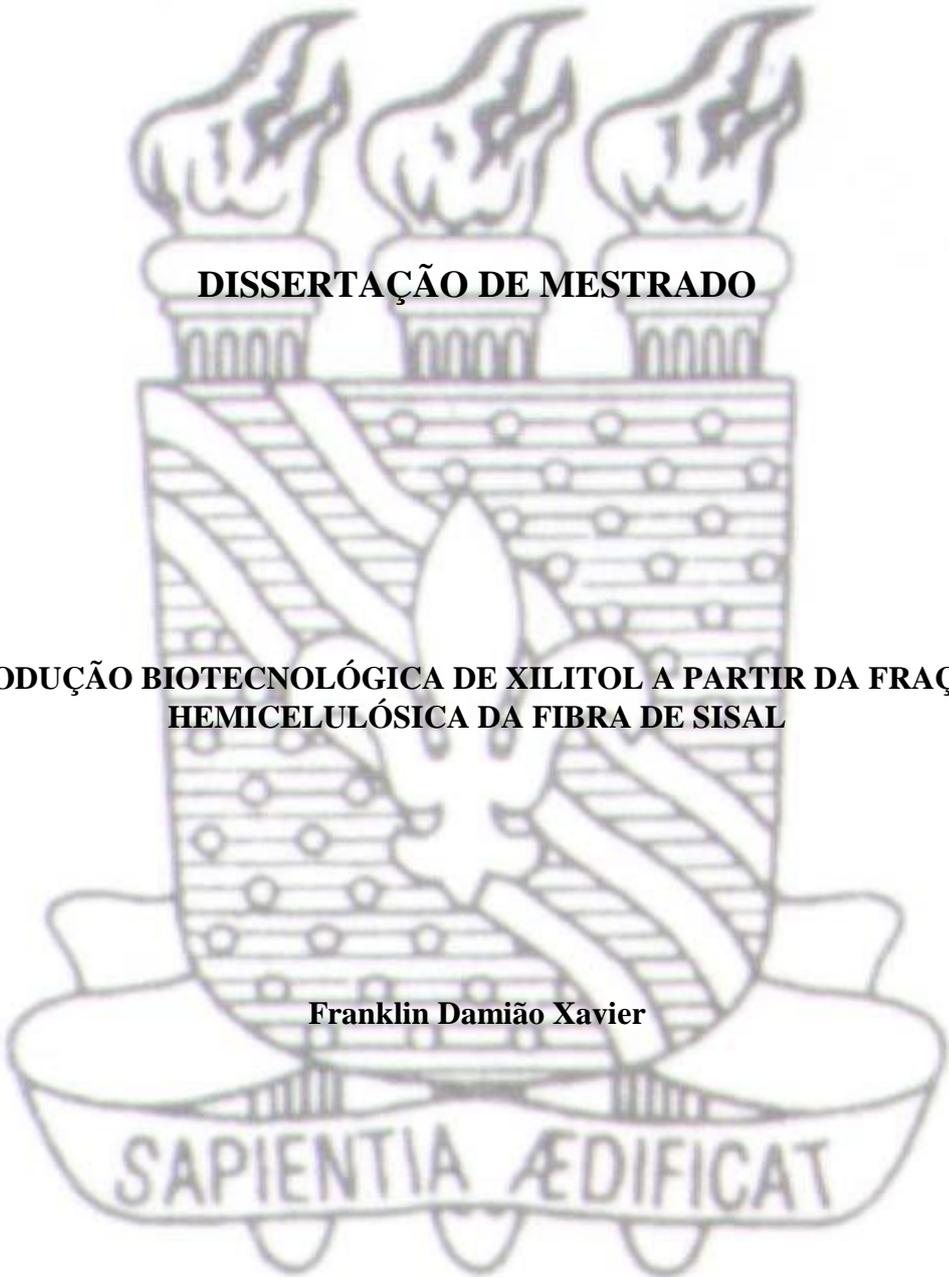




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL A PARTIR DA FRAÇÃO
HEMICELULÓSICA DA FIBRA DE SISAL**

Franklin Damião Xavier

João Pessoa – PB

Agosto/2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL A PARTIR DA FRAÇÃO
HEMICELULÓSICA DA FIBRA DE SISAL**

Franklin Damião Xavier

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal da Paraíba.

Orientadora: Marta Maria da Conceição

***Bolsista CAPES**

João Pessoa – PB

Agosto/2016

X3p Xavier, Franklin Damião.
 Produção biotecnológica de xilitol a partir da fração
 hemicelulósica da fibra de sisal / Franklin Damião Xavier.- João
 Pessoa, 2016.
 86f. : il.
 Orientadora: Marta Maria da Conceição
 Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN
 1. Química. 2. Xilitol. 3. Pré-tratamento. 4. Fibra de sisal.
 5. Fermentação.

UFPB/BC

CDU: 54(043)

Produção biotecnológica de xilitol a partir da fração hemicelulósica da fibra de sisal.

Dissertação de Mestrado apresentada pelo aluno Franklin Damiano Xavier e aprovada pela banca examinadora em 26 de agosto de 2016.

Prof.ª Dr.ª Marta Maria da Conceição
Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Flávio Luiz Honorato da Silva
Examinador

Prof.ª Dr.ª Antonia Lúcia de Souza
Examinadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus.

Agradeço a minha família, por ter me proporcionado toda a estrutura emocional e meios de continuar meus estudos até aqui. Meus pais Francisco Xavier e Maria Vieira que mesmo distantes nunca deixaram de me apoiar e ajudar.

Ao meu irmão Denes, de quem eu estive distante por muito tempo e hoje construímos uma ótima relação, deixando de lado muito problemas.

Quero realizar um agradecimento mais que especial a Aleir, minha namorada, que sempre me deu forças para seguir adiante superando qualquer obstáculo. Pessoa essencial em minha vida. Te amo.

Ao meu amigo Gustavo Santos, com quem passei muitas horas de trabalho e estive comigo em todos os momentos dessa pesquisa, nos bons e ruins. Um grande amigo que em todos os momentos me incentivou e ajudou na minha formação acadêmica e como pessoa.

A todos os professores da Pós-Graduação em Química da UFPB, que contribuíram para minha formação acadêmica.

Em especial a minha orientadora, Professora Marta Maria da Conceição, não somente pela orientação, mas também por ter me aberto as portas da instituição desde o início da minha jornada, me dando total apoio e confiança em meu trabalho, pela disponibilidade em tirar quaisquer dúvidas que eu tivesse, pelos conhecimentos passados.

Aos professores: Flávio Luiz Honorato da Silva, Antônia Lúcia de Souza e José Rodrigues de Carvalho Filho por aceitarem o convite e participarem da banca de avaliação deste projeto.

Aos amigos da UFPB e UFCG: Débora, Lorena, Josevan, Márcio, Douglas, Clebson, Sandro, Rafael, Georges, Ruth, William, Lucas, Cláudia e Aline.

As professoras Líbia e Sharline que disponibilizaram toda a estrutura de seus laboratórios para o desenvolvimento da pesquisa, além de estarem presentes em muitos momentos tirando dúvidas e colaborando significativamente para o andamento da pesquisa.

Aos Laboratórios de Bioengenharia, Operações Unitárias, Análises Físico-Químicas, Lacom, na UFPB, e ao Laboratório de Engenharia Bioquímica, na UFCG, por propiciarem toda infraestrutura necessária.

À todos aqueles que estão ou estiveram diretamente ou indiretamente ligados à minha formação. Com um carinho enorme para Nar que me deu total apoio e confiança em muitos momentos.

Finalmente, à UFPB/PPGQ e a CAPES pelo apoio financeiro para realização da pesquisa.

Muito Obrigado!

RESUMO

O sisal é uma planta típica da região nordeste, sendo resistente a climas secos. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial da fibra, com 50% da produção mundial. O sisal é uma matéria-prima potencial para produção de xilitol devido sua composição lignocelulósica, que contém elevado teor de açúcares. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial da fração hemicelulósica da fibra do sisal para produção de xilitol, além de determinar a composição lignocelulósica, o pré-tratamento mais adequado para remoção de xilose e as condições ideais para a fermentação. Os pré-tratamentos foram realizados em reator de aço inoxidável durante 1 hora na proporção de 1:10 (m/v) fibra de sisal/solução ácida ou básica. A fibra de sisal apresentou melhor composição lignocelulósica para produção de xilitol do que outras biomassas empregadas atualmente, como, por exemplo, o bagaço da cana de açúcar e a palha de milho, devido apresentar um maior valor de hemicelulose, cerca de 10% a mais, e menor teor de lignina. No pré-tratamento ácido, com ácido sulfúrico diluído, a remoção de xilose foi mais eficiente nas condições de maior teor de ácido (2,5%) e temperatura (120 °C). No pré-tratamento alcalino observou-se que não houve remoção da fração hemicelulósica, já o tratamento básico/ácido a solubilização de xilose apresentou resultados inferiores ao tratamento ácido individual. A eficácia do pré-tratamento ácido foi confirmada através de Difração de raios-X, Microscopia eletrônica de varredura, Termogravimetria e Infravermelho. Nos difratogramas foi observado um aumento na cristalinidade da amostra tratada devido a remoção de componentes amorfos (hemicelulose), nas curvas TG a segunda etapa de perda de massa caracterizou a despolimerização da hemicelulose com redução de 20% desse material entre a fibra *in natura* e a tratada. Nas micrografias verificou-se que após o pré-tratamento com ácido a camada mais externa das fibras foi removida, além de clivar a estrutura mais complexa antes existente, tornando visível a estrutura fibrilar celulósica. Na melhor condição observada foi produzido o licor hidrolisado em grande escala e este foi fermentado utilizando a levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516. No tempo de 96 horas verificou-se a produção máxima de xilitol, 3,14 g/L, porém o licor proveniente da fibra de sisal apresentou níveis de ácido acético (5,86 g/L) acima do permitido. O fator de conversão xilose em xilitol, no momento onde a produção foi máxima, foi 0,32 g/g e eficiência de conversão de xilose em xilitol foi de 35%. No processo fermentativo observou-se que o ácido acético interagiu com o microrganismo de forma a diminuir a conversão de xilose em xilitol. Portanto, a fibra de sisal apresentou rendimento satisfatório, mesmo em condições onde a fermentação seria desfavorecida, produzindo xilitol.

Palavras chaves: xilitol, pré-tratamento, fibra de sisal, fermentação

ABSTRACT

Sisal is a typical plant of the northeast, being resistant to dry climates. Brazil is the largest producer and exporter of the fiber, with 50% of world production. Sisal is a potential feedstock for the production of xylitol due to its lignocellulosic composition containing high sugar content. This study aimed to evaluate the potential of the hemicellulose fraction of sisal fiber for production of xylitol, in addition to determining the lignocellulosic composition, the most appropriate pretreatment to remove xylose and optimum conditions for fermentation. The pretreatments were carried out in stainless steel reactor for 1 hour 1:10 (w/v) sisal fiber/acidic or basic solution. The sisal fibers showed better lignocellulosic composition for xylitol production other biomasses currently used, for example, bagasse from sugar cane, corn stover, due to exhibit a greater amount of hemicellulose, about 10% more, and lower lignin content. The pretreatment acid, dilute sulfuric acid, xylose removal was more effective under conditions of higher acid content (2,5%) and temperature (120 °C). In alkaline pretreatment it was observed that there was no removal of the hemicellulose fraction, since the treatment basic/acid solubilization xylose was inferior to the single acid treatment. The effectiveness of the pretreatment acid was confirmed by ray-x diffraction, scanning electron microscopy, Thermogravimetric and Infrared. In the XRD patterns was observed an increase in the crystallinity of the treated sample due to the removal of amorphous components (hemicellulose) in TG curves second mass loss phase characterized depolymerization of hemicellulose with a reduction of 20% of the material between fiber *in nature* and treated. In the micrographs that found after pretreatment with acid the outer layer of the fibers was removed, and cleaving the more complex structure existed before making visible the cellulosic fibrillar structure. In the best condition was observed hydrolyzate liquor produced in large scale and this was fermented using yeast *Candida guilliermondii* CCT 1516. At 96 hours there was the maximum production of xylitol, 3,14 g/L, but liquor from the fiber sisal showed levels of acetic acid (5,86 g/L) above those permitted. The conversion factor xylose to xylitol, which when production was maximum, was 0,32 g/g xylose and xylitol in conversion efficiency was 35%. In the fermentation process it was observed that the acetic acid has interacted with the microorganism so as to reduce xylose to xylitol conversion. Therefore, the sisal fiber showed satisfactory performance even in conditions where fermentation would be disadvantaged, producing xylitol.

Key words: xylitol, pretreatment, sisal fiber, fermentation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Plantação de sisal em Nova Floresta – PB	17
Figura 2 – Produção da fibra de sisal no Brasil em 2015	18
Figura 3 – Corte da folha da fibra de sisal ampliada	18
Figura 4 – Fibra de sisal pronta para ser comercializada.	19
Figura 5 – Estrutura da biomassa lignocelulósica.	20
Figura 6 – Estrutura química das principais unidades presentes na parede vegetal	22
Figura 7 – Representação esquemática da celulose	23
Figura 8 – Rede supramolecular da celulose	24
Figura 9 – Estrutura dos álcoois precursores da lignina	25
Figura 10 – Estrutura geral da molécula de lignina	25
Figura 11 – Ilustração de uma cadeia ramificada da hemicelulose	26
Figura 12 – Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica	28
Figura 13– Degradação de açúcares e formação de inibidores	31
Figura 14 – Molécula de xilitol	32
Figura 15– (a) Plantação de sisal na fazenda lagoa cercada após o corte das folhas (b) Máquina paraibana	35
Figura 16 – Fibra de sisal após o desfibramento da folha	35
Figura 17 – Moagem da fibra de sisal	36
Figura 18 – Fluxograma da metodologia Embrapa	37
Figura 19 – Reator de aço Maitec.....	37
Figura 20 –Cromatógrafo Varian	39
Figura 21 – Meio YMA contendo a <i>Candida guilliermondii</i> CCT 1516.....	42
Figura 22 – Meio sintético após o inóculo	43
Figura 23 – Diagrama de Pareto do planejamento experimental da fibra de sisal	49
Figura 24 – Superfície de resposta para a concentração de xilose no pré-tratamento ácido da fibra de sisal.....	50
Figura 25 – Mecanismo de hidrólise catalisada por ácido	51
Figura 26 – DRX da fibra de sisal <i>in natura</i>	53
Figura 27 – DRX da fibra de sisal tratada	53
Figura 28 – Difratoograma da fibra de sisal <i>in natura</i> (FN) e após o tratamento ácido (FA)....	54
Figura 29 – Micrografias da fibra de sisal: <i>in natura</i> (a,c,e) e tratada (b,d,f)	55

Figura 30 – Curva TG da fibra de sisal <i>in natura</i> em atmosfera de nitrogênio.....	57
Figura 31 – Curva TG da fibra de sisal tratada em atmosfera de nitrogênio.....	58
Figura 32 –Curvas TG da fibra de sisal <i>in natura</i> e tratada	59
Figura 33 – Curvas TG dos constituintes da fibra de sisal em atmosfera de nitrogênio	59
Figura 34– Representação do ácido 4-o-metil-glucurônico ligado em uma cadeia de xilana..	62
Figura 35 – Infravermelho da fibra de sisal <i>in natura</i> e tratada	62
Figura 36 – Curvas de crescimento da <i>Candida guilliermondii</i> em meio sintético, representada em densidade celular (a) e massa seca (b).	64
Figura 37 – Diagrama da produção de xilitol.	65
Figura 38 – Crescimento do microrganismo em meio sintético, (a) densidade celular e (b) massa seca.....	67
Figura 39 – Transferência da suspensão celular centrifugada para o licor hidrolisado.....	67
Figura 40 – (a) Perfil da fermentação, com consumo de xilose e ácido acético e formação de xilitol no pré-hidrolisado da fibra de sisal (b) crescimento celular (g/L) da <i>Candida guilliermondii</i> CCT 1516 no licor hidrolisado da fibra durante a fermentação.	68
Figura 41 – Produção de etanol pela <i>Candida guilliermondii</i>	71
Figura 42 – Esquema simplificado do metabolismo da xilose em leveduras	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição lignocelulósica de biomassas.....	21
Tabela 2: Matriz do planejamento experimental com níveis codificados para pré-tratamento ácido	38
Tabela 3: Níveis reais e codificados das variáveis de entrada do planejamento experimental para pré-tratamento ácido	38
Tabela 4: Meio de cultura YMA (Yeast-Malte Extract Agar) para crescimento e manutenção da <i>Candida guilliermondii</i>	41
Tabela 5: Meio sintético para crescimento da <i>Candida guilliermondii</i>	42
Tabela 6: Composição lignocelulósica da fibra de sisal <i>in natura</i> e tratada	46
Tabela 7: Matriz de planejamento experimental do pré-tratamento ácido da fibra de sisal	48
Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) para o pré-tratamento ácido da fibra de sisal	49
Tabela 9: Concentrações de açúcares e inibidores nos licores do pré-tratamento alcalino	51
Tabela 10: Tratamento básico seguido de ácido para a fibra de sisal.....	52
Tabela 11: Cristalinidade da fibra de sisal <i>in natura</i> e tratada	55
Tabela 12: Dados das curvas TG da fibra de sisal <i>in natura</i> , tratada e seus constituintes em atmosfera de nitrogênio	57
Tabela 13: Bandas de transmitância do infravermelho para a fibra de sisal	62
Tabela 14: Concentração de açúcares e inibidores do licor pré-hidrolisado da fibra de sisal ..	66
Tabela 15: Concentração máxima de xilitol e os parâmetros fermentativos do licor hidrolisado da fibra de sisal	69
Tabela 16: Produção de xilitol a partir de diferentes biomassas	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

DRX – Difração de Raios – X

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

HMF – Hidroximetilfurfural

IV – Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

TG – Termogravimetria

YMA – Yeast Malte Agar (Agar Extrato de Malte-Levedura)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.2 Objetivos	15
1.2.1 Objetivo geral	15
1.2.2 Objetivos específicos.....	15
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1 <i>Agave sisalana</i>	17
2.2 Biomassa lignocelulósica	19
2.2.1 Composição lignocelulósica	20
2.2.2 Celulose	22
2.2.3 Lignina.....	24
2.2.4 Hemicelulose	26
2.3 Pré-tratamentos empregados para produção de xilitol	27
2.4 Inibidores	30
2.5 Xilitol	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 Matéria-prima	35
3.2 Pré-tratamento físico	36
3.2.1 Granulometria.....	36
3.3 Análises físico-químicas	36
3.4 Pré-tratamento químico	37
3.4.1 Pré-tratamento ácido.....	38
3.4.2 Pré-tratamento alcalino.....	38
3.4.3 Pré-tratamento alcalino/ácido	38
3.5 Métodos analíticos	39
3.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	39
3.5.3 Difração de Raios-X (DRX).....	40
3.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	40
3.5.5 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV).....	40
3.6 Fermentação	40
3.6.1 Microrganismo	40
3.6.1.1 Manutenção das células	41
3.6.1.2 Cultivo da <i>Candida guilliermondii</i> CCT 1516 em meio sintético.....	42
3.6.1.3 Determinação de parâmetros cinéticos	43

3.6.2 Preparo do inóculo.....	44
3.6.3 Condições de cultivo do processo fermentativo	44
3.6.4 Determinação de parâmetros fermentativos	44
3.6.4.1 Fator de conversão de xilose em xilitol	44
3.6.4.2 Eficiência na conversão de xilose em xilitol $\eta(\%)$	45
3.6.4.3 Porcentagem de consumo de xilose (Y%).....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 Caracterização do material lignocelulósico.....	46
4.2 Pré-hidrolise	48
4.2.1 Pré-tratamento ácido.....	48
4.2.2 Pré-tratamento alcalino e básico seguido de ácido.....	51
4.3 Determinação da cristalinidade por DRX.....	52
4.4 Análise morfológica da fibra de sisal (MEV)	55
4.5. Análise Termogravimétrica	56
4.6 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV).....	61
4.7 Fermentação.....	63
4.7.1 Curvas de crescimento da <i>Candida guilliermondii</i> CCT 1516 em meio sintético	63
4.7.2 Bioconversão de xilose em xilitol	65
4.7.3 Determinação de parâmetros fermentativos	69
5 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS	75

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a busca por matérias-primas de fontes renováveis é prioridade em várias áreas de pesquisa. Fontes de biomassa têm recebido atenção especial, destacando-se os materiais lignocelulósicos. Estes compostos são um dos mais abundantes recursos orgânicos renováveis da natureza. Neste contexto se sobressai o sisal, *Agave sisalana*, devido ser biodegradável, renovável e o crescente aumento de sua aplicação industrial em vários setores, tais como: biocombustíveis, polímeros, têxtil, compósitos, entre outros.

Os compostos lignocelulósicos são constituídos basicamente pelos polímeros: celulose, hemicelulose e lignina. A fibra do sisal possui elevado teor de polissacarídeos que possibilita a bioconversão em xilitol. Essa característica lhe credencia como uma alternativa potencial ao bagaço de cana-de-açúcar e outras fontes energéticas de segunda geração.

O xilitol é um poliálcool que possui poder edulcorante elevado e 40% menos calorias do que a sacarose. É aplicado na indústria de alimentos, farmacêutica e cosméticos. Para a produção de xilitol a partir de biomassas lignocelulósicas, utilizam-se métodos físicos, químicos e físico-químicos para romper o complexo de celulose-hemicelulose-lignina. O maior empecilho deste processo é a retirada da lignina do complexo para posterior clivagem dos polissacarídeos que compõe a celulose e hemicelulose, principalmente glicose e xilose respectivamente.

Dentre os açúcares a xilose é o segundo monossacarídeo mais abundante da natureza, e está presente em grande parte das estruturas vegetais, onde sua composição pode variar de acordo com a espécie e condições climáticas. A xilose está contida na fração hemicelulósicas das plantas, principalmente nas cadeias de xilanas. Através do uso de pré-tratamentos é possível solubilizar estes açúcares para posterior conversão biotecnológica em xilitol. Esta é uma alternativa viável em comparação com o método químico tradicional, que obtém rendimentos baixos.

A bioconversão para produção de xilitol é um processo que não necessita de catalisadores convencionais, nem elevadas pressões ou temperaturas. Diversos microrganismos realizam esta conversão, desde fungos a bactérias. As mais utilizadas são as leveduras do gênero *Candida*, que conferem um rendimento de até 90% na conversão de xilose em xilitol. Dentro desse grupo se destaca a *Candida guilliermondii*, uma das primeiras a serem estudadas e uma das mais empregadas para a bioconversão atualmente. Um dos empecilhos do uso do

hidrolisado da fração hemicelulósica, é a formação de inibidores durante a produção do licor, sendo essencial a escolha do pré-tratamento empregado para não degradar os açúcares e consequentemente levar a formação de inibidores ao processo fermentativo (CHEN, 2010; RAO, 2016).

Diferentemente de outras biomassas, como a cana-de-açúcar e os derivados de milho, a fibra de sisal não é utilizada na produção de alimentos, tem custo relativamente baixo de biomassa e é adaptada as condições climáticas da região nordeste. Dessa forma, a produção de xilitol a partir da xilose proveniente da fração hemicelulósica do sisal não apresenta, apenas, a agregação de valor, mas uma alternativa mais barata de produção de xilitol, visto o elevado custo para produção e a dificuldade na obtenção de xilose ultra pura através do método químico adotado usualmente.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial da fração hemicelulósica da fibra de sisal para a produção de xilitol por processos biotecnológicos.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar a composição da fibra de sisal, analisando umidade, cinzas, celulose, hemicelulose, holocelulose, lignina e extrativos;
- Caracterizar a fibra de sisal por DRX, MEV, Infravermelho e Termogravimetria;
- Realizar pré-hidrólise ácida da fibra de sisal;
- Determinar as melhores condições da pré-hidrólise através de planejamento fatorial, indicando melhor remoção de xilose da fibra de sisal;
- Avaliar pré-tratamento básico/ácido para remoção de xilose da fibra de sisal;
- Determinar a composição lignocelulósica da fibra após a pré-hidrólise;
- Quantificar o teor de açúcares e inibidores do hidrolisado da fibra de sisal por CLAE;

- Avaliar as condições da fermentação alcoólica para produção de xilitol.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 *Agave sisalana*

O sisal, Figura 1, é uma espécie de planta originária do México, especificamente da região de Yucatan. Seu nome popular deriva-se de uma erva nativa denominada zizal-xiu. Com relação a classificação botânica, o sisal é uma monocotiledônea, família *Agavaceae*, gênero *Agave*, espécie *Agave sisalana* (PAIVA, 2006).

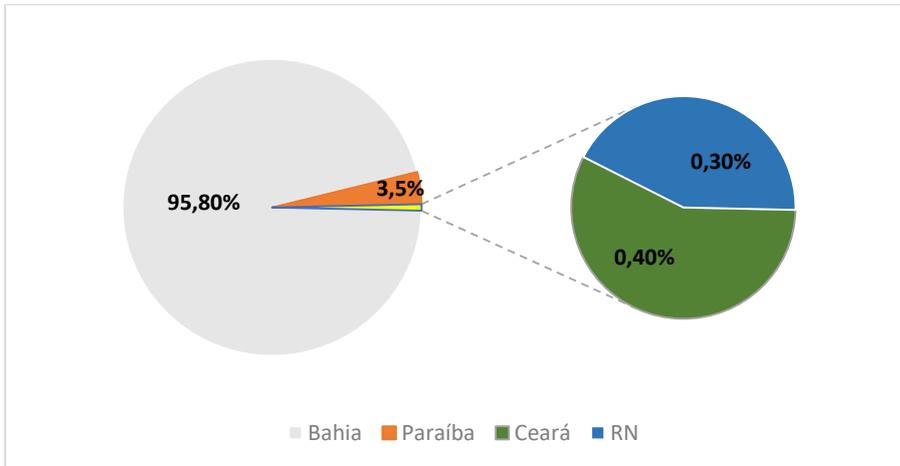
Figura 1 – Plantação de sisal em Nova Floresta – PB



Fonte – Própria

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o Brasil é o maior produtor e exportador mundial da fibra de sisal, com 50% desse total, correspondendo a 91,1 mil toneladas com um valor aproximado de 123,9 milhões de dólares. A região nordeste é a principal produtora do país, sendo a Bahia produtora de 95,8% desse total. Conforme destacado na Figura 2, a Paraíba é o segundo maior produtor da fibra no país, com um total de 3,5%, em seguida vem o Ceará 0,4% e Rio Grande do Norte 0,3%. Grande parte da produção é destinada para a exportação. A região semiárida do Brasil se destaca principalmente por suas características edafoclimáticas que favorecem a produção do sisal (CONAB, 2015).

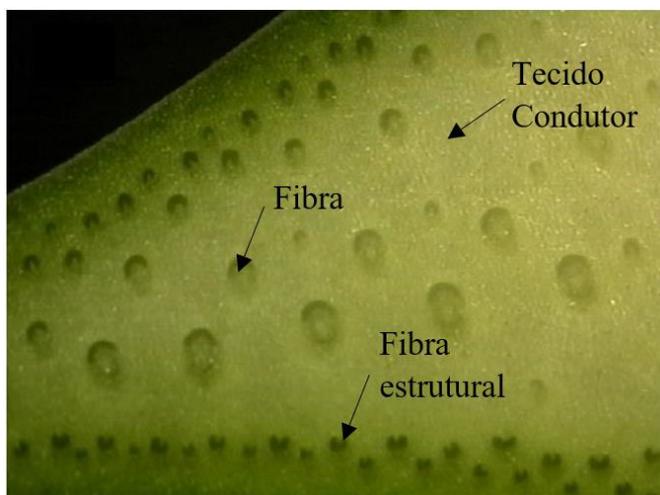
Figura 2 – Produção da fibra de sisal no Brasil em 2015



Fonte – CONAB, 2015

Para a produção da fibra apenas a folha é aproveitada, de forma que uma planta de sisal produz entre 200 e 250 folhas antes da floração, cada uma das quais contém cerca de 700-1400 feixes de fibras com um comprimento variando de 0,5-1,0 m. Durante o desfibramento cerca de 4% da folha é aproveitada, ou seja, é convertida em fibra e o restante do material é decomposto em aproximadamente 16% de resíduos sólidos e 80% de resíduos líquidos. A Figura 3 demonstra a imagem ampliada de uma folha de sisal após o corte, nela pode-se constatar a presença de dois tipos de fibras além do tecido condutor. As fibras estruturais conferem ao sisal sua rigidez e são encontrados na periferia da folha; as fibras em arco crescem em conjunto com os tecidos condutores da planta e são encontrados no meio da folha. Estas fibras podem ser encontrada desde a base até ponta da planta e possui elevada resistência mecânica (SILVA, 2010; FILHO, 2013).

Figura 3 – Corte da folha da fibra de sisal ampliada.



Fonte – Adaptada de Filho et al. (2013)

O bagaço de sisal gerado após o desfibramento da folha de sisal geralmente é descartado, deixado no campo sem nenhuma utilização ou em poucos casos destinado como ração animal (BRANDÃO, 2013). A fibra de sisal depois de desfibramento é seca e estocada, assim como demonstrado na Figura 4, para posterior comercialização. Além de exportada, a fibra de sisal também é utilizada para confecção de cabos, fios, tapetes, carpetes, colchões, tapetes e artigos artesanais, bem como na fabricação de celulose para a produção de papel Kraft (de alta resistência) e outros tipos de papel fino (PANDEY, 2000; SILVA, 2010).

Figura 4– Fibra de sisal pronta para ser comercializada.



Fonte – Própria

Além dessas aplicações, a fibra de sisal despertou o interesse de diversos ramos industriais. Justificada pela facilidade de cultivo, com elevada produtividade e baixo custo, atrelada a característica de ser uma biomassa renovável e biodegradável. Tendo a possibilidade de ser utilizada na indústria automotiva, de móveis, de eletrodomésticos, na mistura com polipropileno, em substituição a fibra de vidro e na construção civil. Devido a sua composição rica em carboidratos também pode ser aplicada na produção de biocombustíveis e outros derivados como o xilitol. Outra característica importante está relacionada a suas propriedades mecânicas, sendo utilizado como reforço em compósitos, argamassas e concreto (GUERRERO, 2014).

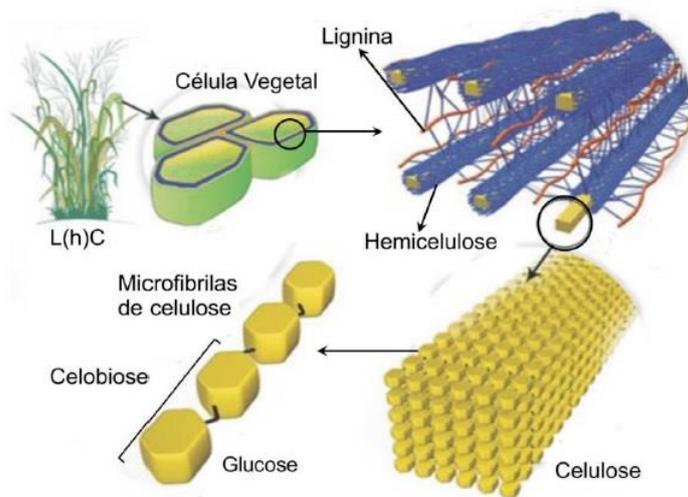
2.2 Biomassa lignocelulósica

Os materiais lignocelulósicos representam a fração mais expressiva da biomassa vegetal, sendo a maior fonte de compostos orgânicos e energias renováveis da biosfera. Dentre eles, pode-se destacar a fibra de sisal, que possui grande teor de açúcares fermentáveis

em sua estrutura, sendo uma cultura pouco exigente e adaptada ao clima do nordeste brasileiro (PANDEY, 2000).

Biomassas lignocelulósicas em sua grande maioria são compostas pelos polissacarídeos celulose e hemicelulose, e estes protegidos por outra macromolécula formada por álcoois aromáticos, a lignina, aos quais se encontram unidos por ligações covalentes e de hidrogênio. Em menores proporções, e de acordo com a origem da planta, é possível encontrar extrativos e minerais (SILVA, 2010). Assim como representado na Figura 5, a composição química e o arranjo dessa matriz lhe conferem características de rigidez e resistência. A forte combinação de lignina com celulose e hemicelulose torna mais difícil para isolar a celulose e os demais carboidratos para a utilização eficaz em diversos processos, como, por exemplo, na produção de biocombustíveis, compósitos e polímeros. (ASADA, 2015)

Figura 5 – Estrutura da biomassa lignocelulósica.



Fonte – SANTOS et al. (2012)

Devido a estas características a biomassa lignocelulósica vem ganhando destaque e maior aplicação industrial, principalmente por sua grande abundância, variedade, ser renovável, baixo custo, baixo impacto ambiental e a possibilidade de produção de diversos produtos com grande valor de mercado (MULAKHUDAIR, 2016).

2.2.1 Composição lignocelulósica

As células vegetais são compostas por redes complexas de polissacarídeos, proteínas, pectinas e lignina. As ligações carboidratos-lignina geralmente são intermediadas por regiões amorfas formadas por cadeias arabinoxilanas, as quais são cadeias precursoras da hemicelulose. A biomassa como um todo pode ser delimitada entre componentes celulósicos e componentes não celulósicos, que seriam a lignina, hemicelulose, pectina, grupos acetil e proteínas. A combinação entre essas moléculas podem definir a estrutura da parede celular e conferir características específicas de cada planta (MATHEW, 2016).

A composição química de cada biomassa pode variar de acordo com a quantidade de cada componente estrutural além de questões climáticas e morfológicas de cada espécie, de modo geral biomassas contêm 35-50% de celulose, seguido de 20-35% de hemicelulose, 10-25% de lignina e uma pequena quantidade de cinzas e extrativos (SANTOS, 2012). Na Tabela 1, é possível constatar a grande quantidade de carboidratos presentes na fibra de sisal quando comparada com outros materiais, cerca 80% de sua composição.

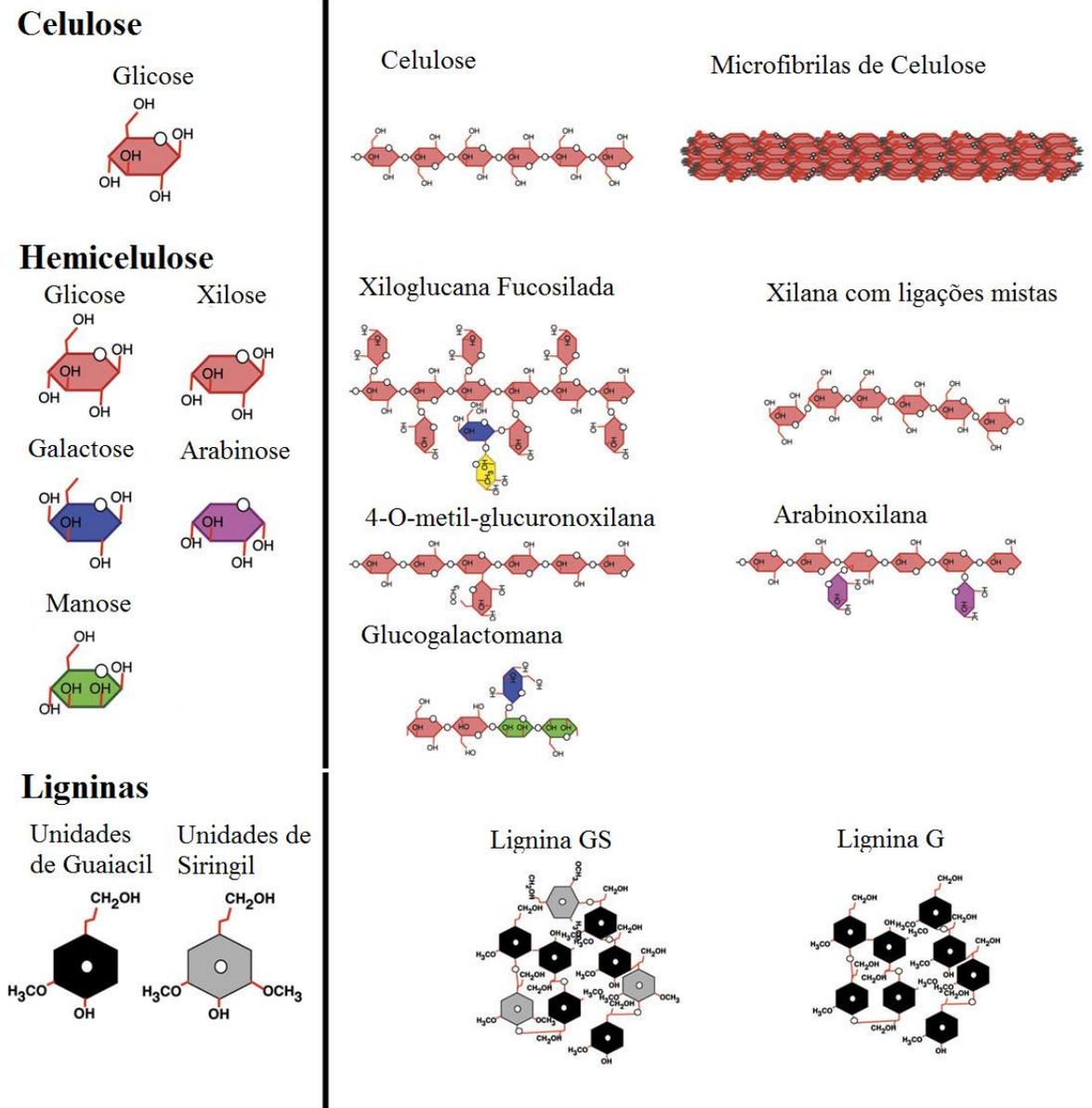
Tabela 1: Composição lignocelulósica de biomassas

Amostra	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)
Fibra de sisal	65-78	10-20	9
Cânhamo	74,1	7,6	2,2
Bagaço de cana	32-48	19-24	23-32
Bambu	54,6	11,4	21,7
Fibra de coco	36-43	0,15-0,25	41-45
Palha de cana	40-44	30-32	22-25

Fontes: DOREZ (2014); MARTIN (2010); SARKAR (2012)

Segundo Sarkar et al. (2012), desde 1970 o estudo da composição química das células vegetais tem sido uma área de destaque. Foi determinado que as paredes celulares são compostas por “blocos de construção” básicos, destacado na Figura 6. Dessa forma, foi constatado que todas as plantas possuem várias características em comum, por exemplo, as paredes das células vegetais são compostas de microfibrilas de celulose que conferem a característica de rigibilidade. Também foi possível verificar que nem todas as paredes vegetais eram formadas pelo mesmo tipo de ligação, ou seja, não possuíam exatamente a mesma composição química e arranjos diferentes.

Figura 6 – Estrutura química das principais unidades presentes na parede vegetal



Fonte – Adaptada de Sarkar et al. (2009)

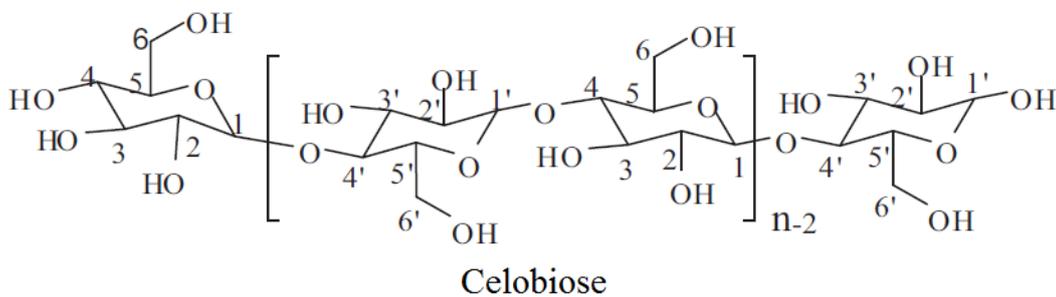
2.2.2 Celulose

A celulose é o polissacarídeo vegetal mais abundante do planeta e o maior componente da estrutura química de biomassas lignocelulósicas. Normalmente é encontrada associada a hemicelulose e lignina, mas também pode ser encontrada na forma pura, como no algodão (MOOD, 2013).

A celulose, Figura 7, pode ser considerada um homopolissacarídeo linear e cristalino. É formado pela repetição de unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas tipo β

(1→4). A estrutura linear, é conferida pela configuração das ligações glicosídicas. Essas cadeias aglomeram-se formando fibrilas e apresentam ligações de hidrogênio entre os grupamentos hidroxila intermoleculares que acarreta na agregação das cadeias celulósicas em “fibrilas elementares” com alto grau de cristalinidade. Estes agregados conferem resistência à tensão, tornam a celulose insolúvel em vários solventes e explicam a resistência a degradação microbiana (MATTHEUS, 2006; DING, 2006).

Figura 7 – Representação esquemática da celulose

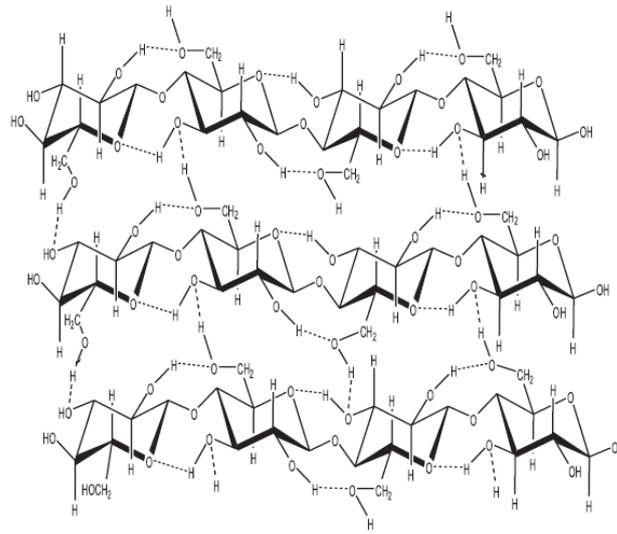


Fonte – Adaptada de Suhas et al. (2016)

A união de duas glicoses através da ligação glicosídica citada acima forma o dímero de celobiose, que é repetida ao longo da cadeia de celulose. Nas estruturas vegetais a celulose pode ser encontrada na forma cristalina e amorfa. Principalmente a celulose tipo I, que possui característica cristalina, ou seja, organização atômica a longo alcance. Os outros constituintes da amostra são de natureza amorfa. Dessa forma, a celulose alterna regiões altamente cristalinas, com regiões menos ordenadas, as regiões mais amorfas, que são mais suscetíveis a ataques de reagentes ou adsorção de água (KADLA, 2000; KRISHNAN, 2015)

A celulose tipo I é mais difícil de ser atingida por um reagente durante a realização de algum tratamento, ou seja, possui menor reatividade devido a menor quantidade de hidroxilas para reagir, pois grande parte das hidroxilas estariam realizando ligações de hidrogênio intermoleculares. A celulose tipo I é formada por dois planos cristalográficos e a tipo II formada por três planos, onde algumas ligações de hidrogênio não são formadas e conseqüentemente a energia de ativação para quebra dessa estrutura seria menor (LENGOWSKI, 2013). Wang et al. (2011) constatou a influência da quantidade de planos durante o processo de hidrólise. Quanto mais amorfa a celulose maior reatividade durante a hidrólise ácida.

Figura 8 – Rede supramolecular da celulose

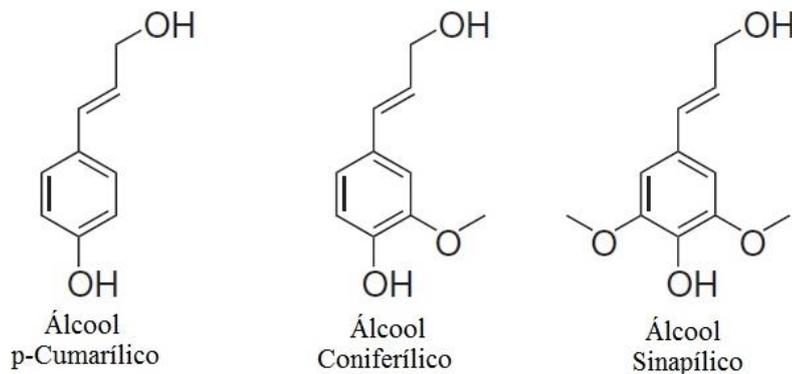


Fonte – Adaptada de Santos et al. (2012)

2.2.3 Lignina

A lignina é considerado como o segundo componente mais abundante na biomassa, sendo caracterizado como um polímero aromático tridimensional com função de proteger a celulose e hemicelulose de ataques microbianos. A lignina é uma macromolécula complexa, formada pela polimerização radicalar de unidades fenil-propeno: álcool p-cumarílico (3-hidroxi-prop-1-enil), álcool coniferílico (4-(3-hidroxi-1-proprenil)-2-metoxifenol) e álcool sinapílico (4-(3-hidroxi-prop-1-enil)-2,6-dimetoxifenol), demonstrado na Figura 9. Constitui a fração não polissacarídica mais abundante na biomassa lignocelulósica. Envolve as microfibrilas celulósicas, conferindo proteção à degradação química e/ou biológica, e pode formar ligações covalentes com a hemicelulose (MOOD, 2013; PEI, 2016).

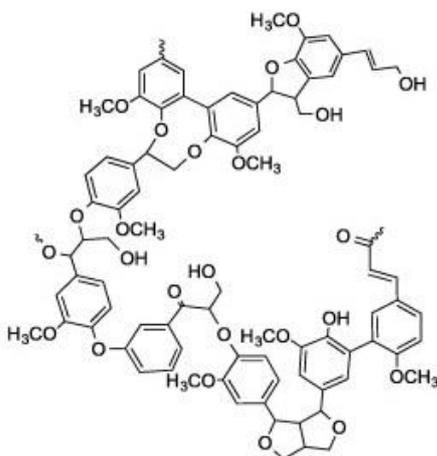
Figura 9 – Estrutura dos álcoois precursores da lignina



Fonte – Adaptada de Rubin (2008)

A lignina é uma molécula que não possui sua estrutura muito bem conhecida, sendo bastante heterogênea. As estruturas químicas da lignina tem sido estudadas principalmente por métodos químicos e espectroscópicos. De modo geral ela é uma substância amorfa, composta por uma parte aromática e outra de cadeias C3. Os três componentes representados na Figura 9, formam o polímero irregular e tridimensional, onde as várias combinações de estruturas de cadeias proporcionam uma diversidade estrutural enorme para a lignina. A Figura 10, representa uma molécula de lignina. Na maioria das vezes a lignina forma um complexo com os carboidatos presentes na amostra, onde a estrutura da mesma pode ser afetada por fatores ambientais que ocorrem durante a biossíntese (SAINI, 2016).

Figura 10 – Estrutura geral da molécula de lignina



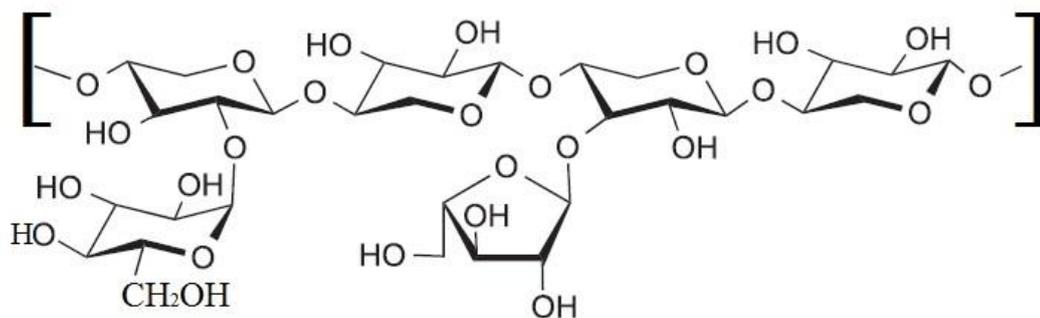
Fonte: Adaptada de FU et al. (2015)

2.2.4 Hemicelulose

A hemicelulose é um heteropolímero extremamente ramificado, composto principalmente por pentoses, dentre elas a D-xilose e D-arabinose. Apresentando um grau de polimerização inferior a 200 e pode ser acetilada (SARKAR, 2012). Além das pentoses a hemicelulose contém algumas hexoses, D-glicose, D-galactose e D-manose e ácidos urônicos como o ácido 4-o-metil- glucurônico. A hemicelulose tem uma estabilidade térmica baixa e pode ser hidrolisada quando é utilizado ácido diluído, sendo suscetíveis a ataque por fungos quando não possui a presença da lignina como proteção (VO e NAVARD, 2016).

Os principais componentes da hemicelulose são as heteroxilanas, em algumas espécies vegetais podem atingir 90% da fração hemicelulósica. As xilanas são formadas de uma cadeia principal, formada através de ligações glicosídicas de moléculas de xilose, em sua grande maioria, substituída por outros monômeros de açúcares. Na Figura 11, está representada uma cadeia ramificada da hemicelulose. Elas estão localizadas na parede celular secundária, como sendo uma interface entre a celulose e a lignina principalmente (SARKAR, 2009).

Figura 11 – Ilustração de uma cadeia ramificada da hemicelulose



Fonte – Adaptada de Fu et al. (2015)

A hidrólise dos açúcares presentes na fração hemicelulósica é um processo largamente estudado, visto que, grande parte desses açúcares possuem um grande potencial para novas aplicações na indústria química, como, por exemplo, a conversão da xilose presente nessa fração para xilitol. O xilitol pode ser aplicado na indústria alimentar e farmacêutica. Portanto,

se faz necessário buscar novas formas eficiente para hidrolisar compostos hemicelulósicos (BAI, 2015).

2.3 Pré-tratamentos empregados para produção de xilitol

As matérias primas oriundas de materiais lignocelulósicos podem ser processados a fim de se produzir compostos como etanol e xilitol. Para isso, grande parte dos pesquisadores utilizam três etapas: o pré-tratamento para deslignificação, a fim de deixar a celulose e hemicelulose mais expostas; a hidrólise da celulose e hemicelulose para produção de açúcares fermentáveis como xilose e glicose; e por fim, a fermentação desses açúcares hidrolisados. (DEMIRBAS, 2005)

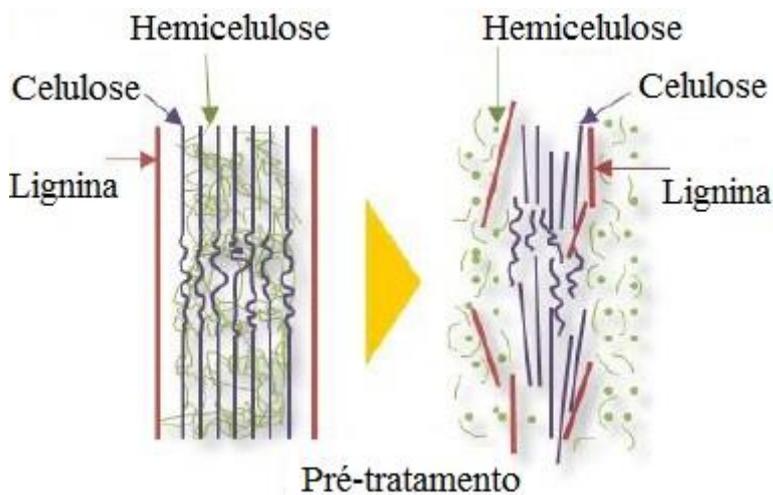
A xilose é um dos principais açúcares obtidos durante a hidrólise de uma biomassa lignocelulósica. Juntamente com ela são obtidos outros monômeros de açúcares, tais como, glicose, arabinose, manose dentre outros. Ela é considerada o segundo monômero de açúcar mais abundante da biosfera e é utilizado no processo de conversão em xilitol, de forma industrial ou microbiológica. Dessa forma, os estudos na área de desenvolvimento para obtenção de xilose a partir de resíduos renováveis alcançaram um aumento considerável. Com a finalidade de obter um produto final com alto valor de mercado e agregar substancialmente valores a uma biomassa que em teoria não teria utilidade e de caráter renovável (ALBUQUERQUE, 2015).

Visto isso, a hidrólise desses polissacarídeos em seus respectivos monômeros é uma etapa essencial a fim de se obter açúcares fermentáveis. O pré-tratamento pode se proceder de diferentes formas de acordo com o objetivo inicial do pesquisador. Diferentes pré-tratamentos separam e solubilizam diferentes partes do complexo lignocelulósico. A eficácia do pré-tratamento pode ser avaliada de diferentes formas, pois além da formação e preservação de pentoses e hexoses da biomassa o mesmo deve evitar ao máximo a formação de subprodutos que provoquem a inibição do microrganismo durante a fermentação. (MOSIER, 2005)

Os pré-tratamentos em biomassas lignocelulósicas utilizam-se métodos químicos, físicos e físico-químicos para romper o complexo de celulose-hemicelulose-lignina, representado na Figura 12. A maior dificuldade deste processo é a retirada da lignina do complexo para posterior clivagem dos polissacarídeos que compõe a celulose e hemicelulose (MOOD et. al., 2013). Na grande maioria das vezes essas biomassas liberam a xilose a partir da estrutura hemicelulósica quando é empregado um pré-tratamento com ácidos em concentrações diluídas a temperaturas abaixo de 140 °C. A conversão da xilose em xilitol

pode ser realizada por via química ou microbiológica, utilizando o hidrolisado obtido a partir da porção hemicelulósica (ALBUQUERQUE, 2014).

Figura 12 – Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica



Fonte – Adaptada de Mosier et al. (2005)

Os pré-tratamentos físicos tem o intuito de modificar o arranjo molecular do complexo lignocelulósico com a finalidade de aumentar reatividade (acessibilidade) dos polissacarídeos para um ataque ácido ou enzimático. Nesse contexto, pode ser utilizado vários tipos de métodos físicos para aumentar a eficiência na obtenção do licor final rico em açúcares, como: moagem, micro-ondas, irradiação por raios gamas ou feixes de elétrons. Todos esses métodos tem a intenção de diminuir o tamanho da partícula (RAO, 2016).

Entre os pré-tratamentos químicos, os mais utilizados são o alcalino e ácido, porém de acordo com o objetivo do pesquisador é possível a utilização de outros métodos e consequentemente diferentes reagentes, como amônia, solventes orgânicos e reagentes oxidativos. O pré-tratamento alcalino remove a lignina e faz com que a holocelulose fique mais acessível para uma etapa subsequente que poder ser por ácido ou degradação enzimática. Em meio alcalino, as ligações éster presentes em parte da hemicelulose e na lignina são clivadas com facilidade, assim grande parte da lignina é eliminada e o material lignocelulósica diminui seu volume, deixando sua celulose e hemicelulose mais expostas. Na grande maioria das vezes são utilizados como reagentes hidróxido de sódio, potássio, cálcio e amônio. O tratamento alcalino não necessita de temperatura elevadas ou reatores complexos (REN, 2016).

O pré-tratamento ácido é considerado um dos mais importantes, gerando uma grande quantidade de açúcares a partir de biomassas distintas. As temperaturas durante o tratamento podem variar de 100 °C até 160 °C. Dentre os ácidos o mais utilizado é o ácido sulfúrico, concentrado ou diluído, mas também são empregados ácidos nítrico, fosfórico e clorídrico para a realização do pré-tratamento. O método utiliza um reator, geralmente aquecido, para realizar a reação da biomassa com o ácido em questão, existindo a necessidade do reaproveitamento deste material devido a viabilidade econômica. Alguns pontos contrários a esta tecnologia são: a necessidade de neutralização antes da fermentação para que não ocorra a inibição; o risco de operação com produtos perigosos; e o custo da instalação para que os materiais suportem as condições agressivas do fluido reagente (SARKAR, 2012).

Esse pré-tratamento tem sido muito utilizado para remoção de componentes da fração hemicelulósica, devido ao ataque ácido atingir principalmente polissacarídeos, especialmente hemicelulósicos. Outra desvantagem desse método seria com relação a produção de inibidores indesejáveis para a fermentação microbológica, como ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural. Estes inibidores são resultados da degradação de açúcares pela ação do ácido, principalmente xilose e glicose. A formação desses compostos está atrelada a fatores como elevada concentração de ácidos e altas temperaturas (MOOD, 2013).

Mesmo com algumas desvantagens a hidrólise com ácido diluído é o método que tem sido frequentemente empregado em grande parte das pesquisas atuais, uma vez que esta metodologia alcança rendimentos elevados de açúcares a partir da hemicelulose, bem como em comparação a hidrólise ácido concentrada, é mais barata, gera menor quantidade de produtos de degradação (HMF e furfural), que são tóxicos aos microrganismos, além de menores problemas de corrosão nos tanques de hidrólise e tubulações (ARRUDA, 2011).

Entre os tratamentos físico-químicos se destacam o ultrassom, irradiação com micro-ondas, explosão de vapor, CO₂, amônia, dentre outras. Esse tipo de tratamento faz uso das condições e reagentes que afetam as propriedades físicas e químicas da biomassa (MATHEW, 2014). Dentro desse grupo de técnicas o tratamento hidrotérmico tem apresentado bons resultados e uma efetiva solubilização da hemicelulose e a não produção de inibidores (VALLEJOS, 2016).

A realização de um pré-tratamento e hidrólise, a princípio, têm a finalidade de solubilizar os açúcares monoméricos e compostos de baixo peso molecular presentes na biomassa lignocelulósica, para que em uma etapa subsequente, o licor produzido venha a ser

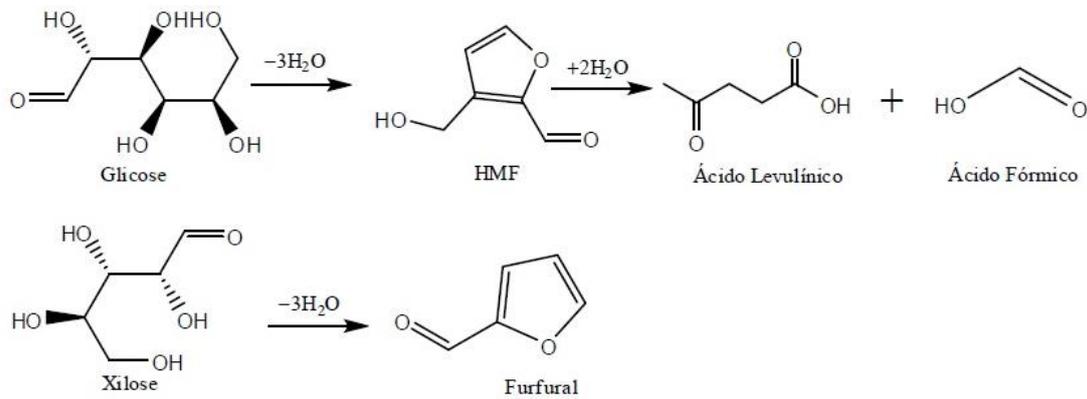
utilizado como uma fonte de carbono por diferentes microrganismos. Dessa forma, permitindo que matérias-primas lignocelulósicas possam ser susceptíveis a utilização biotecnológica.

2.4 Inibidores

Durante um processo fermentativo existem vários fatores que podem influenciar diretamente o rendimento e a produtividade de xilitol, entre eles podemos destacar a concentração inicial de células do inóculo, tipo de substrato, meio de cultura, compostos inibidores, temperatura, pH e oxigenação do meio. Geralmente no licor proveniente de hidrolisados hemicelulósicos ocorre a presença de compostos que causam a inibição do metabolismo do microrganismo, provocando a morte microbiana ou a redução na produtividade do xilitol. Esses produtos são gerados a partir da decomposição de açúcares presentes na hemicelulose e de compostos da lignina. Os principais inibidores são o ácido acético, 5-hidroximetilfurfural (HMF), furfural e compostos fenólicos derivados da lignina. A concentração aceitável de inibidores varia de acordo com microrganismo utilizado e seu nível de adaptação ao meio de fermentação utilizado (RAO, 2016).

A presença de inibidores, principalmente furfural e HMF nos licores hidrolisados são decorrência da degradação de açúcares como xilose e glicose em meio ácido, como demonstrado na Figura 13. O furfural e o HMF são gerados a partir da desidratação catalítica da xilose e glicose, respectivamente. Os níveis inibitórios para a levedura *Candida guilliermondii* são de 2 g/L para ambos, onde a fermentação é inibida 100% nessas condições. O furfural e o 5-hidroximetilfurfural provocam retardamento no processo fermentativo no início da fermentação, inibem o crescimento da levedura e síntese de proteínas (Duarte, 2005). Os compostos fenólicos são os principais inibidores provenientes da lignina, eles provocam a perda a integridade das membranas dos microrganismos. Com concentrações a partir de 0,1 g/L o crescimento celular e a produção de xilitol são inibidos (MUSSATTO, 2004; SÁ, 2015).

Figura 13– Degradação de açúcares e formação de inibidores



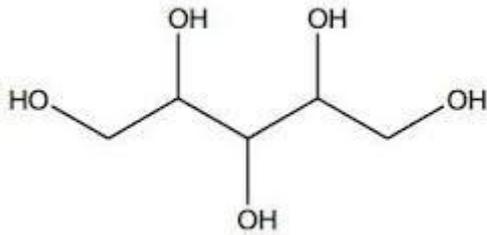
Fonte – Silva (2013)

O ácido acético é um subproduto oriundo da degradação de grupos acetil presentes na hemicelulose durante o tratamento ácido. Segundo Rodrigues et al. (2011) durante a fermentação pela levedura *Candida guilliermondii*, é estimulado por baixas concentrações de ácido acético, menores que 1 g/L. Em concentrações de ácido acético acima de 3,0 g/L as fermentações tiveram efeitos negativos, ocorrendo uma inibição severa ao microrganismo. Diferentemente dos demais inibidores citados o ácido acético interage com a célula do microrganismo de forma a provocar a morte instantânea, devido a uma mudança de pH no interior da célula.

2.5 Xilitol

O Xilitol é um poliálcool de fórmula de $C_5H_{12}O_5$, que possui uma hidroxila ligada a cada átomo de carbono de sua estrutura, assim como destacado na Figura 13. É um adoçante comercial com alto poder edulcorante e solubilidade (ALBUQUERQUE, 2014). Quando comparado com a sacarose, o xilitol tem quase o mesmo poder adoçante, porém apresenta a vantagem de possuir menor teor calórico, 2,4 cal/g, e a sacarose 4 cal/g, correspondendo a cerca de 40 % menos calorias. Na temperatura ambiente o xilitol apresenta-se como um pó branco, cristalino, inodoro e de sabor doce. Sendo uma alternativa interessante para os diabéticos, pois o seu metabolismo é independente da insulina (PAL, 2013).

Figura 14 – Molécula de xilitol



Industrialmente o xilitol é sintetizado a partir da redução química da xilose por hidrogenação usando um catalisador de níquel de Raney. Esse método foi desenvolvido na Finlândia por volta de 1970, utilizando como condições alta temperatura (80-140 °C) e pressão (até 50 atm). No entanto, esse procedimento necessita de uma D-xilose com alto teor de pureza e condições operacionais especiais, o que torna o processo tradicional muito inviável. Outros agravantes para este método seriam: apresentar preocupações ambientais e de segurança, onde também é caracterizado por elevados custos de produção e de baixo rendimento do produto, entre 50-60% de xilitol (CHEN, 2010).

O xilitol pode ser obtido também de forma biotecnológica, na qual a xilose, o segundo carboidrato mais abundante da natureza, é convertido em xilitol com o uso de microrganismos específicos. Dentre esses microrganismos podemos salientar a *Candida guilliermondii*, uma das primeiras utilizadas na produção de xilitol, onde o poliálcool pode ser considerado um metabólito intermediário desses microrganismos. Nessa vertente, observa-se que vários estudos têm procurado alternativas para produção de xilitol, com especial atenção aos processos biotecnológicos. Com a finalidade de reduzir ainda mais os custos de processamento e, além disso, em buscar de soluções para a reciclagem de resíduos, a utilização potencial das matérias-primas renováveis, como a fibra de sisal, bagaço de cana-de-açúcar, dentre outros ganhou destaque nas pesquisas atuais (ZANG, 2014).

O xilitol por ser um adoçante artificial menos calórico, é muito utilizado como substituto do açúcar empregado em indústrias de alimentos, uma vez que sua metabolização independe da rota da insulina. Além disso, o xilitol possui um enorme campo de aplicações, na indústria odontológica, devido propriedades anticariogênicas e biomédicas, tornando um ingrediente interessante na formulação de alimentos funcionais. Previne doenças como otite e infecções respiratórias, dentre outras. Grande parte do xilitol produzido atualmente é derivado do processo químico, o que torna o produto final mais caro. O processo biotecnológico se mostra uma alternativa de baixo custo quando comparada com o produto de

origem química, o qual é realizado à pressão atmosférica e a purificação do hidrolisado é menos complexo (VALLEJOS, 2016).

A demanda de xilitol no planeta aumenta cada vez mais, de acordo que os consumidores estão mais propensos a consumir alimentos menos calóricos, uma maior conscientização na alimentação saudável e em alguns casos relacionado a dietas ou uso indireto em medicamentos e produtos diversos. No ano de 2013 o consumo global de xilitol foi de 160 mil toneladas, com uma estimativa de chegar a 242 mil toneladas em 2020. Dentre as indústrias, a fabricação de chicletes e doces, detêm um consumo cerca de 67% do xilitol produzido. Mundialmente a Ásia produz 50% do total utilizado nas indústrias (RAO, 2016).

O xilitol pode ser produzido do hidrolisado gerado a partir do segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, a hemicelulose, composto em sua maioria de cadeia de xilanas, que durante a hidrólise liberam o monossacarídeo xilose, principalmente. A xilose é um dos produtos de hidrólise primárias a partir de biomassa lignocelulósica, diversos estudos mostram o grande potencial e interesse da produção biotecnológica de xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos por leveduras, agregando valores em recursos de biomassa renovável (WANG, 2015).

Em muitos casos para a produção de xilitol nessas condições é necessário um pré-tratamento do substrato, o qual tem a função de remover a lignina e reduzir a cristalinidade do substrato, tornando a fração hemicelulósica mais exposta e suscetível a um posterior ataque ácido ou enzimático. A hidrólise em materiais lignocelulósicos com ácidos diluídos é a mais empregada, onde a otimização de vários parâmetros de processo se faz necessário para a recuperação de xilose com a maior qualidade possível. Durante o processo de hidrólise ácida, diversos inibidores são libertados, a concentração destes podem variar de acordo com a biomassa utilizada e influenciam negativamente a fermentação, fazendo necessário o processo de desintoxicação para a redução na concentração de inibidores. Posteriormente os açúcares presentes nos licores hidrolisados, especialmente xilose será convertido em xilitol durante a fermentação alcoólica e o xilitol em seguida é concentrado, purificado e cristalizado (JIA, 2016).

A produção biotecnológica de xilitol pode ser realizada por diversos microrganismos, dentro desse grupo se destaca as leveduras do gênero *Candida*. Ela já foi estudada e explorada em diversos meios provenientes de biomassas, pré-tratamentos e hidrólises distintas. Diversos tipos de microrganismos, incluindo bactérias e fungos filamentosos, podem ser utilizados no processo também. Nesse contexto as leveduras que têm mostrado os maiores rendimentos de

fermentação de xilose em xilitol são: *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida boidinii*, *Candida parapsilosis* e *Pichias* (REN, 2016).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Matéria-prima

A fibra de sisal utilizada foi obtida na Fazenda Lagoa Cercada, situada na cidade de Nova Floresta – PB. A coleta foi realizada durante o desfibramento da folha de sisal para produção das fibras. O processo é rudimentar, as folhas, Figura 15, são cortadas e beneficiadas em uma máquina denominada paraibana.

Figura 15– (a) Plantação de sisal na fazenda lagoa cercada após o corte das folhas (b) Máquina paraibana



(a) (b)

Fonte – Própria

Após o processo de extração, a fibra passou por lavagem na própria fazenda e foi seca ao ar livre, Figura 16. As fibras foram separadas e aglomeradas em pequenas quantidades antes da secagem.

Figura 16 – Fibra de sisal após o desfibramento da folha



Fonte – Própria

3.2 Pré-tratamento físico

As amostras foram selecionadas, e cortadas com o auxílio de uma tesoura para diminuir o tamanho do material, visto que, o comprimento das fibras varia de 1 a 1,5 metros. Posteriormente as fibras passaram por um processo de secagem em estufa de circulação e renovação de ar Solab SL – 102, na temperatura de 60 °C durante 8 horas para eliminar o excesso de umidade. Em seguida a fibra foi moída em moinho de Facas Solab SL – 31, Figura 17.

Figura 17 – Moagem da fibra de sisal



Fonte – Própria

3.2.1 Granulometria

Após a moagem da amostra, foi realizada a distribuição granulométrica, com o uso de peneiras tipo Tyler, como malha de 60 mesh e abertura de 250 μm . A amostra foi adicionada na peneira, e a mesma inserida em uma mesa vibratória Bertel, que foi programada para 20 minutos de agitação. O material que não ficou retido na peneira foi armazenado.

3.3 Análises físico-químicas

A composição lignocelulósica da fibra de sisal foi realizada determinando os teores de celulose, hemicelulose, lignina, extrativos, umidade e cinzas, segundo a metodologia adaptada descrita no documento 236 Embrapa, para análise de materiais lignocelulósicos. A Figura 18 demonstra de maneira simplificada a sequência dos procedimentos durante a caracterização da composição lignocelulósica (EMBRAPA, 2010).

Figura 18 – Fluxograma da metodologia Embrapa



3.4 Pré-tratamento químico

Os pré-tratamentos químicos foram realizados com o intuito de analisar a eficiência na remoção de xilose contida na fibra do sisal, visando a menor degradação dos açúcares e consequentemente, menor produção de inibidores da fermentação (REN, 2016). Os ensaios foram realizados em reator pressurizado de aço inoxidável marca Maitec e volume operacional de 700 mL (Figura 19), durante 1 hora na proporção de 1:10 (m/v) fibra de sisal/solução. Foram utilizados pré-tratamentos com ácido diluído, alcalino e alcalino/ácido.

Figura 19 – Reator de aço Maitec



Fonte – Própria

3.4.1 Pré-tratamento ácido

No pré-tratamento ácido foi utilizado ácido sulfúrico diluído. Buscando verificar as influências das variáveis concentração de ácido e temperatura sobre a solubilização da xilose no licor pré-tratado utilizou-se da metodologia de planejamento experimental 2^2 com três repetições no ponto central em duplicata. As variáveis de entrada foram concentração de ácido sulfúrico (0,5, 1,5 e 2,5%) e temperatura (100, 110 e 120 °C). As Tabelas 2 e 3 apresentam a matriz de planejamento e os níveis reais e codificados do planejamento experimental.

Tabela 2: Matriz do planejamento experimental com níveis codificados para pré-tratamento ácido

Experimento	Concentração	Temperatura
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Tabela 3: Níveis reais e codificados das variáveis de entrada do planejamento experimental para pré-tratamento ácido

Variáveis	-1	0	+1
Concentração	0,5%	1,5%	2,5%
Temperatura	100 °C	110 °C	120 °C

3.4.2 Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino consistiu no uso de NaOH 4% e temperaturas de 90 e 120 °C. Neste caso não foi realizado nenhum tipo de planejamento, pois estudos publicados na literatura indicam que este tratamento provoca apenas a degradação da lignina do complexo lignocelulósico (REN, 2016; VO e NAVARD, 2016).

3.4.3 Pré-tratamento alcalino/ácido

A partir dos resíduos gerados nos ensaios do tratamento básico, cada amostra em seguida foi lavada com água destilada até ficar neutra, seca na temperatura de 60 °C durante 24 horas e depois tratada com ácido sulfúrico diluído na melhor condição do planejamento experimental descrito no tópico 3.4.1.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As concentrações de xilose, glicose, arabinose, ácido acético, xilitol, etanol, HMF e furfural foram quantificadas em cromatógrafo equipado com uma bomba modelo ProStar 210 (Varian); Injetor manual com loop de 20 µL; detector de índice de refração modelo ProStar 356 Varian para os açúcares e álcoois e UV/visível 284 nm para os aldeídos; coluna analítica de aço inox Hi-Plex H (30 cm x 7,7 mm; Varian). A temperatura da coluna de 60 °C; fase móvel: H_2SO_4 0,005 mol L⁻¹, com vazão de 0,6 mL/min; tempo de análise: de 60 min para teores de açúcares e aldeídos.

Figura 20 –Cromatógrafo



Fonte – Própria

3.5.2 Termogravimetria

As amostras in natura, tratadas e componentes isolados foram caracterizadas por Termogravimetria. As curvas termogravimétricas foram obtidas em Analisador Térmico Shimadzu, modelo DTG 60, massa de 7 mg, cadinho de alumina, razão de aquecimento de 10 °C/min., em atmosfera de nitrogênio, fluxo de 100 mL e intervalo de temperatura de ambiente até 900 °C.

3.5.3 Difração de Raios-X (DRX)

As amostras *in natura* e a melhor condição dos pré-tratamentos foram analisadas. As análises de DRX foram realizadas em difratômetro Shimadzu, modelo XRD 600 com fonte de radiação Cu K α , tensão de 40 kV, corrente de 30 mA, velocidade de 2° min⁻¹ e faixa de varredura de 2 θ = 10 a 80°.

A partir dos difratogramas gerados foi calculado o índice de cristalinidade (Ic) de cada amostra. O Ic foi determinado pela Equação 1 (Zhou, 2012):

$$Ic = \left[\frac{I_{002} - I_a}{I_{002}} \right] * 100 \quad (1)$$

Em que I_{002} é a intensidade em um ângulo 2 θ perto de 22° representando o material cristalino e I_a é a intensidade em um ângulo 2 θ perto de 18° representando material amorfo na fibra celulósica.

3.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) as amostras foram pulverizadas e metalizadas com ouro. A análise foi realizada em Microscópio Eletrônico de Varredura marca Leo Zeiss, modelo 1430, na voltagem de 5kV.

3.5.5 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em Espectrofotômetro marca Shimadzu, modelo IR Prestige, utilizando KBr no intervalo de 4000-400 cm⁻¹.

3.6 Fermentação

A fermentação foi realizada na melhor condição constatada nos pré-tratamentos utilizados. Esta condição foi ampliada a escala para a produção do licor hidrolisado em uma quantidade suficiente para sua utilização na fermentação alcoólica.

3.6.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi a levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516, adquirida na Fundação André Tosello, selecionada para produção de xilitol. Durante todos os procedimentos o microrganismo foi manipulado em cabine de segurança biológica, classe II A1 Filterflux.

3.6.1.1 Manutenção das células

A manutenção das células foi realizada em meio sintético YMA, descrito na Tabela 4. A cada 30 dias foi realizado um repique em placas de petri para conservação do microrganismo em meio sólido.

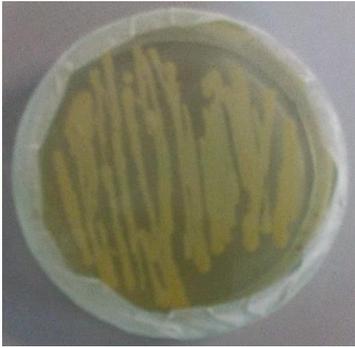
Tabela 4: Meio de cultura YMA (Yeast-Malte Extract Agar) para crescimento e manutenção da *candida guilliermondii*.

Reagentes	Concentração (g/L)
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Peptona Bacteriológica	5,0
Dextrose	10,0
Ágar	20,0

Para o preparo do meio YMA, foi preparada uma solução em um erlenmeyer nas concentrações de acordo com a Tabela 4. Este era fechado e levado para uma autoclave vertical Phoenix Lufenco modelo AV-50. Juntamente com ele foi adicionado placas de petri previamente embrulhadas, com a finalidade de esterilizar todo o conjunto a ser utilizado no repique. O meio e as placas de petri foram autoclavados durante 30 minutos a uma temperatura de 120 °C. Foi realizado o repique com auxílio de uma alça de platina de forma a reproduzir um formato de zig-zag. Após o repique, as placas de petri contendo os microrganismos eram incubadas numa incubadora de bancada digital shaker refrigerada LS 4900-TZH, na temperatura de 28 °C durante 48 horas.

A Figura 21, apresenta a morfologia do microrganismo após o seu crescimento no período de 48 horas em meio YMA. Após o crescimento as placas de petri contendo o microrganismo foram armazenadas em geladeira e mantidas sob refrigeração.

Figura 21 – Meio YMA contendo a *Candida guilliermondii* CCT 1516



Fonte – Própria

3.6.1.2 Cultivo da *Candida guilliermondii* CCT 1516 em meio sintético

Antes da preparação do meio sintético (inóculo) e adição da levedura no hidrolisado para a fermentação, fez-se necessário o estudo de crescimento da levedura em meio sintético, descrito na Tabela 5, a fim de determinar o tempo em que o meio apresenta a quantidade ideal biomassa para ser inserida no meio a ser fermentado, assim como seu comportamento.

Tabela 5: Meio sintético para crescimento da *Candida guilliermondii*

Reagentes	Concentração (g/L)
Xilose	30,0
Sulfato de amônio $(NH_4)_2SO_4$	2,0
Cloreto de cálcio $CaCl_2$	0,1
Solução de extrato de farelo de arroz	20,0

O meio sintético foi preparado seguindo as concentrações da Tabela 05. Em seguida as células de *Candida guilliermondii* CCT 1516 recém repicadas em meio YMA, foram transferidas em condições assépticas com auxílio de uma alça de platina para um béquer contendo água destilada esterilizada. Foram transferidas alíquotas de 6 mL desta suspensão para um erlenmeyer de 500 mL contendo 300 mL do meio sintético. A Figura 22 demonstra o meio sintético após o inóculo do microrganismo.

Figura 22 – Meio sintético após o inóculo



Fonte – Própria

Por fim, os erlenmeyers foram incubados em um agitador rotatório tipo shaker, com agitação de 200 rpm, a 30 °C em um período de 120 horas e analisado o crescimento do microrganismo (LIMA, 2013).

3.6.1.3 Determinação de parâmetros cinéticos

O crescimento da *Candida guilliermondii* nos diversos cultivos foi acompanhado pela quantificação do número de células e massa seca. Foi determinado previamente a quantidade de pontos a serem coletados durante o período das 96 horas, os pontos adotados foram: 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 horas. A partir da inoculação do microrganismo no meio de cultivo, foram retiradas alíquotas nos referidos tempos.

Para quantificação através da contagem de células, uma alíquota da cultura foi retirada e levada ao microscópio para contagem de células em câmara de Neubauer. Os resultados das contagens foram expressos em número de células por mililitro de cultivo (células.mL⁻¹). As contagens foram realizadas em duplicata e utilizadas as médias.

Na quantificação através de massa seca, foi coletado 2 mL de meio de cultura e adicionados em eppendorf com massa pré-estabelecida. Os eppendorfs com o meio foram centrifugados em uma centrífuga Mini Spin Eppendorf durante 10 minutos a uma velocidade de 10000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o resíduo sólido levado a uma estufa com circulação e renovação de ar a 105 °C por 24 horas. Depois desse tempo, os eppendorfs foram postos em um dessecador por 30 minutos e pesados em uma balança analítica Marte AW220. Por diferença foi determinada a massa seca. Os resultados foram feitos em duplicata e utilizadas as médias.

3.6.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi feito em meio sintético assim como descrito no item 3.6.1.2, com volume de 1 L de mistura. Na sequência, a solução foi transferida para recipientes menores e foi adicionado ao meio a levedura proveniente do meio de cultura YMA. Os erlenmeyers foram mantidos sobre agitação de 200 rpm e temperatura de 30 °C durante 24 horas. Durante o inóculo foram retirados nos tempos 0, 4, 8, 12 e 24 horas alíquotas para fazer a análise de massa seca e contagem de células a fim de quantificar a quantidade de células presentes no meio de cultura para realização da inoculação no licor. Após esse período, as células contidas no meio sintético foram separadas por centrifugação a 6000 rpm durante 15 minutos e ressuspensas em água destilada esterilizada. A partir dos dados obtidos no inóculo, foi calculado a massa necessária para fornecer a concentração celular inicial desejada, de 3g/L ou 10^7 células por mililitro (LIMA, 2013). Posteriormente, a suspensão foi adicionada ao licor pré-hidrolisado, estando esse com o pH 5,5 previamente ajustado.

3.6.3 Condições de cultivo do processo fermentativo

A fermentação foi realizada em erlenmeyers de 500 mL contendo 200 mL do licor. Foram feitas algumas retiradas do meio para análise de massa seca, afim de verificar o comportamento da levedura durante o processo fermentativo, e uma alíquota para quantificar os teores de açúcares e de produtos formados durante a fermentação através da cromatografia líquida. Os tempos da fermentação estudados foram: 0, 4, 8, 12, 24, 36, 72, 96 e 120 horas. Os erlenmeyers foram mantidos sob agitação de 200 rpm e temperatura de 30 °C, em agitador rotativo shaker.

3.6.4 Determinação de parâmetros fermentativos

3.6.4.1 Fator de conversão de xilose em xilitol

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \quad (2)$$

Em que,

$Y_{P/S}$: é o rendimento da produção de xilitol baseado no consumo de xilose (g xilitol/g xilose)

P_f : concentração final de xilitol (g/L)

P_i : concentração inicial de xilitol (g/L)

S_f : concentração final de xilose (g/L)

S_i : concentração inicial de xilose (g/L)

3.6.4.2 Eficiência na conversão de xilose em xilitol $\eta(\%)$

A Eficiência na conversão de xilose em xilitol pode ser quantificada pela Equação

$$\eta(\%) = \left(\frac{Y_{P/S} \text{ experimental}}{Y_{P/S} \text{ teórico}} \right) * 100 \quad (3)$$

Em que,

η : é a eficiência na conversão de xilose em xilitol

$Y_{P/S}$ teórico: eficiência teórica na conversão de xilose em xilitol, que segundo Barbosa *et al.* (1988) é de 0,912 g xilitol/g xilose

3.6.4.3 Porcentagem de consumo de xilose (Y%)

$$Y(\%) = \frac{S_i - S_f}{S_i} * 100 \quad (4)$$

Em que,

S_f é a concentração final de xilose (g/L)

S_i é a concentração inicial de xilose (g/L)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do material lignocelulósico

A fibra de sisal depois de seca e uniformizada foi caracterizada segundo a metodologia descrita no tópico 3.3 (Tabela 6). Os resultados foram obtidos para a fibra de sisal *in natura* e para fibra após pré-tratamento ácido na melhor condição do planejamento experimental fatorial, a qual foi denominada de fibra tratada.

Tabela 6: Composição lignocelulósica da fibra de sisal *in natura* e tratada

Componente	Fibra <i>in natura</i> (%)	Fibra tratada (%)
Umidade	6,27	11,20
Extrativos	1,75	2,95
Holocelulose	80,01	62,57
Lignina	11,07	17,65
Alfacelulose	48,20	38,87
Hemicelulose	31,81	23,70
Cinzas	1,20	0,22

A fibra do sisal *in natura* apresentou elevado valor de holocelulose, 80,01%, confirmando altos teores de carboidratos totais presentes na amostra. O baixo teor de extrativos e cinzas sugere a presença em pequena quantidade de compostos organosolúveis e de minerais. O valor de hemicelulose pode ser considerado elevado, indicando altos teores de xilose, devido a hemicelulose ser composta por moléculas heteropolissacarídeos, sendo que os mais abundantes são as cadeias de xilose.

Verifica-se na Tabela 6 que os valores percentuais de hemicelulose, celulose e holocelulose diminuem após o pré-tratamento ácido, indicando a solubilização destes componentes durante a pré-hidrólise ácida, dando ênfase para a redução dos valores da hemicelulose que indica a presença de pentoses no licor produzido. Os percentuais de lignina, umidade e extrativos tiveram um aumento relativamente pequeno, cerca de 5% para lignina e umidade e 1% para extrativos. Esses aumentos podem ser justificados pelo fato da fibra ter passado pela etapa de remoção da fração hemicelulósica com o tratamento ácido, consequentemente, o teor relativo de lignina e demais componentes aumentam, não na mesma

proporção, visto que, os carboidratos apresentaram redução de cerca de 20% e o aumento dos demais não seguiu a mesma tendência.

O valor de cinzas para fibra *in natura* foi de 1,2% e está de acordo com valores encontrados na literatura. Martin et al. (2009) trabalhando com fibra de sisal obtiveram valores que variaram de 0,8 a 1,5%, já Dorez et al. (2014) citam que a fibra de cânhamo apresenta valores em torno de 0,3%, assemelhando aos valores obtidos para fibra após o pré-tratamento ácido.

Os teores de extrativos para fibra *in natura* e a fibra tratada foram de 1,75% e 2,95% respectivamente, os quais são muito próximos dos encontrados por John et al. (2008) que trabalhando com diversas fibras naturais como reforço em compósitos relataram valores de 3% para teores de extrativos da fibra de sisal, já as fibras de linho apresentaram valores de 1,5% de extrativos, o que se assemelha a valores apresentados por Kim et al. (2010) em amostras de sisal com 2%. Quando comparada com outros materiais a fibra de sisal apresenta valores menores, como, por exemplo, a casca da laranja 4,22% (BICU, 2013), palma forrageira 9,69% (FILHO, 2014), bagaço de caju 15,13% e bagaço de cana-de-açúcar 4,48% (ROCHA, 2014).

O complexo celulose-hemicelulose-lignina da fibra *in natura* apresentou teores de 48,20; 31,81 e 11,07% respectivamente. Saha et al. (2006) utilizando palha de trigo para produção de etanol obtiveram valores semelhantes, 48,57; 27,70 e 8,17% para o complexo. Fazendo uso do pré-tratamento com ácido diluído eles obtiveram solubilização de 92% da hemicelulose e 47% da celulose, valores superiores aos encontrados no presente trabalho. Rocha et al. (2014) para produção de xilitol a partir do licor pré-hidrolisado do bagaço do caju, utilizando ácido sulfúrico diluído, observaram um aumento no teor de lignina e celulose com remoção similar da fração hemicelulósica. Saleh et al. (2014) utilizando oliveira como fonte de biomassa para produção de xilitol, empregaram o hidrolisado do pré-tratamento ácido para fermentação e conseguiram solubilizar menos de 50% da hemicelulose presente na amostra durante o pré-tratamento, resultado semelhante ao da fibra de sisal. Verifica-se o comportamento diferente da fibra de sisal comparada ao de alguns materiais, onde houve uma maior remoção da hemicelulose, mas a matéria-prima difere, sendo assim, a morfologia e a estrutura do complexo lignocelulósico pode variar seu arranjo molecular e assim o tratamento ácido obtém resultados diferentes em cada caso.

Observa-se o potencial da fibra de sisal para produção de açúcares fermentáveis quando comparado com o bagaço da cana-de-açúcar e a palha do milho, duas das fontes de biomassa mais utilizadas em indústrias e pesquisas. Gouveia et al. (2009) trabalhando com o bagaço de cana de açúcar para validação de metodologia de caracterização química obtiveram valores de carboidratos totais menores, tanto a celulose quanto a hemicelulose, com cerca de 8% a menos que a fibra de sisal em ambos os teores. Sarkar et al. (2012) em um trabalho sobre produção de bioetanol a partir de palha de milho relata valores de hemicelulose de 21,3% e celulose 46,2%, ambos menores que a fibra de sisal.

4.2 Pré-hidrolise

4.2.1 Pré-tratamento ácido

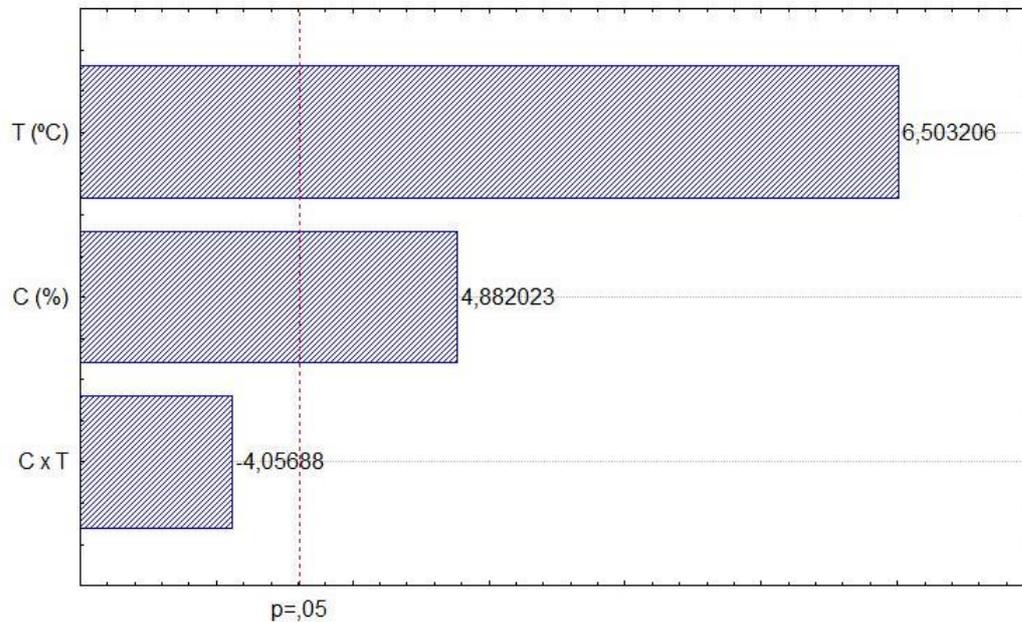
No pré-tratamento ácido foi utilizado um planejamento experimental fatorial 2^2 com três pontos centrais. Na Tabela 7 estão expressos os resultados das medias das concentrações de xilose obtidas durante os ensaios.

Tabela 7: Matriz de planejamento experimental do pré-tratamento ácido da fibra de sisal

Exp.	Concentração (%)	Temperatura (°C)	Xilose (g/L)	Glicose (g/L)	Furfural (g/L)
1	-1	-1	2,976	0,020	0,093
2	+1	-1	10,960	0,876	0,365
3	-1	+1	12,408	1,306	0,720
4	+1	+1	13,145	3,455	1,914
5	0	0	11,092	1,362	0,269
6	0	0	12,644	1,703	0,860
7	0	0	11,102	1,056	0,347

Segundo os dados da Tabela 7, a condição onde a solubilização de xilose apresentou maior concentração foi a de maior concentração de ácido sulfúrico (2,5%) e maior temperatura (120 °C) com 13,145 g/L. A Tabela 7 não apresenta os valores dos inibidores ácido acético e HMF devido não ter sido constatado a presença de nenhum deles na análise de cromatografia líquida (CLAE). Realizando a análise estatística da matriz de planejamento foi obtido o diagrama de Pareto, Figura 23.

Figura 23 – Diagrama de Pareto do planejamento experimental da fibra de sisal



Verifica-se que as variáveis de entrada C (%) e T (°C) são estatisticamente significativas, ou seja, influenciam para o aumento da concentração de xilose, porém a interação entre elas não contribuiu significativamente para a remoção de xilose presente na fibra de sisal. Para a análise foi considerado um intervalo de confiança de 95%.

A Tabela 8 corresponde a análise de variância (ANOVA) utilizada para comprovar a significância estatística do modelo utilizado para concentração de xilose.

Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) para o pré-tratamento ácido da fibra de sisal

Fontes de Variação	GL	SQ	QM	Teste F
Regressão	3	65,88238	21,960793	1,04
Resíduos	3	6,78818	2,26277	
Falta de Ajuste	1	5,19266	5,19266	
Erro Puro	2	1,59552	0,79776	
Total	6	72,67056		
%R ²		90,66		

$$F_{\text{tab}} = 9,28$$

$$F_{\text{cal}} = 9,70$$

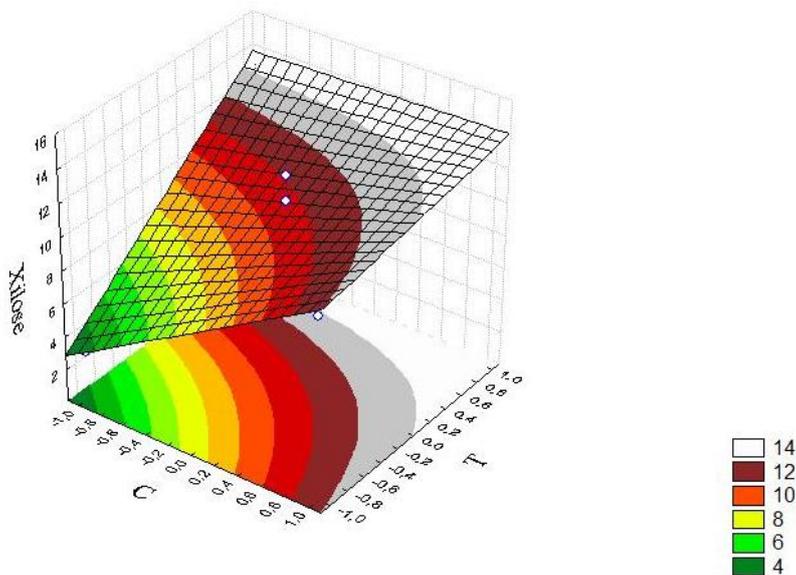
GL - Grau de liberdade; SQ - Soma dos quadrados; QM – Média quadrática dos desvios; Teste F – ($F_{\text{cal}} / F_{\text{tab}}$)

De acordo com o valor do teste F, onde o $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$ o modelo é estatisticamente significativo, para um nível de confiança de 95% e coeficiente de determinação de 90,66%, onde foi constatado que as variáveis independentes contribuem para o aumento da concentração de xilose. Segundo Rodrigues e Lemma (2014) quando o $F_{\text{cal}} > F_{\text{tab}}$, ou seja, sua

razão é maior que 1, a hipótese nula é rejeitada e o modelo é significativo. Dessa forma, é possível gerar a superfície de resposta do modelo matemático para o experimento proposto.

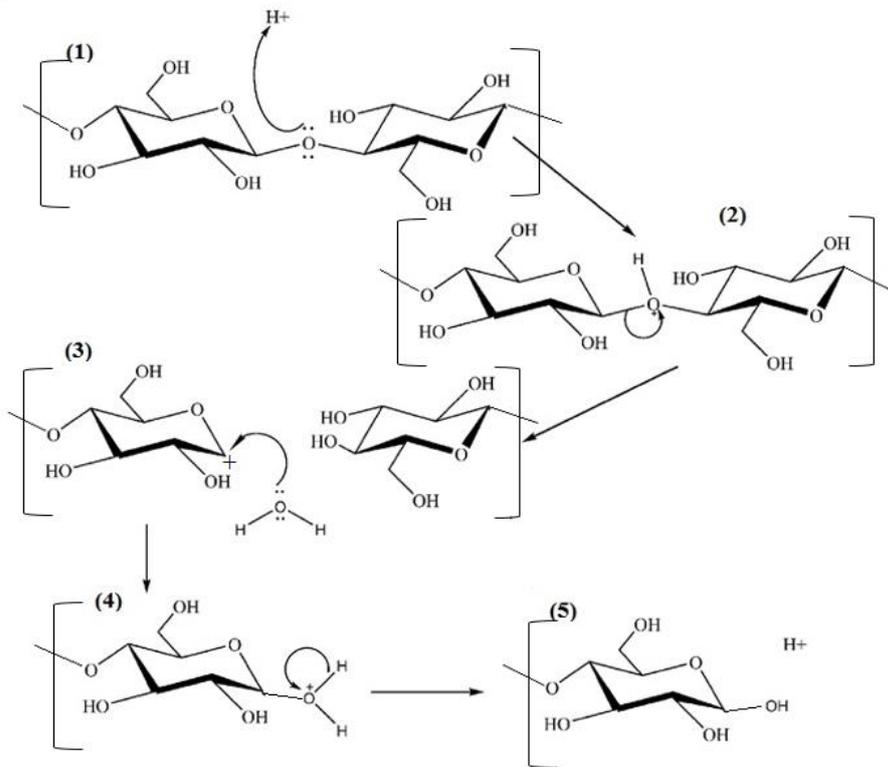
A Figura 24, apresenta a superfície de resposta para a variável concentração de xilose, onde é possível observar que o teor de xilose é máximo, no intervalo estudado, quando a concentração de ácido sulfúrico e temperatura são máximas.

Figura 24 – Superfície de resposta para a concentração de xilose no pré-tratamento ácido da fibra de sisal



A reação do pré-tratamento pode ser descrita pelo mecanismo de hidrólise ácida. Tamanini (2004) cita que os mecanismos de hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos são bastante complexos, visto que, a amostra e solução ácida estão em estados físicos diferentes, além de impedimentos causados pelo arranjo molecular do complexo lignocelulósico. De forma resumida, a Figura 25 demonstra o mecanismo de reação da hidrólise ácida, que se inicia com a difusão dos prótons na matriz polimérica úmida e depois ocorre a protonação do oxigênio da ligação glicosídica (1). Posteriormente ocorre a quebra da ligação e geração de um carbocátion como intermediário (2). Em seguida, uma molécula de água realiza um ataque nucleofílico ao carbocátion (3) e por fim, a regeneração do ácido (4,5) e geração do monômero de açúcar para encerrar a etapa de despolimerização. De forma similar este mecanismo pode ocorrer no interior da matriz para produção de glicose da fração celulósica, ou outro produto dependendo da posição da ligação rompida.

Figura 25 – Mecanismo de hidrólise catalisada por ácido



Fonte – Adaptada de Ogeda e Petri (2010)

4.2.2 Pré-tratamento alcalino e básico seguido de ácido

Os resultados do pré-tratamento alcalino estão expressos na Tabela 9. O tratamento básico tem por finalidade principal a remoção da lignina do complexo da amostra lignocelulósica, deixando a estrutura da hemicelulose e celulose mais exposta para um posterior ataque ácido ou enzimático.

Tabela 9: Concentrações de açúcares e inibidores nos licores do pré-tratamento alcalino

Exp.	Temperatura (°C)	Concentração (%)	Xilose (g/L)	Glicose (g/L)	Ac. Acético (g/L)
1	90	4	0	0	3,1
2	120	4	0,006	0,003	5,1

Verifica-se que em ambas as condições não houve remoção de carboidratos, apenas solubilização de grupos acetil da hemicelulose e lignina para formação do ácido acético em grande quantidade. Além destes grupos é provável a degradação de outros componentes hemicelulósicos para formação do ácido acético. Cruz et al. (2000) trabalhando com

fermentação de resíduos agrícolas para produção de xilitol observaram a formação de ácido acético após o pré-tratamento, proveniente de grupos acetil da fração hemicelulósica. Assim como também constatado por Wang et al. (2015) que após o tratamento básico uma grande quantidade de ácido acético presente no licor hidrolisado.

Os resíduos sólidos obtidos depois do tratamento alcalino foram filtrados, lavados com água destilada e secos em estufa na temperatura de 60 °C. Depois desse procedimento os mesmos foram submetidos a um pré-tratamento com ácido sulfúrico, na melhor condição do planejamento do item 4.2.1, que foi 2,5% de H_2SO_4 e 120 °C de temperatura (Tabela 10).

Tabela 10: Tratamento básico seguido de ácido para a fibra de sisal

Exp.	Temperatura (°C)	Concentração (%)	Xilose (g/L)	Glicose (g/L)	Ac. Acético (g/L)
1	120	2,5	3,3	4,0	0,01
2	120	2,5	1,7	3,0	0,002

Observa-se que os teores de xilose obtidos durante o tratamento básico seguido de ácido são inferiores aos encontrados para o pré-tratamento ácido individualmente. Tanto na condição 1 quanto na 2 os valores não ultrapassaram 3,3 g/L de xilose, enquanto a pré-hidrólise ácida apresentou valores de 13,145 g/L de xilose. Diferente do tratamento alcalino, nesta segunda etapa não houve formação de ácido acético ou qualquer outro inibidor da fermentação, mas provocou a quebra de ligações glicosídicas e formação de glicose no licor hidrolisado. Dessa forma, o pré-tratamento mais vantajoso nas condições do presente trabalho foi o pré-tratamento ácido na concentração de 2,5% e temperatura de 120 °C.

4.3 Determinação da cristalinidade por DRX

Para comprovar a eficiência dos tratamentos, a amostra *in natura* e a melhor condição do pré-tratamento ácido foram caracterizados através de várias técnicas, dentre elas a difração de raios-x. As Figuras 26 e 27 demonstram os difratogramas obtidos para a amostra *in natura* e a fibra tratada respectivamente. Segundo Krishnan et al. (2015) em materiais lignocelulósicos a característica cristalina é derivada principalmente da celulose tipo I. Os outros constituintes da amostra são de natureza amorfa. O ataque de reagentes ácidos ou alcalinos, durante os tratamentos atingem principalmente a celulose tipo II e os demais componentes que possuem ligações intermoleculares mais fracas.

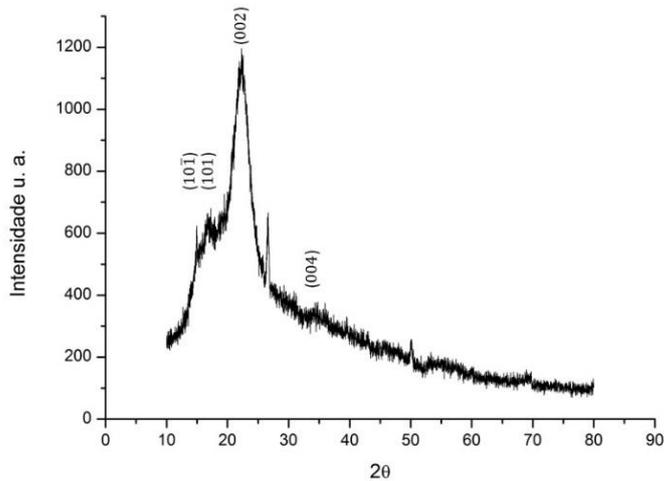
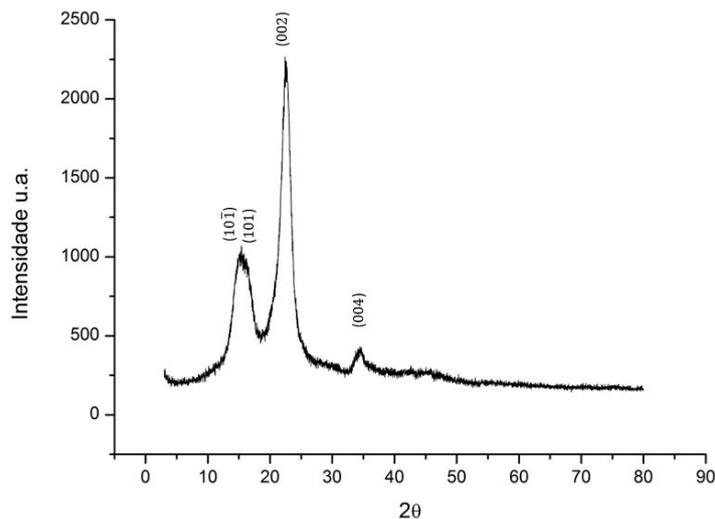
Figura 26 – DRX da fibra de sisal *in natura*

Figura 27 – DRX da fibra de sisal tratada

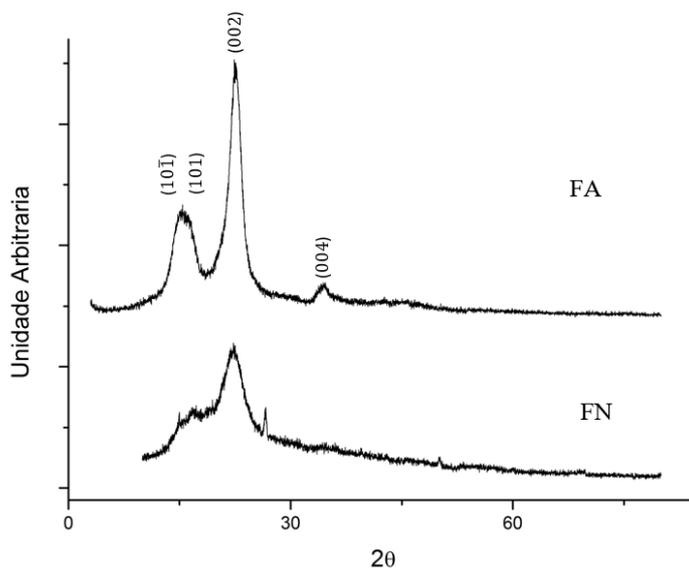


Os picos encontrados nos difratogramas da fibra de sisal, foram indexados segundo a ficha icdd 00-060-1502, sendo catalogada como β -celulose. Nas duas amostras foi possível observar a presença de 3 picos, onde o pico na região de $2\theta = 22^\circ$ é o de maior intensidade. Assim como dito antes, fica ratificado que os demais componentes do sisal possuem características amorfas, somente a celulose o confere propriedades de material cristalino. As regiões mais amorfas são mais suscetíveis a ataques de reagentes ou adsorção de água (WANG, 2011).

A Figura 26 apresenta a amostra de sisal *in natura*, a qual é evidente a pouca cristalinidade da amostra, onde a presença dos componentes amorfos dificulta a visualização

dos picos característicos da celulose além de um background elevado. Na Figura 27 o difratograma da amostra após o tratamento ácido mostrou um pico, $2\theta = 22,53^\circ$, de maior intensidade e relativa cristalinidade. De acordo com Lengowski et al. (2013) a região amorfa e o pico cristalino ficam situados entre os ângulos $18^\circ \leq 2\theta \leq 19^\circ$ e $22^\circ \leq 2\theta \leq 23^\circ$ respectivamente. Sobrepondo os difratogramas, Figura 28, fica nítido a diferença na cristalinidade após o pré-tratamento. Os picos localizados na região de 18° e 22° estão mais expostos, evidenciando a remoção de componentes amorfos. A presença ou ausência de componentes como lignina e hemicelulose influencia diretamente na cristalinidade do material.

Figura 28 – Difratograma da fibra de sisal *in natura* (FN) e após o tratamento ácido (FA)



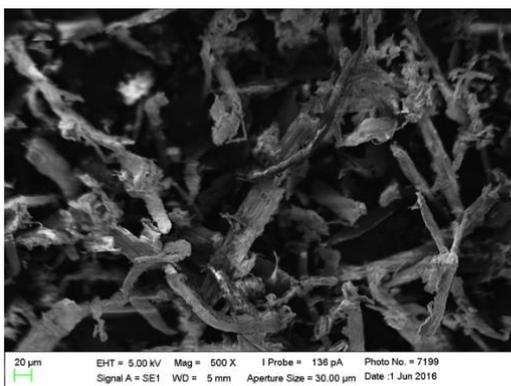
A Tabela 11 expressa o índice de cristalinidade da fibra de sisal. Verifica-se um aumento da cristalinidade 33,61% depois do tratamento ácido. Segundo Mahecha et al. (2015) pode ser explicado pela remoção de compostos amorfos, tais como celulose, hemicelulose e lignina. O índice de cristalinidade está relacionado ao grande número de ligações moleculares secundárias que existem nas regiões cristalinas e o nível de compactação nestas regiões. Ao realizar o tratamento ácido houve a remoção de componentes hemicelulósicos, e a celulose cristalina ficou mais exposta e conseqüentemente aumentando a cristalinidade da amostra. Wei et al. (2016) no estudo de compostos derivados de fibra de sisal, também observaram para a amostra *in natura* índices próximos de 50%, e ao realizar tratamento alcalino a fibra de sisal aumentou sua cristalinidade aproximadamente 30%, com valores similares aos apresentados nesse estudo, porém usando um pré-tratamento distinto.

Tabela 11: Cristalinidade da fibra de sisal *in natura* e tratada

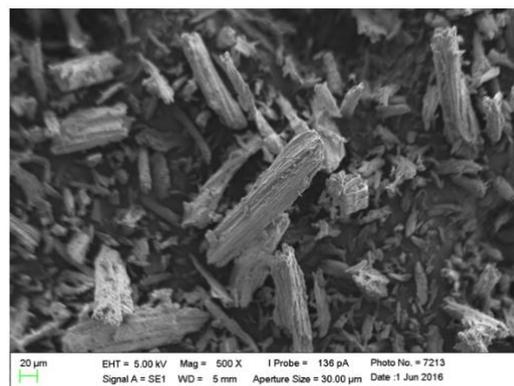
Amostra	Índice de Cristalinidade
FN	44,89 %
FT	78,50 %

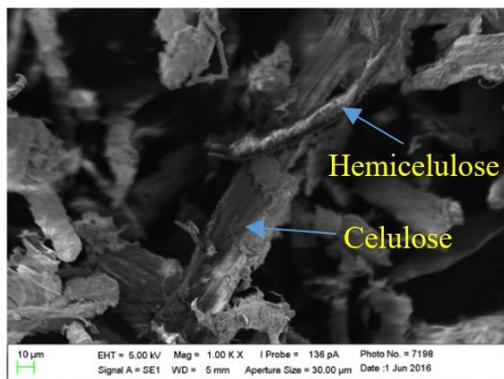
4.4 Análise morfológica da fibra de sisal (MEV)

Com auxílio da microscopia eletrônica de varredura é possível constatar a alteração morfológica sofrida pela fibra de sisal depois do pré-tratamento. As figuras foram ampliadas: 500x, 1000x e 2000x. A Figura 29 demonstra as micrografias da estrutura da fibra de *sisal in natura* e após o pré-tratamento ácido. Na amostra *in natura*, Figura 29 (a,c,e) observa-se os feixes de microfibrilas individuais entrelaçados com o complexo lignina e hemicelulose. A parte fibrosa tem um aspecto de ser recoberto por um material maciço, provavelmente extrativos e uma camada de células de parênquima distribuídas ao longo de toda a fibra. De maneira muito similar, Krishnan et al. (2015) durante o estudo da fibra de sisal como reforço em polímeros, verificaram que amostras de fibra de sisal bruto eram compostas por fibras individuais ligadas entre si por materiais de cimentação como lignina, hemicelulose, cera e óleos.

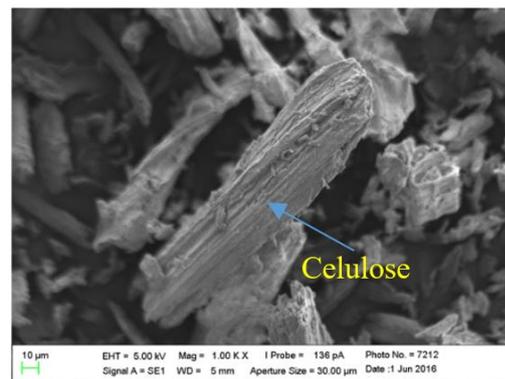
Figura 29 – Micrografias da fibra de sisal: *in natura* (a,c,e) e tratada (b,d,f)

(a) (b)

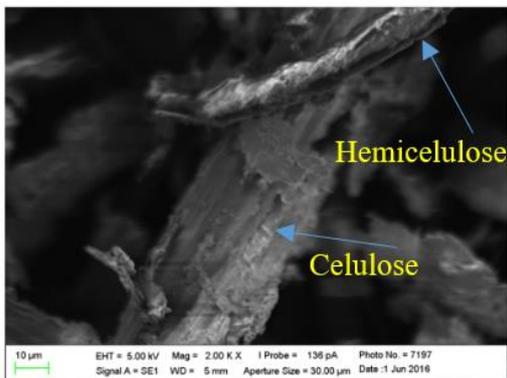




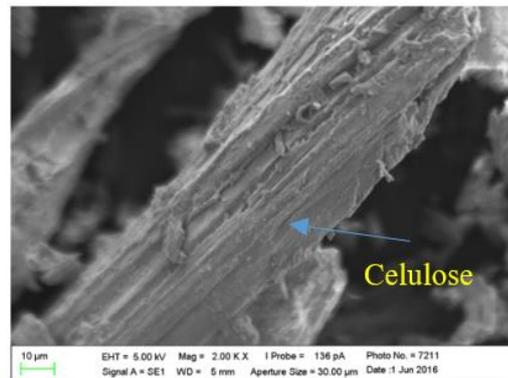
(c)



(d)



(e)



(f)

Na Figura 29 (b,d,f), verifica-se que após o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído 2,5%, que a camada mais externa das fibras foi removida, além de clivar a estrutura mais complexa antes existente, tornando visível a estrutura fibrilar celulósica. Segundo Lacerda et al. (2013) a partir da redução gradual nos tamanhos das fibras justifica a quebra das ligações glicosídicas da celulose, na qual ficaria composta por unidades mais pequenas e mais suscetível a uma posterior hidrólise. Também é possível verificar a remoção dos complexos hemicelulósicos que entrelaçavam o material fibroso anteriormente e assim confirmando a eficácia do pré-tratamento ácido, onde alterou a estrutura lignocelulósica através da remoção parcial da hemicelulose.

4.5. Análise Termogravimétrica

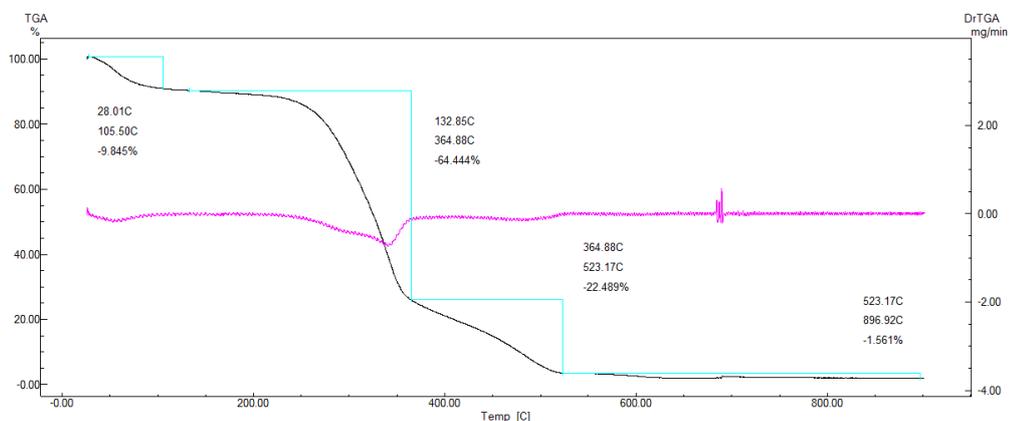
As informações obtidas a partir das curvas termogravimétricas da fibra de sisal *in natura*, tratada e de seus constituintes em atmosfera de nitrogênio estão resumidas na Tabela 12.

Tabela 12: Dados das curvas TG da fibra de sisal *in natura*, tratada e seus constituintes em atmosfera de nitrogênio

Amostras	Etapas de perda de massa							
	Temperatura/ °C	Massa /%	Temperatura/ °C	Massa /%	Temperatura/ °C	Massa /%	Temperatura/ a/ °C	Massa /%
Natura	28 – 105	9.85	133 – 365	64.44	365 – 523	22.49	523 – 897	1.56
Tratada	31 – 105	5.79	120 – 318	43.78	318 – 487	22.93	487 – 899	12.71
Holocelulose	31 – 105	7.85	200 – 301	16.68	301 – 380	50.92	380 – 900	17.04
Celulose	31 – 105	10.42		195 – 376		64.48	376 – 900	18.71
Lignina	28 – 105	8.30		166 – 481		35.30	481 – 900	22.92

Verifica-se que as curvas TG da fibra de sisal *in natura* e tratada apresentaram quatro etapas perdas de massa. A curva termogravimétrica da fibra de sisal *in natura* (Figura 30) apresentou primeira etapa de perda de massa no intervalo de temperatura de 28 – 105,50 °C, atribuível a desidratação de água adsorvida tanto intermolecular quanto intramolecular (MARTINS, 2003). A segunda perda de massa foi um processo mais rápido que ocorreu entre 132,85 – 364,88 °C e apresentou perda de massa de 64,44%. Esta etapa pode ser atribuída a despolimerização da hemicelulose e clivagem de ligações glicosídicas da celulose, ou seja, além das pentoses presentes nessa região há também a degradação de celulose mais amorfa, dessa forma ao analisar a segunda etapa considera-se também a presença de celulose. A terceira etapa ocorreu no intervalo de 364,88 – 523,17 °C e foi atribuída a decomposição da α -celulose, com perda de massa de 22,48%. A degradação da celulose ocorre em temperaturas mais elevadas quando comparada com a hemicelulose. A última etapa de perda de massa ocorreu entre 523,17 – 896,92 °C sendo um processo mais lento, devido se tratar da condensação da lignina e a formação de compostos aromáticos (MARTIN, 2010), apresentou perda de massa de 1,56%, restando 1,665% de cinzas.

Figura 30 – Curva TG da fibra de sisal *in natura* em atmosfera de nitrogênio



A curva TG da fibra de sisal após o pré-tratamento ácido (FT), Figura 31, apresentou mesmo número de etapas de perda de massa quando comparada a amostra *in natura* (Figura 32). A primeira etapa ocorreu no intervalo de temperatura de 31,39 – 105,50 °C e foi atribuída a desidratação, com perda de massa de 5,79%. A segunda etapa foi associada ao objetivo principal de realizar o pré-tratamento ácido, que é a remoção da hemicelulose. O meio ácido interage com os polissacarídeos, especialmente a hemicelulose (xilose, arabinose, entre outros), que são mais fáceis de ser hidrolisados do que a celulose (CARDONA, 2010). Comprova-se a eficácia do tratamento ácido quando comparado a segunda etapa de perda de massa da amostra *in natura*, pois ocorreu perda de massa de 43,78 % no intervalo de temperatura de 120,32 °C a 317,95 °C, sendo 21% menor que a amostra *in natura*. A terceira etapa ocorreu entre 317,95-487,16 °C com perda de massa de 22,93% e foi praticamente igual ao da amostra *in natura*, indicando que o ataque ácido do pré-tratamento atingiu principalmente a hemicelulose. Por fim, a última etapa de perda de massa ocorreu de 487,16 a 898,46 °C, referente à carbonização da lignina com perda de massa de 12,71% e restou 14,787%.

Figura 31 – Curva TG da fibra de sisal tratada em atmosfera de nitrogênio

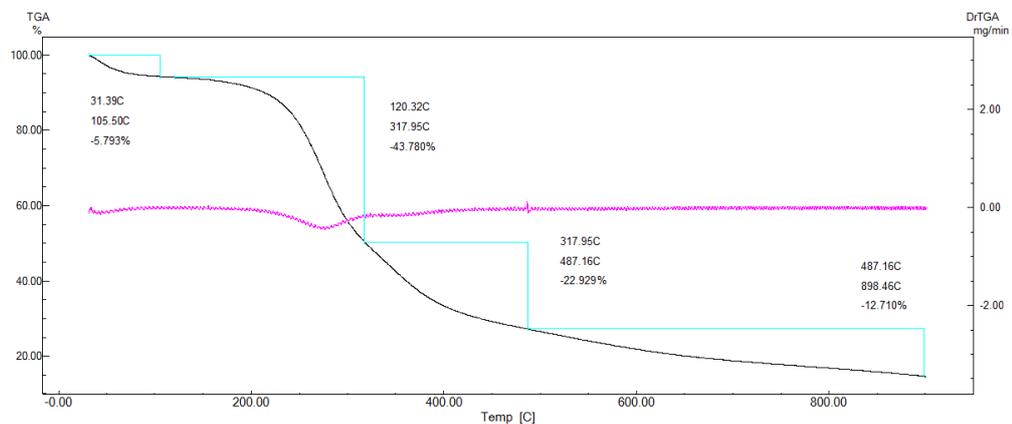
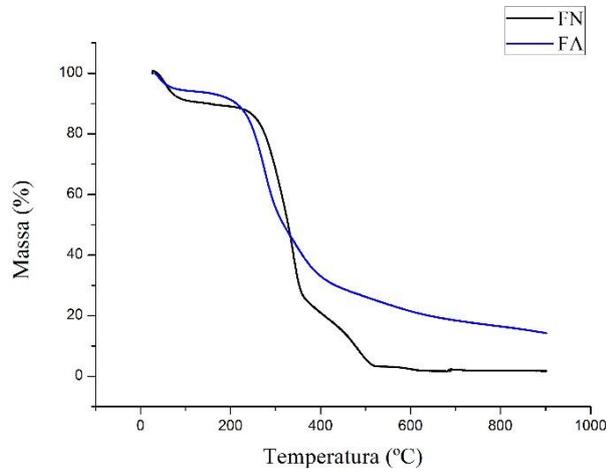
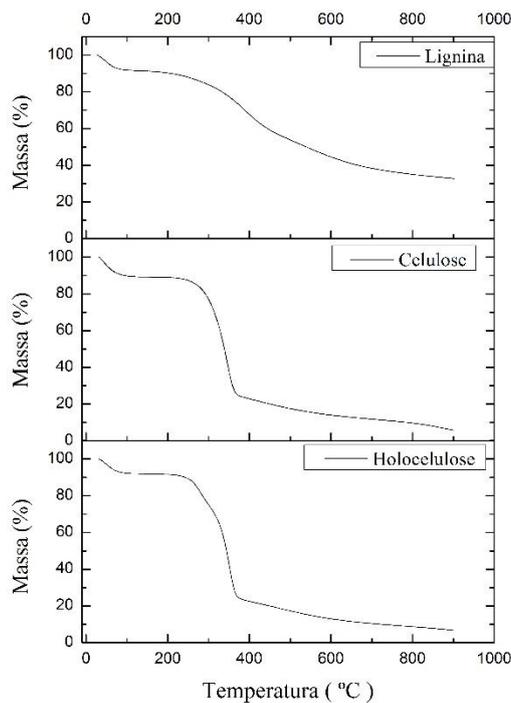


Figura 32 – Curvas TG da fibra de sisal in natura e tratada



Em relação aos constituintes da fibra do sisal a perda de massa inicial ocorreu no intervalo de temperatura de 26 a 106 °C, associada à evaporação da água adsorvida. Nestes casos, ocorre uma perda de 7,85% para holocelulose; 10,41% para alfacelulose e 8,30% para lignina (Figura 33).

Figura 33 – Curvas TG dos constituintes da fibra de sisal em atmosfera de nitrogênio



Durante a obtenção da holocelulose ocorreu degradação oxidativa do material que desarranja a matriz lignocelulósica. Na curva TG da holocelulose verificou-se a primeira perda de massa referente à desidratação; a segunda etapa ocorreu no intervalo de temperatura maior do que a amostra *in natura* (200,28 – 300,87 °C) com perda de massa de 16,68 %, referente a decomposição da hemicelulose e a terceira etapa ocorreu entre 300,87 – 380,02 °C com perda de massa de 50,92%. Essas duas últimas etapas de perda de massa, diferente das outras amostras, ocorreram em intervalo maior de temperatura. Isto sugere que a remoção e a desorganização da matriz aumentou a razão de decomposição, cujo percentual total de perda nessas etapas foi de 67,60% (SHARKAR, 2012). Durante a última etapa, referente ao processo de carbonização, ocorreu perda de massa de 17,04% até a temperatura de 900 °C.

A α -celulose é o componente majoritário da celulose, ao analisar a curva TG da mesma observaram-se três etapas de perda de massa. Uma etapa a menos do que a fibra *in natura*, a fibra tratada e a holocelulose, devido à falta da hemicelulose na estrutura. A segunda etapa ocorreu de forma rápida no intervalo de temperatura de 194,72 – 375,90°C com perda massa de 64,48%. O intervalo de despolimerização da α -celulose tem início na temperatura de decomposição da hemicelulose, corroborando que na perda de massa da amostra *in natura* e nas demais, os componentes da hemicelulose estão presentes junto com a celulose, a qual inicia decomposição na metade do intervalo de temperatura da hemicelulose e finaliza em temperaturas mais elevadas.

A curva TG da lignina apresenta decomposição lenta, com baixa perda de massa. A lignina é considerada estabilizador térmico da celulose contra oxidação térmica, possuindo uma estrutura complexa. A lignina decompõe-se lentamente, o que indica a ocorrência de várias reações simultâneas. Na amostra de lignina proveniente da fibra de sisal verificaram-se três etapas de perda de massa: a primeira etapa foi referente a desidratação; a segunda que correu no intervalo de 165,9 – 481,21 °C foi atribuída a condensação de grupos fenólicos em atmosfera inerte, com perda de massa de 35,3%. A lignina é o componente de maior resíduo de cinzas, restando 32,50% ao final da terceira etapa de carbonização, que ocorreu entre 481,21 – 900,03 °C. Ferdosian et al. (2016) no estudo de decomposição de ligninas de várias biomassas, obtiveram resíduos finais que variaram entre 20 e 35 %, similarmente ao da fibra de sisal. Segundo Guerrero et al. (2014) em estudo das propriedades térmicas dos componentes da fibra de sisal *in natura* e depois de lavada, o valor do teor de carvão final varia de acordo com a composição da lignina e a baixa presença de grupo metoxi gera uma maior quantidade de cinzas ao final do processo.

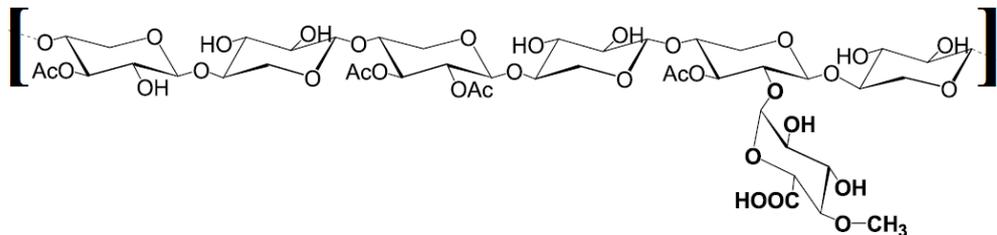
Milanese et al. (2012) durante o estudo térmico da fibra de sisal e de compostos aromáticos verificaram através de curvas TG a decomposição de seus constituintes em intervalos de temperatura bem similares: a desidratação em torno de 110 °C, a despolimerização da hemicelulose e celulose finalizando em 350 °C e o resíduo final, que seria a volatilização da lignina em 800 °C, porém as cinzas de suas amostras apresentaram valores maiores que a fibra de sisal deste trabalho, com cerca de 20% para a amostra *in natura*, indicando a baixa presença de grupos metoxi. As curvas TG da fibra de sisal *in natura* apresentaram três etapas de perda de massa, assim como observado por Santos et al. (2015) e Wei et al. (2014) em trabalhos com fibra de sisal, porém utilizaram fluxo de 50 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 20 °Cmin⁻¹ respectivamente, diferenciando do presente trabalho, onde as condições adotadas possibilitaram uma maior resolução e separação das etapas de perda de massa.

4.6 Espectroscopia de Absorção na Região do Infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho para as amostras de fibra de sisal *in natura* (FN) e após o pré-tratamento ácido (FT) são mostrados na Figura 35. A partir da análise das diferenças entre os espectros é possível determinar a eficiência do tratamento químico na amostra de fibra de sisal. Cada composto do complexo lignocelulósico apresenta características e regiões específicas no infravermelho. Na amostra *in natura* destaca-se a banda situada na região de 1740 cm⁻¹, que pode ser atribuído a estiramento de ligações C=O, presentes nas ligações éster e/ou em ácidos carbóxicos da fração hemicelulósica (Kabir, 2013). Além de xilose e arabinose como componentes principais, a hemicelulose é composta também por unidades básicas de ácidos urônicos (4-o-metil-glucurônico, ácido galacturônico, e ácido D-glucurônico), além de grupos acetil. As ligações ésteres surgem entre açúcares oxidados ou ácidos urônicos na hemicelulose e entre fenóis na lignina (REN, 2016; VO, 2016), a Figura 34 demonstra o ácido 4-o-metil-glucurônico ligado a uma cadeia de xilana. A banda em 1249 cm⁻¹ é característica de grupos acetil presentes na lignina (ZHOU, 2014). Observa-se que depois do tratamento ácido a não visualização dessas duas bandas, indica a remoção parcial de componentes da hemicelulose pelo pré-tratamento ácido. Os grupos acetil que também estão presentes na hemicelulose, em menor quantidade, foram removidos, e a ausência dessas bandas caracterizam a eficácia do tratamento ácido utilizado. Fato este, também confirmado por Barreto et al. (2011) e Fiore et al. (2016), onde ambos trabalhando com fibra de sisal

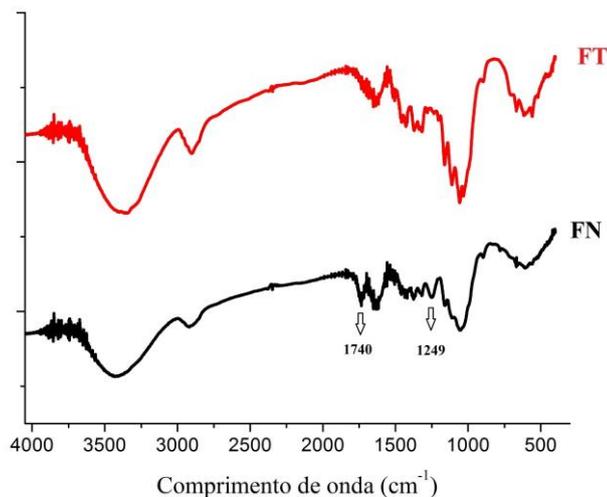
observaram a presença dessas mesmas bandas na amostra in natura e após o uso do pré-tratamento básico e ácido, respectivamente, ocorreu o desaparecimento destas bandas e indicação da remoção de componentes da hemicelulose e lignina em suas amostras.

Figura 34– Representação do ácido 4-o-metil-glucurônico ligado em uma cadeia de xilana



Fonte – Adaptada de Li et al. (2011)

Figura 35 – Infravermelho da fibra de sisal in natura e tratada



Os principais grupos funcionais presentes nos espectros de infravermelho analisados estão representados na Tabela 13, onde relata a vibração corresponde a banda e seu respectivo comprimento de onda.

Tabela 13: Bandas de transmitância do infravermelho para a fibra de sisal

Atribuição do grupo funcional	Comp. de onda (cm ⁻¹)	Referência
Vibração de estiramento -OH da celulose	3300-3500	Barreto et al. (2011)
Estiramentos simétricos e	2900	Santos et al. (2013)

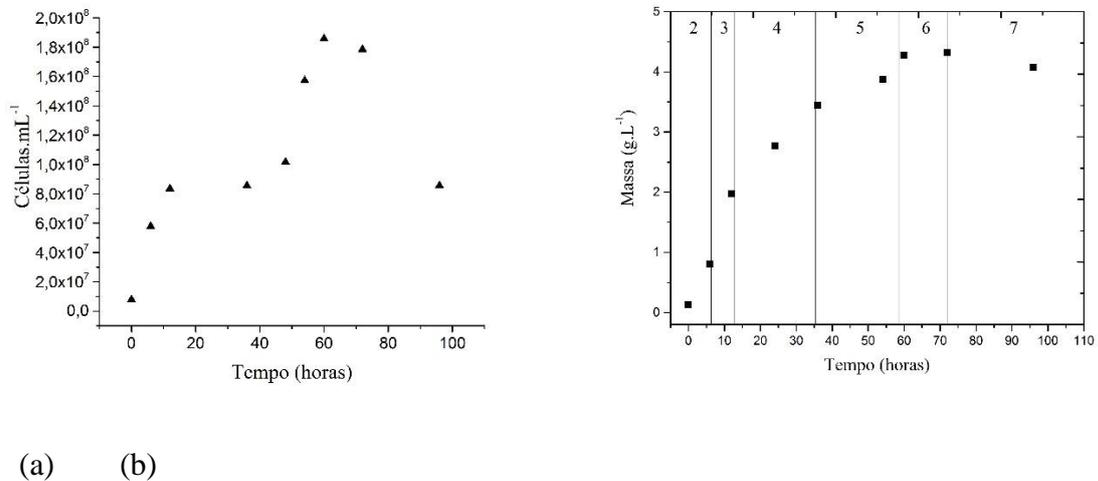
assimétricos de grupos CH ₂				
Ligação glicosídica entre monômeros de açúcares, e bandas de estiramento de C-O e C-C	1052	Kozarski et al. (2011)		
Vibração de estiramento C-O de grupos acetil na lignina	1249	Fiore et al. (2016)		
Vibração de estiramento C-O-C do anel piranose em polissacáridos	1124	Fiore et al. (2016)		
Deformação axial de ligações C-H da celulose cristalina	1430	Zhau et al. (2014)		
Estiramento de ligações C=O da hemicelulose	1742	Kabir, (2013)		
Água adsorvida na fibra, vibração da ligação C=C em moléculas aromáticas na lignina	1645	Zhau et al. (2014), Ferreira et al. (2015)		

4.7 Fermentação

4.7.1 Curvas de crescimento da *Candida guilliermondii* CCT 1516 em meio sintético

A *Candida guilliermondii* CCT 1516 teve um desenvolvimento satisfatório em meio sintético, onde chegou a obter uma densidade celular máxima de $1,85 \times 10^8$ células.mL⁻¹ no tempo de 60 horas. Observa-se na Figura 36.a que a fase de decaimento celular começou a partir das 72 horas de crescimento microbiano, de acordo com a Figura 36.b, de crescimento através de massa seca onde esta fase de decaimento inicia a partir das 72 horas.

Figura 36 – Curvas de crescimento da *Candida guilliermondii* em meio sintético, representada em densidade celular (a) e massa seca (b).



Verifica-se na Figura 36.b que o microrganismo apresentou quase todas as fases de crescimento descritas por Borzani (2001), com exceção da fase 1, que é caracterizada pelo período de adaptação do microrganismo ao meio, onde não ocorre a reprodução do mesmo no meio. Não foi possível constatar essa fase devido a concentração do microrganismo inicial de inoculação já não necessita de fase de adaptação. As demais fases são todas observadas: fase 2 – fase de transição, onde os microrganismos começam a se reproduzir; fase 3 ou “log” – crescimento exponencial, cuja velocidade específica de crescimento é constante e máxima; fase 4 - fase de crescimento linear, onde a velocidade de crescimento decai devido à redução no transporte de nutrientes no meio para as células; fase 5 – fase de desaceleração, a qual é caracterizada pela diminuição do crescimento causada principalmente pela falta de nutrientes e presença de inibidores; fase 6 – fase estacionária, onde as células atingem concentração máxima e ocorre um equilíbrio entre a taxa de crescimento e de morte celular; fase 7 – fase de declínio, onde a taxa de células mortas é maior que a geração de outras novas.

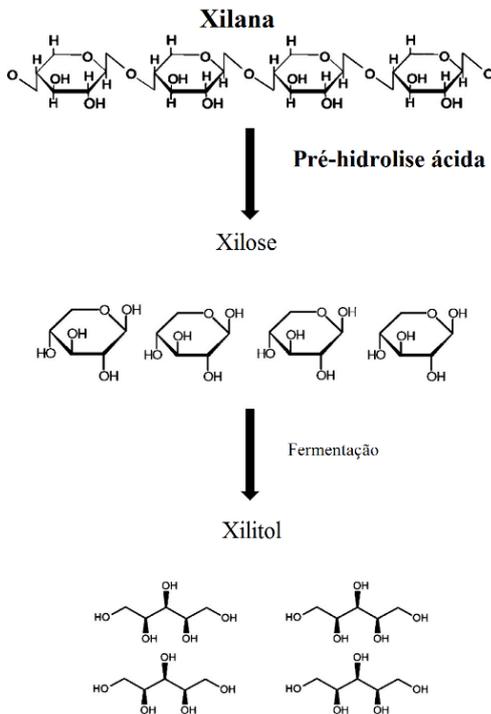
A partir da Figura 36 é possível constatar que o tempo ideal para realização do inóculo são 24 horas, onde seria o momento ideal do microrganismo, que atinge a densidade celular de 10^7 células.mL⁻¹ e uma massa de 3 g/L. Mateo et al. (2014) no estudo da *Candida guilliermondii* para produção de xilitol observaram comportamento similar do microrganismo, porém o meio de crescimento utilizado foi o licor da pré-hidrólise ácida de resíduos de oliveira. A levedura atingiu concentração celular de 3,0 g/L entre os tempos de 20 e 30 horas

em diferentes meios de cultivos (concentrado, com adição nutrientes e sem tratamento) e concentração máxima de biomassa em 72 horas de cultivo.

4.7.2 Bioconversão de xilose em xilitol

O processo de produção de xilitol pode ser resumido de acordo com a Figura 37, que representa o esquema de produção de xilitol desde a solubilização da xilana na fração hemicelulósica durante a pré-hidrólise, até a fermentação alcoólica.

Figura 37 – Diagrama da produção de xilitol.



Fonte – Adaptada de Albuquerque et al. (2014)

A partir da definição da melhor condição da pré-hidrólise, que foi utilizando ácido sulfúrico 2,5% e temperatura 120 °C, esta foi repetida para produção do licor hidrolisado em uma maior quantidade. Ao final do processo o pH do mesmo foi ajustado para 5,5 para posterior fermentação. Inicialmente ao final da pré-hidrólise ácida o pH do licor era 0,5 e o mesmo foi ajustado para 5,5 utilizando hidróxido de cálcio. Posteriormente foi determinada a composição do licor através de CLAE e os resultados estão expressos na Tabela 14.

Tabela 14: Concentração de açúcares e inibidores do licor pré-hidrolisado da fibra de sisal

Amostra	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Ac. Acético (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)
Fibra de sisal	4,617	12,290	5,858	0,1	0,833

Verifica-se na Tabela 14 que a concentração de xilose obtida depois da ampliação da escala é muito próxima da alcançada durante o planejamento experimental do pré-tratamento ácido, com 12,290 g/L. É possível observar a presença de glicose em uma quantidade significativa, 4,617 g/L, e também a presença de inibidores, dos quais o HMF e furfural estão em concentrações aceitáveis para a fermentação, porém o ácido acético excedeu o valor máximo sugerido de 3,0 g/L.

Como o metabolismo do microrganismo utilizado sintetiza a xilose para produzir o xilitol, é clara a vantagem de se utilizar o hidrolisado do pré-tratamento, que está em empregar ácidos diluídos e temperaturas brandas, onde o tempo de reação e o desgaste ambiental são menores, evitando uma etapa subsequente, que seria a hidrólise ácida ou enzimática. Ao analisar os resultados dos açúcares solubilizados durante este processo, verifica-se um alto teor de xilose, onde somente com o pré-tratamento foi possível obter um licor rico em açúcares, demonstrando assim a eficácia do método e da matéria prima utilizada.

Ao longo do planejamento experimental utilizado, não houve a produção de ácido acético nas amostras. O planejamento apresentado foi trabalhado em pequenas quantidades, mas quando selecionada a melhor condição e ampliada a escala de produção, houve uma degradação maior da hemicelulose e seus respectivos grupos acetil, gerando ácido acético no meio fermentativo, de maneira semelhante constatada por Mood et al. (2013), no trabalho de produção de etanol a partir de biomassas lignocelulósicas, que observaram a grande formação de ácido acético depois pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído, a temperatura elevadas.

Durante o inóculo do microrganismo foi analisado o crescimento microbiano através de densidade celular e massa seca, Figura 38, na qual é possível observar que ao final do inóculo a concentração celular foi aproximadamente 3 g/L e densidade celular de 10^7 células.mL⁻¹. Realizou-se os cálculos de acordo com o volume de licor utilizado, e as leveduras foram transferidas de maneira asséptica para o licor pré-hidrolisado utilizado na fermentação, Figura 39.

Figura 38 – Crescimento do microrganismo em meio sintético, (a) densidade celular e (b) massa seca

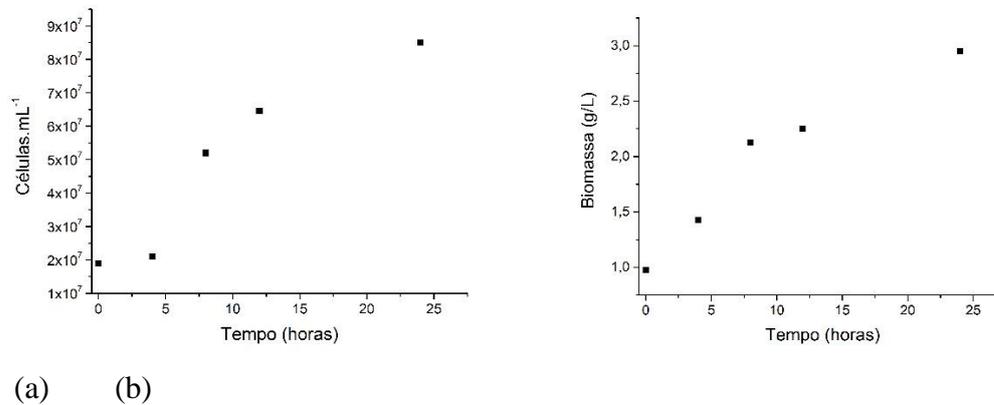
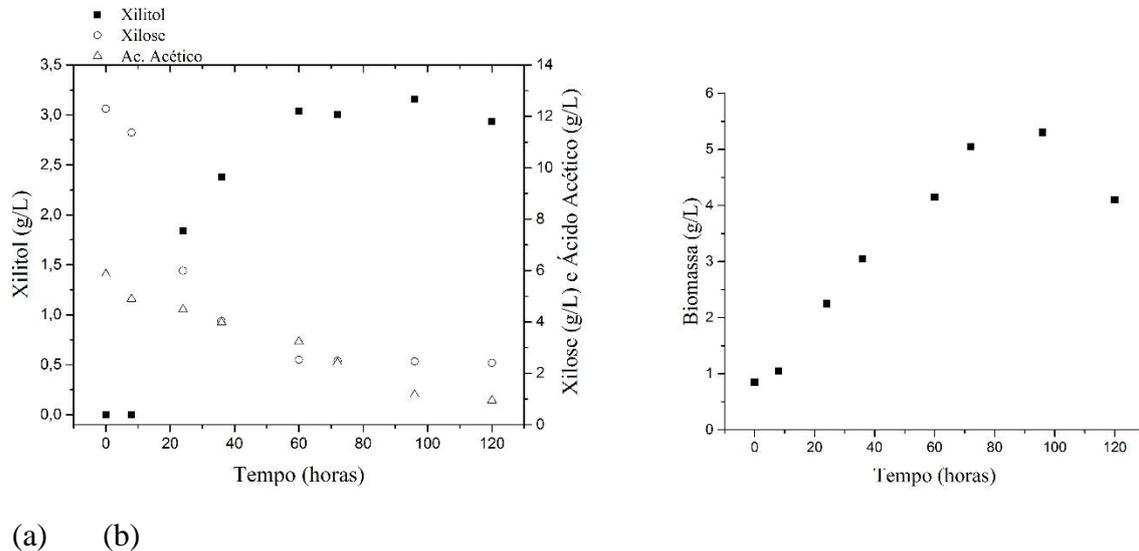


Figura 39 – Transferência da suspensão celular centrifugada para o licor hidrolisado



A Figura 40 mostra o consumo de xilose e a produção de xilitol em um cultivo de 120 horas no licor hidrolisado da fibra, utilizando a levedura *Candida guilliermondii* CCT 1516. Observa-se que nas primeiras 8 horas de fermentação houve somente consumo de substrato. No tempo de 24 horas quando a concentração de xilose diminui cerca de 6 g/L é perceptível a produção de xilitol, com 1,8g/L. Analisando o gráfico de crescimento celular, Figura 39.b, observa-se que enquanto as células continuam crescendo ocorre um aumento na produção de xilitol. A produção de xilitol é máxima no tempo de 96 horas com um valor de 3,154 g/L. De maneira linear à medida que a xilose vai sendo consumida aumenta a produção de xilitol. No último ponto do procedimento observa-se uma queda no valor do xilitol juntamente com o começo da fase de morte celular, mesmo com a presença de mais de 2 g/L de xilose no meio.

Figura 40 – (a) Perfil da fermentação, com consumo de xilose e ácido acético e formação de xilitol no pré-hidrolisado da fibra de sisal (b) crescimento celular (g/L) da *Candida guilliermondii* CCT 1516 no licor hidrolisado da fibra durante a fermentação.



Segundo Soleimani et al. (2014), a formação de xilitol a partir da xilose baseia-se no mecanismo de redução onde ocorre a adição de um átomo de hidrogênio na molécula de xilose na presença da coenzima NADH, responsável por catalisar reações de oxirredução. Esta conversão requer a presença de uma quantidade limitante de oxigênio no sistema, que se denomina condição semi-aeróbica. No entanto, em condições onde ocorre um excesso de oxigênio e um aumento na razão NAD^+/NADH causa a oxidação do xilitol e formação de xilulose, que posteriormente é convertida em uma pentose fosfato a fim de gerar energia para o metabolismo celular.

De forma mais detalhada essa reação é descrita por Albuquerque et al. (2014). Na qual relatam que alguns microrganismos podem produzir xilitol como um metabólito intermediário durante o metabolismo da xilose. A Xilose redutase (XR) é uma enzima dependente de NAD(P)H e a xilitol desidrogenase (XDH) requer NAD^+ , onde a conversão em xilitol pode ocorrer em dois passos. A primeira etapa de redução, onde a xilose é reduzida para xilitol através da coenzima NAD(P)H e, posteriormente, este metabólito é oxidado para xilulose por NAD^+ , com estas duas reações sendo consideradas limitantes para a metabolização de xilose e produção de xilitol. Especificamente para o gênero *Candida* a quantidade de oxigênio no meio é de fundamental importância na razão NAD^+/NADH , e consequente produção de xilitol. A utilização de NAD^+/NADH ou $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ depende do tipo de xilose redutase e xilitol desidrogenase (CHEN, 2010).

O licor proveniente da fibra de sisal possuía níveis de ácido acético acima dos permitidos, cerca de 5,86 g/L. Ao analisar a Figura 39.a, observa-se que a quantidade de ácido acético diminui com o decorrer do tempo, chegando a concentrações de 0,9 g/L. Um ponto interessante a ser discutido durante o processo fermentativo é a presença de inibidores, principalmente HMF, furfural e ácido acético. No licor hidrolisado utilizado no presente trabalho os níveis de HMF e furfural estavam dentro dos níveis inibitórios, que segundo Mussato e Roberto (2004) são de 2 g/L para ambos. Nos hidrolisados hemicelulósicos cuja presença de ácido acético exceda os níveis limites para fermentação, fica comprometida a conversão para o produto final. Segundo Sarrouh et al. (2009) o efeito inibitório desse ácido está relacionado ao pH, pois quando o ácido acético se encontra na forma não dissociada ele é capaz de difundir-se através da membrada celular, atingindo o citoplasma e, ao adentrar no interior das células com níveis de pH mais elevados, ele dissocia-se diminuindo o pH intracelular, provocando a morte do microrganismo. Albuquerque et al. (2015) citam que em concentrações de ácido acético acima de 3,0 g/L as fermentações tiveram efeitos negativos, ocorrendo uma inibição severa ao microrganismo.

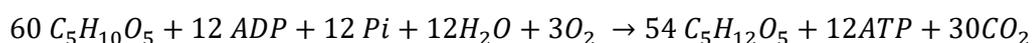
4.7.3 Determinação de parâmetros fermentativos

A concentração de xilitol e os parâmetros fermentativos para o pré-hidrolisado da fibra de sisal são mostrados na Tabela 15.

Tabela 15: Concentração máxima de xilitol e os parâmetros fermentativos do licor hidrolisado da fibra de sisal

Amostra	$P_{max}(g/L)$	$Y(\%)$	$Y_{P/S}$	$\eta(\%)$
Hidrolisado da fibra de sisal	3,154	82,28	0,32	35,00

O fator de conversão xilose a xilitol no momento onde a produção foi máxima é de 0,32 g/g e eficiência de conversão de xilose em xilitol de aproximadamente 35,00 %. Barbosa et al. (1988) citam um rendimento teórico de 0,912 mol de xilitol para cada mol de D-xilose utilizado, empregando a *Candida guilliermondii*, segundo a reação abaixo.



Tendo como referência o rendimento teórico descrito, a produção do presente trabalho não foi elevada, porém tem-se que ressaltar, assim como discutido anteriormente, a influência dos inibidores durante o processo fermentativo, nesse caso, o ácido acético. Houve um

consumo de quase 5,0 g/L durante a fermentação, indicando que o ácido interagiu com o microrganismo de forma a diminuir a conversão de xilose em xilitol, visto que, os demais inibidores presentes estavam em quantidades aceitáveis. De mesmo modo, Castro et al. (2012) durante a produção de xilitol a partir do hidrolisado do eucalipto, verificaram que a *Candida guilliermondii* conseguiu metabolizar cerca de 5,0 g/L de ácido acético durante a fermentação, provocando efeitos negativos na conversão. Na Tabela 16 estão resumidos alguns trabalhos de produção de xilitol a partir de biomassas lignocelulósicas.

Tabela 16: Produção de xilitol a partir de diferentes biomassas

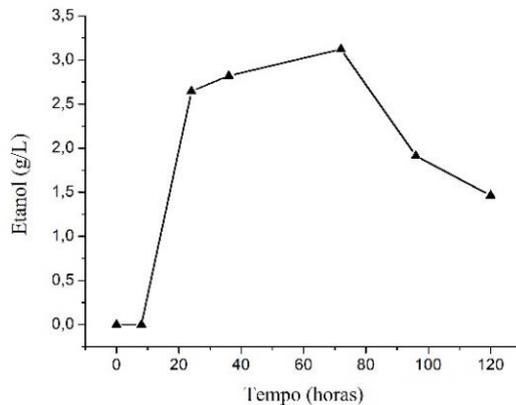
Matéria-prima	H_2SO_4	Rend. em produto (g/g)	Microrganismo	Referência
Casca de soja	1,4%	0,34	<i>C. guilliermondii</i>	Schirmer-Michel et al. (2008)
Farelo de cevada	3 %	0,33	<i>D. hansenii</i>	Cruz et al. (2000)
Sabugo de milho	2%	0,26	<i>D. hansenii</i>	Cruz et al. (2000)
Folhas de milho	3%	0,36	<i>D. hansenii</i>	Cruz et al. (2000)
Bagaço do caju	0,6 mol.L ⁻¹	0,32	<i>K. marxianus</i>	Albuquerque et. al (2015)
Eucalipto	0,35 %	0,40	<i>C. guilliermondii</i>	Canilha et al. (2004)
Bagaço de cana-de-açúcar	100 mg/g	0,31	<i>C. guilliermondii</i>	Branco et al. (2007)

De modo geral, todas as pesquisas citadas na Tabela 16 obtiveram resultados que tiveram influência direta de compostos inibitórios presentes em seus respectivos licores hidrolisados. Schirmer-Michel (2008) utilizando a *Candida guilliermondii* no hidrolisado da casca de soja, obtiveram um rendimento e comportamento que apresentou padrões similares ao do presente estudo, com um rendimento de 0,34 g/g, causado pelo acúmulo de inibidores, dentre eles o ácido acético e glicerol. Ainda segundo o mesmo autor, foi constatado que depois da produção máxima de xilitol houve um decréscimo na concentração de xilitol no meio, a partir das 48 horas, o qual foi averiguado o consumo do próprio xilitol como fonte de carbono. De forma semelhante Cruz et al. (2000) trabalhando com hidrolisados de farelo de cevada e espigas de milho para produção de xilitol, obtiveram um rendimento de 0,33 g/g e 0,26 g/g respectivamente. Sendo que a eficiência da fibra de sisal foi superior a maioria das

pesquisas exibidas, mesmo apresentando comportamento similar em relação a interação com os inibidores.

Outro fator que pode ter influenciado diretamente o rendimento obtido, foi a formação de etanol durante o processo fermentativo, assim como demonstrado na Figura 41 para o hidrolisado da fibra de sisal.

Figura 41 – Produção de etanol pela *Candida guilliermondii*

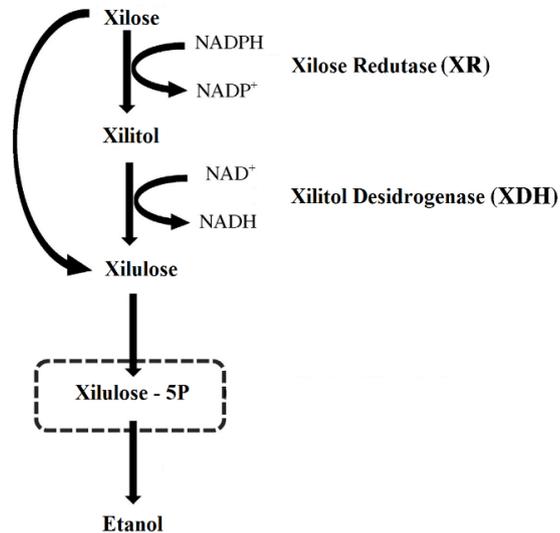


Verifica-se na Figura 41 que a produção de etanol inicia-se a partir das 24 horas de fermentação, de maneira similar ao que ocorreu com o xilitol, onde durante as primeiras 8 horas houve somente consumo de substrato. No tempo de 24 horas a concentração de etanol era de 2,6 g/L, diferentemente do xilitol, que no mesmo período era de 1,8 g/L. A produção de etanol foi máxima no tempo de 72 horas com 3,12 g/L, depois desse período ocorre um decréscimo na concentração de etanol. Indicando a falta de fontes de carbono no meio e consequente consumo do etanol no metabolismo celular. Segundo Parajó et al. (1998) o metabolismo de xilose em leveduras produz diversos produtos como dióxido de carbono, ácido acético, etanol e xilitol. Os fatores de rendimento em produto são dependentes da regulação do fluxo de carbono através das rotas metabólicas. Dessa forma, quando a concentração de xilose diminui a níveis muito baixos a levedura recorre a outras fontes de carbono, como o ácido acético e o próprio xilitol ou etanol.

A concentração de glicose durante todo processo fermentativo teve uma variação de aproximadamente 1,5g/L, porém a concentração da mesma sofreu variações mais significativas posteriormente a formação de etanol. Dessa forma, a fonte de carbono para a produção desta quantidade de etanol não seria a glicose. De acordo com Albuquerque et al. (2014) o xilitol é um composto intermediário no metabolismo de grande parte das leveduras,

podendo ser metabolizado e convertido em etanol de acordo com o microrganismo e as condições do meio durante a fermentação, assim como pode ser observado na Figura 42.

Figura 42 – Esquema simplificado do metabolismo da xilose em leveduras



Fonte: Adaptada de Albuquerque et al. (2014)

A conversão destacada pela Figura 42 pode ser estimulada de acordo com níveis dos outros açúcares presentes. Segundo Walther et al. (2001) as concentrações de açúcares monoméricos no licor hidrolisado utilizado como meio fermentativo podem causar estresse osmótico, de forma a inibir a geração da enzima xilose redutase ou levar a produção de etanol pela levedura em concentrações intoleráveis, além de afetar a cinética das enzimas presentes. Albuquerque et al. (2015) relataram que para a produção de xilitol utilizando hidrolisados hemicelulósicos, o processo pode ser afetado pela concentração de açúcares no meio de fermentação, pela proporção em que ocorrem, além de inibidores presentes. Realizando testes com leveduras do gênero *Candida*, cultivada em meio sintético contendo várias proporções de concentração glicose/xilose, verificou que a glicose inibiu intensamente a produção de xilitol a partir da razão de 1/3, ou seja, utilizando 60 g/L de xilose no meio fermentativo, a formação de xilitol foi prejudicada nos ensaios que as concentrações de glicose ultrapassaram 20 g/L. No hidrolisado da fibra de sisal utilizado neste trabalho também possuía a razão 1/3 de glicose/xilose, podendo ter sofrido algum tipo de estresse durante o processo fermentativo.

Em ambos os produtos gerados durante o processo fermentativo, xilitol e etanol, depois que a produção atingiu uma concentração máxima houve consumo dos mesmo como

fontes de carbono para o metabolismo celular. Esse fato ocorreu no momento onde a quantidade de xilose correspondia a cerca de 18% com relação a inicial.

No presente trabalho a eficiência na conversão de xilose em xilitol foi de 35%, a qual em condições ideais seria avaliada de forma insatisfatória, porém tendo em vista a grande presença de inibidores, como ácido acético, o qual foi constatado que interagiu diretamente com o microrganismo; a conversão de parte da xilose para etanol, onde nas condições de fermentação utilizadas, apresentou formação de etanol em uma concentração equivalente à de xilitol, provavelmente causado pelo estresse osmótico devido a concentração alta de glicose na amostra; a oxigenação do meio que pode alterar a razão entre as coenzimas responsáveis pela conversão em xilitol no metabolismo celular; e de forma muito semelhante é possível verificar que em diversas matérias-primas pesquisadas a produtividade de xilitol foi influenciada de forma negativa devido a presença de inibidores e outros subprodutos gerados; Portanto, levando em consideração todos esses fatores, a fibra de sisal apresentou rendimento satisfatório, e quando comparada a outros materiais em condições semelhantes, demonstrou melhor comportamento.

5 CONCLUSÃO

A fibra de sisal apresentou grande quantidade de carboidratos totais, cerca de 80%. Desse total, foi possível analisar elevado percentual de hemicelulose (31,81%). Em relação à eficiência dos pré-tratamentos, o pré-tratamento ácido apresentou os melhores resultados quanto a remoção de xilose.

As melhores condições para solubilização de xilose da fração hemicelulósica foram para valores máximos de temperatura (120 °C) e concentração de ácido sulfúrico (2,5%), onde o modelo foi estatisticamente significativo para um grau de confiança de 95%. Ao final obtendo um licor pré-hidrolisado com concentração de 13,145 g/L de xilose.

A composição lignocelulósica após o tratamento ácido na melhor condição apresentou remoção parcial da hemicelulose e celulose e aumento de 5% de lignina. A remoção de uma fração da hemicelulose da amostra foi confirmada nas análises de MEV, Infravermelho, Termogravimetria e DRX. As curvas termogravimétricas apresentaram redução de 20% na massa da segunda etapa de perda de massa, atribuível a hemicelulose. O espectro de absorção na região do infravermelho foi possível constatar que após o tratamento, o desaparecimento de bandas características da hemicelulose. Os difratogramas indicaram aumento da cristalinidade com a remoção de componentes amorfos, o que foi confirmado pelas micrografias, corroborando a remoção da fração hemicelulósica.

A fermentação alcoólica do hidrolisado da fibra de sisal utilizando a *Candida guilliermondii* CCT 1516 apresentou rendimento de xilitol de 0,32 g/g e eficiência de 35%, porém o meio fermentativo apresentou teor de ácido acético acima do permitido (5,86 g/L), o que provocou efeito inibitório ao microrganismo. Além deste fator, a presença de outros açúcares pode provocar estresse osmótico no microrganismo e parte da xilose presente no licor foi convertida em etanol, fazendo com que o rendimento total da produção de xilitol diminuísse.

A fibra de sisal demonstrou grande potencial para a produção de xilitol. Salientando que este trabalho foi desenvolvido utilizando somente o licor pré-hidrolisado, o que reduz tempo e reagentes, evitando etapa subsequente que seria a hidrólise ácida ou enzimática. Foi verificado elevado teor de açúcares monoméricos, como a xilose, e rendimento satisfatório.

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, T. L.; GOMES, S. D. L.; MARQUES JR., J. E.; SILVA, I. J.; ROCHA, M. V. P. Xylitol production from cashew apple bagasse by *Kluyveromyces marxianus* CCA510. *Catalysis Today*, v. 255, p. 33–40, 2015.

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

ARRUDA, P. V.; Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana. Tese – USP. 2011.

ASADA, C.; BASNET, S.; OTSUKA, M.; SASAKI, C.; NAKAMURA, Y. Epoxy resin synthesis using low molecular weight lignin separated from various lignocellulosic materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 74, p. 413–419, 2015.

BAI, Y. Y.; XIAO, L. P.; SUN, R. C. Microwave-assisted conversion of biomass derived hemicelluloses into xylo-oligosaccharides by novel sulfonated bamboo-based catalysts. *Biomass and Bioenergy*, v. 75, p. 245-253, 2015.

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

BARRETO A. C. H.; Rosa D. S.; FECHINE P. B. A.; MAZZETTO S. E. Properties of sisal fibers treated by alkali solution and their application in to cardanol-based biocomposites. *Compos Part A-Appl S*, v. 42, p. 492–500, 2011.

BICU, I.; MUSTATA, F. Optimization of isolation of cellulose from orange peel using sodium hydroxide and chelating agents. *Carbohydrate Polymers*, v. 98, p. 341– 348, 2013.

BINOD, P.; SATYANAGALAKSHMI K.; SINDHU, R.; JANU, K. U.; Rajeev K.; SUKUMARAN, A. P. Short duration microwave assisted pretreatment enhances the enzymatic saccharification and fermentable sugar yield from sugarcane bagasse. *Renewable Energy*, v. 37, p. 109-116, 2012.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. W. Cinética de processos fermentativos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Editora Edgard Blücher, v.2, p.93-122, 2001.

BRANCO, R. F.; SANTOS, J. C.; MURAKAMI, L. Y.; MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; SILVA, S. S. Xylitol production in a bubble column bioreactor: Influence of the aeration rate and immobilized system concentration. *Process Biochemistry*, v. 42, p. 258–262, 2007.

BRANDÃO, L. G. N.; PEREIRA, L. G. R.; AZEVÊDO, J. A. G.; SANTOS, R. D.; ARAÚJO, G. G. L.; DÓREA, J. R. R.; NEVES, A. L. A. Efeito de aditivos na composição bromatológica e qualidade de silagens de coproduto do desfibramento do sisal. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 34, n. 6, p. 2991-3000, 2013.

CANILHA, L.; SILVA, J. B. A.; SOLENZAL, A. I. N. Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production. *Process Biochemistry*, v. 39, p. 1909–1912, 2004.

CARDONA C. A.; QUINTERO J. A.; PAZ I. C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: Status and perspectives. *Bioresource Technol*, v.101, p. 4754–4766, 2010.

CASTRO, J. F.; PARRA, C.; YÁÑEZ-S, M.; ROJAS, J.; MENDONÇA, R. T.; BAEZA, J.; FREER, J. Optimal Pretreatment of *Eucalyptus globulus* by Hydrothermolysis and Alkaline Extraction for Microbial Production of Ethanol and Xylitol. *Ind. Eng. Chem. Res*, v. 52, p. 5713–5720, 2013.

CHEN, S.; WANG, Z.; FANG K.; FAN G.; WANG P.; SONG J. Impact of Dilute Sulfuric Acid Pretreatment on Fermentable Sugars and Structure of Bamboo for Bioethanol Production. *BioResources*, v. 9, n. 4, 2014.

CHEN, X.; JIANG, Z.; CHEN, S.; QIN, W.; Microbial and Bioconversion Production of D-xylitol and Its Detection and Application. *Int. J. Biol. Sci.* v. 6, p. 834-844, 2010.

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

CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; DOMÍNGUEZ H.; PARAJÓ, J. C. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol, *Food Biotechnology*, v.14:1-2, p.79-97, 2000.

DEMIRBAS, A. Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. *Energy Sources*, v. 27, p. 327–337, 2005.

DING, S. Y.; HIMMEL, M. E. The maize primary cell wall microfibril: A new model derived from direct visualization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 54, p. 597-606, 2006.

DOREZ, G.; FERRY, L.; SONNIER, R.; TAGUET, A.; CUESTA, J. M. L. Effect of cellulose, hemicellulose and lignin contents on pyrolysis and combustion of natural fibers. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, v. 107, p. 323–331, 2014.

DUARTE, L. C.; CARVALHEIRO, F.; NEVES, I.; GÍRIO, F. M.; Effects of Aliphatic Acids, Furfural, and Phenolic Compounds on *Debaryomyces hansenii* CCMII 941. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 6, p. 121–124, 2005.

EMBRAPA, *Procedimentos para análise lignocelulósica*. Documentos 236, ISSN 0103 – 0205, 2010.

FERDOSIAN F.; YUAN Z.; ANDERSON M.; XU C. C. Thermal performance and thermal decomposition kinetics of lignin-based epoxy resins. *J Anal Appl Pyrol*, v. 119, p. 124–132, 2016.

FILHO, J. A. M.; SILVA, F. A.; FILHO, R. D. T. Degradation kinetics and aging mechanisms on sisal fiber cement composite systems. *Cement & Concrete Composites*, v.40, p. 30–39, 2013.

FILHO, P. F. S. Palma forrageira (*Opuntia fícus indica* e *Nopalea cochenillifera*) como matéria-prima para produção de etanol celulósico e enzimas celulolíticas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN, 2014.

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

FU, L.; MCCALLUM, S. A.; Jianjun MIAO, J.; HART, C.; TUDRYN, G. J.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J. Rapid and accurate determination of the lignin content of lignocellulosic biomass by solid-state NMR. *Fuel*, v. 141, p. 39–45, 2015.

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

GUERRERO M. B.; BECEIRO J. L.; JIMÉNEZ P. E. S.; COSP J. P. Comparison of thermal behavior of natural and hot-washed sisal fibers based on their main components: Cellulose, xylan and lignin. TG-FTIR analysis of volatile products. *Thermochim Acta*, v. 581, p. 70–86, 2014.

HAMELINK, C. N.; HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. Ethanol from lignocellulosic biomass. *Biomass and Bioenergy*, v. 28, p. 384, 2005.

JIA, H.; SHAO, T.; ZHONG, C.; LI, H.; JIANG, M.; ZHOU, H.; WEI, P. Evaluation of xylitol production using corncob hemicellulosic hydrolysate by combining tetrabutylammonium hydroxide extraction with dilute acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, v. 151, p. 676–683, 2016.

JOHN, M. J.; ANANDJIWALA, R. D. Recent Developments in Chemical Modification and Characterization of Natural Fiber-Reinforced Composites. *Polymer Composites*, 2008.

KABIR, M.M.; WANGA, H.; LAU, K.T.; CARDONA, F. Effects of chemical treatments on hemp fibre structure. *Applied Surface Science*, v. 276, p. 13–23, 2013.

KADLA, J. F.; GILBERT, R. D. Cellulose structure: a review. *Cellulose Chemical Technology*. Roma, v. 34, p. 197, 2000.

KIM, J. T.; NETRAVALI, A. N. Mercerization of sisal fibers: Effect of tension on mechanical properties of sisal fiber and fiber-reinforced composites. *Composites: Part A*, v. 41, p. 1245–1252, 2010.

KOZARSKI, M.; KLAUS, A., NIKSIC, M.; JAKOVLJEVIC, D.; HELSPER, J. P. F. G.; VAN GRIENSVEN, L. J. L. D. Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. *Food Chemistry*, v. 129, p. 1667–1675, 2011.

KRISHNAN, A. K; JOSEC, C.; ROHITH, K. R; GEORGE, K. E. Sisal nanofibril reinforced polypropylene/polystyrene blends: Morphology, mechanical, dynamic mechanical and water transmission studies. *Industrial Crops and Products*, v. 71, p. 173–184, 2015.

LACERDA, T. M.; ZAMBON, M. D.; FROLLINI, E., Effect of acid concentration and pulp properties on hydrolysis reactions of mercerized sisal. *Carbohydrate Polymers*. v. 93, p. 347–356, 2013.

LENGOWSKI, E. C.; MUNIZ, G. I. B.; NISGOSKI, S.; MAGALHÃES, W. L. E. Avaliação de métodos de obtenção de celulose com diferentes graus de cristalinidade. *Sci. For.*, Piracicaba, v. 41, n. 98, p. 185-194, 2013.

LI, J.; SHI, C.; LINDSTRÖM, M.E.;HENRIKSSON, G. The methoxy group of 4-O-methylglucuronic acid is central for the formation of hexenuronic acid during kraft pulping. *O PAPEL*, v. 72, p. 54 – 65, 2011.

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

LIMA, F. C. S. Produção de xilitol utilizando licor da pré-hidrolise ácido do bagaço do pendúcuo do caju. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, 2013.

MANRIQUE, G. D.; LAJOLO, F. M. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. *Postharvest Biology and Technology*, v. 25, p. 99–107, 2002.

MARAVÉ A. G.; SALVACHÚA D.; MARTÍNEZ M. J.; DIAZ L. F.; ZAMORANO M. Analysis of the relation between the cellulose, hemicellulose and lignin content and the thermal behavior of residual biomass from olive trees. *Waste Manage*, v. 33, p. 2245–2249, 2013.

MARTIN A. R.; MARTINS M. A.; SILVA O. R. R. F.; MATTOSO L. H. C. Studies on the thermal properties of sisal fiber and its constituents. *Thermochim Acta*, v.506, p. 14–19, 2010.

MARTINS M. A.; JOEKES I. Tire Rubber–Sisal Composites: Effect of Mercerization and Acetylation on Reinforcement. *J Appl Polym Sci*, v.89, p.2507–2515, 2003.

MATEO, S.; PUENTES, J. G.; ROBERTO, I. C.; SÁNCHEZ, S.; MOYA, A. J. Optimization of acid hydrolysis of olive tree pruning residue. Fermentation with *Candida guilliermondii*. *Biomass and bioenergy*, v. 69, p. 39-46, 2014.

MATHEW, A. K.; PARAMESHWARAN, B.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. An evaluation of dilute acid and ammonia fiber explosion pretreatment for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*, v. 199, p. 13–20, 2016.

MATTHEWS, J. F.; SKOPEC, C. E.; MASON, P. E.; ZUCCATO, P.; TORGET, R. W.; SUGIYAMA, J. Computer simulation studies of microcrystalline cellulose I. *Carbohydrate Research*, v. 341, p. 138-152, 2006.

MILANESE, A. C.; CIOFFI, M. O. H.; VOORWALD, H. J. C. Thermal and mechanical behaviour of sisal/phenolic composites. *Composites: Part B*, v. 43, p. 2843–2850, 2012.

MOOD, S. H.; GOLFESHAN, A. H.; TABATABAEI, M. T.; JOUZANI, G. S.; NAJAFI, G. H.; GHOLAMI, M.; ARDJMAND, M. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 27, p. 77–93, 2013.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y. Y.; HOLTZAPPLE, M.; LADISCH, M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, v. 96, p. 673–686, 2005.

MULAKHUDAIR, A. R.; HANOTU, J.; ZIMMERMAN, W. Exploiting microbubble-microbe synergy for biomass processing: Application in lignocellulosic biomass pretreatment. *Biomass and Bioenergy*, v. 93, p. 187e193, 2016.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO I. C. Avaliação De Diferentes Tipos De Carvão Ativo Na Destoxificação De Hidrolisado De Palha De Arroz Para Produção De Xilitol. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 24, p. 94-100, 2004.

OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA. *Quim. Nova*, v. 33, n. 7, p. 1549-1558, 2010.

PAIVA, J. M. F.; FROLLINI, E.; Unmodified and modified surfasse sisal fibers. *Macromolecular materials and Engineering*, v. 291, p. 405-417, 2006.

PAL, S.; CHOUDHARY, V.; KUMAR, A.; BISWAS, D.; MONDAL, A. K.; SAHOO, D. K. Studies on xylitol production by metabolic pathway engineered *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology*, v. 147, p. 449–455, 2013

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues: Sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARAJÓ, J. C.; DOMINGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological Production Of Xylitol. Part 1: Interest Of Xylitol And Fundamentals Of Its Biosynthesis. *Bioresource Technology*, v.65, p.191-2111, 1998.

PEI, Y.; LI, Y.; ZHANG, Y.; YU, C.; FU, T.; ZOU, J.; TU, Y.; PENG, L.; CHEN, P. G-lignin and hemicellulosic monosaccharides distinctively affect biomass digestibility in rapeseed. *Bioresource Technology*, v. 203, p. 325–333, 2016.

RAO, L. V.; GOLI, J. K.; GENTELA, J.; KOTI, S. Bioconversion of lignocellulosic biomass to xylitol: An overview. *Bioresource Technology*, 2016.

REN, N.; ZHAO, L.; CHEN, C.; GUO, W.; CAO, G. A review on bioconversion of lignocellulosic biomass to H₂: Key challenges and new insights. *Bioresource Technology*, v. 215, p. 92–99, 2016.

ROCHA A., SILVA F.L.H., CONRADO L.S.O., LIMA F., CARVALHO J.P., SANTOS S. Ethanol from cashew apple bagasse by enzymatic hydrolysis, *Chemical Engineering Transactions*, v. 37, p. 361-366, 2014.

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

RODRIGUES, M. I. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Campinas, SP: Casa do espírito amigo fraternidade Fé e Amor. 3ª ed., p. 154-158, 2014.

RODRIGUES, R. C. L. B.; KENEALY, W. R.; JEFFRIES, T. W. Xylitol production from DEO hydrolysate of corn stover by *Pichia stipitis* YS-30. *J Ind Microbiol Biotechnol*, v. 38, p.1649–1655, 2011.

RUBIN, E. M. Genomics of Cellulosic biofuels. *Nature*, v. 454, p. 841-845, 2008.

SÁ, L. R. V.; MOUTTA, R. O.; BON, E. P. S.; CAMMAROTA, M. C.; LEITÃO, V. S. F. Fermentative biohydrogen production using hemicellulose fractions: Analytical validation for C5 and C6-sugars, acids and inhibitors by HPLC. *International journal of hydrogen energy*, v. 40, p. 13888-13900, 2015.

SAHA B. C.; COTTA M. A. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. *Biotechnology Progress*, v. 22, 449-53, 2006.

SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, Y. V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*, v. 40, p. 3693–3700, 2005.

SAINI, J. K.; PATEL, A. K.; ADSUL, M.; SINGHANIA, R. R. Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass. *Renewable Energy*, v. 98, p. 29-42, 2016.

SALEH, M.; CUEVAS, M.; GARCÍA, J. F.; SÁNCHEZ, S. Valorization of olive stones for xylitol and ethanol production from dilute acid pretreatment via enzymatic hydrolysis and fermentation by *Pachysolen tannophilus*. *Biochemical Engineering Journal*, v. 90, p. 286–293, 2014.

SÁNCHEZ, O. J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 5270–5295, 2008.

SANTOS, F. A.; QUEIRÓZ, J. H.; COLODETTE, J. L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V. M.; REZENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. *Quim. Nova*, v. 35, n. 5, p.1004-1010, 2012.

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

SANTOS, R. P. O.; RODRIGUES B. V. M.; RAMIRESM E. C.; FILHO A. C. R.; FROLLINI E. Bio-based materials from the electrospinning of lignocellulosic sisal fibers and recycled PET. *Ind Crop Prod.*, v. 72, p. 69–76, 2015.

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

SARKAR, P.; BOSNEAGA, E.; AUER, M. Plant cell walls throughout evolution: towards a molecular understanding of their design principles. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n. 13, p. 3615–3635, 2009.

SARROUH, B. F.; BRANCO, R. F.; SILVA S. S. Biotechnological Production of Xylitol: Enhancement of Monosaccharide Production by Post-Hydrolysis of Dilute Acid Sugarcane Hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol*, v. 153, P.163–170, 2009.

SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLORES, S. H.; HERTZ P. F.; MATOS G. S.; AYUB M. A. Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. *Bioresource Technology*, v. 99, p. 2898–2904, 2008.

SILVA, C.R. Produção de etanol a partir da fração hemicelulósica do bagaço de cana usando glucose isomerase coimobilizada com *Saccharomyces cerevisiae*. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, 2013.

SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA I. M.; LUCHESE R. H.; SILVA, S. S. Inhibitory Effect Of Acetic Acid On Bioconversion Of Xylose In Xylitol By *Candida Guilliermondii* In Sugarcane Bagasse Hydrolysate. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 248-254, 2004.

SILVA, N. L. C. Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual da indústria de celulose. Dissertação – UFRJ, Rio de Janeiro, 2010.

SOLEIMANI, M.; LOPE, T. Evaluation of biocomposite-based supports for immobilized-cell xylitol production compared with a free-cell system. *Biochemical Engineering Journal*, v. 82, p. 166– 173, 2014.

SUHAS;GUPTA, V.K.; CARROTT, P.J.M.; SINGH, R.; CHAUDHARY, M.; KUSHWAHA,S. Cellulose: A review as natural, modified and activated carbon adsorbent. *Bioresource Technology*, v. 216,p. 1066–1076, 2016.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004.

VALLEJOS, M. E.; CHADE, M.; MERELES, E. B.; BENGOCHEA, D. I.; BRIZUELA, J. G.; FELISSIA, F. E.; AREA, M. C. Strategies of detoxification and fermentation for biotechnological production of xylitol from sugarcane bagasse. *Industrial Crops and Products*, v. 91, p.161–169, 2016.

VO, L. T. T.; NAVARD, P. Treatments of plant biomass for cementitious building materials – A review. *Construction and Building Materials*, v. 121, p.161–176, 2016

WAGHMARE, P.R.; KADAM, A.A.; SARATALE, G.D.; GOVINDWAR, S.P. Enzymatic hydrolysis and characterization of waste lignocellulosic biomass produced after dye bioremediation under solid state fermentation. *Bioresource Technology*, v. 168, p. 136–141, 2014.

WALTHER, T.; HENSIRISAK, P.; AGBLEVOR, F.A. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. *Bioresource Technology*, v. 76, p. 213-220, 2001.

WANG, K.; YANG, H. Y.; XU, F.; SUN, R. C. Structural comparison and enhanced enzymatic hydrolysis of the cellulosic preparation from *Populus tomentosa* Carr., by different cellulose-soluble solvent systems. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 4524–4529, 2011.

WANG, S.; LI, H.; FAN, X.; ZHANG, J.; TANG, P.; YUAN, Q. Metabolic responses in *Candida tropicalis* to complex inhibitors during xylitol bioconversion. *Fungal Genetics and Biology*, v. 82, p. 1–8, 2015.

WANG, X.; CUI, X.; ZHANG L. Preparation and characterization of lignin-containing nanofibrillar cellulose. *Procedia Environmental Sciences*, v. 16, p. 125 – 130, 2012.

WEI, J.; MEYER, C. Improving degradation resistance of sisal fiber in concrete through fiber surface treatment. *Applied Surface Science*, v. 289, p. 511– 523, 2014.

WEI, J.; MEYER, C. Utilization of rice husk ash in green natural fiber-reinforced cement composites: Mitigating degradation of sisal fiber. *Cement and Concrete Research*, v. 81, p. 94–111, 2016.

XU, F.; YU, J.; TESSO T.; WANG, F. D. D. Qualitative and quantitative analysis of lignocellulosic biomass using infrared techniques: A mini-review. *Applied Energy*, v. 104, p. 801–809, 2013.

ZHANG, J.; ZHANG, B.; WANG, D.; GAO, X.; HONG, J. Xylitol production at high temperature by engineered *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, v. 152, p. 192–201, 2014.

ZHOU, F.; CHENG, G.; JIANG B. Effect of silane treatment on microstructure of sisal fibers. *Applied Surface Science*, v. 292, p. 806– 812, 2014.

ZHOU, Y.M.; FU, S.Y.; ZHENG, L.M.; ZHAN, H.Y. Effect of nanocellulose isolation techniques on the formation of reinforced poly(vinyl alcohol) nanocomposite films. *eXPRESS Polym. Lett*, v. 6, p. 794–804, 2012.