



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

LORENA LUCENA DE MEDEIROS

**AMPLIAÇÃO DE ESCALA EXPERIMENTAL DA PRODUÇÃO
BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL A PARTIR DO HIDROLISADO DO
PEDÚNCULO DO CAJU**

João Pessoa
2015

LORENA LUCENA DE MEDEIROS

**AMPLIAÇÃO DE ESCALA EXPERIMENTAL DA PRODUÇÃO
BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL A PARTIR DO HIDROLISADO DO
PEDÚNCULO DO CAJU**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito necessário para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva

Co-orientador (a): Prof^a. Dr^a. Sharline Florentino de Melo Santos

João Pessoa
2015

M488a Medeiros, Lorena Lucena de.

Ampliação de escala experimental da produção biotecnológica de xilitol a partir do hidrolisado do pedúnculo do caju / Lorena Lucena de Medeiros.- João Pessoa, 2015.

100f. : il.

Orientador: Flávio Luiz Honorato da Silva

Coorientadora: Sharline Florentino de Melo Santos

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT

1. Tecnologia de alimentos. 2. Xilitol. 3. Xilose. 4. Candida guilliermondii. 5. Biproductos. 6. Planejamento experimental.

LORENA LUCENA DE MEDEIROS

**AMPLIAÇÃO DE ESCALA EXPERIMENTAL DA PRODUÇÃO
BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL A PARTIR DO HIDROLISADO DO
PEDÚNCULO DO CAJU**

Dissertação _____ em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

**Prof^a. Dr^a. Sharline Florentino de Melo Santos
DEQ/CT/UFPB
-Co-orientador-**

**Prof^a. Dr^a. Marta Maria da Conceição
DTA/CTDR/UFPB
-Examinador Interno-**

**Prof^a. Dr^a. Lúbia de Sousa Conrado
DEQ/CCT/UFCG
- Examinador Externo-**

**Prof^a. Dr^a. Flávia Cristina dos Santos Lima
IFPE-PE
-Examinador Externo-**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente 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, carinho e compreensão indispensáveis nessa trajetória.

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

Aos Professores Flávio Luiz Honorato da Silva e Sharline Florentino de Melo Santos, pela orientação, paciência, amizade e pelos conhecimentos transmitidos. Agradeço especialmente à dedicação, o incentivo, a disponibilidade, compreensão e o apoio incondicional ao longo desses dois anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 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.

À Coordenadora do PPGCTA professora Marta Suely Madruga pelo apoio, confiança e pelas experiências transmitidas.

Às professoras Líbia de Sousa Conrado Oliveira e Ana Maria Souto Maior pelas experiências compartilhadas, contribuição e disponibilidade de laboratórios indispensáveis para realização deste trabalho.

Aos Professores Marta Maria da Conceição, Flávia Cristina e Marcelo Muniz pela contribuição e conhecimentos compartilhados a esta pesquisa.

Aos meus sobrinhos Luana e Lucas pelo companheirismo e amizade no decorrer desses anos.

Aos funcionários Lindalva, Débora, Sófacles, Rafael, Diógenes e Juliana pela colaboração, disposição e paciência.

Aos amigos Débora Jamila, Clebson, Paulo, Rian, Iranildo, Taliana e Ângela pela amizade e presença constante durante todo percurso, transmitindo entusiasmo, confiança e transformando os momentos difíceis em momentos de grandes alegrias.

Aos PIBICs Rian, Anderson, Thiago, Ana Cláudia e PIVICs Clara, Darcílio e Rodrigo pelo apoio e colaboração fundamentais para a realização desta pesquisa.

Aos professores (Josilene e Nagel), 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 para a conclusão desta dissertação.

A indústria de polpa de frutas IDEAL, empresa instalada em João Pessoa/PB, que colaborou com esta pesquisa, uma vez que disponibilizou da matéria-prima (resíduo do caju) vinculada a este estudo.

A PROARROZ empresa instalada em Queimadas/PB especializada no beneficiamento de arroz, que forneceu o farelo de arroz colaborando para o desenvolvimento desta pesquisa.

A Fundação André Tosselo (FAT) localizada em Campinas/SP que forneceu a levedura *Candida guilliermondii* CCT-3544 fundamental para este estudo.

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

MUITO OBRIGADA!

MEDEIROS, Lorena Lucena de, *Ampliação de escala experimental da produção biotecnológica de xilitol a partir do hidrolisado do pedúnculo do caju*, João Pessoa: Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, 2015.100p. Dissertação (mestrado)

RESUMO

Em virtude da quantidade de resíduos gerados pelas indústrias e dos compromissos assumidos com o meio ambiente, tem-se verificado um crescente interesse pela utilização de fontes alternativas de energia para geração de bioprodutos com valor agregado, como o etanol e xilitol. Neste contexto, o pedúnculo do caju tem sido considerado uma alternativa promissora para atender à demanda de forma mais sustentável. Em vista disso, o objetivo desta pesquisa foi estudar a ampliação de escala experimental da produção biotecnológica de xilitol utilizando o licor do tratamento ácido do bagaço do pedúnculo do caju como substrato e como agente de fermentação a levedura *Candida guilliermondii* CCT 3544. O bagaço do pedúnculo do caju obtido foi lavado, seco a 55 °C, moído, peneirado (48 mesh), caracterizado e submetido à hidrólise ácida. 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 e hexose dos licores hidrolisados. Após hidrólise o licor foi submetido ao processo de concentração e o meio de fermentação preparado em frascos de Erlenmeyer com 400 mL do meio com licor concentrado e em Biorreator (1600 mL), agitados a 200 rpm, 28 °C de 0 a 120 h, utilizando-se a levedura *C. guilliermondii* CCT 3544. A caracterização da composição lignocelulósica revelou a presença de $21,45 \pm 0,31\%$ de celulose, hemicelulose $10,96 \pm 0,31\%$ e lignina $35,39 \pm 0,97\%$, respectivamente. Verificou-se que o licor do tratamento ácido deve operar sob condições de temperatura ao nível 1 (160 °C), concentração de ácido, proporção bagaço/ácido diluído ao nível -1 (1% e 1:6). O fermentado do hidrolisado concentrado obteve produção máxima com 48 h de fermentação, já o hidrolisado fermentado em biorreator produziu etanol e xilitol simultaneamente com máxima produção de xilitol com 6 h e etanol com 48 h de fermentação.

Palavras-chave: xilitol, xilose, *Candida guilliermondii*, bioprodutos, planejamento experimental, fermentação

MEDEIROS, Lorena Lucena de, *Expansion of the experimental scale of biotechnological xylitol production from cashew peduncle hydrolyzate*, João Pessoa: Graduate Program in Food Science and Technology, Federal University of Paraíba, 2015.100p. Dissertation (Master's Degree)

ABSTRACT

Due to the amount of waste generated by industries and commitments to the environment, there has been a growing interest in the use of alternative energy sources for the generation of bio-products with added value, such as ethanol and xylitol. In this context, cashew peduncle has been considered a promising alternative to meet this demand in a more sustainable manner. Thus, the aim of this study was to assess the expansion of the experimental scale of biotechnological xylitol production using liquor from the acid treatment of cashew peduncle bagasse as substrate and *Candida guilliermondii* CCT 3544 yeast as fermentation agent. Cashew peduncle bagasse was washed, dried at 55°C, ground, sieved (48 mesh), characterized and submitted to acid hydrolysis. Then, a $2^3 + 3$ factorial experimental design with central points was performed in order to verify the effect of variables temperature, bagasse / dilute acid ratio and acid concentration on the release of pentose and hexose from hydrolyzed liquors. After hydrolysis, the liquor was submitted to concentration process and the fermentation medium was prepared in 400 ml Erlenmeyer flasks in Bioreactor (1600 ml), stirred at 200 rpm, 28°C from 0 to 120 h using *C. guilliermondii* CCT 3544 yeast. The characterization of the lignocellulosic composition revealed the presence of $21.45 \pm 0.31\%$ cellulose, $10.96 \pm 0.31\%$ hemicellulose and $35.39 \pm 0.97\%$ lignin, respectively. It was found that the liquor from the acid treatment should operate under temperature conditions at level 1 (160 ° C) and acid concentration, bagasse / dilute acid ratio at level -1 (1%, 1: 6). The overall analysis of results led to the conclusion that *C. guilliermondii* CCT-3544 was able to grow in medium with hydrolyzate, and its maximum concentration of cell growth was 3.5 g L^{-1} in both cases. However, the fermented concentrate obtained maximum production at 48 h of fermentation, but the fermented hydrolyzate in bioreactor produced ethanol and xylitol, with maximum xylitol production at 6 h and maximum ethanol production at 48 h of fermentation.

Keywords: xylitol, xylose, *Candida guilliermondii*, bioproducts, experimental design, fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Tecnologias para utilização de biomassa renovável	14
Figura 2: Estrutura de uma microfibrila, que contém 36 moléculas de celulose	16
Figura 3: Ilustração esquemática de biomassa lignocelulósica	18
Figura 4: Representação da molécula de celulose.....	19
Figura 5: Estrutura química das principais hemiceluloses de parede celular de plantas.....	20
Figura 6: Representação das partes do caju	21
Figura 7: Representação da fragmentação ocasionada pelo tratamento da biomassa lignocelulósica	22
Figura 8: Reações que ocorrem durante a hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos	25
Figura 9: Representação molecular do xilitol	27
Figura 10: Xilitol.....	27
Figura 11: Representação de produção de xilitol por rota química.....	30
Figura 12: Esquema simplificado do metabolismo de D-xilose por meio de leveduras	31
Figura 13: Bagaço do pedúnculo do caju seco a 48 mesh.....	46
Figura 14: Reator de 20 L (Regmed, AU/E-20), utilizado no tratamento ácido de bagaço do pedúnculo do caju	49
Figura 15: Sistema utilizado para concentração dos licores hidrolisado	50
Figura 16: Fluxograma geral do processo de obtenção biotecnológica de xilitol proveniente do bagaço do pedúnculo do caju	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades físico-química do xilitol.....	28
Tabela 2: Variáveis de entrada com os níveis reais e codificados utilizados no planejamento experimental do tratamento ácido do bagaço do pedúnculo do caju.....	47
Tabela 3: Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 com três repetições no ponto central do tratamento ácido.....	47
Tabela 4: Meio de Cultura YM (Yeast-Malte Extract) para reativação da linhagem <i>Candida guilliermondii</i> CCT-3544	58
Tabela 5: Meio de Cultura YMA (Yeast-Malte Extract Ágar) para reativação da linhagem <i>Candida guilliermondii</i> CCT-3544	59
Tabela 6: Composição do meio semi-sintético utilizado para crescimento do inóculo.	59

SUMÁRIO

RESUMO.....	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS.....	
LISTA DE TABELAS	
1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVO	13
1.1.1 Objetivo geral	13
1.1.2 Objetivos específicos	13
2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	14
2.1 BIORREFINARIA.....	14
2.2 BIOMASSA.....	14
2.2.1 Materiais lignocelulósicos como matérias-primas para obtenção de xilitol	15
2.2.2 Tratamento de materiais lignocelulósicos	22
2.3 XILITOL.....	27
2.3.1 Obtenção de xilitol.....	29
2.3.2 Micro-organismos usados para produção de xilitol	31
2.4. APLICAÇÕES DO XILITOL	33
2.4.1 Fatores que influenciam na bioconversão de xilose em xilitol	34
2.5 AMPLIAÇÃO DE ESCALA EXPERIMENTAL	37
2.6 ESTADO DA ARTE (PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL)	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1. MATÉRIA-PRIMA	46
3.1.1 Otimização das condições da hidrólise ácida do bagaço do pedúnculo de caju.....	46
3.1.2 Hidrólise do bagaço do pedúnculo de caju em reator de 20L	48
3.2 CONCENTRAÇÃO DO LICOR HIDROLISADO	49
3.3 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DO PEDUNCULO DE CAJU IN NATURA E HIDROLIZADO	52
3.3.1 Umidade Relativa	52
3.3.2 Resíduo Mineral Fixo (Cinzas).....	52
3.3.3 Proteínas.....	52
3.3.4 Determinação de pH.....	53
3.3.5 Sólidos solúveis totais (SST)	53
3.3.6 Açúcares redutores.....	53
3.3.7 Extrativos	54
3.3.8 Determinação de lignina	54
3.3.9 Determinação de holocelulose	55
3.3.10 Determinação de alfa-celulose.....	56
3.3.11 Determinação de hemicelulose	57
3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS LICORES	57
3.5 ESTUDO DO PROCESSO FERMENTATIVO.....	58
3.5.1 Micro-organismo	58

3.5.2 Preparo do inóculo	59
3.5.3 Crescimento da <i>Candida guilliermondii</i> CCT 3544 na preparação do inóculo.....	60
3.5.4. Análise da concentração de células.....	60
3.5.5 Cálculo da velocidade específica de crescimento.....	61
3.5.6 Cultivo com meio de hidrolisado de pedúnculo de caju em mesa agitadora (shaker).....	62
3.5.7 Processo fermentativo de ampliação de escala	62
3.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS	63
3.6.1 Rendimento teórico de conversão de xilose em xilitol.....	63
3.6.2 Produtividade volumétrica em xilitol	63
3.6.3 Eficiência de Conversão de xilose em xilitol	63
3.6.4 Velocidade volumétrica de consumo de substrato (xilose)	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
4.1 ARTIGO 1	77
4.2 ARTIGO 2	88

1 INTRODUÇÃO

A economia agrícola brasileira se mantém como uma das mais importantes do mundo com excepcional desempenho na safra de 2012/2013 quando alcançou novo recorde, superior a 186,1 milhões de toneladas com crescimento de 9,7% do PIB no primeiro trimestre de 2013 (ECON, 2013).

Simultaneamente com este cenário são produzidos anualmente milhões de toneladas de resíduos agroindustriais, que na maioria das vezes são eliminados no meio ambiente, provocando como consequência um acúmulo excessivo de matéria orgânica na natureza. A América Latina produz, cerca de 500 milhões de toneladas por ano de subprodutos agroindustriais, sendo que o Brasil produz quase metade deste montante (VARIZ, 2011).

Dentre esses produtos agrícolas encontra-se o caju oriundo do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) planta tropical, originária do Brasil, dispersa em quase todo o seu território principalmente na região nordeste que compreende mais de 95% da produção nacional. Sua agroindústria proporciona uma produção de aproximadamente 276.399 toneladas de castanha de caju e 2 milhões de toneladas de pedúnculo por ano (OLIVEIRA, 2008; IBGE, 2013).

Em seu contexto mais amplo, a cadeia do caju compreende um conjunto de atividades que geram um grande número de produtos intermediários e finais, porém o principal produto gerado é a Amêndoa da Castanha de Caju (ACC). Entretanto, estima-se que mais de 90% do pedúnculo é desperdiçado, ou seja, é um subproduto pouco aproveitado na cadeia da produção de castanha (GUANZIROLI, 2009).

Tendo em vista o grande desperdício do pedúnculo do caju, surge um crescente interesse da comunidade científica em investigar o aproveitamento desse resíduo, buscando apresentar opções de uso como matéria-prima para geração de produtos com valor agregado. Dessa forma, a cultura do cajueiro torna-se grande potencial para o desenvolvimento tecnológico, visto que o resíduo pedúnculo do caju, resíduo industrial, principalmente da indústria de suco, pode ser reaproveitado, para enriquecimento em ração animal (LUCIANO et al., 2011), produção de enzimas pectinases (ALCANTRA; ALMEIDA; SILVA, 2010), produção de etanol e xilitol (LIMA et al., 2013; LIMA et al., 2014).

O xilitol é um açúcar álcool de cinco carbonos (poliol) que pode ser encontrado na natureza, em pequenas quantidades. Esse açúcar tem atraído à atenção global por causa do seu poder adoçante semelhante ao da sacarose com menor quantidade de calorias. O xilitol é também conhecido por ser metabolizado por meio de vias independentes de insulina no corpo humano e, portanto, pode ser utilizado como substituto do açúcar para diabéticos. Além disso,

apresenta propriedade anticariogênica, que promove a saúde oral e ainda, auxilia na prevenção de cáries (PRAKASHAM et al., 2009).

O xilitol representa cerca de 12% do mercado total de polióis com um rápido crescimento em todo o mundo (FRANCESCHIN, et al., 2011). Sua produção industrial por meio de soluções purificadas de D-xilose são submetidas à hidrogenação catalítica, sendo o processo operado em altas condições de temperatura e pressão. Em consequência das circunstâncias de operação e da necessidade de pureza da xilose esse procedimento de formação tradicional do poliol, denominado processo químico apresenta custo bastante elevado (CHEN et al., 2010).

Vários estudos têm buscado alternativas às rotas químicas, com especial atenção aos processos biotecnológicos, que atualmente tornaram-se grande foco da comunidade científica. Esse processo apresenta-se como uma alternativa ao processo químico, com a vantagem de ser realizado sob condições suaves de pressão atmosférica e temperatura, oferecendo menor gasto de energia. Devido à especificidade da bioconversão, são obtidos rendimentos mais elevados, com baixo custo de separação/purificação, gerando efluentes mais limpos, atendendo assim aos desafios de sustentabilidade (LORENÇO, 2009).

Em vista disso, o estudo da ampliação de escala do trabalho de Lima et al. (2014) e LIMA (2013) (aumento de 8 e 16 vezes) para obtenção de xilitol utilizando o hidrolisado do pedúnculo do caju se justifica pela grande disponibilidade da matéria-prima em alguns estados do Nordeste como também pela necessidade de empregar uma tecnologia que pode ser uma via de menor custo visando assegurar opções para o aproveitamento do subproduto do caju na tentativa de minimizar os desperdícios, valorizando a cultura do caju, como um bioproduto de valor agregado (xilitol). Vale ressaltar ainda que o licor pré-hidrolisado será denominado no decorrer do trabalho como hidrolisado.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo geral

Estudar a ampliação de escala experimental da produção biotecnológica de xilitol utilizando o licor do tratamento ácido do bagaço do pedúnculo do caju como substrato e como agente de fermentação a levedura *Candida guilliermondii* CCT 3544.

1.1.2 Objetivos específicos

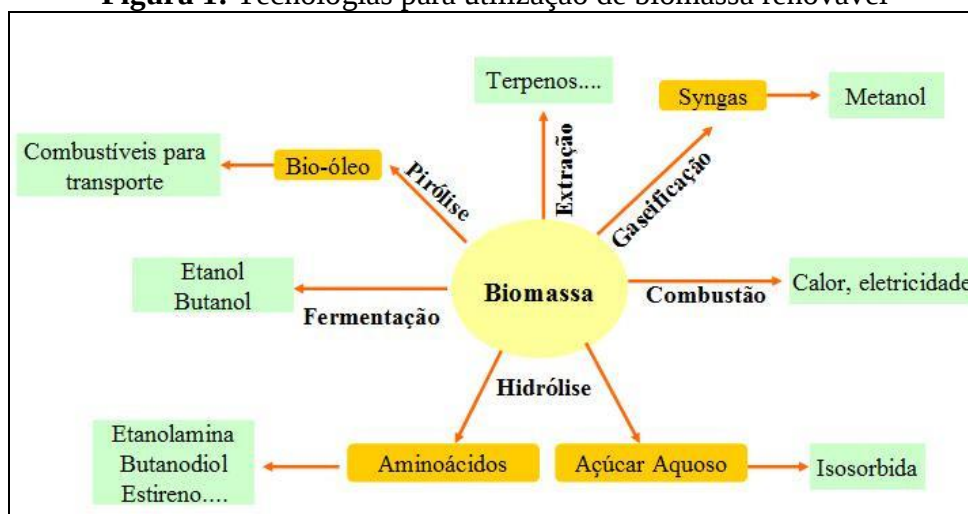
- Obter o resíduo seco do pedúnculo de caju;
- Estudar as melhores condições da hidrólise ácida para obtenção da fração hemicelulósica do bagaço do pedúnculo de caju;
- Determinar características físico-químicas do bagaço do pedúnculo do caju seco in natura e do hidrolisado (umidade, cinzas, proteínas, pH, açúcares redutores, sólidos solúveis, celulose, hemicelulose e lignina);
- Determinar por meio da caracterização físico-química os açúcares do licor hidrolisado do bagaço do pedúnculo do caju (xilose, arabinose, glicose) e os inibidores (ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural);
- Concentrar (2 vezes) do licor hidrolisado;
- Estudar a cinética fermentativa da bioconversão do hidrolisado do bagaço do caju apresentando melhor eficiência e/ou rendimento no processo de obtenção de xilitol em escala ampliada.

2 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

2.1 BIORREFINARIA

O conceito de biorrefinaria corresponde à integração de processos e equipamentos na conversão de biomassa para a produção de energia, combustível e produtos químicos. Em essência, a biorrefinaria moderna se assemelha à refinaria de petróleo: uma matéria-prima abundante que consiste principalmente de polissacarídeos renováveis e lignina. Que através de uma matriz de processos, é fracionada e transformada em uma mistura de produtos, incluindo produtos químicos importantes, como, por exemplo, polímeros, produtos farmacêuticos, bem como energia e combustíveis líquidos, tais como etanol (ALVARADO-MORALES et al., 2009; RAGAUSKAS et al., 2006). A Figura 1 representa as várias tecnologias propostas para a utilização de biomassa como matéria-prima para elaboração de diversos produtos.

Figura 1: Tecnologias para utilização de biomassa renovável



Fonte: (Adaptado de SANDERS et al., 2012).

2.2 BIOMASSA

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 o uso final. Em termos energéticos é toda e qualquer forma de energia associada a formas de energia química acumulada mediante processos fotossintéticos (BNDES, 2008). Recentemente, a biomassa lignocelulósica, vem ganhando atenção como matéria-prima para a produção de bioenergia e bioprodutos.

A biomassa é, assim, um enorme reservatório de energia incluindo-se resíduos florestais, agroindustriais, urbanos, de origem animal, provenientes da indústria transformadora da madeira, entre outros. O emprego de resíduos gerados pelo agronegócio tem sido amplamente investigado, pois estes materiais, depois de submetidos a um tratamento, pode libertar açúcares fermentáveis que servem como principal fonte de carbono para a produção de xilitol (ADENE; AREAC, 2005).

Nos últimos anos, o tipo de biomassa mais investigado são de fontes vegetais, que pode ser composta de duas classes, a primeira é formada por açúcares de reserva como o amido e a sacarose que é amplamente utilizada pelas indústrias alimentícias e de bioconversão a etanol já a segunda classe é composta pelas partes estruturais da planta onde encontram-se os açúcares mais complexos e de difícil acesso (OCTAVE; TOMAS, 2009).

O aproveitamento da biomassa vegetal como fonte de matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos vem gerando interesse principalmente pela sua abundância e seu caráter renovável (YU et al., 2008).

Dentre os carboidratos de massas moleculares menores incluídos na biomassa, destacam-se dois tipos de açúcares: hexoses (açúcares de seis carbonos), dos quais a glicose é a mais comum e, pentoses (açúcares de cinco carbonos), mais comum à xilose. (CORMA et al., 2007).

Existem ainda várias tecnologias de aproveitamento da biomassa dentre elas a combustão direta, cogeração, craqueamento, digestão anaeróbica, fermentação, gaseificação, hidrólise, liquefação, pirólise e transesterificação.

2.2.1 Materiais lignocelulósicos como matérias-primas para obtenção de xilitol

Segundo Kumar e Singh (2008) os principais componentes provindos da parede celular de plantas são a celulose, a hemicelulose e a lignina, além de vários extrativos e compostos inorgânicos. A proporção destes componentes sofrem mudanças na sua composição de acordo com a espécie da planta, tipo de tecido, idade, tempo de colheita e condição ou estágio de crescimento.

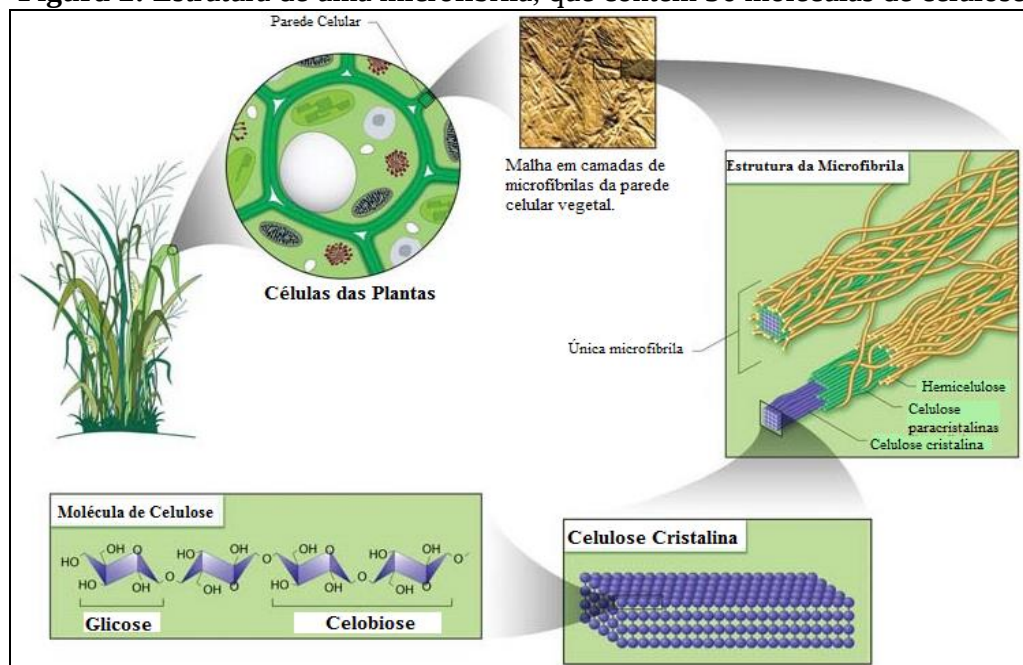
Dentre as biomassas lignocelulósicas utilizadas para obtenção de xilitol incluem inúmeros resíduos agrícolas (bagaço, cascas, palhas, cavacos, madeiras). No entanto os mais investigados são o bagaço de maçã (DALANHOL, 2014), bagaço de cana-de-açúcar (BIER, et al., 2007), bagaço do caju (ROCHA, et al., 2014), sabugo de milho (PING, et al., 2013),

cascas de soja (CASSALES, 2010), palha de trigo (CANILHA, et al.,2005), palha de arroz (MUSSATO; ROBERTO, 2002), cavacos de eucalipto (CANETTIERI, et al.,2002), casca de jabuticaba (SOUZA, 2013), casca de aveia (TAMANINI, et al., 2004), sorgo forrageiro (SENE, et al., 2011).

2.2.1.1 Estrutura e composição dos materiais lignocelulósicos

A biomassa lignocelulósica apresenta uma estrutura complexa, sendo constituída, principalmente, por três frações orgânicas: celulose (35–50%), hemicelulose (20–35%) e lignina (10–25%), além de pequenas quantidades de minerais (cinzas) e extrativos. As cadeias de celulose são unidas por ligações de hidrogênio, denominadas microfibrilas (Figura 2), as quais são presas umas as outras por hemicelulose, e recobertas por lignina. Essas microfibrilas estão frequentemente associadas sob a forma de macrofibrilas (HIMMEL, 2008; OJEDA et al., 2011; SOCCOL et al., 2010; TAHERZADEH; KARIMI, 2008). As interações destes componentes cria uma estrutura altamente resistente e recalcitrante (SAWATDEENARUNAT et al.,2015).

Figura 2: Estrutura de uma microfibrila, que contém 36 moléculas de celulose



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

Para melhor compreender a importância da estrutura da biomassa na determinação dos parâmetros utilizados nos processos de obtenção de energia proveniente de fonte vegetal, será

abordado neste tópico fundamentos relacionados à estrutura dos materiais lignocelulósicos, dando enfoque a parede celular e seus constituintes.

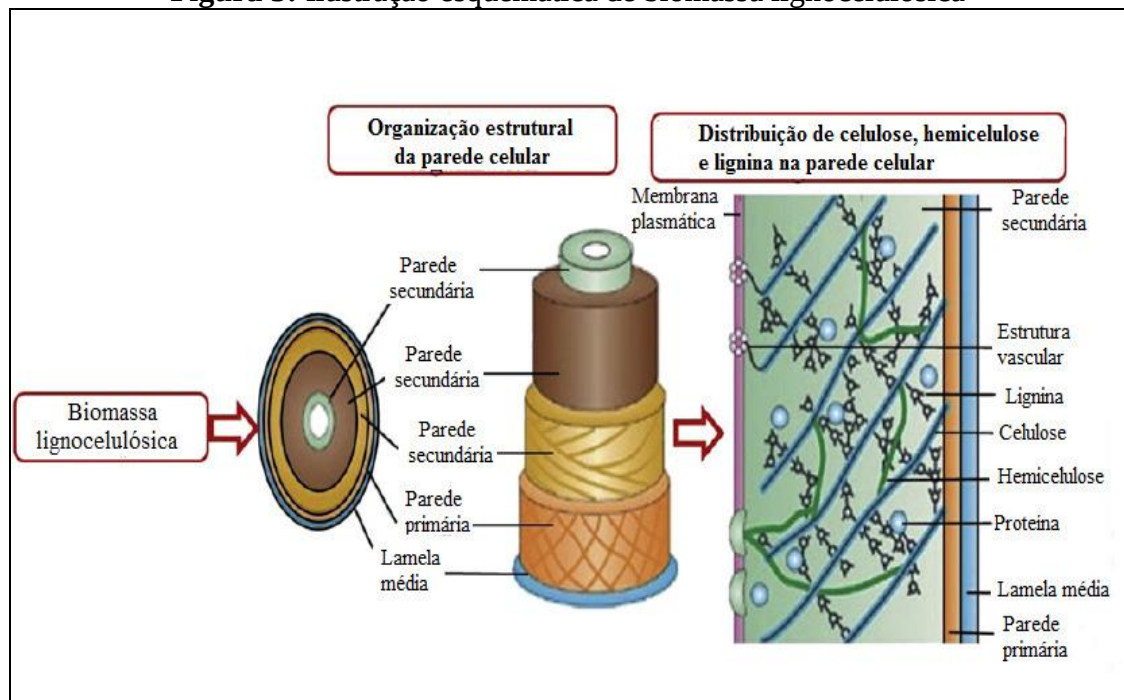
- Parede celular

A parede celular é constituída, principalmente, pelos polímeros de celulose, hemicelulose, lignina e ainda pectina e proteínas. No entanto, Cagnon et al. (2009) relata que a celulose é o polímero mais abundante, correspondendo de 34 a 50% da massa seca, seguida pela hemicelulose que compreende de 19 a 34%, lignina (11 a 30%) além de pequenas quantidades de minerais e extrativos.

A parede celular é fragmentada em parede celular primária e secundária. A diferença esta baseada na proporção de celulose e lignina presentes. A primeira é composta durante o desenvolvimento das células vegetais formada por 80-90% de polissacarídeos (celulose, hemicelulose, principalmente xiloglicanas e pectina) e 10-20% de proteína (MOHNEN et al., 2008).

Logo a parede celular secundária (Figura 3) é depositada quando o crescimento celular é cessado e geralmente está presente em células que possuem função estrutural, como por exemplo as células do xilema. Esta parte da parede celular é constituída por celulose, hemicelulose e lignina. Esta última proporciona maior resistência à estrutura, no entanto, a integridade estrutural do tecido vegetal atribui-se a lamela média que atua unindo as células adjacentes. Esta lamela é formada por substâncias pécticas em células jovens e por lignina em células maduras (MOHNEN et al., 2008).

Figura 3: Ilustração esquemática de biomassa lignocelulósica



Fonte: (Adaptado de MENON; RAO, 2012).

- Celulose

A celulose é o principal constituinte da parede celular e também homopolímero extremamente ordenado de celobiose, que representa um dímero de glicose e possui em sua extensão cerca de 10.000 unidades glicosídicas formando uma cadeia rígida em forma de fibras (STAMBUK, et al., 2008).

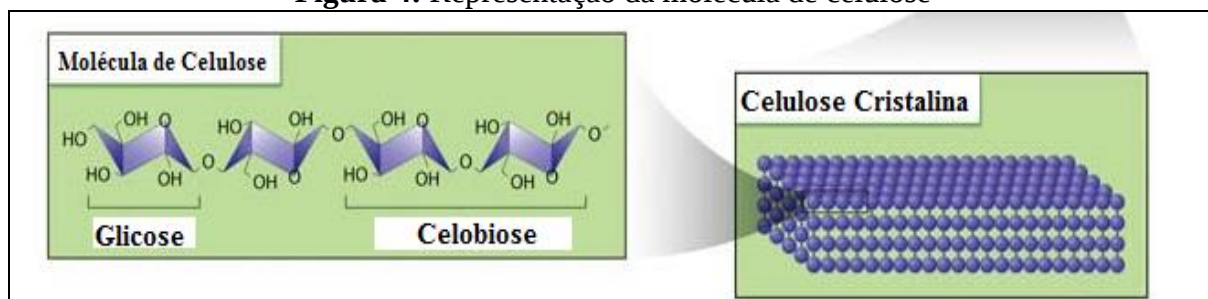
A celulose é definida como um polímero não ramificado composto unicamente por subunidades de D-glicose unidas por ligações β -1,4-glicosídicas. Análises apontam que a duplicação de sua conformação é conhecida como celobiose (4-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranoose) (QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL,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

A celobiose contém seis grupos hidroxila que estabelecem interações do tipo ligações de hidrogênio intra e intermolecular e por interação de *van der Waals* como podemos observar na Figura 4. Devido a essas ligações de hidrogênio há uma forte tendência da celulose formar cristais que a tornam completamente insolúvel em água e na maioria dos solventes orgânicos. O grau de cristalinidade da celulose varia de acordo com sua origem e processamento (SILVA et al., 2009).

Em consequência do padrão de ligação dos açúcares, a cadeia de celulose possui duas extremidades distintas, uma redutora e outra não redutora. A primeira possui um grupo

hemi-acetal livre no carbono 1 e a extremidade não redutora apresenta uma hidroxila livre no carbono quatro 4 (FESTUCCI-BUSELLI et al., 2007).

Figura 4: Representação da molécula de celulose



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

- Hemicelulose

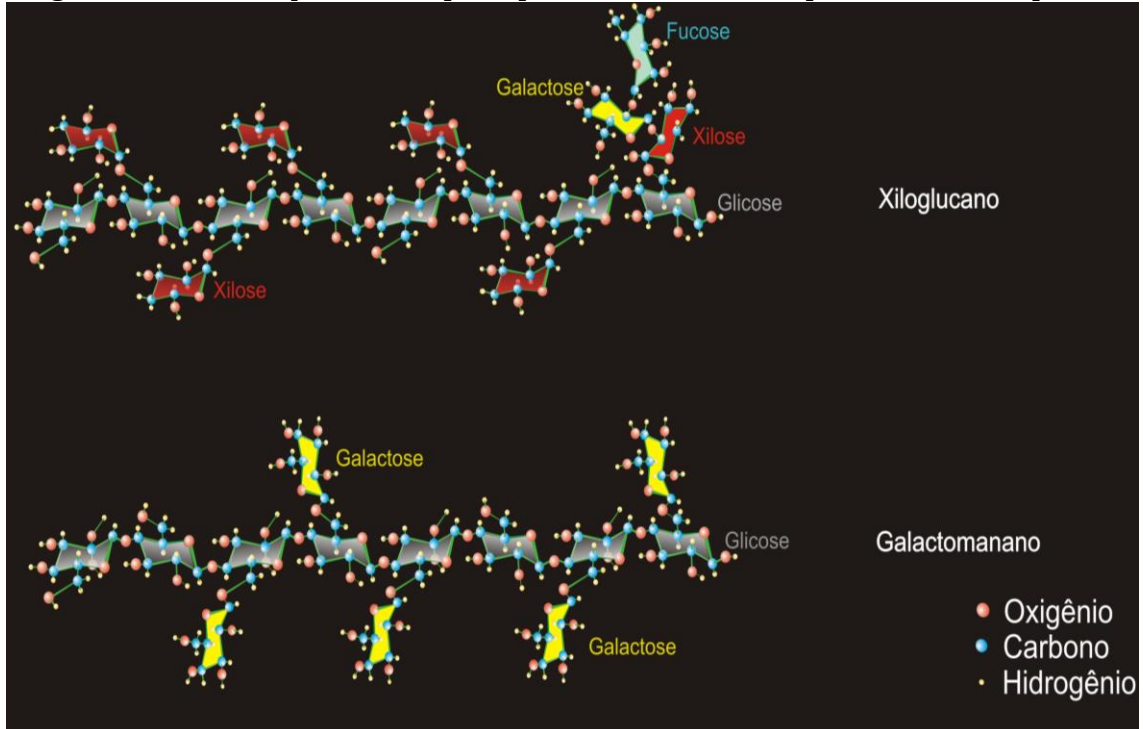
A hemicelulose por sua vez é um heteropolíssacarídeo de menor grau de polimerização entre 100 e 200 e possui várias ramificações composta de diferentes carboidratos simples incluindo pentoses (D-xilose e L-arabinose), hexoses (D-glicose, D-manose, D-galactose) assim como os ácidos urônicos. Esses açúcares 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 natureza química da hemicelulose varia entre os tecidos vegetais, estágio de desenvolvimento, bem como em outras espécies vegetais. As hemiceluloses são classificadas por meio do açúcar predominante da cadeia principal e também na ramificação lateral. Os quatro tipos predominantes de hemicelulose são: xilanas, xiloglicanas, glicanas e mananas (VAN DEN BRINK; DE VRIES, 2011; SCHELLER; ULVSKOV, 2010).

As xilanas são o tipo de conformação mais abundante de hemicelulose, possuem por sua vez a cadeia principal formada por unidades de D-xilose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 e ramificações constituídas por outros resíduos de outros carboidratos chamados de heteroxilanas. Dentre as heteroxilanas as que possuem resíduos de ácido 4-O-metil- α -D-glucopiranosil urônico, classificadas como 4-O-metil- glucuroxilanas são as mais comuns. Este tipo de xilana faz parte da hemicelulose predominante na parede celular secundária de dicotiledôneas (HARRIS; STONE, 2008).

As xiloglicanas possuem a cadeia principal constituída de β -1,4-D-glicose e ramificações laterais formadas principalmente por xilose podendo apresentar galactose, arabinose e fucose como podemos observar na Figura 5 abaixo (MOHNEN et al., 2008).

Figura 5: Estrutura química das principais hemiceluloses de parede celular de plantas



Fonte: (BUCKERIDGE et al., 2010)

- Lignina

A estrutura química da lignina é complexa, esta é fundamentada nos três precursores monoméricos *p*-hidroxibenzil (H), guaiacila (G) e sinrigila (S). Os resíduos unidos por várias ligações tipo éster, éter, C-C, sendo a mais comum a ligação β -O-4, que corresponde a 45-60% das ligações (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 a degradação química e biológica, resistindo assim ao estresse oxidativo e ao ataque de micro-organismos (BETANCUR; PEREIRA JUNIOR, 2010; SUN; CHENG, 2002; VERVERIS et al., 2007).

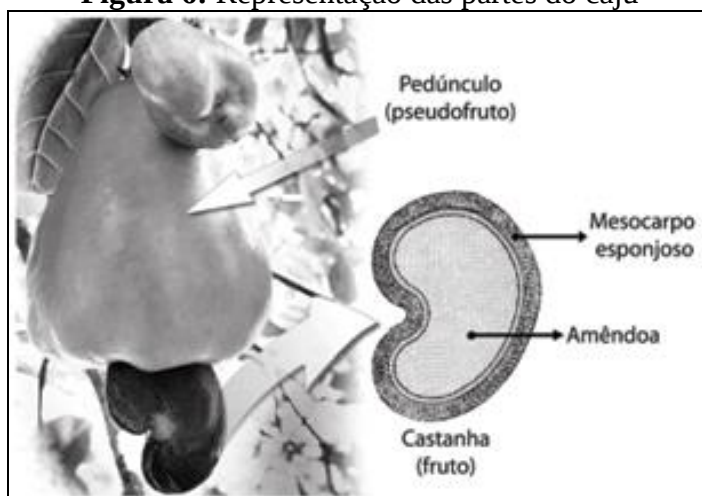
2.2.1.2 Pedúnculo do caju

Segundo Lima et al. (2012), os materiais lignocelulósicos representam uma abundante fonte de açúcares que através de processos biotecnológicos, podem ser convertidos em produtos de interesse industrial atendendo aos desafios de sustentabilidade, contexto no qual a cultura do cajueiro apresenta elevado potencial para o desenvolvimento tecnológico provindos dos resíduos industriais denominados popularmente como bagaço de caju que, em geral, são reaproveitados para enriquecimento da ração animal ou descartados por falta de incentivo de seu uso como alimentação humana.

O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) pertence à família Anacardiácea e é, por sua vez, uma planta genuinamente brasileira visto que quando chegaram os primeiros colonizadores portugueses a planta já se encontrava aqui no nordeste brasileiro, e assim foi disseminando para outros países desde o século XVI. O nome caju é oriundo da palavra indígena “acaíu” que, em tupi, quer dizer noz que se produz (ALSINA, et. al., 2004).

O pedúnculo do caju é frequentemente confundido com o fruto, a castanha, uma drupa cuja semente é comestível. Cientificamente denominado pedúnculo floral, com coloração variante entre o amarelo e o vermelho, o pedúnculo se desenvolveu de modo diferente, é consumido *in natura* e apreciado pela sua suculência (MAZZETTO et al., 2009). Na parte mais interna da castanha está localizada a amêndoa constituída de dois cotilédones carnosos e oleosos, que compõem a parte comestível do fruto como segue na Figura 6.

Figura 6: Representação das partes do caju



Fonte: (MAZZETTO et al., 2009).

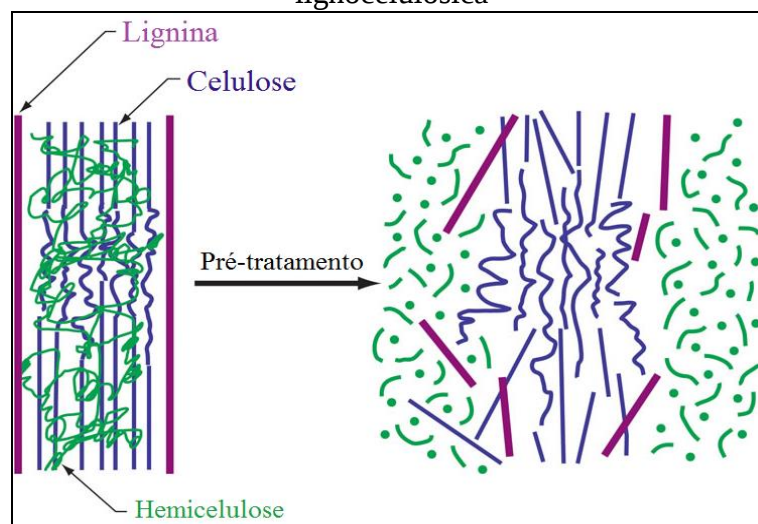
2.2.2 Tratamento de materiais lignocelulósicos

A utilização de biomassa vegetal para produção biotecnológica é um processo que envolve várias etapas. Recentemente têm-se realizado várias pesquisas centradas na melhoria da digestibilidade da biomassa lignocelulósica por meio de tratamentos utilizando vias bioquímicas (SAWATDEENARUNAT et al., 2015).

Devido a esta complexidade da biomassa, o tratamento destes materiais lignocelulósicos é normalmente necessário antes da hidrólise enzimática e fermentação a etanol (HIMMEL, 2008; OJEDA et al., 2011; SOCCOL et al., 2010; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

O tratamento é principalmente destinado à desorganização do complexo lignocelulósico (Figura 7), 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 digestibilidade da fração de celulose na etapa de hidrólise (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Figura 7: Representação da fragmentação ocasionada pelo tratamento da biomassa lignocelulósica



Fonte: (US DOE, 2007; adaptado de MOSIER et al. 2005).

Um tratamento é considerado eficiente quando se obtém para a etapa subsequente, um substrato enriquecido 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 micro-organismos, apresentar segurança e simplicidade operacional e consumo

reduzido de insumos, energia e utilidades (CARDOSO et al., 2012; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Cada tratamento tem um efeito específico sobre as frações de celulose, hemicelulose e lignina. A escolha do tratamento apropriado tem grande impacto sobre os processos subsequentes em termos de digestibilidade da celulose, geração de compostos tóxicos potencialmente inibitórios para etapas biológicas, requisitos de potência de agitação e tratamento de resíduos (GALBE; ZACCHI, 2007; ALVIRA et al., 2010).

O tratamento pode ser realizado por meios físicos, físico-químicos, químicos ou biológicos (ALVIRA et al., 2010).

2.2.2.1 Tratamento físico

Os tratamentos físicos resultam na redução do tamanho das partículas do substrato, conduz a um aumento da superfície específica disponível e também na diminuição da cristalinidade e do grau de polimerização da celulose. Tais fatores são responsáveis pelo aumento do rendimento de hidrólise total da biomassa lignocelulósica, na maioria dos casos de 5 a 25% (dependendo do tipo de biomassa, do tipo e do tempo de moagem) e, também pelo aumento na taxa de hidrólise, devido à redução do tempo de digestão de 23-59% (AGBOR *et al.*, 2011; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Dentre esse tipo de tratamento esta incluso o tratamento por micro-ondas utiliza efeitos térmicos e não térmicos gerados em ambientes aquosos. No método térmico, ocorre a geração de calor interno na biomassa por radiação de micro-ondas, resultante das vibrações das ligações polares na biomassa e do meio aquoso circundante. Esta característica de aquecimento resulta em um efeito de explosão entre as partículas e melhora o rompimento das estruturas recalcitrantes da biomassa lignocelulósica. Outro mecanismo que ocorre no método térmico é a formação de um ambiente ácido por auto-hidrólise, o que resulta na liberação de ácido acético a partir dos materiais lignocelulósicos (SARKAR *et al.*, 2012; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

A celulose, componente da biomassa lignocelulósica, pode ser degradada por irradiação em fibras mais frágeis e em oligossacarídeos de baixo peso molecular e até mesmo em celobiose (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

2.2.2.2 Tratamento físico-químico

As melhores estratégias de tratamento, em geral, combinam métodos físicos e químicos. Nesse caso, o tratamento de explosão a vapor é o método mais comumente usado como tratamento de materiais lignocelulósicos. Neste método, a biomassa é tratada com vapor saturado de alta pressão e, em seguida, a pressão é rapidamente reduzida, o que faz com que a biomassa sofra uma descompressão explosiva. O tratamento é iniciado a uma temperatura de 160–240 °C com uma pressão correspondente de 0,69–4,83 MPa, por poucos segundos (por exemplo, 30 segundos) a poucos minutos (por exemplo, 20 min) antes de o material ser exposto à pressão atmosférica, o que faz com que a reação seja interrompida. O objetivo do tratamento por explosão a vapor é solubilizar a hemicelulose, podendo apresentar resultados de extração semelhantes ao ácido diluído (AGBOR et al., 2011; BALAT, 2011; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009; TAHERZADEH; KARIMI, 2008; SUN; CHENG, 2002;).

Nesse tratamento ocorre também a desestruturação parcial da lignina, com aumento da área superficial e mínima geração de inibidores para a fermentação (CARVALHEIRO et al., 2008).

Existe ainda o tratamento alcalino que objetiva principalmente a remoção da lignina. A depender do rigor da operação, é produzida uma celulose altamente digestível. O meio alcalino provoca o inchamento da parede celular, essa expansão potencializa reações de degradação, pois torna os constituintes da parede celular mais acessíveis. A lignina é removida de forma degradada, não podendo ser utilizada em outros processos (FOELKEL, 2009).

Uma forma de tratamento alcalino é a explosão da fibra por amônia (AFEX- *Ammonia fiber explosion*) é um tipo de tratamento físico-químico alcalino, no qual a biomassa é exposta a amônia líquida a uma temperatura relativamente alta (90–100 °C) por um período de tempo determinado (por exemplo, 30 min) seguido pela redução da pressão (BALAT, 2011; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

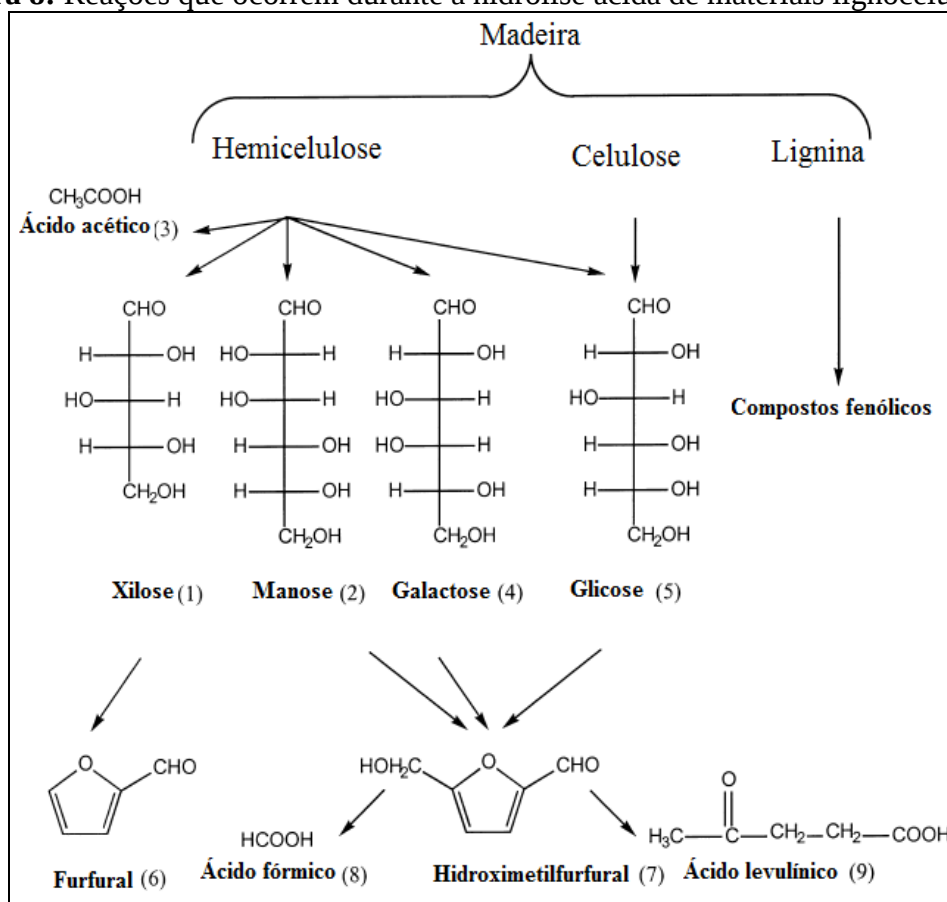
2.2.2.3 Tratamento químico

Tratamentos químicos tendem a solubilizar a hemicelulose e lignina. Alguns métodos de tratamentos químicos envolvem o uso de um ácido, álcali, amônia, solvente orgânico, SO₂, CO₂ ou outros produtos químicos. Estes métodos são de fácil aplicação e apresentam bons rendimentos de conversão em curto espaço de tempo (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 (YANG; WYMAN, 2008; JURADO et al., 2009).

A desidratação dos monômeros, por sua vez, produz furfural, HMF e outros produtos voláteis em ambientes ácidos como podemos observar na Figura 8 (ALVIRA *et al.*, 2010; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Figura 8: Reações que ocorrem durante a hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos



Fonte: (Adaptado de PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

O tratamento com ácido diluído é um dos métodos químicos mais utilizados, cujo objetivo principal consiste em solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa e tornar a celulose mais acessível à hidrólise enzimática. Dependendo do substrato e das condições aplicadas, de 80 a 95% dos açúcares hemicelulósicos podem ser recuperados a partir da matéria-prima lignocelulósica pelo tratamento ácido diluído (BALAT, BALAT, ÖZ, 2008).

O ácido sulfúrico é o mais utilizado devido à solubilização e recuperação dos açúcares hemicelulósicos, no entanto, outros tipos de ácido como, o ácido nítrico, ácido peracético ou ácido fosfórico são citados como alternativas para o tratamento de biomassa lignocelulósica.

A aplicação de ácido às biomassas lignocelulósicas pode ser realizada tanto a alta temperatura e baixa concentração (tratamento com ácido diluído) ou a baixa temperatura e alta concentração (ácido concentrado), nesse último caso mencionando como hidrólise propriamente dita. O ácido diluído é provavelmente o método mais aplicado entre os métodos de tratamentos químicos. A uma temperatura elevada (140–190 °C) e baixa concentração de ácido (ácido sulfúrico 0,1–1%) o tratamento com ácido diluído pode alcançar elevadas taxas de reação e melhorar significativamente a hidrólise da celulose, na etapa posterior de hidrólise enzimática. Quase 100% de remoção da hemicelulose é possível por meio do tratamento com ácido diluído. O tratamento não é eficaz na dissolução de lignina, mas pode provocar uma perturbação na sua estrutura, aumentando a susceptibilidade da celulose à hidrólise enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

De acordo com trabalho de Wyman et al. (2005), o emprego de ácido sulfúrico diluído (0,5–1,0%) a temperaturas moderadas (140–190 °C) efetivamente remove e recupera a maioria da hemicelulose dissolvida como açúcares, e o rendimento em glicose a partir da celulose aumenta com a remoção de hemicelulose.

Em trabalho desenvolvido por Rocha et al. (2011), a utilização da mistura ácido sulfúrico 1% (m/v) e ácido acético 1% (m/v) aplicada ao bagaço de cana-de-açúcar numa relação 1:10 (sólido:líquido) e uma temperatura de 190 °C, durante 10 min, levou a uma solubilização de 14,6% de celulose e 93,4% de hemicelulose.

Na maioria dos casos estes resíduos são hidrolisados por ácidos diluídos devido ao baixo custo desses ácidos e em virtude da liberação de D-xilose disponíveis para a conversão microbiana de xilitol (ALBUQUERQUE et al., 2014). A produção de xilitol está se expandindo a nível mundial (KELLOWAY; DAOUIDIS, 2014), porém ainda são produzidos por via química tornando necessária a busca de processos de produção com custos mais baixos.

Os hidrolisados 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 e suplementação com nutrientes. Na operação de neutralização, usualmente se adicionam produtos químicos com o objetivo de neutralizar os ácidos presentes nos hidrolisados, formando sais. (GÁMEZ et al., 2006).

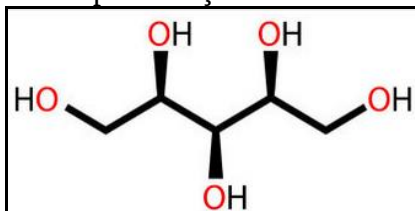
Contudo, esse processo tem por objetivo reduzir ainda mais os custos de processamento e buscar soluções para a reutilização da biomassa vegetal resultante do desperdício de várias agroindústrias, a utilização potencial dessas matérias-primas. Nesse contexto, estão sendo estudados o bambu (MIURA, et al., 2013), girassol (MARTÍNEZ, et al., 2012) e caju (ROCHA, et al., 2014).

2.3 XILITOL

Xilitol (1,2,3,4,5-pentaidroxipentano) é um poliol que apresenta cinco carbonos em sua forma molecular $C_5H_{12}O_5$ (Figura 9) e tem um grupo hidroxila (OH) ligado a cada átomo de carbono na sua cadeia, possui um poder edulcorante elevado semelhante a sacarose, superior a outros polióis como o manitol e o sorbitol, e ainda apresenta 40% menos calorias do que a sacarose (ALBUQUERQUE et al., 2014).

Foi descoberto em 1891 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 (BÄR, 1991).

Figura 9: Representação molecular do xilitol



Fonte: www.dreamstime.com

Este açúcar apresenta-se como um pó branco cristalino (Figura 10), sem odor, altamente solúvel em água (64,2 g/100 mL) (NINGAN; SINGH 1995).

Figura 10: Xilitol



Fonte: www.xylitolusa.com

Segundo a Food and Drug Administration (FDA) órgão regularizador de alimentos nos Estados Unidos, como aditivo do tipo GRAS (Generally Regarded as Safe ou “geralmente reconhecida como segura”), o xilitol é considerada uma substância atóxica, onde sua incorporação em alimentos é legalmente permitida (AGUIAR et al., 1999).

Além disso, o xilitol não participa da reação de Maillard (que podem provocar a formação de compostos de escurecimento em produtos alimentares) e, portanto, não reduzem o valor nutricional das proteínas presentes. Essas características confirmar sua aplicabilidade em processos de produção de alimentos, como doces, caramelos, chocolates, sorvetes, geleias, marmeladas e bebidas (MONEDERO, PÉREZ-MARTÍNEZ, e YEBRA, 2010). Suas propriedades físicas e químicas estão relacionadas na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades físico-química do xilitol

Propriedades	Características ou Valores
Fórmula empírica	$C_5H_{12}O_5$
Massa molar	152,15 g/mol
Aparência	Pó cristalino
Cor	Branco
Sabor	Doce
Odor	Nenhum
Ponto de fusão	92-96 °C
Ponto de ebulição	216 °C (1 atm)
pH (solução aquosa a 10%)	5-7
Densidade (solução aquosa)	10%-1,03 g/mL; 60%-1,23 g/mL
Solubilidade em água à 20 °C	63 g/100 g solução
Viscosidade (solução aquosa a 20 °C)	10%-1,23 cP; 60%- 20,63 cP
Calor de dissolução (endotérmico)	-34,8 cal/g
Valor calórico	2,4 kcal/g
Índice de refração (25 °C)	1,3471 (solução aquosa a 10%)
Higroscopicidade	Em elevada UR é mais higroscópico que a sacarose e menos que o sorbitol
Poder adoçante	Similar ao da sacarose, superior ao do sorbitol e manitol
Estabilidade	Estável a 120 °C (não carameliza)

Fonte: BAR (1991).

2.3.1 Obtenção de xilitol

Sabe-se que as fontes de carbono renováveis, tais como resíduos industriais, podem ser convertidas em substâncias com maior valor agregado, tanto por via química como por rotas biotecnológicas, e a escolha do processo deve ser baseado em uma avaliação detalhada da sustentabilidade, disponibilidade de recursos e logística de transporte (KOUTINAS, et al., 2014).

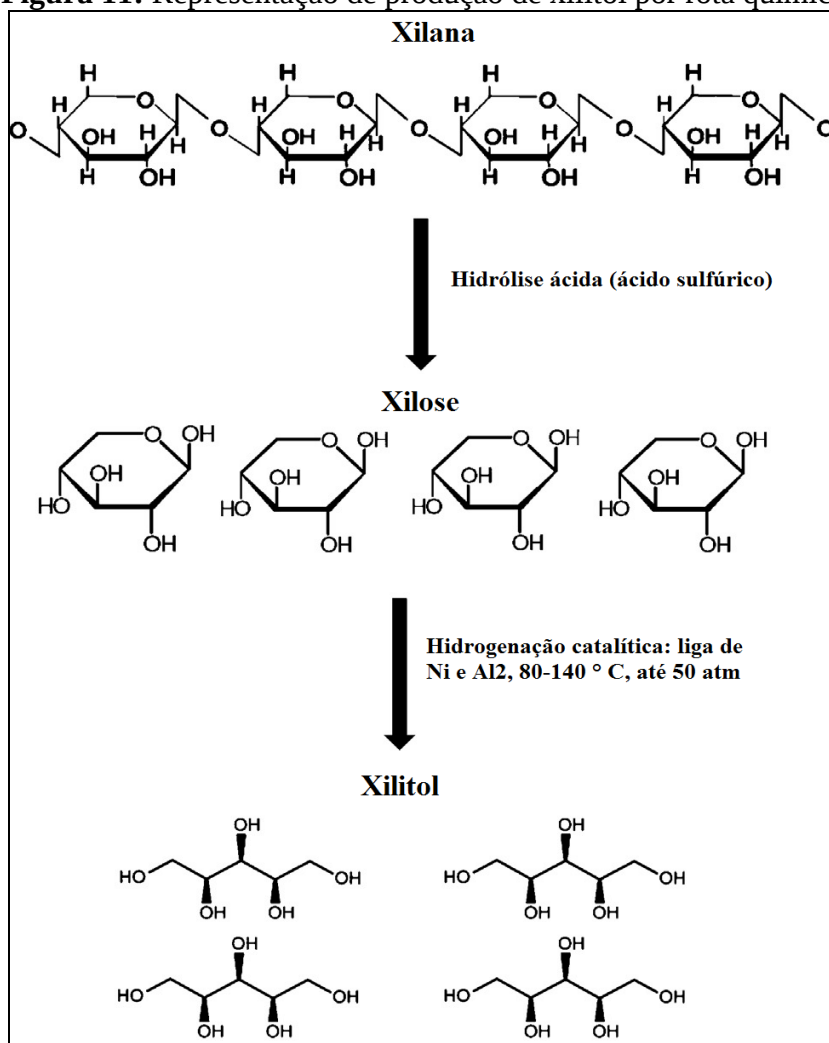
A obtenção de xilitol pode ser realizada de 3 maneiras: extração líquido-sólido, redução química da xilose e conversão biotecnológica de soluções contendo xilose (DOMÍNGUEZ et al., 1999). Tanto o processo químico quanto o biotecnológico se iniciam com soluções de xilose oriundas da hidrólise de materiais lignocelulósicos ricos em xilanas (CRUZ et al., 2000).

- Extração líquido-sólido

O xilitol presente em frutas e vegetais bem como em leveduras, líquens, algas e cogumelos pode ser recuperado por extração líquido-sólido, mas como ocorre em baixas quantidades, menos que 0,900 g/100g, este processo se torna economicamente inviável (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998).

- Redução química da xilose

A produção de xilitol em escala comercial é realizada por um processo químico patenteado em 1977 por Asko Melaja e Lauri Hamalainen (LIMA; BERLINCK, 2003). Este processo inclui quatro etapas básicas: 1. Obtenção da xilose por hidrólise ácida de material vegetal rico em xilana; 2. Purificação da xilose obtida; 3. Hidrogenação catalítica da xilose formando xilitol e 4. Cristalização do composto. O rendimento do processo químico e a qualidade do xilitol dependem da pureza da solução inicial de xilose, já que a presença de impurezas interfere na reação catalítica. São necessárias operações de purificação (como troca iônica, descoloração e fracionamento cromatográfico) para obtenção de uma solução de xilose de elevada pureza. Após a remoção do catalisador por filtração e troca iônica, a solução de xilitol é concentrada, fracionada por cromatografia e cristalizada para obtenção do produto puro. As etapas de purificação aumentam o tempo do processo e encarecem o produto (LIMA; BERLINCK, 2003).

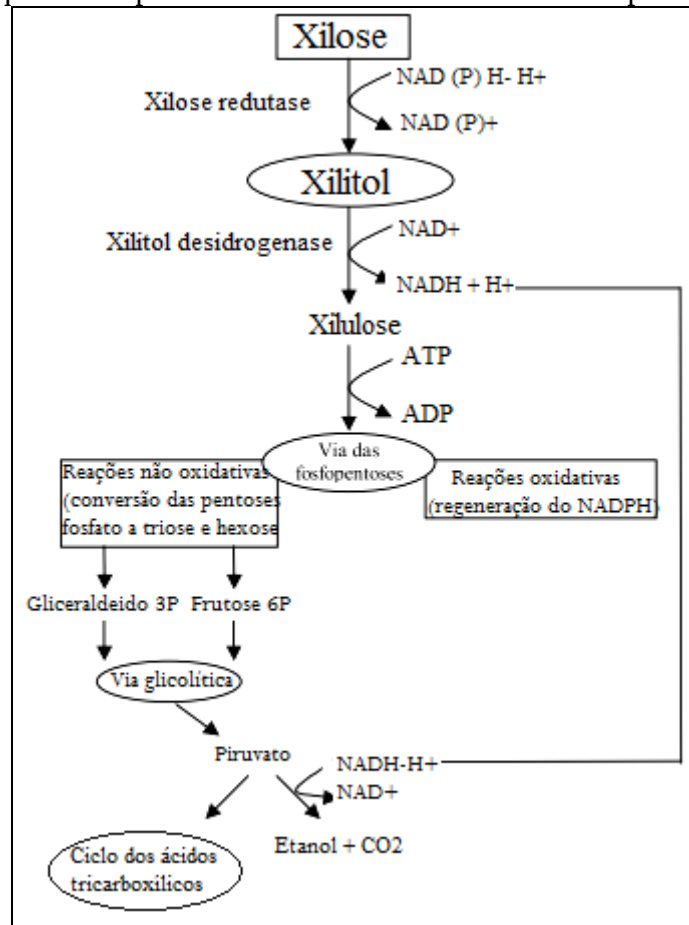
Figura 11: Representação de produção de xilitol por rota química

Fonte: (Adaptado de Alburquerque et al., 2014)

- Conversão biotecnológica de soluções contendo xilose

O xilitol pode ser produzido biotecnologicamente utilizando leveduras e/ou enzimas. Este processo consiste na fermentação de hidrolisados hemicelulósicos obtidos de resíduos agroindustriais e pode competir com o tradicional processo químico (FAVERI et al., 2003). O xilitol é um intermediário do metabolismo de D-xilose em leveduras, como pode ser observado na Figura 12 onde é representado um esquema simplificado do metabolismo desta pentose nestes micro-organismos.

Figura 12: Esquema simplificado do metabolismo de D-xilose por meio de leveduras



Fonte: Adaptado de Parajó, Domínguez e Domínguez (1998).

A xilose redutase (XR) é uma enzima dependente de NADPH típico, enquanto que o xilitol desidrogenase (XDH) requer NADP⁺. Assim, a conversão de D-xilitol ocorre em dois passos, um passo de redução, seguido por um passo de oxidação. Inicialmente a D-xilose é reduzida para D-xilitol por NADPH e, subsequentemente, este metabolito é oxidado para D-xilulose por NADP⁺ (Figura 12), com estas duas reações consideradas limitantes na fermentação de D-xilose para produção de D-xilitol (ZHANG et al., 2012).

2.3.2 Micro-organismos usados para produção de xilitol

O xilitol é um intermediário no metabolismo de D-xilose em micro-organismos e se torna uma alternativa atrativa para a sua produção. Micro-organismos que assimilam e fermentam mais facilmente xilose que glicose são utilizados como agentes neste processo. No entanto, embora em pequeno número, existem bactérias, leveduras e fungos capazes de assimilar e fermentar xilose a xilitol, etanol e outros compostos (BARNETT et al., 2003).

As leveduras são ainda o principal foco de estudos que objetivam produzir xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos. Estes micro-organismos podem produzir xilitol como um metabólito intermediário durante o metabolismo da D-xilose. Dentre esses micro-organismos, as leveduras *Candida guilliermondii* e *Candida tropicalis* são comumente as mais utilizadas para produção de xilitol (ZHANG et al., 2012).

Numerosas espécies microbianas têm um sistema metabólico com XR dependente de NADPH e NAD⁺ dependente de XDH como cofactores e estas enzimas são induzidas por xilose. Entre os gêneros capazes de produzir xilitol, *Candida* é o mais estudado e permanece como um micro-organismo promissor. Com este tipo de micro-organismo, a disponibilidade de oxigênio é o fator mais importante na produção de xilitol a partir de D-xilose. Sob condições limitadas de oxigênio, fosforilação oxidativa pode não re-oxidar todo o NADH produzido. Assim, as concentrações intracelulares aumentam NADH e leva ao acúmulo de xilitol (SENE et al., 2000).

Estudos mostraram valores variáveis para a produção de xilitol por processos biotecnológicos utilizando leveduras a partir de resíduos industriais. Pode ser prontamente observado que os resultados são muito discrepantes e estão relacionados com a diferentes espécie microbiana e as condições de crescimento envolvido (fontes de carbono e nitrogênio, pH, aeração, dentre outros). O controle dessas condições é, portanto, de fundamental importância para aperfeiçoar o processo de produção de xilitol (ALBUQUERQUE et al., 2014).

No entanto, os resultados das pesquisas em escala laboratorial, embora promissores, não são ainda suficientes para ampliação de escala principalmente em função da produtividade do xilitol ser ainda relativamente baixa ao se comparar com o processo químico. Este fato deve-se à presença nos hidrolisados, de compostos tóxicos aos micro-organismos, como fenólicos, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural, provenientes do procedimento de hidrólise ácida da biomassa (VARIZ, 2011).

2.3.2.1 *Candida guilliermondii*

C. guilliermondii foi primeiramente descrita por Castellani no início do século XX como *Endomyces guilliermondii*. Este fungo foi isolado em pacientes com bronchomycosis no Sri Lanka (CASTELLANI, 1912).

C. guilliermondii, também conhecida por *Meyeromyza guilliermondii*, pertence aos *Ascomycetes* e tem sido estudado ao longo dos últimos 40 anos devido ao seu potencial

biotecnológico. Essa levedura apresenta versatilidade industrial devido à alta adaptabilidade e capacidade de resistência relatada ao gênero, e está ainda entre as espécies de leveduras capazes de utilizar *n*-alcanos como única fonte de carbono para obter energia sendo capaz de produzir *single-cell protein* a partir de hidrocarbonetos (PAPON et al., 2013).

Para aplicação industrial, cepas são capazes a crescer a pH fortemente ácido (<4), estes valores de pH podem ser utilizados por apresentar menor contaminação bacteriana, permitindo o cultivo não-estéril, a qual é uma principal fator econômico, além de facilitar o processo de ampliação de escala (TAMBURINI et al., 2010).

C. guilliermondii é tipicamente representante de leveduras aeróbias e não pode crescer sob condições estritamente anaeróbicas. A temperatura de crescimento padrão para *C. guilliermondii* é 30 °C e o limite superior é de cerca de 42 °C. Meios padrões para do cultivo de leveduras são usadas para *C. guilliermondii* (PAPON et al., 2013).

Um estudo foi realizado para verificar o comportamento de *Candida guilliermondii* durante a fermentação em meio sintético contendo uma mistura de fontes de carbono de glicose, xilose e arabinose, demonstrou-se que essa levedura assimila concomitantemente glicose e xilose (MUSSATTO et al., 2006).

De acordo com outro autor a glicose é utilizada como fonte energética para crescimento celular enquanto a xilose é desviada para produção de xilitol e manutenção celular quando há ausência de glicose; no entanto, a arabinose foi assimilada pela levedura apenas quando não havia outra fonte de carbono. No entanto, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana a *C. guilliermondii* apresentou capacidade em degradar arabinose lentamente, mesmo na presença de baixas concentrações das demais fontes de carbono (ARRUDA, 2011).

2.4. APLICAÇÕES DO XILITOL

No mercado já se pode encontrar vários produtos que contêm xilitol em sua formulação, tais como gomas de mascar, balas, compotas, caramelos, chocolates, geléias, sobremesas, produtos de confeitaria, pudins, etc., devido ao seu efeito refrescante e sobretudo pela sua ação anticariogênica. Na área de dentifrícios podemos destacar os cremes dentais e soluções para lavagem bucal. Na indústria farmacêutica, o xilitol pode ser empregado como adoçante ou excipiente na formulação de xaropes, tônicos e preparações de vitaminas (BAR, 1991).

A principal característica do presente poliol é seu alto poder de refrigeração inerente ao seu elevado calor endotérmico ($34,8 \text{ cal g}^{-1}$). Tem sido vastamente citado na literatura por possuir características organolépticas e benefícios para a saúde, tais como: elevada solubilidade (ELAMIN et al., 2012) as baixas taxas de glicemia (ISLAM, 2011), ausência de carcinogenicidade, para pessoas obesas e para pacientes portadores de deficiência de glicose 6-P-desidrogenase (MUSSATTO; ROBERTO, 2002).

Além disso, o xilitol não participa da reação de Maillard (que podem provocar a formação de compostos de escurecimento em produtos alimentares) e, portanto, não diminui o valor nutricional das proteínas presentes. Essas características confirmam a sua aplicação em processos de produção de alimentos (MONEDERO et al., 2010).

O uso mais importante, entretanto, é na substituição do açúcar presente em produtos altamente açucarados, como o leite condensado, que pode caramelizar durante o processamento ou a estocagem. A reação de Maillard, ou seja, reação química entre açúcares e proteínas aceleradas por altas temperaturas e que provoca escurecimento, não ocorre com o xilitol, uma vez que este açúcar não possuem grupos aldeídicos ou cetônicos em sua molécula; assim, não participam de reações com aminoácidos (AGUIAR et al., 1999).

2.4.1 Fatores que influenciam na bioconversão de xilose em xilitol

2.4.1.1 Temperatura

A maioria dos estudos revelam que os processos biotecnológicos utilizando leveduras foram realizadas na temperatura de $30\text{-}37^\circ\text{C}$, provando assim ser ótima para estes micro-organismos na produção de xilitol (PING et al., 2013).

No entanto, alguns pesquisadores evidenciam que as temperaturas mais elevadas podem ser empregues quando utilizam micro-organismos termotolerantes como é o caso da levedura *K. marxianus* que se destaca em estudos de fermentação quando comparado a outros micro-organismos. Rodrussamee et al. (2011) estudaram o potencial de *K. marxianus* DMKU3-1042 na produção de xilitol e etanol de açúcares presentes nos hidrolisados de hemicelulose a temperaturas elevadas (30 , 40 e 45°C). O crescimento celular e o consumo de açúcar foram observados em todas as temperaturas estudadas, confirmando que a estirpe pode crescer a temperaturas elevadas. É importante ressaltar que o crescimento de células mostrou diminuição de sua intensidade, com o aumento da temperatura. A 30°C , a produção de etanol foi de $2,5 \text{ gL}^{-1}$ em 72 h, e a produção de xilitol foi de $4,3 \text{ gL}^{-1}$ após 48 h. A produção de xilitol foi realmente favorecido a 40°C obtida numa concentração de $7,0 \text{ gL}^{-1}$.

2.4.1.2 pH

Outro parâmetro a ser considerado durante a fermentação em biorreator é o pH que dependendo de sua variação pode afetar diretamente a produção biotecnológica. Estudos mostram que três estirpes de *K. marxianus* (IMB2, IMB3 e IMB4), isoladas a partir de uma destilaria indiana foram caracterizados pelo seu crescimento em xilose a temperaturas elevadas (40-45 °C) e diferentes valores de pH (4,5, 5,0 e 5,5). Observou-se que a temperatura mais baixa (40 °C) a pH 5,5 foi a melhor condição para os rendimentos de etanol e de xilitol, em que os valores de 2,08 g L⁻¹ e 7,36 g L⁻¹, respectivamente, alcançados usando a estirpe IMB4 após 96 h de cultivo (WILKINS, et al., 2008).

2.4.1.3 Aeração

A aeração é vista como um fator importante na produção experimental de xilitol, e a quantidade de oxigênio disponível é um dos fatores determinantes para decidir qual caminho a xilose será desviada fermentação ou respiração, que por sua vez, regula o equilíbrio do consumo de carbono para o crescimento e bioconversão. É evidente que as leveduras requerem pouca oxigenação no meio de cultura para a redução de D-xilose apresentando taxas específicas para cada espécie (EL-BAZ, SHETAIA; ELKHOULI, 2011).

Leveduras não formam um grupo homogêneo com relação a sua eficiência energética. O destino de piruvato, um intermediário glicolítico, determina o tipo de metabolismo. Quando todo o piruvato produzido é convertido através do ciclo do ácido tricarboxílico (respiração), o metabolismo oxidativo ocorre e, sendo reduzida a etanol ou outros compostos, visto que o metabolismo oxi-redutor (fermentação) acontece, sendo capazes de ocorrer simultaneamente nas duas vias metabólicas (ALBUQUERQUE, et al., 2014).

Nos eucariotas, tais como leveduras e fungos filamentosos, D-xilose é convertido em D-xilulose por meio de redução e oxidação, que são catalisadas pela xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH). O fator limitante neste processo é o desequilíbrio redox, que é causada pela diferença na preferência para as coenzimas, NADPH no caso de XR e NAD⁺ no caso de XDH. Este desequilíbrio redox é a principal razão para a atividade pela qual o fermento acumula xilitol durante o cultivo anaeróbico (ZHANG et al., 2011)

2.4.1.4 Fontes de Carbono

O uso de materiais lignocelulósicos para a produção de bioprodutos de alto valor agregado é promissor, uma vez que representam uma fonte abundante e renovável de fontes de carbono. Materiais lignocelulósicos representam uma fonte importante e barata de substratos microbianos. A fração hemicelulósica pode ser hidrolisada para xilose e depois fermentado para xilitol (MIURA et al., 2013).

Diversos estudos avaliaram o uso de hidrolisado sabugo de milho como fonte de carbono. Misra et al., (2013) estudaram também o potencial de hidrolisado de sabugo de milho para a produção de xilitol usando uma cepa de *C. tropicalis*. Estes autores obtiveram uma extração máxima de $20,92 \text{ gL}^{-1}$ de xilose utilizando 1% (v/v) de ácido sulfúrico na hidrólise. Concentrando o hidrolisado até $52,71 \text{ gL}^{-1}$, em relação à concentração de xilose, $15,19 \text{ g de L}^{-1}$ de xilitol foi obtido em 60 h de cultura. Ping et al. (2013) usou um hidrolisado concentrado sabugo de milho não-desintoxicado para a produção de xilitol por *C. tropicalis* CCTCC M2012462, atingindo um máximo de $38,8 \text{ g L}^{-1}$ xilitol.

2.4.1.5 Fontes de Nitrogênio

Várias fontes de nitrogênio estão a ser investigados em estudos biotecnológicos para otimizar o crescimento dos micro-organismos e a produção de metabolitos de interesse. Entre as fontes orgânicas mais estudadas são peptona e extrato de levedura. Já entre as fontes inorgânicas são sulfato e fosfato de amônio, nitrato de sódio e uréia (MIURA et al., 2013).

Santos et al. (2005) estudaram a influência da taxa de aeração a partir de bagaço de cana hidrolisado na célula imobilizada reator de leito fluidizado. Os resultados obtidos mostraram que a concentração de portadores (Cs) teve uma influência negativa sobre o rendimento de xilitol com base no consumo de xilose ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (QP), que a taxa de aeração (AR) teve uma influência positiva na QP e influência negativa sobre $Y_{P/S}$.

2.4.1.6 Inibidores do metabolismo microbiano

A utilização dos hidrolisados hemicelulósicos como substratos para bioconversão de xilose em xilitol é dificultada pela presença de compostos tóxicos ao metabolismo microbiano, os quais são provenientes do processo de hidrólise ácida. Tais compostos podem

ser divididos em quatro grupos: (1) produtos de degradação dos açúcares, incluindo o furfural e o 5- hidroximetilfurfural; (2) produtos de degradação da lignina, incluindo uma variedade de compostos aromáticos tais como vanilina e seringaldeído; (3) substâncias liberadas da estrutura lignocelulósica durante o tratamento, como ácido acético e extrativos da madeira (resinas ácidas, ácidos tanínicos e terpenos) e (4) metais provenientes da corrosão dos equipamentos de hidrólise, em particular os íons ferro, cromo, níquel e cobre (BINOD, et al., 2010).

Os produtos de degradação da lignina têm sido considerados os principais responsáveis pelo efeito inibitório na fermentação de hidrolisados. Tais compostos tendem a limitar a utilização eficaz dos açúcares presentes e conseqüentemente influenciam na formação de produtos. A concentração máxima tolerada de cada inibidor não pode ser estabelecida de uma forma geral, uma vez que é fortemente dependente de fatores como: (1) micro-organismo utilizado e o seu grau de adaptação; (2) condições de cultivo (pH, temperatura, aeração, nutrientes utilizados no meio de cultivo) e (3) forma de condução do processo fermentativo (contínuo, descontínuo, descontínuo alimentado e semicontínuo). Por esse motivo, o conhecimento do grau de toxicidade destes inibidores e como minimizar os seus efeitos é de extrema importância para alcançar processos fermentativos eficientes (CORTEZ, 2005).

2.5 AMPLIAÇÃO DE ESCALA EXPERIMENTAL

Os mecanismos de expansões de repetição de pequena e grande escala têm sido intensamente estudado em muitos sistemas experimentais. A ampliação de escala pode ser definida como um procedimento em que os resultados experimentais com equipamento de menor escala são empregados para projetar e construir um sistema de maior escala, sendo considerado importante passo no desenvolvimento de processos. A variação de escala nesse sentido é conhecida como aumento de escala ou “scale-up” (OKONKOWSKI et al., 2005, ARRUDA, 2011).

Em indústrias onde a conversão da matéria-prima em produto se baseia numa conversão biológica, entre todas as etapas que devem ser ampliadas, inclui-se a etapa de biotransformação, realizada em fermentadores. O desenvolvimento tradicional de processos fermentativos é usualmente executado em três estágios ou escalas que são a de bancada, piloto e industrial (SCHMIDELL et al., 2001).

Na escala de bancada, visando menor custo de operação, os dados básicos sobre o processo devem ser levantados com maior nível de detalhes possíveis. Nessa escala são realizadas tarefas básicas, como a seleção do micro-organismo, o meio de cultura ideal para seu desenvolvimento, condições de temperatura, pH, aeração (caso o processo seja aeróbio), assim como a forma de operação do biorreator. Na escala piloto, como a operação é mais onerosa, deve-se manter constante grande parte das possíveis variáveis. De acordo com os conhecimentos obtidos do processo deve-se definir um determinado critério de ampliação de escala, ou seja, uma determinada grandeza, que deverá ser a mesma na escala piloto em relação à empregada na escala de bancada. A operação de uma escala piloto objetiva especialmente o teste do critério de ampliação de escala (BRANCO, 2010).

Os critérios de ampliação de escala normalmente recomendados para fermentadores ou biorreatores convencionais são: a constância da potência no sistema não aerado por unidade de volume de meio (PV); a constância do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (KLa); constância da velocidade na extremidade do impelidor (tip v); constância do tempo de mistura (mt); constância da capacidade de bombeamento do impelidor (F V L); constância do número de Reynolds (NRe) e a constância da pressão parcial ou concentração de O₂ dissolvido (C). Na escala industrial, devido à própria dimensão, visa o lado econômico do processo e procura-se operar o fermentador sob condições similares às ajustadas na escala piloto, as quais permitiram a obtenção de um desempenho adequado do processo (SCHMIDELL et al., 2001).

2.6 ESTADO DA ARTE (PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL)

LIMA et al. (2014) estudaram a produção biotecnológica de xilitol: avaliação de processo de desintoxicação com lignina residual usando metodologia de superfície de resposta. Os pesquisadores avaliaram por meio da metodologia de superfície de resposta, um tratamento de desintoxicação utilizando lignina residual do bagaço do caju que precipita no licor hidrolisado. O bagaço caju foi submetida à hidrólise ácida utilizando H₂SO₄ 3% (w/w), 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 com ácido diluído para a produção de etanol e xilitol utilizando o bagaço de caju. Os autores estudaram a concentração de ácido sulfúrico adicionado, a concentração de sólidos e foram estudados ainda o tempo de contato para maximizar os rendimentos a partir do bagaço. A fermentação foi conduzida em 4 L de um bioreator em escala de bancada (Marconi, São Paulo, Brasil), a uma temperatura de 30 °C e uma velocidade de agitação de 150 rpm, com um volume de trabalho de 2 L. O biorreator foi inoculado com *Saccharomyces cerevisiae* a uma concentração de células de 10 gL⁻¹ para a produção de etanol. O crescimento celular, o pH, a concentração de oxigênio dissolvido, a concentração do substrato e da concentração de etanol foram monitorizados 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. Imagem de microscopia eletrônica de varredura mostrou as mudanças estruturais físicos do bagaço de caju quando foram tratadas com ácido sulfúrico diluído. Tratamento com ácido sulfúrico diluído-CAB, apresentou açúcares derivados de hemicelulose ao líquido e estes hidratos de carbono podem ser usados para a produção de etanol e de xilitol. Foram encontrados nesta pesquisa uma concentração de etanol de 10,0 gL⁻¹ que foi obtido após 4 h de fermentação por *S. cerevisiae*, em frascos agitados, com um rendimento de 0,49 g / glicose e uma produtividade de 1,43 g/hL num biorreator de 4 L em escala de bancada usando *S. cerevisiae*, a concentração máxima de etanol obteve-se 9,59 ± 1,74 gL⁻¹, e a produtividade máxima obtida foi de 1,22 ± 0,06 g/hL por *Kluyveromyces marxianus* CCA 510 produzindo etanol e xilitol, alcançando uma concentração de 11,89 ± 0,34 gL⁻¹ e 6,76 ± 0,28 gL⁻¹, respectivamente, em 96 h.

O estudo de LIMA (2013) e colaboradores fornecem conteúdo base para esta dissertação. Os pesquisadores investigaram as melhores condições para produção de xilitol utilizando o licor da hidrólise ácida do bagaço do pedúnculo do caju, utilizando-se H₂SO₄ a 3%, razão 1:6, temperatura 105 °C durante 1 hora como melhores condições de tratamento. Foram realizados ainda caracterização da composição lignocelulósica do bagaço seco e hidrolisado, onde foram quantificados os teores de celulose, hemicelulose e lignina. Após a

realização do tratamento o licor foi submetido ao processo de destoxificação para remoção dos compostos tóxicos ao metabolismo microbiano. Um planejamento fatorial 2^4+3 pontos centrais foi utilizado para verificar a influência das concentrações de sulfato de amônio, cloreto de cálcio, farelo de arroz e do pH meio de fermentação sobre a concentração final de xilitol, produtividade volumétrica em xilitol, eficiência e o fator de conversão de xilose em xilitol. Os ensaios fermentativos foram realizados utilizando-se a levedura *Candida guilliermondii* CCT 3544, em frascos de Erlenmeyer com 50 mL do meio, agitados a 200 rpm, 28 °C de 0 a 96 h. Após a definição das melhores condições de cultivo e adsorção foi realizado um ensaio fermentativo em intervalos de tempo 0, 12, 24, 36 e 48 h em frascos de Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, ampliação de escala em 3 vezes, contendo 150 mL do meio in natura, concentrado e concentrado/tratado, com concentração inicial de células 10^7 células.mL⁻¹. A análise geral dos resultados levou à conclusão de que 1 gL⁻¹ de sulfato de amônio, 0,5 gL⁻¹ de cloreto de cálcio, 5 gL⁻¹ de farelo de arroz e o pH 4, representam a composição do meio mais adequada para a produção de xilitol. O licor tratado/concentrado representa o meio mais adequado para fermentação, com concentração celular de $56,4 \times 10^6$ células.mL⁻¹, em 36 h, e produção de xilitol de 3000,14 mg/L, resultando em uma produtividade de 0,063 g/L.h com rendimento de bioconversão de 74,47% e eficiência de 81,21%, ao final de 48 h.

PÉREZ-BIBBINS et al. (2013) estudaram os parâmetros culturais que afetam a produção de xilitol por *Debaryomyces hansenii* imobilizada em alginato. Verificaram que a imobilização das leveduras oferece vantagens operacionais, tais como as altas concentrações de células, e alguns inconvenientes relacionados com o vazamento de células que limita a transferência de massa nas partículas. A influência do tamanho do grânulo, o quitosano, a carga do grânulo, o volume de meio líquido, e o uso de hidrolisados de sabugo de milho e vinhaças como meio de cultura foram analisados para produção de xilitol por *Debaryomyces hansenii* imobilizada em esferas de alginato. Os resultados mostraram um crescimento abundante de células livres, que representam 75-95% da biomassa, mas eletromicrografias revelaram a geração de um biofilme denso, com a morfologia das hifas na superfície do cordão e um crescimento intraparticular muito baixo. A produção de xilitol não foi afetada pelo tamanho da partícula; no entanto a quitosana teve um efeito negativo. O uso de sabugo de milho como fonte de carbono e vinhaça dupla diluído como nutrientes econômicos incrementam a concentração de xilitol a 13,7 gL⁻¹ (YP/S = 0,56 gg⁻¹; QP = 0,29 gL⁻¹ h⁻¹). As melhores condições corresponderam a encargos de alta importância e volumes líquidos intermediários (44 g Na-alginato e 110 ml de meio líquido). Esses resultados mostraram a

viabilidade da utilização destes substratos baratos, refletiu a importância das condições micro aeróbicas, e apontou para o efeito favorável de imobilização de células no metabolismo de produção de xilitol.

ZHANG et al. (2012) investigaram a produção de xilitol a partir de D-xilose e hidrolisado hemicelulósico de resíduos hortícolas por um novo isolado de *C. athensensis* SB18. Utilizou-se 30 mL meio de cultivo. A cultura foi preparada pela inoculação de alças cheias de células de levedura a partir das inclinações armazenados YPX em frascos de 100 mL de Erlenmeyer contendo 30 ml de meio YPX-YE incubação a 30 °C e 250 rpm durante 24 h. Em seguida as células foram recolhidas e centrifugadas a 12.000 xg durante 10 min a 4 °C. Os sedimentos celulares foram lavados duas vezes com água estéril e armazenado a 4 °C, para a utilização como inóculo. Os frascos foram inoculados com um tamanho de inóculo de 0,5 gL⁻¹ e incubadas a 30 °C durante 4-7 dias. Experimentos foram conduzidos variando a fonte de nitrogênio, velocidade de agitação, e concentração de xilose inicial. Amostras foram retiradas periodicamente para determinar a densidade de células a 600 nm. Produção de xilitol foram realizadas num Bioreator contendo 1,5 L meio YNB suplementado com 250 gL⁻¹ de xilose. Meio de fermentação com 0,5 gL⁻¹ de inóculo de *C. athensensis* SB18 foi realizado durante 24 h. Os frascos foram incubados a 30 °C e 200 rpm durante 36 h e depois a 100 rpm durante o tempo restante. Este estudo explorou o potencial dessa estirpe para produção de xilitol, apresentando um consumo de 300 gL⁻¹ de D-xilose e rendimento de 0,87g/g, resultando em 256,5 gL⁻¹ de xilitol, demonstrando que a *C. athensensis* SB18 é uma linhagem promissora para título elevado e alto rendimento de produção, além de possuir grande potencial na bioconversão do hidrolisado hemicelulósico. Micro-organismos e cultivo de *C. athensensis* SB18 foi mantida em extrato de levedura-peptona-xilose- ágar (YPX).

HUANG et al. (2011) verificaram uma tecnologia aplicável de bioconversão de xilitol como parte da integração da geração de co-produto dentro do processo de etanol lignocelulósico por meio do desenvolvimento de uma cepa de levedura produtora de xilitol em hidrolisado sem desintoxicação. A cepa de levedura foi isolada a partir da lama residual da fábrica de etanol mini piloto celulósico a INER, onde a matéria-prima utilizada foi à palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar e o capim elefante e a levedura denominada *C. tropicalis* JH030. Os resultados demonstraram o potencial de um novo isolado na produção de xilitol onde a levedura proporciona um bom rendimento de xilitol de 0,71 para a palha de arroz, 0,51 para o bagaço de cana e baixo rendimento de 0,36 para o capim elefante. No entanto, não é necessário realizar a destoxificação do hidrolisado e alguns nutrientes adicionais não

necessitam ser adicionados à fermentação aumentando as vantagens econômicas desta levedura para a produção de xilitol.

VARIZ (2011) avaliou a biomassa de sorgo forrageiro para a produção biotecnológica de xilitol, onde foram avaliadas 3 variedades (0942-032, 0942-058 e 0942-064), respectivamente (A, B e C) de biomassa de sorgo forrageiro empregando a levedura *C. guilliermondii* como agente de fermentação. Além disso, aplicou-se diferentes etapas do processo como a caracterização química das variedades, hidrólise ácida, concentração a vácuo, destoxificação e fermentação dos hidrolisados. Observou-se pela caracterização química das 3 variedades avaliadas que não houve diferenças relevantes quanto aos teores de celulose, hemicelulose e lignina. No entanto, os valores máximos de rendimento e produtividade de xilitol foram respectivamente de 0,35g/g e 0,16 g/L.h⁻¹ para a variedade A, consequentemente as máximas atividades enzimáticas ocorreram nas fermentações realizadas com a variedade A, embora não se observe diferenças marcantes quando comparadas com as demais variedades.

TAMBURINI et al. (2010) pesquisou o efeito do co-substrato em xilose redutase, os níveis de atividade de xilitol desidrogenase e sua consequência sobre a produção de xilitol por *C. tropicalis*. Eles estudaram que com a utilização de leveduras fermentadoras de xilose, o substrato é convertido diretamente em xilitol por uma NAD (P) H-dependente redutase (XR). O xilitol é oxidado, por sua vez por uma desidrogenase dependente de NAD + (XDH), proporcionando xilulose, que é canalizado para a via das pentoses-fosfato. Na ausência de outras fontes de carbono, uma fração significativa do xilitol é usada para estimular o crescimento celular. Então, para evitar a perda de excesso de produção e maximizar a produção de xilitol, de uma série de mono e dissacarídeos foram testados como co-substratos para uma estirpe hiper-acidofílicas de *Candida tropicalis*. Seu efeito sobre a XR e XDH e os níveis de atividade específica foi avaliada, e a expressão resultante da via induzida e a XR: relação XDH foram relacionados para tanto os rendimentos não-otimizados ou otimizados. Contudo, verificou-se que a adição de concentrações baixas de maltose aumentou significativamente o crescimento da biomassa e a acumulação de xilitol.

CASSALES (2010) investigou a otimização da hidrólise da casca de soja (*Glycine max*) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por micro-organismos sobre este hidrolisado. De acordo com o autor a casca de soja mostrou-se um resíduo bastante promissor apresentando teor de lignina menor que 10% e teor de açúcares fermentescíveis de 65%. Foram realizados dois planejamentos experimentais a fim de extrair as melhores condições para as variáveis de temperatura e concentração de ácido com o intuito de obter

apenas as variáveis significativas para liberação de açúcares. Segundo o autor da pesquisa o melhor tratamento foi com a temperatura de 118°C e 2,8 mmol H₂SO₄ g⁻¹ SS em 40 min. Após a otimização do tratamento de hidrólise foram realizados cultivos com hidrolisado obtido no melhor tratamento e concentrado 4 vezes. As fermentações foram realizadas em biorreatores de cultivo submerso contendo 1,3 mL de meio sob condições anaeróbicas e microaerófilas (1 vvm). Os cultivos foram mantidos a 30 °C e a agitação foi de 200 e 300 rpm, o tempo de cultivo foi de 132 h e as amostras foram retiradas a cada 12 h. Com relação a produção de etanol e xilitol foram avaliados cultivos de isolados microbianos contendo *Zymomonas mobilis*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* que em condições anaeróbicas, produziu 3,1 gL⁻¹ de xilitol e 2,2 gL⁻¹ de etanol em 132 h de cultivo sobre o hidrolisado e meio sintético. Este consórcio, em condições microaerófilas, produziu 6,7 gL⁻¹ de etanol (12 h) e 2,3 gL⁻¹ de xilitol (84 h de cultivo) sobre o hidrolisado de casca de soja e consumiu 100% dos açúcares presentes no cultivo sobre meio sintético sem produção de etanol e xilitol. Já com a *C. guilliermondii* e *Debaromyces hansenii* reconhecidas produtoras de xilitol foram testadas isoladamente. A *Cândida guilliermondii* produziu 1,4 gL⁻¹ de etanol (60 h) e 3,6 gL⁻¹ de xilitol (120 h). Para *Debaromyces hansenii* não houve produção de etanol apenas de 8 gL⁻¹ de xilitol (24 h).

LORENÇO (2009) verificou algumas leveduras para bioconversão de D-xilose em xilitol. O procedimento experimental utilizado foi dividido em duas fases, na primeira fase realizou-se o isolamento, purificação e caracterização molecular das leveduras obtidas de torta de filtro. Na segunda fase foram realizados testes de fermentação dos micro-organismos usando meio sintético. Cinco linhagens de leveduras foram utilizadas (*C. tropicalis* MVP 03, MVP 16, MVP 17, MVP 40 e *C. rugosa* MVP 21) e três leveduras pertencentes a USP (*Kluyveromyces marxianus* IZ 1339, *C. tropicalis* IZ 1824 e *C. guilliermondii* FTI 20037), para formação de xilitol em meio sintético utilizando D-xilose como única fonte de carbono, durante 96 h de fermentação. Os resultados demonstraram que as leveduras *C. tropicalis* MVP 03, MVP 16 e MVP 40 apresentaram-se como excelentes produtoras de xilitol. Verificou-se que o isolamento de leveduras de resíduos agroindustriais apresentou grande potencial na obtenção de leveduras adaptadas para bioconversão de D-xilose em xilitol.

BIER et al. (2007) avaliaram o crescimento e consumo de xilose de *C. guilliermondii* na fermentação submersa utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima para produção de xilitol por via biotecnológica. Realizaram-se ensaios em duplicata, onde foi testada a capacidade fermentativa de três cepas de *C. guilliermondii* (LBP018, LBP075 3 LBP076) nos tempos de 0, 24, 48,72 e 96 h. Foi realizada hidrólise ácida para conversão de

xilana em xilose. Utilizou-se em seguida, carvão ativado para purificação do hidrolisado e suplementação do meio de fermentação com sulfato de amônio e farelo de arroz. A fermentação foi realizada em misturados shaker a 150 rpm e temperatura de 30 °C. Com base nos resultados obtidos no experimento foi possível estimar por meio do crescimento de leveduras e do consumo de xilose, que a levedura LBP018 obteve maior quantidade de biomassa e consumo de xilose quando comparado com as demais cepas utilizadas, porém alguns fatores indicaram que o xilitol possa não ser o produto principal nesse caso. Sendo assim seria necessário realizar um estudo paralelo para obtenção de dados mais conclusivos.

CUNHA (2006) estudou a produção microbiológica de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em sistemas fermentativos com células da levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 imobilizadas em suportes sintéticos de álcool polivinílico (PVA). Foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar proveniente da usina Costa Pinto do Grupo, posteriormente exposto ao sol durante 3 dias para secagem. O hidrolisado foi obtido por hidrólise ácida com o objetivo de extração da xilose presente na fração hemicelulósica e concentrado 5 vezes, sob pressão reduzida em concentrador com capacidade de 30L a 70°C, para aumentar do teor de xilose. As células foram imobilizadas por aprisionamento em esferas de PVA-criogel para a definição das melhores condições de imobilização do microrganismo na matriz de PVA. Diante dos resultados, verificou-se que o processo com PVAcriogel na imobilização das células do microrganismo mostrou ser uma técnica promissora, além de apresentar-se como uma nova alternativa na busca de um bioprocessos para obtenção de xilitol, levando a um aumento de até 37% na produção de xilitol, 57% no fator de rendimento e de 120% na produtividade volumétrica.

CANILHA et al. (2005) analisaram as estratégias de preparação do inóculo para bioprodução de xilitol utilizando hidrolisado de palha de trigo como fonte de xilose e a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037. Onde foram realizadas diferentes estratégias para a preparação do inóculo visando um melhor aproveitamento do meio para melhorar a produção de xilitol, a primeira utilizou o crescimento das células em um meio preparado com glicose (7 gL⁻¹) e xilose (30 gL⁻¹) como fontes de carbono, já na segunda utilizou-se para o crescimento das células um meio preparado somente com glicose (37 gL⁻¹). Foi utilizada a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037. Nesta etapa, foram estudados dois meio-sintéticos para o crescimento das células: Meio preparado com (gL⁻¹): 30,0 de D-xilose, 7,0 de glicose, 2,0 de sulfato de amônio, 0,1 de cloreto de cálcio e 20,0 de farelo de arroz; meio preparado com (gL⁻¹): 37,0 de glicose, 2,0 de sulfato de amônio, 0,1 de cloreto de cálcio e 20,0 de farelo de arroz. As células foram cultivadas em incubadora de movimento circular a 200 rpm, 30 °C, por 24

h. Em seguida, foram recolhidas por centrifugação a $2000 \times g$ por 20 min, e lavadas com água esterilizada, para o preparo da suspensão que foi utilizada como inóculo da fermentação. O meio de fermentação consistiu no hidrolisado tratado, suplementado com 1 gL^{-1} de sulfato de amônio e 5 gL^{-1} de farelo de arroz. Os ensaios foram conduzidos em frascos “Erlenmeyer” de 125 mL com 50 mL de meio em incubadora de movimento circular a 200 rpm, 30°C , por 72 h. A concentração inicial de células nos frascos foi de $0,5 \text{ gL}^{-1}$. De acordo com os resultados, pode ser concluído que não é necessário o uso de um meio contendo xilose para o crescimento das células no inóculo quando se utiliza o hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo como fonte de xilose para produção de xilitol, quando se refere ao aspecto econômico.

CANETTIERI et al. (2002) pesquisaram a forma de obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto empregando a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 para avaliar a influência da sua suplementação com os nutrientes sulfato de amônio, cloreto de cálcio e farelo de arroz, bem como a concentração de xilose no hidrolisado, o pH e o tempo de fermentação na produção de xilitol. Os cavacos de eucalipto foram submetidos a hidrólise ácida resultando em um hidrolisado hemicelulósico rico em açúcares fermentescíveis. A partir dos resultados, pode-se verificar que a formação de xilitol do hidrolisado hemicelulósico de cavacos de eucalipto foi influenciada pela presença de sulfato de amônio e farelo de arroz, pela concentração de xilose no hidrolisado e pH inicial de fermentação. De acordo com os resultados, pode-se concluir que as melhores condições para produção de xilitol foi de 1 gL^{-1} de sulfato de amônio, 1 gL^{-1} de cloreto de cálcio, 5 gL^{-1} de farelo de arroz, pH de 5,78, com isso, obteve-se $48,08 \text{ gL}^{-1}$ de xilose durante 72 h de fermentação, produzindo $7,61 \text{ gL}^{-1}$ de xilitol.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATÉRIA-PRIMA

O bagaço do pedúnculo do caju utilizado nesta pesquisa foi adquirido na indústria de polpa de fruta IDEAL, localizada na cidade de João Pessoa, Paraíba. Em seguida, o bagaço foi transportado para o Laboratório de Produtos Fermento Destilados (LPFD), onde foram realizadas duas etapas iniciais para o tratamento: duas lavagens do bagaço do pedúnculo do caju com água destilada a uma temperatura de 50 °C durante 20 min cada lavagem; após esse procedimento o bagaço foi submetido a mais duas lavagens com água destilada a temperatura ambiente (28 °C) para extrair os açúcares remanescentes que permanecem após processamento da polpa, até atingir °Brix zero.

Em seguida, o bagaço foi conduzido para secadores de bandejas convectivos a uma temperatura de 55°C por cerca de 2 h. A biomassa seca foi fragmentada em moinho de facas (marca MARCONI) com a finalidade de reduzir o tamanho da fibra a 48 mesh (0,297 mm), ou seja passou por um tratamento físico (Figura 13), depois acondicionado em sacos plásticos de polipropileno com aproximadamente 1 kg do bagaço seco em cada embalagem, e armazenado para posterior utilização no decorrer da pesquisa.

Figura 13: Bagaço do pedúnculo do caju seco a 48 mesh



3.1.1 Otimização das condições da hidrólise ácida do bagaço do pedúnculo de caju

O bagaço de pedúnculo de caju seco foi submetido a hidrólise ácida para extração da fração hemicelulósica.

Para verificar a influência das variáveis: temperatura, concentração sólido/líquido (Bagaço/solução ácida) e concentração do ácido na hidrólise do bagaço de pedúnculo de caju aplicou-se o planejamento experimental fatorial 2^3+3 pontos centrais, totalizando 11

experimentos. Os valores referentes as variáveis independentes estão ilustrados na Tabela 2, onde os níveis codificados estão representados como (-1), (0) e (+1).

Tabela 2: Variáveis de entrada com os níveis reais e codificados utilizados no planejamento experimental do tratamento ácido do bagaço do pedúnculo do caju

Fatores	Nível - 1	Nível 0	Nível + 1
Temperatura (°C)	105	130	160
Concentração do ácido (%)	1	2	3
Razão Bagaço/solução ácida	1:6	1:9	1:12

Os experimentos do planejamento foram realizados em reator de aço inoxidável (marca MAINTEC FORNOS INTI) com controlador térmico FE50RP (sistema de automação de tempo e temperatura interna/externa) e capacidade máxima de 700 mL. Este foi carregado com o bagaço do pedúnculo do caju, de acordo com a matriz do planejamento apresentada na Tabela 3 que representa a matriz experimental do planejamento referente ao tratamento ácido estudado.

Tabela 3: Matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 com três repetições no ponto central do tratamento ácido

Ensaio	Variáveis codificadas (reais)		
	Temperatura (°C)	Concentração do ácido (%)	Razão Bagaço/solução ácida
1	-1 (105)	-1 (1)	-1 (1:6)
2	+1 (160)	-1 (1)	-1 (1:6)
3	-1 (105)	+1 (2)	-1 (1:6)
4	+1 (160)	+1 (2)	-1 (1:6)
5	-1 (105)	-1 (1)	+1 (1:12)
6	+1 (160)	-1 (1)	+1 (1:12)
7	-1 (105)	+1 (2)	+1 (1:12)
8	+1 (160)	+1 (2)	+1 (1:12)
9	0 (130)	0 (3)	0 (1:9)
10	0 (130)	0 (3)	0 (1:9)
11	0 (130)	0 (3)	0 (1:9)

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 (parte líquida) juntamente com o bagaço (parte sólida). As partes foram separadas por filtração e armazenadas, sob refrigeração.

A fração líquida foi submetida à análise cromatográfica, com o objetivo de se determinar a presença de açúcares, ácidos orgânicos e produtos de degradação.

Os dados obtidos foram analisados pela metodologia de análise de superfície de resposta utilizando o software STATÍSTICA versão 5.0. 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 ($p < 0,05$).

Após definida as melhores condições do processo de hidrólise, foram produzidos quatro litros de licor, nas condições otimizadas, para o estudo posterior de ampliação de escala na produção de xilitol em biorreator. O reator utilizado foi o mesmo que para a otimização, tem um volume útil de 700 mL, logo para obtenção dos 4000 mL foram realizados 12 operações.

3.1.2 Hidrólise do bagaço do pedúnculo de caju em reator de 20L

Para a obtenção do licor com aumento de 8 vezes na escala experimental, em relação ao estudo realizado previamente com 250 mL de hidrolisado (Lima et al., 2014), utilizou-se um reator rotatório de 20 L de capacidade nominal (AU/E-20, Regmed Indústria Técnica Ltda) apresentado na Figura 14. Foram colocados no reator o bagaço de pedúnculo de caju in natura e a solução ácida, em seguida, foi fechado e iniciou-se o aumento da temperatura utilizando um sistema de aquecimento da resistência elétrica.

A contagem do tempo foi iniciada quando o processo atingiu a temperatura desejada. Finalizada a reação, o reator foi despressurizado, através da abertura de uma válvula localizada na parte superior do reator, com o objetivo de acelerar o resfriamento do sistema reacional. A temperatura foi reduzida a 90 °C e, em seguida, o reator foi descarregado.

A fração sólida obtida foi separada para caracterização físico-química. A fração líquida foi submetida à análise cromatográfica, com o objetivo de se determinar a presença de açúcares, ácidos orgânicos e produtos de degradação.

Figura 14: Reator de 20 L (Regmed, AU/E-20), utilizado no tratamento ácido de bagaço do pedúnculo do caju



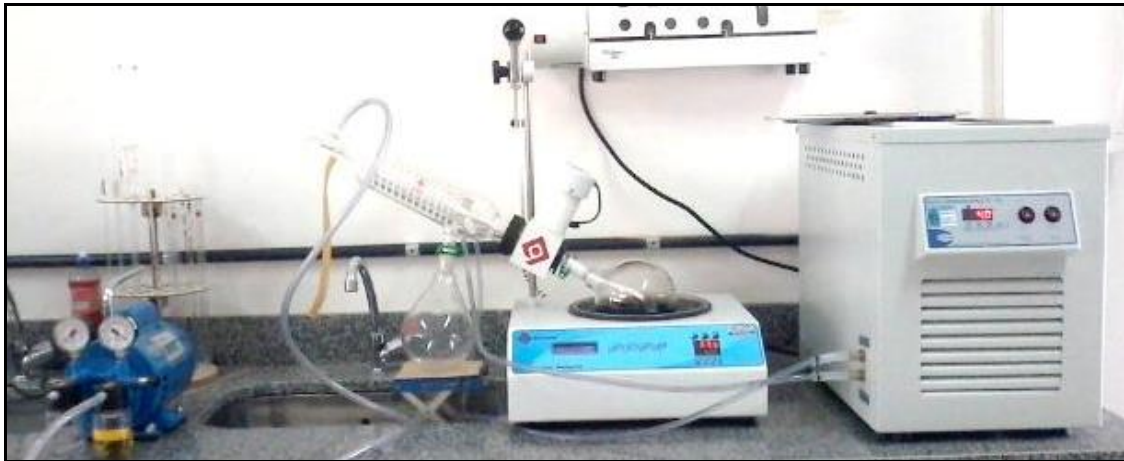
Fonte: (VASCONCELOS, 2012).

3.2 CONCENTRAÇÃO DO LICOR HIDROLISADO

O licor hidrolisado, obtido no reator de 700 mL, foi concentrado em um evaporador rotativo digital (marca QUIMIS) conectado a uma bomba de vácuo (marca PRISMATEC) acoplado a um sistema de refrigeração de água por meio do Banho Ultratermostático SL 152/10 (marca SOLAB) como segue na Figura 15. Para o procedimento de concentração utilizou-se rotação de 0,60 rpm e 250 mL em cada etapa, do início ao fim da concentração foram gastos aproximadamente 3 h.

A temperatura utilizada foi de 80 ± 5 °C com o propósito de aumentar a proporção dos açúcares nos licores, principalmente a xilose. A concentração foi realizada por meio da redução de 2,1 vezes seu volume inicial. O hidrolisado concentrado foi congelado para posterior uso como meio de cultivo.

Figura 15: Sistema utilizado para concentração dos licores hidrolisado



Na Figura 16 verifica-se o fluxograma referente às etapas do processo de obtenção biotecnológico de xilitol provindo do bagaço do pedúnculo do caju.

Figura 16: Fluxograma geral do processo de obtenção biotecnológica de xilitol proveniente do bagaço do pedúnculo do caju



3.3 CARACTERIZAÇÃO DO BAGAÇO DO PEDUNCULO DE CAJU IN NATURA E HIDROLIZADO

A caracterização do bagaço do pedúnculo do caju seco foi realizada por meio de análises da composição lignocelulósicas (celulose, hemicelulose e lignina), físico-químicas investigando a granulometria, densidade aparente e as concentrações de umidade, pH, resíduo mineral fixo (cinzas), proteínas, sólidos solúveis, açúcares redutores em glicose e extrativos.

3.3.1 Umidade Relativa

Para verificar o conteúdo de umidade inicialmente pesou-se 3 gramas do bagaço seco em cápsula previamente seca e tarada. As amostras em triplicata foram inseridas na estufa para secagem direta a 105 °C, por 4 h. Após esse período as amostras foram resfriadas em dessecador até temperatura ambiente, pesados. Refazer esta operação até massa constante (BRASIL, 2008).

$$Umidade(\%) = \frac{(peso\ inicial - peso\ final\ da\ amostra)}{peso\ inicial\ da\ amostra} \times 100 \quad (1)$$

3.3.2 Resíduo Mineral Fixo (Cinzas)

Para sua determinação foram utilizados cadinhos de porcelana vazios antecipadamente aquecidos em mufla a 550 °C por 30 min, disposto em dessecador até temperatura ambiente e registrou-se o peso dos cadinhos vazios e contendo 5 gramas da amostra. Posteriormente as amostras foram carbonizadas até que não produza mais fumaça, seguida de incineração em forno mufla à temperatura de 550 °C até obter cinza brancas ou de cor clara. Resfriar em dessecador até temperatura ambiente e pesar o material, calculando-se a concentração de acordo com a Equação (2) (BRASIL, 2008).

$$Cinzas(\%) = \frac{peso\ final\ da\ amostra}{peso\ inicial\ da\ amostra} \times 100 \quad (3)$$

(2)

3.3.3 Proteínas

A determinação de proteína foi realizada com base no teor de nitrogênio total através

do método de Kjeldahl descrito por Brasil (2008). Esse método utiliza três etapas que podem ser descritas como digestão, destilação e titulação das amostras descritas a seguir. Para o cálculo foi utilizado fator de correção 6,25.

$$Proteínas(g/100g) = \frac{(V_a - V_b) \times (f_a) \times (F) \times (0,14)}{P} \quad (3)$$

V_A = volume de ácido clorídrico 0,1N padronizado gasto na titulação da amostra.

V_B = volume de ácido clorídrico 0,1N padronizado gasto na titulação do branco.

f_a = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1N. (BRASIL, 2008).

3.3.4 Determinação de pH

O pH foi determinado de acordo com a metodologia de Brasil (2008). Na análise preparou-se uma suspensão com 10 mL de água destilada e 0,5 g da amostra sólida. Após homogeneização a amostra foi condicionada ao repouso durante 30 min, posteriormente determinou-se o pH da solução em potenciômetro digital (marca TECNOPON), previamente calibrado com as soluções padrões (4 e 7) a temperatura ambiente.

3.3.5 Sólidos solúveis totais (SST)

Para determinar os sólidos solúveis totais (°Brix), o refratômetro foi previamente calibrado com água destilada, em seguida, foram acrescentados 9 mL de água destilada a 1 g da amostra com posterior agitação até perfeita homogeneização. Em seguida, submetida ao descanso por 30 min, filtrada e realizada a leitura em refratômetro. Em decorrência da diluição o resultado foi multiplicado por 10 para definir o teor de sólidos solúveis presente no bagaço do pedúnculo do caju (BRASIL, 2008).

3.3.6 Açúcares redutores

A concentração de açúcares redutores (AR) foi determinada por meio da metodologia proposta por Miller (1959). Este método consiste na redução do ácido 3,5 dinitrosalicílico (DNS) a 3-amino-5-nitrosalicílico, conjuntamente com a oxidação do grupamento aldeído do açúcar ao grupo carboxílico. A solução tornou-se avermelhada devido ao aquecimento sendo identificada no espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda de 540 nm.

A curva padrão foi utilizada para transformar a leitura de absorbância em miligramas de açúcar redutor por milímetro de solução por meio de cálculos matemáticos. Os resultados foram expressos em miligramas de açúcares redutores por grama de amostra inicial (mg AR/g amostra).

$$AR(g_{AR} / g_A) = \frac{(\text{Absorbância} \times F_C \times 10 \times V_A)}{m_A \times 100} \quad (4)$$

3.3.7 Extrativos

Para a extração de gordura da amostra foram pesados 5 gramas do material vegetal previamente dessecada. Em seguida, foi transferida a substância seca quantitativamente para o cartucho de um aparelho extrator de Soxhlet com auxílio de papel de filtro. Foram utilizados para extração uma mistura de solventes ciclohexano e etanol na proporção de 1:1 v/v, as amostras foram mantidas em aquecimento durante 5-6 h, usando uma temperatura amena para que a amostra não fosse mantida em forte ebulição, fazendo com que a amostragem passe por pelo menos 24 refluxos nesse período. O balão foi previamente aquecido por 1 hora em estufa a 105 °C, resfriado em dessecador por 30 min (até a temperatura ambiente) e pesado. Após a extração, foram retirados os cartuchos dos tubos, novamente fechados e reaquecido até que a seção central do extrator esteja quase cheio, na qual despejou o solvente a recuperar, a operação foi repetida até o balão ficar quase vazio. O solvente restante foi evaporado com cuidado para não queimar a gordura. Posteriormente, o balão com o resíduo em estufa a 105 °C. O balão foi resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado. Esta operação foi repetida até peso constante. A amostra seca e desengordurada foi acondicionada para as análises lignocelulósicas descritas pela TAPPI (2011).

3.3.8 Determinação de lignina

Para determinar lignina foi utilizado segunda as normas da TAPPI T 222 om-22 (2002) com adaptações realizadas por Morais et al. (2010). Foram utilizados 1 g da amostra moída, livre de extrativos e de umidade. Esse material foi disposto em almofariz e adicionado 17 mL de ácido sulfúrico 72%, resfriado previamente em geladeira em torno de 10 °C. Em seguida, o material foi macerado e agitado com o auxílio de um pistilo por 15 min, até o

desaparecimento das partículas visíveis não solubilizadas. Após esse período a amostra foi deixada em repouso durante 24 h.

Transcorrido o tempo de digestão foi acrescentado 306 mL de água destilada ao almofariz para diluir o ácido sulfúrico a 4%, posteriormente o material foi transportado para a filtração, que foi realizada através da bomba a vácuo, conectado a um kitassato de 1000 mL acoplado ao filtro de buchner e papel filtro previamente seco e pesado. A porção disposta no papel de filtro deve ser enxaguada com água destilada até que o filtrado tenha um pH próximo ao da água utilizada. A seguir, o papel foi transportado para estufa a 105 °C, até remoção da água da amostra, inicialmente durante 3 h como parâmetro inicial para secagem e até o peso constante conforme discutido na determinação de umidade.

$$\text{Lignina solúvel}(\%) = \frac{\text{massa lignina seca}}{\text{massa amostra}} \times 100 \quad (5)$$

$$\text{Lignina corrigido } (\%) = \frac{\text{teor lignina solúvel} \times [100 - (\text{teor extrativos} + \text{teor umidade})]}{100} \quad (6)$$

3.3.9 Determinação de holocelulose

Para determinação de holocelulose utilizou metodologia descrita pela TAPPI (2011). Inicialmente, para definir a quantidade de holocelulose presente no material vegetal a ser analisado, foi disposto o papel de filtro em estufa a 105 °C. A seguir, o papel deve ser removido com pinças e acondicionado em dessecador até o momento da utilização. Essa determinação foi realizada em triplicata.

Em um Erlenmeyer de 500 mL foram adicionados 3 gramas do bagaço do pedúnculo do caju seco e livre de extrativos. Posteriormente adicionou-se 120 mL de água destilada ou deionizada. Em uma capela foi preparado um banho-maria de forma a manter a temperatura em 70 °C. Ao Erlenmeyer, foram acrescentados 2,5 gramas de clorito de sódio (NaClO_2), com pureza aproximada de 80%, e 1 mL de ácido acético glacial, com pureza $\geq 99,85\%$. Também se deve acrescentar uma barra magnética para garantir uma agitação constante durante a reação. O conjunto (Erlenmeyer-reagentes) deve ser fechado com um Erlenmeyer de 25 mL e mantido durante 1 hora. Após esse período, foram adicionados novamente 2,5 gramas de clorito de sódio e 1 mL de ácido acético sempre mantendo a temperatura de 70 °C por mais 1 hora. Ao término das 2 h foram adicionados mais 2,5 gramas de clorito de sódio e 1 mL de ácido acético, prosseguindo com aquecimento em banho-maria por mais 3 h.

Durante as 5 h foi providenciada previamente um banho de gelo que cubra além da altura do conteúdo do Erlenmeyer. O recipiente deverá permanecer nesse banho de gelo por 30 min. Concomitantemente, foi preparado a aparelhagem para filtração à vácuo similar ao realizado para análise de lignina. Após a filtração a amostra foi lavada com água destilada e o papel foi transportado para estufa a 105 °C, até remoção da água da amostra, inicialmente durante 3 h como parâmetro inicial para secagem e até o peso constante conforme discutido na determinação de umidade.

$$\text{Holocelulose (\%)} = \frac{(\text{massa holocelulose}_{\text{seca}} - \text{massa papel}_{\text{seco}})}{\text{massa amostra}} \times 100 \quad (7)$$

$$\text{Holocelulose corrigido (\%)} = \frac{(\text{teor holocelulose} - (\text{teor extrativos} + \text{teor umidade}))}{100} \quad (8)$$

3.3.10 Determinação de alfa-celulose

A metodologia de alfa-celulose utilizada neste trabalho foi proposta pela TAPPI (2011) com algumas adaptações. A princípio foi utilizado o papel de filtro quantitativo seco em estufa a 105 °C e guardado em dessecador por 30 min, depois do tempo decorrido o papel foi pesado em balança de quatro dígitos, anotando o valor correspondente para cada papel visto que esse procedimento foi realizado em triplicata.

Cerca de 1 grama do pedúnculo do caju seco foi pesado e disposto em almofariz, à temperatura ambiente, em que possam ser acomodados 100 mL. Foram adicionados 15 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) a 17,5%, aguardou-se 2 min de contato entre a solução e a celulose, e então, começou a triturar o material por 8 min. Ao término desse tempo, foram adicionados 40 mL de água destilada ao almofariz e transferir o conteúdo para a filtração à vácuo. O conteúdo foi transferido do almofariz para o funil de buchner com papel de filtro sob agitação constante para evitar a perda do precipitado. O almofariz foi lavado com mais água destilada e transferido para o funil, em seguida o material foi filtrado com o auxílio de bomba à vácuo com o intuito de agilizar o processo.

O precipitado recolhido no funil após o filtrado atingir pH próximo ao da água utilizada a qual foi verificado através de um potenciômetro digital. O papel de filtro foi transposto para estufa a 105 °C, esse material foi secado até peso constante, conforme discutido na análise de umidade descrita anteriormente nesse trabalho. Após a secagem, o

papel foi colocado em dessecador por 30 min com a finalidade de atingir a temperatura ambiente, depois foi verificado a massa de alfa-celulose em balança analítica.

$$\text{Alfacelulo se } (\%) = \frac{(\text{massa alfacelulo se}_{\text{seca}} \div \text{massa papel}_{\text{seco}})}{\text{massa amostra holocelulo se}} \times 100 \quad (9)$$

$$\text{Alfacelulo se corrigido}(\%) = \frac{(\text{teor holocelulo se}_{\text{corrigido}} \div \text{teor alfacelulo se})}{100} \quad (10)$$

3.3.11 Determinação de hemicelulose

Visto que fazem parte da holocelulose os carboidratos totais presentes na célula vegetal, ou seja, engloba os valores de celulose e dos demais carboidratos.

Sendo assim para encontrar a quantidade de hemicelulose é necessário subtrair os valores expressos ao término do cálculo de holocelulose e alfa-celulose (também conhecida como celulose), como podemos observar abaixo (MORAIS et al., 2010).

$$\text{Hemicelulose corrigido } (\%) = (\text{teor holocelulo se}_{\text{corrigido}} - \text{teor alfacelulo se}_{\text{corrigido}}) \quad (11)$$

3.4 CARACTERIZAÇÃO DOS LICORES

Para a determinação dos teores de açúcares no licor hidrolisado (xilose, glicose e arabinose) e dos inibidores da fermentação (ácido acético, 5-Hidroximetilfurfural e furfural), foi utilizado Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (VARIAN, Waters, Califórnia, USA), equipado com sistema isocrático de solvente, válvula "Rheodyne" com alça de 20 µl; acoplado com uma coluna Agilent Hi-Plex H (7,7 x 300 mm, 8 µ), a uma temperatura de 65 °C, detector de índice de refração (VARIAN), e Software de processamento GALAXIE Chromatography Data System. A fase móvel utilizada foi H₂SO₄ 0,009 Mol/L, a um fluxo de 0,6 mL/min. O tempo de duração da corrida foi de 1 h.

Os cromatogramas das amostras foram comparados com os padrões dos açúcares e inibidores, sendo a quantificação feita pela área do composto em uma curva de calibração de cada composto.

3.5 ESTUDO DO PROCESSO FERMENTATIVO

3.5.1 Micro-organismo

A levedura utilizada na pesquisa foi a *Candida guilliermondii* CCT 3544 obtida na Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosselo – FAT localizada em Campinas. Foi mantida liofilizada a temperatura de 28 °C até o momento da reativação.

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 aproximadamente 10-15 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 (descrito na Tabela 4) e incubado a 28 °C, por 10 dias.

Tabela 4: Meio de Cultura YM (Yeast-Malte Extract) para reativação da linhagem *Candida guilliermondii* CCT-3544

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

A partir da cultura crescida no caldo, foi realizado um repique em placa de Petri contendo meio de cultura YMA (Yeast-Malte Extract Agar) e incubado a 28 °C durante 48 h. Após o crescimento as placas de Petri contendo os micro-organismos foram armazenadas em refrigeração a uma temperatura de 2 a 8 °C.

Tabela 5: Meio de Cultura YMA (Yeast-Malte Extract Ágar) para reativação da linhagem *Candida guilliermondii* CCT-3544

Composição (gL⁻¹)	
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Bacto peptona	5,0
Dextrose	10,0
Ágar	20,0

3.5.2 Preparo do inóculo

Células de *Candida guilliermondii* CCT 3544, foram transferidas em condições assépticas com o auxílio de uma alça de platina, das placas de Petri para tubos contendo 5 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, alíquotas de 1 mL dessa suspensão foi transferido para fracos de Erlemneyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultivo semi-sintético (FELIPE, et al., 1997; CHAUD, et al., 2010), como descrito a seguir:

Tabela 6: Composição do meio semi-sintético utilizado para crescimento do inóculo.

Composição (gL⁻¹)	
Xilose	30,0
Sulfato de amônio	2,0
Cloreto de Cálcio	0,1
Extrato de farelo de arroz	20,0

As soluções foram preparadas separadamente, a solução de extrato farelo de arroz foi obtida utilizando 200 g de farelo para 1 L de água destilada, autoclavado durante 15 min a 111 °C – 0,5 atm com posterior centrifugação por 30 min em condições assépticas a 2000 x g (Excelsa II Centrifuge – 206 BL - FANEM) utilizando posteriormente apenas o sobrenadante como solução de extrato de farelo de arroz (DALANHOL, 2014).

3.5.3 Crescimento da *Candida guilliermondii* CCT 3544 na preparação do inóculo

O estudo da velocidade de crescimento da levedura foi realizado em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultivo semissintético com pH ajustado para 5,5. O meio foi esterilizado e após resfriamento inoculado com a suspensão de levedura. A suspensão foi realizada com auxílio de uma alça de platina, foram tomadas três alçadas da cultura em placas para tubos de ensaio contendo cerca de 5 mL de água destilada esterilizada. A suspensão foi homogeneizada, alíquotas de 1 mL desta suspensão foram então transferidas para os frascos Erlenmeyer contendo meio de cultivo esterilizado. Após inoculação os frascos foram incubados a 28 °C em agitador rotativos tipo shaker (LOGEN SCIENTIFIC), rotação de 200 rpm durante 24 h.

Após esse período as células foram separadas por centrifugação a 2000 x g por 30 min e ressuspensas em água destilada esterilizada, de modo a obter uma solução com concentração de células de 50 gL⁻¹. A partir desta suspensão foi calculado o volume necessário para proporcionar a concentração celular inicial de 3 gL⁻¹.

3.5.4. Análise da concentração de células

A concentração celular foi obtida através de uma curva de calibração mediante a correlação da densidade ótica em espectrofotômetro (DO) com a massa seca de células. Na elaboração da curva, um alíquota de 2 mL células provindas do cultivo de inóculo, foram centrifugadas a 10.000 rpm (centrífuga MINISPIN plus – eppendorf) por 15 min. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas 3 vezes com água destilada, a massa seca foi quantificada após secagem em estufa a 105 °C por 24 h, esta análise de massa seca foi realizada em triplicata.

Simultaneamente, com a mesma amostra de inóculo, foram preparadas diversas diluições (1:1 - 1:2 - 1:5 - 1:10 - 1:15 e 1:20 mL) para construção da curva. Essas diluições foram submetidas à leitura em espectrofotômetro ultravioleta microprocessado marca (QUIMIS) a 600 nm, utilizando água destilada como branco. As amostras retiradas foram diluídas na proporção de 1:25 mL, após homogeneização a suspensão obtida foi analisada em espectrofotômetro.

3.5.5 Cálculo da velocidade específica de crescimento

A velocidade específica de crescimento é obtida pela seguinte expressão (BORZANI et al., 2001):

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

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 $\mu_{\text{máx}}$.

$$\mu_m = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (12)$$

Integrando,

$$\int_{X_i}^X \frac{dX}{X} = \int_{t_i}^t \mu_m dt$$

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

Deste modo, pela equação:

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

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 $\mu_{\text{máx}}$.

A fase exponencial de crescimento também é caracterizada pelo tempo de geração (t_g), que é o tempo necessário para dobrar o valor da concentração celular ($X = 2X_i$).

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

$$\ln \frac{2X_i}{X_i} = \mu_m t_g$$

$$t_g = \frac{\ln 2}{\mu_m} = \frac{0,693}{\mu_m}$$

Como $\mu_{\text{máx}}$ é constante então t_g também é constante nesta fase.
Onde:

X – concentração de células (gL^{-1})

$\mu_{\text{máx}}$ – velocidade específica de crescimento máximo

t – tempo

t_i – tempo início da fase exponencial

3.5.6 Cultivo com meio de hidrolisado de pedúnculo de caju em mesa agitadora (shaker)

O cultivo foi realizado em Erlenmeyer de 1000 mL com 400 mL de meio de cultivo. O meio foi preparado usando o hidrolisado do pedúnculo de caju, obtido no reator de 700 mL, e concentrado, de acordo com as melhores condições nutricionais para o desenvolvimento da *C. guilliermondii* CCT 2544, investigado por Lima (2013), que relatou as seguintes condições: 1 gL⁻¹ de sulfato de amônio, 0,5 gL⁻¹ de cloreto de cálcio, 5 gL⁻¹ de farelo de arroz e pH ajustado para 4 utilizando hidróxido de sódio.

Após esterilização o meio foi inoculado com 3 gL⁻¹ de células, preparadas no inóculo. A fermentação foi conduzida em mesa agitadora com temperatura de 28 °C e agitação de 200 rpm, em duplicata. As amostras foram retiradas a cada 12 h com término de 120 h. Foram realizadas análise de biomassa de células por peso seco e análise de xilose, glicose, arabinose, xilitol e etanol por CLAE.

3.5.7 Processo fermentativo de ampliação de escala

Os experimentos fermentativos com ampliação de escala (16 vezes) foram conduzidos em biorreator marca TEC-BIO com capacidade de 4,5 L (MARCA TECNAL) contendo 1.600 mL do meio de fermentação.

O meio foi preparado, usando o hidrolisado obtido no reator com capacidade de 20 L, de acordo com as melhores condições relatadas por Lima (2013) que foram de 1 gL⁻¹ de sulfato de amônio, 0,5 gL⁻¹ de cloreto de cálcio, 5 gL⁻¹ de farelo de arroz, pH 4,0. Em seguida o meio foi adicionado ao biorreator, este foi fechado e autoclavado a 111 °C – 0,5 atm juntamente com os frascos de ácido orgânico (cítrico), base hidróxido de sódio 3M e óleo mineral durante 20 min.

Posteriormente, o vaso foi removido e resfriado a temperatura ambiente e conectado aos cabos de controle (sensores) de temperatura, pH, oxigênio, nível, dentre outros. Depois desse procedimento deve-se esperar 6 h para polarização do eletrôdo de oxigênio. Foram utilizadas temperatura de 28 °C, agitação 200 rpm, pH 4. Nos tempos 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 e 120 h de fermentação, foram retiradas alíquotas de 6 mL para análises de concentração de celular por massa seca e análises cromatográficas de açúcares e inibidores.

3.6 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS

Foram calculados os parâmetros da fermentação como o fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica (Q_P), eficiência de conversão (η), porcentagem de consumo de xilose ($Y\%$), cálculo da velocidade específica de crescimento (μ_x).

3.6.1 Rendimento teórico de conversão de xilose em xilitol

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad (13)$$

Onde:

$Y_{P/S}$ – Fator de conversão de xilose em xilitol/etanol (g xilitol formado/g xilose consumida g/g)

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

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

3.6.2 Produtividade volumétrica em xilitol

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_f - P_i}{t_i - t_f} \quad (14)$$

Onde:

Q_P – Produtividade volumétrica em produto de xilitol ($g_{xilitol}/formato/L.h$)

Δt – Intervalo de tempo do processo fermentativo (h)

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

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

3.6.3 Eficiência de Conversão de xilose em xilitol

A eficiência de fermentação em porcentagem foi calculada relacionando o rendimento de xilitol através da fermentação com o rendimento teórico ($0,917 \text{ g.g}^{-1}$) (BARBOSA et al., 1988).

$$\eta = \frac{Y_{P/S(Obtido)}}{Y_{P/S(teórico)}} \times 100 \quad (15)$$

Onde:

η – Eficiência de conversão (%)

$Y_{P/S(\text{obtido})}$ – Fator de conversão dos açúcares

$Y_{P/S(\text{teórico})}$ – Fator 0,917 g_{xilitol}/g_{ART}, para xilitol

3.6.4 Velocidade volumétrica de consumo de substrato (xilose)

A velocidade volumétrica de consumo de substrato fundamenta-se no decréscimo de açúcar no decorrer do tempo, de acordo com a Equação 12.

$$r_s = \frac{\Delta S}{\Delta T} = \frac{S_i - S_f}{T_f - T_i} \quad (16)$$

Onde:

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).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADENE (Agência para a Energia); AREAC (Agência Regional de Energia e Ambiente do Centro). **Energias renováveis em meio urbano**. Boletim Técnico, março de 2005.
- AGBOR, V. B.; CICEK, N.; SPARLING, R.; BERLIN, A.; LEVIN, D. B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 675- 685, 2011.
- AGUIAR, C. L.; OETTERER, M.; MENEZES, T. J. B. Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia e Alimentos**, v.33, n.2, p.184-193, 1999.
- AGUIAR JR, W. B.; FARIA, L. F. F.; COUTO, M. A. P. G.; ARAUJO, O. Q. F.; PEREIRA JR, N. P. Growth model and prediction of oxygen transfer rate for xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*. **Biochemical Engineering Journal**, , v.12, p.49-59, Amsterdam, 2002.
- 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.
- ALCÂNTARA, S. R.; ALMEIDA, F. A. C.; SILVA, F. L. H. Pectinases production by solid state fermentation with cashew apple bagasse: water activity and influence of nitrogen source. **Chemical Engineering Transactions**, v. 20, p. 121-126, 2010.
- ALSINA, O. L. S.; ALMEIDA, M. M.; ARAGÃO, R. F. **Estudo das propriedades térmicas da goiaba (*Psidium guajava* L.) e do caju (*Anacardium occidentale* L.)** in: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 12, 2004.
- ALVARADO-MORALES, M.; TERRA, J.; GERNAEY, K. V.; WOODLEY, J. M. Biorefining: Computer aided tools for sustainable design and analysis of bioethanol production. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 87, p. 1171-1183, 2009.
- 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**, Essex, v.101, n. 13, p. 4851-48611, 2010.
- ARRUDA, P.V. **Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 165p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2011.
- BALAT, M., BALAT, H., ÖZ, C. "Progress in bioethanol processing," **Progress in Energy and Combustion Science**. V.34, n.5, p.551-573, 2008.
- BALAT, M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**, v. 52, p. 858-875, 2011.

BÄR, A. Xylito L. In: O'Brien Nabors L, Gelardi RC, editors. **Alternative sweeteners**. 2nd ed. New York: Marcel Deckker; p. 341, 1991.

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.

BARNETT, J., PAYNE, R., YARROW, D. **Yeasts**. Characteristics and identification. 4ed th. Cambridge: Cambridge University Press, 2003.

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**, Valparaíso, v.13., n.3, 2010.

BIER, M. C. J. et al.; Crescimento e consumo de xilose de *Candida guilliermondii* na fermentação submersa utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar. **Evidência**, Joaçaba. v.7, p.119-130, 2007.

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R. R.; VIKRAM, S.; DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S. KURIEN, N.; SUKUMARAN, R. K. PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: An overview. **Bioresource Technology**. Vol. 101, Issue 13, p.4767–4774, July 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.

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

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

BRANCO, L.S.C. **Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa de *Rhodotorula sp.* CNPAT02 em processo de batelada para obtenção de carotenoides**. Dissertação (mestrado) em Engenharia Química. 75p.Universidade Federal do Ceará (UFC). Fortaleza, 2010.

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 Blücher, v., p. 365-380, 2010.

CAGNON, B. B.; PY, X.; GUILLOT, A.; STOECKLI, F.; CHAMBAT, G. Contributions of hemicelulose, cellulose and lignina to the mass and the porous properties of chars activated carbons from various lignocellulosic precursors. **Bioresource Technology**, Essex, v. 100, p. 292-298, 2009.

CANETTIERI, E. V.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A. Obtaining biotechnological xylitol from eucalyptus chips. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 38, n. 3, p.323-331, 2002.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J.B.A.; Strategies for inoculum preparation prior to xylitol bioproduction from wheat straw hydrolysate. **Brazilian Journal of food technology**. 5° SIPAL, 2005.

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.

CARVALHEIRO, f.; DUARTE, L. C.; GÍRIO, F.M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. **Journal ps Scientific and Industrial Research**, New Delhi, v.67, n. 11, p.849-864, 2008.

CASTELLANI A. Observations on the fungi found in tropical bronchomycosis. **Lancet**, v.1, p.13–15, 1912.

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.

CHEN, X. JIANG, Z-H. CHEN, S. QIN, W. Microbial and bioconversion production of xylitol and its detection and application. **International Journal Biological Sciences** . v-6:834–44, 2010.

CORMA, A.; IBORRA, S.; VELTY, A.. Chemical Routes for the transformation of Biomass into Chemicals, **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2411-2502, January, 2007.

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. **influência dos produtos de degradação da lignina na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii***. Dissertação (mestrado), 128p. Lorena - SP-Brasil 2005.

CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion to xylitol. **Food biotechnology**, New York, v.14, p.79-97, 2000.

CUNHA, M. A. A. **Bioprodução de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em sistemas com células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico**. Tese (doutorado) 125p. Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, 2006.

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.

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.

DOMÍNGUEZ, J. M.; CRUZ, J. M; ROCA, E.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Xylitol production from wood hydrolyzates by entrapped *Debaromyces hansenii* and *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.81, p.119-130, 1999.

ECON, L. Ministério da Agricultura , Pecuária e Abastecimento - MAPA Secretaria de Política Agrícola - SPA. p. 1–7, 2013.

ELAMIN, K. SJÖSTRÖM, J. JANSSON, H. SWENSON, J. Calorimetric and relaxation properties of xylitol–water mixtures. **The Journal of Chemical Physics**, v.136:104508, 2012.

EL-BAZ, A.F. SHETAIA, Y.M. ELKHOULI, R.R. Xylitol production by *Candida tropicalis* under different statistically optimized growth conditions. **African Journal of Biotechnology**, v.10, p.53–63, 2011.

FAVERI, D.; TORRE, P.; PEREGO, P., CONVERTI, A. Optimization of xylitol recovery by cristallization from synthetic solutions using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, Essex, 2003.

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, Vitor Francisco; ROCHA, David Rodrigues da; SILVA, Fernando de Carvalho da. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 623-638, Abr. 2009.

FESTUCCI-BUSELLI, R. A.; OTONI, W, C.; JOSHI, C. P. Structure, organization, and functions of cellulose synthase complexes in higher plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2007.

FOELKEL, C. **O processo de impregnação dos cavacos de madeira de eucalipto pelo licor Kraft de cozimento**. Disponível em: <
http://www.eucalyptus.com.br/eucaliptos/PT15_Impregna%C3%A7%C3%A3oCavacos.pdf>. Acesso em: 20 janeiro de 2014.

FRANCESCHIN, G. SUDIRO, M. INGRAM, T. SMIRNOVA, I. BRUNNER, G. BERTUCCO, A. Conversion of rye straw into fuel and xylitol: a technical and economical assessment based on experimental data. **Chemical Engineering Research and Design**, v.89:631–40, 2011.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. In: OLSSON, L (Ed.). **Biofuels**. Berlin: Springer-Verlag, 2007.

GÁMEZ, S., GONZÁLEZ-CABRIALES, J.J., RAMÍREZ, J.A., GARROTE, G., VÁZQUEZ, M. Study of the hydrolysis of sugar cane bagasse using phosphoric acid. *Journal Food Engineering*, v. 74, p. 78–88, 2006.

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

GUANZIROLI, C. E.; FILHO, H. M. S.; JUNIOR, A. S. V. **Cadeia Produtiva da Castanha do Caju: estudo das relações de mercado**. Banco do Nordeste do Brasil, 152p. Fortaleza, 2009.

HARRIS, P. J.; STONE, B. A. **Chemistry and molecular organization of plant cell walls**. In: HIMMEL, M.E. (Ed.). *Biomass Recalcitrance*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, p.60-69, 2008.

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

HIMMEL, M.E. (Ed.). **Deconstructing the plant cell wall for bioenergy**. Biomass recalcitrance. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, 2008.

HUANG, C.F. et al.; Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. **Bioresource Technology**. v.102, p.3322–3329, 2011.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Grupo de Coordenação Estatísticas Agropecuárias – GCEA/IBGE,DPE, COAGRO, Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – Brasil - 2012. Disponível em:
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201301.pdf>. Acesso em: 30 de dezembro de 2013.

ISLAM, S. Effects of xylitol as a sugar substitute on diabetes-related parameters in nondiabetic rats. **Journal of Medicinal Food**, v.14:505–11, 2011.

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**, Oxon, v.100, n.24, p.6378-6384, 2009.

KELLOWAY, A. DAOUTIDIS, P. Process synthesis of biorefineries: optimization of biomass conversion to fuels and chemicals. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.53:5261–73, 2014.

KOUTINAS, AA. VLYSIDIS, A. PLEISSNER, D. KOPSAHELIS, N. GARCIA, I. L. KOOKOS, I. K. PAPANIKOLAOU, S. KWAN, T. H. LIN, C. S. K. Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. **Chemical Society Reviews**. v. 43:2587–627, 2014.

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.

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**, Washington, DC, v.57, n.18, p. 8357-8365, 2009.

LICHTENTHALER, Frieder W. Unsaturated O- and N-heterocycles from Carbohydrate feedstocks. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 9, p. 728-737, May, 2002.

LIMA, L. H. A.; BERLINCK, C. N. Xilitol: o adoçante do futuro. **Ciência Hoje**, São Paulo, v.33, n.195, p.66- 69, jul./2003.

LIMA, F.C. S.; SILVA, F.L.H.; GOMES, J.P.; SILVA NETO, J.M. Chemical composition of the cashew apple bagasse and potential use for ethanol production. **Advances in Chemical Engineering and Science**, v.2, p.519-523, 2012.

LIMA, F.C. S.; SILVA, F.L.H.; GOMES, J.P. **Produção de xilitol utilizando licor da pré-hidrólise ácida do bagaço do pedúnculo do caju**. Tese (Doutorado) 130p, Universidade Federal de Campina Grande, 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.

LORENÇO, M.V. M. **Seleção de leveduras para bioconversão de D-xilose em xilitol**, Dissertação (Mestrado), 79p, Escola Superior Agrícola “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.

LUCIANO, R. C.; ARAÚJO, L. F.; AGUIAR, E. M.; PINHEIRO, L. E.; NASCIMENTO, D. S. Revisão sobre a potencialidade do pedúnculo do caju na alimentação animal. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v.5, n.3, p.53-59, João Pessoa, 2011.

MARTÍNEZ, M.L. SÁNCHEZA, S. BRAVO, V. Production of xylitol and ethanol by *Hansenula polymorpha* from hydrolysates of sunflower stalks with phosphoric acid. **Industrial Crops and Products**, v.40:160–6, 2012.

MAZZETTO, S. E.; LOMONACO, D.; MELE, G. Óleo da castanha de caju: oportunidades e desafios no contexto do desenvolvimento e sustentabilidade industrial. **Química Nova**, v.32, n.3, p.732-721, 2009.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemical & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p.522-550, 2012.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

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.1596–601, 2013.

MIURA, M. WATANABE, I. SHIMOTORI, Y. AOYAMA, M. KOJIMA, Y. KATO, Y. Microbial conversion of bamboo hemicellulose hydrolysate to xylitol. **Wood Science and Technology**. v.47:515–22, 2013.

MOHNEN, D.; BAR-PELED, M.; SOMERVILLE, C. Biosynthesis of plant cell walls. In: HIMMEL, M. E. (Ed.) Biomass recalcitrance: deconstructing the plant cell wall for bioenergy. **West Sussex: Blackwell Publishing**, p. 94-187, 2008.

MONEDERO, V. PÉREZ-MARTÍNEZ, G. YEBRA, M. J. Perspectives of engineering lactic acid bacteria for biotechnological polyol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.86:1003–15, 2010.

MORAIS, J.P.S.; ROSA, M.F.; MARCONCINI, J.M. **Procedimentos para análise lignocelulósicas**. 1ª ed. 54p. Embrapa Algodão – Campina Grande, 2010.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; LADISCH, M. Features of promising Technologies for treatment of lignocelulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.96, p. 673-86, 2005.

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

MUSSATTO, S. I.; SILVA, C. J. S. M.; ROBERTO, I. C. Fermentation performance of *Candida guilliermondii* for xylitol production on single and mixed substrate media. **Apply Microbiology Biotechnology**, v.72, p.681-686, 2006.

NIGAM P AND SINGH D. Processes for fermentative production of xylitol – a sugar substitute. **Process Biochemistry**, Oxford, v. 30 p. 117–124; 1995.

OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: Toward na industrial metabolismo. **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.

OKONKOWSKI, J., et al. Development of a robust, versatile and scalable inoculum train for the production of a DNA vaccine. **Biotechnology Prog.**, v.21, n.4, p.1038-1047, 2005.

OLIVEIRA, V. H. Cajucultura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 01, p. 01-03, 2008.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocelulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25-33, 2000.

PAPON, N. et al. *Candida guilliermondii*: biotechnological applications, perspectives for biological control, emerging clinical importance and recent advances in genetics. **Current Genetics**, v. 59, p.73-90, 2013.

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

PÉREZ-BIBBINS, B. et al. Culture parameters affecting xylitol production by *Debaryomyces hansenii* immobilized in alginate beads. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 387–397, mar. 2013.

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**, China v. 75, p. 86 – 91, 2013.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; FOLCH-MALLOL, J. L. Plant cell wall degrading and remodeling protein. **Biotecnología Aplicada**, La Habana, V. 28, n. 4, p.-205-215, 2011.

RAGAUSKAS, A. J.; WILLIAMS, C. K.; DAVISON, B. H.; BRITOVSEK, G.; CAIRNEY, J.; ECKERT, C. A.; FREDERICK Jr, W. J.; HALLETT, J. P.; LEAK, D. J.; LIOTTA, C. L.; MIELENZ, J. R.; MURPHY, R.; TEMPLER, R.; TSCHAPLINSKI, T. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. **Science**, v. 311, p. 484-489, 2006.

RODRUSSAMEE, N. LERTWATTANASAKUL, N. HIRATA, K. SUPRAYOGI LIMTONG, S. KOSAKA, T. YAMADA, M. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentosesugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Apply Microbiology Biotechnology**, v. 90 p.1573–86, 2011.

ROCHA, G. J. M.; MARTIN, C.; SOARES, I. B.; SOUTO-MAIOR, A. M.; BAUDEL, H. M.; ABREU, C. A. M. Dilute mixed-acid pretreatment of sugarcane bagasse for ethanol production. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 663-670, 2011.

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**, 234–243, 2014.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 358p. 2ª Ed.-Campinas, São Paulo, 2009.

SANDERS, J. P. M.; CLARCK, J. H.; HARMSSEN, G. J.; HEERES, H. J.; HEIJNEN, J. J.; KERSTEN, S. R. A.; VAN SWAAIJ, W. P. M.; MOULIJN, J. A. Process intensification in the future production of base chemicals from biomass. **Chemical Engineering and Processing**, v. 51, p. 117-136, 2012.

SANTOS, J.C. CONVERTI, A. CARVALHO, W. MUSSATTO, S. I. SILVA, S. S. Influence of aer-ation rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process biochemistry**, v. 40, p.113–8, 2005.

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

SARROUH, B. F. **Estudo da Produção Biotecnológica de Xilitol em Reator de Leito Fluidizado Utilizando Bagaço de Cana-de-açúcar e Células Imobilizadas : Avaliação de Parâmetros Operacionais e Viabilidade Econômica**. Tese (Doutorado). 185p. Universidade de São Paulo – USP. Escola de Engenharia de Lorena, 2009.

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.

SHELLER, H. V.; ULVSKOV, P. Hemicelluloses. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.61, p.263-289, 2010.

SENE, L. VITOLO, M. FELIPE, M. G. A. SILVA, S. S. Effect of environmental conditions on xylose reductase and xylitol dehydrogenase production in *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84, p.371–80, 2000.

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.

SCHMIDELL, W.; LIMA U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**, 1ª Edição. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, 541 p., 2001.

SILVA, R.; HARAGUCHI, S. K.; MUNIZ, E. C.; RUBIRA, A.F. Aplicações de fibras lignocelulósicas na química de polímeros e em compósitos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 661-671, Abr. 2009.

SOCCOL, 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 jabuticaba para a obtenção de xilitol por *Candida guilliermondii***. Dissertação (Mestrado) pelo Programa em Ciências Moleculares. 45p. Universidade Estadual de Goiás (UEG), Anápolis – GO, 2013.

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 7.0. Tulsa, OK, USA. StatSoft, Inc. (2004).

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

TAHERZADEH, M.J., KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. **International Journal of Molecular Science**. v.9, p.1621– 1651, 2008.

TAMBURINI, E.; BIANCHINI, E.; BRUNI, A.; FORLANI, G. Cosubstrate effect on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activity levels, and its consequence on xylitol production by *Candida tropicalis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.46, p.352–359, 2010.

TAMAMINI, C.; HAULY, M. C. O. Agro-industrial residues in biotechnological production of xylitol. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 25, n. 4, p. 315-330, Londrina, 2004.

TAMANINI, C.; OLIVEIRA, A. S.; FELIPE, M. G. A.; CANETTIERI, E.V.; CÂNDIDO, E.J.; HAULY, M. C.O. Avaliação da casca de aveia para produção Avaliação da casca de aveia para produção biotecnológica de xilitol biotecnológica de xilitol biotecnológica de xilitol. **Acta Scientiarum. Technology**. v. 26, no. 2, p. 117-125, Maringá, 2004.

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.

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

US DOE. **Biofuels primer placemat: from biomass to cellulosic ethanol and understanding biomass: plant cell walls**, US Department of Energy Office of Science, May-2007.

VAN DEN BRINK, J.; DE VRIES, R. P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, New York, v.91, n.6, p. 1477-1492, 2011.

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.

VASCONCELOS, S.M. **Pré-tratamentos hidrotérmico e com ácido fosfórico diluído de bagaço de cana-de-açúcar para aplicação em biorrefinarias**. Tese (Doutorado) pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, 187 p. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), 2012.

VEVERIS, C.; GEORGHIOU, K.; DANIELIDIS, D.; HATZINIKOLAOU, D. G.; SANTAS, P.; SANTAS, R.; CORLETI, V. Cellulose, hemicellulose, lignin and ash content of some

organic materials and their suitability for use as paper pulp supplements. **Bioresource Technology**, Essex, v.98, n.2, p.296-301, 2007.

WILKINS, M. R. MUELLER, M. EICHLING, S. BANAT, I. M. Fermentation of xylose by the thermotolerant yeast strains *Kluyveromyces marxianus* IMB2, IMB4, and IMB5 under anaerobic conditions. *Process Biochemistry*, v. 43, p.346–50, 2008.

WYMAN, C. E.; DALE, B. E.; ELANDER, R. T.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. R.; LEE, Y. Y. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1959-1966, 2005.

YANG, B. WYMAN, C. E. Pretreatment the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, Sussex, v.2, n.1, p.26-40, 2008.

YU, Y.; LOU, X.; WU, H.. Some recent advances in hydrolysis of biomass in hot-compressed water and its comparisons with other hydrolysis methods, **Energy & Fuels**, v. 22, n. 1, p.46–60, 2008.

ZHANG, B. ZHANG, L. WANG, D. GAO, X. HONG, J. Identification of a xylose reductase gene in the xylose metabolic pathway of *Kluyveromyces marxianus* NBRC1777. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 2001–10, 2011.

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. 134–41, fev. 2012.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados identificados e discussões estão apresentados na forma de artigo científico, elaborados de acordo com as normas sugeridas pelos periódicos escolhidos, intitulados:

Artigo 1: Optimization of acid and hydrothermal pretreatment of cashew peduncle for xylitol production

Artigo 2: Ampliação da produção biotecnológica de xilitol através do hidrolisado do bagaço do pedúnculo do caju

4.1 ARTIGO 1

OPTIMIZATION OF ACID PRETREATMENT OF CASHEW PEDUNCLE FOR XYLITOL PRODUCTION

ABSTRACT - Due to the large amount of waste generated by industries and commitments for environment preservation, there has been a growing interest in the use of alternative energy sources for the production of bioproducts of high added value such as ethanol and xylitol. In this context, cashew 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 pretreatment of cashew peduncle for biotechnological production of xylitol. Physicochemical analyses were held for bagasse characterization, and sugars were assessed by HPLC (glucose, xylose and arabinose) 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, reaction time, bagasse/acid diluted and acid concentration to evaluate the release of pentoses (xylose and arabinose) and hexose (glucose) in the prehydrolyzed liquor. The liquor from the acid pretreatment should operate under ratio conditions temperature at level +1 (160 °C), acid concentration and bagasse:diluted acid at level -1 (1% and 1:6), obtaining pentose yields (xylose and arabinose). It was observed that acid treatment liquor is very effective in providing high-susceptibility substrates for xylitol production.

Keywords: xylose. bioproducts. prehydrolyzed acid. Lignocelulosic biomass. experimental design.

RESUMO – Em virtude da quantidade de resíduos gerados pelas indústrias e dos compromissos assumidos com o meio ambiente, tem-se verificado um crescente interesse pela utilização de fontes alternativas de energia para a produção de bioprodutos de alto valor agregado, como o etanol e xilitol. Neste contexto, o caju tem sido considerada uma alternativa promissora para atender à demanda global de forma mais sustentável. Em vista disso, o objetivo deste estudo foi o de buscar a otimização do pré-tratamento ácido do bagaço do pedúnculo do caju para produção biotecnológica de xilitol. Aplicou-se o planejamento experimental fatorial 2^3+3 pontos centrais, totalizando 11 experimentos para verificar as influências das variáveis: temperatura, tempo de reação, concentração bagaço/ácido diluído e

concentração do ácido para avaliar a liberação de pentoses (xilose e arabinose) e hexose (glicose) nos licores hidrolisados. O licor de pré-tratamento do ácido deve operar sob condições de temperatura relação ao nível 1 (160 ° C), concentração de ácido e bagaço: ácido diluído a nível -1 (1% e 1:6), obtendo-se rendimentos de pentose (xilose e arabinose). Observou-se que o licor de tratamento com ácido é muito eficaz no fornecimento de suportes de elevada susceptibilidade para a produção de xilitol.

Palavras-chave: xilose. bioprodutos. pré-hidrolisado ácido. biomassa lignocelulósica. planejamento experimental.

INTRODUCTION

Annually, million tons of agro-industrial wastes are produced and most of them are discarded, causing an excessive accumulation of organic matter available in nature. Among these wastes, cashew deserves special attention due to its socio-economic importance in the country. It is estimated that about 80% of cashew pulp, i.e. cashew peduncle is not used. Therefore, 1.9 million tons of this food rich in nutritional value are wasted (ALCANTARA et al., 2010).

Cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) is a tropical plant originated in Brazil, scattered in almost all Brazilian territory. The Northeastern region accounts for over 95% of the national cashew production and its processing provides approximately 250 tons of nuts and 2 million tons of cashew peduncle per year (MENDONÇA et al., 2008). Thus, cashew crop has great potential for technological development of its industrial waste that in general are reused in a small-scale or discarded due to the lack of encouragement of its use in human nutrition (LIMA et al., 2014; CORREIA et al., 2013).

Lignocellulosic materials require pretreatment to facilitate the separation of cellulosic from hemicellulosic constituents and lignin (LIMA et al., 2012; LIMA et al., 2013). Among these, acid pretreatment aims to solubilize the hemicellulose fraction from biomass and make cellulose more accessible to enzymes, since there is an increase in pore size of the substrate. Pretreatment with dilute acid appears to be the most favorable method for industrial applications and has been studied in a variety of lignocellulosic biomasses. The main reaction that occurs during acid pretreatment is the hydrolysis of hemicellulose to produce oligomers and monomers. The dehydration of monomers, in turn, produces furfural, HMF and other volatiles (ALVIRA et al., 2010; RUEDA et al., 2010; GALBE, 2007).

Biotechnological production can be performed using some constituents present in the cashew peduncle bagasse waste, among them the most suitable for xylitol production is hemicellulose (constituent of lignocellulosic materials rich in pentoses such as xylose and arabinose). This material is an abundant source of sugars that through biotechnological processes can be converted into products of industrial interest such as xylitol, meeting the challenges of sustainability (LIMA et al., 2012; CAMARGO et al., 2015).

Xylitol is an alcohol sugar of five carbons (polyalcohol) which can be found in nature in minor amounts. This sugar has attracted the global attention due to its sweetness similar to sucrose, but provides very few calories. Xylitol is also known for being metabolized through pathways independent of insulin in the body and therefore can be used as a sugar substitute for diabetics. In addition, xylitol has anticariogenic property, which can help promote oral health and also helps in preventing dental caries (ALBUQUERQUE et al., 2014; PRAKASHAM et al., 2009). This sweetener is about 12% of the total market polyols with a rapid growth worldwide (FRANCESCHIN et al., 2011).

Thus, the aim of this study was to optimize the acid pretreatment of cashew peduncle bagasse for biotechnological production of xylitol.

MATERIAL AND METHODS

Raw material

The raw material used was cashew peduncle bagasse (*Anacardium occidentale* L.) and the prehydrolyzate of this waste (liquor from liquid pretreatment). Cashew peduncle bagasse was acquired from IDEAL pulp production industry located in João Pessoa - PB. Then, samples were processed by two washes with distilled water at temperature of 50 °C for 20 minutes 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 hour, being then removed and inserted in a Willey-type mill, and fraction a 48-mesh sieve were used in the analysis, being vacuum packed in polypropylene bags for further use (LIMA et al., 2012).

Obtaining prehydrolyzate

Pretreatment was obtained from dried and ground cashew peduncle bagasse. Then, the material was submitted to acid pretreatment process performed in stainless steel pressurized

reactor (MAINTEC FORNOS INTI) 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.

Experimental design of acid pretreatment

A full 2^3 factorial design with three replications in central point was carried out to check the influence of variables temperature (105, 130 and 160 °C), acid concentration (1, 2 and 3 %) and bagasse/dilute acid ratio (1:6, 1: 8 and 1:12) to pretreatment with sulfuric acid, totaling 11 experiments for each treatment. The thermal hydrolysis time was recorded from the time it reached the temperature established in the experimental design. After the acid pre-hydrolysis time, 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.

Biomass characterization

For the physicochemical characterization of dry cashew peduncle bagasse, analyses of moisture, pH, fixed mineral residue (ash), proteins and soluble solid were carried out according to BRASIL (2008). The concentration of reducing sugars was determined according to methodology described by Miller (1959).

The determination of extractives and analyses of lignocellulosic materials (lignin, holocellulose, alpha cellulose and hemicellulose) were performed according to methodology described by TAPPI (2011). Analyses were performed in triplicate.

Determination of carbohydrates and fermentation inhibitors

Carbohydrate contents were determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), VARIAN, equipped with isocratic solvent system, "valve Rheodyne" with 20 L handle; coupled with Agilent Hi-Plex H column (7.7 x 300 mm, 8 μ) at a temperature of 65 ° C, refractive index detector (Varian) and GALAXIE processing software Chromatography Data System, The H₂SO₄ mobile phase was 0.009 mol / L at a flow rate of 0.6 ml / min. The duration of the run time was 1 h. 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 (xylose, glucose and arabinose) and inhibitors (acetic acid, furfural and 5-hydroxymethylfurfural) were assessed.

Análise Estatística

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

RESULTS AND DISCUSSION

Physicochemical characterization of dry cashew peduncle bagasse

Table 1 shows the parameters observed in the physicochemical analyses to characterize the dry cashew peduncle bagasse, as well as its standard deviation. It was observed that the moisture content measured on a dry basis resulted in 14.73%, which is in accordance with values obtained by Alcantara et al., (2007), who studied the use of dry cashew peduncle bagasse for further use in a semisolid fermentation process and reported 11.69% of moisture on a dry basis. However, these contents do not corroborate those found by Lima et al., (2012) who studied xylitol production using liquor from the acid prehydrolysis of cashew peduncle bagasse and reported 9.29% of moisture content, which can be justified by the drying method and types of dryers used during treatment of dry biomass.

The pH value found (5.56) was higher than those found by Rocha, A. S. et al. (2014a) who analyzed the protein enrichment of cashew bagasse and found values of 4.76. The pH value is a very important factor because its variation can cause enzyme inactivation in the case of xylitol enzymatically produced or inhibit the multiplication of *Candida guilliermondii* yeast if its value is below 4, which confirms that the material analyzed in this research is favorable to biotechnological xylitol production.

The soluble solid content (SS) found in this study was 0.00; this is due to the washing treatment previously performed in the sample to remove the remaining sugars from cashew peduncle pulp, this value was also reported by Rocha et al., (2014a).

It was also observed that the ash values or fixed mineral residue was 1.35. This value is consistent with those reported by Lima et al. (2012) and Alcantara, et al., (2007), who reported 1.20 and 1.72% ash in the dry cashew peduncle waste. The amount of crude protein found by Alcantara et al., (2007) was $11.54 \pm 1.20 \text{ g.100 g}^{-1}$, a value close to that found in our study, which was $9.85 \pm 0.10 \text{ g.100 g}^{-1}$.

For reducing sugars (% glucose), value of 0.11 g.100g^{-1} was found, confirming the removal of residual sugars remaining in the washed bagasse. The values of extractives (9.51) were lower than those found by Rocha et al., (2014a) who found values of 15.13.

It was observed that levels found in this study were 21.45% of cellulose, 10.96% of hemicellulose and 35.39% of lignin. These results are in agreement with those found by Rocha et al., (2014b), who studied pretreatment of cashew bagasse with dilute acid to produce ethanol, obtaining values of $20.9 \pm 2.0\%$ of cellulose, $16.3 \pm 3.0\%$ of hemicellulose and $33.6 \pm 5.3\%$ of lignin.

Table 1: Mean values ($\pm$ standard deviation) of physicochemical characterization of dry cashew peduncle bagasse

Physicochemical assessment	Dry waste	Standard Deviation
Moisture (g.100g^{-1})	14.73	0.37
Ash (g.100g^{-1})	1.35	0.00
pH	5.56	0.04
Total Soluble Solids ($^{\circ}\text{Brix}$)	0.00	0.00
Reducing Sugars (g.100g^{-1})	0.11	0.01
Proteins (g.100g^{-1})	9.85	0.10
Extractives (%)	9.51	0.50
Cellulose (%)	21.45	0.31
Hemicellulose (%)	10.96	0.31
Lignin (%)	35.39	0.97

Table 2 shows the actual and coded levels of treatments that were used in the experimental design, as well as the responses of sugars (glucose, xylose and arabinose) and inhibitors (acetic acid, furfural and 5-hydroxymethylfurfural).

Table 2: Concentrations of pentose, hexose and inhibitors in the liquor from acid pretreatment

Tri als	Real/coded levels			Response					
	(T °C)	AC(%)	B/CA ratio	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(105)	-1 (1)	-1(1:6)	0.06	0.31	3.33	0.00	0.00	0.44
2	1(160)	-1(1)	-1(1:6)	4.45	8.23	5.19	0.14	0.27	1.00
3	-1(105)	1(3)	-1(1:6)	0.45	1.06	5.29	0.00	0.00	0.39
4	1(160)	1(3)	-1(1:6)	4.20	7.25	3.69	0.21	0.41	0.83
5	-1(105)	-1(1)	1(1:12)	0.32	0.64	1.87	0.32	0.02	0.02
6	1(160)	-1(1)	1(1:12)	2.68	4.91	3.16	0.06	0.14	0.48
7	-1(105)	1(3)	1(1:12)	0.17	0.69	3.32	0.00	0.00	0.14
8	1(160)	1(3)	1(1:12)	3.76	6.38	3.34	0.18	0.47	0.49
9	0(130)	0(2)	0(1:9)	1.35	2.49	3.63	0.00	0.00	0.55
10	0(130)	0(2)	0(1:9)	1.86	3.48	3.30	0.01	0.03	0.14
11	0(130)	0(2)	0(1:9)	1.82	3.29	3.19	0.00	0.00	0.51

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

Acid pretreatment study

Table 3 shows the nonlinear regression models considering statistically significant parameters at 95% confidence ($p < 0.05$), determination coefficients (R^2) and Fcal / Ftab ratio values (F test).

Table 3: Regression model for glucose, xylose, arabinose, acid acetic, 5-HMF and furfural concentrations in the liquor from acid pretreatment of cashew peduncle bagasse

Coded variable	Equation	Fcal/Ftab Ratio	R^2
Glucose	1.92 + 1.76 (T) + 0.13 (C) – 0.28 (R) – 0.072 (TxR) – 0.27 (TxR) + 0.099 (CxR)	4.50	97%
Xylose	3.52 + 3.01 (T) + 0.16 (C) – 0.53 (R) – 0.037 (TxR) – 0.52 (TxR) + 0.22 (CxR)	4.30	97%
Arabinose	3.57 + 0.20 (T) + 0.26 (C) – 0.73 (R) – 0.59 (TxR) + 0.13 (TxR) + 0.15 (CxR)	1.38	90%
5-HMF	0.09 + 0.03(T) – 0.17 (C) + 0.03 (R) + 0.06 (TxR) – 0.05 (TxR) – 0.04 (CxR)	0.3	65%
Furfural	0.12 + 0.16 (T) + 0.06 (C) – 0.01 (R) + 0.06 (TxR) – 0.01 (TxR) + 0.02 (CxR)	0.7	82%
Acid acetic	0.45 + 0.23 (T) – 0.01 (C) – 0.19 (R) – 0.03 (TxR) – 0.02 (TxR) + 0.04 (CxR)	1.0	86%

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

Coefficients in bold of the regression models in Table 3 (responses) are statistically significant at 95% confidence. According to equations shown in Table 3, it is known that the first-order models are statistically significant for the glucose, xylose, arabinose and acetic acid concentrations in the hydrolyzate from the acid pretreatment of cashew peduncle bagasse because they show F_{cal}/F_{tab} ratio equal to or greater than 1 (RODRIGUES and IEMMA, 2012; SANTOS et al., 2014).

Statistically significant models were used to built up the response surfaces to seek to optimize the acid pre-hydrolysis process.

Seeking to optimize the process, the objective function was defined as the highest concentration of pentoses (sum of xylose and arabinose) in the hydrolyzate liquor, with a high ratio (to obtain higher amounts of liquor for the study for expanding the xylitol production scale). Figure 1 shows that setting the temperature at 160 °C (level +1) of the acid pretreatment process, operating with the ratio of 1:6 and initial acid concentration of 3%, high concentration of pentoses was obtained in the hydrolyzate liquor (xylose and arabinose), of approximately 7.2 gL⁻¹ and 3.7 gL⁻¹ (sum of approximately 10.9 gL⁻¹) and consequently 4.2 gL⁻¹ glucose concentration and inhibitor concentrations of 0.8 gL⁻¹ of acetic acid, 0.2 gL⁻¹ of HMF and 0.4 gL⁻¹ of furfural.

However, the maximum values of sugars obtained were reached at temperature at +1 (160 °C) and acid concentration and ratio at level -1 (1% and 1: 6) concentration of pentoses (sum of approximately 17.9 gL⁻¹).

Further studies aimed (LIMA, et al., 2014a; LIMA, et al., 2014b) at expanding the xylitol production scale should be carried out (4 L, 16 times), seeking to optimize xylitol production using concentrations optimized in this work.

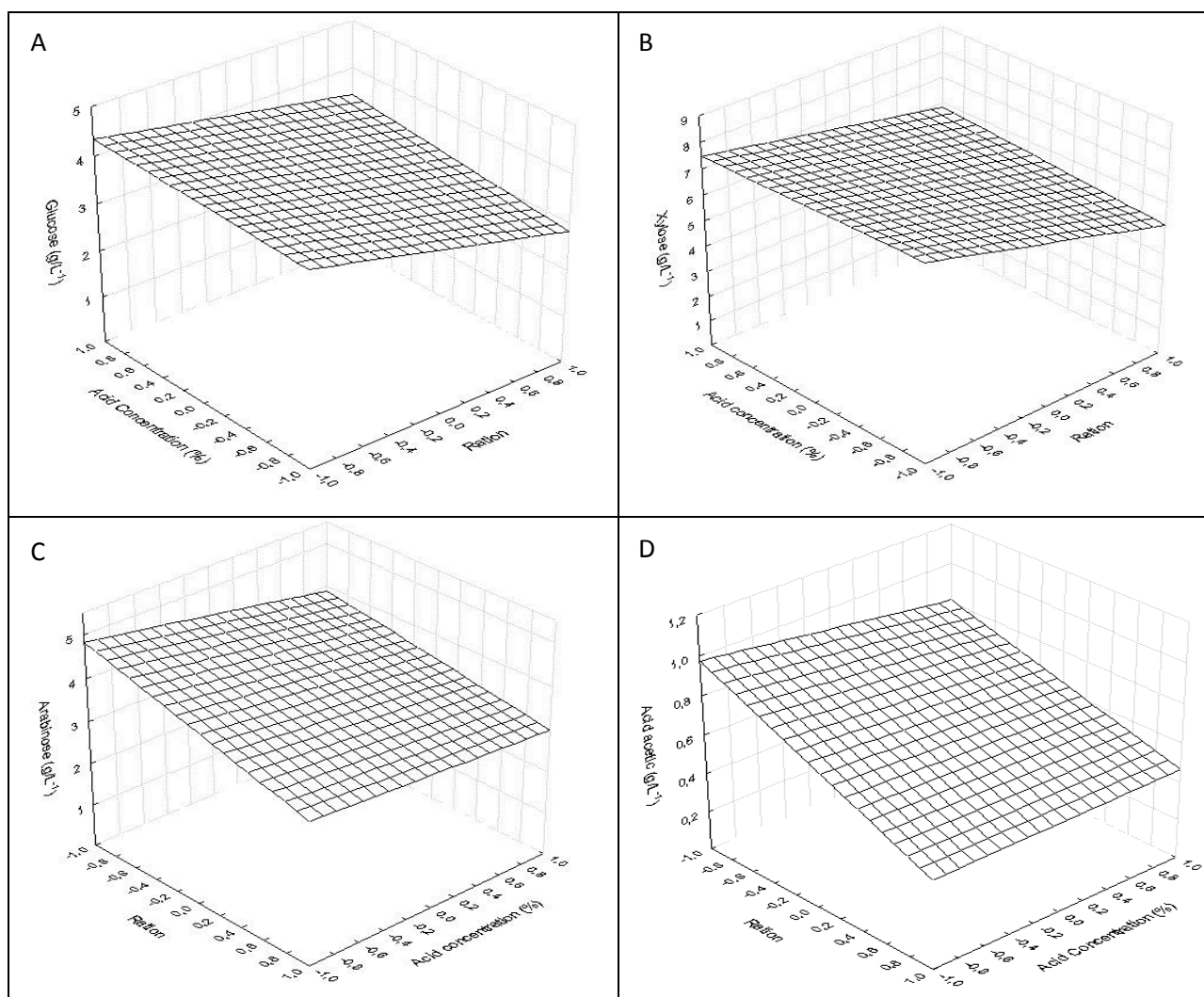


Figure 1: Response surface for the concentration glucose (A), xylose (B), arabinose (C) and acid acetic (D) fixing the temperature in the upper level +1 (160 °C).

CONCLUSIONS

According to the results of this study, the variables used for obtaining liquor from the acid pretreatment should operate under ratio conditions temperature at level +1 (160 °C), acid concentration and bagasse:diluted acid at level -1 (1% and 1:6), obtaining pentose yields (xylose and arabinose).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the financial support from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), due to the Masters scholarship funding.

REFERENCES

- ALBUQUERQUE, T. L. et al. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. **Process Biochemistry**, v. 49, p.1779–1789, 2014.
- ALCÂNTARA S. R., ALMEIDA F. A. C., SILVA F. L. H. Pectinases production by solid state fermentation with cashew apple bagasse: water activity and influence of nitrogen source. **Chemical Engineering Transactions**, v. 20, p.121-26 , 2010.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4851–4861, 2010.
- BRASIL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo, SP: INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008.
- CAMARGO, D. et al . Xylitol bioproduction in hemicellulosic hydrolysate obtained from sorghum forage biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology** (on line), 2015.
- CORREIA, J. A. C. et al. Alkaline hydrogen peroxide pretreatment of cashew apple bagasse for ethanol production: Study of parameters. **Bioresource Technology**, v. 139, p. 249-256, 2013.
- FRANCESCHIN, G. et al. Conversion of rye straw into fuel and xylitol: a technical and economical assessment based on experimental data. **Chemical Engineering Research and Design**, v.89:631–40, 2011.
- GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.108, p.41-65, 2007.
- LIMA, F. C. S. et al. Chemical Composition of the Cashew Apple Bagasse and Potential Use for Ethanol Production. **Advances in Chemical Engineering and Science**. v.2. p.519-523, 2012.
- LIMA, C. S. S. et al. Characterization of acid hydrolysis of sisal. **Applied Energy**, v. 102, p. 254-259, 2013.
- LIMA, F. C. S. et al. Transport Phenomena and Drying of Solids and Particulate Materials. Evaluation of Cashew Apple Bagasse for Xylitol production. 1 ed. Suíça: **Springer**, v. 48, p. 179-204, 2014a.
- LIMA, F. C. S. et al. Biotechnological Production of Xylitol: Evaluation of Detoxification Process with Residual Lignin Using Response Surface Methodology. **Chemical Engineering Transactions**, v. 38, p. 415-420, 2014b.

- MENDONÇA, V. et al. Formation of cashew and tamarind rootstocks influenced by nitrogen levels. **Revista Caatinga**, v.21, n.3, p.82-88, Mossoró, 2008.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- MORAIS, J. P. S.; ROSA, M. F.; MARCONCINI, J. M. **Procedimentos para análise lignocelulósicas**. 1ª ed. 54p. Embrapa Algodão – Campina Grande, 2010.
- 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.
- ROCHA, A. S. et al. Ethanol from cashew apple bagasse by enzymatic hydrolysis. **Chemical Engineering Transactions**. v.37, p.361-366, 2014.
- ROCHA, M. V. P. et al. Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. **Chemical Engineering Journal**, v.243, p.234–243, Jan. 2014.
- RODRIGUES, M. I.; LEMMA, A. F. **Experimental Design and process optimization**. 2 Ed. Campinas, SP: BRAZIL, 2012. 352p.
- RUEDA, S. M. G. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse with phosphoric and sulfuric diluted acid for fermentable sugar production by enzymatic hydrolysis. **Chemical Engineering Transactions**. v. 20. p.321-26, 2010.
- SANTOS, D. C. et al. Elaboração de bebida tipo néctar de graviola adoçada com mel de *Apis melífera*. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 4, p. 216 – 225, Mossoró, 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.

4.2 ARTIGO 2

AMPLIAÇÃO DA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL POR MEIO DO HIDROLISADO DO BAGAÇO DO PEDÚNCULO DO CAJU

RESUMO

Os resíduos agroindustriais que são depositados no meio ambiente causando problemas na natureza podem ser solucionados com o aproveitamento e geração de bioprodutos de valor agregado como o etanol e xilitol. Sendo assim, o presente trabalho teve por objetivo estudar quimicamente a fração lignocelulósica do bagaço do pedúnculo do caju e a fermentação em escala de 8 e 16 vezes utilizando a estirpe *Candida guilliermondii* CCT-3544 como agente de fermentação. De acordo com os resultados presentes neste estudo, pode-se ressaltar que a caracterização da composição lignocelulósica do bagaço do pedúnculo do caju seco (21,45% de celulose, 10,96% de hemicelulose e 35,39% de lignina) informa que este resíduo apresenta elevado teor de carboidratos estruturais, demonstrando o potencial desta fibra para produção de xilitol. A *C. guilliermondii* CCT-3544 foi capaz de crescer no meio com hidrolisado, sendo que sua concentração máxima de crescimento celular ($3,5 \text{ gL}^{-1}$) foi encontrada no meio com hidrolisado concentrado (400 mL) nas primeiras 12 h. Já para o hidrolisado fermentado no Biorreator (1600 mL) houve variação em seu crescimento celular, atingindo o ápice de $3,5 \text{ gL}^{-1}$ às 72 h. O comportamento dos açúcares no processo fermentativo foi similar em ambos processos, no entanto o fermentado concentrado obteve produção máxima com 48 h de fermentação, já o hidrolisado fermentado em biorreator produziu etanol e xilitol simultaneamente com máxima produção de xilitol com 6 h e etanol com 48 h de fermentação.

Palavras-chave: Bioconversão. Xilose. *Candida Guilliermondii*. Hemicelulose. Fibra.

INTRODUÇÃO

A economia agrícola brasileira se mantém como uma das mais importantes do mundo com desempenho superior a 186,1 milhões de toneladas na safra de 2012/2013 (ECON, 2013). Concomitantemente com esses índices são gerados toneladas de resíduos agroindustriais, que em sua maioria são eliminados no ambiente, produzindo acúmulo excessivo de matéria orgânica na natureza.

Nesse contexto muitos materiais são rejeitados/descartados (resíduos), tornando assim biomassas promissoras para o campo científico-tecnológico da biotecnologia. Materiais vegetais são fontes de matéria-prima potencial para a produção de energia, mostrando altos níveis de recuperação do produto. Dessa forma, muitos estudos têm sido realizados visando o potencial de utilização de açúcares fermentescíveis, como glicose e xilose, que são liberados após o pré-tratamento da biomassa vegetal, e utilizados na implementação de produtos com valor agregado como o etanol e xilitol.

O caju (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta tropical, predominante na região nordeste do Brasil com mais de 95% da produção nacional. O pseudofruto do caju apresenta grande potencial para o desenvolvimento biotecnológico visto que ele é pouco aproveitado pela indústria, com estimativa de mais de 90% do pedúnculo é desperdiçado (PROMMAJAK; LEKSAWASDI; RATTANAPANONE, 2014).

O xilitol é um açúcar álcool que pode ser encontrado na natureza, em pequenas quantidades. Esse açúcar tem atraído a atenção global por causa do seu poder adoçante semelhante ao da sacarose, no entanto o xilitol apresenta baixas calorias e é metabolizado no corpo humano por vias independentes de insulina e, portanto, pode ser utilizado em quantidades moderadas como substituto do açúcar para diabéticos. Além disso, apresenta propriedade anticariogênica, que promove a saúde oral e auxilia na prevenção de cáries e ainda é considerado pela Food and Drug Administration (FDA) como edulcorante utilizado na indústria de alimentos já aprovado em mais de quarenta países (MUSSATO & ROBERTO, 2002; PRAKASHAM et al., 2009).

A produção tradicional de xilitol ocorre através da hidrogenação catalítica de xilose sendo operado a alta pressão e temperatura, bem como o alto custo do tratamento de purificação. Comparado com este processo, a bioconversão de xilitol provindo do hidrolisado hemicelulósico utilizando microrganismos representa um processo renovável com condições de reação moderadas e requisitos de baixa energia, o que garante alta seletividade do produto, baixo custo e segurança (CHEN et al., 2010).

É de grande importância na produção de xilitol a suplementação dos hidrolisados com fatores que permitem uma otimização da produtividade. Várias fontes de nitrogênio investigados em estudos biotecnológicos para otimizar o crescimento dos microorganismos e a produção de metabolitos de interesse, uma vez que estas fontes, em muitos processos biológicos, são essenciais para o crescimento microbiano (CHENG et al., 2009).

Tendo em vista a grande disponibilidade da matéria-prima na região Nordeste e a necessidade de empregar uma tecnologia limpa e de baixo custo, além de minimizar os

desperdícios provenientes das indústrias, o trabalho teve por objetivo estudar a ampliação de escala experimental do trabalho de Lima et al. (2014) (aumento de 16 vezes) da produção biotecnológica de xilitol utilizando o licor do tratamento ácido do bagaço do pedúnculo do caju como substrato e como agente de fermentação a levedura *Candida guilliermondii* CCT 3544.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

A matéria-prima utilizada nesta pesquisa foi o bagaço do pedúnculo do caju adquirido na indústria de polpa de frutas IDEAL, localizado na cidade de João Pessoa – Paraíba. Em seguida, o bagaço passou por algumas etapas iniciais que foram duas lavagens do bagaço do pedúnculo do caju com água destilada a uma temperatura de 50°C durante 20 min cada lavagem; após esse procedimento o bagaço foi submetido a mais duas lavagens com água destilada a temperatura ambiente (28°C) para extrair os açúcares remanescentes que permanecem após processamento da polpa, até atingir °Brix zero.

Em seguida, o bagaço foi conduzido por bandejas para secadores convectivos a uma temperatura de 55 °C por cerca de 2 h. Após a remoção de água, a biomassa seca foi fragmentada em moinho de facas (marca MARCONI) com a finalidade de reduzir o tamanho da fibra a 48 mesh.

Obtenção do licor hidrolisado

O licor foi obtido a partir do bagaço do pedúnculo do caju seco. Esta biomassa de caju foi sujeito a hidrólise utilizando solução de ácido sulfúrico 3% durante 1 hora para remoção da fração hemicelulósica utilizando reator rotatório de 20 L de capacidade nominal (AU/E-20, Regmed Indústria Técnica Ltda) para a obtenção do licor com aumento de 8 e 16 vezes da escala experimental que foi de 250 mL.

Em seguida, o reator foi fechado e iniciou-se o aumento da temperatura através de um sistema de aquecimento por resistência elétrica. A contagem do tempo foi inicializada quando o processo atingiu a temperatura desejada. Finalizada a reação, o reator foi despressurizado, através da abertura da válvula localizada na parte superior do reator, com o objetivo de acelerar o resfriamento do sistema reacional. A temperatura foi reduzida a 90 °C e, em

seguida, o licor foi descarregado, filtrado e centrifugado para retirada das impurezas restantes, resultando em 10 L de hidrolisado.

Parte do hidrolisado foi concentrado em um evaporador rotativo digital (marca QUIMIS) conectado a uma bomba de vácuo (marca PRISMATEC) acoplado a um sistema de refrigeração de água por meio do Banho Ultratermostático SL 152/10 (marca SOLAB), utilizando como parâmetros rotação de 0,60 rpm, temperatura de 80 ± 5 °C e 250 mL em cada etapa, do início ao fim da concentração foram gastos cerca de 3 h. Essa etapa tem o propósito de aumentar a proporção dos açúcares nos licores, principalmente a xilose. A concentração foi realizada através da redução de 2,1 vezes seu volume inicial.

Caracterização lignocelulósica do licor e da biomassa tratada

A determinação de extrativos e análises de materiais lignocelulósicos (lignina, celulose, hemicelulose e holocelulose) foram realizadas de acordo com a metodologia descrita pela TAPPI (2011).

Caracterização do hidrolisado

Para a determinação dos teores de açúcares no licor hidrolisado (xilose, glicose e arabinose) e dos inibidores da fermentação (ácido acético, 5-Hidroximetilfurfural e furfural), foi utilizado Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (VARIAN, Waters, Califórnia, USA), equipado com sistema isocrático de solvente, válvula "Rheodyne" com alça de 20 µl; acoplado com uma coluna Agilent Hi-Plex H (7,7 x 300 mm, 8 µ), a uma temperatura de 65 °C, detector de índice de refração (VARIAN), e Software de processamento GALAXIE Chromatography Data System. A fase móvel utilizada foi H₂SO₄ 0,009 Mol/L, a um fluxo de 0,6 mL/min. O tempo de duração da corrida foi de 1 h.

Preparação do Inóculo

A levedura utilizada na pesquisa foi a *Candida guilliermondii* CCT 3544 obtida na Coleção de Culturas Tropicais (CCT) da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosselo – FAT localizada em Campinas. Foi mantida liofilizada a temperatura de 28 °C até o momento da reativação. 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

aproximadamente 10-15 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 (descrito na Tabela 4) e incubado a 28 °C, por 10 dias.

A partir da cultura crescida no caldo, foi realizado um repique em placa de Petri contendo meio de cultura YMA (Yeast-Malte Extract Agar) e incubado a 28 °C durante 48 h. Após o crescimento as placas de Petri contendo os micro-organismos foram armazenadas em refrigeração a uma temperatura de 2 a 8 °C.

Células de *Candida guilliermondii* CCT 3544, foram transferidas em condições assépticas das placas de Petri para tubos contendo 5 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, alíquotas de 1 mL dessa suspensão foi transferido para frascos de Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultivo semi-sintético.

O estudo da velocidade de crescimento da levedura foi realizado em Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultivo semi-sintético com pH ajustado para 5,5. O meio foi esterilizado e após resfriamento inoculado com a suspensão de levedura. A suspensão foi realizada transferindo-se a cultura em placas para tubos de ensaio contendo cerca de 5 mL de água destilada esterilizada. Alíquotas de 1 mL desta suspensão foram então transferidas para os frascos contendo meio de cultivo esterilizado. Após inoculação os frascos foram incubados a 28 °C em shaker (LOGEN SCIENTIFIC), rotação de 200 rpm por 24 h.

Após esse período as células foram separadas por centrifugação a 2000 x g por 30 min e ressuspensas em água destilada esterilizada, de modo a obter uma solução com concentração de células de 50 gL⁻¹. A partir desta suspensão foi calculado o volume necessário para proporcionar a concentração celular inicial de 3 gL⁻¹.

Concentração celular

A biomassa celular foi monitorada por meio de turbidimetria através de densidade ótica a 600nm, onde a concentração de células em g.L⁻¹ foi calculada por uma curva de calibração que correlaciona a absorbância a 600nm e concentração em massa seca das células obtidas de um cultivo em meio sintético. Utilizou-se água destilada como branco.

A massa seca foi determinada a partir da suspensão original após a secagem de alíquotas de 2 mL, em estufa a 105 °C por 24 h, realizadas em duplicata.

Processo de Fermentação

Os experimentos de fermentação foram realizados utilizando ampliação de 8 e 16 vezes do estudo de Lima et al. (2014) realizado com 250 mL em Erlenmeyer. O primeiro ensaio com aumento de 4 vezes resultando no licor de 1 L após concentrado 2,5 vezes resultou em 400 mL utilizando agitador rotativo tipo shaker (LOGEN SCIENTIFIC) a 200 rpm durante 120 h.

Já o segundo ensaio utilizou-se 4L de licor pré-tratado e os experimentos foram conduzidos em biorreator-fermentador TEC-BIO com capacidade de 4,5 L com altura do vaso com tampa de 53 cm (MARCA TECNAL) contendo 1.600 mL do meio de fermentação em duplicata de acordo com as seguintes condições: 3 gL⁻¹ de sulfato de amônio, 0,5 gL⁻¹ de cloreto de cálcio, 20 gL⁻¹ de farelo de arroz, pH 4,0 com agitação de 200 rpm, temperatura de 28 °C por 120 h.

Determinação dos parâmetros fermentativos

O processo fermentativo foi avaliado tendo em vista os valores dos parâmetros produtividade volumétrica (Q_p), fator de conversão de xilose em xilitol e conversão de glicose em etanol ($Y_{p/s}$) e eficiência do processo fermentativo (η) de xilitol com 400 mL e para 1600 mL utilizou-se o xilitol e o etanol. Os parâmetros foram calculados com 48 h de fermentação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização realizada neste estudo mostrou que o bagaço de caju consiste de 21,45% de celulose, 10,96% de hemicelulose, 35,39% de lignina e 9,51% de extrativos. Albuquerque et al. (2014) avaliou a produção de xilitol a partir do bagaço do pedúnculo do caju utilizando *Kluyveromyces marxianus* CCA510, esse autores relataram valores de 17,73% celulose, 19,22% hemicelulose, 33,41% de lignina e 6,41% de extrativos, indicando uma quantidade substancial de hemicelulose quando comparado com os resultados encontrados neste trabalho. Por exemplo, Cheng et al. (2009) relataram um montante de 34,32% hemicelulose na composição de sabugo de milho.

Valores similares foram encontrados por Rocha et al. (2009) quando analisaram o bagaço do pedúnculo do caju seco e hidrolisado. Os autores encontraram valores de 19,21%, 12,05% e 38,11% para celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente. Já Lima et al.

(2012) verificaram também resultados similares para o bagaço do pedúnculo do caju seco (18,31% celulose; 27,18% hemicelulose e 23,91% lignina).

Tabela 1: Composição lignocelulósica do bagaço do pedúnculo do caju seco e hidrolisado

Composição	Bagaço do caju seco (%)
Extrativos	9,51 ± 0,50
Celulose	21,45 ± 0,31
Hemicelulose	10,96 ± 0,31
Holocelulose	32,41 ± 0,33
Lignina	35,39 ± 0,97

De acordo com os resultados da Tabela 2, a xilose é o açúcar predominante 5,4311 gL⁻¹, 5,1706 gL⁻¹, respectivamente, no reator 1 e 2 do hidrolisado e no licor concentrado 10,5521 gL⁻¹. Seguido de glicose (2,1756; 2,5497 e 5,1972 gL⁻¹) e arabinose (3,8136; 3,0317 e 6,0515 gL⁻¹), originados durante o processo de hidrólise ácida da biomassa lignocelulósica. Com relação à quantidade de glicose no hidrolisado Lima et al. (2012) encontrou quantidade semelhantes 1,78 gL⁻¹. No entanto as quantidades de xilose e arabinose foram diferentes (1,43 gL⁻¹ xilose e 7,12 gL⁻¹ arabinose).

Observa-se ainda que durante o processo de concentração alguns valores de HMF e furfural foram minimizados. No entanto, os compostos tóxicos às leveduras podem ser observados como o ácido acético (0,2039 gL⁻¹ reator 1; 0,0844 gL⁻¹ reator 2 e 0,0865 gL⁻¹ no concentrado), furfural (0,4545; 0,2869 e 0,1316 gL⁻¹) e hidroximetilfurfural (0,3947; 0,1526; 0,1154 gL⁻¹), sendo esses gerados a partir das degradações de pentoses e hexoses, conforme analisados e reportados por Silva et al. (2007), Carvalho et al. (2005), Duarte et al. (2005) estudaram que a presença de concentrações acima de 3 gL⁻¹ de ácido acético, 1,5 gL⁻¹ de HMF e 1 gL⁻¹ de furfural, tem efeito tóxico, o suficiente para inibir a ação dos micro-organismo no processo de fermentação. Tornando os licores analisados neste estudo propício para produção biotecnológica de xilitol.

Verifica-se ainda que as concentrações encontradas por Lima et al. (2012) foram (0,3437 gL⁻¹) ácido acético valor semelhante ao encontrado no reator 1, quanto ao furfural (0,00002 gL⁻¹) e hidroximetilfurfural (0,00009 gL⁻¹), os resultados foram divergentes aos encontrados neste estudo.

Tabela 2: Características do hidrolisado hemicelulósico *in natura* e concentrado do bagaço do pedúnculo do caju

Composição	Licor Hidrolisado – reator 1 (gL ⁻¹)	Licor Hidrolisado – reator 2 (gL ⁻¹)	Licor Concentrado (gL ⁻¹)	Condensado (gL ⁻¹)
Glicose	2,1756	2,5497	5,1972	0,0000
Xilose	5,4311	5,1706	10,5521	0,0000
Arabinose	3,8136	3,0317	6,0515	0,0000
Ácido acético	0,2039	0,0844	0,0865	0,0000
5-hidroximetilfurfural	0,3947	0,1526	0,1154	0,5069
Furfural	0,4545	0,2869	0,1316	0,4581

Reator 1: capacidade de 20 L, reator 2: capacidade máxima 700 mL

Com relação aos dados de biomassa apresentados na Figura 1 percebe-se para o cultivo do licor de 400 mL um crescimento celular até 12 h de fermentação (3 gL⁻¹ a 3,5 gL⁻¹) onde ocorre o crescimento máximo com queda às 36 h (2 gL⁻¹) estabilizando até 120 h de operação, Bier et al. (2007) que estudou o crescimento e consumo de xilose utilizando *Candida Guilliermondii* no bagaço da cana-de açúcar encontrou crescimento máximo em 48 h de fermentação, esses autores relatam que nas primeiras 24 h houve crescimento intenso devido ao consumo de açúcares em baixas concentrações como é o caso da glicose o que não acontece neste estudo. Já no hidrolisado de 1600 mL um decréscimo da concentração celular foi observado com crescimento em 36 h (2,5 gL⁻¹) para a amostra 1, no entanto para a amostra 2 só ocorre crescimento a partir de 60 h de fermentação, chegando ao ápice em 72 h (3,5 gL⁻¹), após esse período ocorre o decréscimo da concentração celular.

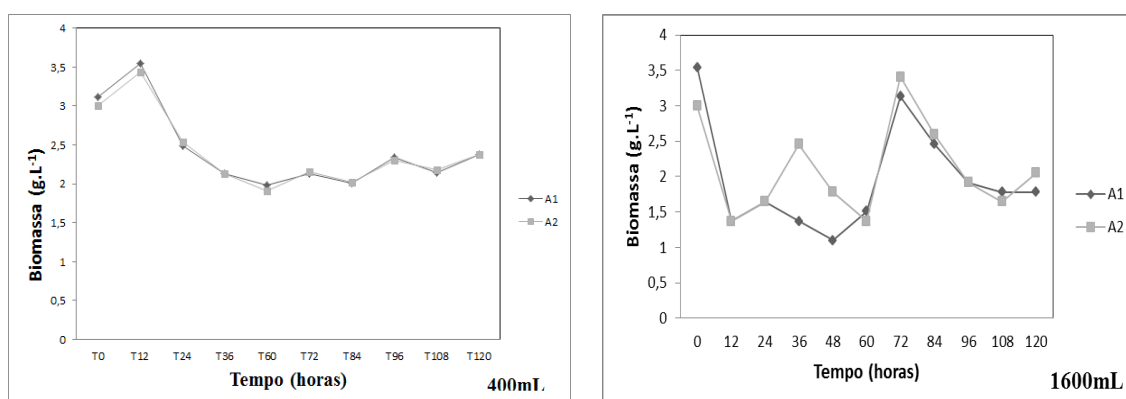


Figura 1: Variação da concentração de biomassa durante a fermentação do hidrolisado hemicelulósico do bagaço do pedúnculo do caju com 400 mL e 1600 mL.

Na Figura 2 observa-se a variação das concentrações de glicose, xilose, arabinose e da produção de xilitol durante as 120 h de fermentação. Nota-se que o comportamento durante o consumo dos açúcares é similar. Alguns estudos como o de Zhang et al. (2012) que estudou a produção de xilitol utilizando a *Candida athensensis* SB18 e verificou um consumo total de xilose em 288 h de fermentação, com concentração máxima obtida em 264 h.

Verifica-se que os valores encontrados neste estudo são diferentes dos encontrados na literatura tendo em vista que a quantidade de açúcares consumidos foram menores que os obtidos em outros estudos como Huang et al. (2011) relata o consumo dos açúcares (glicose, xilose e arabinose) em 80 h de fermentação com produção de etanol e xilitol simultaneamente. Observa-se ainda que o açúcar foi consumido nas primeiras 6 h e se manteve constante no decorrer da fermentação, valores confirmados pela produção de xilitol que foi de 98,6% nas 6 h iniciais. Existem vários fatores que podem explicar esses resultados como a quantidade de inibidores utilizados, fontes de carbono, nitrogênio, pH, temperatura, agitação e quantidade de glicose no hidrolisado que é um dos pontos desfavoráveis utilizados durante o processo de fermentação. Tal fato se deve que na presença de elevadas concentrações desta hexose, esta exerce repressão catabólica sobre as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, principais responsáveis pela bioconversão xilose-xilitol (LEE et al., 1996), reduzindo assim o rendimento e a produtividade de xilitol sendo este efeito inibitório dependente da concentração de glicose no meio.

Vários estudos (SENE et al., 2000; LEE et al., 1996) relatam uma preferência de consumo de glicose em relação a xilose, tendência esta encontrada em nesse estudo.

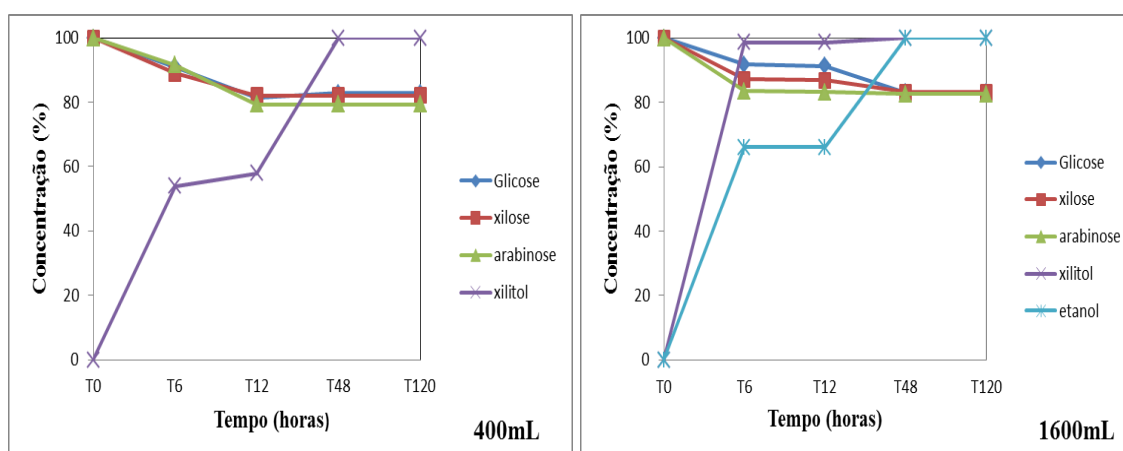


Figura 2: Variação da concentração de glicose, xilose, arabinose, xilitol na fermentação do hidrolisado concentrado em shaker (400 mL) e no biorreator (1600) do bagaço do pedúnculo do caju.

CONCLUSÃO

A caracterização da composição lignocelulósica do bagaço do pedúnculo do caju seco (21,45% de celulose, 10,96% de hemicelulose e 35,39% de lignina) demonstra o potencial deste resíduo agroindustrial para produção de xilitol.

A *C. guilliermondii* CCT-3544 foi capaz de crescer no meio com hidrolisado, sendo que sua concentração máxima de crescimento celular ($3,5 \text{ gL}^{-1}$) foi encontrada no meio com hidrolisado concentrado (400 mL) nas primeiras 12 h. Já para o hidrolisado fermentado no Biorreator (1600 mL) houve variação em seu crescimento celular, atingindo o ápice de $3,5 \text{ gL}^{-1}$ às 72 h.

O comportamento dos açúcares no processo fermentativo foi similar em ambos processos, no entanto o fermentado concentrado obteve produção máxima com 48 h de fermentação, já o hidrolisado fermentado em biorreator produziu etanol e xilitol simultaneamente com máxima produção de xilitol com 6 h e etanol com 48 h de fermentação.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), devido ao financiamento do projeto vinculado a esta pesquisa como também as bolsas de mestrado fornecidas por esta instituição. E a Fundação André Toselo (FAT) que forneceu a levedura *Candida guilliermondii* CCT-3544 fundamental para este estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, T. L. et al. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review. **Process Biochemistry**. v. 49, p.1779–1789, 2014.
- BIER, M. C. J. et al.; Crescimento e consumo de xilose de *Candida guilliermondii* na fermentação submersa utilizando-se bagaço de cana-de-açúcar. **Evidência**, Joaçaba. v.7, p.119-130, 2007.
- CARVALHO R. J.; MARTON J. M.; FELIPE M. G. A., Avaliação do sistema combinado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica para sua utilização como meio de fermentação. **Revista Analytica**, v.18, p.48-55, 2005.
- CHENG, K. K.; ZHANG, J. A. LING, H. Z.; PING, W. X.; HUANG, W.; GE, J. P.; XU, J. M. Optimization of pH and acetic acid concentration for bioconversion of hemicel-lulose

from corncobs to xylitol by *Candida tropicalis*, **Biochemical Engineering Journal**, v.43, p.203–207, 2009.

CHEN, X. JIANG, Z-H. CHEN, S. QIN, W. Microbial and bioconversion production of d-xylitol and its detection and application. **International Journal Biological Sciences** . v-6:834–44, 2010.

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

ECON, L. **Ministério da Agricultura , Pecuária e Abastecimento** - MAPA Secretaria de Política Agrícola - SPA. p. 1–7, 2013.

HUANG, C.F. et al.; Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. **Bioresource Technology**. v.102, p.3322–3329, 2011.

LEE, H., SOPHER, C. R., YAU, K. Y. F. Induction of xylose reductase and xylitol deshydrogenase activities on mixed sugars in *Candida guilliermondii*. **Journal of Chemistry Technology and Biotchnology**, v.66, p.375-379, 1996.

LIMA, F. C. S. et al. Chemical Composition of the Cashew Apple Bagasse and Potential Use for Ethanol Production. **Advances in Chemical Engineering and Science**. v.2. p.519-523, 2012.

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.

MUSSATO, S. I.; ROBERTOI. C. Xylitol: a sweetner with benefits for human health. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.38, p. 401-413, 2002.

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.

PROMMAJAK, T.; LEKSAWASDI, N.; RATTANAPANONE, N. Biotechnological valorization of cashew apple: a review, **Chiang Mai Journal of Science**, v.13, p.159–182, 2014.

ROCHA, V. M. P.; RODRIGUES, H. T. S.; MACEDO, G. R.; GONÇALVES, L. R. B. “Enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated cashew apple bagasse with alkali and diluted sulfuric acid for bioethanol production,” **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.155, n°. 1-3, p. 104-114, 2009.

SENE, L. VITOLO, M. FELIPE, M. G. A. SILVA, S. S. Effect of environmental conditions on xylose reductase and xylitol dehydrogenase production in *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84, p.371–80, 2000.

SILVA, D. D. V.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Improvement of Biotechnological Xylitol Production by Glucose During Cultive of *Candida guilliermondii* in Sugarcane Bagasse Hydrolysate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, p.207, 2007.

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

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. 134–41, fev. 2012.