



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

HELLOCKSTON GOMES DE BRITO

**OBTENÇÃO DA ENZIMA XILOSE REDUTASE A PARTIR DO BAGAÇO DE
ABACAXI (*ANANAS COMOSUS* L. MERRIL)**

JOÃO PESSOA – PB

2020

HELLOCKSTON GOMES DE BRITO

OBTENÇÃO DA ENZIMA XILOSE REDUTASE A PARTIR DO BAGAÇO DE
ABACAXI (*ANANAS COMOSUS* L. MERRIL)

Trabalho final de curso submetido à Universidade Federal da Paraíba (UFPB) como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva.

JOÃO PESSOA – PB

2020

**Catálogo na publicação Seção de
Catálogo e Classificação**

B862o Brito, Hellockston Gomes de.

Obtenção da enzima xilose redutase a partir do bagaço
de abacaxi (Ananas Comosus L. Merrill) / Hellockston
Gomes de Brito. - João Pessoa, 2020.
40 f.

Orientação: Flávio Luiz Da Silva.
Monografia (Graduação) - UFPB/CT.

1. Abacaxi. 2. Hidrólise. 3. Candida Tropicalis. 4.
Xilose Redutase. I. Da Silva, Flávio Luiz. II. Título.

UFPB/BC

HELLOCKSTON GOMES DE BRITO

**OBTENÇÃO DA ENZIMA XILOSE REDUTASE A PARTIR DO BAGAÇO DE
ABACAXI (ANANAS COMOSUS L. MERRIL)**

Relatório final de curso, apresentado a
Universidade Federal da Paraíba, como parte
das exigências para a obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Química.

Aprovado em 04 de agosto de 2020.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva
Orientador



Doutorando Leanderson Túlio Marques Lemos
Membro da banca



Mestranda Maria Helena Juvito da Costa
Membro da banca

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais João Bosco e Maria Aparecida, e aos meus irmãos Ruan Bosco e Israel Gomes, que sempre estiveram ao meu lado, me dando muito amor e conforto, me ajudando de diversas formas seja nos bons ou maus momentos.

A minha amada Milena Coutinho, pelos puxões de orelha e incentivos, por me dá forças para sempre ficar de pé, e a todo seu companheirismo e amizade me tornando alguém melhor.

Ao professor Flávio Honorato, por ter me acolhido como orientando mostrando seu apoio e por toda paciência nesses meses de trabalho.

Aos membros da banca Flávio Honorato, Leanderson Túlio e Helena Juvito pela avaliação e correção do trabalho.

A Leanderson Túlio, por todas valiosas contribuições e conselhos, que ajudaram a elaborar este trabalho, me auxiliando inúmeras vezes desde o começo, além de toda amizade.

As amizades que fiz no curso, que fizeram parte desta jornada comigo, Fernando Moraes, Jefferson Veríssimo, Rodolpho Lins, Camila Mesquita, Rodrigo Marinho, Ruan Dionizio, Tássio Max.

Aos colegas do laboratório de bioengenharia, um especial a Débora Jamila e ao pessoal dos outros laboratórios que me ajudaram a obter as análises, mesmo distantes.

As amizades que fiz no decorrer destes anos, Albert Moreira, Alef Assis, Andeson Oliveira, Fernando Frazão (meu colega de quarto que me ajudou diversas vezes), Leonam Pontes, compartilhando vários momentos preciosos que levarei para toda vida, e aos mais antigos Diego Vilar, Robson Vale e Ulisses Monteiro.

Certamente estes parágrafos não irão atender a todas as pessoas que fizeram parte dessa importante fase de minha vida. Portanto, desde já peço desculpas àquelas que não estão presentes entre essas palavras, mas podem estar certas de que fazem parte do meu pensamento e gratidão. Como a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho e para meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

O abacaxi (*Ananas Comosus* L. Merrill) apresenta grande influência no mercado nacional devido a sua grande demanda. Esse fator torna o Brasil um dos principais produtores mundiais desse fruto. Devido a sua alta atividade industrial, uma grande quantidade de bagaço é gerada. Os constituintes do bagaço são ricos em lignina, celulose e hemicelulose. O teor de hemicelulose é um destaque dessa biomassa. Formado principalmente por xilanas, a hidrólise ácida desse material permite ótima conversão desse resíduo em licor rico em xilose. Uma forte aplicação dessa xilose obtida é sua conversão em xilitol. A conversão se dá principalmente pela ação da enzima xilose redutase com a participação das coenzimas NADPH ou NADH, presentes no metabolismo das leveduras. Dentre às leveduras identificadas como produtoras da xilose redutase, destacam-se as do gênero *Candida* pela maior eficiência de conversão. Portanto, o presente trabalho tem por objetivo utilizar da pesquisa bibliográfica na tomada de decisão para o estudo do processo do rompimento celular adotado a fim de promover a extração da enzima xilose redutase (XR), utilizando a *Candida Tropicalis* como levedura do processo. Este estudo detém grande importância, uma vez que, a obtenção da XR a partir do bagaço de abacaxi é um tema pouco explorado na comunidade científica, podendo gerar grandes ganhos nos processos industriais.

Palavras-Chave: Bagaço de abacaxi. Hidrólise. *Candida Tropicalis*. Xilose Redutase.

ABSTRACT

Pineapple (*Ananas Comosus* L. Merrill) has a great influence on the national market due to its high demand. This factor makes Brazil one of the main world producers of this fruit. Due to its high industrial activity, a large amount of bagasse is generated. The constituents of bagasse are rich in lignin, cellulose and hemicellulose. The hemicellulose content is a highlight of this biomass. Formed mainly by xylans, the acid hydrolysis of this material allows an optimal conversion of this residue into xylose-rich liquor. A strong application of this obtained xylose is its conversion into xylitol. The conversion takes place mainly by the action of the enzyme xylose reductase with the participation of the coenzymes NADPH or NADH, present in the metabolism of yeasts. Among the yeasts identified as producing xylose reductase, those of the genus *Candida* stand out for their greater conversion efficiency. Therefore, the present work aims to use bibliographic research in decision making to study the cell disruption process adopted in order to promote the extraction of the enzyme xylose reductase (XR), using *Candida Tropicalis* as the process yeast. This study is of great importance, since obtaining XR from pineapple bagasse is a topic little explored in the scientific community and can generate great gains in industrial processes.

Keywords: Pineapple pomace. Hydrolysis. *Candida Tropicalis*. Xylose Reductase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação da estrutura lignocelulosica.....	12
Figura 2 - Região cristalina e amorfa da celulose.....	13
Figura 3 - Micrografia eletrônica de varredura pseudo-colorida da <i>Candida tropicalis</i>	21
Figura 4 – a) Material junto do ácido antes da autoclave; b) Solução pós-autoclave e c) solução após a filtração.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição físico-química do abacaxi

11

SÚMARIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	11
3.1 ABACAXI.....	11
3.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	12
3.2.1 Celulose.....	13
3.2.2 Hemicelulose.....	14
3.2.3 Lignina.....	14
3.3 HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	15
3.3.1 Pré-Tratamento e Hidrólise Ácida.....	15
3.3.2 Pré-tratamento Alcalino.....	17
3.3.3 Hidrólise Enzimática.....	17
3.4 FERMENTAÇÃO.....	19
3.4.1 Leveduras.....	20
3.4.2 Cultivo submerso.....	21
3.5 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA.....	22
3.6 XILOSE REDUTASE.....	23
4 PROCEDIMENTO METODOLÓGICO.....	25
4.1 COLETA E TRATAMENTO DO RESÍDUO.....	25
4.2 HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE ABACAXI.....	25
4.3 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA.....	26
4.3.1 Cultivo da Levedura.....	26
4.3.2 Preparação do Inóculo.....	26
4.3.3 Rompimento Celular.....	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1 HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE ABACAXI.....	28
5.2 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA.....	29
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
7 REFERÊNCIAS.....	31

1 INTRODUÇÃO

O abacaxi (*Ananas Comosus* L. Merrill) tem grande influência no mercado nacional, permanecendo presente durante todo o ano, isto se deve a sua grande demanda, uma vez que este é um dos frutos tropicais mais populares do mundo, tendo o Brasil, como um dos seus principais produtores (RAMALHO *et al.*, 2009; ROGÉRIO *et al.*, 2007).

Como consequência dessa demanda é crescente a geração de resíduos a partir do abacaxi processado. O bagaço é formado principalmente pela coroa, casca, extremidades e cilindro central do fruto. De acordo com Botelho *et al.* (2002), o bagaço do abacaxi, é rico em lignina, celulose e hemicelulose.

As xilanas compõem a porção mais representativa das hemiceluloses. Na hidrólise deste material, vem sendo cada vez mais empregado o uso de ácido sulfúrico diluído, por favorecer a hidrólise da celulose sob temperaturas elevadas e maior conversão de xilanas em xilose em condições mais brandas (SUN e CHENG, 2005).

A enzima xilose redutase, presente no metabolismo das leveduras, é o principal catalisador na redução da xilose a xilitol, que é uma substância adoçante com alto valor agregado e apresenta diversas aplicações alimentícias, farmacêuticas e odontológicas. Dentre às leveduras, várias espécies foram identificadas como produtoras de xilose redutase e xilitol, destacando-se as do gênero *Candida* pela maior eficiência de conversão (LIMA, 2002).

Devido a suas características, o bagaço de abacaxi pode ser aproveitado na elaboração de um licor rico em xilose que tem potencial utilização na cadeia produtiva da enzima xilose redutase por meio de processo biotecnológico. Há um leque de aplicações da enzima xilose redutase, de forma geral, são usadas produção biológica de xilitol, etanol e sorbitol através da xilose, enriquecendo o interesse na mesma (RAFIQUL *et al.*, 2015).

Nesse contexto, o presente trabalho tem por objetivo, elaborar um trabalho teórico fundamentado quanto à obtenção da enzima xilose redutase através do cultivo com a levedura *Candida tropicalis* e hidrolisado hemicelulósico do bagaço de abacaxi.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Elaborar um estudo teórico fundamentado quanto à obtenção da enzima xilose redutase utilizando a levedura *Candida tropicalis* como agente a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de abacaxi (*Ananas Comosus* L. Merrill).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a hidrólise nas condições mais favoráveis de temperatura, tempo e concentração ácido/sólido (bagaço), com base na literatura.
- Efetuar a fermentação em meio submerso, usando o licor hidrolisado de bagaço de abacaxi como substrato e a *Candida Tropicalis* como agente de fermentação.
- Extrair a solução de extrato enzimático de xilose redutase através de rompimento celular mecânico.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ABACAXI

O abacaxi (*Ananas Comosus* L. Merrill) é um dos frutos tropicais mais populares do mundo, tendo o Brasil, como um dos seus principais produtores (ROGÉRIO *et al.*, 2007). Segundo dados do IBGE (2018), entre os estados brasileiros, a Paraíba vem se destacando como grande produtor desse fruto, tornando este o principal produto agrícola do estado. A área plantada no estado corresponde a 15,2 % da nacional, obtendo uma produção de 334,9 milhões de frutos e um rendimento médio de 30.689 frutos/ha.

As características dos constituintes químicos do abacaxi mudam de acordo com a época do ano em que é produzido, as propriedades como o sabor, nível de açúcar, acidez e o aroma associado aos compostos voláteis do abacaxi, além do próprio bagaço são alteradas com as mudanças climáticas impostas pelas estações do ano (CARVALHO e BOTREL, 1996).

Entende-se por bagaço, todos os resíduos do abacaxi processado. As cascas e o cilindro central do abacaxi correspondem a 38% do peso do fruto (SARZI, 2002). Onde Botelho *et al.* (2002), caracterizou as fibras da casca e do cilindro central do abacaxi, e observou que estas, são ricas em lignina, celulose e hemicelulose, assentando à casca 1,1; 2,7 e 4,2 % e no cilindro central 0,7; 1,0 e 1,1 %, respectivamente, abaixo (Tabela 1) está disposta a composição físico-química do fruto. Logo se tem a hemicelulose como um dos principais componentes do abacaxi, além de representar cerca de 20 a 35% da biomassa lignocelulósica (MCMILLAN, 1994).

Tabela 1 – Composição físico-química do abacaxi.

Componentes	Percentual (%)
Matéria seca	84,67
Fibra detergente neutro	71,39
Fibra detergente ácido	30,74
Proteína bruta	8,35
Celulose	25,91
Hemicelulose	40,65
Lignina	5,29

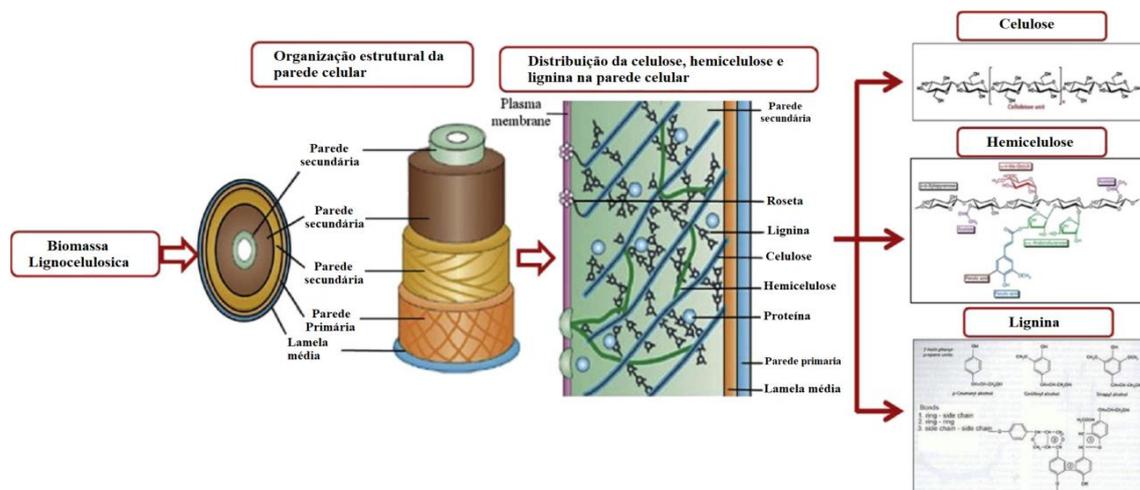
Fonte: LOUSADA JR (2006)

3.2 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A biomassa lignocelulósica é um recurso renovável disponível em materiais orgânicos, representa aproximadamente 60% da biomassa vegetal (resíduos agroindustriais, florestais e urbanos), apresenta alta rentabilidade e tem sido vista como promissora fonte para produzir biocombustíveis e produtos químicos (TAHERZADEH e KARIMI, 2007). Estes podem ser divididos em seis grupos principais: resíduos de colheitas, madeira de lei, madeira conífera, resíduos celulósicos, biomassa herbáceos e resíduos sólidos municipais (CARDONA *et al.*, 2010).

Os materiais lignocelulósicos são polímeros de carboidratos complexos, compostos basicamente por: celulose ($(C_6H_{10}O_5)_n$), hemicelulose ($(C_5H_8O_4)_n$) e lignina ($(C_9H_{10}O_3(OCH_3))_n$). Estes componentes representam cerca de 90% da massa seca do material. Os 10% restantes consiste em extrativos e cinzas. A composição e estrutura química destes materiais dependem da sua origem, fatores genéticos e influências ambientais (BALAT, 2010).

Figura 1 – Representação da estrutura lignocelulósica



Fonte: MENON e RAO (2012) (Adaptado)

Internamente, as fibrilas da fração celulósica (Figura 1), encontram-se dispostas como espirais, conferindo força e flexibilidade ao material. Esta fração encontra-se envolvida pela lignina, formada por ligações éter biologicamente estáveis, cuja função é aumentar a resistência da estrutura a ataques químicos e enzimáticos. A terceira e última fração principal é a hemicelulose, que atua como um elo químico entre a celulose e a lignina (CASTRO e PEREIRA JR, 2010).

Podem ser usados como matéria-prima na produção de alimentos, combustíveis, polímeros iônicos, hidrogéis para liberação gradativa de drogas, enzimas e bens de consumo diversos (KADAM, 2000).

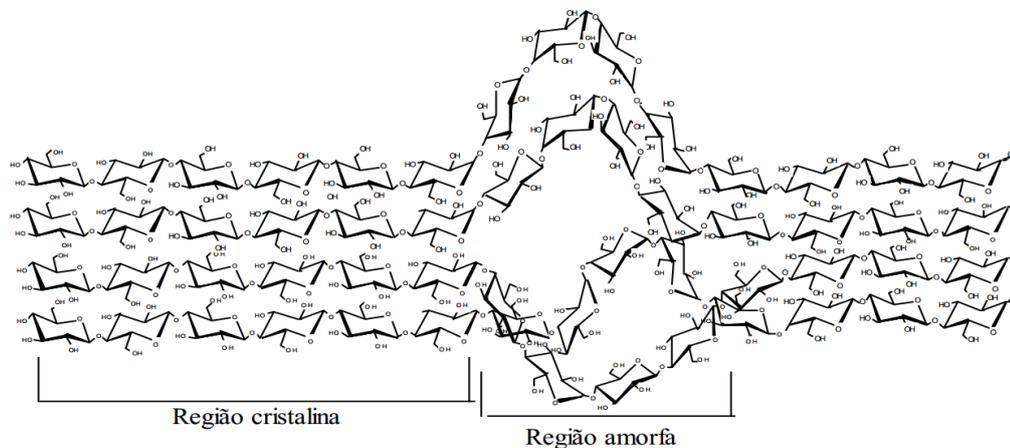
Antes de qualquer tratamento termoquímico, a secagem é uma das primeiras etapas do processamento dos resíduos lignocelulósicos. Responsável por reduzir a atividade da água, com consequente diminuição da velocidade de reações de deterioração do material, crescimento microbiano, processos químicos de escurecimento por oxidação e atividade enzimática (PESSOA JR e KLIKIKIAN, 2005).

3.2.1 Celulose

Segundo Sarkar *et al.* (2012), o principal componente dos materiais lignocelulósicos é a celulose, um polissacarídeo linear de estrutura majoritariamente cristalina unido por unidades repetidas de glicose β -1, 4. As cadeias de celulose são empacotadas em microfibrilas, estabilizadas e ligadas entre si por pontes de hidrogênio intra e intermoleculares (BRODEUR *et al.*, 2011).

Apesar da molécula de celulose ser hidrofílica, é difícil que a água penetre no interior da celulose cristalina à temperatura ambiente. As regiões de celulose cristalina mais compacta e de difícil degradação enzimática são separadas por regiões de menor organização, denominadas amorfas. As regiões de celulose amorfa apresentam menor resistência aos ataques químicos e biológicos e são, portanto, pontos de degradação (FAN *et al.*, 1980) (Figura 2).

Figura 2 - Região cristalina e amorfa da celulose



Fonte: DILLON (2004)

A solubilidade da celulose está diretamente relacionada ao nível de hidrólise alcançado, logo, fatores que afetam sua taxa de hidrólise, também afetam sua solubilidade. Mas à temperaturas altas, ela se torna solúvel, uma vez que as ligações de hidrogênio tornam-se suscetíveis a quebra, devido à energia fornecida. A celulose não derrete com a temperatura, mas sua decomposição começa a 180°C (THERMOWOOD, 2003).

A partir da celulose, pode-se obter nanocristais, utilizáveis no preparo de compósitos, como plásticos, filmes, membranas, géis e implantes médicos (HUBBE *et al.*, 2008; BLAKER *et al.*, 2009).

3.2.2 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolímero curto e muito ramificado formado principalmente por pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-glicose, D-manose, D-galactose) e ácido glucurônico e manurônico (SARKAR *et al.*, 2012).

A xilana é seu componente mais abundante e se constitui em heteropolissacarídeo formado por unidades de β -D-xilopiranosose unidas por ligações do tipo β -1,4 e, ocasionalmente, por ligações do tipo β -1,3. Todos os monômeros da hemicelulose são unidos por ligações facilmente hidrolisáveis (PÉREZ *et al.*, 2002).

A falta de estrutura cristalina, principalmente devido à estrutura altamente ramificada, e a presença de grupos acetila conectados à cadeia polimérica são aspectos importantes da estrutura e composição da hemicelulose. A partir da hemicelulose é possível obter, gomas vegetais para a produção de espessantes, adesivos, emulsificantes, estabilizantes e outros produtos químicos, como precursores de polímeros, (KAMM e KAMM, 2004).

3.2.3 Lignina

A lignina é um polímero amorfo, de elevada massa molecular, formada principalmente por três estruturas fenólicas interligadas: o álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e o álcool sinapílico. Esses álcoois são produzidos através de um processo biossintético e formam uma camada protetora para as paredes das plantas (DELMER, 1995).

As características mais relevantes da lignina são a rigidez da parede celular da planta, a tensão oxidativa e a resistência contra ataques microbianos, devido a sua natureza hidrofóbica (BRODEUR *et al.*, 2011).

Estudos de degradação da lignina são de extrema importância, pois encontram-se associados à celulose e à hemicelulose nos vegetais, dificultando o aproveitamento destes

carboidratos. Pela sua estrutura molecular complexa, a lignina associa-se covalentemente à hemicelulose e previne o acesso de agentes hidrolíticos à celulose (PÉREZ *et al.*, 2002).

De acordo com Harmsen *et al.* (2010), a lignina na madeira se comporta como uma rede tridimensional insolúvel atuando como aglutinante entre as células desempenhando um papel importante na sua resistência e desenvolvimento, por afetar o transporte de água, nutrientes e metabólitos na célula vegetal, criando um material composto que possui uma notável resistência ao impacto, à compressão e à flexão. A partir da lignina podem-se produzir compostos aromáticos leves e combustível sólido sem enxofre (KAMM e KAMM, 2004).

3.3 HIDRÓLISE DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A lignina age como um escudo ao redor da celulose e hemicelulose protegendo-os contra a degradação enzimática, o que impede suas conversões em açúcares fermentáveis. Assim, a aplicação de um pré-tratamento é necessária para a remoção da lignina, diminuição da cristalinidade da celulose e o aumento da área de superfície e porosidade, facilitando a ação enzimática na hidrólise (CANILHA *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2010).

Existem várias técnicas de pré-tratamento, incluindo o pré-tratamento físico, químico, físico-químico e biológico. Mas, independentemente do método utilizado, alguns compostos inibitórios podem ser produzidos durante o processo, os quais desfavorecem a atividade microbiana na etapa de hidrólise. Os inibidores são classificados em três grupos principais: ácidos fracos (levulínico, acético e fórmico), derivados de furano (HMF (5-hidroxi-2-metil furfural) e furfural) e compostos fenólicos (PALMQVIST e HAHNHAGERDAL, 2000).

3.3.1 Pré-Tratamento e Hidrólise Ácida

A hidrólise ácida é um dos métodos mais estudados e promissores entre os pré-tratamentos químicos, e tem como principal objetivo hidrolisar a fração hemicelulósica (em principal as xilanas) presente nas lignoceluloses e tornar a celulose mais suscetível às enzimas (AGUILAR *et al.*, 2002). Ácidos tais como sulfúrico (H_2SO_4), clorídrico (HCl), nítrico (HNO_3) e fosfórico (H_3PO_4) são comumente empregados neste processo, sendo o ácido sulfúrico diluído o mais aplicado (ZHANG, 2012).

O pré-tratamento com ácido depende basicamente de parâmetros como tipo de ácido, concentração, razão sólido (biomassa) / líquido (ácido), temperatura e tempo. Os ácidos utilizados como catalisadores nos processos de hidrólise liberam prótons que atuam nas ligações glicosídicas entre os monômeros de açúcar nas cadeias poliméricas. O rompimento

destas ligações libera uma série de compostos, principalmente açúcares como xilose, glicose e arabinose (AGUILAR *et al.*, 2002).

A hidrólise da hemicelulose fornece uma conversão em xilose entre 75% a 90%, e em menores quantidades, açúcares como glicose e arabinose (HUANG, 2009). Nas altas temperaturas e pressões frequentemente usadas nos processos industriais, a glicose e a xilose se degradam em subprodutos como furfural e hidroximetil furfural, além outros compostos como o ácido fórmico, acético e levulínico que podem gerar problemas, por serem agentes inibitórios dos processos fermentativos (PALMQVIST e HAHNHAGERDAL, 2000).

Compostos fenólicos também são formados durante o pré-tratamento a partir da decomposição parcial da lignina (KOOTSTRA, 2009). Por isso, encontrar as condições ideais do processo é extremamente importante para reduzir a formação de produtos inibitórios na etapa de fermentação.

Vários estudos apontam altos rendimentos nos materiais tratados com H₂SO₄ (menos de 4% mol / L), implicando alta velocidade de reação e significativa melhora na hidrólise enzimática da biomassa lignocelulósica para liberar açúcares fermentáveis, além de oferecer alta atividade catabólica e rentabilidade (ESTEGHLALIAN *et al.*, 1997).

O processo com ácido diluído utiliza altas pressões e temperaturas, com baixos tempos de reação, contribuindo para o uso de processos contínuos. Nesse processo, a produção de xilose a partir da hemicelulose é mais adequada em condições brandas (até 120 °C), pois produz menor quantidade de inibidores. Isto se dá pelo fato de a estrutura cristalina da celulose só ser afetada significativamente em condições mais severas (GONÇALVES FILHO, 2011).

Quanto à hidrólise com ácido concentrado, precisa-se de condições mais amenas e demandam tempos mais prolongados que as com ácido diluído. Embora apresente resultados com rendimento de açúcares de 97,3%, oferece desvantagens em relação aos diluídos como a necessidade da recuperação de ácido, toxicidade e manutenção especial contra materiais corrosivos, gerando mais custos ao processo (SARROUH, 2005).

Os estudos de Lavarack *et al.* (2002) com o bagaço de abacaxi, demonstraram que o ácido clorídrico é menos eficiente na sua degradação para produção de açúcares quando comparado com o ácido sulfúrico.

Aplicando o ácido sulfúrico concentrado a 70% na hidrólise do bagaço Sarrouh *et al.* (2007) alcançaram 88% de rendimento no tratamento realizado por 60 minutos a 50°C para uma relação de teor de sólidos: solução ácida de 0,02 g / g. Também investigaram uma rota

alternativa, seguida de duas etapas: a primeira com ácido sulfúrico 70% e a 50°C e a segunda com uma solução um pouco mais diluída do mesmo ácido (30 - 40%) a 80°C alcançando rendimentos de até 97,5%. Porém, os autores ressaltaram que o aumento dos custos associados a essa rota alternativa tornaram-na economicamente inviável.

3.3.2 Pré-tratamento Alcalino

O pré-tratamento alcalino é conhecido por degradar menos o açúcar do que o pré-tratamento ácido (KUMAR *et al.*, 2009), além de ser realizado em condições ambientais com temperaturas e pressões mais baixas do que outros métodos de pré-tratamento, o que leva a tempos na ordem de horas ou dias (MCMILLAN, 1994).

O principal efeito do pré-tratamento alcalino sobre a biomassa é a solubilização da lignina, o que aumenta a eficácia da enzima, eliminando os locais de adsorção não produtivos e tornando a hemicelulose e a celulose mais acessíveis a processos de hidrólise posteriores.

O pré-tratamento alcalino emprega vários compostos, como hidróxidos de sódio, cálcio, potássio, amônio, amônia aquosa e peróxido de hidrogênio, estes são os agentes alcalinos mais adequados para o pré-tratamento, sendo o hidróxido de sódio o mais estudado e o hidróxido de cálcio o mais efetivo e rentável entre eles (WILLIAM e HOLTZAPPLE, 2000).

A amônia também tem sido testada para vários resíduos, sendo altamente seletiva na remoção da lignina e abertura do material lignocelulósico, com a vantagem de ser facilmente recuperada devido à sua alta volatilidade (KO *et al.*, 2009).

Os agentes alcalinos causam a degradação das cadeias laterais de éster e glicosídicas o que altera a estrutura da lignina de modo a promover um inchaço nas fibras, descristalização e solvatação parcial da celulose e hemicelulose aumentando assim a porosidade da biomassa (SILLS e GOSSETT, 2011).

A principal desvantagem de se utilizar pré-tratamento alcalino está na desacetilação da hemicelulose, gerando ácido acético em solução, sendo necessária uma etapa de neutralização para remover a lignina e os inibidores (sais, ácidos fenólicos, furfural e aldeídos) antes da hidrólise enzimática.

3.3.3 Hidrólise Enzimática

As primeiras tentativas de se utilizar enzimas para hidrólise de materiais lignocelulósicos se deram no início da década de 1970, no Japão. Em decorrência dessa

tecnologia, logo surgiram processos de sacarificação e fermentação simultânea (RODRIGUES *et al.*, 2016).

Os processos de hidrólise enzimática podem ser conduzidos em condições moderadas, podendo operar em pressão atmosférica e em temperaturas, em torno de 50°C. A hidrólise enzimática é um método eficaz e econômico na obtenção de açúcares fermentáveis, pois quando aplicada com um pré-tratamento prévio resulta num rendimento superior a 90% em açúcares (KUMAR *et al.*, 2009).

Comparado com a hidrólise ácida, na hidrólise enzimática há maior produção de monossacarídeos, uma vez que as enzimas celulasas catalisam somente reações de hidrólise e não reações de degradação de açúcares, não havendo formação dos produtos que decompõem os monômeros (PARISI, 1989).

A hidrólise enzimática da celulose é normalmente realizada por celulasas que a despolimeriza em monômeros de glicose. As celulasas podem ser produzidas por diversas espécies bacterianas como o *Clostridium*, *Cellulomonas* e *Bacillus* (BISARIA, 1998), no entanto as celulasas fúngicas produzidas pelos gêneros *Trichoderma* e *Penicillium* têm melhor potencial para aplicação comercial (DUFF e MURRAY, 1996).

As enzimas do complexo celulolítico são formadas por três componentes enzimáticos majoritários: as endoglucanases que agem de maneira aleatória ao longo da cadeia, quebrando ligações internas da celulose reduzindo o grau de polimerização do substrato, além de expor as microfibrilas ao ataque subsequente de outras enzimas e originar sítios de ataque para as exoglucanases; As exoglucanases que atuam como exo-enzimas atacando as extremidades reductoras e não reductoras da cadeia de celulose, com liberação de glicose diretamente do polímero e celobiose como produto principal, que devido a um impedimento estereoquímico atuam apenas sobre a celulose cristalina, produzindo uma redução lenta e gradativa do seu grau de polimerização; As β -glucosidases que agem sobre substratos solúveis e exercem a função de desemaranhar a celobiose gerada pela atuação das outras duas enzimas em glicose (FAN *et al.*, 1980; CASTRO e PEREIRA JR, 2010; BASSO, 2010).

De acordo com Fuentes (2009), o complexo enzimático se torna afetado pelas características estruturais da celulose, de modo que a ação das enzimas influencia na taxa de reação, assim como os fatores cruciais para realização da hidrólise enzimática, como: porosidade, cristalinidade das fibras de celulose, conteúdo de lignina e hemicelulose do material, além da área superficial que implica no número de sítios disponíveis, influenciando a taxa de hidrólise.

3.4 FERMENTAÇÃO

A fermentação é um processo anaeróbico alternativo utilizado por algumas espécies de microrganismos onde ocorre a quebra da glicose ou outros substratos em piruvato, sendo depois transformado em outro produto, por exemplo, o álcool etílico e lactado, definindo a fermentação alcoólica e láctica (BARBATO, 2014).

Os melhores substratos fermentáveis são os açúcares, uma vez que produzem compostos que podem ser reduzidos e eliminados para o meio externo da célula (HARVEY *et al.*, 2008). Comumente a fermentação divide-se em: fermentação submersa, com a fase aquosa abundante e a fermentação em estado sólido com fase não aquosa predominante.

As enzimas são tradicionalmente obtidas por processos de fermentação submersa. Por outro lado, o sistema de fermentação sólida tem caráter heterogêneo e a transferência de oxigênio é limitada por um filme líquido na superfície do substrato, fazendo com que sua velocidade de transferência seja maior que na submersa (LONSANE *et al.*, 1991).

Há diversos fatores que influenciam a fermentação e interferem na atividade da levedura. Entre os principais estão: a temperatura e o pH, os quais afetam a germinação dos esporos; o crescimento celular e a formação de produtos, que tendem a variar de acordo com as atividades metabólicas dos microrganismos; a aeração, que regula condições aeróbicas, elimina o dióxido de carbono formado, estabiliza a temperatura do substrato e ajusta o nível de umidade e concentração de nutrientes; e a contaminação bacteriana, que intervém na formação de produtos (ALBANO, 2012).

O tipo de substrato e o tamanho das partículas também influenciam na fermentação, em vista que partículas muito pequenas propiciam o empacotamento do meio, prejudicando o nível de aeração, transferência de calor e umidade, enquanto que partículas muito grandes podem limitar o ataque microbiano e a proporcionar a liberação de exoenzimas (ALBANO, 2012).

Dos processos de fermentação o mais usual é o alcoólico, que consiste em uma série de reações químicas catalisadas por microrganismos unicelulares denominados leveduras, que convertem açúcares como a glicose ($C_6H_{12}O_6$) em energia para a célula, produzindo metabólitos como etanol (C_2H_5OH) e dióxido de carbono, em uma proporção de 0,511 g etanol / (g glicose) (SILVA, 2007).

Este processo pode dar-se através da fermentação espontânea que é de forma natural, através das leveduras presentes na casca da fruta ou inoculação de fermento selecionado, por uma única levedura. Segundo Barbato (2014), a aplicação comercial para os produtos obtidos

através de processos fermentativos é vasta, de modo a abranger: enzimas, antibióticos, solventes orgânicos, corantes, vitaminas e aminoácidos, entre outros.

3.4.1 Leveduras

As leveduras são microrganismos unicelulares eucariotos pertencentes ao reino Fungi, sua forma varia desde elementos esféricos até células elípticas bastante alongadas, quase filamentosas. Algumas formam pseudohifas, que lhes conferem características multicelulares. Seu tamanho é bastante variável, de 1-5 µm de diâmetro a 5-30 µm de comprimento.

Esses organismos podem ser encontrados em ambientes que lhe ofereçam alguma fonte de carboidrato, e destacam-se pelo seu uso como fonte proteica, capacidade de crescimento em substratos de baixo custo e alto teor de açúcar, na fabricação de vinho e cerveja, pães e bolos, na biorremediação, na produção de etanol industrial e biodiesel e diversas enzimas, atuam como probióticos, aditivos e flavorizantes de comida (OLIVEIRA, 2015).

Possuem membrana citoplasmática lipoproteica, cuja principal função é regular as trocas com o meio ambiente, além de uma parede celular rígida, constituída basicamente de dois polissacarídeos: manana e glucana (BARBADO, 2014).

Na presença de oxigênio, a levedura tem preferência pelo ciclo respiratório, entretanto na sua ausência ou em altas concentrações de glicose, mesmo em ambientes aeróbicos, as leveduras optam pela via fermentativa (efeito Crabtree). Esta via tem como objetivo a regeneração do NAD⁺ e, para isso, direciona o piruvato à descarboxilação pela piruvato descarboxilase com a participação de tiamina formando acetaldeído e liberando CO₂. Em seguida o acetaldeído é reduzido pela desidrogenase alcoólica gerando etanol e regenerando NAD⁺ (OLIVEIRA, 2015, p. 14).

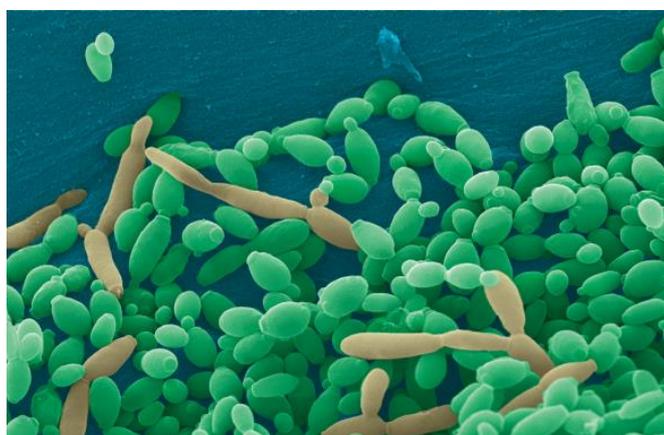
Dentre as leveduras tipicamente utilizadas no processo fermentativo, vale citar: a *Saccharomyces cerevisiae*, empregada na produção de etanol a partir de hexoses (glicose e frutose), devido a sua predominância quanto a tolerância as altas concentrações de etanol, de modo a inibir outras espécies microbianas (MORTIMER *et al.*, 1994).

A *Aspergillus niger* que produzem altos níveis de β-glicosidase e são fonte de celulase destinada ao uso alimentício; A *Trichoderma viride* produtoras de xilanases e celulases e usadas para aplicações não alimentícias (BIGELIS, 1993); As do gênero *Rhodotorula* com baixa capacidade fermentativa, capazes de sintetizar carotenoides intracelularmente, além de

outras substâncias ativas exocelularmente (SILVA, 2004); As do gênero *Candida* que destacando-se pela maior eficiência de conversão na produção de xilitol (LIMA, *et al.*, 2003).

As leveduras do gênero *Candida* são microrganismos saprófitos, capazes de modificar sua forma leveduriforme para uma fusiforme, tornando-se patogênico, uma vez que possui dependência de fatores predisponentes, (RAMOS *et al.*, 1999). Apresentam células ovaladas ou alongadas, com 3 a 7 μm de largura e 3 a 14 μm de comprimento, com micélio em forma de pseudo-hifas ou também como hifas verdadeiras (BARROS, 2005).

Figura 3 - Micrografia eletrônica de varredura pseudo-colorida da *Candida tropicalis*



Fonte: DJSRING (2013)

A levedura *Candida tropicalis* (fig. 3) é relatada em diversos estudos na produção de biossurfactantes e enzimas, obtendo ótimos resultados e altos rendimentos de biomassa, sua configuração diploide asporogênica lhe confere a capacidade de consumir diferentes substratos como, dissacarídeos, fenóis, alcanos e ácidos, além de possuir caráter termotolerante (LUNA *et al.*, 2008; JAMAI *et al.*, 2001).

3.4.2 Cultivo submerso

O processo de fermentação submersa requer menos espaço que outros métodos o que possibilita um controle melhor das variáveis do processo o que garante o sucesso da fermentação, viabiliza altas velocidades de produção, a recuperação de enzimas extracelulares e a determinação de biomassa são facilitadas, sendo realizadas por filtração simples ou centrifugação para a remoção das células (ALBANO, 2012). Sua execução pode ser conduzida em sistemas descontínuos, contínuos e descontínuos alimentado, sendo o primeiro o mais aplicado (PAPAGIANNI *et al.*, 1998).

Neste tipo de processo a agitação se torna necessária para uma boa transferência de calor e massa, onde forças mecânicas resultantes da rotação das turbinas afetam consideravelmente os fungos filamentosos, causando diferentes formas de crescimento e formação de produtos. Os estudos enzimáticos podem ser realizados a partir do sobrenadante da cultura e o crescimento microbiano é quantificado após secagem da biomassa, por gravimetria, podendo ainda ser realizado por densidade ótica no caso de cultivos com bactérias (LIMA *et al.*, 2003).

De acordo com as afirmações de Fernandes *et al.* (1996) a produção da maioria das enzimas comerciais, como também a obtenção de xilitol pela via biotecnológica, ocorrem por meio da fermentação submersa, uma vez que este método facilita o controle da fermentação, de forma a proporcionar maiores rendimentos e menores custos e riscos de contaminação.

A principal fonte de nutrientes (principalmente carbono) para esta fermentação se encontra nos materiais lignocelulósicos, encontrados, por exemplo, nos resíduos agrícolas (DA SILVA *et al.*, 1994). Na maior parte dos casos, o enriquecimento destes compostos com fonte de nitrogênio, minerais ou vitaminas é capaz de produzir elevada atividade enzimática (ELISASHVILI, 1993).

3.5 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

A extração do conteúdo intracelular no meio de cultivo requer que a célula seja modificada geneticamente ou as células devam ser decompostas liberando o conteúdo citoplasmático (GECIOVA *et al.*, 2002). No processo de separação e recuperação das enzimas intracelulares, aplicam-se métodos prévios para ruptura da parede celular, a fim de liberar a enzima em condições em que elas não percam sua atividade biológica (ÖZBEK e ÜLGEN, 2000).

Várias técnicas podem ser empregadas para promover a extração das enzimas intracelulares sem inativa-las, de modo a melhorar o rendimento e a qualidade do extrato, alguns exemplos são:sonicação, congelamento, a moagem com esferas de vidro, homogeneização em alta pressão, tratamentos químicos e enzimáticos (BORZANI *et al.*, 2005b). O custo da produção é relacionado com o tipo de excreção celular e o grau de pureza desejado (PASTORE, 2002).

Alguns métodos se destacam para a purificação de enzimas xilose redutase indicando ótimos rendimentos, como a técnica de extração líquido-líquido por micelas reversas (CORTEZ *et al.*, 2004). O procedimento explorado por Cortez *et al.* (2006), envolve a

extração da enzima por micelas reversas de CTAB (brometo de cetil trimetil amônio) em iso-octano, por um procedimento de duas etapas (extração direta e reversa). Em que, foi obtido na extração reversa um rendimento de recuperação enzimática de 100% e um fator de enriquecimento de 5,6 vezes em relação à direta, tomando como referência, um pH ótimo para a atividade da xilose redutase (XR) antes e após a extração com micelas invertidas de cerca de 6,0.

Já Branco (2010), realizou o rompimento celular por sonicação e prosseguiu com a separação da Xilose Redutase (XR) por micelas reversas usando como tensoativos BDBAC, CTAB e AOT. Neste experimento o autor obteve rendimentos superiores a 90% na fase aquosa de reextração para a XR recuperada.

Ainda há os métodos físicos utilizados para o rompimento das células em suspensão, e obtenção das enzimas intracelulares XR, como no caso da metodologia descrita por Sene (2000b), onde a suspensão celular foi rompida através de ponteira ultrassônica. Para prevenir o aquecimento da solução devido às vibrações ultrassônicas, ela foi imersa em um banho refrigerado a -10 °C. As vibrações foram programadas a uma frequência de 20 KHz, em pulso de 1 s com intervalos de 1 s durante 35 min.

Outro método físico que vem sendo cada vez mais utilizado para o rompimento de células é a ruptura mecânica por agitação com pérolas de vidro. Por este processo apresentar um custo relativamente baixo e levando a ser utilizado para a obtenção de alguns produtos em larga escala (WOODROW e QUIRK, 1982). Como retratado por Gurpilhares *et al.* (2006), ao realizar o rompimento por células de vidro, sob agitação em vórtice, em tubos cônicos de 15mL de volume útil com variação das cargas de pérolas de vidro de 0,44 a 1,10 g mL⁻¹, por um período de 10 min.

3.6 XILOSE REDUTASE

A xilose redutase (XR) é uma enzima oxido redutase intracelular, membro da superfamília aldoceto redutase de enzimas que compreendem mais de 100 proteínas diferentes (EC 1.1.1.21), geralmente encontradas em leveduras e fungos (RAFIQUL *et al.*, 2014b).

Esta enzima ocorre no citoplasma de micróbios que assimilam à xilose, mais conhecida por estar entre os açúcares mais abundantes da biomassa, despertando assim, o interesse no seu metabolismo, que por sua vez, acontece em algumas leveduras e fungos que não possuem a xilose isomerase, de modo a dar início às etapas de conversão da xilose a

xilitol pela xilose redutase (JACKSON & NICOLSON, 2002), essa reação é tida como o primeiro passo na assimilação da xilose na via glicolítica.

Nidetzky *et al.* (1996) demonstrou que a enzima segue um mecanismo biordenado com a ligação do cofator (NADPH⁺) primeiro e o substrato contendo carbonila em segundo, fazendo com que leveduras usando a xilose como fonte de carbono, sejam incapazes de crescerem sem uma forma funcional desta enzima.

O metabolismo da xilose inicia-se com seu transporte através da membrana celular, uma vez dentro da célula, a xilose é reduzida a xilitol pela enzima xilose redutase com a participação das coenzimas NADPH ou NADH (JEFFRIES, 1983).

A produção da enzima xilose redutase depende de condições de cultivo para se obter alta atividade, onde as células são cultivadas em diferentes concentrações do hidrolisado enriquecido com nutrientes, diante de variadas condições de temperatura (25, 30, 35 e 40°C), pH e aeração (SERPA, 2016).

O alto valor da xilose comercial agregado à obtenção de XR limita a produção em larga escala da enzima, bem como sua aplicação no âmbito industrial, com isso, a busca por novas fontes de matéria prima e melhores técnicas nas condições do processo tem sido cada vez mais explorada por pesquisadores, como forma de reduzir os custos na obtenção da XR (RAFIQUL e SAKINAH, 2015).

Uma proposta eficaz na redução dos custos na produção da enzima é a utilização de hidrolisado lignocelulósico como uma fonte de carbono para a preparação de XR a partir de leveduras. A fração hemicelulósica adquirida a partir do bagaço de abacaxi é uma fonte promissora de açúcares fermentáveis, além de ser facilmente hidrolisada por ácido diluído para produzir o hidrolisado hemicelulósico rico em xilose. As aplicações da enzima XR são vastas quanto a produção biológica de xilitol, etanol e sorbitol através da xilose, aumentando ainda mais o interesse na enzima (SERPA, 2016).

4 PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

Todos os ensaios dos experimentos presentes no trabalho foram realizados no laboratório de Bioengenharia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Como matéria-prima, foi utilizado o bagaço seco de abacaxi (*Ananas Comosus* L. Merrill) cedido pela INTRAFRUT – Indústria Transformadora de Frutas S.A., localizada na cidade de João Pessoa-PB.

4.1 COLETA E TRATAMENTO DO RESÍDUO

O resíduo coletado era composto da casca do fruto e a polpa prensada, sendo este o material de descarte da linha de produção da indústria citada. Para o processo de hidrólise, o bagaço de abacaxi foi previamente seco no secador de circulação de ar forçado e leito fixo (65 °C até manter peso constante), para fins de proteger o material contra degradação enzimática e oxidativa, reduzindo a atividade da água e a velocidade das reações químicas no produto, bem como o desenvolvimento de microrganismos (SANTOS *et al.*, 2010).

As etapas seguintes do trabalho envolveram a hidrólise ácida do material, seguida da preparação do inóculo para eventual rompimento celular para a extração enzimática intracelular.

4.2 HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE ABACAXI

O material (bagaço de abacaxi) foi previamente pesado em uma balança analítica. O ácido utilizado foi o ácido sulfúrico (H₂SO₄), da marca Química Moderna com 98% de pureza, que posteriormente foi diluído para a concentração molar requerida para o experimento (1% v/v), seu volume foi medido pelo uso de pipetas volumétricas. Ambos, material e ácido, foram armazenados em recipiente erlenmeyer. Suas proporções da razão sólido (peso em gramas do material) / líquido (volume em mL do ácido) foram de 1:8. O frasco com a solução foi fechado e colocado na autoclave vertical (Phoenix Lufenco: modelo AV - 50) mantido a 105°C e 1 atm, com um tempo de residência de 40 minutos.

O equipamento possui dificuldades em manter altas temperaturas com o valor constante, mesmo com averiguações realizadas em tempos de 5 a 10 minutos, gerando um erro de ±2°C. Terminado o tempo da hidrólise a autoclave foi despressurizada e a solução foi resfriada e filtrada por uma tela de filtro. Por fim, as amostras filtradas foram conservadas na geladeira e posteriormente utilizadas para preparar o inóculo.

4.3 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

4.3.1 Cultivo da Levedura

A levedura *Candida Tropicalis* foi mantida liofilizada até o momento da sua ativação. Para isso, foram utilizados 0,2mL de água destilada (H₂O) esterilizada com o auxílio de uma pipeta Pasteur, na ampola com a levedura liofilizada, em ambiente estéril. Em seguida, foi realizada uma suspensão de células deixando reidratar por aproximadamente 10 minutos (LEMOS, 2017).

Estando reidratada a levedura encontrava-se pronta para ser inoculada. O meio de cultura utilizado para o cultivo da levedura foi o Agar Sabouraud dextrose (IO 057) da 100CULT.

O material foi pesado em balança analítica, cerca de 6,5g, posto em um erlenmeyer ao qual foi adicionado 100mL de água destilada (H₂O) esterilizada, para facilitar na dissolução do material, a solução foi aquecida no micro-ondas por cerca de 40 segundos e homogeneizada com um bastão de vidro. As placas de Petri e o meio foram esterilizados na autoclave por 15 minutos a 120°C (ACUMEDIA, 2011).

O repique foi realizado em capela de fluxo laminar, previamente esterilizada com UV, para fins de evitar qualquer tipo de contaminação por outros microrganismos. O meio foi transferido para as placas e em seguida a levedura *Candida Tropicalis* foi inserida para o cultivo. As placas foram depois flambadas e lacradas com Parafilm. Após o crescimento do microrganismo (48h a temperatura ambiente), as placas foram armazenadas sob refrigeração (4 a 10°C) para preservar a levedura (SILVA, 2019).

4.3.2 Preparação do Inóculo

Para o preparo do inóculo utilizou-se as culturas de levedura cultivadas anteriormente no repique. Estas foram submetidas à suspensão em tubos contendo 3mL de água destilada (H₂O) esterilizada. Onde 1mL proveniente desta suspensão foi injetado em erlenmeyers contendo 50mL do meio de cultivo semissintético, composto por Xilose (C₅H₁₀O₅) (30g/L), extrato de farelo de arroz 20% (100mL/L), Sulfato de Amônio ((NH₄)₂SO₄) da Dinâmica com 99% de pureza (2g/L) e Cloreto de Cálcio hidratado (CaCl₂*2 H₂O) (0,1g/L) da Dinâmica (CHAUD, 2010).

Os frascos contendo o meio e inóculo foram transferidos para uma incubadora de movimento rotatório (SHAKER) para a realização do cultivo, postos a uma rotação de

200rpm e 30°C durante 24h. Posteriormente as células foram recuperadas por centrifugação (modelo: NT835) a 2000 x g por 30 minutos e lavadas com água destilada esterilizada, prosseguindo com outra centrifugação e após descartar o sobrenadante, foram aproveitadas na preparação de suspensão de células a qual foi empregada como inóculo.

Para a elaboração do meio, as soluções de Sulfato de Amônia e Cloreto de Cálcio foram tratadas separadamente nas concentrações de 250 e 50g/L, respectivamente e esterilizadas na autoclave a 120°C por 20 minutos.

A Xilose foi autoclavada a uma temperatura de 111°C por 15 minutos em uma concentração de 300g/L. Já a solução de extrato de farelo de arroz foi preparada com uma concentração de 200g/L, e após a esterilização na autoclave a 111°C por 15 minutos, foi levada a centrifugação (modelo: NT835) a 2000 x g por 15 minutos, da qual, o resíduo foi descartado e o sobrenadante utilizado para compor o meio (RODRIGUES *et al.* 2003a).

4.3.3 Rompimento Celular

Após a conclusão da fermentação, as células cultivadas foram coletadas e submetidas a centrifugação para iniciar-se o processo de rompimento celular. Em seguida, fez-se uma suspensão celular com um tampão de citrato de sódio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) 0,1 M (6,0 pH).

Para o rompimento, a solução foi posta em tubos do tipo *Falcon* de 15mL juntamente com pérolas de vidro em uma proporção de 1:1. As amostras foram colocadas em banho de gelo para serem resfriadas, e posteriormente levadas à agitação em vórtice através de ponteira ultrassônica (QSONICA SONICATORS) usando sonicação a 20 kHz (LIMA, 2012).

A agitação teve duração de 1 minuto, seguida de 30s de resfriamento em 05 ciclos consecutivos para cada amostra. Ao término dos ciclos uma centrifugação refrigerada procedeu-se às amostras, em tempos de 10 minutos e 10.000 x g, desta forma foi possível separar os fragmentos celulares. O extrato enzimático bruto (sobrenadante) obtido pelo rompimento das células foi recolhido e armazenado no congelador (cerca de -10°C) (LE MOS, 2017).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

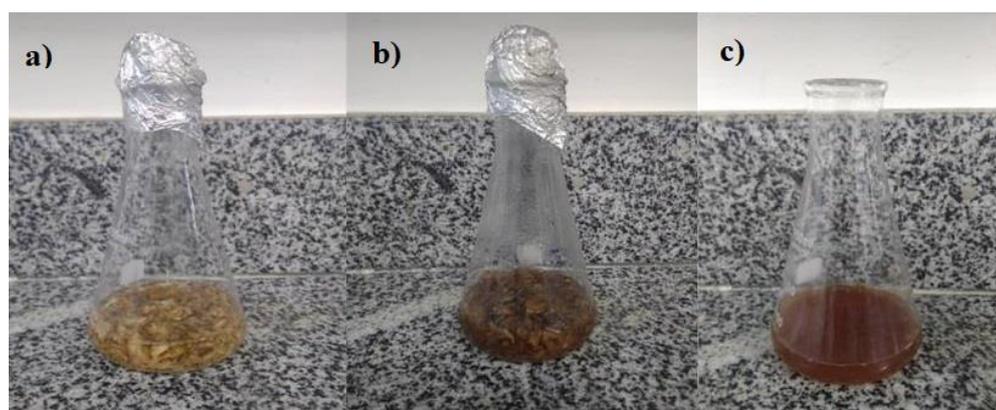
O presente trabalho teve por objetivo elaborar um estudo teórico, quanto à obtenção da enzima xilose redutase. Dessa maneira, foi abordado todo o processo, que vai desde a formação da matéria prima à extração enzimática com base do que foi encontrado na literatura. Conforme o que foi abordado na fundamentação teórica, foi desenvolvida uma metodologia para fins de analisar as condições impostas para estes processos.

Os resultados deste trabalho tem caráter qualitativo, em que será feita um discussão sobre o que foi feito no laboratório em comparação ao encontrado na literatura. De forma a descrever os tratamentos mais adequados para a obtenção da enzima. Com isso, poder evidenciar as melhores rotas e decisões que possam ser tomadas em cada etapa do processo de modo à anteder os objetivos do trabalho.

5.1 HIDRÓLISE ÁCIDA DO BAGAÇO DE ABACAXI

Os parâmetros utilizados para a etapa de hidrólise foram baseados conforme o que está disponível na literatura para a hidrólise ácida do bagaço de abacaxi utilizando o ácido sulfúrico para agir como reagente químico (ESTEGHLALIAN *et al.*, 1994; SARROUT *et al.*, 2007; SUN e CHENG, 2002; MOUTTA *et al.*, 2011). O estado do material em cada etapa da hidrolise pode ser observado na Figura 4 abaixo.

Figura 4 – a) Material junto do ácido antes da autoclave; b) Solução pós-autoclave e c) solução após a filtração



Fonte: Próprio autor

Como exposto na Figura 4, fica evidente a formação do licor da solução pós-autoclave. Este estado é devido à quebra das ligações glicosídicas da fração amorfa da celulose presente nas fibras. Chun *et al.* (1985) relata que altas temperaturas favorecem a

desidratação da xilose a furfural, por causa da sua energia de ativação, já que a energia necessária para converter a xilose corrente na fase líquida é menor do que a para romper as ligações glicosídicas entre as unidades monoméricas de xilose que compõe a hemicelulose.

As pesquisas de Liao *et al.* (2007) e Fengel e Wegener (1989), ressaltam que o aumento da concentração do ácido em conjunto com tempo de hidrólise favorece a solubilização da hemicelulose e o rendimento em xilose, em contra partida, reduz a solubilidade da lignina o que leva a formação de estruturas recalcitrantes com o resíduo sólido remanescente.

Este efeito é mais intenso associado à elevação da temperatura, graças à formação de compostos inibidores, amplificando as velocidades das reações de despolimerização de hemicelulose e lignina, ocasionando da ruptura das ligações dos radicais de acetila com as cadeias de xilanas e formação do ácido acético (CHUN *et al.*, 1985). Diante destes fatores, foi realizada escolha dos níveis de temperatura, tempo de reação e concentração de ácido concomitante aos proporcionados pela literatura.

5.2 EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA

Na etapa de rompimento celular, a suspensão foi realizada com um tampão de citrato de sódio 0,1 M a um pH 6,0. Dado que um pH extremo pode causar desnaturação parcial ou inativação da enzima por alterar sua conformação nativa dessa maneira (RAFIQUL *et al.*, 2015).

Para ocorrer à separação da xilose redutase, deve-se submetê-la ao rompimento das suas células para levar a liberação delas. Há inúmeras técnicas empregadas para o rompimento celular (como as mostradas na fundamentação teórica), visando a purificação e caracterização da xilose redutase, dentre elas destaca-se o rompimento mecânico com pérolas de vidro (HO *et al.*, 1990; KUHN *et al.*, 1995; GÍRIO *et al.*, 1996).

A ruptura mecânica por agitação com pérolas de vidro tem sido um dos métodos mais comumente empregados. Por este processo apresentar um custo relativamente baixo e levando a ser utilizado cada vez mais para o rompimento de células para a obtenção de alguns produtos em larga escala (WOODROW e QUIRK, 1982). O que levou o emprego desta técnica no rompimento celular deste trabalho.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento do presente estudo possibilitou o entendimento e conhecimento do processo de extração enzimática, partindo desde a obtenção da matéria prima, de forma a abordar todas as etapas necessárias da operação de obtenção da enzima Xilose Redutase (XR). A revisão bibliográfica do presente trabalho teve total relevância para a execução do objetivo proposto, já que esta foi fundamental na construção todas as etapas do projeto, fazendo o uso das características dos compostos analisados para atribuir a eles seu devido procedimento.

O estudo detém grande importância, uma vez que, a obtenção da XR a partir do bagaço de abacaxi é um tema pouco explorado na comunidade científica, podendo gerar grandes ganhos nos processos industriais. Desse modo, as investigações de métodos que promovem o rompimento celular e extração enzimática são de grande relevância, de modo que as escolhas das condições dos parâmetros utilizados nos processos influenciam diretamente seus resultados. Uma vez que foram examinados, as técnicas de rompimento sem perder a atividade biológica do material de forma a melhorar o rendimento e qualidade do extrato, além de poder diminuir o custo com o processo, visto que, a enzima XR possui vastas aplicações no mercado, principalmente na produção biológica de xilitol, etanol e sorbitol.

7 REFERÊNCIAS

- ACUMEDIA. **Ágar sabouraud dextrose**. Abril de 2011. Disponível em: <https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7150_pt_pi.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2020.
- AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **J. Food Eng.**, Essex, v.5, n.4, p.309-318, 2002.
- ALBANO, M. **Comparação da produção de celulases e xilanases por fungos filamentosos em fermentação submersa e estado sólido**. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Convers. Mang.**, Trabzon, p. 858-875, 2010.
- BARBATO, J. **Estudo da obtenção de carotenoides por fermentação empregando a levedura *Rhodotorula* sp em melão e caldo de cana-de-açúcar como meio de cultura**. 2014. 51 f. Trabalho final de curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campo Mourão, Paraná.
- BARROS, L. M. **Ocorrência de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* em sítios subgingivais e nas mucosas da cavidade bucal: genotipagem por RAPD e atividade enzimática de aspartil proteinases e fosfolipases**. 2005. 133 f. Tese - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- BASSO, T. P. **Atividade celulolítica de fungos isolados de bagaço de cana-de-açúcar e serapilheira em comparação com cepas de *Trichoderma reesei***. 2010. 90 f. Dissertação - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- BIGELIS, R. Carbohydrases. In: NAGODAWITHANA, T., REED, G. (Ed.). **Enzyme in Food Processing**. San Diego: Academic Press, 1993. Cap. 6, p. 121-158.
- BISARIA, V. S. Bioprocessing of agro-residues to value added products. In: MARTIN, A.M. (Ed.). **Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products**. UK: 2° ed. Chapman and Hall, 1998.
- BLAKER, J. J. *et al.* Renewable nanocomposite polymer foams synthesized from pickering emulsion templates. **Green Chem.**, v. 11, n. 9, p. 1321-1326, 2009.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotechnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. 1° ed., Ed. Edgard Blücher, v. 3, São Paulo, 2005b.

- BOTELHO, L.; CONCEIÇÃO, A.; CARVALHO, V. D. Caracterização de fibras alimentares da casca e cilindro central do abacaxi *smooth cayenne*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.26, n. 2, p. 362-367, 2002.
- BRANCO, R. F. **Produção enzimática de Xilitol utilizando sistemas de coenzima com alternativa às vias química e microbiológica de obtenção**. 2010. 132 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena-SP.
- BRODEUR, G. *et al.* Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: A review. **Enzyme Res.**, Tallahassee, p. 1-17, 2011.
- CANILHA, L. *et al.* Bioconversion of sugarcane biomass into ethanol: an overview about composition, pretreatment methods, detoxification of hydrolysates, enzymatic saccharification and ethanol fermentation. **J. Biomed. Biotechnol.**, p. 1-15, 2012.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, L. C. Production of bioethanol from the sugar cane bagasse: Status and Perspectives. **Bioresour. Technol.**, Manizales, p. 4754-4760, 2010.
- CARVALHO, V. D.; BOTREL, N. Características da fruta para exportação. In: BRASIL. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Abacaxi para exportação: procedimentos de colheita e pós- colheita**. Brasília. EMBRAPA. p. 41 (Série Publicações Técnicas FRUPEX, 23), 1996.
- CASTRO, A. M.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais, **Quim. Nova**, v. 33, n. 1, p. 181-188, 2010.
- CHAUD, L. C. S. **Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol**. 2010. 92 f. Dissertação (mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena – SP.
- CHUM, H. L.; DOUGLAS, L. J.; FEINBERG, D. A. SCHROEDER, H. A. **Evaluation of pretreatments of biomass for enzymatic hydrolysis of cellulose**. NREL, p.77, 1985.
- CORTEZ, E. V. *et al.* Optimized extraction by cetyl trimethyl ammonium bromide reversed micelles of xylose reductase and xylitol dehydrogenase from *Candida Guilliermondii* homogenate. **J. Chromatogr. B.**, v. 807, n. 1, p. 47-54, 2004.
- CORTEZ, E. V. Characterization of xylose reductase extracted by CTAB-reversed micelles from *Candida guilliermondii* homogenate. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 42, n. 2, p. 251-257, 2006.
- DA SILVA, R., YIM, D. K., PARK, Y. K. Application of thermostable xylanases from *Hemicola* sp for pulp improvement. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 77, p. 109-111, 1994.
- DELMER, D. P.; AMOR, Y. **Cellulose biosynthesis**. *The Plant cell*, v. 7, p. 987-1000, 1995.

- DILLON, A. J. P. Cellulases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Eds.). **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Editora Legis Summa, 2004, p. 243-269.
- DJSRING. **Pseudo-colored scanning electron micrograph of *Candida tropicalis* YC466 displaying both yeast and pseudohyphae**. 12 June 2013. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:C_tropicalis_YC466.png>. Acesso em: 20 Jan. 2020.
- DUFF, S. J. B.; MURRAY, W.D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 55, n. 1, p. 1–33, 1996.
- ELISASHVILI, V. L. Biosynthesis and properties of cellulases and xylanases of higher Basidiomycetes. **Appl. Biotechnol. Microbiol.**, v. 29, p. 257-266, 1993.
- ESTEGHLALIAN, A.; HASHIMOTO, A. G.; FENSKE, J. J.; PENNER, M. H. Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass. **Bioresour. Technol.**, v. 59, p. 129–136, 1997.
- FAN, L. T.; LEE, Y. H.; BEARDMORE, D. H. Mechanism of the enzymatic hydrolysis of cellulose: Effects of major structural features of cellulose on enzymatic hydrolysis. **Biotechnol. Bioeng.** XXII: p. 177-199, 1980.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlim: Walter de Gruyter, 1989.
- FERNANDES, T. M. S. *et al.* Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. **Rev. Microbiol.**, v. 27, p. 15-18, 1996.
- FUENTES, L. L. G. **Determinação de dados cinéticos da deslignificação do bagaço de cana-de-açúcar e da hidrólise enzimática no pré-tratamento com hidróxido de cálcio**. 2009. 169 f. Dissertação (Mestrado em engenharia química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- GECIOVA, J.; DEAN, B.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry - A review. **Int. Dairy J.**, v. 12, p. 541-553, 2002.
- GÍRIO, F. M.; PELICA, F.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. Characterization of xylitol dehydrogenase from *Debaryomyces hansenii*. **Appl. Biochem. Biotech.**, v. 56, p. 79-87, 1996.
- GONÇALVES FILHO, C. L. **Utilização do pseudocaule de bananeira como substrato da fermentação alcoólica: Avaliação de diferentes processos de despolimerização**. 2011. 96 f. Dissertação - Universidade da Região de Joinville, SC.

- GURPILHARES, D. B.; HASMANN, F. A.; PESSOA Jr. A.; ROBERTO, I. C. Optimization of glucose-6-phosphate dehydrogenase releasing from *Candida Guilliermondii* by disruption with glass beads. **Enzyme Microb. Tech.**, v. 39, p. 591-595, 2006.
- HARMSSEN, P.; HUIJGEN, W.; BERMUDEZ, L.; BAKKER, R. **Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass**. Biosynergy 2010.
- HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. 2º ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- HO, N. W. Y. *et al.* Purification, characterization, and amino terminal sequence of xylose reductase from *Candida shehatae*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 12, p. 33-39, 1990.
- HUANG, C. F.; TING-HSIANG, L.; GIA-LUEN, G.; WEN-SONG, H. Enhanced ethanol production by fermentation of rice straw hydrolysate without detoxification using a newly adapted strain of *Pichia stipitis*. **Bioresour. Technol.**, v. 100, n. 17, p. 3914-3920, 2009.
- HUBBE, M. A.; ROJAS, O. J.; LUCIA, L. A.; SAIN, M. Cellulosic nanocomposites: a review. **Bioresour.**, v. 3, n. 3, p. 929-980, 2008.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção Agrícola, 2018**. Rio de Janeiro: IBGE. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 set. 2019.
- JACKSON, S.; NICOLSON, S. W. Xylose as a nectar sugar: from biochemistry to ecology. **Biochem. Molecular Biol.**, p. 613-620, 2002.
- JAMAI, L. *et al.* Production of ethanol from starch by free and immobilized *Candida tropicalis* in the presence of α -amylase. **Bioresour. Technol.**, v. 98, p. 34, 2001.
- JEFFRIES, T. W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. **Adv. Biochem. Eng.**, Berlin, v. 27, p. 1-32, 1983.
- KADAM, K. L.; FORREST, L. H.; JACOBSON, W. A. **Rice straw as a lignocellulosic resource**: collection, processing, transportation, and environmental aspects. Biomass and Bioenergy. v. 18, p. 369-389, 2000.
- KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Appl. Biotechnol. Microbiol.**, v. 64, n. 2, p.137-145, 2004.
- KO, J. K. *et al.* Ethanol production from rice straw using optimized aqueous-ammonia soaking pretreatment and simultaneous saccharification and fermentation processes. **Bioresour. Technol.**, v. 100, n. 19, p. 4374-4380, 2009.

- KOOTSTRA, A. M. J.; BEEFTINK, H. H.; SCOTT, E. L.; SANDERS, J. P. M. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. **Biochem. Eng. J.**, v. 46, p. 126–131, 2009.
- KUHN, A.; VAN ZYL, C.; VAN TENDER, A.; PRIOR, B. A. Purification and partial characterization of an aldo-keto reductase from *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 61, p. 1580-1585, 1995.
- KUMAR, P.; BARRET, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomassa for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Ind. Eng. Chem. Res.**, n.48, p.3713-3729, 2009.
- LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xylose, arabinose, glucose and other products. **Biomass Bioenerg.**, v. 23, n. 5, p. 367-380, 2002.
- LEMONS, L. T. M. **Produção e recuperação de xilose redutase a partir do hidrolisado do pedúnculo do cajú (*Anacardium Occidentale* L.)**. 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB.
- LI, C. *et al.* Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification. **Bioresour. Technol.**, v. 101, p. 4900–4906, 2010.
- LIAO, W. *et al.* Studing the effects of reaction conditions on components of dairy manure and cellulose accumulation using dilute acid treatment. **Bioresour. Technol.**, v. 98, p. 1992-1999, 2007.
- LIMA, L. H. A. **Efeito do ácido acético nas enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Candida Guilliermondii***. 2002. 77 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, São Paulo.
- LIMA, L. H. A.; FELIPE, M. G. A.; TORRES, A. G. T. Reclassification of *Candida guilliermondii* FTI 20037 as *Candida tropicalis* based on molecular phylogenetic analysis. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 34, nov. 2003.
- LONSANE, B. K. *et al.* Scale-up Strategies for Solid State Fermentation Systems: a review. **Process Biochem.**, v.26, p.1-15, 1991.
- LOUSADA JR, J. E. *et al.* Caracterização físico-química de subprodutos obtidos do processamento de frutas tropicais visando seu aproveitamento na alimentação animal. Centro de Ciências Agrárias - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza - CE. **Rev. Ciênc. Agron.**, v. 37, n. 1, p. 70-76, 2006.

- LUNA, J. N.; RUFINO, D. R.; SARUBBO, L. A.; TAKAKI, G. M. C. Produção de Biossurfactante em meio de baixo custo formulado com água do mar. **Exacta: engenharia de produção**. V. 6, n. 2, p 209-215, 2008.
- MCMILLAN, J. D. Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: HIMMEL, M.E.; BAKER, J.O.; OVEREND, R.P., (Eds.). **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**. Washington DC: Ed. Am. Chem. Soc., 1994. Chap. 15, p. 292-324.
- MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v.38, p.522-550, 2012.
- MORTIMER, R. K. *et al.* Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. **Yeast**, v. 10, n. 12, p. 1543-1552, 1994.
- MOUTTA, R. O. *et al.* Statistical optimization of sugarcane leaves hydrolysis into simple sugars by dilute sulfuric acid catalyzed process. **Sugar tech**. v. 14, p. 53-60, 2011.
- NIDETZKY, B.; NEUHAUSER, W.; HALTRICH, H.; KULBE, K. D. Continuous enzymatic production of xylitol with simultaneous coenzyme regeneration in a charged membrane reactor. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 52, p. 387-396, 1996.
- OLIVEIRA, C. F. **Isolamento, caracterização, identificação e seleção de ua levedura fermentadora de abacaxi (*Ananas Comosus* L.)**. Nov. 2015. 71 f. Trabalho de final de curso (Graduação em Biotecnologia Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- ÖZBEK, B.; ÜLGEN, K. Ö. The stability of enzymes after sonication. **Process Biochem.**, v. 35, p. 1037-1043, 2000.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I. Inhibition and detoxification. **Bioresour. Technol.**, v. 74, p. 17–24, 2000.
- PAPAGIANNI, M.; MATTEY, M.; KRISTIANSEN, B. Citric acid production and morphology of *Aspergillus niger* as functions of the mixing intensity in a stirred tank and a tubular loop bioreactor. **Biochem. Eng. J.**, p.197-205, 1998.
- PARISI, F. Advances in lignocellulosic hydrolysis and in the utilisation of the hydrolysates. **Adv. Biochem. Eng.**, v. 38, p. 53-87, 1989.
- PASTORE, G. M. **Processos e produção de alimentos: aplicação de enzimas**. In: Seminário Brasileiro de Biotecnologia Enzimática. Brasília, Anais. Brasília-DF, 2002.

- PÉREZ, J.; MUÑOZ-DORADO, J.; De-la-RUBIA, T.; MARTÍNEZ, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. **Int. Microbiol.**, v. 5, p. 53–63, 2002.
- PESSOA JR, A.; KLIKIKIAN, B. V. **Purificação de produtos biotecnológicos**. São Paulo: Ed. Manole, p. 440, 2005.
- RAFIQUL, I. S. M.; SAKINAH, A. M. M. Biochemical properties of xylose reductase prepared from adapted strains of *Candida tropicalis*. **Applied biochemistry and biotechnology**. Kuantan (Malásia), p. 387-399, 2014b.
- RAFIQUL, I. S. M.; SAKINAH, A. M. M.; ZULARISAM, A. W. Inhibition by toxic compounds in the hemicellulosic hydrolysates on the activity of xylose reductase from *Candida tropicalis*. **Biotechnol. lett.**, Kuantan (Malásia), p. 191-196. jan. 2015.
- RAMALHO, A. R. *et al.* **Comunicado técnico (349) - Embrapa**: Características das cultivares de abacaxizeiros cultivados no Estado de Rondônia. 1ª Ed. Porto Velho - RO, ago. 2009.
- RAMOS, I. N. C; VASCONCELOS, L. C. S; LIMA, M. G. G. C; FIGUEIREDO, R. L. Q. Candidose Bucal em pacientes HIV-positivos. **JBC**, v. 3, p. 59-61, 1999.
- RODRIGUES, C. *et al.* Materiais lignocelulósicos como matéria-prima para a obtenção de biomoléculas de valor comercial. In: RESENDE, R. R. (Ed.). **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria: fundamentos e aplicações**. São Paulo: Editora blucher, v. 4, 2016, cap. 8.
- RODRIGUES, R. C. L. B. *et al.* Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagace hemicellulosic hydrolysate using controlled vacuum evaporation process variables. **Process Biochem.**, v. 38, p. 1231-1237, 2003a.
- ROGÉRIO, M. C. P. *et al.* Valor nutritivo do resíduo da indústria processadora de abacaxi (*Ananas comosus* L.) em dietas para ovinos: Consumo, digestibilidade digestibilidade parente e balanços energético e nitrogenado. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 59, n. 3, p. 773-781, 2007.
- SANTOS, C. T.; BONOMO, R. F.; CHAVES, M. A. Cinética e modelagem da secagem de carambola (*Averrhoa carambola* L.) em secador de bandeja. **Acta Sci. Technol.**, v. 32, n. 3, p. 309-313, 2010.
- SARKAR, N. *et al.* **Bioethanol production from agricultural wastes**: Na overview. **Renewable Energy**, Índia, v. 37, p. 19-27, 2012.
- SARROUH, F. B.; JOVER, J.; GONZÁLEZ, E. A study of single-step hydrolysis of bagasse with concentrated sulphuric acid for obtaining ethanol and in a modified single step and

corresponding technical-economic analysis step and corresponding technical-economic analysis. **Ingenieria Quimica**, v. 25, n. 3, p. 34-38, 2005

SARROUH, F.; SILVA, S. S.; SANTOS, T. D. CONVERTI, A. Technical/Economical evaluation of sugarcane bagasse hydrolysis for bioethanol production. **Chem. Eng. Technol.** v. 30, n. 2, p. 270-275, 2007.

SARZI, B., DURIGAN, J. F.; ROSSI JR, O. D. Temperatura e tipo de preparo na conservação de produto minimamente processado de abacaxi 'Pérola'. **Ver. Bras. Frutic.**, v. 24, n. 2, p. 376-380, 2002.

SENE, L. **Obtenção e cinética da xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** 2000. 107 f. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, 2000b.

SERPA, J. F. **Produção da enzima xilose redutase por *Candida Tropicalis* ATCC750 usando hidrolisado hemicelulósico do bagaço de caju.** 2016. 68 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

SILLS, D. L.; GOSSETT, J. M. Assessment of commercial hemicellulases for saccharification of alkaline pretreated perennial biomass. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 1389-1398, 2011.

SILVA, J. S. (Ed.). **Produção de álcool combustível na fazenda e em sistema cooperativo.** Viçosa-MG, p. 1-166. 2007.

SILVA, M. C. **Alterações na biossíntese de carotenóides em leveduras induzidas por agentes químicos.** 2004. 105 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas.

SILVA, R. K. P. **Produção de lipase por *Candida Tropicalis* URM 7057 utilizando biorreator tanque agitado.** 2019. 109 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE.

SUN, Y.; CHENG, J. J. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. **Bioresour. Technol.**, v. 96, p. 1599-1606, 2005.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresour.**, v. 2, n. 3, p. 472-499, 2007.

THERMOWOOD® HANDBOOK. Helsinki, Finland, **International Thermowood Association**. 2003.

WILLIAM, E. K.; HOLTZAPPLE, M. T. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. **Biomass Bioenerg.**, v. 18, p.189-199, 2000.

WOODROW, J. R.; QUIRK, A. V. Evaluation of the potential of a bead Mill for the release of intracellular bacterial enzymes. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 4, p. 385-389, 1982.

ZHANG, D.; ONG, Y. L.; LI, Z.; WU, J. C. Optimization of dilute acid-catalyzed hydrolysis of oil palm empty fruit bunch for high yield production of xylose. **Chem. Eng. J.**, n. 181-182, p. 636-642, 2012.