o licor hidrolisado do bagaço do sisal (*Agave sisalana*) como substrato e as leveduras *Candida guilliermondii* e *Debaryomyces hansenii* como agentes de fermentação.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

Em geral, a biomassa lignocelulósica é definida como um recurso natural renovável que pode ser processada para fornecer formas bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para conversão biotecnológica. Em termos energéticos é toda e qualquer energia associada à energia química acumulada mediante processos fotossintéticos (BNDES, 2008).

Nas últimas décadas, vários cientistas consideraram associar a biomassa e o desperdício para a produção de energia de diversas maneiras, como o aproveitamento de resíduos como matéria-prima biotecnológica tem sido amplamente investigado, pois estes materiais depois de submetidos a um tratamento físico, químico e/ou térmico, podem liberar açúcares fermentáveis que servem como principal fonte de carbono para a produção de bioenergia e bioprodutos, gerando o interesse dos pesquisadores principalmente pela sua abundância e seu caráter renovável (SINGH et al., 2014).

Dentre as biomassas investigadas para obtenção de bioprodutos as mais utilizadas são procedentes de fontes vegetais (bagaço, cascas, palhas, cavacos, madeiras) que são fontes de carbono e nitrogênio, como por exemplo bagaço de maçã (DALANHOL, 2014), bagaço de cana-de-açúcar (DHALIWAL et al., 2011), bagaço do caju (ROCHA et al., 2014), sabugo de milho (PING et al., 2013), cascas de soja (CASSALES, 2010), palha de arroz (CHEN et al., 2011), casca de jabuticaba (SOUZA, 2013), casca de aveia, sorgo forrageiro (SENE et al., 2011) e sisal (XAVIER et al., 2018).

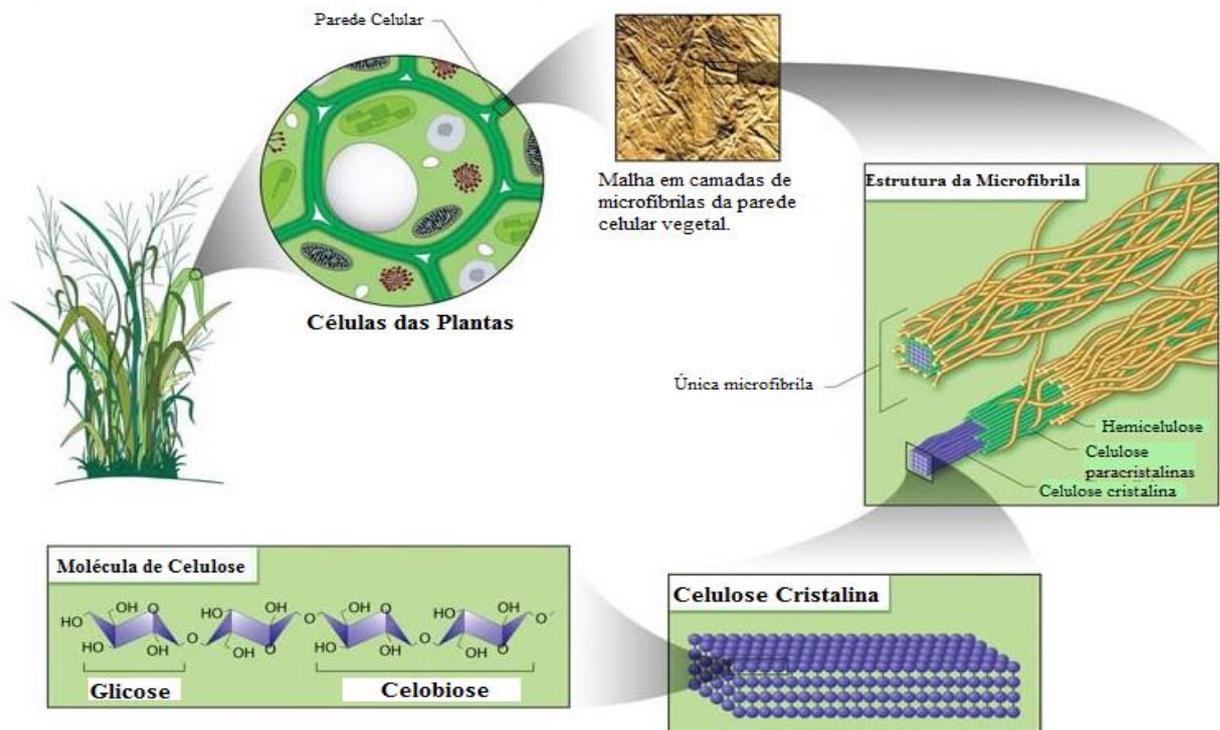
A planta industrial de processamento que utiliza biomassa lignocelulósica como insumo e tem seus processos e equipamentos altamente integrados, produzindo uma gama de produtos de maior valor agregado denomina-se biorrefinaria. Em outras palavras, biorrefinaria nada mais é do que uma instalação industrial que, por diferentes rotas tecnológicas, converte os diversos tipos de biomassa lignocelulósica em biocombustíveis, eletricidade, calor e insumos químicos (OCTAVE; THOMAS, 2009).

Nesse contexto, a otimização do processo de produção é importante para o mercado de uma biorrefinaria, pois auxilia na integração do processo para máxima eficiência da unidade de produção industrial, otimizando o tempo, agregando valor à matéria-prima e aos novos produtos, aumentando a receita e minimizando resíduos gerados constantemente pelas indústrias, conseqüentemente diminuindo os impactos ambientais.

2.1.1 Estrutura e composição da biomassa lignocelulósica

A biomassa lignocelulósica apresenta uma estrutura complexa constituída, principalmente por celulose (35–50%), hemicelulose (20–35%) e lignina (10–25%), além de pequenas quantidades de minerais e extrativos. As cadeias de celulose são unidas por ligações de hidrogênio, denominadas microfibrilas (Figura 1), as quais são presas umas as outras por hemicelulose, e recobertas por lignina. Essas microfibrilas estão frequentemente associadas sob a forma de macrofibrilas (OJEDA et al., 2011; SOCCOL et al., 2010), que apresentam interações formando uma estrutura altamente resistente (SAWATDEENARUNAT et al., 2015).

Figura 1: Estrutura de uma microfibrila, que contém 36 moléculas de celulose



Fonte: (Adaptado de BUCKERIDGE et al., 2010; US DOE, 2005).

A celulose é definida como um polímero não ramificado composto unicamente por subunidades de D-glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas. Análises apontam que a duplicação de sua conformação é conhecida como celobiose (4-O- β -D-glicopiranosil- β -D-glicopiranosil) (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2011).

A hemicelulose, por sua vez, é um heteropolímero de menor grau de polimerização que a celulose, entre 100 e 200, e possui várias ramificações composta de

diferentes carboidratos simples incluindo pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-glicose, D-manose, D-galactose), assim como os ácidos urônicos. Esses açúcares contêm 2-6 monômeros em sua estrutura e são unidos por ligações glicosídicas do tipo 1-3, 1-4 e 1-6, quase sempre acetiladas, formando uma estrutura fraca e hidrolítica que serve como uma conexão entre lignina e as fibras de celulose (STAMBUK et. al., 2008). A xilose é o principal açúcar monomérico na hemicelulose, no entanto, outros monômeros são encontrados nos pré-hidrolizados de diferentes tipos de biomassas como é o caso da arabinose, portanto, podem ser utilizados para a produção de xilitol e arabitol (DALLI; PATEL; RAKSHIT, 2017).

A estrutura química da lignina é complexa, sendo fundamentada nos três precursores monoméricos *p*-hidroxibenzil (H), guaiacila (G) e sinrigila (S) (LAHTINEN et al., 2009). A propriedade física mais significativa desta macromolécula é sua rigidez, que garante a estrutura do tecido vegetal e ainda previne o mesmo do colapso dos vasos condutores. Além da importante função estrutural, a lignina possui resistência à degradação química e biológica, resistindo assim ao estresse oxidativo e ao ataque de microrganismos (BETANCUR; PEREIRA JUNIOR, 2010).

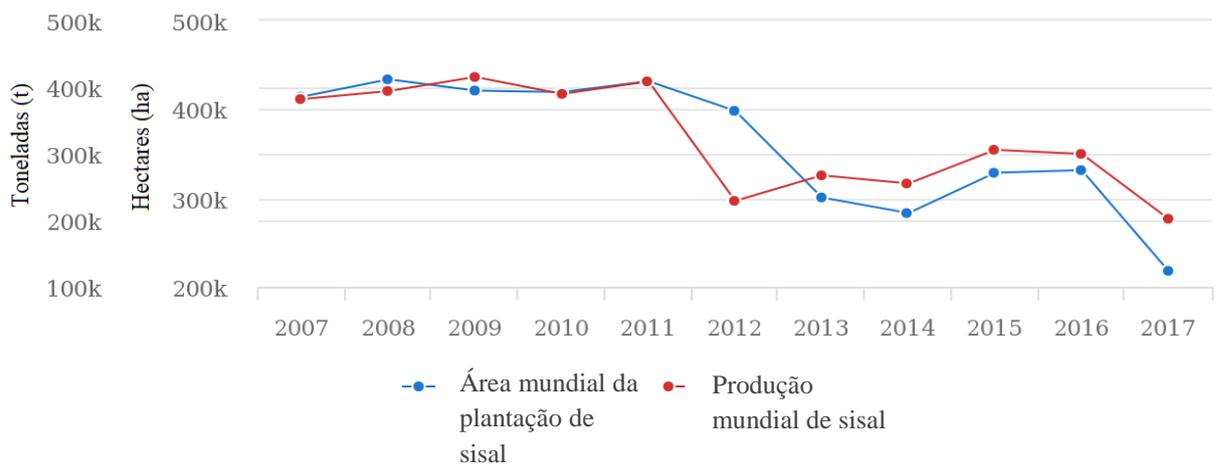
2.1.2 Biomassa lignocelulósica do semiárido: Sisal (*Agave sisalana*)

Sisal é uma planta do Agave originária do México que é conhecida por sua fibra dura e tem sido tradicionalmente utilizado em indústrias marinhas e na agricultura para fabricação de fios, corda, artesanato, devido a sua resistência, durabilidade, capacidade de estiramento, afinidade com certos corantes e resistência em água salgada. Uma planta de sisal (Figura 2) apresenta ciclo de crescimento curto e produz entre 200 e 250 folhas antes da floração, cada uma das quais contém cerca de 700-1400 feixes de fibras, atingem comprimento de 0,5 até 2 metros de altura e apresenta-se na forma de espada. (BOTURA et al., 2013).

Figura 2: Sisal (*Agave Sisalana*)

Fonte: Arquivo do autor (Lagoa Cercada, Nova Floresta – PB).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), a produção mundial de sisal no ano de 2011 foi de 408.218 toneladas. Na Figura 3 é mostrada a produção mundial de sisal em 10 anos (2007-2017), na qual pode ser observada a redução de produção no ano de 2012 (229.157 toneladas), por consequência da crise econômica, bem como também o decréscimo na produção do ano de 2016 (299.749 toneladas) para 2017 (202.223 toneladas) (FAOSTAT, 2019).

Figura 3: Produção mundial de sisal em 10 anos

Fonte: adaptado da FAOSTAT (2019).

O Brasil é o maior produtor mundial de sisal com 79.629 toneladas no ano de 2017, é também o maior exportador de fibras de sisal e de seus produtos derivados como cordéis, almofadas, tapetes e carpetes; entretanto, seu valor comercial ainda é limitado (FAOSTAT, 2015).

Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a região Nordeste é a principal produtora do país, sendo a Bahia produtora de 95,8%, a Paraíba 3,5%, seguida do Ceará 0,4% e Rio Grande do Norte 0,3%. Grande parte da produção de fibra é destinada para a exportação. A região semiárida do Brasil se destaca principalmente por suas características edafoclimáticas que favorecem a produção do sisal (CONAB, 2015).

As fibras de sisal são uma das fibras duras mais importantes produzidas no mundo (Figura 4). Na Figura 4a são as fibras obtidas a partir das folhas de *Agave sisalana* e e na Figura 4b a fibra depois de desfibramento, seca e estocada para posterior comercialização. As fibras de sisal foram utilizadas como agentes de reforço em compostos preparados a partir de PET reciclado, explorando para preparar materiais com um alto valor agregado (SANTOS et al., 2015).

Figura 4: Fibras de sisal extraída da folha e após secagem pronta para exportação



Fonte: Arquivo do autor (Lagoa Cercada, Nova Floresta – PB).

O processo de desfibramento do sisal (Figura 5) ocorre com a utilização de uma máquina desfibradora (Figura 5a), onde o puxador insere e remove rapidamente a folha de sisal, e parte da planta é desmembrada, separando a fibra da parte residual denominado bagado do sisal (Figura 5b).

Figura 5: Processo de desfibramento



Fonte: Arquivo do autor (Lagoa Cercada, Nova Floresta – PB).

Vale ressaltar que o aproveitamento de resíduos do sisal é de grande importância, pois reduz a poluição ambiental, uma vez que o o descarte dos resíduos no meio ambiente causa problemas para a fauna e a flora da região, como pode ser observado na Figura 6. Esse resíduo, também conhecido como bagaço é composto de água, parênquima, celulose, fibras de vários tamanhos, compostos inorgânicos e componentes relacionados ao metabolismo primário e secundário da planta (SANTOS et al., 2013).

Figura 6: Bagaço de sisal (resíduo descartado no meio ambiente)



Fonte: Arquivo do autor (Lagoa Cercada, Nova Floresta – PB).

Estudos relataram recentemente que os resíduos de sisal possuem em sua constituição alguns ingredientes bioativos como pectina (SANTOS et al., 2013) e flavonas (CHEN et al.,

2009). Outros constituintes também presentes nos resíduos de sisal são isoflavonóides, hemicelulose, tigogenina e ramnogalacturonano (RIBEIRO; BARRETO; COELHO, 2015; ZHANG; LIU; LIN, 2014). A formação de determinados extratos lipofílicos originados das fibras do sisal também tem sido investigada (GUTIÉRREZ; RODRÍGUEZ; DEL RÍO, 2008).

2.2 BIOCONVERSÃO

A utilização de biomassa vegetal para produção biotecnológica é um processo que envolve várias etapas, em virtude da complexidade da biomassa. Geralmente, é necessário o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos antes da hidrólise química ou enzimática, favorecendo o processo de bioconversão (SOCCOL et al., 2010; OJEDA et al., 2011).

A conversão biotecnológica é majoritariamente conseguida pelo biocatalisador de células inteiras, envolvendo bactérias, fungos, leveduras, estirpes recombinantes e/ou sistema enzimático. No entanto, a redução enzimática livre de células ou a catálise enzimática imobilizada pode não ser econômica, devido à alta exigência de cofator e, portanto, esta opção foi mantida fora do escopo desta revisão (DASGUPTA et al., 2017).

Para iniciar a produção de compostos industrialmente importantes a partir da biomassa celulósica, é necessária a bioconversão dos componentes celulósicos em açúcares fermentáveis (KUMAR; SINGH; SINGH, 2008).

2.2.1 Obtenção de açúcares fermentescíveis

Os tratamentos aplicados à biomassa são destinados, principalmente, à desorganização do complexo lignocelulósico por meio da redução do teor de lignina e hemicelulose, redução da cristalinidade da celulose e aumento da porosidade, provocando assim, a abertura da estrutura da parede celular, de forma a promover uma maior degradação da fração de celulose (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Recentemente, têm-se realizado um estudo centrado na melhoria da digestibilidade da biomassa lignocelulósica por meio de tratamentos utilizando vias bioquímicas (SAWATDEENARUNAT et al., 2015).

Um tratamento é considerado eficiente quando se obtém, para a etapa subsequente, uma biomassa enriquecida em celulose, de fácil hidrólise, e com a menor quantidade de açúcares solúveis perdidos em reações secundárias. Para que seja economicamente competitivo, deve também resultar em elevada recuperação da lignina e hemicelulose para posterior utilização

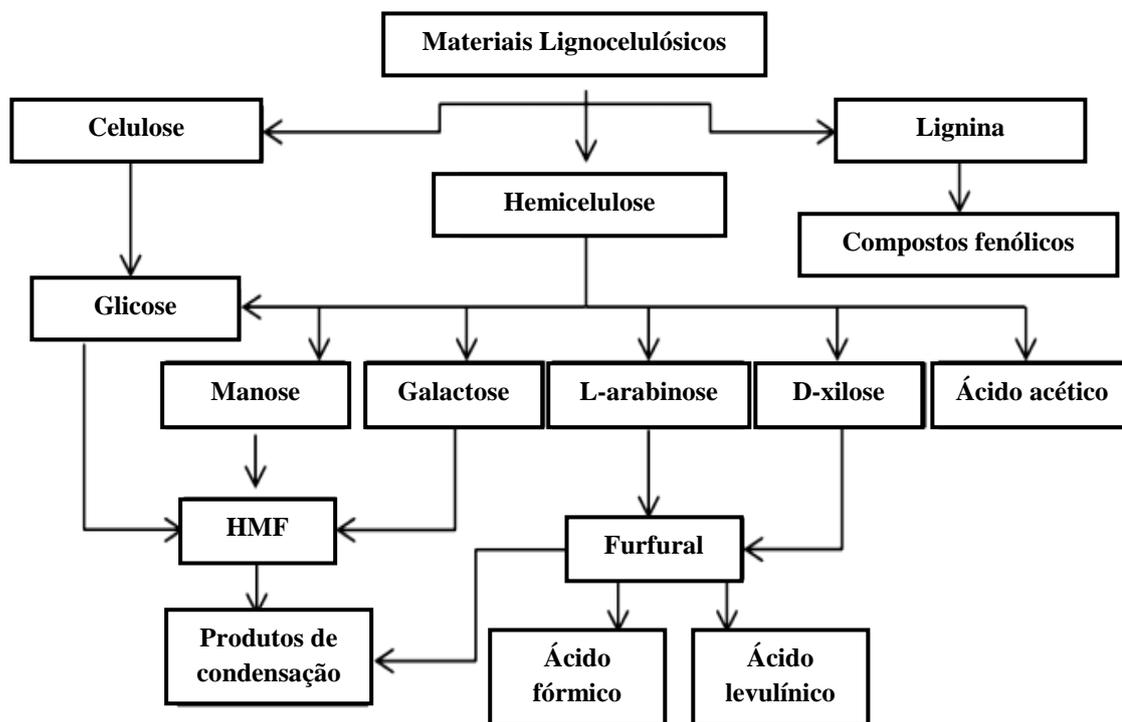
como matérias-primas de outros processos. Além disso, deve gerar o mínimo de compostos inibidores aos microrganismos, apresentar segurança, simplicidade operacional e consumo reduzido de insumos e energia (CARDOSO et al., 2012).

Cada tratamento tem um efeito específico sobre as frações de celulose, hemicelulose e lignina. Tratamentos químicos tendem a solubilizar a hemicelulose e lignina. Alguns métodos envolvem o uso de um ácido, álcali, amônia, solvente orgânico, SO₂, CO₂ e outros produtos químicos (ALVIRA et al., 2010; SARKAR et al., 2012).

A hidrólise com ácido diluído é um dos tratamentos mais eficientes na solubilização da fração hemicelulósica. A lignina é pouco dissolvida por este tratamento embora possa ser parcialmente quebrada. Ácidos fortes podem quebrar ligações glicosídicas de polissacarídeos, liberando os monossacarídeos individuais, mas também podem degradar açúcares monoméricos (JURADO et al., 2009).

A desidratação dos monômeros, por sua vez, produz alguns compostos tóxicos que provocam retardamento no processo fermentativo, inibem o crescimento da levedura e a síntese de proteínas, além da perda na integridade das membranas dos microrganismos. Os principais compostos tóxicos presentes no hidrolisado de biomassa lignocelulósica são furfural devido à degradação das pentoses, como xilose e arabinose, e hidroximetilfurfural das hexoses especialmente glicose, além de outros compostos como os fenólicos derivados da lignina e produtos voláteis em ambientes ácidos, como observado na Figura 7 (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

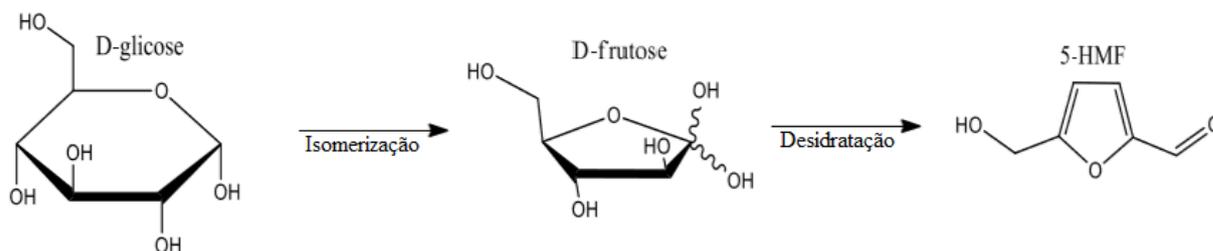
Figura 7: Produtos resultantes da hidrólise de material lignocelulósico



Fonte: adaptado (BALAT, 2011).

A modificação catalítica de hexoses/pentoses em furanos envolve várias etapas como desidratação, hidratação, hidrólise, isomerização, condensação aldólica, hidrogenação e oxidação (AIDA et al., 2007). Na Figura 8 são mostradas reações de conversão de glicose em 5-hidroximetilfurfural que podem ocorrer quando submetida a elevadas condições de temperaturas e pressão. A síntese do HMF pode ser realizada empregando a frutose, glicose ou sacarose como matéria-prima, sendo que o método mais fácil de obter o HMF é através da desidratação por catálise ácida da frutose. Ao utilizar a glicose é necessário combinar o processo de sua isomerização em frutose com o processo de desidratação da frutose (CRISCI et al., 2010, TONG; MA; LI, 2010).

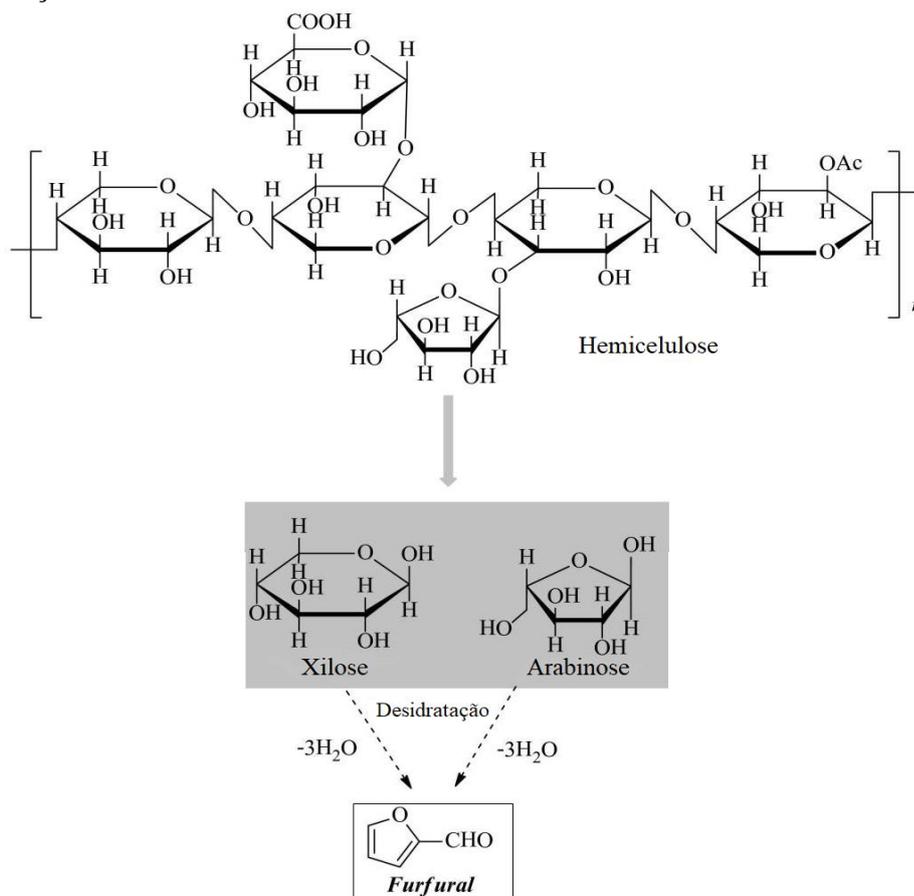
Figura 8: Reação de conversão de glicose a HMF



Fonte: adaptado (AIDA et al., 2007).

A hemicelulose presente na biomassa sofre hidrólise em meio ácido resultando em monossacarídeos (xilose e arabinose), que é desidratada, quando submetidos a elevadas de pressão e temperatura, formando furfural, como podemos observar na Figura 9 (MAZAR et al., 2018).

Figura 9: Reação de conversão de xilose e arabinose a furfural



Fonte: adaptado (DESHAVATH et al., 2017).

As reações de hidrólise podem ser aceleradas na presença de catalisadores que podem ser orgânicos, inorgânicos (HCl e H₂SO₄), sais, entre outros (KASSAYE; PANT; JAIN, 2017).

Os licores obtidos após a hidrólise ácida necessitam de algumas etapas de processos antes de serem utilizados como meios de fermentação. Em geral, as seguintes operações são necessárias: concentração, detoxificação, neutralização, centrifugação e suplementação com nutrientes (ALVIRA et al., 2010).

2.2.2 Produção biotecnológica de edulcorantes

O processo químico tem dominado a produção industrial de açúcares e edulcorantes nas últimas décadas. Nessa produção, as soluções purificadas são submetidas ao processo de hidrogenação catalítica, que apresentam condições de alta temperatura (140-200 °C) e pressão (50-60 bar) (SU et al., 2013). A rota química para a produção de xilitol oferece alto rendimento e eficiência de conversão, mas sofre grandes inconvenientes como extensas etapas intermediárias de purificação, recuperação de produtos, desativação de catalisadores e reciclagem (complicada devido à homogeneidade de solução), requisitos para tornar o processo geral muito caro (DASGUPTA et al., 2017).

Vários estudos têm buscado alternativas às rotas químicas, com especial atenção aos processos biotecnológicos, que ainda têm o objetivo de buscar soluções para o aproveitamento dos resíduos agroindustriais, com intuito de auxiliar na manutenção do meio ambiente e reduzir os custos de processamento (ALBUQUERQUE et al., 2014).

Na busca de alternativas ecológicas para a obtenção do xilitol, a via biotecnológica tem sido amplamente estudada. Pesquisas sobre o xilitol, arabitol e seus derivados estão aumentando, tanto química quanto biotecnologicamente. Os estudos estão focados principalmente na redução dos custos de fabricação destes polióis, otimizando e reduzindo as etapas do processo tecnológico (ARCAÑO et al., 2018).

Dasgupta et al. (2017) estudaram os desafios e perspectivas da produção de xilitol. Na revisão, os autores concluíram que a conversão biocatalítica de xilitol pode emergir como um processo verde ao utilizar matérias-primas renováveis e que o verdadeiro desafio será converter o processo biocatalítico de nível de bancada de laboratório para nível de escala piloto, para que a bioprodução de xilitol possa ser considerado um processo competitivo em termos de custo e baixo impacto ambiental.

De acordo com Albuquerque et al. (2014), os valores de produtos por processos biotecnológicos utilizando leveduras são variáveis, pois os resultados estão relacionados com as diferentes espécies microbianas e as condições de crescimento envolvido (fontes de carbono, nitrogênio, pH, aeração, dentre outros fatores que influenciam diretamente no resultado final do processo). O controle dessas condições é, portanto, de fundamental importância para aperfeiçoar e aumentar o processo de produção.

2.2.3 Leveduras produtores de arabitol e xilitol

As primeiras investigações sobre as leveduras produtoras de L-arabitol foram relatadas na década de 1970, durante estudos sobre o tratamento e aplicação de materiais lignocelulósicos. Barnett, em 1976, descobriu que entre as 400 leveduras incluídas em seu estudo, cerca de 100 linhagens cresceram em L-arabinose aerobicamente. *Candida tropicalis* e *Pachysolen tannophilus* foram às primeiras espécies a serem capazes de metabolizar L-arabinose em condições aeróbicas e fermentativas e produzir arabitol aerobicamente.

As linhagens de leveduras nativas mais eficientes capazes de produzir L-arabitol a partir de L-arabinose, D-xilitol a partir de D-xilose são do gênero *Candida*, *Pichia*, *Debaryomyces*, *Pachysolen* e *Rhodotorula* (BURA;VAJZOVIC;DOTY, 2012; KOGANTI; JU, 2013).

O gênero *Debaryomyces* sofreu importantes revisões desde que foi relatado pela primeira vez por Klöcker em 1909. A primeira grande descrição do gênero, por Lodder e Kreger-van Rij em 1952, incluiu cinco espécies, 15 foram reconhecidas até 2010, embora agora este número tenha reduzido para 11 espécies. *Debaryomyces* é um gênero ascomicetico, são esféricas e têm uma parede verruga. A reprodução assexuada de *Debaryomyces* é caracterizada por brotamento multilateral e pseudo-hifas ausentes ou pouco desenvolvidas (WRENT et al., 2014).

Debaryomyces hansenii, uma levedura altamente osmotolerante e halotolerante, normalmente habita ambientes hiper-salinos como a água do mar e salmouras concentradas. Pode tolerar níveis de salinidade até 4M NaCl, enquanto o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* é inibido quando a salinidade atinge acima de 1,7M NaCl. Os mecanismos moleculares subjacentes à sua extrema osmotolerância e halotolerância atraíram atenção considerável dos pesquisadores (MINHAS; BISWAS; MONDAL, 2009).

A faixa de pH para o crescimento de *D. hansenii* é de 2,5 a 9,0 e a atividade de água (a_w) oscila entre 0,81 e 0,91, são capazes de crescer a 30 °C e há um relato de crescimento em 12,5 °C. A via das pentoses-fosfato também opera nesta levedura, como consequência, sua bioenergética é altamente dependente da respiração. Sua produção é maior em valores de pH próximos a 5,0 e diminui abaixo de pH 3,0 e acima de pH 7,0. *Debaryomyces hansenii* também exibe uma grande capacidade de utilizar a xilose, que por sua vez é o segundo açúcar mais abundante na biomassa lignocelulósica. Esta fonte de energia renovável é de grande interesse para a indústria (WRENT et al., 2014).

Estudo sobre a produção de arabitol relata a potencialidade do microrganismo *D. hansenii*. Os pesquisadores concluíram que cerca de 40 gL⁻¹ de arabitol podem ser produzidos em 5 dias com 55% de rendimento. Entre as composições avaliadas, o meio com uma relação N/P de 9 obteve maior produção de arabitol. A melhor operação foi iniciar a fermentação em uma condição de alta ($\pm 100\%$) OD, pH próximo ao neutro (6,7), permitindo que os dois parâmetros caíssem naturalmente, ao longo do crescimento celular, aos valores de controle de 5% OD e pH 3,5. Sob as condições de fermentação otimizadas, o arabitol foi produzido a partir do glicerol com uma produtividade volumétrica de 0,33 gL⁻¹h⁻¹ e uma produtividade específica de 0,02 gg⁻¹h⁻¹. Estes valores de produtividade volumétrica e produtividade específica foram 2 a 3 vezes maiores do que os obtidos nos estudos anteriores de agitação com *D. hansenii* (KOGANTHI; JU, 2013).

Candidatos microbianos com capacidade de fermentar xilose para produção de xilitol, são bem revisados e a maioria deles pertencem à comunidade de leveduras, com poucas exceções bacterianas. Fungos filamentosos também são relatados para produzir xilitol, mas seus rendimentos são significativamente baixos, como observado na Tabela 1. As leveduras do gênero *Candida* demonstram ser mais promissoras quando confrontadas com as demais leveduras, em termos de produção de xilitol, rendimento e produtividade (RAFIQUL E SAKINAH, 2013).

Tabela 1: Produção microbológica de xilitol

Microrganismo	Temperatura	pH	Concentração inicial de xilose	Xilitol	Rendimento	Produtividade de volumétrica	Referência
<i>Gênero</i>	°C	–	(g.L ⁻¹)	(g.L ⁻¹)	(g.g ⁻¹)	(g.L ⁻¹ h ⁻¹)	–
Bactéria							
<i>Enterobacter liquefaciens</i> 553	30	7,0	100	33,3	–	0,35	Yoshitake et al. (1973)
<i>Corynebacterium</i> sp. B-4247	30	7,2	100	40	0,48	0,8	Rangaswamy; Agblevor (2002)
Fungos							
<i>Penicillium crustosom</i> CCT 4034	30	6,0	11,50	0,52	–	0,005	Sampaio et al. (2003)
<i>Aspergillus niger</i> PY11	30	5,0	30	1,39	0,101	–	Kang et al. (2016)
Leveduras							
<i>Candida tropicalis</i> IF0 0618	30	5,0	172	–	0,64	2,67	Horitsu et al. (1992)
<i>Candida tropicalis</i> KCTC 7221	30	6,5	150	110	0,81	5,4	Kim et al. (2004)
<i>Candida</i> sp. 559-9	30	5,0	200	173	~0,90	1,44	Ikeuchi et al. (1999)
<i>Pichia</i> sp.	28	–	40	25	0,58	0,5	Rao et al. (2007)
<i>Pichia stipitis</i> CBS 5773	32	5,7	52	–	0,52	0,44	Neeru et al. (2013)
<i>Debaromyces hansenii</i> UFV-170	30	6,0	10	5,84	0,54	0,24	Sampaio et al. (2004)
<i>Debaromyces nepalensis</i> NCYC 3413	30	7,0	100	36	0,44	–	Kumdam et al. (2012)
<i>Hansunela anomala</i> NCAIM Y.01499	30	4,5	50	21,7	0,47	0,23	Mareczky et al. (2015)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> IMB2	45	4,5	50	7,78	0,42	0,24	Mueller et al. (2011)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> CCA510	30	6,0	36,44	12,27	0,50	0,170	Albuquerque et al. (2015)

Fonte: Adaptado DASGUPTA et al., 2017.

Desde a descoberta inicial, numerosas leveduras fermentadoras de xilose foram relatadas. Entre as melhores leveduras que fermentam xilose, as mais conhecidas são a *Candida guilliermondii*, *Pichia stipitis*, algumas cepas de *Candida tropicalis* produzem principalmente xilitol a partir de xilose; e *Pachysolen tannophilus* que produz uma mistura de etanol e xilitol. *C. guilliermondii* FTI 20037 é considerado um excelente produtor de xilitol a partir da xilose. Desde sua descoberta no final de 1980, muitos trabalhos têm sido publicados em vários aspectos da fermentação para produção de xilitol pela FTI 20037 em ambos os meios definidos e hidrolisados lignocelulósicos ricos em xilose (WEN et al., 2016).

A pesquisa realizada por Arruda et al. (2017) demonstra que o coeficiente volumétrico de transferência de massa de oxigênio (kLa) é útil para facilitar a escala de produção de xilitol por *C. guilliermondii* em nível de bancada e escala-piloto. Um valor de kLa de 16 h^{-1} foi aplicado em reatores com capacidade volumétrica de 2,4 L, 18 L e 125 L. A fermentação foi aumentada com sucesso do nível de bancada para escala piloto, com todos os experimentos demonstrando eficiência de conversão de xilose em xilitol de 60% no mínimo. Em escala piloto, rendimento e produtividade volumétrica de $0,55 \text{ gg}^{-1}$ e $0,31 \text{ gL}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente, com taxa de crescimento específico máxima de $0,26 \text{ h}^{-1}$. O uso desse parâmetro (K_{La}) permitiu a reprodução precisa dos resultados obtidos no nível do biorreator de bancada para uma escala maior. Trata-se de informação extremamente crucial e importante, considerando que o objetivo do processo biotecnológico proposto é atingir o nível requerido para a viabilidade industrial.

2.2.4 Metabolismo de leveduras produtoras de arabitol e xilitol

Os pesquisadores observaram que todas as leveduras investigadas assimilaram açúcares (glicose, xilose e arabinose) sequencialmente. Revelaram, ainda, que a arabinose foi o último açúcar a ser consumido, sugerindo que a L-arabinose apresenta maior necessidade metabólica de produzir enzimas da via assimilatória (KORDOWSKA-WIATER, 2015).

O transporte de açúcar através da membrana celular é o primeiro passo no metabolismo das pentoses. A produção microbiana de xilitol tem sido extensivamente estudada como uma alternativa ao processo químico bastante utilizado pelas indústrias atualmente, uma vez que não necessita de etapas extensas para a purificação da xilose auxiliando a redução dos custos de produção. Microrganismos como bactérias, leveduras e

fungos possuem a capacidade de fermentar a xilose presente no hidrolisado derivado de resíduos lignocelulósicos e produzir xilitol (RAO et al., 2016).

A via metabólica utilizada por estes microrganismos na qual o xilitol e o arabitol é produzido, está apresentada na Figura 10, onde a xilose é reduzida a xilitol na presença de uma enzima xilose redutase (XR) de NADH e/ou NADPH, que é secretada da célula ou oxidada em xilulose pela xilitol desidrogenase (XDH). As duas reações acima são consideradas etapas importantes da taxa na produção de xilitol. Além disso, pela enzima xilulose quinase (XKS), a xilulose é fosforilada (PPP) em 5-fosfato de xilulose e catabolizada ao entrar nas vias das pentoses fosfato, glicolítica ou da fosfocetolase, é convertida, através de reações não oxidativas da via hexose monofosfato, em intermediários como gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato, os quais podem então ser metabolizados por esta via, conectada a outras como o ciclo de Krebs e às reações de fermentação alcoólica (ARRUDA et al., 2011).

A via das pentoses fosfáticas (PPP) consiste em duas fases: uma fase oxidativa e uma fase não oxidativa. Na fase oxidativa do PPP, os fosfatos de hexose (como a glicose 6-fosfato) são oxidados em fosfatos de pentose (como a 5-fosfato de ribulose), fornecendo o NADPH necessário nas vias biossintéticas. Na fase não oxidativa, os fosfatos das pentoses são transformados em hexose e triose fosfatos. Frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato são produzidos a partir de X5P na fase não-oxidativa do PPP. Estes são então transformados em piruvato na via glicolítica. O piruvato formado pode ser convertido em etanol ou pode entrar no ciclo do ácido tricarbóxico (TCA). Sob condições aeróbicas, o NADH formado na segunda etapa do metabolismo da xilose pode ser reoxidado no sistema de transporte de elétrons e, como consequência, o xilitol não é produzido. Condições limitadas pelo oxigênio ou condições anaeróbicas, favorecem a síntese do xilitol devido ao acúmulo de NADH que subsequente inibe a XDH ligada ao NAD. Conclui-se que o oxigênio reduz as razões de XR dependente de NADH para atividades de XDH dependentes de NAD e consequentemente minimiza a produção de xilitol em leveduras que utilizam xilose (RAFIQUL E SAKINAH, 2013).

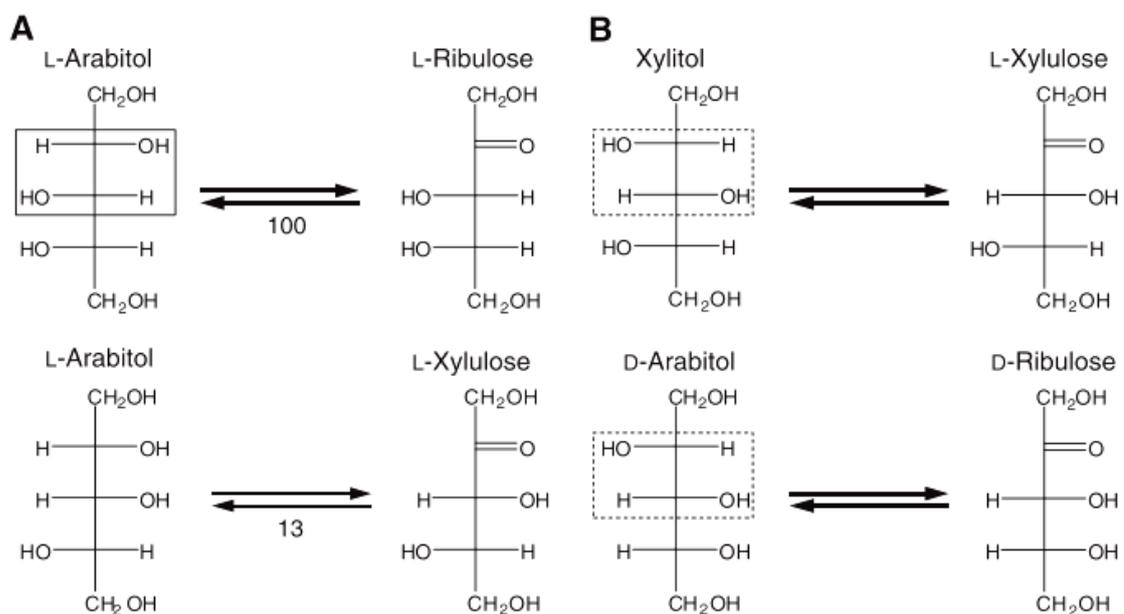
A produção de xilitol é realizada usando células livres ou células imobilizadas em processo contínuo ou descontínuo por meio sintético ou substratos lignocelulósicos. A especificidade das enzimas XR e XDH as coenzimas reduzidas e oxidadas, respectivamente, varia de acordo com a levedura (ARRUDA et al., 2011).

Até o momento, há pouca informação sobre o transporte de L-arabinose em leveduras. Na etapa inicial do metabolismo da arabinose em leveduras, essa pentose é convertida pela L-arabinose redutase em L-arabitol, que é posteriormente oxidado em L-xilulose por L-arabitol-4-desidrogenase. Na etapa seguinte, a L-xilulose é convertida em xilitol pela L-xilulose redutase. Esse pentitol é um composto intermediário nas vias catabólicas da arabinose e xilose. Em fungos, L-arabinose e D-xilose redutases preferem NADPH como cofator, enquanto que as poliol desidrogenases são dependentes de NAD, pois em baixas condições de oxigênio a regeneração do NAD é limitada e o arabitol é acumulado (MAHMUD et al., 2013).

Apesar dos escassos dados bioquímicos relativos à utilização da L-arabinose por leveduras, observou-se que as vias catabólicas da arabinose e xilose se sobrepõem parcialmente, pois no primeiro passo a D-xilose é transformada em xilitol pela D-xilose redutase, que depende de NADPH (preferencialmente) ou NADH como cofatores. A especificidade do cofator duplo da aldose redutase (XR) pode ajudar algumas células de levedura a evitar o acúmulo excessivo de xilitol sob aeração limitada. Em uma etapa adicional, o xilitol é convertido em D-xilulose pela enzima xilitol desidrogenase, enzima dependente do NAD, e essa pentose é desviada para o caminho das pentoses fosfato, após fosforilada pela D-xilulose quinase. Sabe-se que muitos tipos de leveduras são capazes de assimilar a L-arabinose como a única fonte de carbono e energia. Eles produzem biomassa aerobicamente e, sob aeração limitada, eles secretam L-arabitol no meio. Apenas duas espécies (*Candida arabinoferrmentans* e *Ambrosiozyma monospora*) foram relatadas para produzir traços de etanol a partir de L-arabinose (KORDOWSKA-WIATER, 2015).

metabolismo do xilitol foram identificados duas enzimas a xilitol-4-desidrogenase (XDH) que mostra atividade oxidase com xilitol e D-arabitol como substratos, não demonstrando nenhuma atividade para L-treitol, sugerindo que XDH prefere alditóis contendo configuração D-treo adjacente a um grupo álcool primário como substratos. Assim, as especificidades do substrato de LAD e XDH são complementares entre si. Isto poderia fornecer a levedura a capacidade de utilizar simultaneamente múltiplos açúcares (SAKAKIBARA; TORIGOE, 2012).

Figura 11: Esquema do metabolismo do xilitol e arabitol por leveduras



Fonte: (SAKAKIBARA; TORIGOE, 2012).

2.2.5 Fatores que influenciam o metabolismo das leveduras produtoras de arabitol e xilitol

Os resultados obtidos por diferentes cientistas sugerem que existem diversos fatores que limitam a produção de arabitol e xilitol por leveduras. Entre os fatores que afetam a assimilação do substrato e a secreção do produto estão temperatura de incubação, composição do meio (o tipo de substrato e concentração das fontes C e N), pH, suprimento de oxigênio associado ao volume de cultura, especificidade do microrganismo e velocidade de agitação do shaker. Este último fator é fundamental durante a biotransformação, pois afeta o equilíbrio

dos cofatores redox, que por sua vez determinam o tipo e a concentração do produto secretado no meio. Portanto, a otimização desses fatores é necessária para obter uma produção eficiente (KORDOWSKA-WIATER, 2015).

2.2.5.1 Fontes de Carbono

A concentração inicial dos açúcares no meio de fermentação exerce grande influência sobre a produção por leveduras. Os materiais lignocelulósicos são baratos, renováveis e abundantes fontes de carbono promissoras disponíveis. Após a hidrólise da biomassa, os açúcares intrínsecos na fração hemicelulósica (arabinose e xilose) são liberados e posteriormente fermentados. Estudos demonstram que em faixa de concentração de xilose entre 60 e 80 g/L a produção de xilitol é favorecida. Entretanto, o aumento excessivo da concentração de xilose provoca um decréscimo na velocidade de crescimento do microrganismo, com conseqüente queda na produção de xilitol (RAO et al., 2016). Na Tabela 1, as concentrações iniciais de xilose variaram entre 10 e 200 gL⁻¹.

Misra, Raghuwanshi e Saxena (2013) utilizaram espigas de milho como substrato potencial para produção de xilitol por *C. tropicalis*. Obteve-se um máximo de 20,92 gL⁻¹ de xilose por hidrólise ácida. O hidrolisado foi submetido à concentração assistida por micro-ondas, à quantidade de xilose foi elevada para 52,71 gL⁻¹ resultou na produção de xilitol de 15,19 gL⁻¹ e rendimento de 0,31 gg⁻¹.

A produção de arabitól é muito influenciada pela concentração de açúcar no meio. Autores relataram concentrações ideais de fontes de carbono deve está na faixa de 20-100 gL⁻¹ de arabinose para produção de arabitól (KORDOWSKA-WIATER, 2015).

Kumdam, Murthy e Gummadi (2013) estudaram o efeito da alta concentração inicial de substrato na produção de etanol e de arabitól. Quando concentração inicial de substrato foi aumentada para 150 gL⁻¹, a taxa de utilização e crescimento da levedura *Debaryomyces nepalensis* no substrato foi mais lenta quando comparado a outras fermentações desse estudo, onde foram utilizados 100 gL⁻¹.

2.2.5.2 Fontes de Nitrogênio

Várias fontes de nitrogênio orgânico como extrato de levedura, peptona, uréia, ácido casamino e fontes inorgânicas como sulfato de amônio, nitrato de amônio e cloreto de amônio são geralmente usados na bioprodução. A proporção do nitrogênio inorgânico para orgânico podem afetar o crescimento e o metabolismo das células das leveduras (LOMAN; ISLAM; JU, 2018).

Um estudo sobre a produção de etanol e arabitol por Kordowska-wiater (2015) mostrou que o sulfato de amônio serviu como a melhor fonte de nitrogênio, enquanto, na presença de nitritos e nitratos, a *Debaryomyces nepalensis* não conseguiu metabolizar glicose e arabinose de forma eficiente. Nessa pesquisa o extrato de levedura provou ser uma fonte integral de aminoácidos e outras vitaminas para o crescimento da *D. nepalensis*. Além disso, para determinar a concentração ótima de sulfato de amônio, os experimentos variaram entre 3, 4,5 e 6 gL⁻¹ de sulfato de amônio. O crescimento da biomassa e a utilização do substrato não foram consideravelmente afetados neste intervalo de concentração. O rendimento de arabitol e etanol aumentaram para 0,12 gg⁻¹ e 0,21 gg⁻¹ quando 6 g de (NH₄)₂SO₄ foram incluídos no meio.

Zhang et al. (2012) investigaram o efeito de fontes de nitrogênio na produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de resíduos hortícolas utilizando a cepa *Candida athensensis* SB18. O meio sintético contendo 150 gL⁻¹ de xilose foi suplementado com diferentes fontes de nitrogênio, como sulfato de amônio, nitrato de amônio, ureia e casaminoácido. Entre os quais, a adição de ureia melhorou a conversão de xilose com um maior rendimento de xilitol de 0,76 gg⁻¹.

Os efeitos da relação C/N na produção de arabitol também foram declarados por Loman, Islam e Ju (2013), os autores avaliaram a relação C/N na produção de arabitol e relataram que quanto maior essa relação C/N, maior será a produção de arabitol que foi de 36 gL⁻¹ de arabitol utilizando proporção de C/N de 63 que foi a maior relação utilizadas por eles utilizando a *Debaryomyces hansenii*. Os cientistas abordaram ainda ao efeito das razões de nitrogênio inorgânico para orgânico, I/ON, de 0 a 1 e mostraram que maiores concentrações de arabitol de 36,6 ± 1,5 gL⁻¹ foram obtidas em maiores proporções I/ON de 0,64, 0,8 e 1,0, e menores concentrações de arabitol de 30,6 ± 1,2 gL⁻¹ foram encontradas quando nitrogênio

inorgânico não estava presente ou em baixa I/ON (0,39). Os resultados sugeriram que incluir alguma fonte de nitrogênio inorgânico foi útil para a produção de arabitol nessa relação C/N.

2.2.5.3 pH

A determinação do efeito do pH foram consideradas potencialmente valiosas devido à ionização dependente do pH dos grupos envolvidos na ligação de substratos e catálise. Um estudo relata que o valor do pH depende do microrganismo estudado, mas a faixa de 3,6 a 7,0 (principalmente 5,5 a 6,0), são favoráveis para crescimento de leveduras (KORDOWSKA-WIATER, 2015).

Em outra investigação, os pesquisadores observaram que o pH ótimo para a conversão de xilose em xilitol por xilose-redutase de *Candida parapsilosis* foi 6,0, apresentando atividade máxima da enzima (RAFIQUL; MIMI SAKINAH, 2013). Sirisansaneeyakul, Wannawilai e Chisti (2013) avaliaram a produção de xilitol por *Candida magnolia* TISTR 5663 sob condições limitadas de oxigênio. O maior rendimento de xilitol (0,72 gg⁻¹) foi obtido utilizando a biomassa de 50 gL⁻¹ a pH 7,0.

Outro estudo revela que o pH teve um efeito significativo na produção de arabitol. Foram avaliados valores de pH que variaram de 3,0, 3,5, 4, 5 e 6. Para os diferentes sistemas de pH as concentrações máximas alcançadas também foram diferentes: aproximadamente 17 gL⁻¹ para pH 3, 21 gL⁻¹ para pH 3,5, 23 gL⁻¹ para pH 4, 25 gL⁻¹ para pH 5 e 30 gL⁻¹ para pH 6. Os autores descobriram que um pH mais alto (mais próximo do neutro) era mais favorável ao crescimento de células de levedura (KOGANTI; JU, 2013).

De acordo com Kumdam, Murthy e Gummadi (2013), a *Debaryomyces nepalensis* sobrevive em um amplo intervalo de pH de 3,0 a 11,0. O trabalho teve o interesse de determinar o pH ótimo para o crescimento e a produção de metabólitos. Nesse estudo, o pH inicial do meio de cultura foi variado na faixa de 5,0 a 7,0 e tanto o crescimento quanto a utilização do substrato foram menores quando o pH inicial do meio foi de 5,0 e 5,5. Com o pH inicial de fermentação entre 6,0 e 7,0, houve forte produção de metabólitos. Em pH 6,0, um máximo de 10,4 gL⁻¹ de arabitol foram produzidos, manifestando baixa produtividade do produto em pH inferior.

2.2.5.4 Temperatura

A maioria das leveduras cresce entre 30 °C a 37 °C para fins biotecnológicos de produção de xilitol e arabitol. O efeito da temperatura de incubação na produção de arabitol por *Pichia manchurica* foi estudado a três temperaturas diferentes 25, 30 e 35 °C por Sundaramoorthy e Gummadi (2018). Os autores verificaram que a temperatura é um fator chave na produção de arabitol. Entre as três diferentes temperaturas testadas, 30 °C apresentou a produção máxima de arabitol (34,7 gL⁻¹), com um rendimento de 0,24 gg⁻¹.

Células de *C. guilliermondii* foram capazes de produzir eficientemente xilitol a partir de um meio composto apenas por D-xilose e MgCl₂.6H₂O em tampão fosfato de potássio, a 35 °C e pH 6,5. Nestas condições, os resultados foram 42 gL⁻¹ de xilitol, correspondendo a 0,80 gg⁻¹ de rendimento e 2,65 gL⁻¹h⁻¹ de produtividade volumétrica (CORTEZ; MUSSATO; ROBERTO, 2016).

2.2.5.5 Concentração de transferência de oxigênio (aeração)

A disponibilidade de oxigênio é um importante parâmetro de processo que desempenha função na regulação do crescimento celular e formação de bioprodutos, afetando a atividade das enzimas xilose redutase (XR), xilitol desidrogenase (XDH), arabinose redutase (AR) e arabitol desidrogenase (LAD), de interesse para produção de arabitol e xilitol (RAO et al., 2016).

Para avaliar a influência de diferentes valores de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) na produção de xilitol utilizando a *C. tropicalis* W103, Cheng et al. (2010) realizaram fermentação em batelada e observaram que em K_{La} menor de 10,8 h⁻¹, a biomassa foi menor, com baixa produtividade de xilitol, mas, quando o valor de K_{La} aumentou de 10,8 h⁻¹ para 16,5 h⁻¹, a biomassa aumentou, assim como o aumento do rendimento de xilitol. Com aumento adicional de K_{La} para 18,3 h⁻¹, ocorreu um aumento da biomassa, no entanto, o rendimento de xilitol diminuiu, isso pode ter ocorrido por causa da maior atividade de XDH que converte xilitol em xilulose. O rendimento máximo de xilitol foi de 0,73 gg⁻¹ e a produtividade de 1,43 gL⁻¹h⁻¹ que foram obtidos em K_{La} 16,5 h⁻¹.

A fim de determinar a taxa de agitação ótima em fermentação com *Debaryomyces nepalensis*, os estudos foram realizados a 350, 400, 500 e 700 rpm, mantendo a taxa de

aeração constante em 0,5 vvm. O perfil de utilização do substrato foi quase similar sob diferentes taxas de agitação, mas a biomassa máxima foi obtida com maior taxa de agitação de 700 rpm. A diminuição na taxa de agitação de 700 rpm para 400 rpm resultou em um máximo de $6,2 \text{ gL}^{-1}$ de arabitol. O rendimento de arabitol em relação ao substrato foram de $0,06 \text{ gg}^{-1}$ e o correspondente valor de produtividade foi $0,07 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Valores abaixo de 400 rpm resultaram em baixos rendimentos do produto. A concentração de oxigênio dissolvido diminuiu com o tempo, o que é indicativo de crescimento de biomassa (KUMDAM; MURTHY; GUMMADI, 2013).

A concentração de oxigênio dissolvido (OD) é um fator muito importante para o crescimento celular e a formação de produtos. É difícil monitorar quantitativamente o OD em frascos agitados. No entanto, diferentes proporções de volume de cultura para o volume do frasco podem fornecer uma indicação da sensibilidade da cultura ao baixo e à alta a concentração de OD.

Nesse sentido, foi realizado um estudo com três frascos de 500 mL contendo diferentes volumes médios: 40, 75 e 100 mL de meio de cultura. Esperava-se que o frasco com o volume muito pequeno tivesse uma melhor eficiência de transferência de oxigênio via aeração de superfície, resultando em uma condição de OD mais alta na cultura. Os resultados demonstram que em volumes baixos e OD superior, foram claramente melhores para o crescimento celular mais rápido e maiores concentrações celulares. A concentração máxima de células foi de 20 gL^{-1} no sistema do menor volume de cultura (40 mL), quando aumentaram o volume inicial (100 mL) o valor diminuiu para apenas 9 gL^{-1} . No menor volume (40 mL), açúcares foram quase esgotados em apenas 20-28 h de produção com uma concentração de arabitol de $11,8 \text{ gL}^{-1}$. O rendimento de arabitol correspondente foi de 35% e a produtividade volumétrica foi de $0,59 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$. Nos sistemas de médio e maior volume, as concentrações máximas de arabitol atingiram $11,4 \text{ gL}^{-1}$ (46 h) e $10,7 \text{ gL}^{-1}$ (72 h), significativamente depois do tempo requerido no sistema de menor volume. A maior condição de OD foi claramente benéfica para alcançar alta produtividade de arabitol (LOMAN; ISLAM; JU, 2018).

2.2.5.6 Atividade enzimática

Nas leveduras, a XR catalisa a conversão da xilose em xilitol e XDH catalisa a conversão de xilitol em xilulose. A formação de xilitol a partir da xilose tem sido atribuída a um desequilíbrio redox na exigência de cofator desses dois passos oxidativos do metabolismo da xilose. O envolvimento dessas duas enzimas (XR e XDH) no catabolismo da xilose foi confirmado em *D. nepalensis* pela determinação de suas atividades no extrato intracelular de células crescidas em meio contendo xilose. A incapacidade de *D. nepalensis* para converter xilose em etanol foi confirmada pela atividade específica muito baixa do álcool desidrogenase (ADH) em células cultivadas na presença de xilose em comparação com as células cultivadas em glicose. Este é o primeiro relato sobre a investigação do metabolismo da glicose e xilose por *D. nepalensis*. Os resultados do estudo sugerem que a cepa pode eficientemente utilizar glicose e xilose como substrato único ou misto e produzir metabólitos de valor agregado, como etanol e xilitol. Os autores sugerem a otimização da produção de etanol e xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos utilizando *D. Nepalensis* (KUMAR; MURTHY; GUMMADI, 2012).

Mahmud et al. (2013) relataram que o principal fator limitante de rendimento para a produção de xilitol é seu consumo para o crescimento e a manutenção das células. A inibição anti-sentido de XDH em *Trichoderma reesei* reduziu a atividade de XDH para 48% e aumentou a produtividade de xilitol. Estudos semelhantes também foram feitos em *C. tropicalis*, que teve maior produtividade e rendimento de xilitol de 98%, alcançado usando glicerol como um co-substrato. Ajuste de aeração, adição de glicose como um co-substrato e imobilização das células mostraram-se eficientes para aumentar a produção de xilitol.

2.2.5.7 Minerais

A fim de compreender a influência dos minerais no metabolismo das leveduras, Sundaramoorthy e Gummadi (2018) avaliaram a presença e ausência de quatro oligoelementos (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+}). O meio desprovido de todos os quatro oligoelementos serviu como controle negativo, enquanto o meio incluindo todos eles foi utilizado como controle positivo. Cada um dos quatro elementos foram removidos, um de cada vez, para definir seu efeito individual. O efeito de Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} e Zn^{2+} suplementares

sobre a produção de arabitol usando a linhagem de levedura de *Pichia manchurica* foi examinado pela primeira vez até 216 h em culturas em frascos agitados. Verificou-se que os íons metálicos aumentaram a biomassa bem como a concentração do produto. Os melhores resultados foram obtidos quando a cultura foi suplementada com íons metálicos (32,6 gL⁻¹). A maior produção de arabitol foi observada no controle positivo com um rendimento de (0,22 gg⁻¹).

Pesquisa semelhante foi realizada com intuito de verificar que a *D. nepalensis* necessitava de Zn, Fe, Cu e Mn para o crescimento, bem como para a formação de produtos. O crescimento foi melhor na ausência de Zn e Fe, mas muito baixo no caso de controle negativo. Isso pode ser diretamente correlacionado com a utilização do substrato, que foi mais rápida e completa no meio sem Zn e Fe. No entanto, para a produção máxima de etanol e arabitol, todos os quatro oligoelementos são necessários (KUMDAM; MURTHY; GUMMADI, 2013).

2.3 EDULCORANTES

De acordo com Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961 que dispõe sobre as normas técnicas especiais reguladoras do emprego de aditivos químicos em alimentos, edulcorante é a substância orgânica, não glicídica, capaz de conferir sabor doce aos alimentos (BRASIL, 1961).

Dessa forma, a importância tecnológica, sensorial e nutricional de um edulcorante deve ser considerada, pois além de proporcionar sabor doce, auxilia na textura conferindo corpo, potenciando o aroma, sabor ainda atua na conservação dos alimentos. Esse adoçante é significativo para sociedade que necessita de dietas especiais como no caso de portadores de diabetes tipo II, síndrome metabólica, hipertrigliceridemia, resistência à insulina, cardiovasculares (coronárias), hipertensão, doenças renais e obesidade. Para atender esse segmento a indústria dispõe de alimentos com edulcorantes (naturais e/ou artificiais), denominados dietéticos (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2017).

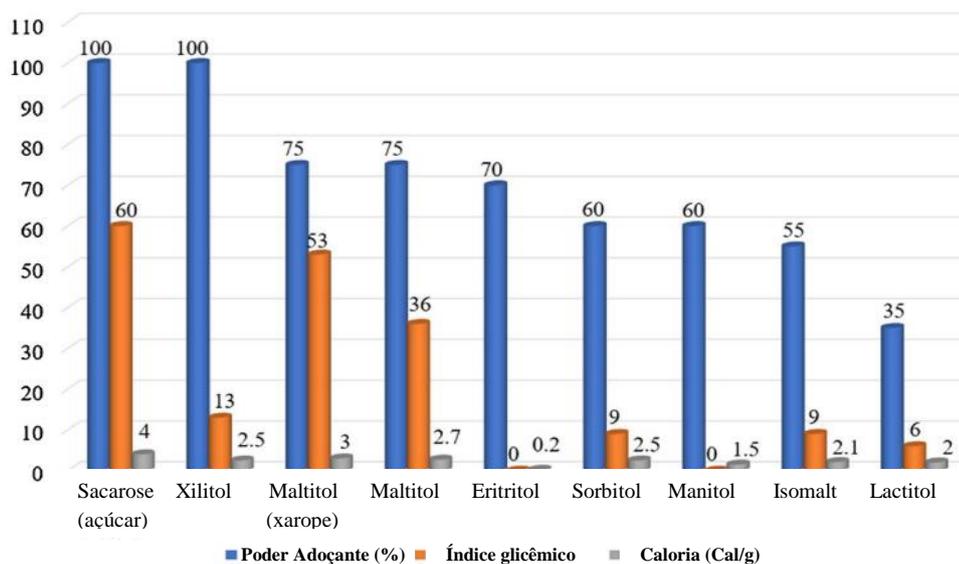
Açúcares raros que ocorrem naturalmente surgiram recentemente como uma categoria alternativa de adoçantes. Estes monossacarídeos e seus derivados são encontrados na natureza em pequenas quantidades e não possuem calorias significativas (MOORANDIAN; SMITH; TOKUDA, 2017).

Os edulcorantes mais utilizados atualmente são: artificiais (aspartame, ciclamato, sucralose, sacarina) e naturais (steviosídeo, xilitol, manitol e sorbitol). A resolução RDC nº 18 de 24 de março de 2008 estabelece o regulamento para o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, o xilitol (INS 967) é rotulado *quantum satis* (latim) quer dizer “apenas o suficiente”, significa que não há limite para seu uso, desde que seja usada a menor quantidade para o resultado específico. No entanto, a organização mundial da saúde (OMS) sugere uma quantidade limite de ingestão de adoçantes, como exemplo aspartame (40 mg/Kg de peso corporal/dia), ciclamato (11 mg/Kg de peso corporal/dia), Stévia (5,5 mg/Kg de peso corporal/dia) e xilitol (15 mg/Kg de peso corporal/dia). Cuidados com o uso dos polióis devem ser tomados principalmente pelo fato de possuírem efeito laxativo (BRASIL, 2008).

O xilitol é o mais doce dos polióis, possui doçura equivalente a sacarose, mas com menos calorias e menor índice glicêmico (Figura 12). Outra vantagem é que suas duas principais vias de absorção (fígado e flora intestinal) são independentes da insulina. A permeabilidade das células do fígado e seu enorme número de enzimas permitem metabolizar rapidamente o xilitol e transformá-lo em energia. No entanto, a absorção pelo intestino é bastante lenta. Toda a D-glicose do metabolismo do xilitol é primeiro armazenada como glicogênio no fígado e depois liberada gradualmente. Assim, sua concentração no sangue não sofre as mudanças repentinas que são causadas geralmente pela sacarose e pela glicose, o que torna o xilitol um adoçante adequado para diabéticos. Além disso, devido à sua baixa carga calórica, pode ser considerado como um adoçante adequado para uso em dietas controladas por carboidratos. Seu consumo provoca efeitos de saciedade, baixa resposta glicêmica e melhora do perfil nutricional (EVRENDILEK, 2012; PULICHARLA et al., 2016).

Recentemente, a demanda por xilitol aumentou de forma constante em 6% ao ano devido a seus múltiplos benefícios, principalmente nos mercados de alimentos, cerca de 70% do consumo global de xilitol é responsável pelo fabrico de pastilhas elásticas e produtos de confeitaria. Dois fatores principais contribuíram para essa demanda crescente; uma é a preocupação com a saúde e outra é o aumento da conscientização do produto químico livre de açúcar de baixo teor calórico derivado naturalmente. Globalmente, o xilitol tem um vasto mercado que compreende uma demanda anual de 161,5 milhões de toneladas (em 2013), e prevê atingir 250 milhões até 2020, quase 1,5 vezes a sua exigência atual (DASGUPTA et al., 2017).

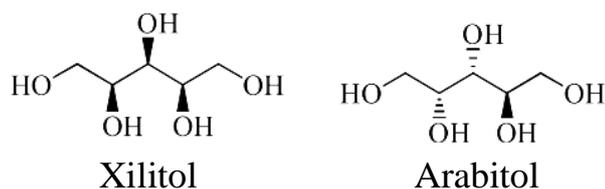
Figura 12: Comparação de sacarose com polióis em termos de doçura, índice glicêmico e calorias



Fonte: adaptado (ARCAÑO et al., 2018)

O xilitol é um poliálcool cuja fórmula molecular é $C_5H_{12}O_5$ (1,2,3,4,5-pentaidroxipentano) assim como o arabitol (Figura 13). O xilitol tem atraído à atenção global por causa do seu poder adoçante semelhante ao da sacarose, podendo ser utilizado como substituto do açúcar para diabéticos, por ser metabolizado através de vias independentes de insulina; além de apresentar propriedade anticariogênica, que promove a saúde oral e auxilia na prevenção de cáries. (PRAKASHAM; RAO; HOBBS, 2009).

Figura 13: Estrutura química de xilitol e arabitol



Fonte: adaptado (ARCAÑO et al., 2018)

Em 1891, o xilitol foi descoberto pelo químico Emil Fischer (Alemanha, 1852-1919) e sua equipe, que obteve sob a forma de xarope a partir da reação de xilose com a amálgama de sódio. Este açúcar apresenta-se como um pó branco cristalino, sem odor, altamente solúvel

em água (64,2 g/100 mL). Segundo a *Food and Drug Administration* (FDA) órgão regularizador de alimentos nos Estados Unidos, como aditivo do tipo GRAS (Generally Recognized as Safe ou “geralmente reconhecida como segura”), o xilitol é considerado uma substância atóxica, onde sua incorporação em alimentos é legalmente permitida (CAROCHO; MORALES; FERREIRA, 2017).

A estabilidade do xilitol não é afetada pelo pH, pois pode ser usado em uma ampla faixa de pH (1 a 11), assim como os polióis, são estáveis à altas temperaturas. A molécula de xilitol não possui grupos formila ou carbonila (característicos de aldeídos e cetonas, respectivamente), portanto não participa das reações de Maillard, portanto, não reduzem o valor nutricional das proteínas presentes. Recomenda-se a produção de produtos alimentícios em que a mudança de cor que ocorre nesse processo seja indesejável (ZACHARIS, 2012). Essas características confirmam sua aplicabilidade em processos de produção de alimentos, como gomas, doces, caramelos, chocolates, sorvetes, geleias, marmeladas e bebidas (MONEDERO; PÉREZ-MARTÍNEZ; YEBRA, 2010).

O arabitol ou arabinitol, é um álcool polihídrico, e também um estereoisômero de xilitol. Apresenta-se como adoçante de baixa caloria nutricional com cerca de 0,2 kcal/g (devido à sua lenta absorção), em comparação com 2,4 kcal/g para o xilitol e 4 kcal/g para sacarose. Assim, o arabitol pode encontrar aplicação exclusiva como adoçante natural com baixa caloria e substituto do açúcar para os diabéticos, similar ao xilitol (KOGANTI, JU, 2013). É doce, incolor, cristalino e solúvel em água, e juntamente com outros polióis, é usado nas indústrias de alimentos e em terapias humanas. Assim como o xilitol têm o benefício adicional de não sustentar o crescimento de bactérias orais, o que significa que seu consumo, ao contrário dos açúcares convencionais, não leva a cáries dentárias.

Como alternativa a via química, o arabitol pode ser sintetizado por microrganismos. O arabitol é encontrado de duas formas: o L-arabitol pode ser sintetizado por redução química ou fermentação microbiológica da L-arabinose (pentose), sua eficácia é semelhante às fibras alimentares solúveis (MINGGUO et al. 2011). Já o D-arabitol pode ser produzido por meio de substratos ricos em hexose (glicose, manose), é bastante utilizado como substrato para alguns produtos químicos, e ácidos arabinóico e xilônico, propileno, etilenoglicol, xilitol, glicolípídios imunossupressores, herbicidas e medicamentos antipatogênicos (KOGANTI et al., 2011; KOGANTI, JU, 2013; YOSHIKAWA et al., 2014; ZHANG et al. 2014).

Para produção de D-arabitol são necessários substratos ricos em glicose (hexose), além disso, pesquisas relatam a utilização de glicerol como substrato. Os estoques globais e persistentes de glicerol são o resultado das grandes quantidades de glicerol bruto produzido na fabricação de sabão, biodiesel e outras indústrias (NICOL et al., 2011). A aplicação biotecnológica do glicerol parece ser uma opção interessante. Existem alguns relatos sobre a bioconversão de glicerol em D-arabitol por leveduras selecionadas (KOGANTI, JU, 2013; YOSHIKAWA et al., 2014).

Um estudo do Departamento de Energia (DOE-USA) identifica um grupo de produtos químicos promissores derivados de açúcar e materiais que poderiam servir como um motor econômico para uma biorrefinaria. O xilitol e o arabitol encontra-se entre as 12 substâncias químicas derivadas diretamente dos açúcares da biomassa lignocelulósica promissoras para o desenvolvimento dentro da biotecnologia industrial (ERICKSON; NELSON; WINTERS, 2012).

O arabitol é produzido em escala industrial por meio da redução química nas lactonas dos ácidos arabinônico e lixínico, uma reação que requer um catalisador caro e uma temperatura constante de 100 °C (KUMDAM; MURTHY; GUMMADI, 2013). Além disso, etapas extensas de separação devem ser seguidas nesse processo para remover os subprodutos da reação (ZHANG et al., 2014).

2.4 OUTROS ESTUDOS SOBRE A PRODUÇÃO DE EDULCORANTES

Xavier et al. (2018) avaliaram a produção simultânea de xilitol e etanol a partir de fibra de sisal. Os autores realizaram um planejamento experimental fatorial para verificar a melhor condição para obter xilose no licor hidrolisado hemicelulósico. O pré-tratamento foi realizado com ácido sulfúrico diluído utilizando baixas temperaturas, para fermentação utilizaram a levedura *Candida tropicalis*. Durante a análise dos resultados verificaram que os maiores teores de xilose obtidos foi de 0,132 g·g⁻¹ de fibra de sisal, a 120 °C com 2,5% (v/v) de solução ácida. No cultivo com hidrolisado hemicelulósico de fibra de sisal, a produção máxima de xilitol foi 0,32 g·g⁻¹ e de etanol 0,27 g·g⁻¹, obtido em 60 h a temperatura de 30 °C.

Carocho, Morales e Ferreira (2017) abordaram em sua pesquisa os adoçantes utilizados como aditivos alimentares no século XXI, fizeram uma revisão do que é conhecido e o que está por vir. Os autores revisaram a relação da doçura com o ganho de peso, à

deterioração dos dentes e os adoçantes que entraram na indústria de alimentos em 1800 e que agora são básicos em alimentos. Eles argumentaram que apesar de sua longa relação com a comida, os adoçantes estão nos holofotes por muitas razões, dentre elas, a escolha perfeita para diabéticos, para os perigos relacionados à toxicidade, câncer e outros problemas de saúde associados ao seu consumo. Os resultados conflitantes para os mesmos adoçantes e os regulamentos divergentes são combustível para um amplo debate sobre o impacto dos adoçantes na indústria, na saúde e no estilo de vida da humanidade. Nesta revisão, a história, principais preocupações, benefícios, desvantagens, classificação e tendências futuras são revisitados para aditivos alimentares nutritivos, intensos e naturais.

Rao et al. (2016) exploraram a bioconversão da biomassa lignocelulósica ao xilitol. Os pesquisadores relataram que a forte construção física e química das biomassas lignocelulósicas é um dos principais obstáculos para a recuperação da xilose, que a atual produção em larga escala de xilitol é alcançada por um processo químico catalisado por níquel baseado na hidrogenação de xilose, que requer xilose purificada como substrato bruto, esse processo necessita de alta temperatura e pressão, que continua a ser intensivo em termos de custos e consumo de energia. Portanto, há uma necessidade de desenvolver um processo integrado para conversão biotecnológica de lignoceluloses em xilitol. A revisão confere as estratégias de pré-tratamento que facilitam a hidrólise da celulose e hemicelulose. Há também uma ênfase em várias metodologias de detoxicação e fermentação, incluindo estratégias de engenharia genética para a conversão eficiente de xilose em xilitol.

Kordowska-wiater (2015) fez uma revisão sobre a produção de arabitol por leveduras, o seu status atual e as perspectivas futuras. Os autores apresentaram as vias metabólicas que conduzem de açúcares e/ou glicerol a arabitol. Embora as informações sobre a produção microbiana de arabitol seja bastante limitado, a pesquisa sobre esse tema vem crescendo nos últimos anos, com pesquisadores procurando novos microrganismos, substratos e tecnologias.

Lima et al. (2014) estudaram a produção biotecnológica de xilitol e avaliaram o processo de desintoxicação com lignina residual. Os pesquisadores avaliaram por meio da metodologia de superfície de resposta, um tratamento de desintoxicação utilizando lignina do bagaço do caju que precipita durante a formação do licor hidrolisado. O bagaço de caju foi submetido à hidrólise ácida utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) 3% (v/v), foi então realizada análises de açúcares e inibidores compostos presentes no licor hidrolisado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O hidrolisado foi concentrado e, em seguida,

tratado sob condições variadas de massa lignina residual (0,25, 0,45 e 0,65 g), pH (4, 7 e 10) e tempo de contato (20, 40 e 60 min) nos níveis (-1, 0 e 1), respectivamente, viabilizando reduzir a concentração dos compostos tóxicos e melhorar a eficiência do processo para posterior fermentação (produção de xilitol). Os resultados deste trabalho indicam que para se obter o licor hidrolisado, uma menor percentagem de remoção da glicose e xilose e a remoção de maiores concentrações de furfural e HMF, deve funcionar sob as seguintes condições: pH - 1 (4), tempo de contato em + 1 (60 min) e a massa de lignina residual de nível +1 (0,65 g) com remoção de aproximadamente 100%.

Rocha et al. (2014) pesquisaram as condições de tratamento das concentrações de ácido diluído na obtenção de açúcares para produção de etanol e xilitol utilizando o resíduo do caju como substrato. Os autores estudaram a concentração de ácido sulfúrico adicionado, a concentração de sólidos e ainda o tempo de contato para maximizar os rendimentos a partir do bagaço. A fermentação foi conduzida em um biorreator de 4 L em escala de bancada, temperatura de 30 °C e uma velocidade de agitação de 150 rpm. *S. cerevisiae* foi inoculada em biorreator a uma concentração de células de 10 gL⁻¹ para a produção de etanol. *Kluyveromyces marxianus* foi utilizada para produção de xilitol, utilizando 100 mL de meio em erlenmeyer de 250 mL, temperatura de 30°C, 200 rpm por 120 h com concentração celular de 1 gL⁻¹. A produção de xilitol foi 6.76 gL⁻¹ em 96 h de fermentação. O crescimento celular, pH, concentração de oxigênio dissolvido, concentração do substrato e concentração de etanol foram monitorados em relação ao tempo. As melhores condições para o tratamento com ácido diluído foi obtida utilizando-se 0,6 mol/L de H₂SO₄ durante 15 min a 121 °C. Nesta condição de tratamento, foram observados na fração de hidrolisado após o tratamento com Ca(OH)₂ uma ausência de quantidades detectáveis de furfural ou hidroximetilfurfural.

Koganti e Ju (2013) estudaram a utilização de *D. hansenii* para produção de arabitol. Esse processo de fermentação utilizando glicerol iniciou-se com a seleção da cepa de alta produção de arabitol produzido como o único polioliol detectável a partir de glicerol. Neste trabalho, pH, concentração de oxigênio dissolvido (OD), tamanho do inóculo e concentração de magnésio e de nitrogênio-fósforo (N/P) foram sistematicamente avaliados quanto a efeitos sobre a taxa de crescimento celular e a produtividade de arabitol. Entre os avaliados, o meio com N/P = 9, OD de 5% de saturação de ar e pH 3,5 para maior produção de arabitol. Sob estas condições ótimas, produção de arabitol foi 40 gL⁻¹ obtido em 5 dias, em comparação com os estudos anteriores com 15 gL⁻¹ arabitol em 5 dias. Produtividade volumétrica e

produtividade específica foram melhorados com sucesso 0,13-0,33 g.Lh⁻¹ a 0,007-0,02 g.gh⁻¹, respectivamente, com um rendimento de 55% arabitol a partir de glicerol.

Branco (2010) determinou as condições de obtenção de xilitol por via enzimática utilizando xilose redutase de *C. guilliermondii* FTI 20037. Numa primeira etapa, esta enzima foi produzida e pré-purificada e em seguida foi realizada a seleção do sistema de regeneração enzimática *in situ* de coenzima NADPH. Foi avaliada a influência da concentração de xilose, de NADPH e de glicose, a carga de xilose redutase e de glicose desidrogenase, sendo que a variável resposta foi considerada a produtividade volumétrica em xilitol. Para a otimização do processo de produção de xilitol em meio sintético sob regime de batelada empregou-se um planejamento composto central rotacional (estrela). A partir dos resultados construíram um modelo quadrático que relacionou a produtividade com os fatores na região de estudo. De acordo com este modelo, a melhor condição operacional resulta em alto valor de produtividade e eficiência em xilitol, 1,68 g/L.h e 100%, respectivamente.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nos Laboratórios de Bioengenharia, Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM), Laboratório de Solidificação Rápida (LSR), Laboratório de Flavor da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal de Campina Grande. A pesquisa foi desenvolvida em duas etapas: a primeira descrita na Figura 14 referente a obtenção e caracterização da matéria-prima, hidrólise do bagaço do sisal.

Figura 14: Primeira etapa do processo de obtenção biotecnológica de arabitol e xilitol proveniente do bagaço do sisal por *Debaryomyces hansenii*



Fonte: Arquivo do autor

A segunda etapa compreende a caracterização dos hidrolisados, fermentação, estudo da influência das variáveis de processo e estudo dos parâmetros cinéticos (Figura 15).

Figura 15: Segunda etapa do processo de obtenção biotecnológica de arabitol e xilitol proveniente do bagaço do sisal por *Debaryomyces hansenii*



Fonte: Arquivo do autor

3.1 MATÉRIA-PRIMA

O bagaço do sisal utilizado nesta pesquisa foi coletado na fazenda Lagoa Cercada localizada na cidade de Picuí/Nova Floresta – Paraíba ($6^{\circ}26'53.6''S$ de latitude e $36^{\circ}14'31.3''W$ de longitude).

A biomassa foi lavada em duas etapas: a primeira lavagem do bagaço do sisal com água destilada a uma temperatura de $50^{\circ}C$ durante 20 min; na segunda etapa foi realizada lavagem do bagaço com água destilada a temperatura ambiente ($28^{\circ}C$), para reduzir os sólidos solúveis de $1,7^{\circ}Brix$ até atingir $^{\circ}Brix$ zero, objetivando a extração dos açúcares remanescentes que permanecem após processo de separação da fibra e do bagaço, tendo em vista que apenas os açúcares intrínsecos na parede celular da biomassa vegetal são interessantes para pesquisa (LIMA et al., 2014).

Em seguida, a biomassa foi conduzida para estufas com circulação de ar a uma temperatura de $55^{\circ}C$ por cerca de 24 h, acondicionadas em sacos plásticos de polipropileno para manutenção durante toda pesquisa, a temperatura ambiente (em torno de $28^{\circ}C$).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DO BAGAÇO DO SISAL SECO

Nesta etapa foram determinadas a granulometria da biomassa seca de acordo com Correia (2004). A biomassa seca foi fragmentada em moinho de facas (marca MARCONI) com a finalidade de reduzir o tamanho do bagaço, as peneiras (BERTEL ISO 3310/01, São Paulo, Brasil) de 35, 48, 60, 65 e 250 mesh foram utilizadas para estudo granulométrico. A biomassa para estudo foi a que passou na peneira de 250 mesh, observada na Figura 16.

Figura 16: Bagaço de sisal lavado, seco e moído



Fonte: Arquivo do autor.

Para caracterização lignocelulósica da biomassa de sisal seco foram realizadas as determinações de umidade, pH, resíduo mineral fixo (cinzas), sólidos solúveis, em triplicata, de acordo com Brasil (2008). Para verificar as proporções de celulose, hemicelulose e lignina do bagaço do sisal seco foi utilizada a metodologia descrita pela TAPPI T17 wd-70, TAPPI T 203 cm-99 e TAPPI T222 os-74 (2011).

Também foram realizadas análises termogravimétricas utilizando-se um Analisador Térmico (Shimadzu, São Paulo, Brasil), para avaliar a estabilidade das amostras. As curvas termogravimétricas foram obtidas em atmosfera de nitrogênio, fluxo 25 mL/min, cadinho de alumina, 10 mg de amostra, razão de aquecimento de 10 °C/min, intervalo de temperatura de ambiente até 900 °C. Nesta técnica analítica, a composição de um material é analisada por meio da medição da variação de massa de uma alíquota com programação controlada de temperatura (LIMA et al., 2013).

Para visualização morfológica do grau das partículas das biomassas sem tratamento e pré-tratadas realizou-se micrografias por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), utilizando-se microscópio marca Zeiss, modelo LEO 1430 (São Paulo, Brasil), com

sinal elétron de elétrons secundários. Um pré-revestimento com uma fina camada de aproximadamente 24 nm de ouro, fixada por uma fita dupla face de carbono condutora e metalizada por *sputtering* marca EMITECH (modelo K550X- São Paulo, Brasil) com tempo de recobrimento de 1 min e 30 segundos utilizando uma corrente de 25 mA, no metalizador, com tensão de 25 kV, por meio do software ZEISS, em diferentes ampliações, a fim de realizar a visualização morfológica do grau das partículas das biomassas antes e após a hidrólise (FIORE et al., 2016).

Com o intuito de analisar a estrutura das biomassas antes e após os tratamentos foram obtidas curvas de difração de Raios-X em Difratorômetro (Shimadzu, São Paulo, Brasil), modelo XRD 600 com fonte de radiação $\text{CuK}\alpha$, tensão de 30kV, corrente 30mA, velocidade de 0,1°/min. e faixa de varredura de $2\theta = 3$ a 80°. Para determinação do índice de cristalinidade do material utilizamos a Equação (1) onde I_c é a intensidade em um ângulo 2θ perto de 22°, e I_a é a intensidade em um ângulo 2θ perto de 18° (FERREIRA et al., 2015; MARTIN, 2009), representando a parte cristalina e amorfa, respectivamente:

$$I_c = \frac{(I_c - I_a)}{I_c} \times 100 \quad (1)$$

A partir da análise das diferenças entre os espectros (antes e após a hidrólise) é possível determinar a eficiência do tratamento químico na amostra de sisal. Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro marca Shimadzu, modelo IR Prestige (São Paulo, Brasil), utilizando KBr no intervalo de 4000-400 cm^{-1} (BARRETO et al., 2011).

3.3 HIDRÓLISE DO BAGAÇO DO SISAL

A hidrólise do sisal foi realizada em reator de aço inoxidável (marca MAINTEC FORNOS INTI, Campina Grande, Brasil) com controlador térmico FE50RP (sistema de automação de tempo e temperatura interna/externa) e capacidade máxima de 700 mL, a fim de possibilitar a hidrólise da hemicelulose para a obtenção de pentoses.

As melhores condições foram determinadas através de planejamento experimental $2^3 + 3$ pontos centrais, totalizando 11 experimentos. Os parâmetros avaliados foram: temperatura (110, 130 e 150 ° C, concentração de ácido (1,5; 2,5 e 3,5%) e razão de bagaço/ácido diluído

(1:12, 1:16 e 1:20 g/v) denominado de variáveis independentes, onde (-1), (0) e (+1) representam o menor nível, ponto central e o maior nível, respectivamente, verificando assim a influência das variáveis de entrada (temperatura, razão biomassa/solução de ácido e concentração de ácido) sobre a eficiência dos açúcares (celobiose, glicose xilose, arabinose) e compostos inibitórios de fermentação gerados nesse processo (ácido acético, 5-hidroximetilfurfural e furfural) (LIMA et al., 2014).

O tempo de 1 h de hidrólise no reator foi cronometrado a partir do momento que atingiu a temperatura estabelecida no planejamento experimental. Após o tempo de hidrólise, foram retirados do reator o licor negro juntamente com a parte sólida, separadas por filtração e armazenadas. A fração líquida foi submetida à análise cromatográfica com o objetivo de determinar a presença de açúcares, ácidos orgânicos e produtos de degradação.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS HIDROLISADOS DO BAGAÇO DO SISAL

O teor total de açúcares (celobiose, glicose, xilose e arabinose), poliálcoois (arabitol e xilitol) e inibidores (ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural) foram determinados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando-se cromatógrafo VARIAN (Waters, Califórnia, USA).

O detector de índice de refração (Varian 356 - LC), equipado com sistema isocrático de solvente, válvula "Rheodyne" com alça de 20 µl; acoplado com uma coluna agilent Hi-Plex H (300 mm x 7,7 mm) foi utilizado para avaliar açúcares e inibidores a uma temperatura de 65 °C, usando como fase móvel uma solução de 0,009 mol/L de H₂SO₄ em fluxo de 0,7 mL/min, injeção de 20 µL da amostra, e tempo de análise de 60 min.

A coluna Hi-plex Ca (300 mm x 7,7 mm) foi utilizada para avaliar os álcoois produzidos. As amostras foram investigadas em temperatura de 85 °C (Hi-plex Ca), fase móvel composta de água ultrapura. A separação cromatográfica foi realizada a um fluxo constante de 0,6 mL/min, injeção de 20 µL de amostra e tempo de corrida cromatográfica para identificação dos poliálcoois em 30 min (cromatógrafo VARIAN, Waters, Califórnia, USA).

O software de processamento utilizado foi GALAXIE Chromatography Data System. Os cromatogramas das amostras foram comparados com os padrões dos componentes analisados e a quantificação foi realizada pela área composta em uma curva de calibração de

cada composto, em cinco concentrações, dependendo do composto analisado. Os resultados foram expressos em grama do composto por Litro de amostra.

3.5 ESTUDO DO PROCESSO FERMENTATIVO

3.5.1 Microrganismo

As leveduras *Candida guilliermondii* CCT 1516 e *Debaryomyces hansenii* CCT 2371 foram obtidas na Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosselo (FAT), localizada em Campinas – SP. Ambas as leveduras foram estudadas, porém a *C. guilliermondii* é mencionada apenas nas patentes.

Para a reativação das células foi adicionado 0,2 mL de água destilada estéril com o auxílio de uma pipeta Pasteur, na ampola com a levedura liofilizada, em ambiente estéril. Em seguida, foi realizada uma suspensão das células, deixando reidratar por 15 min. Após este período, todo o conteúdo foi transferido da ampola para um tubo de ensaio contendo 5,0 mL do meio de cultura líquido YM (Tabela 2) e incubado a 30 °C, por 10 dias.

Tabela 2: Composição do meio de cultura extrato de malte-levedura (YM) para reativação das leveduras

	Composição (gL ⁻¹)
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Peptona	5,0
Dextrose	10,0

A partir da cultura crescida no caldo, foi realizado um repique em placa de Petri (Tabela 3) contendo meio de cultura extrato de malte-levedura-ágar (YMA) para a levedura *Debaryomyces hansenii* e Sabouraud Dextrose Ágar (SDA) para a levedura *Candida guilliermondii*, ambas foram incubadas a 30 °C durante 48 h.

Tabela 3: Meio de cultura quimicamente definido para manutenção das leveduras

Composição (gL ⁻¹)	YMA	SDA
Extrato de levedura	3,0	-
Extrato de malte	3,0	-
Peptona	5,0	10,0
Dextrose	10,0	40,0
Ágar	20,0	15,0

Após o crescimento, as placas de Petri contendo os microrganismos foram armazenadas em refrigeração a uma temperatura de 4 °C, durante 3 meses (Figura 17).

Figura 17: Leveduras (*Candida guilliermondii* e *Debaryomyces hansenii*) em placa de petri após repicagem

Fonte: Arquivo do autor.

3.5.2 Preparo do inóculo

Os meios 1 e 2 descritas na Tabela 4 foram preparadas separadamente, o valor do pH foi ajustado com NaOH para 6,5 e autoclavadas a 111° C e 0,5 atm durante 15 min. As células de levedura foram transferidas em condições assépticas com o auxílio de uma alça de platina, das placas de Petri para tubos contendo água destilada esterilizada e inoculadas em frascos de erlemmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo, na proporção de 1 mL da suspensão para cada 50 mL de meio, mantidos por 24 horas. Após as 24 h de crescimento, alíquotas de 50 mL foram retiradas do meio e transferidas para tubos Falcon de mesma

capacidade. Os tubos foram centrifugados (3000g, 15 min) e o sobrenadante foi descartado, observado na Figura 18 (FELIPE, et al., 1997; CHAUD, et al., 2010).

Figura 18: Preparo do inóculo da *Debaryomyces hansenii*



Fonte: Arquivo do autor.

Tabela 4: Composição dos meios utilizados para crescimento do inóculo das leveduras *Candida guilliermondii* e *Debaryomyces hansenii*

Composição (g L^{-1})	Meio 1 (SANTA ANA et al., 2002)	Meio 2 (KOGANTI; JU, 2013)
Glicose	12	12
Xilose	36	36
Arabinose	10	10
Sulfato de Magnésio	0,2	1
Sulfato de amônio	1	4
Fosfato de potássio	3	0,21
Fosfato de potássio bibásico	7	0,32
Extrato de Levedura	-	6

O precipitado celular foi então suspenso em 1mL de água destilada estéril e utilizado na inoculação do cultivo tanto em meio sintético como em hidrolisado hemicelulósico do bagaço do sisal.

3.5.3 Cultivo em meio sintético

O estudo da velocidade de crescimento da levedura foi realizado em Erlenmeyer de 1000 mL contendo 400 mL do meio de cultivo, o pH foi ajustado para 6,5. Os meios foram

esterilizados e após resfriamento inoculados com a ressuspensão das leveduras previamente centrifugadas (3000g, 15 min) no pré-inóculo de 24 h, inoculados 10^7 células/mL. Após inoculação os frascos foram incubados a 30 °C em agitador rotativos tipo shaker (LOGEN SCIENTIFIC), rotação de 200 rpm durante 120 h (Figura 19).

Figura 19: Cultivo teste em meios sintético (1 e 2)



Fonte: Arquivo do autor.

3.5.4 Cultivo com meio de hidrolisado do bagaço do sisal em mesa agitadora (shaker)

O cultivo foi realizado em erlenmeyer de 1000 mL com 400 mL de meio de cultivo utilizando *D. hansenii* como agente de fermentação. O meio foi preparado usando o hidrolisado do bagaço do sisal suplementado de acordo com as melhores condições nutricionais para o desenvolvimento das leveduras estudadas no meio sintético, descritos na Tabela 4. O pH foi ajustado para 6,5 e o precipitado foi removido por centrifugação. Posteriormente, o meio foi autoclavado a 111 °C por 15 min.

Após esterilização, a levedura *Debaryomyces hansenii* foi inoculada 10^7 células/mL, cultivadas anteriormente em pré-inóculo por 24 h em meio semelhante ao do cultivo.

A fermentação foi conduzida em mesa agitadora com temperatura de 30 °C e agitação de 200 rpm, em duplicata. As amostras foram retiradas a cada 12 h com término em 120 h (Figura 20). Foram realizadas análise de turbidimetria (com intuito de verificar a concentração celular durante o cultivo) e determinação de glicose, xilose, arabinose, arabitól e xilitól por CLAE, segundo descrição nos itens 3.4 e 3.5.5, respectivamente.

Figura 20: Cultivo em hidrolisado do bagaço do sisal



Fonte: Arquivo do autor.

3.5.5. Análise da concentração de células

A concentração celular foi obtida através de uma curva de calibração mediante a correlação da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro ultravioleta microprocessado marca (QUIMIS, São Paulo, Brasil) com a massa seca de células. Na elaboração da curva, uma alíquota de 2 mL das células provindas do cultivo, foram centrifugadas a 10.000 rpm (centrífuga MINISPIN plus – eppendorf) por 10 min. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas com água destilada e quantificadas após secagem em estufa a 105 °C por 24 h, esta análise de massa seca foi realizada em quintuplicata.

Com a mesma amostra foi realizada leitura da densidade ótica em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 600 nm, a cada 12 h de cultivo. As amostras retiradas foram diluídas, quando necessário, após homogeneização a suspensão obtida foi analisada. Ao término do cultivo (último ponto para retirada de amostras) foram preparadas diversas diluições (1:1 - 1:2 - 1:5 - 1:10 - 1:15 e 1:20 mL) para construção da curva (ISHMAYANAA; KENNEDYA; LEARMONTHA, 2015).

3.6 PARÂMETROS DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO

3.6.1 Cálculo da velocidade específica de crescimento

A velocidade específica de crescimento foi obtida pela Equação 2 (BORZANI et al., 2001):

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (2)$$

Em uma cultura batelada, na fase exponencial (ou logarítmica) de crescimento a velocidade específica de crescimento é constante e máxima, sendo μ_x denominado de μ_m como mostrado nas Equações (3) a (6).

$$\mu_m = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

Integrando,

$$\int_{X_i}^X \frac{dX}{X} = \int_{t_i}^t \mu_m dt \quad (4)$$

$$\ln X - \ln X_i = \mu_m (t - t_i) \quad (5)$$

$$\ln X = \mu_m (t - t_i) + \ln X_i \quad (6)$$

A representação de $\ln X$ versus o tempo de cultivo, na fase exponencial, resulta em uma reta, com coeficiente angular igual a velocidade específica máxima de crescimento $\mu_{m\max}$. A fase exponencial de crescimento também é caracterizada pelo tempo de geração (T_g) constante, que é o tempo necessário para dobrar o valor da concentração celular ($X = 2X_i$), como mostrado nas Equações de (7) a (9).

$$\ln 2X_i = \mu_m (t - t_i) + \ln X_i \quad (7)$$

$$\ln \frac{2X_i}{X_i} = \mu_m t_g \quad (8)$$

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_m} = \frac{0,693}{\mu_m} \quad (9)$$

Como $\mu_{m\acute{a}x}$ é constante então t_g também é constante nesta fase. Em que:

X – concentração de células (gL^{-1})

$\mu_{m\acute{a}x}$ – velocidade específica de crescimento máximo

t – tempo

t_i – tempo início da fase exponencial

3.6.2 Produtividade em células

A produtividade em células expressa à velocidade média do crescimento microbiano (Q_x), onde observa-se a taxa evolutiva do crescimento microbiano, sendo calculada pela Equação (10), onde (X_0) indica o valor da variável no ponto de partida do processo, (X) o valor final, (t) tempo de cultivo.

$$Q_x = \frac{(X - X_0)}{t} \quad (10)$$

3.6.3 Fator de conversão de substrato em células

É O fator de conversão de substrato em células é a relação estabelecida entre a quantidade de célula produzida e o teor de substrato consumido. De modo que se verifica a influência de um sob o outro, onde S_0 é a concentração inicial de substrato e S é a final (Equação 11)

$$Y_{x/s} = \frac{(X - X_0)}{(S_0 - S)} \quad (11)$$

3.7 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS DO HIDROLISADO DO BAGAÇO DO SISAL

Os parâmetros da fermentação foram calculados como o rendimento teórico de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica (Q_P), velocidade volumétrica de consumo de substrato (r_s) e porcentagem de consumo do substrato ($Y\%$).

3.7.1 Rendimento teórico de conversão de substrato em produto

O rendimento teórico de conversão de substrato em produto é calculado pela Equação 12.

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (12)$$

Em que:

$Y_{P/S}$ – Fator de conversão de açúcares em álcoois (g produto formado/g substrato consumida g/g)

P_f e P_i – Concentração final e inicial de produto (gL^{-1})

S_f e S_i – Concentração final e inicial de substrato (gL^{-1})

3.7.2 Produtividade volumétrica

A produtividade volumétrica é calculada pela Equação 13.

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \quad (13)$$

Em que:

Q_P – Produtividade volumétrica em produto ($\text{g}_{\text{xilitol/formato}}/\text{Lh}$)

Δt – Intervalo de tempo do processo fermentativo (h)

P_f e P_i – Concentração final e inicial de produto (gL^{-1}).

t_i e t_f – correspondem aos tempos inicial e final de fermentação (h)

3.7.3 Velocidade volumétrica de consumo de substrato

A velocidade volumétrica de consumo de substrato fundamenta-se no decréscimo de açúcar no decorrer do tempo, de acordo com a Equação 14.

$$r_s = \frac{\Delta S}{\Delta T} = \frac{S_i - S_f}{T_f - T_i} \quad \text{Em que:} \quad (14)$$

S_f e S_i – equivalem às concentrações inicial e final de açúcar (gL^{-1}).

t_f e t_i – equivalem ao tempo inicial e final (h).

3.7.4 Porcentagem de consumo dos substratos

A porcentagem de consumo ($Y\%$) corresponde o valor de açúcar (xilose e arabinose) convertido em produto (xilitol e arabitol). Calculado de acordo com a Equação 15:

$$Y (\%) = \frac{S_i - S_f}{S_i} \times 100 \quad (15)$$

S_i e S_f – Concentração inicial e final de substrato (gL^{-1})

3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para verificar a influência da hidrólise para obtenção de açúcares e inibidores, realizou-se a metodologia de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta (RODRIGUES; IEMMA, 2014). Os modelos de regressão polinomiais foram selecionados com base na significância do teste F de cada modelo testado e, também, pelo coeficiente de determinação, ao nível de 95% de confiança ($p < 0,05$) utilizando o software STATISTICA versão 5.0 (STATISTICA, 2004).

REFERÊNCIAS

- AIDA, T. M.; TAJIMA, K.; WATANABE, M.; SAITO, Y.; KUROBA, K.; NOKANA, T.; HATTORI, H.; SMITH JR, R. L.; ARAI, K. Reactions of d-fructose in water at temperatures up to 400°C and pressures up to 100Mpa. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 42, p. 110-119, 2007.
- 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, 1779–1789, 2014.
- ALBUQUERQUE, T. L.; GOMES, S. D. L.; MARQUES JUNIOR, J. E; SILVA JUNIOR, I. J; ROCHA, M. V. P. Produção de xilitol a partir do bagaço de caju por *Kluyveromyces marxianus* CCA510. **Catalysis Today**. v. 255, p. 33-40. 2015.
- ALVIRA, P.; THOMAS-PEJEO, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, N. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v.101, n. 13, p. 4851-48611, 2010.
- ARCAÑO, Y. D.; GARCÍA, O. D. V.; MANDELLI, D.; CARVALHO, W. A.; PONTES, L. A. M. Xylitol: A review on the progress and challenges of its production by chemical route. **Catalysis Today**, in Press, 2018.
- 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, p. 15-22, 2011.
- ARRUDA, P. V.; SANTOS, J. C.; RODRIGUES, R. C. L. B.; SILVA, D. D. V.; YAMAKAWA, C. K.; ROCHA, G. J. M.; JÚNIOR, J. N.; PRADELLA, J. G. C.; ROSSELL, C. E. V.; FELIPE, M.G.A. Scale up of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI20037. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 47, p. 297-302, 2017.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v.52, p. 858-875, 2011.
- BARBOSA, M. F. S.; MEDEIROS, M. B.; MANCILHA, I. M.; SCHNEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, p.241-251, 1988.

BARRETO, A. C. H., ROSA, D. S., FECHINE, P. B. A., MAZZETTO, S. E. Properties of sisal fibers treated by álcali solution and their application into cardanol-based biocomposites. **Composites: Part A**. 42, 492-500, 2011.

BETANCUR, G. J. V.; PEREIRA JUNIOR, N. Sugar cane bagasse as feedstock for second generation ethanol production. Part 1: diluted acid pretreatment optimization. **Eletronic Journal of Biotechnology**, v.13., n.3, 2010.

BNDES e CGEE. Banco Nacional para o Desenvolvimento Social e Econômico. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro: BNDES e CGEE, 2008.316p.

BORLAND, A.M.; GRIFFITHS, H.; HARTWELL, J.; SMITH, J.A.C. Exploiting the potential of plants with crassulacean acid metabolism for bioenergy production on marginal lands. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 2879–2896, 2009.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e processos fermentativos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; **Biotecnologia Industrial**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, v.2, p.179-192, 2001.

BOTURA, M.B.; DOS SANTOS, J.D.G. ; DA SILVA, G.D.; DE LIMA, H.G.; DE OLIVEIRA, J.V.A.; DE ALMEIDA, M.A.O.; BATATINHA, M.J.M.; BRANCO. A. In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (Sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. **Veterinary Parasitology**, v.192, p. 211–217, 2013.

BRANCO R.F. **Produção enzimática de xilitol utilizando sistema de regeneração de coenzima como uma alternativa às vias química e microbiológica de obtenção**. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo Lorena, 2010.

BRASIL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos** /coordenadores Odair Zenebon, Neus Sadocco Pascuet e Paulo Tiglea -- São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

BRASIL. Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961. Aprova o “**Regulamento técnico sobre o emprego de aditivos químicos a alimentos**” constante do anexo desta resolução. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/decretos/50040_61.htm> Acesso em: 17 de abril de 2018.

BRASIL. RDC nº 18 de 24 de março de 2008. Aprova o “**Regulamento técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com respectivos limites máximos**”

constante do anexo desta resolução. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619>> Acesso em: 17 de abril de 2018.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, Wanderley D.; SOUZA, A. P. . **As rotas para o etanol celulósico no Brasil..** In: Luís Augusto Barbosa Cortez. (Org.). Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade. São Paulo: Editora Edgard Blucher, v., p. 365-380, 2010.

BURA, R.; VAJZOVIC, A.; DOTY, S. L. Novel endophytic yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain PTD3 I: production of xylitol and etanol. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 39, p. 1003-1011, 2012.

CARDOSO, W. S.; SANTOS, E. A.; MOTA, C. M.; TARDIN, E. D.; RESENDE, S. T.; QUEIROZ, J.H. Pré-tratamentos de biomassa para produção de etanol de segunda geração. **Revista Analytica**, São Paulo, n.56, 2012.

CAROCHO, M.; MORALES, P.; FERREIRA, I. C. F. R. Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come. **Food and Chemical Toxicology**, vol. 107, p.302-317, 2017.

CASSALES, A. R. **Otimização da hidrólise da casca de soja (glycine max) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microrganismos sobre este hidrolisado.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CHAUD, L. C. S.; ARRUDA, P. V.; SENE, L.; FELIPE, M. G. A. Comparison of detoxification methodologies for sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate based on active charcoal and vegetal polymer aiming at biotechnological xylitol. **Journal of Biotechnology**, v.150, 365p, 2010.

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

CHEN, P. Y.; KUO, Y. C.; CHEN, C. H.; KUO, Y. H.; & LEE, C. K. Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine ex Engelm. **Molecules**, v.14, p.1789-1795, 2009.

CHENG, K.K.; LING, H.Z.; ZHANG, J.A.; PING, W.X.; HUANG, W.; GE, J.P.; XU, J.M. Strain isolation and study on process parameters for xylose to xylitol bioconversion. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.24, p.1606–1611, 2010.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Sisal 2015: Retrospectiva**. 2015

CORREIA, R. T. P. **Estudo do cultivo semi-sólido em resíduo de abacaxi por *Saccharomyces cerevisiae* e *Rhizopus oligosporus***. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2004.

CORTEZ, D.V., MUSSATTO, S.I., ROBERTO, I.C. Improvement on d-xylose to xylitol biotransformation by *Candida guilliermondii* using cells permeabilized with Triton X- 100 and selected process conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.180, p. 969–979, 2016.

CRISCI, A.J.; TUCKER, M.H.; DUMESIC, J.A.; SCOTT, S.L. Bifunctional Solid Catalysts for the Selective Conversion of Fructose to 5- Hydroxymethylfurfural. **Topics in Catalysis**, v.53, p. 1185-1192, 2010.

DALANHOL, K. C. F. **Avaliação do desempenho das leveduras *Candida Guilliermondii* e *Kluyveromyces marxianus* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de maçã**. Dissertação (mestrado). 71 p. Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, 2014.

DALLI, S. S.; PATEL, M.; RAKSHIT, S. K. Development and evaluation of poplar hemicellulose prehydrolysate upstream processes for the enhanced fermentative production of xylitol. **Biomass and Bioenergy**, v. 105, p. 402- 410, 2017.

DAUBER, J.; BROWN, C.; FERNANDO, A.L.; FINNAN, J.; KRASUSKA, E.; PONITKA, J. et al. Bioenergy from “surplus” land: environmental and socio-economic implications. **BioRisk**, v. 7, p. 5–50, 2012.

DASGUPTA, D.; BANDHU, S.; ADHIKARI, D. K.; GHOSH, D. Challenges and prospects on xylitol production with whole cell bio-catalysis: A review. **Microbiological Research**, v. 197, p. 9-21, 2017.

DEBNATH, M.; PANDEY, M. SHARMA, R.; THAKUR, G.S.; LAL, P. Biotechnological intervention of *Agave sisalana*: A unique fiber yielding plant with medicinal property. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.43, p. 177–187, 2010.

DESHAVATH, N. N.; MOHAN, M.; VEERANKI, V. D.; GOUD, V. V.; PINNAMANENI, S. R.; BENARJEE, T. Dilute acid pretreatment of sorghum biomass to maximize the hemicellulose hydrolysis with minimized levels of fermentative inhibitors for bioethanol production. **3 Biotec**, v. 7, p. 1-12, 2017.

DHALIWAL, S.S.; OBEROI, H.S.; SANDHUA, S. K.; NANDAB, D.; KUMAR, B. D.; UPPAL, S. K. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *pichia kudriavzevii*, **Bioresource Technology**, v.102, p. 5968–5975, 2011.

ERICKSON, B., NELSON, J.E., WINTERS, P. Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals. **Biotechnology Journal**, v.7, p.176–185, 2012.

EVRENDILEK, G.A. Sugar alcohols (polyols). **Sweeteners: Nutritional Aspects, Applications, and Production Technology**, 1 ed, pp. 45–78, 2012.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, **Future Fibers**. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/futurefibres/fibres/sisal/en/>> acesso em: 20 de agosto de 2015.

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, **Sisal Crops**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize/>> acesso em: 10 de fevereiro de 2019.

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

FERREIRA, S. R., SILVA, F. A., LIMA, P. R. L., FILHO, R. D. T. Effect of fiber treatments on the sisal fiber properties and fiber-matrix bond in cement based systems. **Construction and Building Materials**. 101, 730-740, 2015.

FIGLIORE, V., SCALICI, T., NICOLETTI, F., VITALE, G., PRESTIPINO, M., VALENZA, A. A new eco-friendly chemical treatment of natural fibres: effect of sodium bicarbonate on properties of sisal and its epoxy composites. **Composites Part B**. 85, 150-160, 2016.

GUTIÉRREZ, A.; RODRÍGUEZ, I. M.; DEL RÍO, J. C. Chemical composition of lipophilic extractives from Sisal (*Agave sisalana*) fibers. **Industrial Crops and Products**, v.28, p.81-87, 2008.

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

HORITSU, H.; YAHASHI, Y.; TAKAMIZAWA, K.; KAWAI, K.; SUZUKI, T.; WATANABE, N. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: optimization of production rate. **Biotechnology Bioengineering**, v.40, p. 1085-1091, 1992.

IKEUCHI, T.; AZUMA, M.; KATO, J.; OOSHIMA, H. Screening of microorganisms for xylitol production and fermentation behavior in high concentrations of xylose. **Biomass & Bioenergy**, v.16, p. 333-339, 1999.

ISHMAYANAA, S.; KENNEDYA, U. J. ; LEARMONTHA, R.P. Preliminary Evidence of Inositol Supplementation Effect on Cell Growth, Viability and Plasma Membrane Fluidity of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Procedia Chemistry**, v.17, p.162 – 169, 2015.

KANG, T.Z.; MOHAMMAD, S.H.; MURAD, A.M.A. ILLIAS, .; R.M.; JAHIM, J.M. Fermentative production of xylitol: a first trial on xylose bifurcation. **Indian Journal Science and Technology**, v. 9, p. 1-5, 2016.

KASSAYE, S.; PANT, K. K.; JAIN, S. Hydrolysis of cellulosic bamboo biomass into reducing sugars via a combined alkaline solution and ionic liquid pretreatment steps. **Renewable Energy**, v. 104, p. 177-184, 2017.

KIM, T.B.; LEE, Y.J.; KIM, P.; KIM, C.S.; OH, D.K. Increased xylitol production rate during long-term cell recycle fermentation of *Candida tropicalis*. **Biotechnology Letters**, v.26, p. 623-627, 2004.

KOGANTI, S., KUO, T.M., KURTZMAN, C.P., SMITH, N. AND JU, L.-K. Production of arabitol from glycerol: strain screening and study of factors affecting production yield. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 90, p.257–267, 2011.

KOGANTI, S. JU, L. *Debaryomyces hansenii* fermentation for arabitol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 79, p.112– 119, 2013.

KORDOWSKA-WIATER, M. Production of arabitol by yeasts: current status and future prospects. **Journal of Applied Microbiology**, v.119, p.303-314, 2015.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, p 377–391, 2008.

KUMDAM, H., MURTHY, S.N., GUMMADI, S.N. Statistical approach to optimize xylitol production by *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413 in vitro. **Food Nutrition Science**, v. 3, p. 1027-1036, 2012.

KUMDAM, H., MURTHY, S.N., GUMMADI, S.N. Production of ethanol and arabitol by *Debaryomyces nepalensis*: influence of process parameters. **AMB Express**, v. 3, p.23, 2013.

KRUGER, J.S.; NIKOLAKIS, V.; VLACHOS, D.G.; Carbohydrate dehydration using porous catalysts. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v.1, p. 312-320, 2012.

JURADO, M.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ-ACALÁ, A.; MARTÍNEZ, A.; MARTÍNES, M.J. Laccase detoxification of steam-exploded wheat straw for second generation bioethanol. **Bioresource Technology**, v.100, n.24, p.6378-6384, 2009.

LAHTINEN, M.; KRUUS, K.; HEINONEN, P.; SIPILA, J. On the reactions of two fungal laccases differing in their redox potencial with lignin model compounds and their rate of formation. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.57, n.18, p. 8357-8365, 2009.

LIMA, C. S. S., CONCEIÇÃO, M. M., SILVA, F. L. H., LIMA, E. E., CONRADO, L. S., LEÃO, D.A.S. Characterization of acid hydrolysis of sisal. **Applied Energy**. v. 102, p.254-259, 2013.

LIMA, F. C. S.; SILVA, F. L. H.; GOMES, J. P.; MUNIZ, M. B.; SANTIAGO, A. M.; SILVA, C. G. Biotechnological production of xylitol: evaluation of detoxification process with residual lignin using response surface methodology. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 415-420, 2014.

LOMAN, A. A.; ISLAM, S. M. M.; JU, L. Production of arabitol from enzymatic hydrolysate of soybean flour by *Debaryomyces hansenii* fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.102, p.641-653, 2018.

MAHMUD, A.; HATTORI, K.; HONGWEN, C.; KITAMOTO, N.; SUZUKI, T.; NAKAMURA, K.; TAKAMIZAWA, K. Xylitol production by NAD⁺- dependent xylitol dehydrogenase (*xdhA*)- and L-arabitol-4-dehydrogenase (*ladA*)-disrupted mutants of *Aspergillus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 115, p.353-359, 2013.

MARECZKY, Z.; FEHÉR, A.; FEHÉR, C.; BARTA, Z.; RÉCZEY, K. Effects of pH and aeration conditions on xylitol production by *Candida* and *Hansenula* yeasts. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, v. 60, p. 54-59, 2015.

MARTIN, A.R; MATTOSO, L.H.C; MARTINS, M.A; SILVA, O.R.R.F. Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade *Agave sisalana*. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.19, n.1, p.40-6, 2009.

MARAN, J. P.; PRIYA, B. Ultrasound-assisted extraction of pectin from sisal waste. **Carbohydrate Polymers**. v. 115, p. 732-738, 2015.

- MAZAR, A.; JEMAA, N.; AL DAJANI, W. W.; MARINOVA, M.; PERRIER, M. Comparative study: Furfural Production from two types of pre-hydrolysate produced using aspen and maple chips. **Biomass and Bioenergy**, v. 111, p. 103-113, 2018.
- MINGGUO, J., WANG, B., YANG, L., LIN, S., CHENG, H. Microbiological purification of L-arabitol from xylitol mother liquor. **Journal Microbiology Biotechnology**, v. 21, p.43-49, 2011.
- MINHAS, A.; BISWAS, D.; MONDAL, A. Development of host and vector for high-efficiency transformation and gene disruption in *Debaryomyces hansenii*. **FEMS Yeast Research**, v.9, p.95-102, 2009.
- MISRA, S.; RAGHUWANSHI, S.; SAXENA, R.K. Evaluation of corncob hemicellulosic hydrolysate for xylitol production by adapted strain of *Candida tropicalis*. **Carbohydrate Polymers**, v.92, p. 1596-1601, 2013.
- MONEDERO, V. PÉREZ-MARTÍNEZ, G. YEBRA, M. J. Perspectives of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.86, p.1003-15, 2010.
- MOORADIAN, A. D.; SMITH, M.; TOKUDA, M. The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review. **Clinical Nutrition ESPEN**, vol. 18, p. 1-8, 2017.
- MUELLER, M.; WILKINS, M.R.; BANAT, I.M. Production of xylitol by the thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains bioprocess. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**, v.1, p. 2-5,
- NEERU, C.; CHANDRAJIT, B.; VIDYASAGAR, J. Biological production of xylitol from corn husk and switchgrass by *Pichia stipitis*. **Research Journal Chemical Science**, v. 3, p. 58-64, 2013.
- NICOL, R. W.; MARCHAND, K.; LUBITZ, W.D. Microbiological purification of L-arabitol from xylitol mother liquor. **Journal Microbiology Biotechnology**, v.21, p.43-49, 2011.
- NUNES, R. M.; GUARDA, E. A.; SERRA, J. C. V.; MARTINS A. A. Resíduos agroindustriais: potencial de produção do etanol de segunda geração no Brasil. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.
- OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. **Biochimie**, v.91, p. 659-664, 2009.

- OJEDA, K.; ÁVILA, O.; SUÁREZ, J.; KAFAROV, V. Evaluation of technological alternatives for process integration of sugarcane bagasse for sustainable biofuels production – Part 1. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, p. 270 – 279, 2011.
- PRAKASHAM, R.S.; RAO, R.S.; HOBBS, P.J. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v.3, p.8–36, 2009.
- PING, Y; LING, H.Z.; SONG, G.; GE, J-P. Xylitol Production from non-detoxified corncob hemicellulose acid Hydrolysate by *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 75, p. 86 – 91, 2013.
- PULICHARLA, R.; LONAPPAN, L.; BRAR, S.K.; VERMA, M. Production of renewable C5 platform chemicals and potential applications, **Platform Chemical Biorefinery**, pp. 201–216, 2016.
- QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; FOLCH-MALLOL, J. L. Plant cell wall degrading and remodeling protein. **Biotecnología Aplicada**, v. 28, n. 4, p.205-215, 2011.
- RAFIQUL, I. S. M.; SAKINAH, A. M. M. Process for the production of xylitol: a review. **Food Reviews International**, v. 29, p.127-156, 2013.
- RANGASWAMY, S.; AGBLEVOR, F.A. Screening of facultative anaerobic bacteria utilizing D-xylose for xylitol production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 60, p. 88-93, 2002.
- RAO, R.S.; BHADRA, B.; SHIVAJI, S. Isolation and characterization of xylitol-producing yeasts from the gut of colleopteran insects. **Current Microbiology**, v. 55, p. 441-446, 2007.
- RAO, L. V.; GOLI, J. K.; GENTELA, J.; KOTI, S. Bioconversion of lignocellulosic to xylitol: Na overview. **Bioresource Technology**, v. 213, p. 299-310, 2016.
- RIBEIRO, B. D.; BARRETO, D. W.; COELHO, M. A. Z. Use of micellar extraction and cloud point preconcentration for valorization of saponins from sisal (*Agave sisalana*) waste. **Food and Bioproducts Processing**, v. 94, p. 601-609, 2015.
- ROCHA, G. J. M.; GONÇALVES, A. R.; OLIVEIRA, B. R.; OLIVARES, E. G.; ROSSELL, C. E. V. Steam explosion pretreatment reproduction and alkaline delignification reactions performed on a pilot scale with sugarcane bagasse for bioethanol production. **Industrial Crops and Products**, v.35, 274–279, 2012.

ROCHA, M. V. P.; RODRIGUES, T.H.S; ALBUQUERQUE, T.L; GONÇALVES, L.R.B; MACEDO, G.R. Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. **Chemical Engineering Journal**, v.243, p.234–243, 2014.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 358p. 3ª Ed.-Campinas, São Paulo, 2014.

SAKAKIBARA, Y.; TORIGOE, K. Biochemical characterization of L-arabitol 2-dehydrogenase from *Pantoea ananatis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 6, p.715–718, 2012.

SAMPAIO, F.C.; DA SILVEIRA, W.B.; CHAVES-ALVES, V.M.; PASSOS, F.M.L.; COELHO, J.L.C. Screening of filamentous fungi for production of xylitol from xylose. **Brazilian Journal Microbiology**, v.34, p. 325-328, 2003.

SAMPAIO, F.C.; TORRE, P.; PASSOS, F.M.; PEREGO, P.; PASSOS, F.J.; CONVERTI, A. Xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii* UFV-170. Effect of the specific oxygen uptake rate. **Biotechnology Progress**, v.6, p. 1641-1650, 2004.

SANTA ANNA, L.M.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA JR, N.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, p. 159-166, 2002.

SANTOS, J. D. G.; ESPELETA, A. F.; BRANCO, A.; DE ASSIS, S. A. Aqueous extraction of pectin from Sisal waste. **Carbohydrate Polymers**, v.92, p.1997-2001, 2013.

SANTOS, R. P.O.; RODRIGUESA, B. V. M.; RAMIRESA, E. C.; RUVOLLO-FILHO, A. C.; FROLLINIA, E. Bio-based materials from the electrospinning of lignocellulosic sisal fibers and recycled PET. **Industrial Crops and Products**, v.72, p. 69–76, 2015.

SARKAR, N.; GHOSH, S. K.; BANNERJEE, S.; AIKAT, K. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. **Renewable Energy**, v. 37, p. 19-27, 2012.

SAWATDEENARUNAT, C. SURENDRA, K.C. TAKARA, D. OECHSNER, H. KHANAL, S.K. Anaerobic biotechnology for bioenergy production: principles and applications. **Bioresource Technology**, v. 178, p. 178–186, February 2015.

SENE, L.; ARRUDA, P.V.; OLIVEIRA, S.M.M.; FELIPE, M.G.A., Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42. p. 1141 – 1146, 2011.

SINGH, R.; SHUKLA, A.; TIWARI, S.; SRIVASTAVA, M. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 32, p.713–728, 2014.

SIRISANSANEEYAKUL, S., WANNAWILAI, S., CHISTI, Y. Repeated fed-batch production of xylitol by *Candida magnolia* TISTR 5663. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, p.1121–1129, 2013.

SOCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P. S., MEDEIROS, A. B. P., KARP, S. G., BUCKERIDGE, M., RAMOS, L. P., PITARELO, A. P., FERREIRA-LEITÃO, V., GOTTSCHALK, L. M. F., FERRARA, M. A., BON, E. P. S., MORAES, L. M. P., ARAÚJO, J. A., TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820-4825, 2010.

SOUZA, J. A. **Avaliação do hidrolisado hemicelulósico da casca de jaboticaba para a obtenção de xilitol por *Candida guilliermondii***. Dissertação (Mestrado) pelo Programa em Ciências Moleculares. 45p. Universidade Estadual de Goiás (UEG), Anápolis – GO, 2013.

SUNDARAMOORTHY, B.; GUMMADI, S. N. Screening of new yeasts *Pichia manchurica* for arabitol production. **Journal of Basic Microbiology**, v.1, p.1-11, 2018.

STAMBUK, B. U.; ELEUTHERIO, E. C. A.; FLOREZ-PARDO, L. M.; SOUTO_MAIOR, A.; BOM, E. P. S. Brazilian potencial for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v.67, p.918-926, 2008.

STATISTICA. **Data analysis software system**. version 5.0. Tulsa, OK, USA. StatSoft, Inc. (2004).

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

TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry). Official Test Methods (OM), Provisional Test Methods (PM) and Useful Test Methods (UM). Atlanta - One Dunwoody Park, 2011.

TONG, X.; MA, Y.; LI, Y. Biomass into chemicals: Conversion of sugars to furan derivatives by catalytic processes. **Applied Catalysis A General**, v.385, p. 1-13, 2010.

US DOE. **Cellulose Structure and Hydrolysis Challenges**. *Genomics:GTL Roadmap*, DOE/SC-0090, U.S. Department of Energy Office of Science. (p. 204), 2005.

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

WEN, X.; SIDHU, S.; HOREMANS, S. K. C.; SOOKSAWAT, N.; HARNER, N. K.; BAJWA, P. K.; YUAN, Z.; LEE, H. Exceptional hexose-fermenting ability of the xylitol-producing yeast *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.121, p.631-637, 2016.

WRENT, P.; RIVAS, E. M.; PRADO, E. G.; PEINADO, J. M.; SILÓNIZ, M. I. *Debaryomyces*. **Encyclopedia of Food Microbiology** (second edition), p.563-570, 2014.

XAVIER, F. D.; BEZERRA, G. S.; SANTOS, S. F. M.; OLIVEIRA, L. S. C.; SILVA, F. L. H.; SILVA, A. J. O.; CONCEIÇÃO, M. M. Evaluation of the Simultaneous Production of Xylitol and Ethanol from Sisal Fiber. **Biomolecules**, v.8, p. 2-13, 2018.

YANG, L.; LU, M.; CARL, S.; MAYER, J. A.; CUSHMAN, J. C.; TIAN, E.; LIN, H. Biomass characterization of Agave and Opuntia as potential biofuel feedstocks. **Biomass and Bioenergy**, v.76, p.43-53, 2015.

YOSHIKAWA, J., HABE, H., MORITA, T., FUKUOKA, T., IMURA, T., IWABUCHI, H., UEMURA, S., TAMURA, T., KITAMOTO, D. Production of D-arabitol from raw glycerol by *Candida quercitrusa*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.98, p. 2947– 2953, 2014.

YOSHITAKE, J.; ISHIZAKI, H.; SHIMAMURA, M.; IMAI, T. Xylitol production by an enterobacter species. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.37, p. 2261-2267, 1973.

ZACHARIS, C.; K. Xylitol. **Sweeteners and Sugar Alternatives in Food Technology**, 2 ed, pp. 347–382, 2012.

ZHANG, J.; GENG, A.; YAO, C.; LU, Y.; LI, Q. Xylitol production from D-xylose and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of *Candida athensensis* SB18. **Bioresource Technology**, v.105, p.134–141, 2012.

ZHANG, X.; LIU, L.; LIN, C. Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a neutral polysaccharide from Sisal waste. **Food Hydrocolloids**, v.39, p.10-18, 2014.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e as discussões produzidos durante o desenvolvimento da Tese estão apresentados em forma de patentes e artigos científicos submetidos e publicados nos periódicos de impacto na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Artigo 1: EFFICIENT HYDROLYSIS OF CELLULOSIC BIOMASS INTO FREE SUGARS FOR A FUTURE DEVELOPMENT PROCESSING A BIOREFINERY CONTEXT

(Submetido e publicado, DOI: 10.1016/j.bcab.2018.09.004 - Periódico Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. Qualis: A2 em Ciência de Alimentos).

Artigo 2: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA ESTRUTURAL E POTENCIALIDADE DO BAGAÇO DO SISAL PARA PRODUÇÃO DE POLÍOIS DE INTERESSE INDUSTRIAL

(Submetido, Periódico: Brazilian Journal of Chemical Engineering. Qualis: A2 em Ciência de Alimentos).

Patente 1: BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE ARABITOL A PARTIR DO SISAL

(*Agave sisalana*)

(Depositada; Número do Processo: BR 10 2018 005222 5)

Patente 2: PROCESSO DE PRODUÇÃO DE EDULCORANTES POR FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA UTILIZANDO HIDROLISADO DE SISAL

(Depositada; Número do Processo: BR 10 2018 014447 2)

4.1 ARTIGO 1: Efficient hydrolysis of cellulosic biomass into free sugars for a future development processing a biorefinery context

(Aceito e publicado, DOI: 10.1016/j.bcab.2018.09.004 - Periódico Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. Qualis: A2 em Ciência de Alimentos e A1 em Ciências agrárias).

(ANEXO A)

4.2 ARTIGO 2: Structural-chemical characterization and potential of sisal bagasse for the production of polyols of industrial interest

(submetido ao periódico Brazilian Journal of Chemical Engineering. Qualis: A2 em Ciência de Alimentos)

STRUCTURAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND POTENTIAL OF SISAL BAGASSE FOR THE PRODUCTION OF POLYOLS OF INDUSTRIAL INTEREST

Lorena Lucena de Medeiros^{1*}, Flávio Luiz Honorato da Silva², Angela Lima Menêses de Queiroz¹, Ysrael Simões Lins de Oliveira², Evanildo Francisco de Souza Junior², Marta Suely Madruga¹, Marta Maria da Conceição³

¹ Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

² Department of Chemical Engineering, Center of Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

³ Federal University of Paraíba, Center for Technology and Regional Development, João Pessoa, Paraíba, Brazil

* Corresponding author: lorenalucena@live.com

ABSTRACT

Sisal is a potential raw material for the production of bioproducts because it has high contents of cellulose and hemicellulose that generate fermentable sugars and can produce compounds of value for industrial use. The present study evaluates the structural composition of sisal bagasse to use it in the production of arabitol and xylitol. Sisal bagasse was characterized by determination the moisture, pH, ash, soluble solids, extractives, alphacellulose, holocellulose, hemicellulose and lignin. Electron microscopy and infrared and X-ray diffraction analyses were also performed. The cell growth of the yeast *Debaryomyces hansenii* in synthetic media was tested to determine the best conditions for the fermentation in the sisal bagasse hydrolysate. The results showed high amounts of hemicellulose (22.91%) in sisal bagasse biomass when compared to sugarcane and that the conversion of hemicellulose, breaking, into pentoses in the hydrolysed liquor from the sisal bagasse was efficient (liquor rich in pentoses), and these evidences were observed through analytical determinations such as SEM and physical analysis of infrared and X-ray diffraction; in addition, the results showed that *D. hansenii* was able to obtain excellent arabitol production (1.14 g·L⁻¹) values in the sisal bagasse hydrolysate medium, thus demonstrating the importance of the biomass for obtaining bioproducts.

Keywords: *Agave sisalana*; lignocellulosic biomass; agroindustrial; arabitol; xylitol

1. INTRODUCTION

Health concerns have grown worldwide due to eating disorders and diseases such as obesity, hypertension and diabetes, which continue to be major public health problems, caused mainly by a poor diet. For this reason, the demand for products with low sugar, salt and fat contents is increasing every year. However, the most recent controversy over food intake revolves around the excessive consumption of simple sugars (Rao et al., 2016).

As an alternative, the consumption of artificial sweeteners has increased in recent decades, but the potential consequences of this practice on health has been the subject of constant debate. For this reason, alcohol or polyol sugars, which have been the topic of recent studies due to their low caloric content and anticariogenic properties since they are not fermentable by oral bacteria, are sugars applicable to diabetics because there is no need for the body to produce large amounts of insulin to control the sugar levels due to their slow absorption or lack of absorption by the human digestive tract. These sugars are able to significantly reduce adipose tissue in the body and prevent fat deposition in the digestive tract (Mooradian; Smith and Tokuda, 2017).

Among the world's total production of polyols, also known as sweeteners, 42% are used in food processing. Sweeteners include arabitol, xylitol, sorbitol, ribitol and mannitol, which have sweetening power approximately 25 to 100% greater than that of sucrose. These sugars are gentle on the palate and have a sweet, refreshing and pleasant flavor. Xylitol and arabitol are crystalline and water soluble, and they are used in the food and therapeutic industries due to their low caloric contents (2.4 kcal/g and 0.2 kcal/g, respectively) compared to sucrose (4 kcal/g) (Kordowska-Wiater et al., 2013; Prakasham et al., 2009).

The conventional large-scale production of polyols is currently achieved chemically and is a costly process. For this reason, interest has been shown in the study of biotechnological production, which uses microorganisms for the generation of bioproducts from the hydrolysates of the hemicellulose fraction of plant biomass, which may reduce production costs. The main aim of hydrolysis is the disorganization of the lignocellulose complex by reducing the crystallinity of the cellulose and increasing the porosity, thus causing the dissolution of the hemicellulose structure, which is rich in pentoses, such as xylose and arabinose (Botura et al., 2013; Ojeda et al., 2011).

Sisal (*Agave sisalana*) is a lignocellulosic plant biomass of great ecological and economic interest and grows well throughout the year in hot climates and arid regions

(Debnath et al., 2010). Sisal displays high productivity and low associated cost, and it has approximately 10% more pulp than sugarcane bagasse, thus presenting high potential for generating fermentable sugars (Benítez-Guerrero et al., 2014).

In this context, sisal (*Agave sisalana*) plant originating in Mexico has considerable quantities of sugars as renewable sources for the generation of products of industrial interest. According to the Food and Agriculture Organization of the United Nations, in 2011, world production of sisal reached 408,518 tonnes (ZHANG; LIU; LIN, 2014). However, the values fell to 202,223 tons in 2017 as a result of the global economic crisis and the low valorization of commercial raw materials (FAOSTAT, 2019).

Sisal bagasse, a residual biomass from the production of fiber, has been investigated for the production of biofuels and biomaterials in Brazil. Thus, the development of new technologies continues to expand its possible applications in a biorefinery (Carpio and Souza, 2017).

In view of the above, the objective of this study was to evaluate the chemical and structural composition of sisal bagasse as a substrate for the biotechnological production of arabitol and xylitol to add value to the lignocellulosic biomass.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Raw material

Sisal bagasse was obtained from the Lagoa Cercada farm, located in the municipality of Nova Floresta-Paraíba (6°26'53.6"S latitude and 36°14'31.3"W longitude).

The biomass was washed to remove residual sugars that remained after the fiber and bagasse separation, until reaching zero °Bx. Afterwards, the biomass was dried in an air circulation oven at 55 °C for approximately 24 h and packed for subsequent analysis (Lima et al., 2012).

2.2. Hemicellulose hydrolysate liquor

The sisal bagasse was hydrolyzed in a stainless steel reactor (Maintec Fornos Inti) with a FE50RP thermal controller (internal/external temperature and time automation system)

and a maximum capacity of 700 mL to obtain pentoses from hemicellulose. Reaction conditions included the following: 1.5% H₂SO₄ acid solution; a temperature of 110 °C; a 1:12 bagasse:diluted acid ratio; and a reaction time of 1 hour, according to the factorial experiment of Medeiros et al. (2018), which optimized the hydrolysis process of the sisal bagasse. After the elapsed time, the black liquor was removed from the reactor, and the solid was separated by filtration and stored.

The liquid fraction was subjected to high performance liquid chromatography (HPLC) to determine the presence of sugars, organic acids and degradation products. Biomass samples, before and after hydrolysis, were then analyzed as described in the following section.

2.3 Characterization of the biomass

For characterization of the dry sisal bagasse, the moisture, pH, ash and soluble solids were determined according to Brasil (2008). The methodologies described by TAPPI T17 wd-70, TAPPI T 203 cm-99 and TAPPI T222 os-74 (2011) were used to determine the cellulose, hemicellulose and lignin ratios of dry sisal bagasse in triplicate.

For structural characterization, scanning electron microscopy (SEM) was performed. The microscope used was a Zeiss Leo 1430 with secondary electron signal detection. Samples were coated with a thin layer of approximately 24 nm of gold, fixed by double-sided conductive carbon tape and metalized by sputtering using an Emitech K550X coater with a coating time of 1 min and 30 s, a 25 mA current for the sputter, and a voltage of 25 kV. The Zeiss software was used at different magnifications for morphological visualization of the biomass particles before and after hydrolysis (Fiore et al., 2016).

To analyze the structure of the biomass, an X-ray diffraction curve was obtained using an XRD 600 Shimadzu diffractometer with a CuK α radiation source, 30 kV voltage, 30 mA current, 0.1°/min speed and 2 θ scanning range of 3-80°. For the determination of the crystallinity index of the material, we used equation 1, where I_c is the intensity at an angle of 2 θ close to 22° and I_a is the intensity at an angle of 2 θ close to 18° (Barreto et al., 2011; Ferreira et al., 2015), representing the crystalline and amorphous parts, respectively:

$$I_c = [(I_c - I_a) / I_c] * 100 \quad (1)$$

The absorption spectra in the infrared region were obtained on a Shimadzu IR Prestige spectrophotometer using the KBr technique in the range of 4000-400 cm^{-1} . This analysis was performed with the sisal bagasse before and after the acid treatment to determine the changes in the absorption bands for hemicellulose according to Barreto et al. (2011).

2.4 Microorganism and preparation of the pre-inoculum with synthetic medium

Strains of the yeast *Debaryomyces hansenii* (CCT 2371) used in the experiment were maintained at 4 °C in Petri dishes containing yeast malt extract agar (YMA) medium consisting of 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ malt extract, 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ yeast extract, 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ peptone, 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dextrose and 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ agar.

The inoculums were grown in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of medium. Two synthetic media were tested, medium 1 (Santa ana et al., 2002) and medium 2 (Koganti and Ju, 2013) (Table 1), which were tested for estimating the appropriate nutritional values for *D. hansenii*.

The media were prepared separately, and the pH was adjusted to 6.5 ± 0.5 according Kumdam, Murthy and Gummadi (2013).

Yeast cells were transferred from Petri dishes into tubes containing 5 mL of sterile distilled water. Then, 2 mL aliquots of this suspension were inoculated, that is, for each 50 mL of synthetic medium, 1 mL of inoculum was added. Cells were grown on a rotary shaker (Logen Scientific) at 30 °C with a rotation of 200 rpm for 24 h, subsequently recovered by centrifugation (3000 g, 15 min) and resuspended in the fermentation medium.

Table 1: Compositions of the synthetic media used for growth of the inoculum of *Debaryomyces hansenii*.

Composition (g·L ⁻¹)	Medium 1	Medium 2
Glucose	12	12
Xylose	36	36
Arabinose	10	10
Magnesium sulfate	0.2	1
Ammonium sulfate	1	4
Potassium phosphate	3	0.21
Dibasic potassium phosphate	7	0.32
Yeast extract	-	6

2.5 Cell growth in the synthetic medium

The study of the yeast growth rate was performed in a 500 mL Erlenmeyer flask containing 200 mL of either synthetic culture medium 1 or 2. The pH was adjusted to 6.5 ± 0.5 , and was applied a thermic treatment in the medium. Approximately 2 ± 0.5 g·L⁻¹ medium was inoculated with 10^7 cells/mL of the suspension of yeast prepared in the 24 h pre-inoculum. 10^7 cells/mL of the yeast suspension prepared in the 24 h pre-inoculum were inoculated. Fermentation was carried out in duplicate at a temperature of 30 °C with stirring at 200 rpm. Samples were taken every 12 h up to 120 h. Turbidimetry analysis and the determination of glucose, xylose, arabinose, arabitol and xylitol by high-performance liquid chromatography (HPLC) were performed.

2.6 Fermentation of the sisal bagasse hydrolysate

Cultivation was performed in a 1000 mL Erlenmeyer flask with 400 mL of of the sisal bagasse hydrolysate supplemented according to the best nutritional conditions for the development of *D. hansenii* studied in the synthetic media described in Table 1 (0.2 g·L⁻¹ of magnesium sulfate, 1 g·L⁻¹ of ammonium sulfate, 3 g·L⁻¹ of potassium phosphate and 7 g·L⁻¹ of dibasic potassium phosphate).

After thermic treatment, 10^7 cells/mL of the yeast suspension prepared in the 24 h pre-inoculum were inoculated. . Fermentation was conducted in duplicate on a shaker table with a temperature of 30 °C and stirring speed of 200 rpm. Samples were taken every 12 h up to 120 h. Turbidimetry analysis and the determination of glucose, xylose, arabinose, arabitol and xylitol by HPLC were performed.

2.7 Cell concentration analysis

The cellular concentration was determined by turbidimetry using a calibration curve that correlates to the spectrophotometric optical density (OD) with a dry mass of cells. For preparation of the curve, a 2 mL aliquot of the cells from the culture was centrifuged at 10,000 rpm (MiniSpin Plus centrifuge, Eppendorf) for 10 min. At the end of centrifugation, the supernatant was separated, the cells were washed with distilled water, and the dry mass was quantified after drying in an oven at 105 °C for 24 h. Dry mass analysis was performed in quintuplicate. Simultaneously, with the same sample, the OD reading was performed in a UV-VIS spectrophotometer (QUIMIS) at 600 nm using distilled water as the blank. At the end of cultivation, various dilutions were prepared (1:1, 1:2, 1:5, 1:10, 1:15 and 1:20 mL) to construct the curve, and the suspension obtained was analyzed (Ishmayana; Kennedy; Learmonth, 2015; Kumdam; Murthy; Gummadi, 2013).

2.8 Analytical methods

The contents of sugars and polyalcohols were determined by HPLC (Varian, Waters, Calif., USA), with a refractive index detector (Varian 356-LC) equipped with an isocratic solvent system and a Rheodyne valve with a 20 μ L loop. An Agilent Hi-Plex Ca column (300 mm x 7.7 mm) was used to evaluate the alcohols produced. The samples were investigated at 85 °C (Hi-Plex Ca), the mobile phase was composed of ultra-pure water, the flow rate was 0.6 mL/min, and the injection volume was 20 μ L of sample. The analysis time for identification was 30 min (Medeiros et al., 2018).

The chromatograms of the samples were compared to the standards of the analyzed components, and the quantification was performed by the composite area on a calibration

curve of each compound. The processing software used was Galaxie Chromatography Data System.

2.9 Fermentation parameters

The fermentation parameters were calculated, including the conversion factor of the substrate (used xylose for the xylitol production or arabinose for the arabitol production) into product ($Y_{P/S}$), volumetric productivity (Q_P), percent substrate consumption ($Y\%$), specific growth rate (μ_{max}), cell productivity (P_x) and factor of substrate conversion into cells (López-Linares et al., 2018).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Table 2 shows the moisture (8.55%) and ash (8.62%) contents, differing greatly from those reported in another study, which were 3.8% and 5.7% moisture, as well as 5.7% and 2.1% ash, for bagasse and sisal fiber, respectively. The results may be explained by the great susceptibility of these variables to the place of collection of the waste, harvesting, and drying treatment carried out for biomass packaging (Lima et al., 2013). Krishnam et al. (2015) reported values similar to the one found in this study, which was $10.43 \pm 0.5\%$ moisture in sisal fiber after heat treatment, and noted that the increase in the percentage of cellulose after the steam explosion of sisal fibers increases the number of available hydroxyl groups, in turn leading to greater moisture absorption.

With respect to the pH value of the fresh sample (10.09), Yang et al. (2015) studied the composition of the plants *Agave tequilana* (same genus as sisal) and *Opuntia ficusindica* (cactus) and obtained pH values of 4.74 and 4.17, respectively. The pH became alkaline due to washes performed on the biomass. However, these values may vary due to the climate, soil and nutrients that make up the plant.

The soluble solids on the surface of the sisal bagasse was 0.00°Bx , which is due to the washes performed to remove the sugars remaining after the bagasse-fiber separation process (Lima et al., 2012).

The holocellulose content represents the total sugars found in the lignocellulosic sample. For the untreated sisal bagasse, the following contents were obtained: holocellulose

(50.83%); hemicellulose (22.91%); alphacellulose (28.72%); and lignin (17.9%). These values were close to the values reported by Lima et al. (2013) for the chemical composition of sisal bagasse, which was (48.2%) holocellulose, (27.6%) alphacellulose and (20.6%) hemicellulose, whereas lignin was 22.6%, which was more than that found in the present study.

The contents of hemicellulose and lignin were higher than those found in palms, with values of 18.5% and 12.3%, respectively. *Agave tequilana*, a species of the genus *Agave* such as sisal (*Agave sisalana*), showed 22.8% hemicellulose and 13.8% lignin in untreated biomass (Yang et al., 2015). The variation in these contents may be due to the enzyme-mediated biochemical process that acts on the formation of the cell wall. The constituents of the lignocellulosic biomass can be modified by the abiotic and biotic effects of the environment, such as hormones, nutrient levels, light, fungal infection and lesions, which may influence the lignin content (Oliveira; Abreu and Pereira, 2009).

Medeiros et al. (2018) reported a value of 14.18% hemicellulose in untreated sisal bagasse, which can be converted into pentoses, such as xylose and arabinose, with potential for the bioproduction of industrial sweeteners. Thammasittirong et al. (2017) reported similar values of hemicellulose in sugarcane with different varieties, with levels ranging from 21.10% to 31.30% depending on the variety studied. For lignin (an aromatic compound that hinders the hydrolysis of biomass), the value 17.90% was relatively lower than those reported in the literature, which were 22.6% for the pulp and 13.5% for sisal fiber (Lima et al., 2013), thus presenting a lower resistance to the possible treatments for obtaining simple sugars.

According to Yang and Yu (2013), sugarcane bagasse presents hemicellulose levels of approximately 24%. An approximate value of 22.91% was found for sisal bagasse, which demonstrates the potential of the *Agave sisalana* plant for obtaining sugars such as arabinose and xylose, considering that sugarcane is one of the main biomasses of industrial interest used in the generation of fermentable sugars for bioproduction.

Extractives are structural components of the cell wall, such as salts, sugars and polysaccharides (water soluble); fatty acids or fatty esters; long chain alcohols; waxes; resins; steroids; and phenolic compounds and glycosides, which may interfere with the extraction of the compounds of interest. In the present study, 10.24% of extractives were found. Lima et al. (2013) reported a close value of 8.5% for sisal bagasse.

Table 2: Mean values (\pm standard deviation) of the physico-chemical characterization of sisal bagasse in the present study and lignocellulosic biomasses reported in literature

Component	Dry sisal bagasse (present study) <i>Agave sisalana</i>	Lima et al. (2013) (sisal bagasse) <i>Agave sisalana</i>	Krishnam et al. (2015) (sisal fibers) <i>Agave sisalana</i>	Yang et al. (2015) (sisal) <i>Agave tequilana</i>	Medeiros et al. (2018) (sisal bagasse) <i>Agave sisalana</i>	Thammasittirong et al. (2017) (sugarcane varieties)	Yang and Yu (2013) (sugarcane bagasse)
Moisture (%)	8.55 \pm 0.30	3.80	10.43	--	12.21	--	--
Ash (%)	8.62 \pm 0.16	2.10	--	6.00	--	--	--
pH	10.09 \pm 0.11	--	--	4.74	--	--	--
Extractives (%)	10.24 \pm 0.26	8.50	--	29.00	--	--	--
Alphacellulose (%)	28.72 \pm 0.43	27.60	74.0	26 .00	18.28	39.07 to 45.72	40.00
Hemicellulose (%)	22.91 \pm 0.22	20.60	12.0	22.80	14.80	21.10 to 31.30	24.00
Holocellulose (%)	50.83 \pm 0.45	48.20	--	--	--	--	--
Lignin (%)	17.90 \pm 0.65	22.60	9.00	13.80	29.42	12.04 to 23.50	25.00

-- Indeterminate values by the authors

In the diffractogram (Figure 1), the reflection plane (002) was observed at approximately 20° , which is attributed to the network of glycosidic rings, corresponding to crystalline cellulose (Miranda et al., 2015). Among the polymeric constituents of the lignocellulosic biomass, only type I cellulose has a crystalline characteristic due to the ordering of monomers of hexoses. The other components, such as lignin and hemicellulose, are amorphyously dispersed in the structure, and their solubilization by treatments applied to the biomass may leave the crystalline portion more exposed, causing an increase in the intensity of the posttreatment peak (Hernández-Meléndez et al. 2016).

The crystallinity index (CI) of sisal bagasse was 35.95%. Xavier et al. (2018) reported a value of 44.89% for sisal fiber components. However, Carvalho et al. (2010) reported a value of 37.56% for sugarcane bagasse, demonstrating that sisal bagasse presents potential, since cellulose is composed of molecules of glucose, an essential sugar for the production of second generation ethanol. After pretreatment with acid, the CI increased to 48.9%. Therefore, it appears that the crystalline portion of the biomass after hydrolysis was more exposed and visible, indicating that the amorphous components were solubilized in the hydrolysate liquor and partially removed.

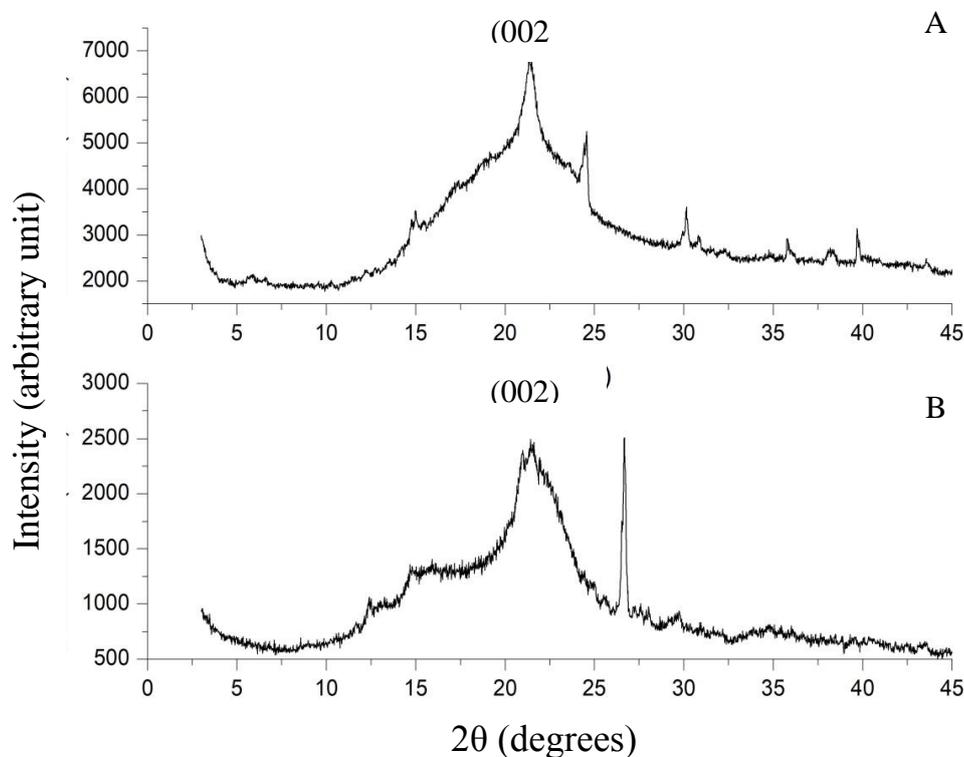


Figure 1. Diffractograms of dry untreated sisal bagasse (A) and treated sisal bagasse (B)

In the IR spectra (Figure 2), compositional changes in the sisal lignocellulosic material were observed after acid hydrolysis. A change in the characteristic absorption bands of hemicellulose is observed. At a wavelength of 1745 cm^{-1} (Xu et al., 2013), the changes are attributed to aldehyde groups, which originate from the partial oxidation of hemicellulose (Sakdaronnarong and Jonglertjunya, 2012). A similar behavior was observed by Chen (2014), who confirmed the removal of hemicellulose, thus showing the efficacy of the hydrolysis.

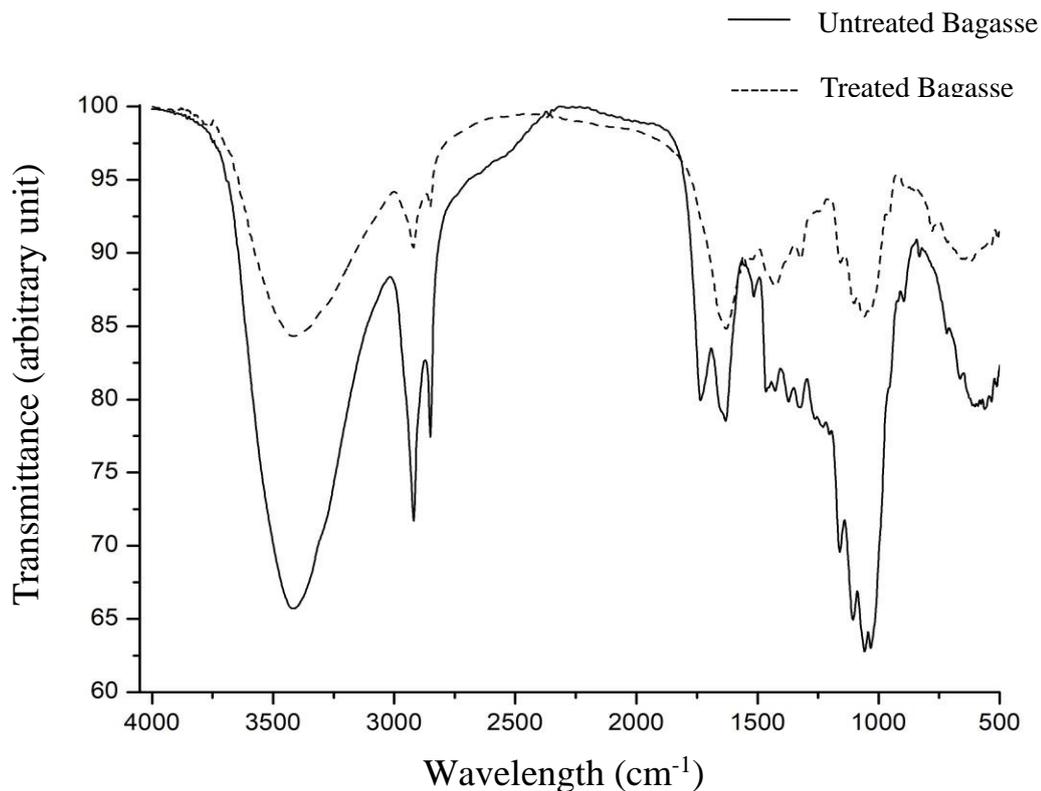


Figure 2. Infrared spectra of untreated sisal bagasse and sisal treated sisal bagasse.

The images obtained by SEM show the physical structure of the dry untreated sisal bagasse (A) and that treated sisal bagasse (B) (Figure 3). The images were enlarged 200x (1), 500x (2), 1000x (3) and 2000x (4) for better visualization of the external layer removed in the treatment. A three-dimensional interlacing of the fibers of the lignocellulosic material is observed, covered by parenchyma cells, whose main components are cellulose, hemicellulose, lignin and extractives (Martin et al., 2009).

Studies report that the complex present in sisal bagasse fibers can be deconstructed with the aid of physical, chemical or enzymatic treatments to obtain sugars of technological interest (Krishnan et al., 2015; Lima et al., 2013; Peng et al., 2010). The arrows show parts of the outer membrane decomposed due to the fiber-bagasse separation, washing and drying physical treatments (A1, A2, A3 and A4) carried out for prolonged maintenance of the study material.

It can be observed that after the acid treatment (B1, B2, B3 and B4), the amorphous part was removed, where most of the hemicellulose is contained, which is composed mainly of pentoses, such as xylose and arabinose, leaving the regions constituted by more resistant cellulose bonds, which may undergo more complex treatment to break their bonds and obtain glucose.

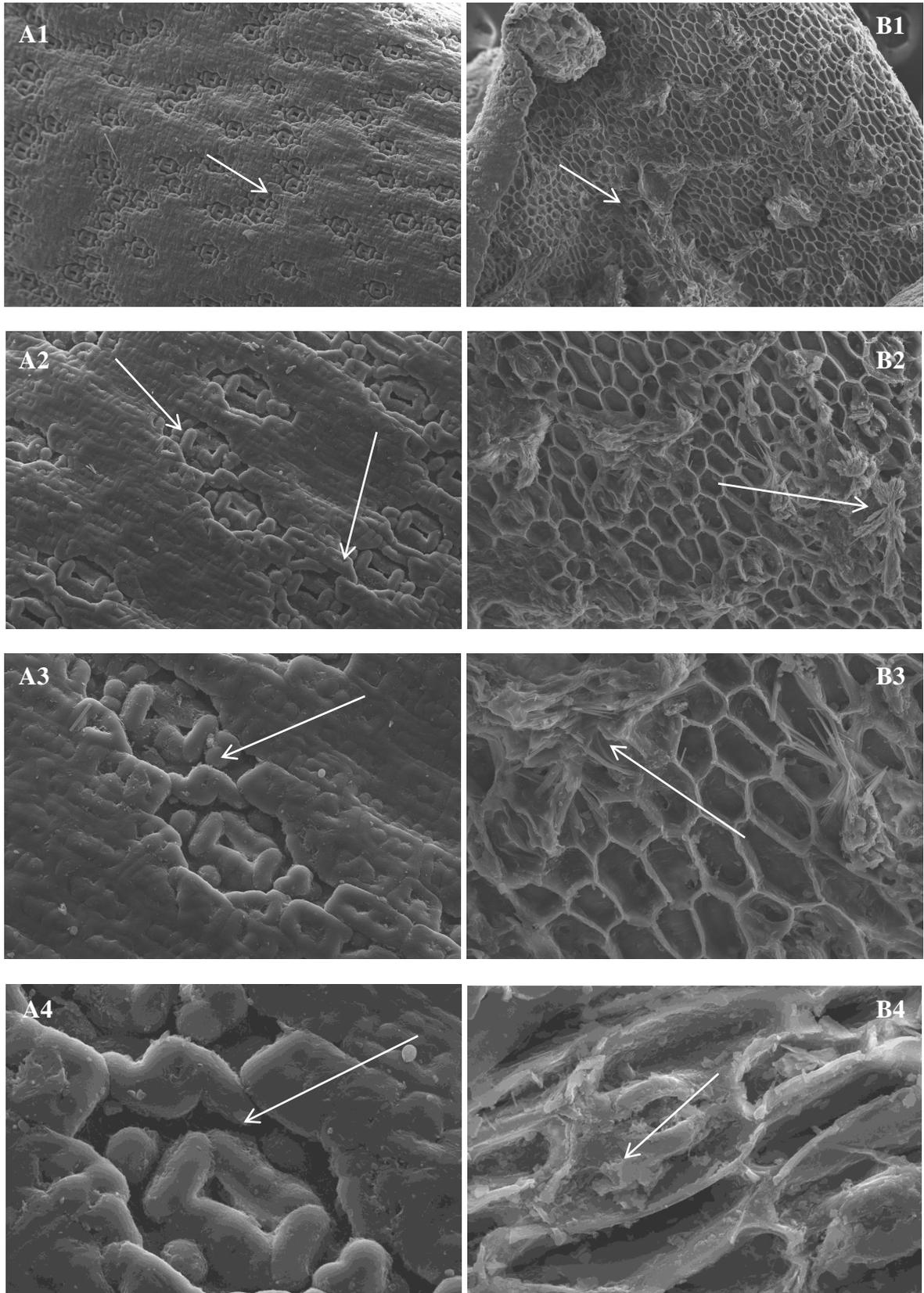


Figure 3. Scanning electron microscopy of untreated (A) and treated (B) sisal bagasse with magnifications of 200x (1), 500x (2), 1000x (3) and 2000x (4).

Figure 4 shows the cell growth of *D. hansenii* over 120 hours of culture in synthetic medium. The maximum cell concentrations were found with medium 1 ($7.65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), which was reproduced in culture with sisal hydrolysate, in which a maximum of $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ biomass was obtained at the end of the culture. Maximum cell concentrations were found with medium 1 ($7.65 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), sisal hydrolyzate culture had a similar behavior in which a maximum biomass of $4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ was obtained at the end of the culture for the supplementation described in item 2.6, correspondent to the medium 1. Medium 2 allowed a cell growth of $6.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, which was lower than that in medium 1, clearly being superior in growth and bioproduction.

Koganti et al. (2013) reported higher concentrations of cell biomass than in this study, in their tests the contents ranged from 12 to $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. However, these values were achieved when the authors used glycerol supplementation in the medium in all experiments, which may have increased the carbon source concentration in the medium.

A study on ethanol and arabitol production by *Debaryomyces nepalensis* tested the influence of fermentation parameters and found a cell biomass production of $33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ with medium containing glycerol and $31 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ with medium containing only arabinose as a carbon source. It is important to note that the substrates were free, without the coparticipation of any competing sugar, and received greater aeration (Kumdam; Murthy and Gummadi, 2013).

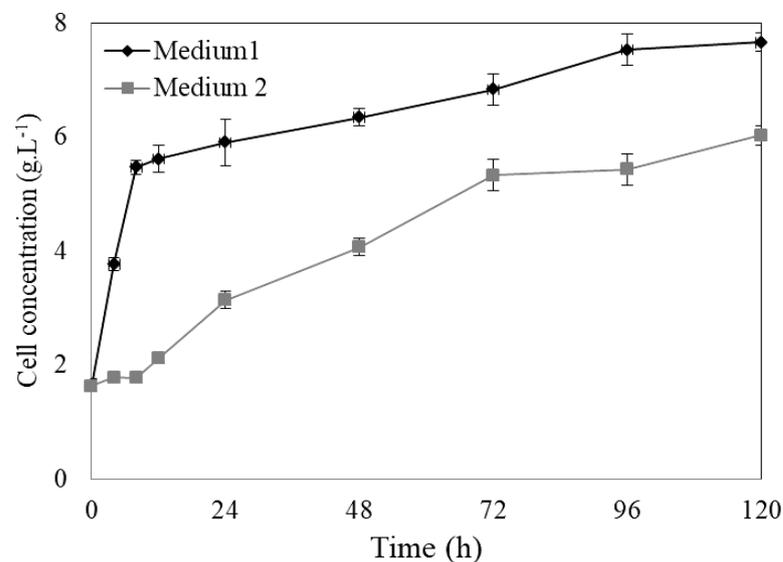


Figure 4. Cellular kinetics of the yeast *Debaryomyces hansenii* in synthetic media (1 and 2).

When evaluating the parameters of fermentative kinetics in synthetic medium, it can be seen in Table 3 that medium 1 obtained $0.0501 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ and medium 2 obtained $0.0366 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ of cellular productivity (Q_x), respectively. Obtained cellular productivity (Q_x) of $0.0501 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, however, the concentration of the cellular productivity (Q_x) in medium 2 was $0.0366 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Medium 1 was better when compared to medium 2. The parameters including the generation time (T_g), substrate conversion into cells factor ($Y_{x/s}$) and maximum specific growth rate (μ) followed the same pattern.

As for $Y_{x/s}$, $0.7889 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ was found for medium 1, $0.4681 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ was found for medium 2 and $0.3850 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ was found for the sisal bagasse hydrolysate. Gírio et al. (2000) reported values of $0.99 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ with a medium containing xylose + arabinose and $0.24 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ in a medium containing glucose + arabinose; the authors did not mention values for a medium containing glucose, xylose and arabinose.

Table 3: Parameters of the fermentative kinetics in synthetic medium (1 and 2)

	Medium 1	Medium 2
$Q_x \text{ (g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}\text{)}$	0.0501	0.0366
$T_g \text{ (h)}$	4.6086	5.7714
$Y_{x/s} \text{ (g}\cdot\text{g}^{-1}\text{)}$	0.7889	0.4681
$\mu \text{ (h}^{-1}\text{)}$	0.1504	0.1201

With respect to the consumption of substrates (xylose and arabinose) and production of polyols (xylitol and arabitol), the results for the synthetic media are shown in Figure 5 and in Figure 6 for the medium with sisal bagasse hydrolysate.

Medium 1 consumed more xylose (Figure 5A) and arabinose (Figure 5B) than medium 2 during the 120 hours of culture. For xylose, there were consumptions of $18.49 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ for medium 1 and $16.28 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ for medium 2, with $2.84 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ xylose consumed in the medium with sisal bagasse hydrolysate. This represents a percentage of xylose consumption ($Y\%$) of 67.82% for medium 1 compared to 57.83% for medium 2 and 100% for the medium with the hydrolysate (Table 4).

For arabinose, the difference between the values was even more considerable, $6.11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ for medium 1, $3.71 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ for medium 2, and $1.14 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the medium with sisal bagasse

hydrolysate, which corresponds to 79.04% for medium 1, 49.08% for medium 2, and 100% for the media with sisal bagasse hydrolysate (Table 4).

Rumdam et al. (2013) studied the production of arabitol from simple arabinose solutions, and 86.70 g·L⁻¹ substrate was consumed while 22.70 g·L⁻¹ arabitol was produced, which are values above those observed in this study. However, medium 1 had a high conversion yield of arabinose into arabitol (0.64 g·g⁻¹), as did the sisal hydrolysate (0.96 g·g⁻¹), when compared to the value mentioned by those authors, which was 0.26 g·g⁻¹.

Concomitant with the consumption of carbon sources, there was production of polyols. Figure 5D shows that the production of arabitol was 3.93 g·L⁻¹ for medium 1, 1.41 g·L⁻¹ for medium 2 and 1.14 g·L⁻¹ for the sisal bagasse hydrolysate (Figure 6A). The production of xylitol (Figure 5C) was 1.38 g·L⁻¹ for medium 1 and 1.11 g·L⁻¹ for medium 2, while in the sisal bagasse hydrolysate there was almost no production of xylitol, totaling 0.11 g·L⁻¹ (Figure 6B) over 120 hours of culture.

Gírio et al. (2000) evaluated the ability of *D. hansenii* yeast to assimilate pentoses from hemicelluloses. They found that the maximum concentration of L-arabitol produced from L-arabinose was only 2.86 g·L⁻¹ for 35 g·L⁻¹ substrate in 120 h of fermentation, the yield ($Y_{P/S}$) was 0.10 g·g⁻¹. When the medium contained xylose and arabinose, this value increased to 1.05 g·g⁻¹. The values found in this study were higher than those found by those authors, with values of 0.64 g·g⁻¹ (medium 1), 0.38 g·g⁻¹ (medium 2) and 0.97 g·g⁻¹ for the sisal bagasse hydrolysate (Table 4). For xylitol, a yield of 0.07 g·g⁻¹ was observed for medium 1 and 0.0681 for medium 2, while a yield of 0.04 g·g⁻¹ was observed for the sisal bagasse hydrolysate, whereas those authors reported 0.59 g·g⁻¹. The authors pointed out that in arabinose medium with a small amount of xylose and glucose, arabitol was the main product, similarly to the cultivation in sisal bagasse hydrolysate.

Table 4: Fermentative parameters for the production of polyols by *Debaryomyces hansenii* in synthetic medium (1 and 2).

Polyols/ Fermentation parameters	Arabitol			Xylitol		
	Medium 1	Medium 2	Sisal bagasse hydrolysate medium	Medium 1	Medium 2	Sisal bagasse hydrolysate medium
$Y_{P/S} (g \cdot g^{-1})$	0.6432	0.3770	0.9913	0.0746	0.0681	0.0387
$Q_P (g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1})$	0.0327	0.0117	0.0095	0.0115	0.0092	0.0009
$Y (\%)$	79.04	49.08	100	67.82	57.83	100

The volumetric productivity was another factor evaluated during the cultivation, (Table 4). It is observed that for arabitol production, $0.0327 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ was found for medium 1, $0.0117 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ was found for medium 2 and $0.0009 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ was found for the hydrolysate (Table 4). Kumdam, Murthy and Gummadi (2013) reported a yield of $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ for 144 hours of cultivation, a value similar to that found in this study with 120 h of cultivation. Those authors also reported the value found at 192 h, which was $0.07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. In turn, Koganti and Ju (2013) found a Q_P value of $0.14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ in culture medium supplemented with glycerol. Gírio et. al. (2000) reported a productivity of $0.20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ for cultivation in medium containing xylose and arabinose over 140 h of culture, a value higher than the one found in this study.

Figure 5 shows the consumption of xylose and arabinose for the production of xylitol and arabitol in sisal bagasse hydrolysate composed of $0,001 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose, $2,86 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ xylose and $1,15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ arabinose. It is observed that arabitol production (Figure 5E) occurred from 12 h to 96 h of culture, stabilizing at 120 h. Additionally, the substrate (arabinose) was fully consumed within 96 h of culture.

Kordowska-Wiater (2015) investigated promising yeasts for the production of arabitol and described the production by means of several yeasts. *Candida entomaea* produced a yield of $0.7 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, and *Pichia guilliermondii* produced L-arabitol with a yield of $0.71 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ using glucose, D-xylose and L-arabinose separately and sequentially. However, they were not able to produce ethanol from xylose and arabinose. *D. hansenii* produced a yield of $0.1 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ in arabinose and xylose medium (Gírio et al., 2000).

Kordowska-Wiater et al. (2008) reported that among yeasts capable of producing arabitol from L-arabinose, the most efficient was *Candida parapsilosis*, producing $10\text{-}14 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$

from $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ L-arabinose under different culture conditions, with yields of 0.51 to $0.78 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$. The authors confirmed the influence of conditions such as aeration and temperature on the efficiency of the biotransformation of L-arabinose to arabitol.

In the present study, the conversion yield value was $0.9913 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, which was higher than those found in the literature, demonstrating the potential of *D. hansenii* for arabitol production, even in mixed medium of glucose, xylose and arabinose. There was no ethanol production due to the low glucose index in the sisal hydrolysate medium.

The xylose consumption (Figure 5F) ceased at 96 h of culture, with low xylitol production starting at 72 hours of culture. This may have occurred because *D. hansenii* better assimilated the arabinose under the fermentation conditions used. Xavier et al. (2018) studied the production of xylitol and ethanol in sisal fiber hydrolysate using *Candida tropicalis* as a fermentation agent and found the maximum production of xylitol at 60 h of culture, with a value of $0.0305 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, a value similar to that found in this study of $0.0387 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, demonstrating satisfactory values for sisal biomass.

A study conducted to produce xylitol in synthetic medium using *Debaromyces nepalensis* found oxygen transfer coefficients in the range of 12-39.6 h^{-1} , providing xylose and nitrogen sources intermittently, and obtained a maximum yield of $0.64 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, a value higher than that in the present study, which was $0.0387 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Himabindu and Gummadi, 2015).

Soleimani and Tabil (2014) compared the efficiencies of the regeneration and bioconversion of free and immobilized cells of *Candida guilliermondii* FTI 20037 for xylitol production from hemicellulosic hydrolysates of oat hulls and found that the aeration rate or the oxygen mass transfer coefficient plays a crucial role in the production of xylitol. In the fermentation of the hydrolysate containing $74.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ of xylose, an aeration rate of 1.25 vvm was used, and a maximum xylitol yield of $0.87 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ was obtained.

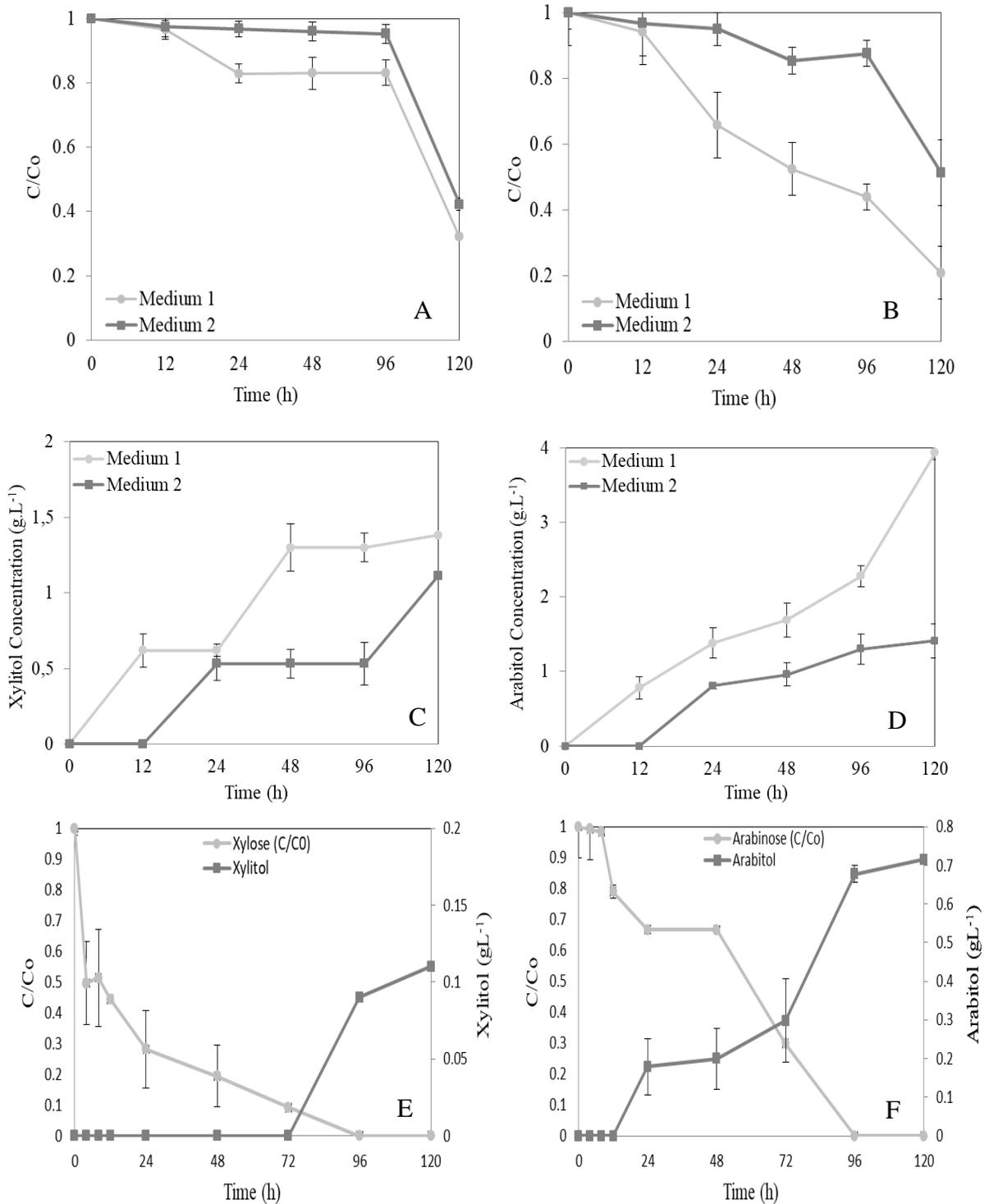


Figure 5. Consumption of xylose (A), consumption of arabinose (B), production of xylitol (C) and production of arabitol (D) for fermentation in the synthetic media using *Debaryomyces hansenii*. Arabinose consumption and arabitol production (E) and xylose consumption and xylitol production (F) by *Debaryomyces hansenii* in sisal bagasse hydrolysate. (C/C_0) represents the value of the final substrate /value of the initial substrate (xylose in figure 5A-5E and arabinose in 5B-5F).

4. CONCLUSION

Sisal bagasse presented considerable amounts of lignocellulosic compounds (cellulose and hemicellulose), demonstrating its high potential as a raw material to obtain sugars used in the bioproduction of polyols of industrial interest.

The hydrolysis process was efficient, as indicated by the SEM, infrared and X-ray diffraction physical analyses.

The yeast *Debaryomyces hansenii* was able to obtain high values of arabitol production in sisal bagasse hydrolysate medium, demonstrating the potential of this waste and adding economic value to sisal bagasse, which is often discarded in the environment, thus reducing the environmental impact.

REFERENCES

- Barreto, A. C. H., Rosa, D. S., Fechine, P. B. A., Mazzetto, S. E., Properties of sisal fibers treated by alkali solution and their application into cardanol-based biocomposites. *Composites: Part A*, 42, 492-500 (2011).
- Benitez-Guerrero, M., López-Beceiro, J., Sánchez-Jiménez, P. E. & Pascual-Cosp, J., Comparison of thermal behavior of natural and hot-washed sisal fibers based on their main components: cellulose, xylan and lignin. TG – FTIR analysis of volatile products. *Thermochim. Acta*, 581, 70-86 (2014).
- Botura, M.B., Dos Santos, J.D.G., Da Silva, G.D., De Lima, H.G., De Oliveira, J.V.A., De Almeida, M.A.O., Batatinha, M.J.M. & Branco. A., In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (Sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. *Veterinary Parasitology*, 192, 211–217 (2013).
- Brasil., Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo, Brasil: Instituto Adolfo Lutz (2008).
- Carpio, L. G. T. and Souza, F. S., Optimal allocation of sugarcane bagasse for producing bioelectricity and second generation ethanol in Brazil: Scenarios of cost reductions. *Renewable Energy*, 111, 771-780 (2017).
- Carvalho, K. C. C., Mulinari, D. R., Voorwald, H. C. J. & Cioffi, M. O. H., Preparação e caracterização de fibras de bagaço de cana modificadas com nanopartículas de óxido de zircônio. 19º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais – CBECiMat, 7726-7734, Campos do Jordão –SP (2010).

- Chen, H., *Biotechnology of lignocellulose: theory and practice*. Chemical Industry Press, Beijing and Springer Science Business Media Dordrecht (2014).
- Debnath, M., Pandey, M., Sharma, R., Thakur, G.S. & Lal, P., *Biotechnological intervention of Agave sisalana: A unique fiber yielding plant with medicinal property*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 43, 177–187 (2010).
- FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations, *Sisal Crops*. Available in: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize/>> Accessed: February 10, 2019.
- Ferreira, S. R., Silva, F. A., Lima, P. R. L., Filho, R. D. T., *Effect of fiber treatments on the sisal fiber properties and fiber-matrix bond in cement based systems*. *Construction and Building Materials*. 101, 730-740 (2015).
- Fiore, V., Scalici, T., Nicoletti, F., Vitale, G., Prestipino, M., Valenza, A., *A new eco-friendly chemical treatment of natural fibres: effect of sodium bicarbonate on properties of sisal and its epoxy composites*. *Composites Part B*. 85, 150-160 (2016).
- Girio, F.M., Amaro, C., Azinheira, H., Pelica, F., Amaral- Collaço, M.T., *Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii**. *Bioresource Technology*, 7, 245–251 (2000).
- Hernández-Meléndez, O., Miguel-Cruz, F., Montiel, C., Hernández-Luna, M., Vivaldo-Lima, E., Mena-Brito, C. & Bárzana, E., *Characterization of blue agave bagasse (BAB) as raw material for bioethanol production processes by gravimetric, thermal, chromatographic, x-ray diffraction, microscopy, and laser light scattering techniques* - *Bioenergy Research*, 1–13 (2016).
- Himabindu, K., and Gummadi, S.N., *Effect of k_{LA} and Fed-batch strategies for enhanced production of xylitol by *Debaryomyces nepalensis* NCYC 3413.*, *British Biotechnology Journal*, 5, 24–36 (2015).
- Ishmayanaa, S., Kennedy, U.J., and Learmontha, R.P., *Preliminary Evidence of Inositol Supplementation Effect on Cell Growth, Viability and Plasma Membrane Fluidity of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae**. *Procedia Chemistry*, 17, 162 – 169 (2015).
- Koganti, S. and Ju, L., **Debaryomyces hansenii* fermentation for arabitol production*. *Biochemical Engineering Journal*, 79, 112– 119 (2013).
- Kordowska-Wiater, M., Targonski, Z., and Jarosz, A., *Biotransformation of L-arabinose to arabitol by yeasts from genera *Pichia* and *Candida**. *Biotechnologia* 1, 177–188 (2008).
- Kordowska-Wiater, M., *Production of arabitol by yeasts: current status and future prospects*. *Journal of Applied Microbiology*, 119, 303-314 (2015).

Krishnan K. A., Josec, C., Ra, R. K., and George, K. E., Sisal nanofibril reinforced polypropylene/polystyrene blends: Morphology, mechanical, dynamic mechanical and water transmission studies. *Industrial Crops and Products*, 71, 173–184 (2015).

Kumar, R., Singh, S., and Singh, O. V., Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 35, 377-391 (2008).

Kumdam, H., Murthy, S. N., and Gummadi, S. N., Production of ethanol and arabitol by *Debaryomyces nepalensis*: influence of process parameters. *AMB Express*, 3, 1-12 (2013).

Lima F. C. S., Silva F. L. H., Gomes J. P., and Silva Neto, J. M., Chemical composition of the cashew apple bagasse and potential use for ethanol production. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 2, 519-523 (2012).

Lima, C. S. S., Conceição, M. M., Silva, F. L. H., Lima, E. E., Conrado, L. S., Leão, D.A.S., Characterization of acid hydrolysis of sisal. *Applied Energy*. 102, 254-259 (2013).

López-Linares, J. C., Romero, I., Cara, C., Castro, E., Mussato, S. I., Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapeseed straw hemicellulosic hydrolysate. *Bioresource Technology*, 247, 736-743 (2018).

Martin, A. R., Mattoso, L. H. C., Martins, M. A & Silva, O. R. R. F., Caracterização química e estrutural de fibra de sisal da variedade Agave sisalana. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 19(1), 40–6 (2009).

Medeiros, L. L., Silva, F. L. H., Conceição, M. M., Conrado, L. S., Madruga, M. S., Costa, W. A., Bezerra, T. K. A., Efficient hydrolysis of cellulosic biomass into free sugars for a future development processing a biorefinery context. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 16, 448-452 (2018).

Miranda, C. S., Fiuza, R. P, Carvalho, R. F., José, N. M., Efeito dos tratamentos superficiais nas propriedades do bagaço da fibra de piaçava ; *Attalea funifera* Martius. *Quimica Nova*, 38, 161-165 (2015).

Mooradian, A. D., Smith, M., and Tokuda, M., The role of artificial and natural sweeteners in reducing the consumption of table sugar: A narrative review. *Clinical Nutrition ESPEN*, 18, 1-8 (2017).

Ojeda, K., Ávila, O., Suárez, J., Kafarov, V., Evaluation of technological alternatives for process integration of sugarcane bagasse for sustainable biofuels production – Part 1. *Chemical Engineering Research and Design*, 89, 270 – 279 (2011).

Oliveira, M. B., Abreu, H. S., and Pereira, R. P. W., Teor de Lignina em Plantas de *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake Tratadas com Fitorreguladores. *Silva Lusitana*, 17, 51-57 (2009).

- Prakasham, R.S., Rao, R.S., and Hobbs, P.J., Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 3, 8–36 (2009).
- Peng, X., Zhong, L., Ren, J., Sun, R., Laccase and alkali treatments of cellulose fibre: Surface lignin and its influences on fibre surface properties and interfacial behaviour of sisal fibre/phenolic resin composites. *Composites: Part A*, 41, 1848–1856 (2010).
- Rao, L. V., Goli, J. K., Gentela, J., Koti, S., Bioconversion of lignocellulosic to xylitol: Na overview. *Bioresource Technology*, 213, 299-310 (2016).
- Santa Anna, L.M., Sebastian, G.V., Menezes, E.P., Alves, T.L.M., Santos, A.S., Pereira JR, N., Freire, D.M.G., Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 19, 159-166 (2002).
- Sakdaronnarong, C., and Jonglertjunya, W., Rice straw and sugarcane bagasse degradation mimicking lignocellulose decay in nature: An alternative approach to biorefinery ;*Science Asia*, 38, 364–372 (2012).
- Soleimani, M., Tabil, L., Evaluation of biocomposite-based supports for immobilized-cell xylitol production compared with a free-cell system. *Biochemical Engineering Journal*, 82, 166–173 (2014).
- TAPPI (Technical Association of the Pulp and Paper Industry), Official Test Methods (OM), Provisional Test Methods (PM) and Useful Test Methods (UM). Atlanta - One Dunwoody Park (2011).
- Thammasittironga, S.N., Chatwachirawongc, P., Chamduanga, T., Thammasittironga, A., Evaluation of ethanol production from sugar and lignocellulosic part of energy cane. *Industrial Crops & Products*, 108, 598-603 (2017).
- Xavier, F. D., Bezerra, G. S., Santos, S. F. M., Oliveira, L. S. C., Silva, F. L. H., Silva, A. J. O., Conceição, M. M., Evaluation of the Simultaneous Production of Xylitol and Ethanol from Sisal Fiber. *Biomolecules*, 8, p. 2-13 (2018).
- Xu, F., Yu, J., Tesso, T., Dowell, F., E Wang, D., Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. *Applied Energy*, 104, 801–809 (2013).
- Yang, L., Lu, M., Carl, S., Mayer, A. J., Cushman, J. C., Tian, E., Lin, H., Biomass characterization of Agave and Opuntia as potential biofuel feedstocks. *Biomass and Bioenergy*. 76, 43-53 (2015).
- Yang, S.T. and Yu, M., *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals and Polymers*. John Wiley & Sons, 1st edition, 7-8, New Jersey (2013).

Zhang, X.; Liu, L.; Lin, C. Isolation, structural characterization and antioxidant activity of a neutral polysaccharide from Sisal waste. *Food Hydrocolloids*, 39, 10-18 (2014).

4.3 PATENTE 1: Bioprocesso de produção de arabitol a partir do sisal (agave sisalana)

(Depositada; Número do Processo: BR 10 2018 005222 5)



16/03/2018 870180021093
09:14



29409161802531512

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 005222 5

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-900

País: Brasil

Telefone: (83) 32167558

Fax:

Email: inova@reitoria.ufpb.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/03/2018 às 09:14, Petição 870180021093

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): BIOPROCESSO DE PRODUÇÃO DE ARABITOL A PARTIR DO SISAL

Resumo: A presente invenção refere-se a um processo para a produção de arabitol a partir da biomassa lignocelulósica de sisal por via biotecnológica elaborado a partir da fermentação do licor hidrolisado do sisal por meio de leveduras do gênero *Candida* e *Debaryomyces*. As soluções podem ser hidrolisadas ou parcialmente hidrolisadas antes da fermentação. Após a fermentação, as células de levedura podem ser separadas, por diversos processos, por exemplo, centrifugação seguida de filtração por membrana, ultrafiltração, nanofiltração ou microfiltração. A solução de arabitol recuperada pode ser cristalizada para fornecer cristais de arabitol puro. O produto apresenta-se como fonte de açúcares de baixo valor calórico e com propriedades edulcorantes de interesse industrial. Este composto pode fornecer propriedades adoçantes e anticariogênicas, auxiliando na prevenção de cáries, além de ser indicado às pessoas portadoras de diabetes.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 16/03/2018 às 09:14, Petição 870180021093

Inventor 1 de 7**Nome:** LORENA LUCENA DE MEDEIROS**CPF:** 06853185404**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Doutorando**Endereço:** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia,
Departamento de Engenharia de Alimentos, Programa de pós-
graduação em ciência e tecnologia de alimentos, Campus I**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58051-900**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 996 288414**Fax:****Email:** lorenalucena@live.com**Inventor 2 de 7****Nome:** FLÁVIO LUIZ HONORATO DA SILVA**CPF:** 42579325468**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia,
Departamento de Engenharia de Alimentos, Programa de pós-
graduação em ciência e tecnologia de alimentos, Campus I**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58051-900**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 999 219209**Fax:****Email:** flavioluizh@yahoo.com.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/03/2018 às
09:14, Petição 870180021093

Nome: MARTA MARIA DA CONCEIÇÃO

CPF: 80542131404

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Av. Hilton Souto Maior, nº 6701. Condomínio Cabo Branco
Residence Prive. Q753, L472. Bairro: Portal do Sol

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58046-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 244039

Fax:

Email: martamaria8@yahoo.com

Inventor 4 de 7

Nome: MARTA SUELY MADRUGA

CPF: 30898773415

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia,
Departamento de Engenharia de Alimentos, Laboratório de Flavor,
Campus I

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 321 67473

Fax:

Email: msmadruga@uol.com.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/03/2018 às
09:14, Petição 870180021093

Nome: LÍBIA DE SOUSA CONRADO OLIVEIRA

CPF: 49167499449

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Laboratório de Bioengenharia

Cidade: Campina Grande

Estado: PB

CEP: 58109-000

País: BRASIL

Telefone: (83) 210 11113

Fax:

Email: libiaconrado@yahoo.com.br

Inventor 6 de 7

Nome: ANGELA LIMA MENÊSES DE QUEIROZ

CPF: 00808661400

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Pesquisador

Endereço: Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Alimentos, Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos, Campus I

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 904030

Fax:

Email: angelalimas@gmail.com

Inventor 7 de 7

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/03/2018 às 09:14, Petição 870180021093

Nome: MELANIA LOPES CORNÉLIO

CPF: 85368890478

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia,
Departamento de Engenharia Química, Campus I

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 244405

Fax:

Email: melaniacomelio@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	00_Comprovante gru.pdf
Relatório Descritivo	01_Relatorio descritivo.pdf
Reivindicação	02_Reivindicacao.pdf
Desenho	03_Desenho.pdf
Resumo	04_Resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/03/2018 às 09:14, Petição 870180021093

4.4 PATENTE 2: Processo de produção de edulcorantes por fermentação simultânea utilizando hidrolisado de sisal

(Depositada; Número do Processo: BR 10 2018 014447 2)



16/07/2018 870180060948
09:26
29409161806883685

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 014447 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24098477000110

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Cidade Universitária

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58059-900

País: Brasil

Telefone: (83) 32167558

Fax:

Email: inova@reitoria.ufpb.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/07/2018 às 09:26, Petição 870180060948

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE PRODUÇÃO DE EDULCORANTES POR FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEA UTILIZANDO HIDROLISADO DE SISAL

Resumo: A presente invenção trata de um processo de produção integrada de xilitol e arabitol a partir da biomassa lignocelulósica do sisal por meio de inóculo conjunto de leveduras. As soluções podem ser hidrolisadas ou parcialmente hidrolisadas antes da fermentação. Após a fermentação, as células de levedura são separadas e o pH é ajustado. A solução que contém os edulcorantes é recuperada e cristalizada para fornecer xilitol e arabitol cristalino. Este composto pode fornecer propriedades adoçantes e anticariogênicas, auxiliando na prevenção de cáries, além de ser indicado às pessoas portadoras de diabetes. Dessa forma, a produção de edulcorantes (xilitol e arabitol) é uma alternativa de produto natural para a indústria de alimentos auxiliando na prevenção da Reação de Maillard, mantendo o valor nutricional das proteínas presentes, além de proporcionar efeitos benéficos para a saúde dos diabéticos e propriedade anticariogênica, de grande interesse para as indústrias farmacêutica e cosmética, respectivamente.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/07/2018 às 09:26, Petição 870180060948

Inventor 1 de 7**Nome:** LORENA LUCENA DE MEDEIROS**CPF:** 06853185404**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Doutorando**Endereço:** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia,
Departamento de Engenharia de Alimentos, Programa de pós-
graduação em ciência e tecnologia de alimentos, Campus I**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58051-900**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 996 288414**Fax:****Email:** lorenalucena@live.com**Inventor 2 de 7****Nome:** FLÁVIO LUIZ HONORATO DA SILVA**CPF:** 42579325468**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Física:** Professor do ensino superior**Endereço:** Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia,
Departamento de Engenharia de Alimentos, Programa de pós-
graduação em ciência e tecnologia de alimentos, Campus I**Cidade:** João Pessoa**Estado:** PB**CEP:** 58051-900**País:** BRASIL**Telefone:** (83) 999 219209**Fax:****Email:** flavioluizh@yahoo.com.br**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/07/2018 às
09:26, Petição 870180060948

Nome: SHARLINE FLORENTINO DE MELO SANTOS

CPF: 88567109434

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia,
Departamento de Engenharia Química, Campus I

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 996 138866

Fax:

Email: sharlinefm@hotmail.com

Inventor 4 de 7

Nome: MARTA SUELY MADRUGA

CPF: 30898773415

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia,
Departamento de Engenharia de Alimentos, Campus I

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 321 67473

Fax:

Email: msmadruga@uol.com.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/07/2018 às
09:26, Petição 870180060948

Nome: LÍBIA DE SOUSA CONRADO OLIVEIRA

CPF: 49167499449

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, Departamento de Engenharia Química

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58109-000

País: BRASIL

Telefone: (83) 210 11113

Fax:

Email: libiaconrado@yahoo.com.br

Inventor 6 de 7

Nome: ANGELA LIMA MENÉSES DE QUEIROZ

CPF: 00808661400

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Alimentos, Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos, Campus I

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 904030

Fax:

Email: angelalimas@gmail.com

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/07/2018 às 09:26, Petição 870180060948

Nome: DÉBORA JAMILA DA NOBREGA

CPF: 07243379460

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Engenheiro, arquiteto e afins

Endereço: Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia,
Departamento de Engenharia Química, Campus I

Cidade: João Pessoa

Estado: PB

CEP: 58051-900

País: BRASIL

Telefone: (83) 999 909537

Fax:

Email: deborajamila@gmail.com

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	00_Comprovante de Pagamento.pdf
Relatório Descritivo	01_Relatorio descritivo.pdf
Reivindicação	02_Reivindicacoes.pdf
Resumo	03_Resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 16/07/2018 às 09:26, Petição 870180060948

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O bagaço do sisal apresentou potencialidade para obtenção de hidrolisado rico em açúcares fermentescíveis como xilose e arabinose. O hidrolisado obtido por meio da otimização dos fatores que influenciam no teor de carboidratos atingiu máxima concentração de pentoses operando sob condições de temperatura, concentração de ácido e proporção bagaço/ácido diluído ao nível -1 (110 °C, 1,5% e 1:12, respectivamente). Análises químicas estruturais realizadas neste estudo demonstraram a eficiência do processo de hidrólise.

Diante dos resultados obtidos, pode-se concluir que o fermentado do hidrolisado do bagaço do sisal, utilizando a levedura *Debaryomyces hansenii*, obteve 100% de consumo de substrato (arabinose e xilose) com máxima produção de arabitol obtida com 96 h de fermentação, já para o xilitol iniciada apenas com 72h de cultivo demonstrou a necessidade de um estudo específico das vias de obtenção de xilitol. Tendo em vista que a xilose redutase é a enzima chave da produção de xilitol, sugere-se, em pesquisas futuras, o estudo da atividade de xilose redutase da levedura *D. hansenii*, com intuito de verificar se a atividade enzimática dessa levedura será mais alta para a L-arabinose do que a D-xilose, além disso, testes de alteração da especificidade do substrato deverão ser realizados para afirmar as melhores condições que favorecem a produção de arabitol e/ou xilitol pela *D. hansenii*.

Pesquisas podem ser realizadas para avaliar a produção de arabitol e xilitol por meio de outras biomassas residuais, garantindo sua aplicação nas indústrias alimentícias e reduzindo os impactos ambientais. Por fim, faz-se necessária a realização de uma análise de custo, para inferir sobre a viabilidade econômica dos processos fermentativos de produção de arabitol e xilitol em escala ampliada com a levedura *D. hansenii* e as condições pré-estabelecidas na pesquisa realizada.

ANEXO

ANEXO A: Artigo publicado no Periódico Biocatalysis and Agricultural Biotechnology

Efficient hydrolysis of cellulosic biomass into free sugars for a
future development processing a biorefinery context

Lorena Lucena de Medeiros^{1*}, Flávio Luiz Honorato da Silva², Marta Maria da Conceição³, Líbia de Sousa Conrado⁴, Marta Suely Madruga¹, Willyan Araújo da Costa², Taliana Kenia Alencar Bezerra¹

¹ Department of Food Engineering, Technology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

² Department of Chemical Engineering, Center of Technology, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

³ Federal University of Paraíba, Center for Technology and Regional Development, João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁴ Department of Chemical Engineering, State University of Campina Grande, Paraíba, Brazil

* Corresponding author

Federal University of Paraíba, Technology Center, Food Engineering Department, Post Graduation Program in Food Science and Technology, Campus I, 58051-900, University City, João Pessoa, Paraíba, Brazil. e-mail: lorenalucena@live.com, Telephone number: + 55

83 99628 8414

ABSTRACT: Due to the commitments for environment preservation, there has been a growing interest in the use of alternative energy sources for the production of bioproducts of added value. In this context, sisal has been considered a promising alternative to meet the global demand in a more sustainable way. Thus, the aim of this study was to optimize the acid hydrolysis of sisal bagasse to obtain hydrolyzed liquor rich in xylose and arabinose for a future development process in a biorefining context. Thermal analysis was held for bagasse characterization, and sugars and fermentation inhibitors (acetic acid, furfural and hydroxymethylfurfural) in the prehydrolyzed liquor. The 2^3+3 factorial experimental design was applied with a total of 11 experiments to investigate the influence of variables temperature, bagasse/acid diluted and acid concentration to evaluate the release of pentoses (xylose and arabinose) and hexose (glucose) in the prehydrolyzed liquor, fixing the reaction time in 1 h. The liquor from the acid hydrolysis should operate under conditions at levels -1 (110 °C, 1,5 % and 1:12), obtaining pentose yields (xylose and arabinose), which are the best conditions indicated in planning with 34.39 % conversion. It was observed that acid treatment liquor is very effective in providing high-susceptibility substrates for arabitol and xylitol production.

Key-words: Acid hydrolysis; Biomass; Bioproduction; Sweeteners; Sisal

1. Introduction

Sisal (*agave sisalana*) is a monocotyledonous plant of great interest in semi-arid regions, as it is quite resistant to long drought periods. It is a plant native to Mexico, but Brazil is the world's largest producer and exporter, and its production was 283,797 t in 2011, representing more than 69 % of world production (Santos et al., 2015). These indices were maintained, and a recent research has shown production of 298,498 t in 2016 (FAOSTAT, 2017).

The commercial use of sisal concentrates on its fiber, used in the production of yarns and ropes; however, the growth in the discard of part of the fiber extraction, called bagasse, has caused economic and environmental problems. Although in literature, there are several studies with fibers, little has been developed in relation to bagasse (Barreto et al., 2011). It is estimated that only 4 % of sisal leaves produce fiber, the residual material is

usually discarded by sisal producing farms, generating waste and pollution (Botura et al., 2013).

Thus, it is necessary to use the plant biomass, which is a process involving several stages. Recently, studies have focused on the improvement of biomass digestibility with the aim of reducing process costs and promoting sustainable production (Lima et al., 2014). Due to its complexity, there is a need to deconstruct the plant components by reducing lignin content, cellulose crystallinity and increasing porosity, thereby opening up the cell wall structure (Hendriks and Zeeman, 2009).

Among the numerous hydrolysis treatments under study, dilute acid has been shown to be the most favorable method for industrial applications, and the most applied in a variety of lignocellulosic biomasses. The main reaction that occurs during acid treatment is hemicellulose solubilization, producing liquor rich in pentoses such as xylose and arabinose (Alvira et al., 2010).

The biotechnological production of sisal bagasse can be carried out using some constituents that can be converted into products of industrial interest, such as arabitol and xylitol, also known as natural sweeteners. They are sugars of five-carbon, polyalcohol, has sweetness similar to sucrose, providing low calories. Xylitol is used as a sugar substitute in the food industry and is one of the 12 intermediate high value-added chemicals produced by biomass (Irmak et al., 2017).

These natural sweeteners have anticariogenic properties and can be used as a sugar substitute for diabetics because there is no need for the body to produce large amounts of insulin to control sugar levels due to slow absorption by the human digestive tract (Medeiros et al., 2016).

Optimization of industrial processes is an important factor for the biorefinery market, since it assists in the maximum efficiency of the production unit, optimizing time, adding value to the raw material, increasing revenue and minimizing the waste generated by industries, consequently environmental impacts. In order to introduce sisal biomass as a renewable alternative, the objective of this study was to optimize the acid hydrolysis of sisal bagasse to obtain hydrolyzed liquor rich in xylose and arabinose for a future development process in a biorefining context (xylitol, arabitol and ethanol).

2. Material and Methods

2.1 Raw material

The raw material used was sisal bagasse (*Agave sisalana*) and the hydrolyzate of this waste (liquor from liquid treatment). Sisal was acquired from Lagoa Cercada farmhouse located in Nova Floresta - PB. Then, samples were processed by two washes with distilled water at temperature of 50 °C for 10 min each wash; then, samples were submitted to two additional washes with distilled water at room temperature (about 25 °C) for leaching excess sugars. After this process, the raw material was submitted to drying in a tray drier at 55 °C for 1 h, being then vacuum packed bags for further use (Lima et al., 2012).

2.2 Obtaining hydrolyzate

Treatment was obtained from dried sisal bagasse. Then, the material was submitted to acid treatment process performed in stainless steel pressurized reactor brand Parr (model MAINTEC Fornos Inti- Brazil) with temperature controller FE50RP (time, heating, internal/external temperature automation system) and 700 mL of capacity, filtered for the separation of solid constituents of cellulose and lignin (Medeiros et al., 2016).

2.3 Experimental design

A full 2^3 factorial design with three replications in central point was carried out to check the influence of variables temperature (110, 130 and 150 °C), acid concentration (1,5, 2,5 and 3,5 %) and bagasse/dilute acid ratio (1:12, 1:16 and 1:20) to treatment with sulfuric acid, totaling 11 experiments for each treatment, fixing the reaction time in 1 h, because previous studies of the research group have demonstrated demonstrated that the most favorable condition to obtain sugars with lower inhibitor production was 1 h, as corroborated by other researches and observed in this study that the hydrolysis of eucalyptus in the time of 1 h presented higher efficiency (Colodette et al., 2011; López-Linares et al., 2018). The thermal hydrolysis time was recorded from the time it reached the temperature established in the experimental design. The acid hydrolysis black fluid (liquor, liquid part) and bagasse (solid part) were removed from the reactor, being

separated by filtration and only liquor was collected for subsequent analysis of sugars, to evaluate the release of pentoses (xylose and arabinose) and hexose (glucose) in the prehydrolyzed liquor.

For the validation of the model the calculation of % difference was performed, we used the following equation:

$$\% \text{Diference} = (E_v - E_p) / E_v \quad (1)$$

E_v is the experimental best condition validation and E_p is the response predicted by the model.

2.4 Thermal characterization

For the characterization of dry sisal bagasse and after treatment, Thermogravimetric curves were obtained in Shimadzu Thermal Analyzer, mass of 10 mg, heating rate of 10 °C/min, in nitrogen atmosphere, flow of 25 mL/min and ambient temperature range up to 900 °C. In this analysis, the best hydrolysis condition was selected for thermal analysis.

2.5 Determination of sugars and fermentation inhibitors

Carbohydrate and inhibitors contents were determined by High Performance Liquid Chromatography (VARIAN, Waters, California, USA), coupled with a refractive index detector (Varian 356 - LC), equipped with isocratic solvent system, "Rheodyne" valve with 20 µl loop; coupled with an Agilent column Hi-Plex H (300 mm x 7.7 mm) was used. Samples were investigated at temperature of 65 °C, mobile phase composed of ultra pure water, flow rate of 0.6 mL/min, injecting 20 µL of sample and analysis time of 60 min. The chromatograms of samples were compared with standards of sugars analyzed, and quantification was performed by the compound area in a calibration curve of each compound. Total contents of sugars (cellobiose, glucose, xylose and arabinose) and inhibitors (acetic acid, furfural and 5-hydroxymethylfurfural) were assessed.

2.6 Statistical Analysis

The results were statistically investigated by analysis of variance and regression analysis using the Response Surface Methodological (RSM) analysis to define the best acid treatment conditions for the production of pentoses (cellobiosis, glucose, xylose and arabinose). Nonlinear regression at 90 and 95 % confidence was carried out for each response using experimental data of the factorial experimental design.

3. Results and discussion

Table 1 shows the actual and coded levels of treatments used in the experimental design, as well as the responses of sugars (cellobiose, glucose, xylose and arabinose) and inhibitors (acetic acid, furfural and 5- hydroxymethylfurfural). Good reproducibility of the experimental design through the central points was observed (run 9, 10 and 11), and similar values were obtained.

Sulfuric acid has been widely investigated for hemicellulose hydrolysis. Sulfuric acid is a stronger acid and more effective at low concentrations; however, the temperature used in the process may contribute to the formation of inhibitors. Differences in the concentrations of individual sugars can be explained in large part by the formation of degradation products (Table 1). Furan dehydration products remained low with all sulfuric acid concentrations, primarily furfural (pentose dehydration) and 5-hydroxymethylfurfural (hexose dehydration). Other sugar degradation products were obtained in sulfuric acid hydrolysates, and essentially acetic acid, a natural constituent of hemicellulose, was present in hydrolysates liquor. The higher acetic acid levels observed with sulfuric acid may also include products from sugar destruction. Sugar products represent potential microbial growth and fermentation inhibitors because it is so important to detect and quantify these compounds in hydrolysates (Geddes et al., 2010; Zaldivar et al., 2000).

Table 2 shows the nonlinear regression models considering statistically significant parameters at 95% confidence ($p < 0.05$), determination coefficients (R^2) and F_{cal} / F_{tab} ratio values (F test).

Regression model coefficients in bold in Table 2 (responses) are statistically significant at 95 % confidence for cellobiosis, arabinose, furfural and acetic acid; 90 % for glucose, xylose and 5-hydroxymethylfurfural. According to equations shown in Table 2, it

is known that first-order models are statistically significant for cellobiose, xylose, 5-hydroxymethylfurfural, furfural and acetic acid concentrations in the hydrolyzate from the acid treatment of sisal bagasse, as they show F_{cal}/F_{tab} ratio equal to or greater than 1 (Rodrigues and Iemma, 2014).

Statistically significant models were used to build up the response surfaces in the attempt to optimize the acid hydrolysis process of sisal bagasse. Objective function was defined as the highest concentration of pentoses (xylose and arabinose) in the hydrolyzate liquor, for the study for arabitol and xylitol production.

Figure 1 shows that maximum values of sugars were obtained temperature at 110 °C (level -1) of the acid treatment process, operating at a ratio of 1:12 and initial acid concentration of 1,5 %, high concentration of pentoses (xylose and arabinose) was obtained in the hydrolyzate liquor, 5.73 gL⁻¹ cellobiose, 0.07 gL⁻¹ glucose, 17.94 gL⁻¹ xylose and 4.71 gL⁻¹ arabinose concentration and no inhibitor concentration, run 1 (Table 1), which are the best conditions indicated in planning with 34.39 % conversion. A study carried out with sisal fiber applying temperature of 105 °C using 3% sulfuric acid, a ratio of 1:10 in the pressurized reactor during 1 h of hydrolysis, obtained values similar to those of this study with 0.7 gL⁻¹ of glucose, 12.4 gL⁻¹ of xylose and 4.5 gL⁻¹ of arabinose (Lima et al., 2013).

Abo-State et al., (2013) studied the effect of different pretreatments on egyptian sugarcane bagasse bioethanol production, 10 g of bagasse were placed in flasks containing of 100 mL with distilled water; being then steam-treated by autoclaving at 121 °C and 1.5 bars for 20 min. After hydrolysis, 17.05 gL⁻¹ of glucose, 4.19 gL⁻¹ of xylose and 0.73 gL⁻¹ of arabinose were obtained, values different from those found with sisal bagasse. However, these levels are considerable regarding obtaining glucose for ethanol production.

The highest values were 12.56 (run 4) and 7.56 (run 8) gL⁻¹ of acetic acid in the experiment carried out (Table 1). Using sulfuric acid concentration of 3.5 % and temperature of 150 °C, levels +1 (Figure 1), the trend was the same, and maximum values were more than 3 gL⁻¹ of acetic acid. Acetic acid can inhibit microbial growth from 4 to 10 gL⁻¹ because it goes through the cellular membranes and decreases intracellular pH, which affects the metabolism of microorganisms (Gámez et al., 2006; Lawford and Rousseau, 1998).

In our study, acetic acid concentrations were above the limit of toxicity that could inhibit the development of microorganisms. Similar behavior was observed by Dalli, Patel and Rakshit, (2017), who studied the development and evaluation of pre-hydrolyzed processes of hemicellulose poplar for increased fermentative xylitol production under the conditions of 1, 2 and 2.5% for 2 h at 120 ° C. It was observed that the higher the time and sulfuric acid concentration, the higher the acetic acid and furfural contents obtained in the hydrolyzed liquor, exceeding values allowed in literature.

Observing Table 3, it can be seen that the comparison of predicted values by the regression models of the experimental data (Table 2) by the experimental values in triplicate (run 1 + 2 replicates) show% differences for the junction of cellobiose and glucose of 4.56% and for xylose of 0.78%, values considered low. For the arabinose, it is verified that the model is not predictive, presenting a difference of 10%. No inhibitors were detected.

Figure 2 shows the sample mass loss as a function of time and temperature through the profile of thermogravimetric curves (TG), while DTG, derived from the TG curve, corresponds to the inflection points. Both curves allow a precise mapping of the thermal processes within the sample. This analysis is useful for evaluating the thermal changes of certain compounds and temperature limits at which they can be submitted without compromising their properties (degradation). Resulting in the improvement of applications for the knowledge of which are the volatile products and the residues generated in relation to their biological action. (Pettinau et al., 2014).

The figure shows four mass loss stages. The first stage was attributed to water vaporization, presenting 12.21% and 5.7 % of mass loss, for sample before (A) and after pretreatment (B), respectively, with temperature ranges around 105°C. However, a larger value is observed for the first sample, since the prehydrolyzed bagasse underwent washing and drying treatment for packaging until the moment of analysis.

The second stage occurs due to the hemicellulose depolymerization and fractionation of glycosidic cellulose bonds, and at temperature range from 150 °C to 350 °C, it presented mass loss of 14.80 % for sample without treatment (A) and 11.75 % for prehydrolyzed bagasse (B). The hemicellulose value decreased among samples, since hemicellulose was solubilized in the hydrolyzed liquor (Avila-lara et al, 2015).

The third mass loss stage, attributed to the degradation of type II cellulose, can be observed at temperature from 400 °C to approximately 550 °C, with values of 18.28 % (A) and 15.76 % (B) for sisal bagasse without treatment and after hydrolysis, respectively. There is a reduction of cellulose values, justified by the dissolution of hydrolyzed particles in the liquor.

The fourth stage refers to the lignin decomposition, which also occurs from 200 °C. According to Lima et al., (2013), it is not possible to differentiate the processes of disintegration of lignocellulosic components because some of them overlap at temperature ranges from 220 to 360 °C, corresponding to the complexity of bonds and functions present in biomasses. The values of 29.42 % (A) were raised to 46.09 % (B), because after the decomposition of the other components of the lignocellulosic biomass, the lignin becomes visible.

It could be observed that at 900 °C, the material was practically decomposed.

4. Conclusions

According to the results of this study, the variables used to obtain high concentrations of pentoses in the liquor of the acid hydrolysis of sisal bagasse must operate under temperature conditions, acid and bagasse concentration: acid diluted at levels -1 (110 °C, 1.5 % and 1:12).

Thus, the hydrolyzed liquor presents potential sugar values for the fermentation and formation of sustainable bioproducts in the industry, adding value to lignocellulosic biomass of sisal.

Acknowledgements

The authors would like to thank the financial support from the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel CAPES for the PhD scholarship granting.

References

- Abo-State, M. A., Ragab, A.M.E., EL-Gendy, N. Sh., Farahat, L. A., Madian, H. R. 2013. Effect of different pretreatments on Egyptian sugar-cane bagasse saccharification and bioethanol production. *Egyptian Journal of Petroleum*, 22, 161-167.
- Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M., Negro M.J., 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*, 101, 4851–4861.
- Ávila-lara, A. I.; Camberos-flores, J. N.; Mendoza-pérez, J. A.; Messina-fernández, S. R.; Saldaña-duran, C. E.; Jimenez-ruiz, E. I.; Sánchez-herrera, L. M.; E Pérez-pimienta, J. A. 2015. Optimization of alkaline and dilute acid pretreatment of agave bagasse by response surface methodology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 3, 146).
- Barreto, A.C.H., Rosa, D.S., Fachine, P.B.A., Mazzetto, S.E. 2011. Properties of sisal fibers treated by alkali solution and their application into cardanol-based biocomposites. *Composites: Part A*. 42, 492–500.
- Botura, M.B., Santos, J.D.G. , Silva, G.D., Lima, H.G., Oliveira, J.V.A., Almeida, M.A.O., Batatinha, M.J.M., Branco. A. 2013. In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perrine (Sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. *Veterinary Parasitology*, 192, 211–217.
- Colodette, J.L., Longue Jr., D., Pedrazzi, C., Oliveira, R.C., Gomide, J.L., Gomes, F.J.B., 2011. Pulpability and bleachability of xylan-depleted eucalyptus wood chips. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50, 1847–1852.
- Dalli, S. S., Patel, M., Rakshit, S. K. 2017. Development and evaluation of poplar hemicellulose prehydrolysate upstream processes for the enhanced fermentative production of xylitol. *Biomass and Bioenergy*, 105, 402-410.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Database, 2017, Living planet report <<http://faostat.fao.org>> (accessed 25.09.2017).

- Gámez, S., Gonzáles-Cabriales, J. J., Ramírez, J. A., Garrote, G., Vázquez, M. 2006. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal of food engineering*, 74, 78-88.
- Geddes, C. C., Peterson, J. J., Roslander, C., Zacchi, G., Mullinnix, M. T., Shanmugam, K. T., Ingram, L. O. 2010. Optimizing the saccharification of sugar cane bagasse using dilute phosphoric acid followed by fungal cellulases. *Bioresource Technology*, 101, 1851-1857.
- Hendriks, A. T. W. M.; Zeeman, G. 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Biouresource Techonology*, 100, 10-18, 2009.
- Irmak, S., Canisaga, H., Vokoun, C., Meryemoglu, B. 2017. Xylitol production from lignocellulosics: Are corn biomass residues good candidates?. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 11, 220–223.
- Lawford, H. G., and Rousseau, J. D. 1998. Improving fermentation performance of recombinant *Zymomonas* in acetic acid-containing media. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 70–72, 161–172.
- Lima F.C. S., Silva F.L.H., Gomes J.P., Silva Neto J.M. 2012. Chemical composition of the cashew apple bagasse and potential use for ethanol production. *Advances in Chemical Engineering and Science*, 2, 519-523.
- Lima, C.S.S., Conceição, M.M., Silva, F.L.H., Lima, E.E., Conrado, L.S., Leão, D.A.S. 2013. Characterization of acid hydrolysis of sisal. *Applied Energy*, 102, 254–259.
- Lima F.C.S., Silva F.L.H., Gomes J.P., Muniz M.B., Santiago A.M., Silva C.G. 2014. Biotechnological production of xylitol: evaluation of detoxification process with residual lignin using response surface methodology. *Chemical Engineering Transactions*, 38, 415-420.
- López-Linares, J. C., Romero, I., Cara, C., Castro, E. Mussato, S. I. 2018. Xylitol production by *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* from rapessed straw hemicellulosic hydrolysate. *Bioresource technology*, 247, 736-743.

- Medeiros, L. L., Silva F.L.H., Lima F.C. S., Lima, C. S. S., MUNIZ, M. B., SANTOS, S. F. M., 2016. Optimization of acid treatment of cashew peduncle for ethanol and xylitol production. *Chemical Engineering Transactions*, 49, 577-582.
- Pettinau, A., Dobó, Z., Köntös, Z., Zsembéri, A., 2014. Experimental characterization of a high sulphur Hungarian brown coal for its potential industrial applications. *Fuel Processing Technology*, 122, 1-11.
- Rodrigues M.I., lemma A.F., 2014. *Experimental design and process optimization*. 3rd Ed. – Campinas, SP, Brazil, 358.
- Santos, J. D. G., Vieira, I. C., Braz-filho, R., Branco, A. 2015. Chemicals from *agave sisalana* biomass: isolation an identification. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 8761-8771.
- Zaldivar, J., Martinez, A., Ingram, L.O., 2000. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 68, 524–530.

Table 1: Concentrations of sugars and inhibitors in the liquor from acid treatment

Run	Independent variable							Response		
	(T °C)	Acid concentration (%)	B/DA ratio	C (g.L ⁻¹)	G (g.L ⁻¹)	X (g.L ⁻¹)	A (g.L ⁻¹)	HMF (g.L ⁻¹)	Furfural (g.L ⁻¹)	Acetic Acid (g.L ⁻¹)
1	-1(110)	-1(1,5)	-1(1:12)	5.73	0.07	17.94	4.71	0.00	0.00	0.00
2	1(150)	-1(1,5)	-1(1:12)	3.15	0.00	16.99	2.56	0.00	0.00	0.00
3	-1(110)	1(3,5)	-1(1:12)	4.29	0.00	17.30	2.14	0.86	0.15	0.00
4	1(150)	1(3,5)	-1(1:12)	4.17	0.12	16.52	1.68	0.00	0.00	12.56
5	-1(110)	-1(1,5)	1(1:20)	2.27	0.00	16.26	1.20	0.00	0.00	0.00
6	1(150)	-1(1,5)	1(1:20)	2.41	0.00	16.29	1.11	0.03	0.00	0.00
7	-1(110)	1(3,5)	1(1:20)	3.26	0.00	15.82	1.16	0.03	0.00	0.00
8	1(150)	1(3,5)	1(1:20)	1.54	1.83	16.81	1.57	0.00	0.00	7.56
9	0(130)	0(2,5)	0(1:16)	2.86	0.00	16.67	1.29	0.00	0.00	0.00
10	0(130)	0(2,5)	0(1:16)	2.75	0.00	16.52	1.31	0.00	0.00	0.00
11	0(130)	0(2,5)	0(1:16)	2.77	0,00	16.73	1.33	0.00	0.00	0.00

T - temperature, B/DA - bagasse:diluted acid, C- cellobiose; G - glucose; X-xylose; A - arabinose, HMF - 5-hydroxymethylfurfural.

Table 2: Regression model for cellobiose, glucose, xylose, arabinose, 5-HMF, furfural and acetic acid concentrations in the liquor from acid treatment of sisal bagasse

Coded variable	Equation	Fcal/Ftab Ratio	R ²	p
Cellobiose	$3.198 - 0.536 (C) - 0.037 (T) - 0.982 (R) + 0.074 (CxT) + 0.141 (CxR) - 0.068 (TxR) - 0.540 (CxTxR)$	5.26	95 %	<0.05
Glucose	$0.184 + 0.235 (T) + 0.235 (C) + 0.204 (R) + 0.253 (TxR) + 0.222 (CxR) + 0.204 (CxTxR)$	0.98	95 %	<0.1
Xylose	$16.714 - 0.090 (C) - 0.129 (T) - 0.446 (R) + 0.140 (CxT) + 0.344 (CxR) + 0.149 (TxR) - 0.098 (CxTxR)$	3,16	94 %	<0.1
Arabinose	$1.823 - 0.286 (C) - 0.378 (T) - 0.755 (R) + 0.273 (CxT) + 0.365 (CxR) + 0.484 (TxR) - 0.150 (CxTxR)$	0.45	90 %	<0.05
5-HMF	$0.083 - 0.107 (C) + 0.107 (T) - 0.099 (R) - 0.114 (CxT) + 0.107 (CxR) - 0.107 (TxR) + 0.099 (CxTxR)$	1,06	96 %	<0.1
Furfural	$0.013 - 0.018 (C) + 0.018 (T) - 0.018 (R) - 0.018 (CxT) + 0.018 (TxR) - 0.018 (CxR) + 0.018 (CxTxR)$	2.77	96 %	<0.05
Acetic acid	$1.829 + 2.515 (C) + 2.515 (T) - 0.624 (R) + 2.515 (CxT) - 0.624 (TxR) - 0.624 (CxR) - 0.624 (CxTxR)$	3.10	85 %	<0.05

T - temperature, C - acid concentration, R - bagasse / diluted acid ratio and 5-HMF - 5-hydroxymethylfurfural

Table 3: Comparison of predicted values by the regression models of the experimental data

	Cellobiose + Glucose	Xylose	Arabinose
Response Predicted by the model	5.44	18.11	4.51
Experimental best condition validation (exp. 1)*	5.70*	17.97*	4.10*
Diference	4.56	0.78	10.00

* Results are means of triplicate assays %

Figure 1: Response surface for the concentration (cellobiose, xylose, acetic acid and furfural) fixing the bagasse / diluted acid ratio in the upper level -1 (1:12)

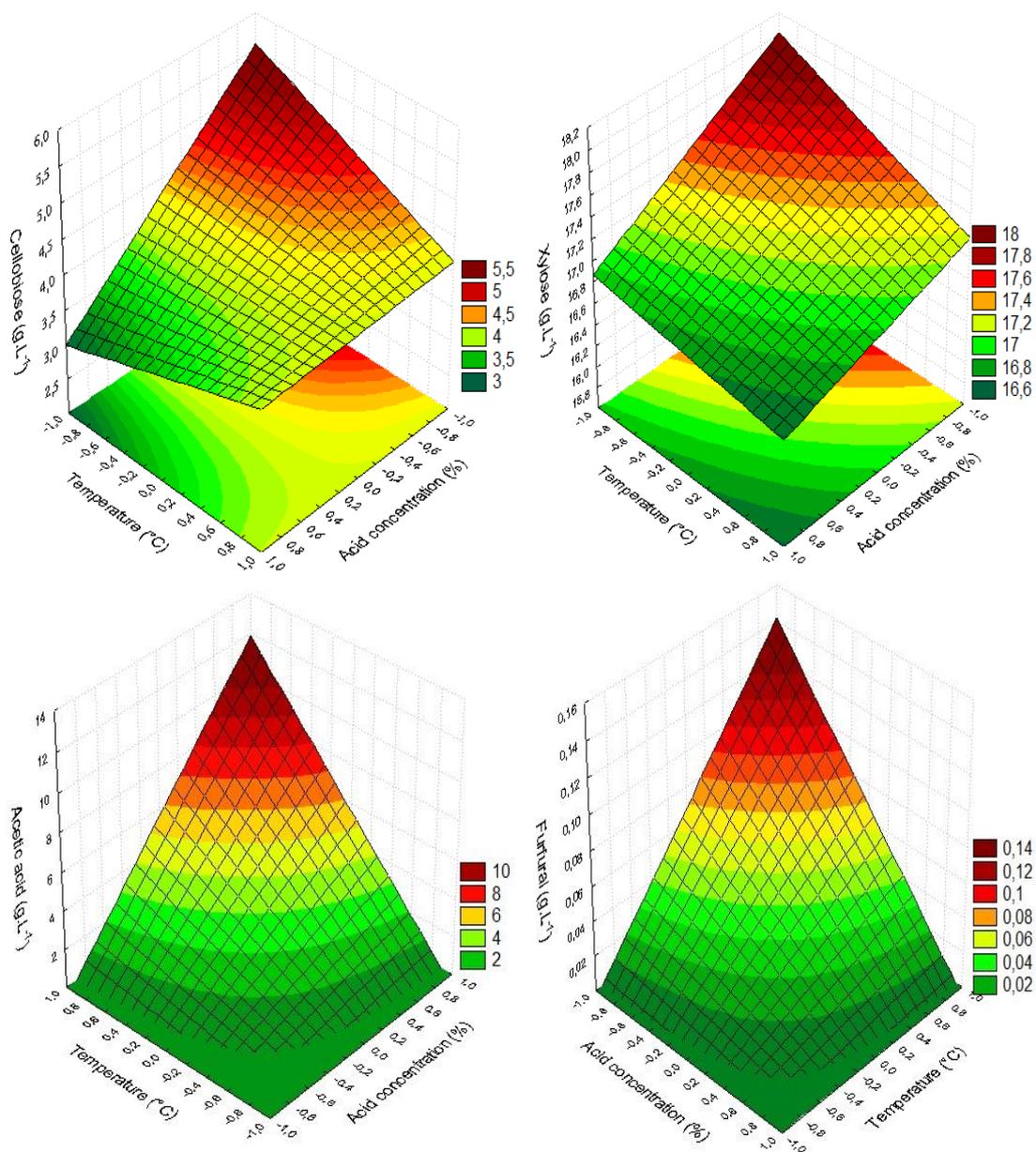


Figure 2: Thermal characterization TG / DTG curves of sisal bagasse before treatment (A) and prehydrolysis residue (B) after treatment

