



**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**  
**SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA**

**Dissertação de Mestrado**

**INFLUÊNCIA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA LIGNINA  
NA BIOCONVERSÃO DE XILOSE EM XILITOL POR**  
*Candida guilliermondii*

**Daniela Vieira Cortez**

**Lorena - SP- Brasil**

**2005**



**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**  
**SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA**  
**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA**

**Dissertação de Mestrado**

**INFLUÊNCIA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA LIGNINA  
NA BIOCONVERSÃO DE XILOSE EM XILITOL POR**  
*Candida guilliermondii*

**Daniela Vieira Cortez**

**Lorena - SP- Brasil**

**2005**

### Ficha catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Universitária da FAENQUIL

C828i Cortez, Daniela Vieira  
Influência dos Produtos de Degradação da Lignina na  
Bioconversão de Xilose em Xilitol por *Candida guilliermondii* /  
Daniela Vieira Cortez. -- Lorena, 2005.  
128f. : il.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Engenharia  
Química de Lorena. Departamento de Biotecnologia.  
Orientadora: Inês Conceição Roberto.

1. Biotecnologia 2. Xilitol: Fermentação 3. Vanilina: Efeito  
inibitório - Xilitol 4. Siringaldeído: Efeito inibitório - Xilitol 5.  
*Candida guilliermondii*: Biocatalisador I. Roberto, Inês  
Conceição, orientadora. II. Título.

CDU

574.6

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

**INFLUÊNCIA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA LIGNINA  
NA BIOCONVERSÃO DE XILOSE EM XILITOL POR  
*Candida guilliermondii***

Dissertação de mestrado apresentada  
como parte das exigências para a  
obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia Industrial

**Banca Examinadora:**

Dra. Inês Conceição Roberto  
Dra. Heizir Ferreira de Castro  
Dr. Arnaldo Márcio de Ramalho Prata

**Estudante:**

Daniela Vieira Cortez

**Lorena - SP- Brasil  
2005**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA  
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

**INFLUÊNCIA DOS PRODUTOS DE DEGRADAÇÃO DA LIGNINA  
NA BIOCONVERSÃO DE XILOSE EM XILITOL POR  
*Candida guilliermondii***

Este exemplar corresponde a versão  
final da dissertação de mestrado  
aprovada pela banca examinadora

---

Dra. Inês Conceição Roberto  
Orientador e Presidente da Banca Examinadora

**Lorena - SP- Brasil  
2005**

***Aos meus pais, Afonso e Geralda  
e aos meus irmãos, pelo apoio  
incondicional.***

## **AGRADECIMENTOS**

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Inês Conceição Roberto, não somente pela orientação, mas também pela confiança no meu trabalho, pela desmedida paciência e acima de tudo, pelo aprendizado que este período me proporcionou.

A todos os professores, funcionários e alunos do laboratório e do Departamento de Biotecnologia, que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
2.1. Xilitol.....	15
2.1.1. Principais Aplicações do Xilitol.....	17
2.1.2. Ocorrência e Produção de Xilitol.....	18
2.2. Fatores Importantes na Bioconversão de Xilose em Xilitol em Presença de Compostos Inibitórios .....	21
2.2.1. Concentração Inicial de Células.....	22
2.2.2. pH.....	23
2.3. Materiais Lignocelulósicos .....	24
2.3.1. Palha de Arroz .....	26
2.3.2. Inibidores Presentes no Hidrolisado Hemicelulósico .....	27
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
4.1. Estudo do Cultivo do Inóculo em Meio Semi-Sintético Suplementado com Sais de Fosfato Mono e Di-Básico .....	42
4.1.1. Microrganismo .....	42
4.1.2. Preparo do Inóculo .....	42
4.1.3. Estudo do Efeito da Concentração de Sais de Fosfato no Cultivo do Inóculo ...	43
4.1.4. Condições de Cultivo do Inóculo.....	44
4.2. Influência da Concentração de Sais de Fosfato Mono e Di-Básico na Bioconversão de Xilose em Xilitol .....	44
4.2.1. Preparo do Meio Semi-Sintético para o Processo Fermentativo .....	44
4.2.2. Estudo do Efeito da Concentração de Sais de Fosfato na Bioconversão de Xilose em Xilitol .....	45
4.2.3. Condições de Cultivo do Processo Fermentativo.....	46
4.3. Estudo do Efeito dos Produtos de Degradação de Lignina na Bioconversão de Xilose em Xilitol .....	46
4.3.1. Metodologia Estatística.....	47
4.4. Obtenção e Preparo do Hidrolisado de Palha de Arroz.....	51
4.4.1. Condições de Fermentação do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz.	52
4.5. Métodos Analíticos .....	53
4.5.1. Determinação da Concentração Celular .....	53
4.5.2. Determinação do pH.....	53
4.5.3. Determinação da Concentração de Glicose, Xilose, Arabinose, Xilitol, Glicerol, Ácido acético, e Etanol .....	53
4.5.4. Determinação da Concentração de Furfural e 5-Hidroximetilfurfural .....	54
4.5.5. Determinação da Concentração dos Compostos Fenólicos por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC).....	54
4.5.6. Determinação dos Compostos Fenólicos Totais por Espectrofotometria UV-visível .....	55
4.6. Metodologia de Análise dos Resultados .....	56

<u>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</u>	<u>59</u>
5.1. Estudo do Cultivo do Inóculo em Meio Semi-Sintético Suplementado com Sais de Fosfato Mono e Di-Básico .....	59
5.2. Influência da Concentração de Sais Fosfato Mono e Di-Básico na Bioconversão de Xilose em Xilitol .....	61
5.3. Estudo do Efeito dos Produtos de Degradação da Lignina na Bioconversão de Xilose em Xilitol .....	65
5.4. Análise Estatística dos Efeitos da Concentração de Inibidores, Concentração Inicial de Células e pH sobre a Bioconversão de Xilose em Xilitol .....	80
5.5. Otimização e Confirmação dos Modelos Obtidos.....	91
5.6 Caracterização do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz .....	96
5.7. Ensaio Fermentativo de Bioconversão de Xilose em Xilitol por <i>Candida guilliermondii</i> Cultivada em Hidrolisado de Palha de Arroz .....	98
<u>6. CONCLUSÕES .....</u>	<u>106</u>
<u>7. RECOMENDAÇÕES.....</u>	<u>107</u>
<u>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</u>	<u>108</u>

<u>APÊNDICES.....</u>	
APÊNDICE 1. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR, DE AÇÚCARES, ÁCIDO ACÉTICO, GLICÉROL, ETANOL, FURANOS, COMPOSTOS FENÓLICOS E DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (MÉTODO DE FOLIN MODIFICADO - PADRÃO VANILINA)	
APÊNDICE 2: TABELAS DOS RESULTADOS DE FERMENTAÇÃO, OBTIDOS NOS ENSAIOS EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE ARROZ	
APÊNDICE 3. RESULTADOS DE FERMENTAÇÃO, OBTIDOS NOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 <sup>4</sup>	
APÊNDICE 4. RESULTADOS DE FERMENTAÇÃO, OBTIDOS NOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 <sup>2</sup> COM FACE CENTRADA	

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Propriedades físico-químicas do xilitol. ....	16
Tabela 2.2. Concentração de alguns compostos identificados no pré-hidrolisado de carvalho vermelho e seus efeitos inibitórios na subsequente fermentação de xilose a etanol. ....	30
Tabela 2.3. Escala de inibição relativa dos compostos / extratos para a fermentação a etanol por <i>Z. mobilis</i> CP4(pZB5).....	35
Tabela 4.1. Composição do meio semi-sintético utilizado para crescimento do inóculo. ....	43
Tabela 4.2. Composição do meio semi-sintético utilizado para o processo fermentativo. ....	45
Tabela 4.3. Concentrações dos sais de fosfato (0,6 M), empregados para o tamponamento do meio de fermentação de acordo com os valores de pH propostos pelo planejamento experimental fatorial $2^4$ .....	47
Tabela 4.4. Matriz de planejamento experimental $2^4$ com três repetições no ponto central, utilizada para investigar o efeito das concentrações de vanilina ( $X_1$ ; V) e siringaldeído ( $X_2$ ; S), do pH ( $X_3$ ) e da concentração inicial de células ( $X_4$ ; $X_0$ ), sobre a bioconversão de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i> .....	48
Tabela 4.5. Matriz do planejamento fatorial composto $2^2$ com face centrada e três repetições no ponto central, apresentando os níveis codificados e os reais das variáveis respostas avaliadas, vanilina ( $X_1$ ; V) e siringaldeído ( $X_2$ ; S).....	49
Tabela 5.1. Resultados de $pH_{final}$ , concentração celular final ( $X_{final}$ ), consumo percentual de xilose ( $C_{Xl}$ ), concentração de xilitol ( $P_{XO}$ ), fator de conversão em células ( $Y_{X/S}$ ) e fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ), obtidos com 30 h do cultivo do inóculo em meio com diferentes concentrações de sais de fosfato em pH 5,5. ...	60
Tabela 5.2. Influência das diferentes concentrações dos sais de fosfato, em pH 5,5, sobre os parâmetros fermentativos obtidos durante o cultivo de <i>C. guilliermondii</i> em meio semi-sintético para a obtenção de xilitol.....	65
Tabela 5.3. Matriz do planejamento $2^4$ e resultados experimentais obtidos durante a bioconversão de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 nas diferentes condições de concentração de vanilina (V) e de siringaldeído (S), pH e concentração inicial de células ( $X_0$ ). ....	67
Tabela 5.4. Grau de inibição do crescimento celular ( $GI_X$ ) e da produção de xilitol ( $GI_P$ ) pela vanilina (V) e siringaldeído (S) em diferentes condições de pH e concentração inicial de células ( $X_0$ ), propostas pelo planejamento experimental. ....	71
Tabela 5.5.A. Análise de variância dos efeitos principais de interação dos fatores sobre a produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ) e concentração de xilitol ( $P_{XO}$ ), obtidos durante a realização dos ensaios do planejamento experimental. ....	84
Tabela 5.5.B. Análise de variância dos efeitos principais de interação dos fatores sobre o consumo percentual de xilose ( $C_{Xl}$ ) e fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ), obtidos durante a realização dos ensaios do planejamento experimental. ....	85
Tabela 5.6. Matriz do planejamento experimental completo $2^2$ com face centrada e 3 repetições no ponto central, utilizada para a avaliação da influência da vanilina (V; $X_1$ ) e do siringaldeído (S; $X_2$ ) no consumo percentual de xilose ( $C_{Xl}$ ), na concentração de xilitol ( $P_{XO}$ ), no fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) e na produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ).....	86
Tabela 5.7. Análise de variância de regressão para os modelos representativos do consumo percentual de xilose ( $C_{Xl}$ ), concentração de xilitol ( $P_{XO}$ ), fator de conversão ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ), obtidos durante a realização dos ensaios do planejamento experimental. ....	87

Tabela 5.8. Parâmetros fermentativos obtidos durante os ensaios para a confirmação do modelo otimizado para a bioconversão de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i> , em meio semi-sintético suplementado com 1,6 g/L de vanilina.....	94
Tabela 5.9. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado 6 vezes, utilizado no cultivo de <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037 para obtenção de xilitol.....	97
Tabela 5.10. Resultados de remoção percentual dos compostos inibitórios (furanos e compostos fenólicos) da bioconversão de xilose em xilitol, após tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (concentrado 6 vezes) com carvão ativado.....	97
Tabela 5.11. Resultados da variação do pH, do ácido acético e dos compostos fenólicos, obtidos durante a realização dos ensaios em hidrolisado de palha de arroz concentrado 6 vezes: não tratado (HC), destoxificado com carvão ativado (HDC), destoxificado e suplementado com vanilina (HDV) e meio semi-sintético suplementado com vanilina (MSV), para a obtenção de xilitol por <i>C. guilliermondii</i> . .....	102
Tabela 5.12. Parâmetros fermentativos obtidos na realização dos ensaios para obtenção de xilitol a partir de hidrolisado de palha de arroz não tratado (HC), hidrolisado tratado com carvão ativado (HDC), hidrolisado tratado e suplementado com vanilina (HDV) e meio semi-sintético (MS) e meio semi-sintético suplementado com vanilina (MSV). ....	104

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Modelo molecular do xilitol (software ACD/Chem Sketch vs. 5.0).....	15
Figura 2.2. Esquema simplificado do metabolismo de xilose em leveduras.....	21
Figura 2.3. Unidades poliméricas encontradas na lignina: (A) álcoois e (B) ácidos (adaptado de LIN e DENCE, 1992).....	26
Figura 2.4. Bioconversão da vanilina por <i>S. cerevisiae</i> (adaptado de FITZGERALD <i>et al.</i> , 2003). .....	38
Figura 2.5. Características químicas da vanilina e do siringaldeído (adaptado de www.sigmaaldrich.com e RAGNAR <i>et al.</i> , 2000). .....	40
Figura 5.1. Crescimento celular (A), consumo de açúcares (B), produção de xilitol e etanol (C) e variação de pH (D), durante o cultivo de <i>C. guilliermondii</i> em meio suplementado com diferentes concentrações de sais de fosfato. ....	62
Figura 5.2. Consumo de xilose (A) e produção de xilitol (B) por <i>C. guilliermondii</i> sob as diferentes condições de cultivo apresentadas pelo planejamento experimental 2 <sup>4</sup> utilizado. ....	68
Figura 5.3. Variação das concentrações de vanilina e de álcool vanilil (A e B), de siringaldeído e de ácido siríngico (C e D), durante o cultivo de <i>C. guilliermondii</i> para bioconversão de xilose em xilitol, sob as condições de concentração celular: 1,0 g/L (A e C) e 3,0 g/L (B e D). ....	75
Figura 5.4. Variação da concentração dos aldeídos (vanilina + siringaldeído) e de seus compostos correspondentes, durante o cultivo de <i>C. guilliermondii</i> para a bioconversão de xilose em xilitol, sob as condições de concentração celular: 1,0 g/L (A e C) e 3,0 g/L (B e D). ....	76
Figura 5.5. Resultados de fator de conversão ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ), obtidos nos ensaios do planejamento experimental 2 <sup>4</sup> utilizado para o estudo da influência da vanilina e do siringaldeído na bioconversão de xilose em xilitol por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037. ....	79
Figura 5.6. Estimativas dos efeitos (ao nível de 95% de confiança) através dos gráficos de pareto das variáveis respostas: (A) produtividade volumétrica em xilitol (g/L.h); (B) concentração de xilitol (g/L); (C) consumo de xilose (%) e (D) fator de conversão em xilitol (g/g). ....	82
Figura 5.7. Superfícies de resposta descritas pelos modelos que representam o consumo percentual de xilose (A) e a concentração de xilitol (B), obtidos pelo cultivo de <i>C. guilliermondii</i> em função das concentrações de vanilina e siringaldeído, empregando-se 3,0 g/L de células e pH 5,5. ....	89
Figura 5.7. Superfícies de resposta descritas pelos modelos que representam o fator de conversão de xilose em xilitol (C) e produtividade volumétrica em xilitol (D), obtidos pelo cultivo de <i>C. guilliermondii</i> em função das concentrações de vanilina e siringaldeído, empregando-se 3,0 g/L de células e pH 5,5. ....	90
Figura 5.8. Gráfico de sobreposição utilizado para a otimização das variáveis respostas avaliadas, na região em estudo. ....	93
Figura 5.9. Ensaio fermentativo para produção de xilitol por <i>C. guilliermondii</i> cultivada em meio semi-sintético nas condições otimizadas (1,6 g/L de vanilina, 3,0 g/L de células e pH 5,5).....	94
Figura 5.10. Crescimento celular de <i>C. guilliermondii</i> (A), consumo de açúcares (B) e formação de xilitol e etanol (C), obtidos durante o cultivo em hidrolisado de palha de arroz concentrado 6 vezes (HC: não tratado; HDC: tratado e HDV: tratado e suplementado com vanilina). ....	100

## RESUMO

**Influência dos produtos de degradação da lignina na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii*.** Daniela Vieira Cortez. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Orientador: Dra. Inês Conceição Roberto (Departamento de Biotecnologia, Faenquil, CP 116, 12600-970, Lorena, SP, Brasil). Banca Examinadora: Dra. Heizir Ferreira de Castro e Dr. Arnaldo Márcio de Ramalho Prata. Fevereiro de 2005.

No presente trabalho foi estudado o efeito inibitório dos compostos de degradação da lignina (vanilina e siringaldeído) sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* FTI 20037, cultivada em meio semi-sintético. Numa fase preliminar, foram conduzidos ensaios fermentativos variando-se a concentração de sais de fosfato, visando a manutenção do pH durante o processo de bioconversão. Nesta etapa, a concentração inicial de células foi de 1,0 g/L e o pH inicial do meio de 5,5. Os resultados revelaram que a produção de xilitol pela levedura foi favorecida com o aumento da concentração de fosfato no meio. Com o tempo de 96 h, no meio adicionado de sais de fosfato na concentração de 0,6 M, a concentração de xilitol atingiu o valor máximo de 62,2 g/L, o que correspondeu a um aumento de 42% quando comparado com o meio ausente de sais. Numa segunda etapa, o efeito da vanilina e do siringaldeído (0 a 2,0 g/L), pH (5,5 a 7,0) e concentração celular inicial (1,0 a 3,0 g/L) foram avaliados sobre os parâmetros fermentativos: consumo percentual de xilose ( $C_{Xl}$ ), concentração de xilitol ( $P_{XO}$ ), fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ), de acordo com a metodologia do planejamento experimental. Os resultados revelaram que o siringaldeído influenciou negativamente todas as respostas estudadas, sendo seu efeito inibitório mais pronunciado no maior valor de pH avaliado (7,0). A vanilina teve efeito negativo no consumo da pentose e a sua combinação com o siringaldeído (ambos em 2,0 g/L) influenciou negativamente tanto o consumo da xilose quanto o fator de conversão do açúcar em xilitol. A análise estatística também revelou que o pH apresenta efeito negativo sobre o bioprocessamento, o que demonstra que em pH 5,5 a produção de xilitol é favorecida. Com base nos efeitos observados, realizou-se um planejamento composto com face centrada empregando-se a vanilina e o siringaldeído como variáveis independentes. Nesta etapa as fermentações foram conduzidas em pH 5,5 e com 3,0 g/L de células. Foram obtidos modelos matemáticos quadráticos para  $C_{Xl}$ ,  $P_{XO}$ ,  $Y_{P/S}$  e  $Q_P$ . Nas condições otimizadas foram realizados ensaios que confirmaram a validade dos modelos, obtendo-se como resultados  $C_{Xl} = 94\%$ ,  $P_{XO} = 66,3$  g/L,  $Y_{P/S} = 0,77$  g/g e  $Q_P = 0,69$  g/L.h. Foram também realizadas fermentações em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz sem tratamento, visando comparar o grau de toxicidade do hidrolisado frente aos comportamentos observados nos meios semi-sintéticos. Observou-se que no hidrolisado não tratado (controle), foram obtidos  $Y_{P/S} = 0,47$  g/g e  $Q_P = 0,18$  g/L.h, valores estes aproximadamente 20 e 67% menores do que os obtidos no meio semi-sintético sem inibidores, o que pode ser atribuído à presença de compostos tóxicos no hidrolisado. Utilizando o hidrolisado destoxificado com carvão ativo,  $Y_{P/S}$  foi aumentado para 0,71 g/g, o que confirma a inibição da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* pela presença de compostos tóxicos no hidrolisado, uma vez que o tratamento proporcionou a remoção destes compostos, inclusive da vanilina e do siringaldeído. Com o objetivo de se verificar o efeito de compostos fenólicos no hidrolisado, 1,6 g/L de vanilina (como um composto modelo) foram adicionados ao hidrolisado de palha de arroz destoxificado e não se verificou interferência no fator de conversão de xilose em xilitol, porém a produtividade volumétrica de xilitol foi prejudicada, uma vez que a xilose foi mais lentamente assimilada, o que se sugere que a eficiência de assimilação dos açúcares e nutrientes pela levedura é negativamente influenciada pela presença destes compostos.

## ABSTRACT

In the present work, the toxic effect of the lignin degradation products (vanillin and syringaldehyde) on the xylose-to-xylitol bioconversion in the semi synthetic medium by the *Candida guilliermondii* FTI 20037 was studied. Initially, fermentation assays were performed to evaluate the best potassium phosphate salts concentration as a buffer of the fermentation medium. In this stage, an initial cell concentration of 1.0 g/L and pH 5.5 were employed. The results revealed that the presence of the salts (0.6 M) in the medium favoured the xylitol production after 96 h (it was increased in 42% regarding the medium without salts).

Subsequently, the effects of vanillin and syringaldehyde (0 to 2.0 g/L), pH (5.5 to 7.0) and initial cell concentration (1.0 to 3.0 g/L) on fermentative parameters: xylose consumption, xylitol concentration, yield factor and volumetric productivity, were evaluated by using multivariate statistical approaches. According to statistical analysis, syringaldehyde presented a negative effect on all the analyzed fermentative parameters, being its higher inhibitory effect on the higher evaluated pH value (7.0). The vanillin negatively influenced the pentose consumption. The vanillin - syringaldehyde interaction (both in 2.0 g/L) negatively affected the xylose consumption and the yield factor. The statistical analysis also revealed that pH presents negative effect on the bioprocess, showing that at pH 5.5 the xylitol production is favoured. According to the observed effects, a  $2^2$  - full - factorial centered face design was used, with vanillin and syringaldehyde as independent variables. In this stage, an initial cell concentration of 3.0 g/L and pH 5.5 were employed. Quadratic mathematical models were obtained for all the fermentative parameters previously mentioned. Fermentations assays were carried out under optimal conditions, resulting in xylose consumption of 94%, xylitol production of 66.3 g/L, yield factor of 0.77 g/g and volumetric productivity of 0.69 g/L.h, which validated the model.

In the final stage, fermentations assays were performed with untreated rice straw hydrolysate, aiming to verify the toxicity of this medium regarding the behavior observed in the semi-synthetic medium. In this stage, the same initial cell concentration and pH used under the optimal conditions (3.0 g/L and 5.5, respectively) were employed. As a result, a yield factor of 0.47 g/g and a volumetric productivity of 0.18 g/L.h were obtained, under cultivation of the raw hydrolysate. These values are about 20 and 67% lower than those obtained in the semi-synthetic medium (without toxic compounds), probably due to the presence of toxic compounds in the hydrolysate. When the hydrolysate was treated with active charcoal, a yield factor of 0.71 g/g was obtained, confirming the inhibitory effect of the toxic compounds on the xylose-to-xylitol bioconversion by *C. guilliermondii*, since these compounds (including vanillin and syringaldehyde) were removed. 1.6 g/L of vanillin (model compound) was added to the detoxified hydrolysate to evaluate the effects of phenolic compounds on this medium. As a result, it was verified that vanillin does not interfere in the yield factor, although it affects the volumetric productivity. This suggests that the phenolic compounds have a negative influence on sugars and nutrients assimilation.

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com o uso desordenado dos recursos ambientais bem como o avanço tecnológico dos diversos setores que compõe a economia, tem chamado a atenção no que diz respeito à preservação ambiental, buscando meios eficientes de acondicionamento e até mesmo de reaproveitamento, em alguns casos, dos resíduos provenientes dos processos industriais. Neste contexto encaixam-se os materiais lignocelulósicos, que podem ser encontrados sob a forma de resíduos agrícolas, agroindustriais e florestais.

A xilose é o açúcar predominante da fração hemicelulósica de vários resíduos de materiais lignocelulósicos e sua utilização para geração de produtos de interesse industrial é de fundamental importância no processo global de aproveitamento destes materiais. Dentre os diversos produtos obtidos a partir da bioconversão de xilose destaca-se o xilitol, um produto com poder adoçante similar ao da sacarose e propriedades anticariogênicas, o qual vem sendo utilizado principalmente como adoçante em confeitos não cariogênicos, em alimentos dietéticos, preparações farmacêuticas e em cosméticos.

A utilização dos hidrolisados hemicelulósicos como substratos para bioconversão de xilose em xilitol é dificultada pela presença de compostos tóxicos ao metabolismo microbiano, os quais são provenientes do processo de hidrólise ácida. Tais compostos podem ser divididos em quatro grupos: (1) produtos de degradação dos açúcares, incluindo o furfural e o 5-hidroximetilfurfural; (2) produtos de degradação da lignina, incluindo uma variedade de compostos aromáticos tais como vanilina e seringaldeído; (3) substâncias liberadas da estrutura lignocelulósica durante o pré-tratamento, como ácido acético e extrativos da madeira (resinas ácidas, ácidos tanínicos e terpenos) e (4) metais provenientes da corrosão dos equipamentos de hidrólise, em particular os íons ferro, cromo, níquel e cobre. Os produtos de degradação da lignina têm sido considerados os principais responsáveis pelo efeito inibitório na fermentação de hidrolisados. Tais compostos tendem a limitar a utilização eficaz dos açúcares presentes e conseqüentemente influenciam na formação de produtos. A concentração máxima tolerada de cada inibidor não pode ser estabelecida de uma forma geral, uma vez que é

fortemente dependente de fatores como: (1) microrganismo utilizado e o seu grau de adaptação; (2) condições de cultivo e (3) forma de condução do processo fermentativo. Por esse motivo, o conhecimento do grau de toxicidade destes inibidores e como minimizar os seus efeitos é de extrema importância para alcançar processos fermentativos eficientes.

Estudos para a compreensão do mecanismo envolvido na inibição da atividade fermentativa causada por compostos tóxicos aos microrganismos já vem sendo realizados há vários anos, porém, a literatura não menciona pesquisa quanto ao efeito dos compostos fenólicos provenientes da degradação da lignina durante a etapa de pré-tratamento do material lignocelulósico sobre a bioconversão de xilose em xilitol. Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo estudar o efeito da vanilina e do siringaldeído, escolhidos como compostos representativos dos produtos de degradação da lignina sobre a bioconversão de xilose em xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, sob diferentes condições de cultivo. Tais compostos são considerados pela literatura como potencialmente tóxicos em processos de bioconversão. No presente estudo, foi utilizada a metodologia do planejamento experimental e os resultados foram avaliados com base nos conceitos de estatística multivariada. Foram também realizados ensaios empregando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, visando comparar o grau de toxicidade do hidrolisado frente aos comportamentos observados nos meios semi-sintéticos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Xilitol

O xilitol é um composto orgânico (poliálcool natural de cinco átomos de carbono) de fórmula  $C_5H_{12}O_5$  (1,2,3,4,5 pentahidroxi pentano). Sua molécula possui estrutura aberta e é conhecido como polihidroxiálcool acíclico, ou pentitol, devido a ter cinco grupos OH na molécula, e cada grupo hidroxila se encontrar ligado a um átomo de carbono (Figura 2.1). Sua conformação molecular tem sido proposta como um “zig-zag”, apresentando rotação nas ligações entre  $C_2$  e  $C_3$ , e entre  $C_3$  e  $C_4$ , assim como uma interação entre  $O_2$  e  $O_4$  (MÄKINEN, 2000).

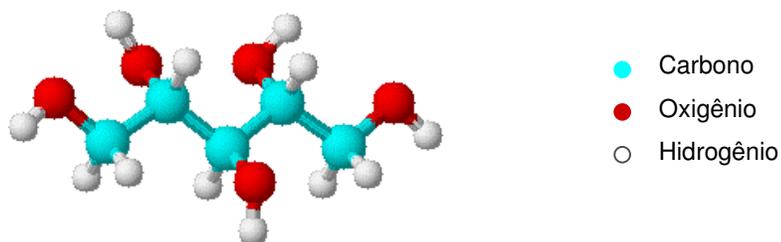


Figura 2.1. Modelo molecular do xilitol (software ACD/Chem Sketch vs. 5.0).

O xilitol possui poder adoçante similar ao da sacarose, sendo 2,4 vezes mais doce que o manitol e 2 vezes mais doce que o sorbitol, podendo esta propriedade variar com o pH, a concentração de sais e a temperatura (Delazari, 1980 citado por AGUIAR *et al.*, 1999). Além de poder adoçante, o xilitol possui propriedades físico-químicas (Tabela 2.1) e fisiológicas importantes, que o coloca como produto em potencial para aplicações em diversos setores industriais. Devido ao seu calor de dissolução negativo (-34,8 cal/g), o xilitol promove um prazeroso efeito refrescante, que é especialmente realçado em sabores de menta. Seu poder de edulcoração é muito semelhante ao da sacarose, ou seja, a mesma quantidade deste ou daquele tem igual efeito nos alimentos (BAR, 1991).

De uma forma geral, o xilitol é extremamente bem tolerado quando administrado oralmente. Estudos clínicos revelaram que o xilitol possui propriedades laxativas, o que deve ser levado em conta quando da sua aplicação em alimentos (EMODI, 1978). De acordo com CULBERT *et al.* (1986), a ingestão de xilitol deve restringir-se a quantidades inferiores às necessárias para a produção do efeito laxativo (cerca de 20 g por dose, ou 60 g por dia se ingerido em várias refeições). Por esta razão, produtos normalmente ingeridos em grandes quantidades, como refrigerantes por exemplo, não utilizam xilitol como adoçante.

Tabela 2.1. Propriedades físico-químicas do xilitol.

Fórmula empírica	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
Massa molar	152,15 g/mol
Aparência	Pó branco, cristalino
Sabor	Doce
Odor	Inodoro
Poder adoçante	Igual à sacarose, superior ao sorbitol e manitol
Ponto de fusão	92 a 96 °C
Ponto de ebulição	216 °C (760 mmHg)
Solubilidade em água a 20°C	64,2 g/100 g de H <sub>2</sub> O
Densidade	1,50
pH (solução aquosa a 5%)	5 a 7
Calor de solução (endotérmico)	-34,8 cal/g
Valor calórico	4,0 kcal/g
Estabilidade	Estável a 120 °C e sob condições normais de processamento de alimentos. A caramelização ocorre somente se aquecido por vários minutos próximo ao ponto de ebulição

FONTE: Adaptado de MANZ *et al.*, 1973

A propriedade anticariogênica do xilitol é relatada como uma das mais relevantes deste polioliol (PEPPER e OLINGER, 1988; MÄKINEN, 1992). A cárie é um processo infeccioso que ocorre devido à presença de bactérias na placa

dentária. As bactérias do gênero *Streptococcus* normalmente presentes na flora bucal, apresentam grande ação cariogênica, uma vez que, em condições ácidas, são capazes de produzir uma grande quantidade de ácido lático, e podem ainda sintetizar polissacarídeos extracelulares, os quais aumentam a adesão da placa dentária na superfície dos dentes (KANDELMAN, 1997). Desta forma, quanto mais cedo estas colônias aparecerem nos dentes, e quanto maior a presença destas colônias na flora bucal, maior o risco de desenvolvimento de cáries.

Segundo MANZ *et al.* (1973) a queda de pH na superfície dos dentes, uma das condições que contribui para o aparecimento de cáries, não ocorre após lavagem bucal com solução de xilitol a 10%, por não haver liberação de ácidos que atacam o esmalte dos dentes. A elevação de pH decorrente do uso da solução de xilitol, torna o ambiente menos favorável ao desenvolvimento das bactérias responsáveis pelo desenvolvimento das cáries.

Atualmente, a eficiência do xilitol na redução do aparecimento de cáries, assim como sua capacidade em reverter estágios iniciais desta mesma lesão, já está clinicamente comprovada (SÖDERLING *et al.*, 2000; ISOKANGAS *et al.*, 2000; MÄKINEN *et al.*, 2001).

### *2.1.1. Principais Aplicações do Xilitol*

De acordo com BAR (1991), o xilitol tem seu uso aprovado em vários países, na manufatura de alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos sendo que sua maior aplicação se encontra na indústria de alimentos, seguido pelas preparações farmacêuticas e cosméticas. No mercado Europeu e na Escandinávia, por exemplo, o xilitol tem sido amplamente utilizado nestes três setores há mais de 20 anos.

A incorporação do xilitol em alimentos é permitida por ser este uma substância atóxica, e portanto, reconhecido como um aditivo do tipo GRAS - Generally Regarded as Safe, pela Food and Drug Administration. A DL<sub>50</sub> em ratos é de 25,7 g/kg de peso corporal, o que corresponde à ingestão diária de quase dois quilogramas para um adulto de 75 kg (AGUIAR *et al.*, 1999).

No mercado já se pode encontrar vários produtos que contêm xilitol em sua formulação, tais como gomas de mascar, balas, confeitos, compotas, caramelos, chocolates, geléias, sobremesas, produtos de confeitaria, pudins, etc., devido ao seu efeito refrescante e sobretudo pela sua ação anticariogênica. Na área de dentifrícios podemos destacar os cremes dentais e soluções para lavagem bucal. Na indústria farmacêutica, o xilitol pode ser empregado como adoçante ou excipiente na formulação de xaropes, tônicos e preparações de vitaminas (BAR, 1991). Em função do relativo alto preço do xilitol, este tem sido normalmente encontrado no mercado em combinação com outros adoçantes que atuam como agente de corpo a esta mistura (MÄKINEN *et al.*, 1998).

Segundo YLIKAHRI (1979), o xilitol pode ser usado no tratamento de pacientes com desordem no metabolismo de glicídeos (Diabetes), desordem no metabolismo de lipídios ou com lesões renais e parenterais. Recentemente, características do xilitol confirmam sua utilização também na prevenção de otites (UHARI *et al.*, 1998), osteoporose (MATTILA *et al.*, 1998 a,b,c), e infecções pulmonares (ZABNER *et al.*, 2000).

### 2.1.2. Ocorrência e Produção de Xilitol

Na natureza, o xilitol pode ser encontrado em muitas frutas, vegetais e cogumelos (*Psalliota campestris*). Entretanto, sua extração diretamente de fontes naturais é um processo antieconômico e impraticável, uma vez que o xilitol é encontrado apenas em pequenas quantidades na natureza (menos que 900 mg/100 g) (WASHÜTTL *et al.*, 1973).

O xilitol também aparece como um produto intermediário durante o metabolismo de carboidratos em mamíferos, inclusive no homem (MANZ *et al.*, 1973; YLIKAHRI, 1979). Um humano adulto produz, por exemplo, entre 5 e 15 g de xilitol por dia durante o metabolismo normal (PEPPER e OLINGER, 1988), e a sua concentração de xilitol no sangue encontra-se na faixa de 0,03 a 0,06 mg/100 mL (MANZ *et al.*, 1973; YLIKAHRI, 1979).

Um processo alternativo à extração do xilitol diretamente de suas fontes naturais é a sua obtenção pela hidrogenação da D-xilose presente em fontes vegetais, o que pode ser realizado por via química (empregando catalisadores metálicos) como no caso do processo comercial (MELAJA e HÄMÄLÄINEN, 1977) ou microbiológica, utilizando microrganismos como catalisadores do processo de redução, conforme relatado em diversos trabalhos em que se utilizam os hidrolisados oriundos da fração hemicelulósica da biomassa vegetal (ROBERTO *et al.*, 1996 a,b; FELIPE *et al.*, 1996, 1997 a,b; DOMINGUEZ *et al.*, 1996; PARAJÓ *et al.*, 1997; CONVERTI *et al.*, 1999).

A produção de xilitol por via química em escala industrial teve início em 1975 na Finlândia, com a Finnish Sugar Co. Ltda., Helsink. O processo baseia-se na utilização de “birch woods” (madeira de pequeno porte, proveniente de uma árvore de tronco fino) e a indústria tem capacidade para produzir cerca de 4.000 ton/ano. Este processo ocorre em reatores a elevada pressão (31 a 40 atm) e temperatura (100 a 130 °C), e requer extensivas etapas de purificação da xilose antes de sua hidrogenação, assim como várias etapas de purificação final do produto para remoção do catalisador (liga de Ni e Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). O processo químico de produção de xilitol possui um tempo de duração de 2 a 5 h, dependendo da temperatura e pressão empregadas, e apresenta um rendimento em xilitol entre 50 e 60% (JAFFE *et al.*, 1974; MELAJA e HÄMÄLÄINEN, 1977).

De acordo com GIMENES *et al.* (2000) o processo fermentativo de produção de xilitol surge como uma alternativa ao processo químico, sendo que não requer a purificação inicial da xilose, pois utiliza enzimas ou microrganismos específicos que atuam somente na conversão de xilose em xilitol, o que leva a um maior rendimento, e conseqüentemente, a uma maior facilidade de separação do produto de interesse. O objetivo de se desenvolver uma tecnologia para a produção de xilitol empregando-se microrganismos é criar uma alternativa de produção deste poliál em grande escala, que seja competitiva ao processo por via química e que apresente custos inferiores.

Segundo OJAMO *et al.* (1987) o xilitol obtido pela hidrogenação catalítica pode conter resíduo tóxico proveniente do catalisador, e subprodutos originados durante o processo de hidrogenação, o que torna a sua purificação ainda mais difícil. Outro problema é que, assim como a xilose é hidrogenada a

xilitol, outros açúcares também são hidrogenados aos seus respectivos álcoois polihídricos, tornando assim um problema a mais na etapa de recuperação e purificação. Sendo assim, a obtenção de xilitol por via química necessita de várias operações de troca-iônica, descoloração e fracionamento cromatográfico, que conseqüentemente geram um aumento no custo de produção (OJAMO *et al.*, 1987).

De uma forma geral, dentre os microrganismos estudados para bioconversão, as leveduras são consideradas os melhores produtores de xilitol, e por isso, estas são citadas na maioria das publicações. É difícil comparar as capacidades produtivas de diferentes leveduras, porém, vários autores relataram que os melhores produtores de xilitol pertencem ao gênero *Candida* (MAYERHOFF *et al.*, 1996; WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998).

Uma vez dentro da célula da levedura, a xilose é reduzida em xilitol pela xilose redutase (aldose redutase EC 1.1.1.21) dependente quer de NADH ou de NADPH. O xilitol, composto relativamente estável, ou é excretado da célula ou oxidado a xilulose pela xilitol desidrogenase (EC 1.1.1.9) dependente de NAD<sup>+</sup> ou NADP<sup>+</sup>. O próximo passo é a fosforilação da D-xilulose a D-xilulose-5-fosfato, catalisada pela xilulosequinase (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998). A Figura 2.2 mostra um esquema simplificado do metabolismo de xilose em leveduras. As primeiras duas reações são consideradas limitantes do metabolismo de xilose. A presença quer de elevadas atividades de xilose redutase (XR) ou baixas atividades de xilitol desidrogenase (XDH) tem sido usada como critério para selecionar os microrganismos produtores de xilitol.

O catabolismo de xilose está intimamente relacionado com as condições ambientais e aos microrganismos em estudo. A literatura apresenta principalmente os fatores: suprimento de oxigênio, concentração de substrato, pH e concentração inicial de células, como as variáveis que influenciam a produção de xilitol no meio de cultivo (PARAJÓ *et al.* 1998 a,b,c; WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998).

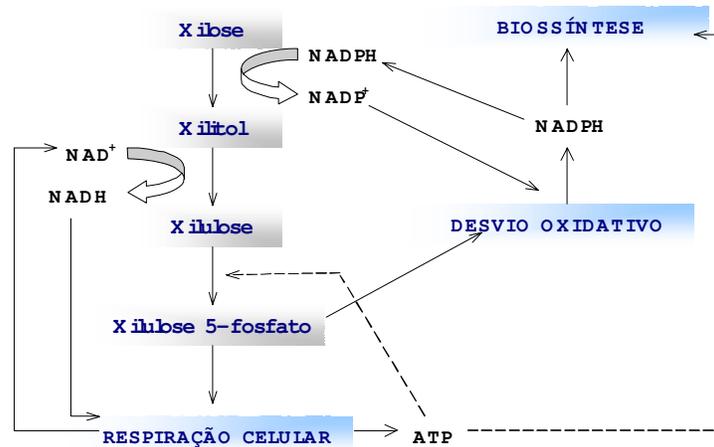


Figura 2.2. Esquema simplificado do metabolismo de xilose em leveduras.

## 2.2. Fatores Importantes na Bioconversão de Xilose em Xilitol em Presença de Compostos Inibitórios

De acordo com PARAJÓ *et al.* (1998 a) a bioconversão de pentoses em poliálcoois é um processo complexo, influenciado por vários fatores, incluindo a cepa, a idade das células, as condições de cultivo e o tipo do meio de fermentação (particularmente sua natureza, como soluções sintéticas ou hidrolisados lignocelulósicos, sendo este último afetado pela presença de outros açúcares e compostos inibitórios).

Segundo ROBERTO *et al.* (1996 b), apesar de muitas espécies de leveduras serem hábeis em converter xilose em xilitol com altos rendimentos em meio contendo xilose comercial como fonte de carbono, esta fermentação pode ser prejudicada em meio formulado com hidrolisado hemicelulósico, uma vez que este é um substrato complexo, que normalmente inclui diferentes compostos que são inibitórios ao metabolismo microbiano. Deste modo, através do uso de condições ambientais apropriadas, tais como o valor do pH inicial e concentração inicial de células, estes efeitos podem ser minimizados.

### 2.2.1. Concentração Inicial de Células

Segundo SILVA (1999) a concentração inicial de inóculo exerce grande influência na bioconversão de xilose em xilitol e é dependente de diversos outros fatores como o tipo de microrganismo, a composição do meio e as condições de fermentação.

FELIPE *et al.* (1996) durante a investigação dos efeitos da concentração inicial de células (1,0 e 3,0 g/L) no cultivo de hidrolisado de eucalipto para a produção de xilitol por *C. guilliermondii*, constataram que o aumento da concentração celular promoveu uma melhora tanto na utilização da xilose quanto na formação de xilitol.

ROBERTO *et al.* (1996 a) também investigaram a concentração celular inicial sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, porém utilizando-se hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz como meio de cultivo. Estes autores observaram que o aumento da concentração celular inicial de 0,67 para 2,41 g/L não favoreceu o consumo de xilose, a formação de biomassa e produção de xilitol, o que segundo eles pode estar relacionado à baixa disponibilidade de oxigênio no meio de cultivo. O mesmo não foi observado por PARAJÓ *et al.* (1997), que durante a avaliação da concentração inicial de células de *Debaryomyces hansenii* Y-7426 cultivadas em hidrolisado de madeira, constataram um aumento no consumo de xilose e formação de xilitol com o aumento da concentração celular. Segundo estes autores, os rendimentos limitados de xilitol em presença de baixas concentrações celulares, poderiam estar relacionados com o desvio da xilose para o crescimento celular.

FELIPE *et al.*, 1997 a, avaliaram a concentração celular inicial de *C. guilliermondii*, porém utilizando-se hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, e ao contrário do observado com hidrolisado de eucalipto, constataram um decréscimo no fator de conversão de xilose em xilitol de 0,75 para 0,62 g/g com o aumento da concentração celular de 0,1 para 3,0 g/L. Neste mesmo trabalho, foi observado um decréscimo de cerca de 40% na concentração de ácido acético e um aumento no pH do meio de cultivo, na presença de 3,0 g/L de células, levando os autores a sugerirem que nestas condições esta levedura agiu como um agente destoxicante do meio, sendo

um aspecto positivo para processos microbiológicos de produção de xilitol utilizando hidrolisado hemicelulósico rico em xilose.

### 2.2.2. pH

De acordo com PARAJÓ *et al.* (1998 b), o valor ótimo de pH depende da levedura adotada para o processo de bioconversão de xilose em xilitol.

ROBERTO *et al.* (1996 b) durante o cultivo de *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz suplementado com sulfato amônio como fonte de nitrogênio, obtiveram em pH 5,3 os melhores valores de conversão (0,68 g/g) e produtividade volumétrica em xilitol (0,51 g/L.h).

FELIPE *et al.* (1997 b) investigaram o efeito do pH na bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037, utilizando como meio de fermentação, hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar tratado com óxido de cálcio. Os autores constataram que a valores de pH menores do que 4,5 o consumo dos açúcares e a produção de xilitol foram totalmente inibidos. Foi observado ainda que a máxima concentração de xilitol (25,9 g/L) foi obtida em pH 5,5, sendo alcançados nestas condições, um fator de conversão de 0,75 g/g e uma produtividade volumétrica em xilitol de 0,57 g/L.h Em fermentações de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar tratado com óxido de cálcio e carvão ativado, MORITA *et al.* (2000) obtiveram valores máximos de fator de conversão e produtividade volumétrica em xilitol (0,79 g/g e 0,56 g/L.h, respectivamente) em pH 7,0, empregando *C. guilliermondii*. Nota-se que a diferença nos tratamentos do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, proporcionou valores similares de fator de conversão e produtividade volumétrica para ambos os autores, porém tais resultados foram obtidos em valores diferentes de pH.

RODRIGUES *et al.* (2003), durante o cultivo de *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana observaram que a máxima produtividade volumétrica de xilitol ( $Q_P = 0,76$  g/L.h) foi obtida em pH 5,5, enquanto que a máxima conversão de substrato em células ( $Y_{X/S} = 0,31$  g/g) ocorreu em pH 7,5. De acordo com os resultados obtidos, os autores concluíram que o valor ótimo de pH para a produção de xilitol por *C.*

*guilliermondii* foi o 5,5, obtendo-se uma concentração do poliálcool de 36,29 g/L e um fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) de 0,64 g/g.

A influência do pH inicial na bioconversão de xilose em xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos é relacionada, em geral, com a presença de ácido acético nestes hidrolisados (ROBERTO *et al.*, 1996 b).

ZALDIVAR *et al.* (1999) avaliaram o efeito do pH na toxicidade de aldeídos aromáticos, 5-hidroximetilfurfural e furfural sobre a produção de etanol por *Escherichia coli* LY 01 e observaram que a toxicidade de todos os compostos (exceto furfural) foi reduzida com o aumento do pH de 6 para 8.

### **2.3. Materiais Lignocelulósicos**

De acordo com KUHAD e SINGH (1993), os materiais lignocelulósicos (bagaço de cana-de-açúcar, palha de arroz, palha de trigo, fibra de milho, dentre outros) por serem fontes renováveis de energia e de baixo custo, são amplamente utilizados como matéria-prima para geração de energia, ração animal e principalmente como fonte de carboidratos para processos de bioconversão.

A composição de um material lignocelulósico varia de uma espécie vegetal para outra, porém são constituídos principalmente por celulose (35-50%), hemicelulose (20-35%) e lignina (10-25%) (SAHA, 2003).

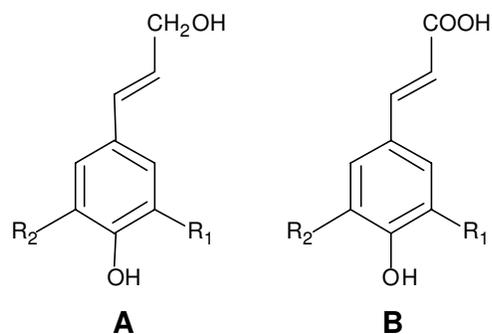
A celulose é um homopolímero linear de unidades repetidas de D-glicose com ligações  $\beta(1\rightarrow4)$ , de elevada massa molar e alta cristalinidade. Sua função na natureza é estrutural, sendo o principal componente da parede do vegetal onde atua como suporte para a membrana celular (KUHAD e SINGH, 1993). A estrutura cristalina do material lignocelulósico constitui um dos principais obstáculos para a sua hidrólise, independente do método de extração empregado (PARISI, 1989).

A hemicelulose está presente em todas as camadas da parede celular do vegetal, porém concentrada nas camadas primárias e secundárias, onde ocorre em associação com a celulose e a lignina (BISARIA e GHOSE, 1981). Sua estrutura não é cristalina, o que facilita sua hidrólise (OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996). Ao contrário da celulose, a hemicelulose apresenta

variações quanto à sua estrutura e composição, sendo constituída de polímeros heterogêneos com cadeias lineares apresentando ramificações laterais. Estes polímeros são compostos basicamente de hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose), pentoses (D-xilose e L-arabinose), ácidos D-glicorônicos e grupos acetila (KUHAD e SINGH, 1993).

A lignina pode ser definida como um material amorfo e polifenólico, originado de uma polimerização desidrogenativa (mediada por enzimas) de três monômeros fenilpropanóides, os álcoois coniferil, sinapil e *p*-coumaril. É um polímero tridimensional desprovido de unidades regulares e repetidamente ordenadas, como encontrado em outros polímeros naturais como a celulose e as proteínas (LIN e DENCE, 1992). Além disto, as ligninas podem ser divididas de acordo com os constituintes da unidade estrutural básica, ou seja, as ligninas G, que possuem unidades guaiacil (grupo metóxi no carbono de posição três do esqueleto fenilpropanóide); as ligninas S, que possuem unidades siringil (o grupo metóxi está localizado nos carbonos três e cinco) e as ligninas GSH, que possuem unidades guaiacil, siringil e unidades de compostos fenilpropanóides não metoxilados (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000 b, SUN *et al.* 2001).

Nas ligninas de coníferas, normalmente referidas como ligninas G, os elementos estruturais são derivados principalmente do álcool coniferil (mais que 95% do número total de unidades estruturais), com o restante consistindo principalmente de unidades do tipo álcool *p*-coumaril e quantidades traços de unidades derivadas de álcool sinapil. As ligninas de angiospermas, chamadas de ligninas GS, são constituídas de unidades de álcool coniferil e álcool sinapil em proporções variadas. As ligninas de gramíneas, classificadas como ligninas GSH, contudo, diferentemente das ligninas de angiospermas, contém adicionalmente pequenas mas significativas quantidades de elementos estruturais derivados do álcool *p*-coumaril, contendo também resíduos de ácido *p*-coumárico e ácido ferúlico ligados no interior da lignina através de ligações éster (LIN e DENCE, 1992; SUN *et al.* 2001). Na Figura 2.3 encontram-se os esquemas representativos das unidades dos álcoois coniferil, sinapil, *p*-coumaril, bem como dos ácidos *p*-coumárico e ferúlico.



Unidade monomérica	Substituintes	
Álcoois	$R_1$	$R_2$
Coniferil	OCH <sub>3</sub>	H
Sinapil	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<i>p</i> -Coumaril	H	H
Ácidos	$R_1$	$R_2$
<i>p</i> -Coumárico	H	H
Ferúlico	OCH <sub>3</sub>	H

Figura 2.3. Unidades poliméricas encontradas na lignina: (A) álcoois e (B) ácidos (adaptado de LIN e DENCE, 1992).

De acordo com SUN *et al.* (2001), vanilina e siringaldeído são compostos provenientes da oxidação das unidades monoméricas guaiacil (álcool coniferil) e siringil (álcool sinapil), respectivamente.

Além dos três componentes majoritários, a parede celular da biomassa vegetal apresenta outros constituintes, em menor proporção, que são classificados como extrativos (ácidos graxos, resinas, taninos, dentre outros) e não extrativos (sílica, oxalatos, carbonatos, dentre outros) que variam suas composições de acordo com a espécie vegetal (KUHAD e SINGH, 1993).

A alta proporção de pentoses na fração hemicelulósica, em especial D-xilose, aliada a sua maior facilidade de extração do complexo lignocelulósico, tem atraído a atenção de pesquisadores para a efetiva utilização desta fração em processos de bioconversão, inclusive para a produção biotecnológica de xilitol à partir de fontes lignocelulósicas (PARAJÓ *et al.*, 1998 c).

### 2.3.1. Palha de Arroz

A palha de arroz é um resíduo agrícola gerado em grandes quantidades por todo o planeta. No Brasil, segundo os dados do IBGE obtidos em novembro de 2004, são esperados para a safra de arroz (em casca) para o ano de 2005,

uma colheita de 3.730.111 hectares (ha) com produção de 12.831.277 toneladas (t) e rendimento médio de 3.447 kg/ha.

Como um exemplo de fonte renovável, a palha de arroz tem sido empregada em uma gama de aplicações como, alimento complementar para rebanho de bovinos e ovinos; cobertura morta para pomares; forragem de baias e como fonte de energia renovável, dentre outros. Quanto ao aspecto energético, de acordo com a resolução CONSEMA nº 002/00, a palha de arroz faz parte do grupo dos combustíveis alternativos ou resíduos normalmente utilizados como combustíveis secundários, podendo ser empregada em termelétricas, em usinas de biomassa e em usinas de briquetagem.

Além destas aplicações, este material lignocelulósico também pode ser utilizado como matéria-prima para a produção biotecnológica de vários produtos de interesse industrial, como por exemplo, o xilitol, devido ao seu elevado conteúdo de pentosanas (ROBERTO *et al.*, 1995; MUSSATTO e ROBERTO, 2003).

Com o intuito de se obter açúcares disponíveis como fontes de carbono para um processo fermentativo, os polissacarídeos constituintes da matéria-prima devem ser hidrolisados aos seus açúcares correspondentes (PARAJÓ *et al.*, 1998 c). Durante os diferentes procedimentos empregados para a hidrólise de materiais lignocelulósicos, podem ser formados ou liberados uma grande variedade de compostos que são tóxicos aos microrganismos fermentativos (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000 b).

### *2.3.2. Inibidores Presentes no Hidrolisado Hemicelulósico*

De acordo com PARAJÓ *et al.* (1998 c), os inibidores contidos nos hidrolisados podem limitar o consumo da fonte de carbono, reduzindo a velocidade de crescimento ou até mesmo impedindo o processo fermentativo. Além disto, os tipos e as quantidades dos componentes tóxicos variam de acordo com a matéria-prima utilizada bem como as condições de hidrólise empregadas.

Segundo OLSSON e HAHN-HÄGERDAL (1996), os inibidores da fermentação de um hidrolisado lignocelulósico podem ser divididos em cinco grupos: 1) as substâncias liberadas durante a pré-hidrólise e hidrólise incluindo o ácido acético (liberado da degradação da estrutura da hemicelulose) e extrativos (terpenos, álcoois e compostos aromáticos tais como taninos); 2) um grupo de sub-produtos (furfural, 5-hidroxiacetilfurfural, ácido levulínico, ácido fórmico e substâncias húmicas) provenientes da degradação dos açúcares durante o processo de pré-hidrólise e hidrólise; 3) os produtos de degradação da lignina também produzidos durante a pré-hidrólise e hidrólise, incluindo uma grande variedade de compostos aromáticos e poliaromáticos com uma variedade de substituintes e 4) os metais liberados do equipamento de hidrólise e aditivos, tais como, SO<sub>2</sub>.

De uma forma geral, não pode ser estabelecida a concentração máxima tolerada de cada inibidor presente no meio, uma vez que esta é fortemente dependente de fatores como o microrganismo a ser utilizado e o seu grau de adaptação, o processo fermentativo empregado e a presença simultânea de vários outros inibidores (PARAJÓ *et al.*, 1998 c).

A obtenção de um modelo otimizado de um processo fermentativo somente será conseguida mediante um entendimento dos mecanismos inibitórios dos compostos individuais e seus efeitos de interação, bem como a influência dos parâmetros ambientais (por exemplo, pH, concentração inicial de células, concentração do composto inibitório e temperatura, dentre outros fatores), não deixando de considerar as taxas de bioconversão e a resposta adaptativa do microrganismo aos compostos tóxicos. (PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000 b). Com este intuito, vários estudos têm sido desenvolvidos para a identificação dos compostos inibitórios dos hidrolisados hemicelulósicos, sendo que o conhecimento a respeito destes e como minimizar seus efeitos é de grande importância para que se realize um processo fermentativo com grande eficiência (OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996; PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL, 2000 b).

Deste modo, vários trabalhos da literatura a respeito do efeito de compostos inibitórios sobre diferentes processos de bioconversão bem como seus possíveis mecanismos de ação, serão apresentados a seguir, de forma

cronológica, dando ênfase aos produtos de degradação de lignina, que são os alvos desta linha de pesquisa:

PFEIFER *et al.* (1984) estudaram a influência dos principais produtos provenientes da degradação da biomassa na fermentação de glicose em etanol por *Saccharomyces carlsbergensis* W34. Para isto, os compostos modelos (furfural, 5-hidroximetilfurfural, diidroxiacetona, gliceraldeído, metilglioxal, celobiose, fenol e vanilina - como compostos de referência dos produtos de degradação da lignina) foram adicionados ao meio fermentativo em quantidades que variaram de 1 a 20 mg/mL. Pelos resultados obtidos constataram que celobiose, diidroxiacetona e gliceraldeído mostraram pouco ou nenhum efeito na bioconversão de glicose em etanol, porém, 5-hidroximetilfurfural, furfural, metilglioxal e os compostos de lignina (vanilina e fenol) inibiram decisivamente a fermentação numa faixa de 1 a 10 mg/mL, tendo a vanilina apresentado um marcante efeito inibitório numa concentração de 5 mg/mL.

CLARK e MACKIE (1984) realizaram um estudo sistemático do hidrolisado de madeira (*Pinus radiata*) na tentativa de definir as fontes de inibição, utilizando como sistema fermentativo modelo, fermentação etanólica com levedura de panificação. Os resultados indicaram que uma série de compostos fenólicos de baixa massa molecular, relacionados em estrutura às “cetonas de Hibberts”, devem ser identificados como os materiais mais inibitórios. Estes compostos baseados na lignina, apesar de presentes em menores níveis comparados com os compostos de degradação dos carboidratos, são aproximadamente dez vezes mais inibitórios.

TRAN e CHAMBERS (1985) identificaram e estudaram alguns dos inibidores provenientes de carvalho vermelho, por meio da adição de compostos modelos derivados da hemicelulose, lignina e extrativos da madeira, na fermentação de xilose em etanol por *Pichia stipitis* CBS 5776. Para isto, foram avaliados os compostos: furfural e ácido acético (como compostos modelos da degradação da hemicelulose); vanilina, siringaldeído, ácido vanílico e ácido siríngico (como compostos modelos da lignina) e os ácidos palmítico, capríco, caprílico e pelargônico (como extrativos), sendo cada um dos compostos adicionado em solução contendo 50 g/L de xilose e nutrientes. Na Tabela 2.2 estão apresentados a determinação quantitativa de alguns dos

compostos encontrados no pré-hidrolisado de carvalho vermelho bem como os resultados de inibição da produção de etanol à partir de xilose pelos compostos modelos testados.

Tabela 2.2. Concentração de alguns compostos identificados no pré-hidrolisado de carvalho vermelho e seus efeitos inibitórios na subsequente fermentação de xilose a etanol.

Composto	Concentração (g/L)	Quantidade testada (g/L)	Etanol (g/L)
Controle	-	-	22,3
Furfural	1,32	1,30	20,2
Ácido acético	12,14	11,92	5,4
Vanilina	0,086	0,091	10,2
Siringaldeído	0,213	0,220	6,2
Ácido vanílico	0,084	0,080	16,7
Ácido siríngico	0,092	0,082	19,9
Ácido capróico	0,022	0,021	19,4
Ácido caprílico	0,019	0,021	18,3
Ácido pelargônico	0,014	0,015	17,4
Ácido palmítico	0,016	0,015	21,9

FONTE: TRAN e CHAMBERS, 1985

Quanto à inibição da produção de etanol, foi observado que o ácido acético foi menos tóxico do que o furfural, o siringaldeído foi menos tóxico do que a vanilina e o ácido siríngico foi menos tóxico do que o ácido vanílico. Assim, os autores constaram que o grupo metoxil adicional reduz a toxicidade e os ácidos aromáticos são menos tóxicos do que os aldeídos correspondentes, ainda sugeriram que os efeitos inibitórios são cumulativos devido a toxicidade de cada composto estudado.

ANDO *et al.* (1986) avaliaram quantitativamente os monômeros aromáticos provenientes de álamo tratado por explosão à vapor, e estudaram suas influências na fermentação a etanol pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os autores observaram que a maioria dos compostos inibiu a fermentação mas o grau de inibição dependeu fortemente dos grupos funcionais ligados ao anel benzênico, assim estimaram o potencial inibitório

para cada grupo funcional como: CH=CH (+3,0) > CHO (+1,5) > *p*-OH (+1,0) > COOH (+0,5) > *m*-OH (0) > OCH<sub>3</sub> (-1,0). Logo, o potencial inibitório total do composto (soma dos potenciais inibitórios de seus grupos funcionais) dá a intensidade inibitória dele na fermentação.

TRAN e CHAMBERS (1986) investigaram a fermentabilidade de manose em butanodiol, para identificar os efeitos inibitórios dos compostos derivados de lignina e extrativos de pré-hidrolisado de pinho. Foi observado que todos os compostos modelos de lignina testados exibiram efeitos inibitórios na fermentação. Segundo os autores, a vanilina foi o composto modelo que apresentou o menor efeito inibitório e ainda, sugeriram que os compostos com substituinte hidroxila na posição três do anel aromático (aldeído protocatecólico e ácido protocatecólico) ou ligações duplas em cadeias laterais (álcool coniferil), podem ter diferentes mecanismos inibitórios e são mais inibitórios do que os compostos com grupos 3-metóxi (vanilina e ácido vanílico) ou ligações simples nas cadeias laterais (álcool di-hidroconiferil) ou sem qualquer grupo na posição três do anel aromático (ácido *p*-hidroxibenzóico). Ainda de acordo com estes autores, os compostos modelos de lignina apresentam toxicidade cumulativa maior do que sinérgica.

NISHIKAWA *et al.* (1988) identificaram quatro potenciais inibidores (5-hidroximetilfurfural, furfural, vanilina e siringaldeído) na fração hemicelulósica de álamo (obtida através do tratamento à vapor da matéria-prima), utilizada como substrato para crescimento e produção de 2,3-butanodiol por *Klebsiella pneumoniae* (em batelada alimentada). Objetivando determinar o efeito inibitório causado por tais compostos, o microrganismo foi crescido em meio adicionado de 5-hidroximetilfurfural (0 a 5,0 g/L) e dos demais compostos (0 a 0,8 g/L). O período de incubação foi de 24 e 48 h. Foi constatado que após 24 h o furfural, numa faixa de concentração de 0,2 a 0,4 g/L, promoveu uma queda drástica tanto no crescimento quanto na produção do solvente; 5-hidroximetilfurfural inibiu em concentrações maiores que 1,0 g/L. Nos meios adicionados com vanilina ou siringaldeído, a inibição se mostrou mais gradual com o aumento da concentração, sendo que no primeiro caso o efeito inibitório teve comportamento linear (entre 0,1 e 0,8 g/L); no último caso o efeito foi menos pronunciado (no intervalo de 0,1 a 0,6 g/L). Após 48 h de incubação, as culturas provenientes do meio adicionado com vanilina recuperaram quase que

completamente a capacidade de formação do 2,3-butanodiol, em todas as concentrações testadas. Siringaldeído foi tóxico à concentrações maiores que 0,6 g/L, contudo, a produção do solvente foi recuperado a concentrações menores que 0,5 g/L. Em presença de furfural a recuperação não foi significativa e no caso do 5-hidroximetilfurfural, foi pouco significativa em concentrações menores que 4,0 g/L. Quando os compostos testados foram combinados binariamente, foi observado que a única combinação que não mostrou inibição sinérgica significativa foi 5-hidroximetilfurfural - furfural, contudo, o nível de inibição não diferiu nitidamente das demais combinações.

VAN ZYL *et al.* (1988) identificaram os principais compostos inibitórios que retardavam a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol por *P. stipitis*. Para a determinação dos compostos derivados de lignina, o hidrolisado foi submetido a uma extração com dietileter e de acordo com os resultados obtidos, os autores identificaram a presença de 0,4 g/L de ácido *p*-coumárico, 0,6 g/L de ácido vanílico, vanilina e ácido ferúlico e 0,8 g/L de glicosídeos, sendo tais compostos testados, através da suplementação em meio semi-sintético, nas mesmas concentrações encontradas no hidrolisado e os resultados foram comparados com os valores obtidos de uma fermentação controle (ausente destes inibidores). Através dos resultados obtidos, os autores observaram que o rendimento em etanol foi o mesmo tanto para o meio suplementado quanto para o controle. Também foi verificado que em presença dos inibidores, a xilose não foi totalmente assimilada, além de ter sido constatado aumento no tempo de fermentação com conseqüente diminuição na produtividade volumétrica de etanol.

EDLIN *et al.* (1995) estudaram a assimilação de compostos fenólicos simples como fontes de carbono para o crescimento de *Brettanomyces anomalus*. Para tal, os substratos fenólicos (vanilina, ácido sinápico, ácido caféico, eugenol, ácido *p*-coumárico, ácido vanílico, ácido ferúlico, ácido cinâmico e ácido benzóico) foram adicionados em meio semi-definido obtendo uma concentração final de 2 mM. Os autores observaram que a vanilina foi o único composto fenólico que não inibiu o crescimento do organismo e ainda, foi constatada a presença de ambos, álcool vanilil e ácido vanílico, sendo o primeiro em maior concentração. De acordo com estes autores, estas reações são catalisadas por enzimas oxiredutases e requerem um doador / receptor de

elétrons tais como  $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$  ou  $\text{FAD}^+ / \text{FADH}$ . Contudo, é pouco conhecido o modo de ação destas enzimas responsáveis pelo metabolismo destes compostos fenólicos.

FELIPE *et al.* (1995) avaliaram o efeito do ácido acético na fermentação de xilose por *C. guilliermondii* FTI 20037. Para isto, utilizaram meio semi-sintético contendo diferentes concentrações do ácido (0,0, 0,5, 1,0, 3,0, 6,0 e 12,0 g/L). Os autores constataram que o aumento da concentração do ácido até 1,0 g/L levou a um favorecimento no fator de conversão e na produtividade de xilitol (14 e 16%, respectivamente). Além disto, foi observado que a levedura foi capaz de assimilar o ácido juntamente com os açúcares, sendo completamente consumido em concentrações menores que 3,0 g/L, sugerindo que nas condições em estudo, *C. guilliermondii* age como agente de destoxificação do meio. Ainda de acordo com estes autores, há variações nos níveis de tolerância ao ácido acético e estas variações devem ser atribuídas às diferentes espécies de microrganismos avaliados e às condições experimentais adotadas, especialmente com relação ao pH de fermentação. O efeito tóxico do ácido acético é aumentado por baixos valores de pH no meio devido a entrada do ácido em sua forma não dissociada, no interior da célula. A difusão do ácido acético para dentro da célula, especialmente sob estas condições, deve induzir a acidificação do citoplasma, resultando na perda da capacidade da produção de energia e do transporte de vários nutrientes.

DELGENES *et al.* (1996) estudaram os efeitos dos produtos de degradação de lignocelulose na fermentação de glicose e xilose por *S. cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *P. stipitis* e *Candida shehatae*. Os compostos tóxicos (furaldeído, acetato, 5-hidroximetilfuraldeído, vanilina, hidroxibenzaldeído e siringaldeído) foram adicionados em concentrações que variaram de 0,2 a 15,0 g/L e foram quantificados como inibidores do crescimento e da produção de etanol. Segundo os resultados obtidos, as fermentações foram significativamente afetadas pela presença dos produtos de decomposição da lignocelulose e o grau de inibição dos compostos testados dependeu da natureza e concentração dos inibidores bem como do tipo de microrganismo. Além disto, foi constatado que para as quatro cepas testadas, vanilina foi o mais poderoso inibidor e também foi observado que alguns dos inibidores (particularmente vanilina e furaldeído) puderam ser metabolizados

pelos organismos fermentadores durante um período de incubação mais prolongado, resultando na remoção dos materiais tóxicos e na recuperação parcial tanto do crescimento como da produção de etanol.

LOPEZ-MALO *et al.* (1997) investigaram os efeitos: temperatura (10 a 30 °C), pH (3,0 a 4,0) e concentração de vanilina (350 a 1200 ppm) durante o crescimento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* e *Aspergillus parasiticus*, utilizando-se para tal, um meio de crescimento de dextrose de batata com atividade de água ( $a_w$ ) ajustada para 0,98. Foi constatado que as condições inibitórias (onde não houve crescimento após 30 dias) dependeram do tipo de fungo e ainda, *A. niger*, a espécie mais resistente, foi inibida a 15 °C, pH 3,0 e 1000 ppm de vanilina. Para *A. ochraceus* (a mais sensível), as condições inibitórias foram 500 ppm, pH 3,0 e T• 15 °C. Os autores concluíram que a vanilina pode ser usada como um agente antimicrobiano para a prevenção da degradação de alimentos por fungos, em processos que combinem efeitos de preservação como atividade de água ( $a_w$ ) reduzida, pH e temperatura de estocagem.

PREZIOSI-BELLOY *et al.* (1997) avaliaram a bioconversão do hidrolisado de álamo por *Candida parapsilosis*, para a produção de xilitol. No hidrolisado, obtido por auto-hidrólise por explosão à vapor, foram encontrados entre os açúcares (xilose, glicose e manose), inibidores (ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural, vanilina e siringaldeído), sendo estes últimos avaliados para a determinação de seus efeitos sobre o metabolismo da levedura. Para este propósito foram preparados meios semi-sintéticos suplementados com os compostos (em concentrações proporcionais as encontradas no hidrolisado). Neste trabalho, os autores constataram que independente do composto testado, os açúcares foram completamente assimilados e foram observados crescimento celular, produção de xilitol e etanol. Ainda, observaram que as fermentações em presença de vanilina (0,1 g/L) e siringaldeído (0,1 g/L) tiveram o mesmo perfil, obtendo resultados de conversão e produtividade em xilitol similares aos encontrados no ensaio controle (não suplementado com inibidor), ou seja, cerca de 0,50 g/g e 0,70 g/L.h, respectivamente. A assimilação de ácido acético (2,9 g/L) interferiu no consumo da glicose, sendo necessárias 18 h para o consumo da glicose residual (< 5,0 g/L). Ao contrário do observado nos meios suplementados com apenas um dos inibidores,

quando todos eles foram adicionados no meio fermentativo, não houve crescimento celular, o que levou os autores a suporem que eles agem cumulativamente para inibir a atividade microbiana, interferindo no consumo de açúcares ou de outros elementos essenciais.

RANATUNGA *et al.* (1997) identificaram alguns componentes, encontrados no hidrolisado de serragem (composto por carvalho vermelho, carvalho branco e álamo amarelo, na proporção 1:1:1), que poderiam promover a inibição da bactéria recombinante *Z. mobilis* CP4(pZB5) durante a fermentação de xilose para a obtenção de etanol. Neste estudo foram identificados no hidrolisado os compostos: ácido gálico, 5-hidroximetilfurfural, vanilina, ácido protocatecólico, siringaldeído, furfural, álcool coniferil, ácido sinápico e ácido capróico. Após a identificação dos possíveis compostos inibitórios, os mesmos e um alcalóide (glaucina) foram avaliados individualmente com o intuito de se determinar seus efeitos tóxicos na produção de etanol pela bactéria. Os resultados indicaram que dentre os compostos analisados, os de maior efeito inibitório foram o ácido acético (o mais tóxico), o ácido capróico, o furfural, seguidos da vanilina e siringaldeído. A partir dos resultados, os autores classificaram os inibidores, identificados de acordo com seus graus de inibição, sendo apresentados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3. Escala de inibição relativa dos compostos / extratos para a fermentação a etanol por *Z. mobilis* CP4(pZB5).

Grau de inibição			
Fraco	Moderadamente fraco	Moderadamente forte	Forte
	Álcool coniferil	Ácido capróico	
Ácidosinápico	Ácido gálico	Furfural	Ácido acético
Ácido siríngico	Glaucina	Siringaldeído	Extrativos de carvalho
Ácido vanílico	5-Hidroximetilfurfural	Vanilina	
	Ácido protocatecólico	Extrativos de álamo-amarelo	

FONTE: Adaptado de RANATUNGA *et al.*, 1997

LEE *et al.* (1999) investigaram os efeitos dos produtos provenientes da degradação dos açúcares e da lignina durante o pré-tratamento (explosão à vapor) de carvalho para a produção de etanol por *S. cerevisiae*. Os autores constataram que os produtos de degradação dos açúcares (5-hidroximetilfurfural, furfural e ácido levulínico) foram muito menos inibitórios do que os produtos de degradação da lignina (ácido *p*-hidroxibenzóico, vanilina, siringaldeído, ácido vanílico, ácido siríngico, dentre outros). A vanilina, numa faixa de concentração de 1 a 2,5 g/L, promoveu nos estágios iniciais da fermentação uma fase de latência, porém, o processo foi recuperado obtendo-se ao final, os mesmos resultados obtidos no controle. Contudo, acima de 3,0 g/L a toxicidade não foi contornada. Siringaldeído se mostrou menos tóxico do que vanilina. Também foi observado que os ácidos aromáticos foram menos tóxicos do que seus correspondentes aldeídos.

ZALDIVAR *et al.* (1999) investigaram a toxicidade dos aldeídos representativos (furfural, 5-hidroximetilfurfural, 4-hidroxibenzaldeído, siringaldeído e vanilina) como inibidores do crescimento e da produção de etanol por bactérias etanologênicas derivadas de *Escherichia coli* B (cepas KO11 e LY01). Os autores observaram que furfural foi mais tóxico do que o 5-hidroximetilfurfural e dos aldeídos aromáticos, 4-hidroxibenzaldeído foi o mais tóxico seguido pela vanilina e pelo siringaldeído. Além disto, foi observado que as toxicidades de todos os aldeídos, exceto furfural, foram aditivas quando testadas em combinações binárias (50% de inibição no crescimento). Furfural e os aldeídos combinaram de forma sinérgica e causaram mais que 75% de inibição no crescimento. Finalmente foi constatado que a danificação da integridade da membrana não é o principal mecanismo de inibição do crescimento por furanos e aldeídos aromáticos.

ZALDIVAR e INGRAM (1999) investigaram a toxicidade dos ácidos aromáticos derivados da lignina (ácidos ferúlico, gálico, 4-hidroxibenzóico, siríngico e vanílico), do ácido acético proveniente da hidrólise da acetilxilana e de outros derivados da degradação dos açúcares (ácidos furóico, fórmico, levulínico e capróico) na fermentação à etanol pela bactéria etanologênica *E. coli* LY01. Os autores observaram que a toxicidade foi relacionada à hidrofobicidade e não à danificação da membrana, além disto, foi constatado que as combinações dos ácidos foram bruscamente aditivas na inibição do

crescimento celular. Foi observado também que quando os compostos foram testados em concentrações que promoveram 80% de inibição no crescimento, estes ou estimularam (ácidos acético, levulínico e vanílico) ou causaram somente uma modesta inibição na produção de etanol, durante 30 min de incubação das células em tampão contendo xilose e o agente teste. Finalmente foi constatado que, ao contrário dos aldeídos, a toxicidade dos ácidos orgânicos foi nitidamente afetada pelo pH inicial, o que pode ser explicada pelo colapso de gradientes iônicos e o aumento da concentração iônica no interior das células.

TANAKA e HIROKANE (2000) isolaram, a partir de húmus, uma bactéria (*Burkholderia cepacia* TM1) que pode oxidar eficientemente alguns aldeídos aromáticos e investigaram a produtividade dos ácidos formados nas reações em batelada, com o intuito de avaliar algumas condições operacionais chaves necessárias para uma produção contínua. Para tal, os ensaios foram conduzidos com vanilina, siringaldeído e ácido *p*-hidroxibenzóico (em concentrações que variaram de 1,0 a 5,0 g/L), como fontes de carbono. Foi constatado que o consumo de vanilina foi favorecido com o aumento da concentração celular (dentro da faixa empregada nos experimentos, ou seja, de 0,4 a 5,0 g/L de células). A máxima concentração produzida de ácido vanílico foi obtida quando aproximadamente 3,0 g/L de vanilina foram utilizadas; acima desta concentração a produção foi negativamente afetada. O mesmo comportamento foi observado nos dois outros compostos avaliados. Além disto, os autores observaram que a taxa de consumo do siringaldeído e a produção do ácido siríngico foram mais lentas quando comparados com os outros compostos.

ZALDIVAR *et al.* (2000) examinaram os efeitos individuais e em combinações binárias de seis álcoois aromáticos (catecol, álcool coniferil, guaiacol, hidroquinona, metilcatecol e álcool vanilil) e álcool furfuril, na produção de etanol à partir de xilose pela bactéria etanologênica *E. coli* LY01. Foi constatado que os álcoois inibiram a produção de etanol através da inibição do crescimento. Em combinação binária, o grau de inibição do crescimento foi rigorosamente aditivo para a maioria dos compostos testados (quando empregada menor concentração de inóculo). As combinações com álcool furfuril e furfural (furaldeído) apresentaram efeito sinérgico, aumentando

assim a toxicidade. Além disto, foi constatado que a toxicidade dos compostos em estudo estava diretamente relacionada à hidrofobicidade dos mesmos, porém, a danificação da membrana apresentou ser um fator mais importante para a toxicidade dos álcoois que dos ácidos ou aldeídos.

FITZGERALD *et al.* (2003) determinaram a efetividade da vanilina como um agente antimicrobiano contra três leveduras associadas com apodrecimento de alimentos, *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailli* e *Zygosaccharomyces rouxii*, com o intuito de verificar o destino do composto adicionado ao meio de cultura e estabelecer suas propriedades antimicrobianas (e de seus metabólitos), para seu posterior uso como conservante potencial para alimentos. As concentrações mínimas inibitórias (MIC) foram determinadas para cada levedura sendo, para *S. cerevisiae*: 21 mM (3,20 g/L), para *Z. bailli*: 20 mM (3,04 g/L) e para *Z. rouxii*: 13 mM (1,98 g/L). Pelos resultados obtidos, observou-se que álcool vanilil foi identificado como o maior produto de bioconversão da vanilina, porém também foram detectados baixos níveis de ácido vanílico (reações estas apresentadas na Figura 2.4 que segue), o que faz com que a efetividade antimicrobiana do aldeído seja influenciada.

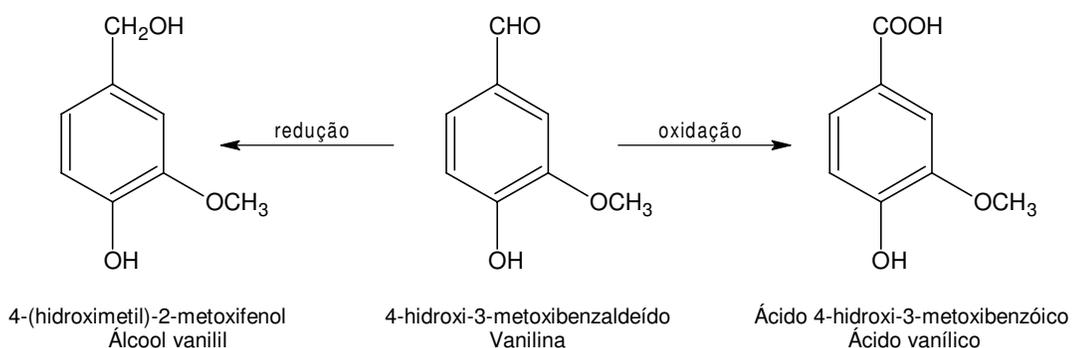


Figura 2.4. Bioconversão da vanilina por *S. cerevisiae* (adaptado de FITZGERALD *et al.*, 2003).

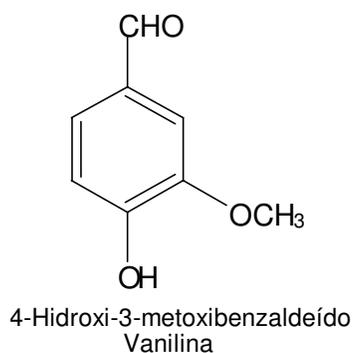
Ainda segundo FITZGERALD *et al.* (2003), nem o álcool vanilil nem o ácido vanílico foram encontrados como antagonísticos ao crescimento celular, o que indica que a bioconversão da vanilina (a níveis inferiores a MIC) em produtos sem atividade antimicrobiana seria benéfico à levedura. Estas atividades de bioconversão, presumivelmente catalisadas por desidrogenases não específicas, foram encontradas expressadas constitutivamente.

KLINKE *et al.* (2003) estudaram os inibidores potenciais obtidos à partir da oxidação úmida de palha de trigo e seus efeitos na produção de etanol por *S. cerevisiae*. Nove fenóis (4-hidroxibenzaldeído, vanilina, siringaldeído, 4-hidroxiacetofenona, acetovanilona, acetosiringona, ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico e ácido siríngico) e ácido 2-furóico, identificados como presentes no hidrolisado, foram cada um, testados em concentrações que variaram de 50 a 100 vezes a concentração encontrada no hidrolisado, ou seja, a 10 mM. A influência dos compostos foi estudada em um meio definido e no hidrolisado de palha de trigo. Os autores observaram que em meio definido a adição de 4-hidroxibenzaldeído, vanilina, 4-hidroxiacetofenona e acetovanilona causaram um decréscimo de 53 a 67% na produtividade volumétrica em etanol (quando comparado ao controle); ácido 4-hidroxibenzóico, ácido vanílico e ácido siríngico bem como ácido 2-furóico, siringaldeído e acetosiringona, foram menos inibitórios. Pela adição dos mesmos compostos ao hidrolisado observou-se que siringaldeído e acetovanilona interagiram negativamente com os componentes do hidrolisado, causando um drástico decréscimo na produtividade em etanol, quando comparados ao meio definido. Foi observado também que, após 6 h de fermentação no meio adicionado com 10 mM de fenóis, os aldeídos foram assimilados e seus correspondentes álcoois (4-hidroxibenzilálcool, álcool vanilil e álcool siríngil) foram encontrados.

FITZGERALD *et al.* (2004) investigaram o modo de ação da vanilina com relação a sua atividade antimicrobiana contra *E. coli*, *Lactobacillus plantarum* e *Listeria innocua*. Os autores determinaram a concentração mínima inibitória (MIC) para os microrganismos sendo estas, 15 mM (2,28 g/L), 75 mM (11,41 g/L) e 35 mM (5,33 g/L), respectivamente. Foi ainda constatado que a atividade antimicrobiana da vanilina foi dependente do tempo de exposição, bem como da sua concentração e do organismo alvo. Além disto, foi observado que a atividade inibitória da vanilina reside principalmente na sua habilidade em

afetar danosamente a integridade da membrana citoplasmática, com resultante perda de gradientes de íons, pH de homeostase e inibição da atividade respiratória. Os autores também observaram que o grau de danificação da membrana mostrou-se sub-letal na maioria das células dentro de uma população microbiana inibida; na MIC o composto exerceu ação bacteriostática de inibição, ao contrário da maioria dos antimicrobianos fenólicos potentes, tais como carvacrol e timol, que são bactericidas.

As estruturas dos compostos inibitórios, vanilina e siringaldeído, encontram-se na Figura 2.5.



Formula molecular:  $C_8H_8O_3$

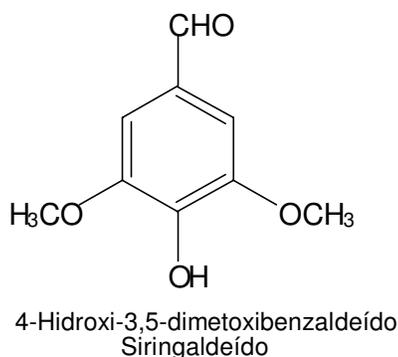
Massa molecular: 152,15 g/mol

Ponto de ebulição: 170°C (15 mmHg)

Ponto de fusão: 81-83°C

Pressão de vapor: > 0,01 mmHg (25°C)

pKa: 7,40



Formula molecular:  $C_9H_{10}O_4$

Massa molecular: 182,17 g/mol

Ponto de ebulição: 192-193°C (14 mmHg)

Ponto de fusão: 110-113°C

pKa: 7,34

Figura 2.5. Características químicas da vanilina e do siringaldeído (adaptado de [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com) e RAGNAR *et al.*, 2000).

### 3. OBJETIVOS

#### Geral

O presente trabalho visa avaliar a influência dos produtos de degradação de lignina na bioconversão de xilose em xilitol, pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037.

#### Específicos

- Determinar a concentração de sais de fosfato de potássio mais adequada para manter o pH constante durante o processo fermentativo;
- Investigar o efeito do pH, da concentração de inibidores (vanilina e siringaldeído) e da concentração inicial de células, sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* em meio semi-sintético, com auxílio de um planejamento estatístico;
- Determinar as condições ótimas de fermentação em meio semi-sintético e estabelecer um modelo matemático que correlacione as respostas obtidas com as variáveis significativas do processo, empregando a metodologia da superfície de resposta;
- Realizar ensaios fermentativos em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz visando comparar o grau de toxicidade do hidrolisado frente aos comportamentos observados nos meios semi-sintéticos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Estudo do Cultivo do Inóculo em Meio Semi-Sintético Suplementado com Sais de Fosfato Mono e Di-Básico

#### 4.1.1. Microrganismo

O microrganismo utilizado no presente trabalho foi a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, da coleção de culturas do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos DEBIQ/FAENQUIL, selecionada para produção de xilitol (BARBOSA, *et al.*, 1988). A cultura foi repicada em tubos de ensaio contendo ágar malte inclinado. Após incubação dos tubos em estufa a 30 °C por 24 h, os mesmos foram conservados em geladeira a 4 °C para posterior preparo do inóculo.

#### 4.1.2. Preparo do Inóculo

Células de *C. guilliermondii*, recém repicadas em meio de manutenção, foram transferidas em condições assépticas, com auxílio de uma alça de platina, para tubos de ensaio contendo cerca de 5 mL de água destilada esterilizada. Alíquotas de 1 mL desta suspensão foram transferidas para frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio de cultivo descrito na Tabela 4.1. Os frascos foram incubados a 30 °C em agitador metabólico a 200 rpm durante 30 h. Após este período, as células foram separadas por centrifugação a 2000xg por 20 min e ressuspensas em água destilada esterilizada, após várias lavagens de forma a se obter uma suspensão celular densa. A partir desta suspensão foi calculado o volume necessário para fornecer a concentração celular inicial desejada no meio de fermentação, para cada ensaio.

Para o preparo do meio de cultura foram utilizadas soluções concentradas de cada componente, as quais foram preparadas separadamente e autoclavadas a 112 °C por 15 min (xilose: 40% e glicose: 15%) e 121 °C por

20 min (cloreto de cálcio diidratado: 1%, extrato de farelo de arroz e sulfato de amônio: 7%). Os componentes foram então misturados assépticamente, de forma a se obter a concentração desejada de cada nutriente no meio de cultura.

Para a utilização do farelo de arroz como nutriente, foi preparada uma suspensão de farelo em água destilada numa proporção de 10% (p/v). Após a autoclavagem da suspensão por 20 min a 121 °C, esta foi centrifugada em condições assépticas a 2000xg por 20 min. A fração líquida (extrato de farelo de arroz) foi transferida para um frasco previamente esterilizado e conservada em geladeira até a sua utilização, nunca por um período superior a uma semana.

Tabela 4.1. Composição do meio semi-sintético utilizado para crescimento do inóculo.

Componente	Concentração (g/L)
Xilose	30,0
Glicose	5,0
Sulfato de amônio	3,0
Extrato de farelo de arroz	20,0
Cloreto de cálcio diidratado	0,1

#### *4.1.3. Estudo do Efeito da Concentração de Sais de Fosfato no Cultivo do Inóculo*

Para o estudo do efeito da concentração de sais de fosfato durante o cultivo do inóculo, foram realizados ensaios nas quais o meio de cultura foi suplementado com solução tampão de sais de fosfato de potássio (mono e di-básico) nas concentrações de 0,2 M (21,7 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 6,9 g/L de  $\text{K}_2\text{PO}_4$ ) ou 0,6 M (68,9 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 22,1 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), em pH 5,5. Os resultados obtidos foram comparados com um controle (meio não tamponado), no qual o pH inicial foi acertado para 5,5 com NaOH 0,1 N.

As soluções tampão 0,2 e 0,6 M foram preparadas a partir de uma solução estoque (1,5 M) no pH desejado (5,5), a qual foi autoclavada a 121 °C

por 20 min. Para o preparo da solução estoque adotou-se a proporção de 4 partes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para 1 parte de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .

A suplementação do meio de cultivo com a solução tampão (0,2 ou 0,6 M) foi feita de forma asséptica, de forma a se obter a concentração desejada de cada nutriente bem como do tampão, no meio de cultura.

#### *4.1.4. Condições de Cultivo do Inóculo*

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 100 mL contendo 50 mL do meio de cultivo de inóculo, incubados com células cultivadas nas condições descritas para o preparo do inóculo, a 30 °C, em agitador metabólico, sob agitação de 200 rpm, durante 30 h. Uma amostra foi retirada no tempo zero ( $t_{0h}$ ) e outra no tempo final ( $t_{30h}$ ), para a dosagem da concentração de xilose, glicose, xilitol e de células e variação do pH.

## **4.2. Influência da Concentração de Sais de Fosfato Mono e Di-Básico na Bioconversão de Xilose em Xilitol**

Uma vez determinada a concentração de sais fosfato mais adequada para o cultivo do inóculo, foi feito o estudo da influência destes sais na bioconversão de xilose em xilitol. Para este propósito, o preparo do microrganismo bem como do inóculo, foi o mesmo apresentado nos itens 4.1.1 e 4.1.2.

### *4.2.1. Preparo do Meio Semi-Sintético para o Processo Fermentativo*

Nesta etapa, o meio de fermentação foi composto pelos nutrientes descritos na Tabela 4.2. Foram utilizadas soluções concentradas de cada componente, as quais foram preparadas separadamente. As soluções de xilose (40%) e glicose (15%) foram autoclavadas a 112 °C por 15 min, enquanto que

as soluções de extrato de farelo de arroz (10%), cloreto de cálcio diidratado (1%) e sulfato de amônio (7%) foram autoclavadas a 121 °C por 20 min. Os componentes foram então misturados, assepticamente, de forma a se obter a concentração desejada de cada nutriente meio de cultura.

Tabela 4.2. Composição do meio semi-sintético utilizado para o processo fermentativo.

Componente	Concentração (g/L)
Xilose	90,0
Glicose	15,0
Sulfato de amônio	3,0
Extrato de farelo de arroz	20,0
Cloreto de cálcio diidratado	0,1

#### *4.2.2. Estudo do Efeito da Concentração de Sais de Fosfato na Bioconversão de Xilose em Xilitol*

Para o estudo do efeito da concentração de sais de fosfato durante a bioconversão de xilose em xilitol, foram realizados ensaios nas quais o meio de cultivo foi suplementado com solução tampão de sais de fosfato de potássio (mono e di-básico) nas concentrações de 0,2 M (21,7 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 6,9 g/L de  $\text{K}_2\text{PO}_4$ ) ou 0,4 M (43,6 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 13,9 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) ou 0,6 M (68,9 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 22,1 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), em pH 5,5. O preparo das soluções tampão e a suplementação do meio de cultivo foram realizados conforme mencionado no item 4.1.3. Os resultados obtidos foram comparados com um controle (meio não tamponado), na qual o pH inicial foi acertado para 5,5 com NaOH 0,1 N.

#### 4.2.3. Condições de Cultivo do Processo Fermentativo

Os experimentos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultivo, inoculados com células cultivadas nas condições descritas para o preparo do inóculo. Os frascos foram incubados a 30 °C, em agitador metabólico, sob agitação de 200 rpm. Durante as fermentações, amostras foram retiradas periodicamente, em tempos de 24 h, para o acompanhamento da concentração de xilose, glicose, xilitol e de células e variação do pH. O pH foi determinado segundo o item 4.5.2.

#### 4.3. Estudo do Efeito dos Produtos de Degradação de Lignina na Bioconversão de Xilose em Xilitol

No estudo da influência dos produtos de degradação de lignina (vanilina e siringaldeído) na bioconversão de xilose em xilitol, o preparo do inóculo foi o mesmo apresentado no item 4.1.2. O meio de cultivo para o inóculo foi suplementado com tampão de sais de fosfato na concentração de 0,6 M em pH 5,5, de acordo com o que foi apresentado no item 4.1.3 e as condições de cultivo foram as mesmas empregadas no item 4.1.4.

Para constituição do meio de fermentação, além dos nutrientes apresentados na Tabela 4.2, também foram adicionados os sais de fosfato correspondentes a 0,6 M, cujas concentrações foram alteradas de acordo com o pH de interesse (Tabela 4.3). Para cada valor de pH avaliado (5,5, 6,3 e 7,0), foi preparada uma solução estoque (1,5 M), sendo adotado para o pH 5,5 a proporção de 4 partes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para 1 parte de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , para 6,3 a proporção de 1 parte de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para 1 parte de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  e para 7,0 a proporção de 1 parte de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  para 4 partes de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ . A composição do meio de fermentação, bem como sua suplementação com os sais, foi conduzida de forma asséptica, de forma a manter as concentrações desejadas tanto do tampão quanto dos nutrientes que compõe este meio.

Para o processo fermentativo, as condições de cultivo foram as mesmas apresentadas no item 4.2.3. O meio de cultivo foi suplementado com vanilina e siringaldeído, conforme o planejamento experimental fatorial apresentado na

Tabela 4.4, sendo as massas desses compostos diretamente dissolvidas no meio de fermentação imediatamente antes do uso, mediante aquecimento em banho-maria. Nos ensaios suplementados com os compostos fenólicos foi feita análise através de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) para o acompanhamento durante todo o tempo de cultivo, da variação de tais compostos e formação de produtos correspondentes (álcool vanilil, ácido vanílico e ácido siríngico).

Tabela 4.3. Concentrações dos sais de fosfato (0,6 M), empregados para o tamponamento do meio de fermentação de acordo com os valores de pH propostos pelo planejamento experimental fatorial  $2^4$ .

pH desejado	Sais de fosfato (g/L)	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
5,5	68,9	22,1
6,3	43,1	55,1
7,0	17,2	88,2

#### 4.3.1. Metodologia Estatística

Para avaliação da influência das variáveis: concentração inicial de vanilina e siringaldeído, concentração inicial de células e pH, sobre o processo de bioconversão de xilose em xilitol foi utilizado um planejamento fatorial completo de dois níveis  $2^4$  e com três repetições no ponto central, conforme matriz apresentada na Tabela 4.4. As variáveis foram codificadas de acordo com a Equação 1:

$$V_C = (V_R - V_0) / \Delta V_R \quad (\text{Equação 4.1})$$

Em que:

$V_C$  – valor codificado da variável independente;

$V_R$  – valor real da variável independente;

$V_0$  – valor real da variável independente no ponto central;

$\Delta V_R$  – valor do passo, isto é  $(V_{R\text{máx}} - V_{R\text{mín}})/2$ .

Tabela 4.4. Matriz de planejamento experimental  $2^4$  com três repetições no ponto central, utilizada para investigar o efeito das concentrações de vanilina ( $X_1$ ; V) e siringaldeído ( $X_2$ ; S), do pH ( $X_3$ ) e da concentração inicial de células ( $X_4$ ;  $X_0$ ), sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*.

Ensaio	Níveis codificados das variáveis				Níveis reais das variáveis (g/L)			
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	V	S	pH	$X_0$
1	-1	-1	-1	-1	0,0	0,0	5,5	1,0
2	+1	-1	-1	-1	2,0	0,0	5,5	1,0
3	-1	+1	-1	-1	0,0	2,0	5,5	1,0
4	+1	+1	-1	-1	2,0	2,0	5,5	1,0
5	-1	-1	+1	-1	0,0	0,0	7,0	1,0
6	+1	-1	+1	-1	2,0	0,0	7,0	1,0
7	-1	+1	+1	-1	0,0	2,0	7,0	1,0
8	+1	+1	+1	-1	2,0	2,0	7,0	1,0
9	-1	-1	-1	+1	0,0	0,0	5,5	3,0
10	+1	-1	-1	+1	2,0	0,0	5,5	3,0
11	-1	+1	-1	+1	0,0	2,0	5,5	3,0
12	+1	+1	-1	+1	2,0	2,0	5,5	3,0
13	-1	-1	+1	+1	0,0	0,0	7,0	3,0
14	+1	-1	+1	+1	2,0	0,0	7,0	3,0
15	-1	+1	+1	+1	0,0	2,0	7,0	3,0
16	+1	+1	+1	+1	0,0	2,0	7,0	3,0
17	0	0	0	0	1,0	1,0	6,3	2,0
18	0	0	0	0	1,0	1,0	6,3	2,0
19	0	0	0	0	1,0	1,0	6,3	2,0

A análise estatística dos dados obtidos foi realizada utilizando-se o programa STATGRAPHICS (versão 5.0). A significância dos fatores experimentais foi testada pelo teste  $t$  de Student. Este teste, baseado na hipótese de que o verdadeiro parâmetro é zero, é utilizado para elucidar a significância dos fatores. Se o valor de  $t$  calculado ( $t_{\text{calc}}$ ) for superior ao  $t$  tabelado ( $t_{(1-\alpha, \lambda)}$ ) para um nível de significância de  $\alpha$  e  $\lambda$  graus de liberdade, então o termo em causa contribui significativamente para a resposta.

Foram obtidas como respostas (variáveis dependentes) do modelo experimental, o consumo percentual de xilose ( $C_{X1}$ ), a concentração de xilitol

( $P_{XO}$ ), o fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) e a produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ).

A partir da análise estatística dos resultados obtidos no planejamento experimental  $2^4$ , foi obtida a otimização da bioconversão da xilose em xilitol, com base nos fatores que apresentaram significância (vanilina e siringaldeído), utilizado-se um planejamento fatorial composto  $2^2$  com face centrada e três repetições no ponto central, conforme a matriz apresentada na Tabela 4.5. Nesta etapa, foram consideradas constantes as variáveis: concentração inicial de células (3,0 g/L) e pH (5,5). A metodologia de superfície de resposta foi utilizada.

Tabela 4.5. Matriz do planejamento fatorial composto  $2^2$  com face centrada e três repetições no ponto central, apresentando os níveis codificados e os reais das variáveis respostas avaliadas, vanilina ( $X_1$ ; V) e siringaldeído ( $X_2$ ; S).

Ensaio	Níveis codificados das variáveis		Níveis reais das variáveis (g/L)	
	$X_1$	$X_2$	V	S
1	-1	-1	0,0	0,0
2	1	-1	2,0	0,0
3	-1	1	0,0	2,0
4	1	1	2,0	2,0
5	-1	0	0,0	1,0
6	1	0	2,0	1,0
7	0	-1	1,0	0,0
8	0	1	1,0	2,0
9	0	0	1,0	1,0
10	0	0	1,0	1,0
11	0	0	1,0	1,0

O modelo quadrático para prever o ponto ótimo foi expresso de acordo com a Equação 2.

$$Y_i = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{12}X_1X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 \quad (\text{Equação 4.2})$$

Em que:

$Y_i$  = variável resposta;

$b_0$  = coeficiente de intercessão;

$b_1, b_2$  = termos lineares;

$b_{11}, b_{22}$  = termos quadráticos;

$b_{12}$  = termo de interação;

$X_1$  = nível codificado da variável independente: vanilina;

$X_2$  = nível codificado da variável independente: siringaldeído.

O programa “Design-Expert” (versão 5.0) e/ou STATISTICA (versão 5.0) foi utilizado para a análise de regressão dos dados obtidos. A significância dos coeficientes de regressão foi testada pelo teste  $t$  de Student. A qualidade do ajuste da equação polinomial do modelo foi expressa pelo coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a sua significância estatística foi determinada pelo teste  $F$  de Fisher. O valor de  $F$  experimental foi comparado com o  $F$  tabelado;  $F_{(\alpha, p-1, n-p)}$ , em que  $\alpha$  é o risco escolhido,  $n$  é o número total de ensaios e  $p$  é o número de termos do modelo. Este teste, utilizado para determinar a adequação do modelo aos dados é feito pela comparação de duas variâncias: a variância do erro puro ( $S_{ep}^2$ ) e a falta de ajuste ( $S_{fa}^2$ ). Se o valor de  $F$  calculado ( $F = S_{ep}^2 / S_{fa}^2$ ) for superior ao  $F$  tabelado, então a falta de ajuste indica que o modelo proposto não é adequado para descrever a resposta.

As superfícies de resposta foram plotadas utilizando-se o programa STATISTICA (versão 5.0) e/ou “Design-Expert” (versão 5.0). As concentrações ótimas das variáveis foram obtidas pela análise dos gráficos de curvas de nível das respostas e pela otimização através do método numérico do programa “Design-expert”, baseado no critério da conveniência descrito por Myers e Montgomery, conforme consta no manual do programa.

Uma vez obtidas as condições otimizadas (1,6 g/L de vanilina, 3,0 g/L de células e pH 5,5), foi realizado um ensaio para a confirmação do modelo. Para

tal propósito, foi utilizado meio semi-sintético, no qual, além dos nutrientes apresentados na Tabela 4.2, também foram adicionados os sais de fosfato, correspondentes a concentração de 0,6 M e pH 5,5 (68,9 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 22,1 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ).

Para o processo fermentativo, as condições de cultivo foram as mesmas apresentadas no item 4.2.3. O meio de cultivo foi suplementado com 1,6 g/L vanilina, sendo diretamente dissolvido no meio de fermentação imediatamente antes do uso, mediante aquecimento em banho-maria. Foi feita análise através de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) para o acompanhamento durante todo o tempo de cultivo, da variação do composto fenólico e formação de produtos correspondentes (álcool vanilil e ácido vanílico).

#### **4.4. Obtenção e Preparo do Hidrolisado de Palha de Arroz**

A palha de arroz utilizada nos experimentos foi obtida na região de Lorena. Após o recebimento, a palha foi seca ao sol e cominuída em moinho tipo martelo até um tamanho de aproximadamente 1 cm de comprimento e 1 mm de espessura. O hidrolisado hemicelulósico foi obtido por catálise ácida em reator confeccionado em aço-inox AISI 316 com capacidade de 350 L., munido de aquecimento indireto por resistência elétrica por camisa de óleo térmico. As reações foram realizadas a 121 °C por 27 min, empregando uma relação solução ácida:palha seca de 10 g/g. Foi utilizado o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  como catalisador e a solução ácida foi preparada para concentração final de 1% (ROBERTO *et al.*, 2003). Ao final da reação, o material descarregado do reator foi centrifugado e a fração líquida recuperada (hidrolisado hemicelulósico).

Para o hidrolisado tratado, a fração líquida recuperada foi retornada ao reator de hidrólise para destoxificação do hidrolisado com carvão ativo nas seguintes condições: proporção carvão:hidrolisado de 3% (p/v), temperatura de 45 °C e tempo de agitação de 30 min (MUSSATTO e ROBERTO, 2001). Após o processo de adsorção com carvão ativo, a mistura foi centrifugada para remoção de sólidos.

O hidrolisado não tratado (H) e o hidrolisado destoxificado (HD), foram então submetidos ao processo de concentração (HC e HDC, respectivamente),

sob vácuo, em evaporador com capacidade de 4 litros, a uma temperatura de 65 °C de forma a obter a concentração de xilose de aproximadamente 90,0 g/L, e em seguida estocados a 4 °C para posterior utilização nos ensaios de fermentação.

Foi feita uma caracterização dos hidrolisados, através de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), para a determinação de alguns dos compostos presentes no meio e através de espectrofotometria (UV-visível), na qual foi determinada a concentração total dos compostos fenólicos constituintes, utilizando-se do método de Folin - Ciocalteau (padrão vanilina) e de determinação de unidades arbitrárias de absorbância (280 nm). O valor de pH também foi determinado.

#### *4.4.1. Condições de Fermentação do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz*

As condições de fermentação para o cultivo em hidrolisado (HC e HDC) foram definidas após os resultados obtidos com os cultivos em meio semi-sintético (concentração celular inicial de 3,0 g/L e pH 5,5). O pH do hidrolisado foi elevado para 5,5 com adição de NaOH em *pellets*, sendo em seguida centrifugado a 2000xg por 20 min para a remoção do precipitado resultante. Nesta etapa, o hidrolisado não foi suplementado com os nutrientes empregados em meio semi-sintético.

Para a fermentação em hidrolisado hemicelulósico destoxificado suplementado com vanilina (HDV), o composto fenólico (1,6 g/L) foi adicionado ao hidrolisado logo após a correção do pH e remoção do precipitado por centrifugação. A suplementação com vanilina foi feita minutos antes da inoculação, e sua total solubilização no hidrolisado foi conseguida mediante aquecimento do meio em banho-maria.

O processo fermentativo foi conduzido em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio de cultivo, inoculados com células cultivadas nas condições descritas para o preparo do inóculo. Os frascos foram incubados a 30 °C, em agitador metabólico, sob agitação de 200 rpm.

Durante a fermentação, amostras foram retiradas periodicamente, em 0, 48, 72 e 96 h, para o acompanhamento do teor de compostos fenólicos (vanilina, siringaldeído, ácido vanílico, álcool vanilil, ácido siríngico e ácido ferúlico), ácido acético, furfural, xilose, glicose, xilitol e de células e variação do pH. O pH foi determinado segundo o item 4.5.2.

## **4.5. Métodos Analíticos**

### *4.5.1. Determinação da Concentração Celular*

A concentração celular foi obtida mediante uma curva de calibração que correlaciona densidade ótica (DO) com massa seca de células. Para a elaboração desta curva, células provenientes do cultivo de 50 mL de inóculo, foram centrifugadas a 2000xg por 20 min. O sobrenadante foi descartado e as células lavadas pelo menos 2 vezes com água destilada. Em seguida, as células foram ressuspensas em água destilada de forma a se obter uma suspensão homogênea densa (suspensão original), a qual foi utilizada para preparar suspensões com diversas diluições. As suspensões diluídas foram submetidas à leitura de absorvância em espectrofotômetro (Beckman DU 640) a 600 nm, utilizando-se água destilada como branco. A massa seca foi determinada a partir da suspensão original após secagem de alíquotas de 5 mL, em estufa a 105 °C por 24 h.

### *4.5.2. Determinação do pH*

Os valores de pH foram determinados por potenciometria, por meio de um aparelho da marca MICRONAL modelo B474, com correção de temperatura.

### *4.5.3. Determinação da Concentração de Glicose, Xilose, Arabinose, Xilitol, Glicerol, Ácido acético, e Etanol*

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, xilitol, glicerol, acético acético e etanol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), em equipamento WATERS, nas seguintes condições: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura: 45 °C; eluente: ácido sulfúrico 0,01 N desgaseificado; fluxo: 0,6 mL/min; volume de amostra: 20 µL; detector: índice de refração.

Como preparo, as amostras foram primeiramente centrifugadas a 1800xg por 20 min para a remoção das células, sendo os sobrenadantes recolhidos e apropriadamente diluídos com água deionizada. Numa etapa posterior as amostras já diluídas foram passadas por filtros C18 SEP-PACK CARTRIDGE (Waters Associates - MILIPORE). As concentrações destes compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

#### *4.5.4. Determinação da Concentração de Furfural e 5-Hidroximetilfurfural*

As concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), em equipamento WATERS, nas seguintes condições: coluna Waters Resolve C18 5 µm (3,9 x 300 mm); temperatura ambiente; eluente: acetonitrila/água (1/8 com 1% de ácido acético) desgaseificado; fluxo: 0,8 mL/min; volume de amostra: 20 µL e detector: UV a 276 nm.

Inicialmente, as amostras foram centrifugadas a 1800xg por 20 min para a remoção das células. Os sobrenadantes foram recolhidos e passados por uma membrana do tipo HAWP 04700 com poros de 0,45 µm (Waters Associates - MILIPORE). As concentrações destes compostos foram calculadas a partir de uma curva de calibração obtida de soluções padrão.

#### *4.5.5. Determinação da Concentração dos Compostos Fenólicos por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC)*

As concentrações de vanilina, álcool vanilil, ácido vanílico, siringaldeído, ácido siríngico e ácido ferúlico, foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alto Desempenho (HPLC), em equipamento WATERS, nas seguintes condições: coluna Waters Resolve C18 5  $\mu$ m (3,9 x 300 mm); temperatura ambiente; eluente: acetonitrila/água (1/8 com 1% de ácido acético) desgaseificado, com adição de ácido fosfórico para correção do pH para 2,5; fluxo: 0,9 mL/min; volume de amostra: 20  $\mu$ L e detector: UV a 276 nm.

As amostras foram centrifugadas a 1800xg por 20 min para a remoção das células. Os sobrenadantes foram recolhidos e passados por uma membrana do tipo HAWP 04700 com poros de 0,45  $\mu$ m (Waters Associates - MILIPORE). As concentrações destes compostos foram calculadas a partir de uma curva de calibração obtida de soluções padrão.

#### 4.5.6. *Determinação dos Compostos Fenólicos Totais por Espectrofotometria UV-visível*

A concentração total dos compostos fenólicos foi quantificada colorimetricamente pelo método modificado de Folin-Ciocalteu (SINGLETON *et al.*, 1999) usando a vanilina como padrão de calibração.

Inicialmente, as amostras foram centrifugadas a 1800xg por 20 min para a remoção das células. Os sobrenadantes foram recolhidos e passados primeiramente por um filtro de 0,45  $\mu$ m, para remoção de possíveis interferentes, sendo em seguida diluídos (se necessário), com água deionizada.

Para a reação colorimétrica, em um tubo de ensaio foram adicionados os 3,0 mL da amostra (sobrenadante), seguidos de 0,2 mL de reagente Folin. O sistema foi homogeneizado por meio de vórtice e mantido em repouso por um período de 5 min. Após este tempo, foi adicionada à mistura, 0,8 mL de solução de  $(\text{Na})_2\text{CO}_3$  150,0 g/L, seguido de agitação (em vórtice). O sistema foi então deixado em repouso à temperatura ambiente, na ausência de luz e por um período de 30 min. Fez-se então a leitura em espectrofotômetro a 760 nm. Para

composição do branco, água deionizada foi adicionada em substituição à amostra. Seguiu-se o mesmo procedimento.

#### 4.6. Metodologia de Análise dos Resultados

Para avaliação dos resultados obtidos nas diversas etapas do trabalho serão analisados os seguintes parâmetros:

1. *Fator de Conversão de Substrato em Células*  $Y_{X/S}$  (*g<sub>células formadas</sub> / g<sub>substrato consumido</sub>*)

$$Y_{X/S} = \frac{\bullet X}{-\bullet S_T} = \frac{(X_f - X_i)}{[(S_{1f} - S_{1i}) + (S_{2f} - S_{2i})]}$$

Em que:

$X_i$  e  $X_f$  = Concentração inicial e final de células (g/L);

$t_i$  e  $t_f$  = Tempo inicial e final da fermentação (h);

$S_{1i}$  e  $S_{1f}$  = Concentração inicial e final de glicose (g/L) e

$S_{2i}$  e  $S_{2f}$  = Concentração inicial e final de xilose (g/L).

2. *Fator de Conversão de Xilose em Xilitol*  $Y_{P/S}$  (*g<sub>xilitol formado</sub> / g<sub>xilose consumida</sub>*)

$$Y_{P/S} = \frac{\bullet P}{-\bullet S_2} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_{2f} - S_{2i})}$$

Em que:

$P_i$  e  $P_f$  = Concentração inicial e final de xilitol (g/L) e

$S_{2i}$  e  $S_{2f}$  = Concentração inicial e final de xilose (g/L).

3. *Fator de Rendimento em Xilitol*  $Y_{P/X}$  ( $g_{xilitol\ formado} / g_{células\ formadas}$ )

$$Y_{P/X} = \bullet P / \bullet X = (P_f - P_i) / (X_f - X_i)$$

Em que:

$P_i$  e  $P_f$  = Concentração inicial e final de xilitol (g/L) e

$X_i$  e  $X_f$  = Concentração inicial e final de células (g/L).

4. *Produtividade Volumétrica em Células*  $Q_X$  ( $g_{células\ formadas} / L.h$ )

$$Q_X = \bullet X / \bullet t = (X_f - X_i) / (t_f - t_i)$$

Em que:

$X_i$  e  $X_f$  = Concentração inicial e final de células (g/L) e

$t_i$  e  $t_f$  = Tempo inicial e final da fermentação (h).

5. *Consumo Volumétrico de Xilose*  $Q_S$  ( $g_{xilose\ consumida} / L.h$ )

$$Q_S = \bullet S_2 / \bullet t = (S_{2f} - S_{2i}) / (t_f - t_i)$$

Em que:

$S_{2i}$  e  $S_{2f}$  = Concentração inicial e final de xilose (g/L) e

$t_i$  e  $t_f$  = Tempo inicial e final da fermentação (h).

6. *Produtividade Volumétrica em Xilitol*  $Q_P$  ( $g_{xilitol\ formado} / L.h$ ):

$$Q_P = \bullet P / \bullet t = (P_f - P_i) / (t_f - t_i)$$

Em que:

$P_i$  e  $P_f$  = Concentração inicial e final de xilitol (g/L) e

$t_i$  e  $t_f$  = Tempo inicial e final da fermentação (h).

### 7. Eficiência de Conversão $\eta$ (%)

$$\zeta = (Y_{P/S} \text{ obtido} / Y_{P/S} \text{ teórico}) \times 100$$

Em que:

$Y_{P/S} \text{ teórico} = 0,917 \text{ g/g}$  (BARBOSA *et al.*, 1988).

### 8. Determinação do Grau de Inibição do Crescimento Celular $GI_X$ (%)

$$GI_X = [1 - (\bullet X_{MSI} / \bullet X_{MS})] \times 100$$

Em que:

- $X_{MS}$  = Variação da concentração celular em meio semi-sintético sem inibidor e
- $X_{MSI}$  = Variação da concentração celular em meio semi-sintético adicionado com o inibidor.

### 9. Determinação do Grau de Inibição da Formação de Xilitol $GI_P$ (%)

$$GI_P = [1 - (\bullet P_{MSI} / \bullet P_{MS})] \times 100$$

Em que:

- $P_{MS}$  = Variação da concentração de xilitol em meio semi-sintético sem inibidor
- $P_{MSI}$  = Variação da concentração de xilitol em meio semi-sintético adicionado com o inibidor.

### 10. Determinação da eficiência do tratamento do hidrolisado de palha de arroz com carvão ativado (remoção dos compostos inibitórios RCI - %)

$$RCI = [1 - (CI_{HDC} / CI_{HC})] \times 100$$

$CI_{HC}$  = Concentração total de compostos inibitórios (furanos e compostos fenólicos) no hidrolisado não tratado e

$CI_{HDC}$  = Concentração total de compostos inibitórios (furanos e compostos fenólicos) no hidrolisado destoxificado com carvão ativado.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Estudo do Cultivo do Inóculo em Meio Semi-Sintético Suplementado com Sais de Fosfato Mono e Di-Básico

Visando definir a concentração mais adequada de sais de fosfato de potássio para o tamponamento do meio de cultivo, ensaios foram realizados variando-se a concentração destes sais. Nestes estudos iniciais, empregou-se o meio utilizado para o cultivo do inóculo, conforme descrito no item 4.1, por se tratar de uma etapa de adaptação do microrganismo ao processo fermentativo e também por uma questão de economia de reagentes.

A Tabela 5.1 apresenta os resultados de concentração celular, pH, consumo de xilose bem como produção de xilitol durante o cultivo do inóculo em meios contendo diferentes concentrações fosfato. Observa-se que, para todos os meios avaliados, a concentração celular final apresentou pouca variação (de 3,4 a 3,8 g/L), porém que o crescimento foi favorecido em meios contendo sais de fosfato na concentração de 0,6 M, evidenciado pelo maior fator de conversão ( $Y_{X/S}$ ).

Quanto ao consumo de xilose, observa-se que a adição de sais de fosfato ao meio de cultivo afetou negativamente a eficiência de utilização desta pentose. Com 30 h de cultivo, a levedura apresentou um consumo de 75% de xilose em meio controle (sem adição de sais), enquanto que em meio suplementado com fosfato nas concentrações de 0,2 e 0,6 M, o consumo desta pentose decresceu para 61 e 43%, respectivamente. No entanto, o fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) variou pouco com a adição de fosfato ao meio, o que resultou em valores de 0,52 a 0,62 g/g.

Tabela 5.1. Resultados de  $\text{pH}_{\text{final}}$ , concentração celular final ( $X_{\text{final}}$ ), consumo percentual de xilose ( $C_{\text{XI}}$ ), concentração de xilitol ( $P_{\text{XO}}$ ), fator de conversão em células ( $Y_{\text{X/S}}$ ) e fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{\text{P/S}}$ ), obtidos com 30 h do cultivo do inóculo em meio com diferentes concentrações de sais de fosfato em pH 5,5.

Concentração (M)	$\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ (g/L)		$\text{pH}_{\text{final}}$	$X_{\text{final}}$ (g/L)	$C_{\text{XI}}$ %	$P_{\text{XO}}$ (g/L)	$Y_{\text{X/S}}$ (g/g)	$Y_{\text{P/S}}$ (g/g)
0	0	0	2,5	3,7	75	11,7	0,14	0,52
0,2	21,7	6,9	4,7	3,4	61	10,8	0,16	0,62
0,6	68,9	22,1	5,7	3,8	43	6,3	0,24	0,55

Concentração inicial média de glicose: 5,0 g/L; xilose: 30,0 g/L; concentração celular inicial: 0,1 g/L

O valor do pH obtido ao final do cultivo é também mostrado na Tabela 5.1. Observa-se que o crescimento de *C. guilliermondii* em meio controle (sem adição de sais) promoveu uma queda acentuada no valor de pH (3,0 unidades), enquanto que em meio contendo sais de fosfato na concentração de 0,2 M o decréscimo foi de apenas 0,8 unidade. Nota-se ainda que a utilização de sais de fosfato na concentração de 0,6 M promoveu o tamponamento do meio, sendo observado um aumento de 0,2 unidade, com 30 h de cultivo. De acordo com VOGEL e TADARO (1997), o sulfato de amônio produz condições acidificadas devido ao rápido consumo de amônia e concomitante liberação de ácido livre no meio. No presente trabalho, o sulfato de amônio foi utilizado como fonte de nitrogênio, o que explica o decréscimo acentuado de pH durante o cultivo em meio não tamponado.

Com este estudo foi possível concluir que o meio contendo sais de fosfato na concentração de 0,6 M, ou seja 68,9 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 22,1 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  é o mais adequado para o cultivo do inóculo pois, além de manter o pH inicial do meio, esta condição favoreceu a conversão de substrato em células.

## 5.2. Influência da Concentração de Sais Fosfato Mono e Di-Básico na Bioconversão de Xilose em Xilitol

Este estudo teve por objetivo avaliar e comparar a cinética de produção de xilitol por *C. guilliermondii* em meios suplementados com diferentes concentrações de fosfato de potássio. Os resultados de crescimento celular, consumo de açúcares, produção de xilitol, etanol, e variação do pH estão apresentados na Figura 5.1 (A, B, C e D).

Observa-se que, para todos os meios avaliados, o crescimento celular foi semelhante durante as primeiras 24 h de cultivo (Fig. 5.1 A). Entretanto, após este tempo, variações significativas foram obtidas em função da concentração de fosfato no meio. O meio controle (sem adição dos sais) foi o que proporcionou a menor concentração celular com 96 h de cultivo ( $X_{\text{final}} = 7,6 \text{ g/L}$ ), sugerindo que a adição dos sais de fosfato interfere positivamente no crescimento microbiano. Comparando-se os valores de concentração celular final obtidos em meios suplementados com diferentes concentrações de fosfato, nota-se que o aumento da concentração molar dos sais de 0,2 para 0,6 promoveu um decréscimo na concentração celular de 12,1 para 8,9 g/L.

O consumo total de xilose (Fig. 5.1 B) foi influenciado pela concentração de fosfato no meio, sendo obtidos valores acima de 90% de consumo desta pentose, com 96 h de cultivo, em todas as condições avaliadas. Nota-se ainda que com 24 h de cultivo, a glicose já havia sido completamente consumida, em todos os meios de cultivo estudados.

A produção de xilitol pela levedura *C. guilliermondii* foi dependente da concentração de sais de fosfato no meio de cultivo (Fig. 5.1 C). Deste modo, observa-se que a formação do poliol foi favorecida com o aumento da concentração dos sais no meio. A concentração de xilitol no meio controle foi de 43,7 g/L, com 96 h de cultivo. Entretanto, quando o meio foi suplementado com sais de fosfato na concentração de 0,6 M a concentração de xilitol atingiu o valor máximo de 62,2 g/L, o que correspondeu a um aumento de 42% quando comparado com meio controle. Por outro lado, a produção de etanol no meio controle atingiu um valor de 9,0 g/L, com 96 h e decresceu para 5,6 g/L quando o meio foi suplementado com fosfato na concentração de 0,6 M. A

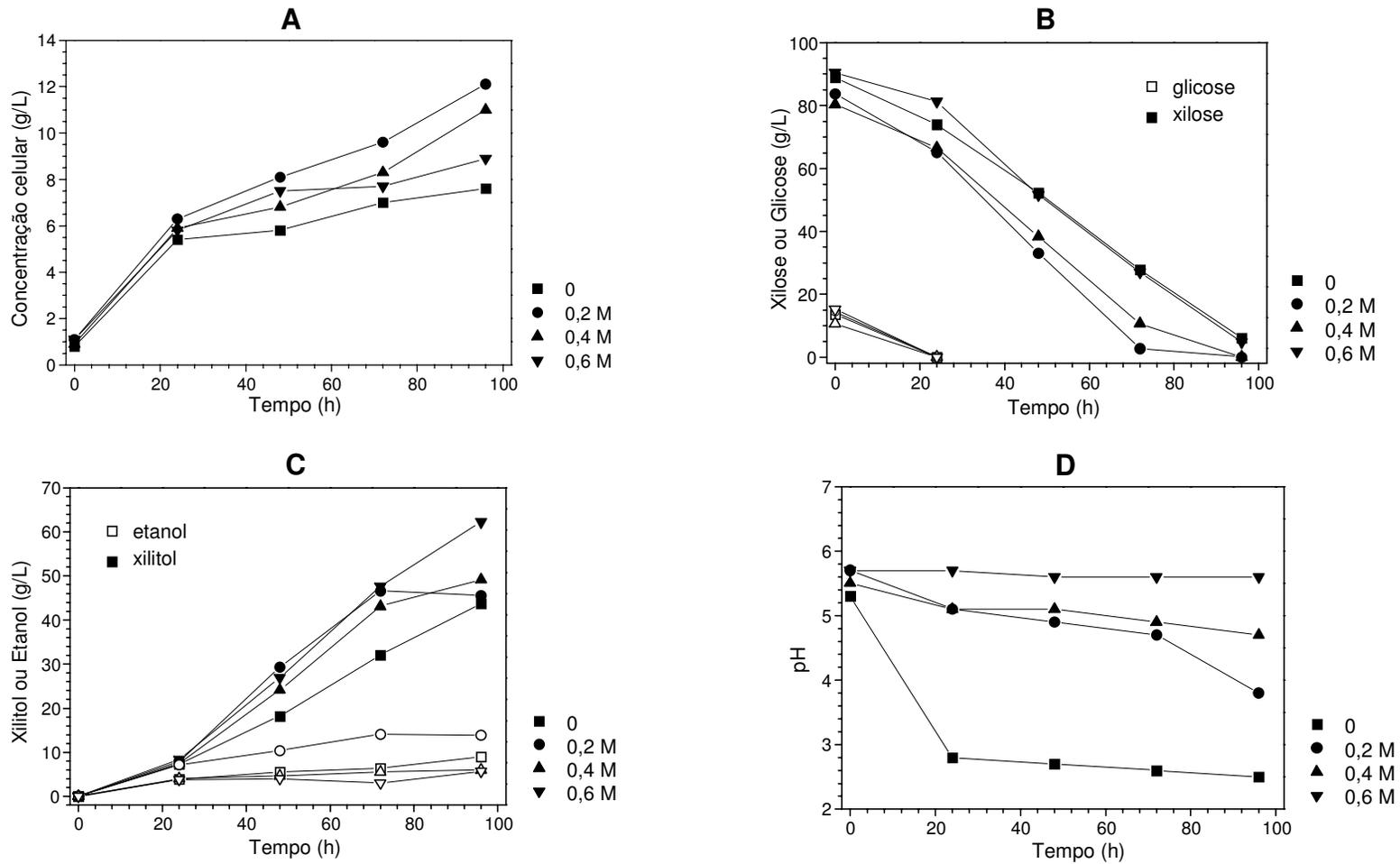


Figura 5.1. Crescimento celular (A), consumo de açúcares (B), produção de xilitol e etanol (C) e variação de pH (D), durante o cultivo de *C. guilliermondii* em meio suplementado com diferentes concentrações de sais de fosfato.

máxima concentração de etanol obtida foi de 14,0 g/L, com 96 h de cultivo, em meio contendo fosfato na concentração de 0,2 M.

Embora a produção de xilitol por *C. guilliermondii* seja bastante estudada, a influência de concentrações elevadas de fosfato de potássio sobre o processo fermentativo tem sido pouco relatada. AZUMA *et al.* (2000) examinaram o efeito da adição de diferentes sais: NaCl, 4% (0,68 M); KCl, 5% (0,67 M); MgCl, 4,5% (0,47 M); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 9% (0,66 M) e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8% (0,67 M), na produção de xilitol por *Candida tropicalis* em meio contendo 5% de xilose na ausência ou presença de glicose (2%). Foi constatado que todos os sais influenciaram positivamente a conversão em xilitol e que o efeito de repressão catabólica causado pela glicose foi contornado pela adição de sais no meio de cultivo. Neste mesmo trabalho, os autores estudaram detalhadamente o efeito da adição de NaCl na bioconversão de xilose em xilitol, porém em meios contendo uma elevada concentração de xilose (10% e 15%). Foi observado que, em meio contendo apenas xilose (10%) como fonte de carbono (sem adição de sal) a concentração de xilitol alcançou um máximo de 60,2 g/L, com 96 h de fermentação, enquanto que na presença de glicose este valor decresceu para 47,1 g/L, após o mesmo tempo de cultivo. Por outro lado, quando o meio de cultivo contendo xilose ou xilose e glicose, foram adicionados de 4% de NaCl, as concentrações de xilitol foram de 61,1 e 60,2 g/L, respectivamente, o que demonstra que o efeito do sal foi positivo apenas em meios contendo glicose. Um comportamento semelhante foi observado no presente trabalho, no qual foi verificado um aumento na produção de xilitol de 43,7 para 62,2 g/L, quando o meio de fermentação contendo xilose (9%) e glicose (1,5%) foi adicionado de sais de fosfato na concentração de 0,6 M.

Uma outra possível explicação para os resultados obtidos no presente trabalho poderia ser a diminuição na solubilidade de oxigênio no meio devido à elevada concentração de sais adicionados. Segundo WINKELHAUSEN e KUZMANOVA (1998), sob condições anaeróbias ou com baixas taxas de transferências de oxigênio, o sistema de transporte de elétrons em leveduras não é capaz de oxidar NADH completamente. Como consequência, a concentração intracelular de NADH aumenta, gerando um desequilíbrio entre as concentrações de NADH e NAD<sup>+</sup>, levando a excreção de xilitol.

Estudando a produção da enzima dextranucrase por *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F, RODRIGUES *et al.* (2003) constataram que o aumento da concentração de fosfato no meio favoreceu a produção da enzima. A atividade da enzima foi aumentada de 25 para 66 UDS/mL quando a concentração de fosfato no meio a foi elevada de 0,1 para 0,3 M. Segundo os autores, além de um elevado rendimento enzimático, a utilização de um meio enriquecido com fosfato foi capaz de manter o pH controlado, evitando a desnaturação da enzima.

Observando o comportamento do pH durante o cultivo de *C.guilliermondii* nos diferentes meios de cultivo (Fig. 5.1 D), pode-se notar que a concentração de fosfato de 0,6 M foi a que proporcionou o controle deste parâmetro, sendo verificado uma variação de apenas 0,1 unidade, com 96 h de cultivo. No ensaio realizado em meio não suplementado com os sais de fosfato (fermentação controle), a queda no valor de pH foi bastante pronunciada (de 5,3 para 2,5), similar ao comportamento observado durante o estudo do inóculo. Quando em presença de sais de fosfato na concentração correspondente a 0,2 M, observa-se que esta condição não foi suficiente para manter o pH do meio quando atingidas as 96 h de cultivo, apresentando uma queda de 1,9 unidades. Com o aumento da concentração dos sais para o equivalente a 0,4 M, nota-se que a variação de pH do cultivo foi menos pronunciada (queda de aproximadamente 0,8 unidade) quando comparado à fermentação controle.

Visando uma avaliação global dos resultados determinou-se então os parâmetros fermentativos da bioconversão de xilose em xilitol pela levedura *C. guilliermondii* em meios contendo diferentes concentrações dos sais de fosfato e os resultados estão apresentados na Tabela 5.2.

Observa-se que o fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) foi favorecido com o aumento da concentração iônica do meio, sendo o melhor resultado obtido no ensaio com sais fosfato na concentração de 0,6 M, ou seja, 68,9 g/L de  $KH_2PO_4$  e 22,1 g/L de  $K_2HPO_4$ . Este resultado correspondeu a um aumento de 36, 24 e 16% em relação ao meio controle, 0,2 M e 0,4 M, respectivamente. Foi constatado ainda que o maior valor de produtividade volumétrica de xilitol ( $Q_P = 0,65$  g/L.h) foi obtido tanto no meio com 0,2 M

quanto no meio com 0,6 M de sais de fosfato e que a conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) foi pouco influenciada pela concentração iônica do meio.

Tabela 5.2. Influência das diferentes concentrações dos sais de fosfato, em pH 5,5, sobre os parâmetros fermentativos obtidos durante o cultivo de *C. guilliermondii* em meio semi-sintético para a obtenção de xilitol

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> / K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (M)	Tempo (h)	C <sub>XI</sub> (%)	Y <sub>X/S</sub> (g/g)	Y <sub>Xilitol/S</sub> (g/g)	Y <sub>Etanol/S</sub> (g/g)	Q <sub>P</sub> (g/L.h)
0	96	93	0,07	0,53	0,09	0,46
0,2	72	97	0,09	0,58	0,15	0,65
0,4	96	100	0,11	0,62	0,07	0,51
0,6	96	95	0,07	0,72	0,04	0,65

C<sub>XI</sub>: consumo percentual de xilose

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que o meio de fermentação suplementado com 68,9 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 22,1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,6 M) além de manter o pH durante a fermentação, foi o mais adequado para a produção de xilitol por *C. guilliermondii*, sendo portanto selecionado para a etapa posterior.

### 5.3. Estudo do Efeito dos Produtos de Degradação da Lignina na Bioconversão de Xilose em Xilitol

Com o objetivo de se estudar o efeito inibitório dos produtos de degradação da lignina na bioconversão de xilose em xilitol pela levedura *C. guilliermondii* FTI 20037, dois aldeídos aromáticos (vanilina e siringaldeído) foram selecionados como modelos representativos. A escolha destes compostos foi feita com base nos dados da literatura que apontam a vanilina e o siringaldeído, dentre uma gama de compostos fenólicos presentes nos hidrolisados de biomassa vegetal, como os de elevada toxicidade ao metabolismo microbiano (DELGENES, *et al.*, 1996; RANATUNGA, *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 1999).

Nesta etapa, os experimentos foram conduzidos de acordo com a metodologia do planejamento experimental de forma a identificar e quantificar o

efeito individual das variáveis experimentais e de suas interações sobre o processo. As variáveis investigadas foram: vanilina e siringaldeído (0 a 2,0 g/L); pH (5,5 a 7,0) e concentração inicial de células (1,0 a 3,0 g/L). A matriz do planejamento com os níveis reais das variáveis, bem como os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 5.3. Para auxiliar na análise, foram construídos gráficos de barras para expressar o consumo de xilose e a produção de xilitol nas diferentes condições experimentais estudadas (Figuras 5.2 A e B).

Observa-se que, independente dos níveis de pH e concentração celular inicial avaliados, a combinação de vanilina e siringaldeído (ensaio 4, 8, 12 e 16) causou completa inibição do bioprocesso (Fig. 5.2 A e B). Nota-se ainda que, a utilização de somente vanilina como composto tóxico (ensaio 2, 6, 10 e 14), tanto o consumo de xilose quanto a produção de xilitol foram similares aos obtidos em meios ausentes deste composto, nas mesmas condições de pH e concentração celular.

Ainda com relação à vanilina, nota-se que a concentração inicial de células (1,0 e 3,0 g/L) não influenciou o consumo de xilose em fermentações realizadas em pH 5,5 (ensaio 2 e 10), enquanto que em pH 7,0 o consumo desta pentose foi favorecido com o aumento da concentração celular (ensaio 6 e 14). É importante ainda ressaltar que o consumo incompleto de xilose durante as fermentações conduzidas em pH 7,0 (ensaio 6 e 14) não foi devido a presença de vanilina no meio, uma vez que resultados similares foram obtidos em meios ausentes deste composto. Estes resultados sugerem que nas condições experimentais estudadas, a vanilina não possui ação inibitória sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*.

Analisando as fermentações dos meios em que o siringaldeído foi o único composto tóxico (ensaio 3, 7, 11 e 15), observa-se uma acentuada redução no consumo de xilose e na produção de xilitol em todas as condições experimentais avaliadas (Fig. 5.2 A e B). Utilizando a menor concentração celular (1,0 g/L), nota-se que em pH 7,0 a bioconversão foi totalmente inibida, enquanto que em pH 5,5 o consumo de xilose e a produção de xilitol foram de 36% e 13,4 g/L, respectivamente.

Tabela 5.3. Matriz do planejamento 2<sup>4</sup> e resultados experimentais obtidos durante a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 nas diferentes condições de concentração de vanilina (V) e de siringaldeído (S), pH e concentração inicial de células (X<sub>0</sub>).

Ensaio	Níveis reais				pH <sub>final</sub>	X <sub>final</sub> (g/L)	C <sub>GLI</sub> (%)	C <sub>XI</sub> (%)	P <sub>XO</sub> (g/L)	Y <sub>X/S</sub> (g/g)	Y <sub>P/S</sub> (g/g)	Q <sub>P</sub> (g/L.h)
	V	S	pH	X <sub>0</sub>								
1	0,0	0,0	5,5	1,0	5,6	8,5	100	95	57,9	0,07	0,72	0,60
2	2,0	0,0	5,5	1,0	5,4	7,1	100	94	59,3	0,05	0,69	0,62
3	0,0	2,0	5,5	1,0	5,5	3,0	100	36	13,4	0,04	0,47	0,14
4	2,0	2,0	5,5	1,0	5,5	1,0	0	2	0,0	0,00	0,00	0,00
5	0,0	0,0	7,0	1,0	7,1	9,4	100	60	34,2	0,12	0,64	0,36
6	2,0	0,0	7,0	1,0	7,0	7,3	100	63	34,5	0,09	0,66	0,36
7	0,0	2,0	7,0	1,0	6,9	1,6	29	0	0,0	0,00	0,00	0,00
8	2,0	2,0	7,0	1,0	7,0	0,9	0	4	0,0	0,00	0,00	0,00
9	0,0	0,0	5,5	3,0	5,5	11,4	100	99	53,2	0,07	0,59	0,55
10	2,0	0,0	5,5	3,0	5,5	7,4	100	98	55,0	0,04	0,71	0,57
11	0,0	2,0	5,5	3,0	5,5	3,9	100	54	25,1	0,03	0,57	0,26
12	2,0	2,0	5,5	3,0	5,5	2,2	27	2	0,8	0,00	0,38	0,01
13	0,0	0,0	7,0	3,0	7,0	9,8	100	84	43,2	0,09	0,65	0,45
14	2,0	0,0	7,0	3,0	7,0	8,4	100	79	41,0	0,06	0,63	0,43
15	0,0	2,0	7,0	3,0	6,9	4,7	89	19	0,9	0,06	0,10	0,01
16	2,0	2,0	7,0	3,0	7,0	2,9	73	2	0,0	0,0	0,00	0,00
17	1,0	1,0	6,3	2,0	6,3	3,8	100	45	28,6	0,03	0,72	0,30
18	1,0	1,0	6,3	2,0	6,3	3,9	100	44	28,9	0,06	0,75	0,30
19	1,0	1,0	6,3	2,0	6,3	3,6	100	54	30,5	0,03	0,76	0,32

Concentração inicial média de glicose: 15,0 ± 2,0 g/L; xilose: 90,0 ± 10,0 g/L; C<sub>GLI</sub>: consumo percentual de glicose; C<sub>XI</sub>: consumo percentual de xilose; P<sub>XO</sub>: concentração de xilitol e tempo de fermentação: 96 h.

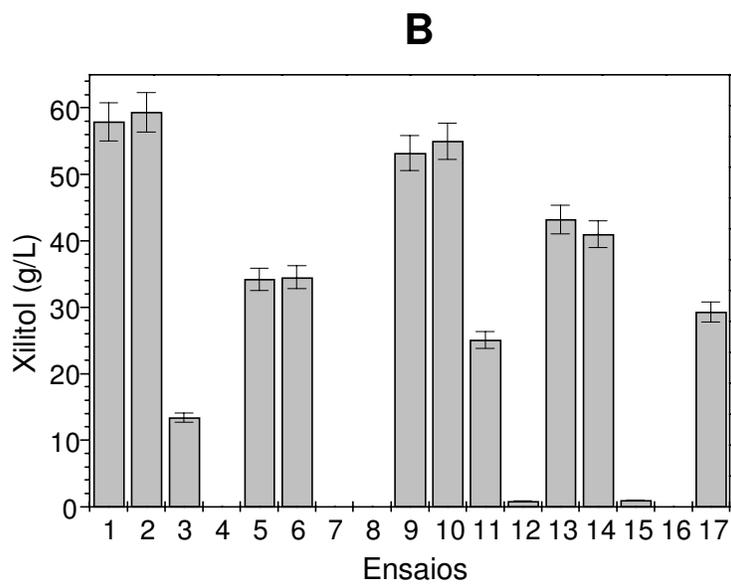
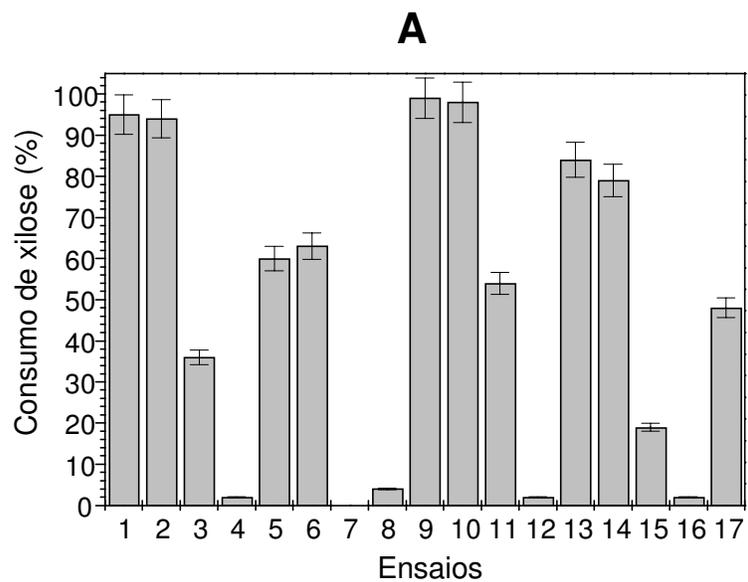


Figura 5.2. Consumo de xilose (A) e produção de xilitol (B) por *C. guilliermondii* sob as diferentes condições de cultivo apresentadas pelo planejamento experimental  $2^4$  utilizado.

Ainda com relação ao meio adicionado com siringaldeído, quando se utilizou a maior concentração celular (3,0 g/L), o consumo de xilose decresceu de 54% para 19% e a produção de xilitol de 25,1 para 0,9 g/L quando o pH aumentou de 5,5 para 7,0. Estes resultados demonstram que a inibição causada pelo siringaldeído foi parcialmente contornada pelo aumento da concentração celular empregando o menor nível de pH. Comportamento semelhante foi encontrado por FELIPE *et al.* (1996) durante a investigação dos efeitos da concentração inicial de células (1,0 e 3,0 g/L) durante a fermentação de hidrolisado de eucalipto para a produção de xilitol por *C. guilliermondii*. Estes autores constataram que o aumento da concentração celular promoveu uma melhora tanto na utilização da xilose quanto na formação de xilitol, o que os mesmos sugeriram ter sido graças a destoxificação do meio de cultivo através da assimilação do ácido acético pela levedura.

Com relação ao efeito do pH na bioconversão de xilose em xilitol empregando meios ausentes de inibidores (ensaios 1, 5, 9 e 13), observa-se claramente que tanto o consumo de xilose quanto a produção de xilitol foram desfavorecidos em valores de pH mais elevados (Fig. 5.2 A e B). Empregando 1,0 g/L de células, verifica-se que o aumento do pH de 5,5 (ensaio 1) para 7,0 (ensaio 5) resultou em uma redução no consumo de xilose de 95 para 60% e na produção de xilitol de 57,9 para 34,2 g/L. Nota-se ainda que este decréscimo foi menos acentuado quando a concentração celular foi de 3,0 g/L, passando de 99 para 84% e de 53,2 para 43,2 g/L, respectivamente. Estes resultados indicam que o pH 7,0 não é adequado para produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037.

RODRIGUES *et al.* (2003) estudando o efeito do pH (3,5, 5,5 e 7,5) na produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, constataram que o pH de 5,5 foi o que proporcionou a melhor conversão de xilose em xilitol. Segundo os autores, em pH 7,5 o metabolismo de xilose foi direcionado para o crescimento celular o que resultou em uma menor conversão em produto. No presente trabalho, o aumento da conversão de substrato em células ( $Y_{x/s}$ ) foi também observado quando o pH do cultivo foi elevado de 5,5 para 7,0 em fermentações ausentes de inibidores, conforme mostrado na Tabela 5.3.

No presente trabalho foi ainda determinada a toxicidade da vanilina e do siringaldeído sobre o crescimento e produção de xilitol por *C. guilliermondii*, estando os resultados sumarizados na Tabela 5.4. O grau de inibição, expresso em porcentagem, foi calculado a partir dos valores obtidos em meios ausentes de inibidores.

Através dos resultados apresentados pela Tabela 5.4, observa-se que o grau de inibição da vanilina sobre o crescimento microbiano foi similar (cerca de 20%) nos ensaios 2, 6 e 14 e um pouco mais pronunciado no ensaio 10 (em torno de 40%). Porém, nota-se que em presença deste composto, a máxima inibição na produção de xilitol foi de apenas 5%, o que corresponde ao ensaio 14, cujo meio de cultivo continha 2,0 g/L de vanilina, 3,0 g/L de células e pH 7,0. Observa-se ainda que nos demais ensaios (2, 6 e 10) a formação do polioli apresentou um discreto excedente em relação aos ensaios não suplementados (1, 5 e 9), o que explica a porcentagem negativa de inibição.

Os resultados referentes ao efeito do siringaldeído sobre o crescimento e produção de xilitol por *C. guilliermondii* apresentados na Tabela 5.4, demonstram claramente a elevada toxicidade deste composto nas condições avaliadas (ensaios 3, 7, 11 e 15). Observa-se que o grau de inibição do siringaldeído sobre o crescimento foi superior a 70% e atingiu 96% quando os ensaios foram conduzidos em pH 7,0 com 1,0 g/L de células. Para a produção de xilitol o grau de inibição foi superior a 75%, com exceção do ensaio 11 (pH = 5,5 e concentração celular = 3,0 g/L) o qual apresentou uma inibição de 53%.

Tabela 5.4. Grau de inibição do crescimento celular ( $GI_X$ ) e da produção de xilitol ( $GI_P$ ) pela vanilina (V) e siringaldeído (S) em diferentes condições de pH e concentração inicial de células ( $X_0$ ), propostas pelo planejamento experimental.

Ensaio	Condições				$GI_X$ (%)	$GI_P$ (%)
	V (g/L)	S (g/L)	pH	$X_0$ (g/L)		
1	0,0	0,0	5,5	1,0	0	0
2	2,0	0,0	5,5	1,0	23	-2
3	0,0	2,0	5,5	1,0	75	77
4	2,0	2,0	5,5	1,0	101	100
5	0,0	0,0	7,0	1,0	0	0
6	2,0	0,0	7,0	1,0	26	-1
7	0,0	2,0	7,0	1,0	96	100
8	2,0	2,0	7,0	1,0	103	100
9	0,0	0,0	5,5	3,0	0	0
10	2,0	0,0	5,5	3,0	43	-3
11	0,0	2,0	5,5	3,0	81	53
12	2,0	2,0	5,5	3,0	109	98
13	0,0	0,0	7,0	3,0	0	0
14	2,0	0,0	7,0	3,0	21	5
15	0,0	2,0	7,0	3,0	78	98
16	2,0	2,0	7,0	3,0	104	100

Nos ensaios suplementados com vanilina e siringaldeído (4, 8 12 e 16), o crescimento celular foi completamente inibido e conseqüentemente o xilitol não foi produzido. Nota-se nestes ensaios que durante as 96 h de cultivo a levedura não foi capaz de se multiplicar no meio, além de ter sido constatado até mesmo uma diminuição na concentração celular, o que explica os valores de inibição superiores a 100%. PALMQVIST *et al.* (1999) durante o estudo da influência de compostos inibitórios sobre a bioconversão de glicose em etanol por *S. cerevisiae*, observaram que quando combinados ácido acético e furfural, os compostos interagiram negativamente causando decréscimo na taxa de crescimento, rendimento em células e em etanol.

De acordo com PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL (2000 a,b), o microrganismo quando inoculado, é exposto a uma solução aquosa com uma

atividade de água relativamente baixa devido à própria composição do meio de cultivo (açúcares, aminoácidos, íons, além do próprio produto de interesse). Quando compostos inibitórios estão presentes ou são adicionados a este meio, o decréscimo na atividade de água torna-se ainda maior. Segundo estes autores, o microrganismo pode suportar esta situação desfavorável até um certo limite, sendo que quando ultrapassado pode levar à morte celular.

DELGENES *et al.* (1996), avaliando diferentes tipos de inibidores na bioconversão de xilose em etanol por *C. shehatae* e *P. stipitis*, constataram que ambos, crescimento e produção de etanol, foram quase totalmente inibidos quando vanilina na concentração de 1,0 g/L ou siringaldeído na concentração de 1,5 g/L foram adicionados ao meio de cultivo.

LEE *et al.* (1999) estudando o efeito inibitório destes compostos na fermentação alcoólica por *S. cerevisiae* verificaram que concentrações de vanilina variando de 1,0 a 2,5 g/L influenciaram a fermentação apenas no estágio inicial, porém após um período de 12 h o processo foi recuperado e no final do cultivo a concentração de etanol e de biomassa foi similar à obtida na fermentação controle. Foi verificado ainda que a levedura não foi capaz de contornar a toxicidade causada pela vanilina em concentrações acima de 3,0 g/L, enquanto que para o siringaldeído a inibição total ocorreu em concentrações acima de 5,0 g/L.

A toxicidade da vanilina e do siringaldeído sobre o crescimento de *E. coli* LY01 em meios contendo xilose como fonte de carbono foi também reportada por ZALDIVAR *et al.* (1999). Segundo os autores a concentração de vanilina necessária para inibir o crescimento celular foi inferior a de siringaldeído (1,5 g/L e 2,5 g/L, respectivamente), o que sugere que a vanilina é mais tóxica do que o siringaldeído.

No presente trabalho ficou demonstrado que o grau de inibição dos aldeídos aromáticos é dependente das condições de cultivo, porém diferentemente do comportamento observado para outros microrganismos, o crescimento da levedura *C. guilliermondii* é inibido em maior grau pelo siringaldeído do que pela vanilina.

O mecanismo de inibição dos compostos fenólicos sobre a atividade microbiana não está totalmente esclarecido na literatura. De acordo com ANDO *et al.* (1986) o grau de inibição destes compostos está relacionado com o grupo

funcional presente no anel de benzeno. Segundo os autores, os aldeídos aromáticos são mais tóxicos do que os ácidos correspondentes e dentre os aldeídos, a vanilina é mais inibitória do que o siringaldeído, devido ao menor grau de metoxilação (O-CH<sub>3</sub>) na molécula. Com base nos resultados da fermentação de *S. cerevisiae*, os autores concluíram que a vanilina é mais tóxica do que o siringaldeído (1,0 g/L de vanilina causou um decréscimo de 30% no rendimento em etanol, enquanto que o siringaldeído na mesma concentração inibiu 18%).

Segundo SIKKEMA *et al.* (1995), a ação inibitória de compostos lipofílicos (compostos fenólicos, por exemplo) é na maioria dos casos diretamente relacionada ao comportamento de partição destes compostos em *n*-octanol/água, o que se sugere que a membrana citoplasmática é o principal alvo da ação tóxica.

ZALDIVAR *et al.* (1999) correlacionaram o grau de inibição dos aldeídos aromáticos com a hidrofobicidade relativa de cada composto, a qual foi medida através do valor de LogP<sub>octanol/água</sub>. De acordo com os autores, foi encontrado um valor de 1,21 para vanilina e de 0,99 para o siringaldeído. Entretanto, nenhum destes compostos causou perda de magnésio intracelular, mesmo em concentrações maiores do que a mínima crítica para o crescimento, sugerindo que o mecanismo de toxicidade destes compostos não está diretamente ligado a perda da integridade da membrana celular, conforme relatado por outros autores (FITZGERALD *et al.*, 2004).

Outro aspecto importante quanto à atividade antimicrobiana de compostos fenólicos foi abordado por FITZGERALD *et al.*, (2003). Estes autores estudaram o efeito da vanilina sobre o crescimento de três tipos de leveduras associadas com a deterioração de alimentos (*S. cerevisiae*, *Z. bailii* e *Z. rouxii*). Utilizando a levedura *S. cerevisiae*, os autores constataram que o álcool vanilil é o principal produto formado durante a bioconversão de vanilina e que este é um processo constitutivo, provavelmente catalisado por uma desidrogenase não específica. Estes autores ainda sugerem que o efeito antimicrobiano da vanilina pode estar relacionado aos processos vitais da célula, seja pela inibição direta das enzimas oxi-redutases ou indiretamente pela inibição das vias que geram os co-fatores reduzidos necessários para estas enzimas

No presente trabalho, foi também verificado que a levedura *C. guilliermondii* é capaz de converter os aldeídos aromáticos em seus respectivos ácidos ou álcoois, sendo o tipo e a quantidade formada dependente das condições experimentais (Figuras 5.3 e 5.4).

A Fig. 5.3 (A e B) mostra os resultados de conversão de vanilina em álcool vanilil durante o cultivo de *C. guilliermondii* em diferentes valores de pH (5,5 ou 7,0) e concentração inicial de células (1,0 ou 3,0 g/L), conforme os ensaios 2, 6, 10 e 14 do planejamento experimental apresentado na Tabela 5.3. Observa-se que para todas as condições avaliadas, *C. guilliermondii* produziu cerca de 2,2 g/L de álcool vanilil com 24 h de cultivo, coincidindo com o esgotamento de vanilina do meio, o que correspondeu a uma conversão de 100%. Nota-se ainda que a concentração do álcool se manteve inalterada à partir das 24 h de cultivo, o que sugere que este composto não foi assimilado pela levedura. Comportamento semelhante foi também observado por EDLIN *et al.* (1995) que demonstraram uma elevada conversão de vanilina (> 80%) em álcool vanilil pela levedura *B. anomalous*, sendo ainda constatado que apenas uma pequena porcentagem de vanilina (4%) foi oxidada a ácido vanílico.

Em fermentações de xilose por *K. pneumoniae* em meio suplementado com vanilina, NISHIKAWA *et al.* (1988) verificaram que o álcool vanilil foi o principal produto metabólico formado durante a assimilação da vanilina. A produção de álcool vanilil foi máxima com 48 h de cultivo, sendo observada uma produção de 0,26 g/L a partir de 0,6 g/L de vanilina, o que correspondeu a uma conversão de 43%. FITZGERALD *et al.* (2003), durante o cultivo de *S. cerevisiae* em meios contendo glicose como fonte de carbono suplementados com diferentes concentrações de vanilina também identificaram o álcool vanilil como principal produto da bioconversão de vanilina, sendo o ácido vanílico detectado em baixos níveis. Por outro lado, elevado rendimento em ácido vanílico foi relatado por TANAKA e IROKANE (2000), durante o cultivo de *B. cepacia* em meios contendo apenas vanilina como substrato, na concentração de 2,0 g/L. O rendimento molar foi de 94% após 32 h de reação. Neste trabalho, os autores também constaram que o siringaldeído é oxidado em ácido siríngico com elevado rendimento (72%), porém com taxas inferiores a da vanilina, uma vez que a máxima produção ocorreu após 70 h.

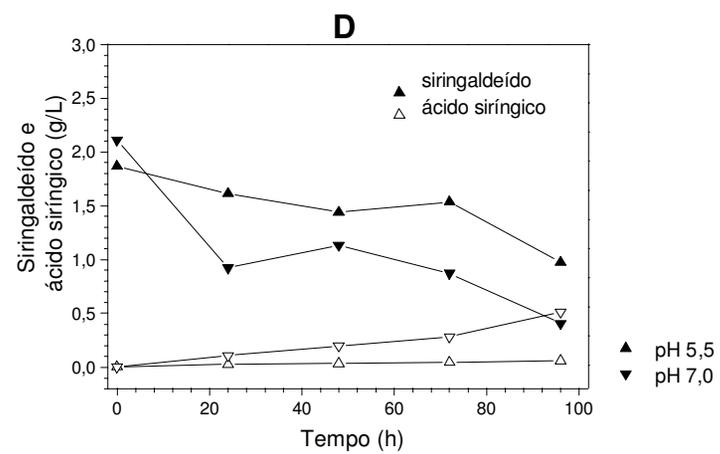
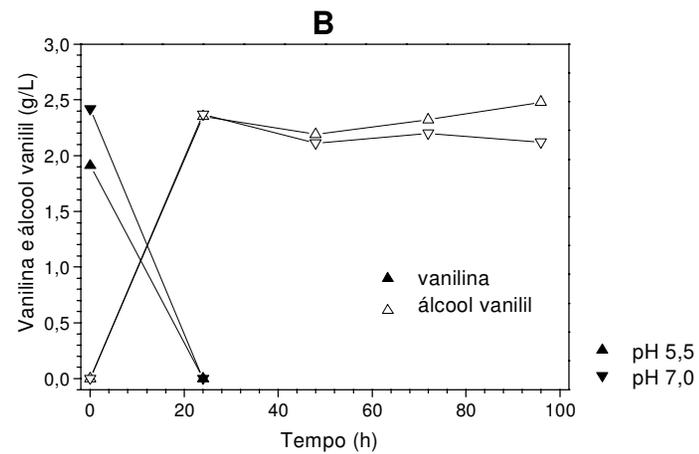
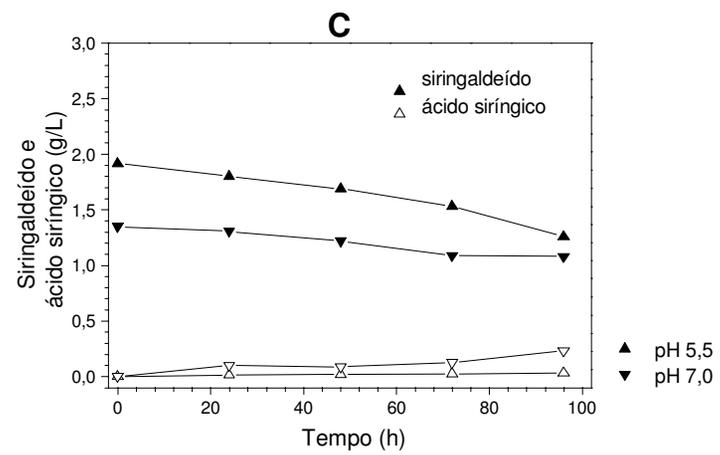
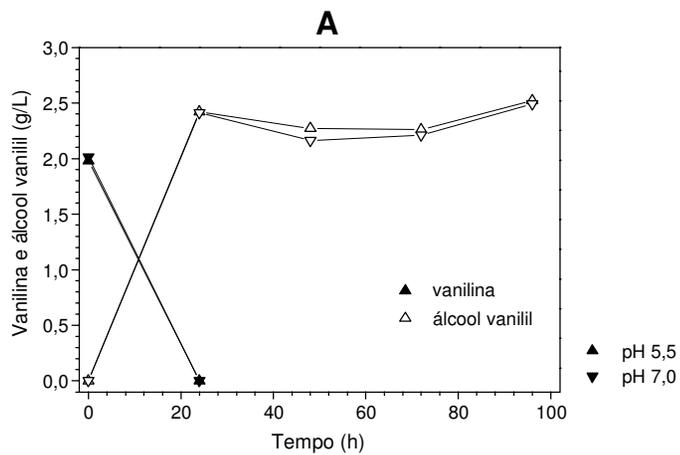


Figura 5.3. Variação das concentrações de vanilina e de álcool vanilil (A e B), de siringaldeído e de ácido síringico (C e D), durante o cultivo de *C. guilliermondii* para bioconversão de xilose em xilitol, sob as condições de concentração celular: 1,0 g/L (A e C) e 3,0 g/L (B e D).

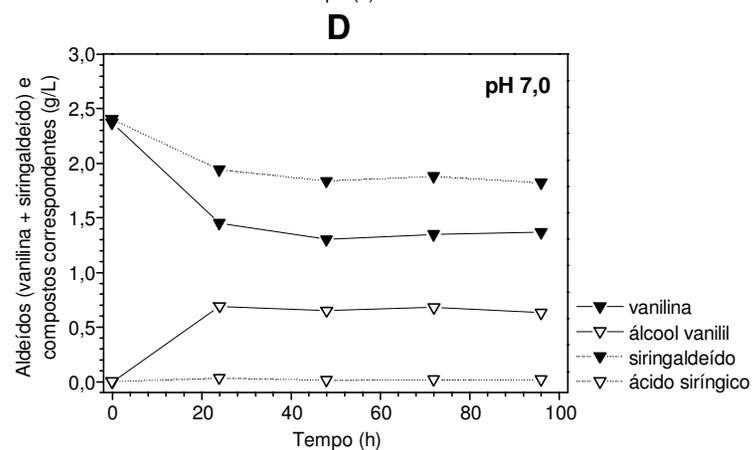
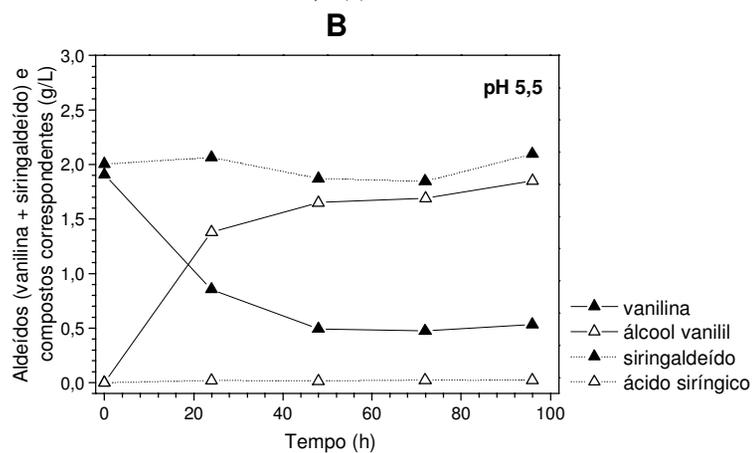
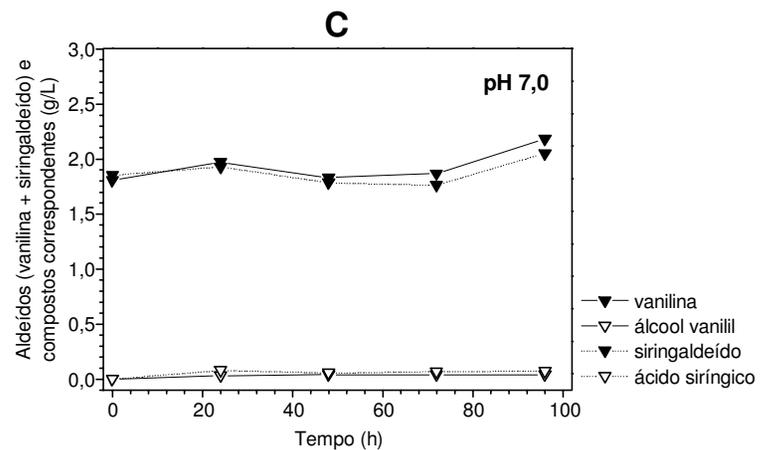
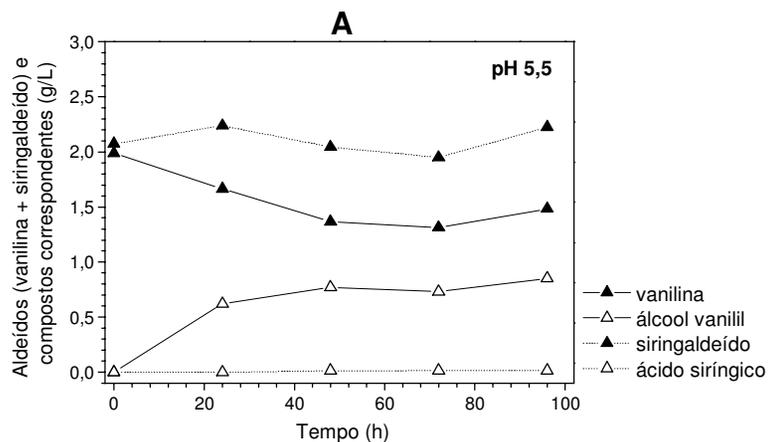


Figura 5.4. Variação da concentração dos aldeídos (vanilina + siringaldeído) e de seus compostos correspondentes, durante o cultivo de *C. guilliermondii* para a bioconversão de xilose em xilitol, sob as condições de concentração celular: 1,0 g/L (A e C) e 3,0 g/L (B e D).

No presente trabalho, a assimilação de siringaldeído por *C. guilliermondii* foi incompleta, para todas as condições testadas, sendo ainda observada uma baixa formação de ácido siríngico (Fig. 5.3 C e D). Nota-se que o aumento na concentração inicial de células favoreceu o consumo do aldeído e que a máxima assimilação (80%) foi verificada após 96 h de cultivo nas condições: pH = 7,0 e  $X_0 = 3,0$  g/L, o que corresponde ao ensaio 15. Nestas condições a concentração de ácido siríngico formada (0,5 g/L) foi ainda muito baixa. Provavelmente, outros produtos metabólicos como álcool siringil, podem ter sido produzidos a partir do siringaldeído, porém este composto não foi analisado.

Na Fig. 5.4 A, B, C e D observa-se os perfis de assimilação do siringaldeído e da vanilina, quando ambos os compostos estão presentes no meio de cultivo (ensaios 4, 8, 12 e 16). Nota-se que em pH 5,5, o aumento da concentração inicial de células de 1,0 para 3,0 g/L (Fig. 5.4 A e B) não favoreceu a assimilação do siringaldeído, ao contrário do observado com a vanilina, já que o consumo desta foi de aproximadamente 74% com formação de cerca de 1,9 g/L de álcool vanilil. Observa-se ainda que em pH 7,0 na presença de 1,0 g/L de células (Fig. 5.4 C), não houve assimilação de ambos os compostos fenólicos, porém, em meio com 3,0 g/L de células (Fig. 5.4 D), tanto a vanilina quanto o siringaldeído foram assimilados, apresentando valores de conversão de 42 e 24%, respectivamente, com formação de 0,6 g/L álcool vanilil e 0,02 g/L de ácido siríngico.

Com relação aos parâmetros fermentativos obtidos nos ensaios do planejamento fatorial  $2^4$  (Figura 5.5), observa-se que dentre os resultados não nulos de bioconversão, o menor fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S} = 0,10$  g/g) por *C. guilliermondii* foi obtido no ensaio 15, o qual foi conduzido nos maiores níveis de pH e de concentração inicial de células, em meio contendo 2,0 g/L de siringaldeído. Nestas condições, a produtividade volumétrica de xilitol também foi baixa ( $Q_P = 0,01$  g/L.h).

Verifica-se também que o maior valor de  $Y_{P/S}$  (0,74 g/g) foi obtido nos ensaios do ponto central, nos quais o meio de cultivo foi suplementado com níveis intermediários de vanilina e siringaldeído (1,0 g/L), pH (6,3) e concentração celular inicial (2,0 g/L). Nota-se ainda, que nestas condições o valor obtido de  $Q_P$  foi inferior aos demais (0,31 g/L.h) e a formação de xilitol foi

de aproximadamente 29,0 g/L. BARBOSA *et al.* (1988) durante o estudo dos fatores que afetam a produção de xilitol por *C. guilliermondii*, após 80 h de cultivo, obtiveram um fator de conversão de xilose em xilitol semelhante ao obtido no presente trabalho (0,74 g/g), porém, os autores constataram a formação de 77,2 g/L de xilitol, e uma produtividade volumétrica de 0,96 g/L.h. Comparando-se os resultados obtidos no presente trabalho com o citado da literatura e considerando as diferenças tanto na composição do meio quanto nas condições de fermentação, observa-se que quando ambos os compostos fenólicos (vanilina e siringaldeído) estão presentes no meio de cultivo a uma concentração total de até 2,0 g/L, em condições próximas da neutralidade (pH 6,3), o fator de conversão não é afetado, porém, nota-se que a produtividade volumétrica assim como a concentração de xilitol são negativamente influenciados, uma vez que a velocidade de assimilação da pentose é inferior à obtida no meio não suplementado. Tal comportamento também foi constatado por VAN ZYL *et al.* (1988), durante o cultivo de *P. stipitis* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de etanol.

O maior valor de produtividade volumétrica ( $Q_P \sim 0,61$  g/L.h) foi observado nos ensaios 1 e 2, os quais foram conduzidos nas condições de menor pH e menor concentração inicial de células, independente da vanilina. Nestas condições foi obtido valor médio de conversão de xilose em xilitol de 0,71 g/g, com formação de aproximadamente 58,0 g/L de xilitol. Estes resultados foram similares aos obtidos por SILVA *et al.* (1996), durante o estudo para avaliação do efeito da concentração de xilose e da idade do inóculo, nas atividades de XR e XD de *C. guilliermondii* FTI 20037, em meio semi-sintético. Utilizando-se um inóculo de 40 h em meio contendo 90,0 g/L de xilose, estes autores obtiveram após 112 h de fermentação, uma concentração de aproximadamente 63,0 g/L de xilitol, com um fator de conversão de xilose em xilitol de 0,70 g/g e produtividade volumétrica de 0,57 g/L.h. Quando comparados tais resultados com os obtidos no presente trabalho, observa-se que, na verdade, as condições utilizadas no presente estudo se mostram mais adequadas para a obtenção de xilitol, uma vez que foram necessários somente 96 h para a total assimilação da xilose para a formação de uma concentração deste poliol similar a encontrada na literatura (~60,0 g/L).

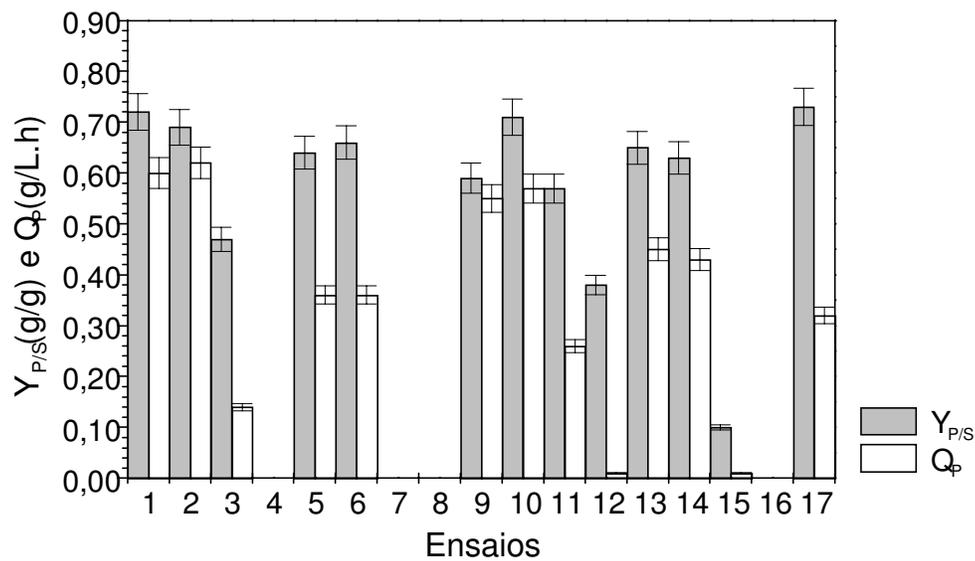


Figura 5.5. Resultados de fator de conversão ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ), obtidos nos ensaios do planejamento experimental  $2^4$  utilizado para o estudo da influência da vanilina e do siringaldeído na bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037.

Além disto, observa-se que a vanilina em concentrações de até 2,0 g/L, realmente não interfere no bioprocesso, uma vez que os resultados obtidos na sua presença foram similares aos obtidos na sua ausência.

Através dos resultados obtidos nas diferentes condições propostas pelo planejamento experimental, observa-se que nas condições estudadas, o processo de bioconversão de xilose em xilitol foi influenciado por todas as variáveis avaliadas (concentração de vanilina e de siringaldeído, concentração inicial de células e pH), porém não seria possível uma análise direta dos efeitos destas variáveis, uma vez os resultados obtidos sugerem que diferentes combinações entre as mesmas tenham interferido nos parâmetros analisados. O próximo passo então, foi empregar a análise estatística para que os efeitos principais bem como suas possíveis interações, pudessem ser convenientemente avaliados.

#### **5.4. Análise Estatística dos Efeitos da Concentração de Inibidores, Concentração Inicial de Células e pH sobre a Bioconversão de Xilose em Xilitol**

Os efeitos individuais e de interação dos fatores (concentração de vanilina e de siringaldeído, pH e concentração celular inicial), sobre os parâmetros da bioconversão de xilose em xilitol foram analisados estatisticamente. Os resultados referentes ao consumo percentual de xilose ( $C_{Xl}$ ), concentração de xilitol ( $P_{XO}$ ), produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) e fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ), mostrados na matriz do planejamento  $2^4$  (Tabela 5.3), foram utilizados como respostas.

Os valores dos efeitos, para as quatro respostas em estudos, estão mostrados no gráfico de Pareto (Figura 5.6 A, B, C e D). O gráfico de Pareto apresenta as estimativas dos valores padronizados dos efeitos sobre as respostas estudadas em ordem decrescente de magnitude. Estes valores são comparados ao valor do teste  $t$  de Student tabelado para o número de graus de liberdade do experimento e o nível de confiança desejado. Valores de efeito maiores que o  $t$  tabelado (linha vertical) são considerados significativos. Para

todas as variáveis respostas analisadas, o valor de  $t$  tabelado foi 2,37, determinado com base nos 5% de significância e 7 graus de liberdade.

Os resultados da análise estatística confirmaram os efeitos sugeridos pela análise direta dos dados, ou seja, os fatores siringaldeído e pH exercem um efeito negativo sobre os parâmetros da bioconversão de xilose em xilitol.

Para as respostas concentração e produtividade volumétrica de xilitol (Fig. 5.6 A e B), nota-se que apenas os efeitos individuais do pH e concentração siringaldeído foram significativos ao nível de confiança de 95%. Verifica-se ainda que estas variáveis apresentaram efeitos negativos sobre as respostas, sugerindo que ambos os parâmetros são favorecidas no menor nível de pH (5,5) e na ausência de siringaldeído. Estes resultados confirmam o elevado grau de toxicidade do siringaldeído e mostram que a vanilina (até 2,0 g/L) não exerce influência sobre estes dois parâmetros, mesmo em pH ácido.

As estimativas dos efeitos para o consumo percentual de xilose estão apresentadas na Fig. 5.6 C. Semelhante ao observado para  $Q_P$  e  $P_{XO}$ , os efeitos individuais do siringaldeído (-15,84) e do pH (-4,82), são também negativos e significativos. No entanto, para esta resposta nota-se um efeito positivo da concentração inicial de células (+2,41) e um efeito negativo da vanilina (-2,93) e de interação entre a vanilina e o siringaldeído (-2,70). O sinal negativo da vanilina sugere que o composto interfere negativamente no consumo da pentose e o de interação sugere um efeito antagônico entre os fatores, ou seja, na presença de ambos compostos, o decréscimo no consumo de xilose foi maior do que a soma dos decréscimos causados pelos compostos individuais.

Quanto à resposta  $Y_{P/S}$  (Fig. 5.6 D), verifica-se que o maior efeito observado foi o da variável siringaldeído (-9,63), seguido pelo efeito da curvatura (+5,03) e do pH (-2,55). Também foi estimado, no mesmo nível de confiança (95%), o efeito de interação significativa entre a vanilina e o siringaldeído (-2,74), similar ao observado para o consumo de xilose. O efeito de curvatura verificado para  $Y_{P/S}$  revela a existência de efeitos quadráticos, bem como de um ponto de máxima conversão dentro da região estudada.

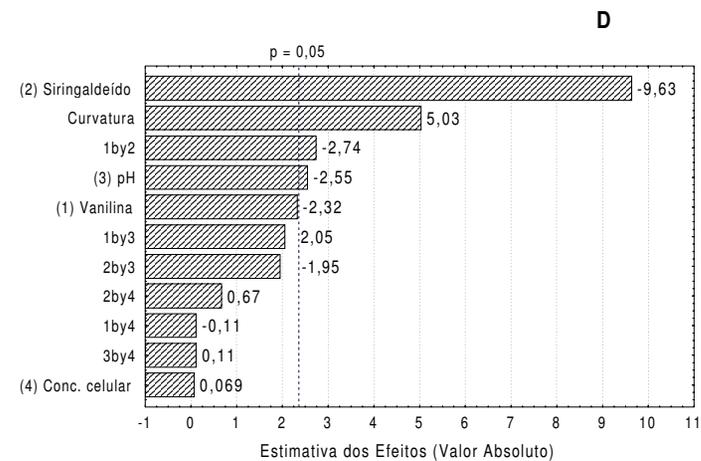
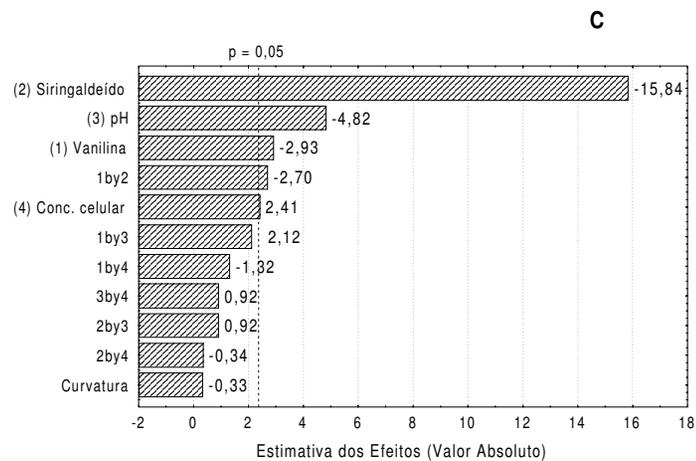
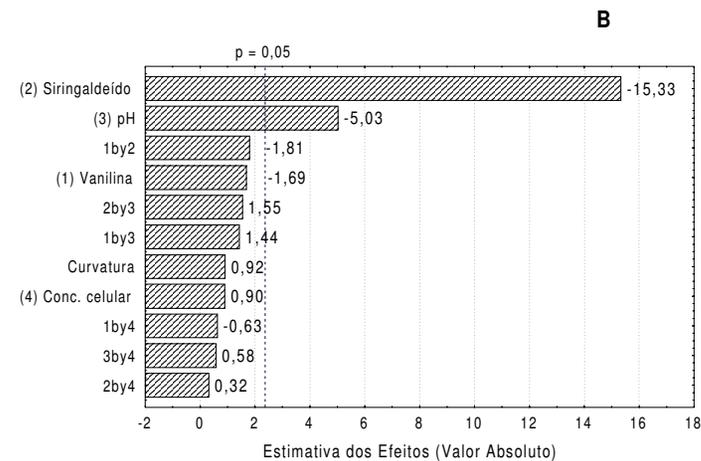
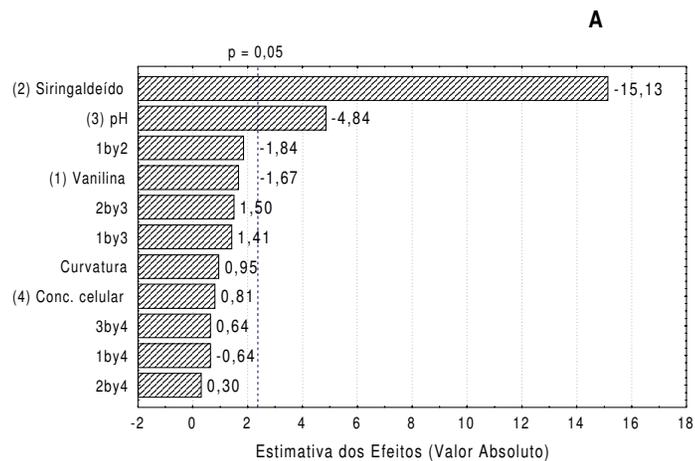


Figura 5.6. Estimativas dos efeitos (ao nível de 95% de confiança) através dos gráficos de pareto das variáveis respostas: (A) produtividade volumétrica em xilitol (g/L.h); (B) concentração de xilitol (g/L); (C) consumo de xilose (%) e (D) fator de conversão em xilitol (g/g).

A significância estatística dos efeitos principais e de interação dos fatores sobre os parâmetros da bioconversão de xilose em xilitol foi confirmada através da análise de variância (Tabela 5.5 A e B). Verifica-se que o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi superior a 0,90 para todas as respostas estudadas, o que demonstra a relevância estatística dos fatores experimentais sobre as respostas avaliadas. Para as respostas  $Q_P$ ,  $P_{XO}$  e  $C_{XI}$  um ajuste linear poderia descrever a influência dos fatores selecionados, porém para a resposta  $Y_{P/S}$  o modelo linear não foi adequado para descrever os dados experimentais devido ao efeito significativo da curvatura ( $p = 0,0015$ ).

Um modelo quadrático consiste na determinação de um maior número de parâmetros, o que requer um maior número de níveis para as variáveis. Dados para a análise de um modelo quadrático podem ser obtidos através da ampliação de um planejamento fatorial. A ampliação pode ser feita de diversas maneiras, dentre as quais encontram-se o planejamento com face centrada e o planejamento estrela.

Ao contrário de um planejamento estrela, que amplia a região estudada, o planejamento com face centrada restringe a região avaliada aos níveis iniciais. Entretanto, este planejamento é adequado no caso de haver limitações físicas para a ampliação dos níveis, bem como no caso de haver alta probabilidade da região ótima encontrar-se dentro da faixa inicial. No presente trabalho, além da impossibilidade de ampliação dos níveis inferiores dos fatores siringaldeído e vanilina, a probabilidade da existência de uma região ótima na faixa experimental estudada é muito grande devido ao efeito significativo da curvatura para a resposta  $Y_{P/S}$ . Desta forma, a influência da vanilina e do siringaldeído sobre a produção de xilitol por *C. guilliermondii* foi investigada através de um planejamento fatorial  $2^2$  composto com face centrada. A matriz do planejamento e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5.6. Estes ensaios foram conduzidos com a variável concentração celular inicial no nível superior (+1 = 3,0 g/L) e o pH no nível inferior (-1 = 5,5), conforme efeitos sugeridos no planejamento fatorial inicial.

Tabela 5.5.A. Análise de variância dos efeitos principais de interação dos fatores sobre a produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ) e concentração de xilitol ( $P_{XO}$ ), obtidos durante a realização dos ensaios do planejamento experimental.

Variável resposta	Fatores	SQ	GL	MQ	F	p
$Q_P$ (g/L.h)	Curvatura	0,0031	1	0,0031	0,90	0,3745
	Vanilina ( $X_1$ )	0,0095	1	0,0095	2,80	0,1384
	Siringaldeído ( $X_2$ )	0,78	1	0,78	229,08	0,0000*
	pH ( $X_3$ )	0,080	1	0,080	23,47	0,0019*
	Concentração celular ( $X_4$ )	0,0023	1	0,0023	0,66	0,4421
	$X_1X_2$	0,012	1	0,012	3,40	0,1078
	$X_1X_3$	0,0068	1	0,0068	2,00	0,2000
	$X_1X_4$	0,0014	1	0,0014	0,41	0,5406
	$X_2X_3$	0,0077	1	0,0077	2,25	0,1771
	$X_2X_4$	0,00031	1	0,00031	0,090	0,7728
	$X_3X_4$	0,0014	1	0,0014	0,41	0,5406
	Erro	0,024	7	0,0034		
$R^2 = 0,97$	Total	0,92851	18			
$P_{XO}$ (g/L)	Curvatura	25,50	1	25,50	0,84	0,3901
	Vanilina ( $X_1$ )	86,96	1	86,96	2,86	0,1345
	Siringaldeído ( $X_2$ )	7144,48	1	7144,48	235,13	0,0000*
	pH ( $X_3$ )	768,68	1	768,68	25,30	0,0015*
	Concentração celular ( $X_4$ )	24,75	1	24,75	0,81	0,3968
	$X_1X_2$	99,50	1	99,50	3,27	0,1133
	$X_1X_3$	62,81	1	62,81	2,07	0,1937
	$X_1X_4$	12,08	1	12,08	0,40	0,5484
	$X_2X_3$	72,68	1	72,68	2,39	0,1659
	$X_2X_4$	2,98	1	2,98	0,098	0,7634
	$X_3X_4$	10,40	1	10,40	0,34	0,5769
	Erro	212,69	7	30,38		
$R^2 = 0,97$	Total	8523,51	18			

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática

\* $F_{\text{tabelado}}(5,10,8) = 3,35$

Tabela 5.5.B. Análise de variância dos efeitos principais de interação dos fatores sobre o consumo percentual de xilose ( $C_{X1}$ ) e fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ), obtidos durante a realização dos ensaios do planejamento experimental.

Variável resposta	Fator	SQ	GL	MQ	F	p
$C_{X1}$ (%)	Curvatura	8,49	1	8,49	0,11	0,7479
	Vanilina ( $X_1$ )	650,25	1	650,25	8,56	0,0221*
	Siringaldeído ( $X_2$ )	19044,00	1	19011,00	250,74	0,0000*
	pH ( $X_3$ )	1764,00	1	1764,00	23,22	0,0019*
	Concentração celular ( $X_4$ )	441,00	1	441,00	5,81	0,0468*
	$X_1X_2$	552,25	1	552,25	7,27	0,0308*
	$X_1X_3$	342,25	1	342,25	4,51	0,0714
	$X_1X_4$	132,25	1	132,25	1,74	0,2285
	$X_2X_3$	64,00	1	64,00	0,84	0,3892
	$X_2X_4$	9,00	1	9,00	0,12	0,7408
	$X_3X_4$	64,00	1	64,00	0,84	0,3892
	Erro		531,67	7	75,95	
$R^2 = 0,97$	Total	23603,16	18			
$Y_{P/S}$ (g/g)	Curvatura	0,30	1	0,30	25,28	0,0015*
	Vanilina ( $X_1$ )	0,06	1	0,06	5,39	0,0532*
	Siringaldeído ( $X_2$ )	1,10	1	1,10	92,82	0,0000*
	pH ( $X_3$ )	0,08	1	0,08	6,51	0,0380*
	Concentração celular ( $X_4$ )	0,00	1	0,00	0,00	0,9469
	$X_1X_2$	0,88	1	0,88	7,49	0,0291*
	$X_1X_3$	0,49	1	0,49	4,19	0,0799
	$X_1X_4$	0,00	1	0,00	0,01	0,9117
	$X_2X_3$	0,04	1	0,04	3,82	0,0916
	$X_2X_4$	0,00	1	0,00	0,44	0,5262
	$X_3X_4$	0,00	1	0,00	0,01	0,9117
	Erro		0,08	7	0,01	
$R^2 = 0,95$	Total	1,81	18			

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática

\* $F_{\text{tabelado}}(5,10,8) = 3,35$

Tabela 5.6. Matriz do planejamento experimental completo  $2^2$  com face centrada e 3 repetições no ponto central, utilizada para a avaliação da influência da vanilina (V;  $X_1$ ) e do siringaldeído (S;  $X_2$ ) no consumo percentual de xilose ( $C_{XI}$ ), na concentração de xilitol ( $P_{XO}$ ), no fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) e na produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ).

Ensaio	Níveis codificados		Níveis reais (g/L)		$C_{XI}$ %	$P_{XO}$ (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)	$Q_P$ (g/L.h)
	$X_1$	$X_2$	V	S				
1	-1	-1	0	0	99	53,2	0,59	0,55
2	1	-1	2,0	0	94	64,2	0,80	0,67
3	-1	1	0	2,0	58	32,8	0,63	0,34
4	1	1	2,0	2,0	2	0,78	0,39	0,01
5	-1	0	0	1,0	64	53,3	0,78	0,55
6	1	0	2,0	1,0	51	43,0	0,79	0,45
7	0	-1	1,0	0	89	75,0	0,77	0,78
8	0	1	1,0	2,0	34	23,6	0,63	0,25
9	0	0	1,0	1,0	52	45,3	0,81	0,47
10	0	0	1,0	1,0	60	40,1	0,77	0,42
11	0	0	1,0	1,0	59	43,7	0,83	0,46

Concentração média de glicose = 15,0 g/L; xilose = 95,0 g/L

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5.6, pode-se observar que, de uma maneira geral, os melhores resultados do fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S} = 0,80$  g/g) foram obtidos nos ensaios do ponto central, isto é, com as variáveis siringaldeído e vanilina nos seus níveis intermediários (0 = 1,0 g/L). Tanto o aumento conjunto das duas variáveis (ensaio 4) quanto sua redução para o nível -1 (ensaio 1) resultaram um decréscimo no valor de  $Y_{P/S}$ . Entretanto, este decréscimo foi bem mais acentuado quando os valores das variáveis foram aumentados ( $Y_{P/S} = 0,39$  g/g) do que quando foram reduzidos ( $Y_{P/S} = 0,58$  g/g). Estes resultados confirmam a existência de um ponto de máxima conversão dentro da região estudada. Nota-se ainda que a conversão foi favorecida quando concentrações intermediárias dos dois compostos estão presentes no meio.

Ao contrário do comportamento observado para o fator de conversão, os resultados de produtividade volumétrica foram maiores nos ensaios 2 e 7

( $Q_P \sim 0,70$  g/L.h), os quais foram conduzidos na ausência de siringaldeído e adicionados de vanilina nas concentrações de 2,0 e 1,0 g/L, respectivamente. Estes resultados confirmam o acentuado efeito inibitório do siringaldeído sobre a produtividade volumétrica do xilitol. Além disto, pode-se concluir que a vanilina, em concentrações até 2,0 g/L, não interfere na produtividade em xilitol.

Foi elaborada então, uma análise de variância de regressão para os modelos representativos de todas as variáveis respostas avaliadas ( $C_{XI}$ ,  $P_{XO}$ ,  $Y_{P/S}$  e  $Q_P$ ), sendo os resultados apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Análise de variância de regressão para os modelos representativos do consumo percentual de xilose ( $C_{XI}$ ), concentração de xilitol ( $P_{XO}$ ), fator de conversão ( $Y_{P/S}$ ) e produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P$ ), obtidos durante a realização dos ensaios do planejamento experimental.

Variável resposta	Fonte	SQ	GL	MQ	F	p
$C_{XI}$ (%) <sup>I</sup>	Modelo	7453,58	3	2484,53	64,40	< 0,0001
	Resíduo	270,05	7	38,58		
	<i>Falta de ajuste</i>	232,05	5	46,41	2,44	0,3155
	<i>Erro puro</i>	38,00	2	19,00		
$R^2 = 0,96$	Total	7723,64	10			
$P_{XO}$ (g/L) <sup>II</sup>	Modelo	3673,58	3	1224,53	29,89	0,0002
	Resíduo	286,75	7	40,96		
	<i>Falta de ajuste</i>	272,57	5	54,51	7,69	0,1191
	<i>Erro puro</i>	14,19	2	7,09		
$R^2 = 0,93$	Total	3960,33	10			
$Y_{P/S}$ (g/g) <sup>III</sup>	Modelo	0,17	5	0,035	25,92	0,0014
	Resíduo	0,0067	5	0,0013		
	<i>Falta de ajuste</i>	0,0048	3	0,0016	1,73	0,3868
	<i>Erro puro</i>	0,0019	2	0,00093		
$R^2 = 0,96$	Total	0,18	10			
$Q_P$ (g/L.h) <sup>IV</sup>	Modelo	0,39	3	0,13	29,47	0,0002
	Resíduo	0,031	7	0,0045		
	<i>Falta de ajuste</i>	0,030	5	0,0060	8,53	0,1082
	<i>Erro puro</i>	0,0014	2	0,00070		
$R^2 = 0,93$	Total	0,43	10			

SQ = soma quadrática; GL = graus de liberdade; MQ = média quadrática

I, II, IV:  $F_{\text{tabelado}}(5,3,7) = 4,35$ ; III:  $F_{\text{tabelado}}(5,5,5) = 5,05$

Através da análise de variância de regressão do modelo (Tabela 5.7), nota-se que as variáveis respostas apresentam valores de coeficiente de determinação ( $R^2$ ) superiores a 0,93. Além disto, comparando-se os valores de  $F$  determinados com os valores de  $F$  tabelados, observa-se que os modelos matemáticos são significativos ( $p < 0,001$ ) e não apresentam falta de ajuste, ao nível de 95% de confiança, o que significa que a diferença entre os valores obtidos experimentalmente e os valores previstos pela equação do modelo pode ser explicada pelo erro experimental.

Com base nos dados obtidos da análise de variância, os modelos matemáticos para descrever o consumo percentual de xilose ( $Y_1$ ), a concentração de xilitol ( $Y_2$ ), o fator de conversão ( $Y_3$ ) e a produtividade volumétrica em xilitol ( $Y_4$ ), na região em estudo, são apresentados nas Equações 5.2, 5.3, 5.4 e 5.5, respectivamente.

$$Y_1 = 60,2 - 12,3X_1 - 31,3X_2 - 12,7X_1X_2 \quad (\text{Equação 5.2})$$

$$Y_2 = 43,2 - 5,2X_1 - 22,5X_2 - 10,7X_1X_2 \quad (\text{Equação 5.3})$$

$$Y_3 = 0,82 - 0,0033X_1 - 0,085X_2 - 0,060X_1^2 - 0,14X_2^2 - 0,11X_1X_2 \quad (\text{Equação 5.4})$$

$$Y_4 = 0,45 - 0,052X_1 - 0,23X_2 - 0,11X_1X_2 \quad (\text{Equação 5.5})$$

Em que:

$Y_1$  = consumo de xilose (%);

$Y_2$  = concentração de xilitol (g/L);

$Y_3$  = fator de conversão de xilose em xilitol (g/g);

$Y_4$  = produtividade volumétrica em xilitol (g/L.h);

$X_1$  = variável codificada que representa a concentração de vanilina e

$X_2$  = variável codificada que representa a concentração de siringaldeído.

As equações 5.2 a 5.5 possibilitam a obtenção de superfícies de resposta, representativas de cada variável resposta, na região estudada (Figura 5.7 A, B, C e D).

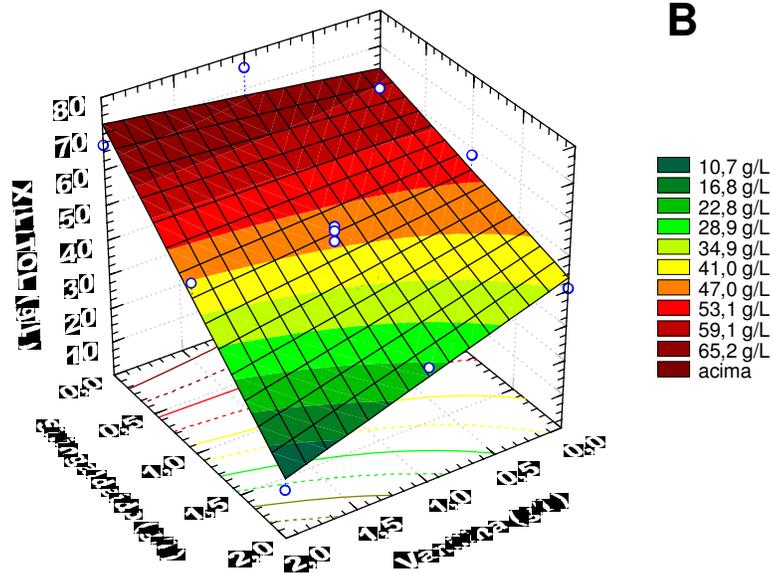
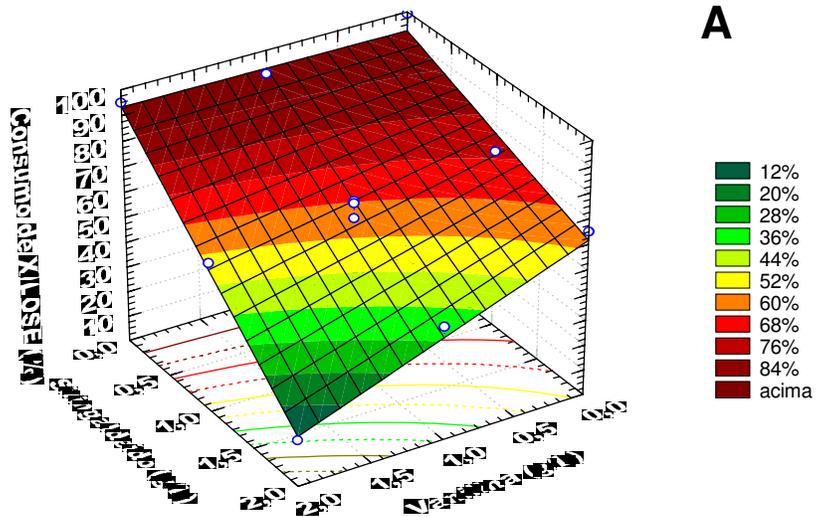


Figura 5.7. Superfícies de resposta descritas pelos modelos que representam o consumo percentual de xilose (A) e a concentração de xilitol (B), obtidos pelo cultivo de *C. guilliermondii* em função das concentrações de vanilina e siringaldeído, empregando-se 3,0 g/L de células e pH 5,5.

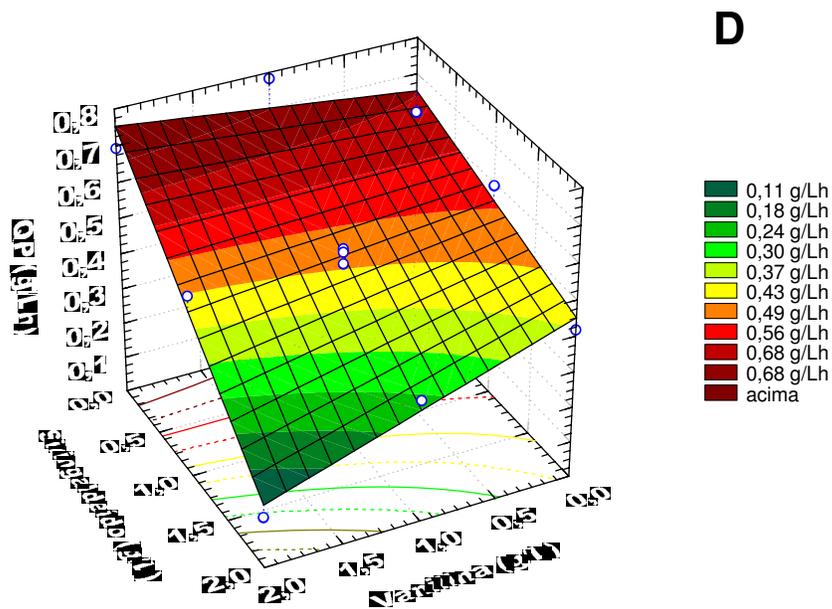
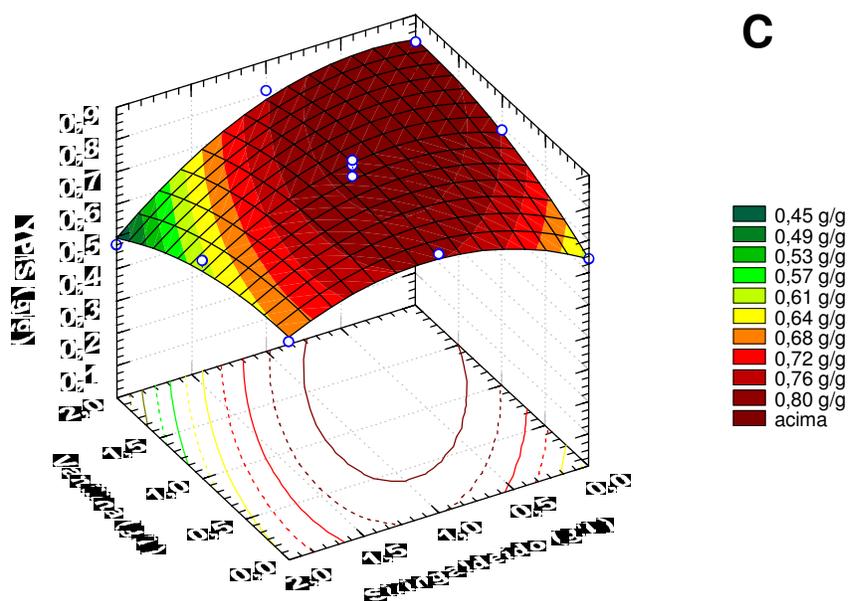


Figura 5.7. Superfícies de resposta descritas pelos modelos que representam o fator de conversão de xilose em xilitol (C) e produtividade volumétrica em xilitol (D), obtidos pelo cultivo de *C. guilliermondii* em função das concentrações de vanilina e siringaldeído, empregando-se 3,0 g/L de células e pH 5,5.

Na Fig. 5.7 A está representada a superfície de resposta do consumo percentual de xilose. Observa-se que um valor máximo na variável resposta ( $Y_1 = 92 \pm 15\%$ ) é obtido tanto na ausência de ambos compostos fenólicos, quanto na presença de vanilina e ausência de siringaldeído.

Quando observada a formação de xilitol (Fig. 5.7 B), nota-se que o valor máximo de  $71,2 \pm 20,0$  g/L é obtido na presença de vanilina em seu maior nível (+1 = 2,0 g/L) e de siringaldeído em seu menor nível (-1 = 0 g/L).

De acordo com a superfície de resposta que representa o fator de conversão de xilose em xilitol (Fig. 5.7 C), a região em estudo possui um ponto de máximo ( $0,84 \pm 0,10$  g/g) situado nos níveis codificados: + 0,40 de vanilina (representando 1,4 g/L do compostos) e -0,39 de siringaldeído (0,6 g/L de siringaldeído).

A produtividade volumétrica de xilitol (Fig. 5.7 D) é representada por uma superfície de resposta, cujo valor máximo  $0,74 \pm 0,20$  g/L.h se encontra no menor nível de siringaldeído (-1 = 0 g/L) e no maior nível de vanilina (+1 = 2,0 g/L).

## 5.5. Otimização e Confirmação dos Modelos Obtidos

A otimização do processo de biocobertura da xilose em xilitol em meios contendo compostos aromáticos (vanilina e siringaldeído) foi efetuada com o auxílio do programa estatístico “Design-Expert”, por meio da sobreposição das curvas de nível dos modelos, de forma a se obter resposta a critérios impostos. Dentre os modelos que representam os parâmetros avaliados (consumo percentual de xilose, concentração de xilitol, fator de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica de xilitol), foram priorizados os dois últimos ( $Y_{P/S}$  e  $Q_P$ ), por se apresentarem como parâmetros importantes na análise de custo de processos de bioconversão, ou seja, a busca de uma conversão completa do substrato em um menor período de tempo. A maximização dos demais parâmetros foi baseada nos resultados obtidos pelos dois modelos anteriormente mencionados.

Nas condições em estudo, ao se buscar a otimização do processo começando, por exemplo, na região onde se encontra um valor máximo de

conversão de xilose em xilitol ( $\sim 0,84$  g/g), nota-se que neste ponto (aproximadamente 1,3 g/L de vanilina e 0,63 g/L de siringaldeído) se obtém uma produtividade volumétrica cerca de 28% menor do que o valor máximo previsto, de aproximadamente 0,74 g/L.h, o que sugere que a presença dos compostos fenólicos na faixa de concentração avaliada pode favorecer a conversão, porém prejudica a produtividade, uma vez que a assimilação da pentose se torna mais lenta. Segundo PALMQVIST e HAHN-HÄGERDAL (2000 a), os compostos inibitórios limitam a utilização eficiente dos substratos presentes no meio de cultivo para a formação do produto de interesse via processo fermentativo.

Deste modo, as respostas foram maximizadas em conjunto e os critérios foram convenientemente selecionados de forma a manter as variáveis independentes na faixa em estudo e os valores estimados para as variáveis respostas avaliadas dentro de uma faixa que permitiu a sobreposição dos modelos. Nestas condições, buscou-se um valor de fator de conversão de xilose em xilitol levando-se em conta a produtividade volumétrica, sendo portanto os critérios selecionados 0,71 g/g e 0,64 g/L.h, respectivamente. Com base neste critério, também foram selecionados: consumo de xilose de 82% com produção de 61,3 g/L de xilitol. O gráfico de sobreposição resultante pode ser visualizado na Figura 5.8. Este gráfico fornece uma área (em cinza) na qual são satisfeitas as condições impostas. O ponto para a maximização dos parâmetros foi assinalado no gráfico, e correspondeu a 1,6 g/L de vanilina (nível codificado +0,6) e ausência de siringaldeído (nível codificado -1,0). Nestas condições são previstos (ao nível de 95% de confiança): fator de conversão de  $0,80 \pm 0,07$  g/g e produtividade volumétrica em xilitol de  $0,72 \pm 0,10$  g/L.h, com um consumo de xilose de  $92 \pm 10\%$  e formação de  $69,0 \pm 9,7$  g/L de xilitol. Este ponto foi então designado como o ponto de ótimo, e dois ensaios de confirmação do modelo obtido foram realizados tendo em vista as condições por ele definidas, ou seja, meio semi-sintético suplementado com 1,6 g/L de vanilina, com 3,0 g/L de células e pH 5,5.

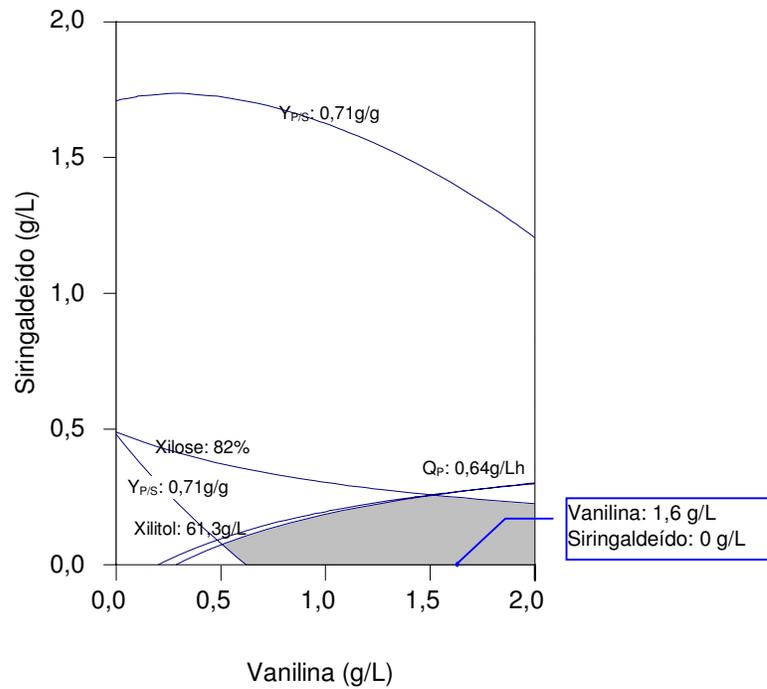


Figura 5.8. Gráfico de sobreposição utilizado para a otimização das variáveis respostas avaliadas, na região em estudo.

Deste modo, o comportamento cinético obtido durante a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* nas condições otimizadas está apresentado na Figura 5.9 A e B e os resultados do processo fermentativo, obtidos com 96 h de cultivo, são visualizados na Tabela 5.8. Tais resultados foram determinados a partir da média dos resultados obtidos nos dois ensaios de confirmação.

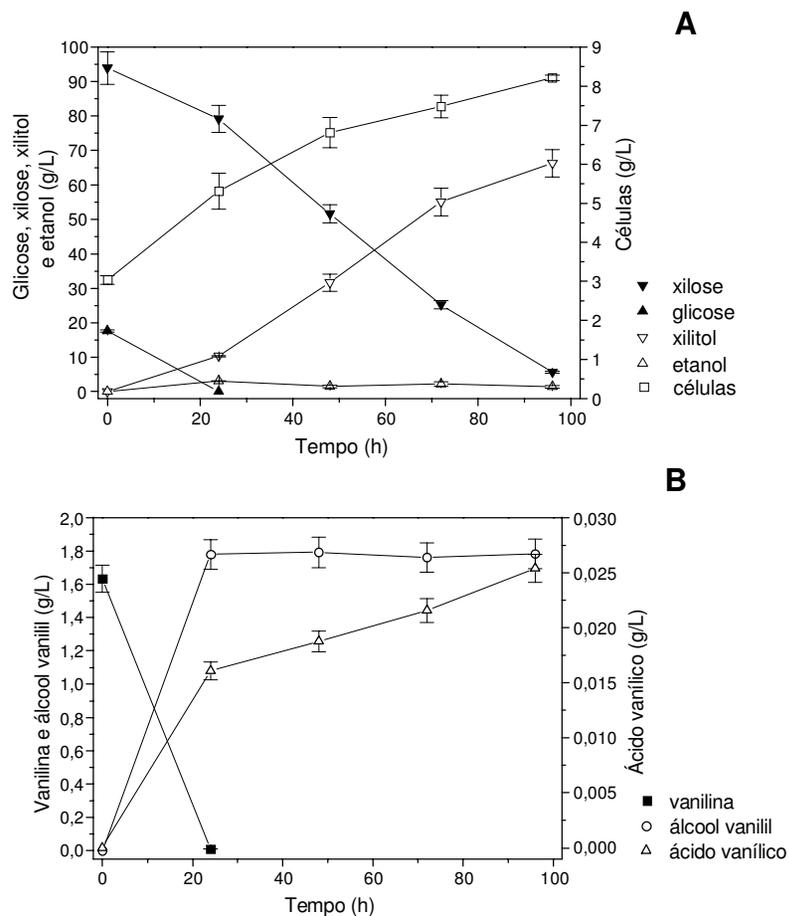


Figura 5.9. Ensaio fermentativo para produção de xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético nas condições otimizadas (1,6 g/L de vanilina, 3,0 g/L de células e pH 5,5).

Tabela 5.8. Parâmetros fermentativos obtidos durante os ensaios para a confirmação do modelo otimizado para a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, em meio semi-sintético suplementado com 1,6 g/L de vanilina.

Parâmetros	Resultados
Tempo de fermentação (h)	96
Consumo percentual de xilose	94 ± 0,08 (92 ± 10)
Consumo percentual de glicose	100 ± 0
Conversão percentual de vanilina	100 ± 0
Concentração celular (g/L)	8,2 ± 0,07
Concentração de xilitol (g/L)	66,3 ± 4 (69,0 ± 9,7)
Concentração de etanol (g/L)	1,4 ± 0,3
Concentração de álcool vanilil (g/L)	1,8 ± 0,09
Concentração de ácido vanílico (g/L)	0,025 ± 0,001
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,77 ± 0,01 (0,80 ± 0,07)
$Q_P$ (g/L.h)	0,69 ± 0,04 (0,72 ± 0,1)
Rendimento em xilitol (% do teórico)	84

( ) = valores previstos pelo modelo otimizado

Observando-se os valores do consumo percentual de xilose ( $94 \pm 0,08\%$ ), da concentração de xilitol ( $66,3 \pm 4$  g/L), de  $Y_{P/S}$  ( $0,77 \pm 0,01$  g/g) e de  $Q_P$  ( $0,69 \pm 0,04$  g/L.h) apresentados na Tabela 5.8, nota-se que o modelo descreve bem a região em estudo, uma vez que tais resultados estão dentro da faixa de variação prevista por este mesmo modelo ( $92 \pm 10\%$ ,  $69,0 \pm 9,7$  g/L,  $0,80 \pm 0,07$  g/g e  $0,72 \pm 0,1$  g/L.h, respectivamente). Estes resultados foram superiores aos encontrados por SILVA *et al.* (1996), durante o processo de bioconversão de 90,0 g/L de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037, cultivada em meio semi-sintético, para a avaliação do efeito da concentração de xilose e idade do inóculo sobre o bioprocessamento. Como reportado anteriormente, estes autores obtiveram uma concentração de xilitol de 63,4 g/L, com  $Y_{P/S}$  igual a 0,70 g/g e  $Q_P$  de 0,57 g/L.h, após 112 h de cultivo.

Através dos resultados obtidos nos ensaios de confirmação do modelo otimizado, observa-se que em presença de vanilina (em concentrações de até 2,0 g/L) e quando empregados pH ótimo para a produção de xilitol (5,5) e uma concentração celular inicial relativamente alta (3,0 g/L), o processo de bioconversão de xilose em xilitol pode ser favorecido, obtendo-se resultados satisfatórios de conversão de xilose no poliol (84% do valor teórico). Quanto à produtividade volumétrica em xilitol, estratégias devem ser tomadas com o intuito de se aumentar o valor deste parâmetro fermentativo.

Uma vez determinada a condição otimizada para a bioconversão de xilose em xilitol em meio contendo vanilina como composto representativo de produtos de degradação de lignina, foram realizados ensaios fermentativos em hidrolisado de palha de arroz, visando comparar o grau de toxicidade do hidrolisado frente aos comportamentos observados no meio semi-sintético. Para tal propósito, foram utilizadas a concentração inicial de células e o pH inicial empregados nos ensaios de otimização, ou seja, 3,0 g/L de 5,5, respectivamente.

## 5.6 Caracterização do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Arroz

Para o estudo da toxicidade do hidrolisado no cultivo de *C. guilliermondii* para a obtenção de xilitol, foram realizados ensaios em hidrolisado seis vezes concentrado (concentração de xilose de ~90,0 g/L), não tratado (HC) e destoxificado com carvão ativado (HDC).

Numa etapa preliminar, foi feita uma caracterização de ambos os hidrolisados, sendo os resultados apresentados na Tabela 5.9. Os níveis de compostos tóxicos em ambos os hidrolisados, em geral, encontram-se abaixo do limite reportado como inibitório, portanto, pode-se concluir que hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz é um meio apropriado para o processo de bioconversão de xilose em xilitol, em especial quando é destoxificado para a redução das concentrações dos compostos inibitórios. Não se descarta ainda, a hipótese de haver inibição, causada pelo efeito sinérgico dos compostos (mesmo quando encontrados em baixos níveis).

A partir dos resultados obtidos na caracterização dos hidrolisados, foi determinada a eficiência do tratamento com carvão ativado na destoxificação do meio, baseando-se na composição do hidrolisado não tratado. Deste modo, os resultados foram expressos como remoção percentual dos compostos inibitórios da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, sendo determinados para todos os métodos de análise empregados (cromatografia e espectrofotometria) e apresentados na Tabela 5.10.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.10, nota-se que o tratamento com carvão ativado é eficiente na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, uma vez que foram obtidos valores de remoção superiores a 89%. Além disto, observa-se que a metodologia de unidades arbitrárias de absorvância pode ser utilizada para determinação do grau de remoção de compostos inibitórios (furanos e compostos fenólicos), pois além de constituir um método de fácil aplicação, fornece valores similares aos obtidos no método cromatográfico. Através do tratamento, os compostos inibitórios foram parcialmente removidos do hidrolisado, tornando-o um meio de cultivo mais favorável para o desenvolvimento do microrganismo.

Tabela 5.9. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado 6 vezes, utilizado no cultivo de *C. guilliermondii* FT1 20037 para obtenção de xilitol.

	Hidrolisado	
	HC	HDC
<i>pH</i>	0,46	0,65
<i>Açúcares (g/L)</i>		
Glicose	7,3	10,5
Xilose	85,3	86,4
Arabinose	13,6	13,5
<i>Ácidos carboxílicos (g/L)</i>		
Ácido acético	2,4	1,9
<i>Furanos (g/L)</i>		
Furfural	0,080	0,039
5-Hidroximetilfurfural	nd	nd
<i>Compostos fenólicos HPLC (g/L)</i>		
Ácido vanílico	0,0019	nd
Ácido siríngico	0,036	nd
Vanilina	0,031	nd
Siringaldeído	0,76	nd
Ácido ferúlico	0,66	nd
<i>Total de compostos fenólicos (HPLC) (g/L)</i>	1,49	nd
<i>Compostos fenólicos totais pelo método de Folin (g/L) (Espectrofotometria UV-visível) (g/L)</i>		
	6,6	0,70
<i>Total de compostos inibitórios (furanos + compostos fenólicos) (HPLC) (g/L)</i>		
	1,57	0,039
<i>Unidades arbitrárias de absorbância (280 nm) (Espectrofotometria UV-visível) (ua)</i>		
	303,6	23,6

HC = hidrolisado não tratado; HDC = hidrolisado destoxificado com carvão ativado; nd = não detectado

Tabela 5.10. Resultados de remoção percentual dos compostos inibitórios (furanos e compostos fenólicos) da bioconversão de xilose em xilitol, após tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz (concentrado 6 vezes) com carvão ativado.

Método de análise	Remoção dos compostos inibitórios (%)
<i>Cromatografia (HPLC)</i>	
-Detector UV a 276 nm	98
<i>Espectrofotometria (UV-visível)</i>	
-Folin-Ciocalteau (padrão vanilina)	89
-Unidades arbitrárias de absorbância (280nm)	92

## 5.7. Ensaios Fermentativos de Bioconversão de Xilose em Xilitol por *Candida guilliermondii* Cultivada em Hidrolisado de Palha de Arroz

Nesta etapa, o estudo da bioconversão de xilose em xilitol foi realizado primeiramente em hidrolisado não tratado e concentrado seis vezes (HC), com o intuito de se verificar o comportamento cinético da levedura em presença de compostos que podem interferir na sua atividade metabólica, prejudicando assim a formação do produto de interesse. Em seguida, *C. guilliermondii* foi cultivada no hidrolisado de palha de arroz destoxificado com carvão ativado e concentrado 6 vezes (HDC), visando comparar os resultados de bioconversão entre os dois tipos de hidrolisados utilizados.

Como verificado anteriormente, a vanilina numa concentração de até 2,0 g/L, tem efeito positivo sobre o processo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, quando utilizado meio semi-sintético como meio de cultivo. Numa etapa posterior, foi então verificada a influência deste composto na formação do polioli, quando em meio constituído por hidrolisado, seguindo as condições determinadas na etapa de otimização do bioprocessamento. Para tal propósito, vanilina (1,6 g/L) foi adicionada ao hidrolisado hemicelulósico destoxificado com carvão ativado e concentrado, no qual a concentração de compostos potencialmente tóxicos foi nula, HDV. Os resultados obtidos, foram então comparados aos resultados obtidos no ensaio de confirmação do modelo otimizado.

Devido ao favorecimento na bioconversão de xilose em xilitol quando adicionados sais de fosfato na concentração de 0,6 M, ou seja, 68,9 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 22,1 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , aos meios de cultivo constituídos por meio semi-sintético, optou-se por seguir a mesma metodologia no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Os resultados obtidos não foram satisfatórios, uma vez que após a adição dos sais houve precipitação de compostos (não identificados), o que acarretou baixos resultados de bioconversão (dados não apresentados). Desta forma, nesta etapa do trabalho os sais de fosfato de potássio não foram adicionados ao hidrolisado de palha de arroz.

Os comportamentos cinéticos obtidos durante o cultivo em hidrolisado não tratado e concentrado 6 vezes (HC), destoxificado com carvão ativado e

concentrado 6 vezes (HDC) e destoxificado (concentrado 6 vezes) e suplementado com vanilina (HDV), são visualizados na Figura 5.10 A, B e C.

Na Figura 5.10 A está apresentado o crescimento celular de *C. guilliermondii* frente aos diferentes hidrolisados avaliados (HC, HDC e HDV). Observando-se o comportamento cinético entre HC e HDV, nota-se que apesar do hidrolisado não tratado (HC) ter se iniciado com uma concentração celular inferior (2,2 g/L), ambos os ensaios apresentaram uma variação de crescimento semelhante (1,9 vezes), obtendo-se ao final um valor de 4,1 e 4,9 g/L de células, respectivamente. Quando o hidrolisado foi destoxificado com carvão ativado (HDC), nota-se um aumento na formação de biomassa, atingindo um valor de 7,3 g/L, ao final de 96 h de cultivo.

Com relação à assimilação dos açúcares, foi observado que arabinose presente no hidrolisado hemicelulósico não foi consumida em nenhum dos ensaios realizados, mantendo-se numa concentração média de 14,0 g/L. Quanto à glicose (Figura 5.10 B), nota-se que exceto para o meio constituído por hidrolisado destoxificado e suplementado com vanilina (onde se observou um residual de 5%), nos demais ensaios este açúcar foi totalmente consumido após 48 h de cultivo. Em relação ao consumo de xilose (Figura 5.10 B), observa-se que o menor valor de assimilação da pentose foi obtido no ensaio constituído por hidrolisado não tratado (43%). No hidrolisado destoxificado suplementado com vanilina (HDV) foi consumido cerca de 52% do açúcar e dentre os três tipos de meios avaliados, o destoxificado não suplementado (HDC) com o composto fenólico apresentou o melhor resultado de consumo de xilose (87%).

Quanto à formação de xilitol e etanol (Figura 5.10 C) nota-se primeiramente que para todos os hidrolisados hemicelulósicos estudados, a formação de etanol foi inferior a 5,0 g/L. Ao se verificar a formação de xilitol, observa-se que dentre os hidrolisados avaliados, o constituído por hidrolisado destoxificado foi o que apresentou melhor resultado de formação do poliálcool (aproximadamente 53,0 g/L). Quando adicionada vanilina ao hidrolisado destoxificado, a formação de xilitol foi 75% superior em relação ao hidrolisado não tratado.

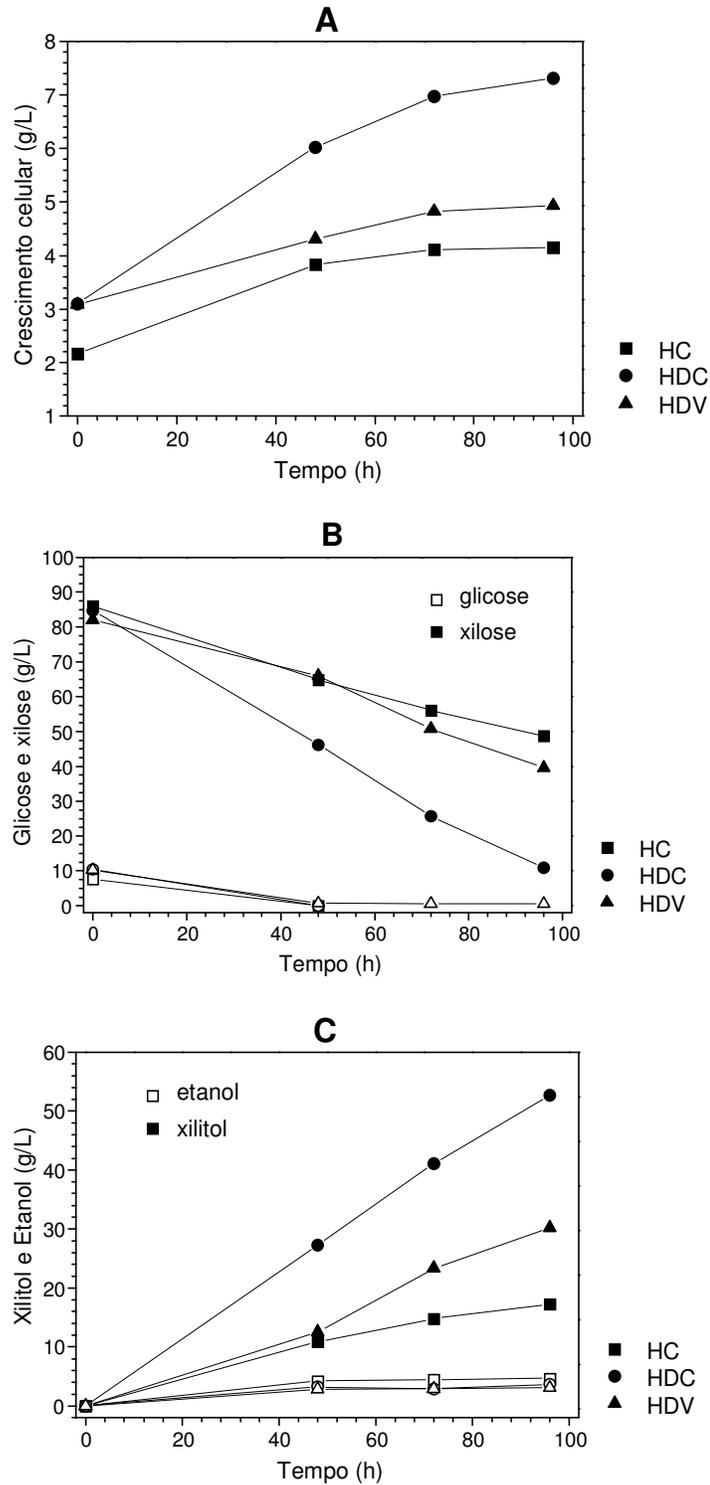


Figura 5.10. Crescimento celular de *C. guilliermondii* (A), consumo de açúcares (B) e formação de xilitol e etanol (C), obtidos durante o cultivo em hidrolisado de palha de arroz concentrado 6 vezes (HC: não tratado; HDC: tratado e HDV: tratado e suplementado com vanilina).

De acordo com a literatura, a toxicidade dos hidrolisados pode variar com as condições de fermentação, tipo de microrganismo e também pela sua composição química, tendo em vista os diferentes compostos tais como furfural, 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) e compostos fenólicos. PREZIOSI-BELLODY *et al.* (1997), verificaram que não houve crescimento celular de *C. parapsilosis* quando cultivada em meio semi-sintético suplementado com vanilina (0,1 g/L), siringaldeído (0,3 g/L), ácido acético (3,0 g/L), furfural (0,7 g/L) e 5-HMF (1,5 g/L), levando os autores a suporem que estes compostos agem cumulativamente para inibir a atividade fermentativa, interferindo no consumo de açúcares ou de outros elementos essenciais. O efeito sinérgico de inibição também foi reportado por TRAN e CHAMBERS (1985).

Deste modo, com o intuito de se buscar as possíveis causas da toxicidade dos meios de cultivo constituídos por hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado, em especial o não tratado, foi feito um acompanhamento durante todo o tempo de fermentação da variação dos compostos fenólicos, furfural, ácido acético e pH, sendo os resultados apresentados na Tabela 5.11.

De acordo com a Tabela 5.11, observa-se que não houve assimilação do ácido acético durante as 96 h de cultivo em hidrolisado não tratado e concentrado (HC), além disto, este ácido pode ter interagido com outros compostos presentes, potencializando assim a toxicidade do meio. Deste modo, observando-se a Tabela 5.11, sugere-se que entre os compostos identificados, provavelmente siringaldeído (~0,70 g/L) e ácido ferúlico (~0,60 g/L) foram os que interagiram com o ácido acético, contribuindo para o baixo desempenho do processo de bioconversão, isto porque tais compostos, além de terem sido encontrados em maior proporção, não foram assimilados durante todo o tempo de cultivo, o que significa que podem ter interferido no bioprocessamento. Nota-se nestas condições, um decréscimo no pH de 5,7 para 4,9.

Tabela 5.11. Resultados da variação do pH, do ácido acético e dos compostos fenólicos, obtidos durante a realização dos ensaios em hidrolisado de palha de arroz concentrado 6 vezes: não tratado (HC), destoxificado com carvão ativado (HDC), destoxificado e suplementado com vanilina (HDV) e meio semi-sintético suplementado com vanilina (MSV), para a obtenção de xilitol por *C. guilliermondii*.

Meio de cultivo	Tempo (h)	pH	Ácido acético (g/L)	Furfural (g/L)	Compostos fenólicos (g/L)					
					Vanilina	Álcool vanilil	Ácido vanílico	Siringaldeído	Ácido siríngico	Ácido ferúlico
HC	0	5,7	2,4	nd	0,035	0,051	0,0036	0,73	0,054	0,62
	48	5,1	2,1	nd	0,0079	0,075	0,020	0,77	0,020	0,60
	72	4,9	2,3	nd	0,0058	0,077	0,021	0,77	0,020	0,51
	96	4,9	2,6	nd	0,0029	0,11	0,011	0,73	0,026	0,61
HDC	0	5,4	1,8	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	48	5,8	1,2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	72	5,6	0,6	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	96	5,9	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
HDV	0	5,3	1,8	nd	1,6	nd	nd	nd	nd	nd
	48	5,1	2,3	nd	nd	1,6	nd	nd	nd	nd
	72	4,6	2,7	nd	nd	1,6	nd	nd	nd	nd
	96	4,6	3,1	nd	nd	1,5	nd	nd	nd	nd
MSV	0	5,7	-	-	1,6	nd	nd	-	-	-
	48	5,8	-	-	nd	1,8	0,019	-	-	-
	72	5,8	-	-	nd	1,8	0,022	-	-	-
	96	5,5	-	-	nd	1,8	0,025	-	-	-

nd = não detectado; (-) = ausente

Quanto ao hidrolisado destoxificado com o carvão ativado (HDC), nota-se que o ácido acético foi totalmente assimilado pela levedura, o que levou a um discreto aumento no pH do meio de 5,4 para o 5,9. Observa-se que o bioprocessamento no hidrolisado hemicelulósico destoxificado foi o que apresentou melhor desempenho, uma vez que a assimilação do ácido por *C. guilliermondii* indica que nas condições empregadas (3,0 g/L de células e pH 5,5) a levedura foi capaz de destoxificar por completo o meio de cultivo, que teoricamente apresentava somente ácido acético como composto com potencial inibitório. Tal comportamento também foi observado por FELIPE *et al.* (1997 a).

Quando o hidrolisado destoxificado foi suplementado com vanilina (HDV), nota-se um aumento na concentração do ácido acético de 1,8 para 3,1 g/L, com concomitante diminuição do pH de 5,3 para 4,6. Além disto, observa-se que para as mesmas condições de cultivo utilizadas para o meio semi-sintético na qual vanilina foi convertida em seu álcool e ácido correspondentes, o comportamento da conversão de tal composto se diferenciou no cultivo em meio constituído por hidrolisado hemicelulósico, uma vez que neste caso a vanilina foi totalmente convertida em seu álcool correspondente. KLINKE *et al.* (2003), durante o estudo do efeito de inibidores sobre a bioconversão de glicose em etanol por *S. cerevisiae*, também observaram que os aldeídos fenólicos (10 mM) testados em hidrolisado de palha de trigo, foram reduzidos em seus respectivos álcoois (vanilil, siringil, 4-hidroxibenzilálcool) após 6 h de cultivo.

Os parâmetros fermentativos obtidos durante o cultivo da *C. guilliermondii* em diferentes hidrolisados concentrados: 1) hidrolisado não tratado (HC), 2) hidrolisado destoxificado com carvão ativado (HDC) e 3) hidrolisado destoxificado com carvão e suplementado com vanilina (HDV), estão sumarizados na Tabela 5.12. Para efeito comparativo, foram adicionados à tabela os valores dos parâmetros fermentativos obtidos no meio semi-sintético controle (MS) e suplementado com vanilina (MSV). Observa-se que os menores valores de formação de biomassa 4,1 e 4,9 g/L, foram obtidos no HC e no HDV, respectivamente. Nota-se ainda que para ambos os hidrolisados a assimilação de xilose pela levedura foi incompleta, atingindo valores similares, de aproximadamente 50%, com 96 h de fermentação. Por outro lado, a produção de xilitol diferiu grandemente nestes meios, sendo constatado um

Tabela 5.12. Parâmetros fermentativos obtidos na realização dos ensaios para obtenção de xilitol a partir de hidrolisado de palha de arroz não tratado (HC), hidrolisado tratado com carvão ativado (HDC), hidrolisado tratado e suplementado com vanilina (HDV) e meio semi-sintético (MS) e meio semi-sintético suplementado com vanilina (MSV).

Parâmetros	Meio de cultivo				
	HC	HDC	HDV	MS	MSV**
Tempo de fermentação (h)	96	96	96	96	96
Consumo percentual de xilose	43	87	52	99	94
Consumo percentual de glicose	100	100	95	100	100
Consumo percentual de ácido acético	0	100	0*	-	-
Concentração celular (g/L)	4,1	7,3	4,9	11,4	8,2
Concentração de xilitol (g/L)	17,3	52,7	30,2	53,2	66,3
Concentração de etanol (g/L)	4,7	3,7	3,6	10,4	1,4
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,47	0,71	0,71	0,59	0,77
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,045	0,052	0,035	0,068	0,048
$Y_{P/X}$ (g/g)	17,2	18,1	26,9	8,4	19,8
$Q_X$ (g/L.h)	0,020	0,044	0,019	0,088	0,054
$Q_S$ (g/L.h)	0,39	0,77	0,44	0,95	0,92
$Q_P$ (g/L.h)	0,18	0,55	0,31	0,55	0,69
Rendimento em xilitol (% do teórico)	51	77	77	64	84

\* = formação de 3,1 g/L de ácido acético

\*\* = resultados obtidos a partir da média de dois ensaios experimentais

aumento de 80% na concentração deste poliol quando a vanilina (1,6 g/L) foi adicionada ao hidrolisado destoxificado. Tal comportamento revela que o grau de toxicidade do hidrolisado é dependente do tipo e da concentração de cada inibidor, e principalmente dos efeitos de interação entre eles, uma vez que o HC continha uma concentração de fenólicos totais (1,49 g/L - Tabela 5.9) similar a concentração de vanilina adicionada ao hidrolisado (1,6 g/L). De fato, a presença de vanilina no meio sintético (MSV), isento de qualquer tipo de inibidor, inclusive o ácido acético, favoreceu a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, quando comparado ao controle (MS). Os valores de  $Y_{P/S}$  e  $Q_P$  foram aumentados de 0,71 para 0,77 g/g e de 0,55 para 0,69 g/L.h, respectivamente, quando o meio sintético foi suplementado com 1,6 g/L de vanilina .

Quanto ao hidrolisado destoxificado (HDC), nota-se que a produtividade volumétrica de xilitol foi similar ao do meio semi-sintético ( $Q_P = 0,55$  g/L.h), porém o fator de conversão de xilose em xilitol foi superior no meio hidrolisado ( $Y_{P/S} = 0,71$  g/g) quando comparado ao meio semi-sintético ( $Y_{P/S} = 0,59$  g/g). O menor fator de conversão de xilose em xilitol observado para o MS pode ser atribuído ao desvio do metabolismo para o crescimento celular, conforme evidenciado pelo aumento de biomassa e do fator de conversão de substrato em células (Tabela 5.12). Ainda com relação ao hidrolisado destoxificado (HDC), verifica-se que a adição de vanilina neste hidrolisado (HDV), não afetou conversão de xilose em xilitol pela levedura ( $Y_{P/S} = 0,71$  g/g) porém a produtividade volumétrica em xilitol decresceu acentuadamente (de 0,55 g/L.h para 0,31 g/L.h) devido à baixa eficiência de assimilação de xilose, o que se sugere que os compostos inibitórios afetam o transporte de nutrientes pela célula.

## 6. CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos no presente trabalho, foi possível concluir que:

- A adição de sais de fosfato de potássio ao meio semi-sintético de fermentação favorece a produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037. Dentre as concentrações avaliadas, 0,6 M (68,9 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e 22,1 g/L de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) foi a que proporcionou os maiores valores de fator de rendimento ( $Y_{P/S} = 0,72$  g/g) e produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_P = 0,65$  g/L.h) além de manter o pH constante durante o bioprocesso;
- A metodologia estatística empregada foi uma ferramenta valiosa na avaliação dos efeitos principais e de interação entre as variáveis (vanilina, siringaldeído, pH e concentração celular inicial) sobre os resultados da bioconversão de xilose em xilitol pela levedura *C. guilliermondii*;
- O crescimento e a produção de xilitol por *C. guilliermondii* são inibidos em maior grau pelo siringaldeído do que pela vanilina. Além disto, a toxicidade do siringaldeído é potencializada em pH 7,0;
- A levedura *C. guilliermondii* é capaz de converter os compostos fenólicos estudados em seus respectivos álcoois ou ácidos, sendo o tipo e a quantidade formada dependente das condições experimentais;
- Os resultados da análise estatística confirmaram o efeito negativo do siringaldeído e do pH sobre os parâmetros fermentativos avaliados e ainda revelaram o efeito de interação entre siringaldeído e vanilina;
- A análise de superfície de resposta permitiu a otimização dos parâmetros da fermentação de *C. guilliermondii* em meio semi-sintético (pH 5,5 e  $X_0 = 3,0$  g/L) e a determinação dos níveis de siringaldeído e de vanilina que tornam máximos os valores de fator de rendimento e produtividade volumétrica do xilitol;
- Através de estudos em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz ficou evidenciado que os compostos fenólicos afetam negativamente a bioconversão de xilose em xilitol e que a ação inibitória está relacionada a uma limitação no transporte de nutrientes pela célula.

## 7. RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho e dando continuidade ao estudo do efeito dos produtos de degradação de lignina (vanilina e siringaldeído) sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* FTI 20037, sugere-se:

- Um estudo do comportamento cinético das enzimas envolvidas na bioconversão de xilose em xilitol em presença dos inibidores (compostos fenólicos);
- Um estudo do efeito do ácido acético, juntamente com o siringaldeído e ácido ferúlico, sobre a bioconversão de xilose em xilitol, uma vez que estes foram os compostos encontrados em maior proporção no hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz;
- A determinação do grau de inibição causado pelos compostos inibitórios presentes no hidrolisado de palha de arroz, através da simulação do hidrolisado com os compostos modelos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, C.L., OETTERER, M., MENEZES, T.J.B. Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos (Bol.SBCTA), v. 33, n. 2, p. 184-193, 1999.
- ANDO, S., ARAI, I., KIYOTO, K., HANAI, S. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Fermentation Technology, v. 64, n. 6, p. 567-570, 1986.
- AZUMA, M., IKEUCHI, T., KIRITANI, R., KATO, J., OOSHIMA, H. Increase in xylitol production by *Candida tropicalis* upon addition of salt. Biomass and Bioenergy, v. 19, p. 129-135, 2000.
- BAR, A. Xylitol. In: O'BREIN NABORS, L.; GELARDI, R. Alternative sweeteners. Second edition revised and expanded. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 349-379.
- 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.
- BISARIA, V.S., GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulosic materials: Substrates, microorganisms, enzymes and products. Enzyme and Microbial Technology, v. 3, p. 90-104, 1981.
- CLARK, T.A., MACKIE, K.L. Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*. Journal of Chemistry Technology and Biotechnology, v. 34B, p. 101-110, 1984.
- CONVERTI, A., PEREGO, P., DOMÍNGUEZ, J.M. Xylitol production from hardwood hemicellulose hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii* e *Candida guilliermondii*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 82, p. 141-151, 1999.
- CULBERT, S.J., WANG, Y.M., FRITSCH, H.A., CARR, D., LANTIN, E., van EYS, J. Oral xylitol in american adults. Nutrition Research, v. 6, n. 8, p. 913-922, 1986.
- DELGENES, J., MOLETTA, R., NAVARRO, J.M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. Enzyme and Microbial Technology, v. 19, p. 220-225, 1996.
- DOMINGUEZ, J.M., GONG, C.S., TSAO, G.T. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 57-58, p. 49-56, 1996.
- EDLIN, D.A.N., NARBAD, A., DICKINSON, J.R., LLOYD, D. The biotransformation of simple phenolic compounds by *Brettanomyces anomalus*. FEMS Microbiology Letters, v. 125, p. 311-316, 1995.

- EMODI, A. Xylitol: It's properties and food applications. Food Technology, p. 28-32, 1978.
- FELIPE, M.G.A., VIEIRA, D.C., VITOLO, M., SILVA, S.S. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. Journal of Basic Microbiology, v. 35, p. 171-177, 1995.
- FELIPE, M.G.A., ALVES, L.A., SILVA, S.S, ROBERTO, I.C., MANCILHA, I.M., ALMEIDA E SILVA, J.B.. Fermentation eucalyptus hemicellulosic hydrolysate to xylitol by *Candida guilliermondii*. Bioresource Technology, v. 56, p. 281-283, 1996.
- FELIPE, M.G.A., VITOLO, M., MANCILHA, I.M., SILVA, S.S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 18, p. 251-254, 1997 a.
- FELIPE, M.G.A., VITOLO, M., MANCILHA, I. M., SILVA, S.S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicelulosic hydrolysate for xylitol production: Effect of pH. Biomass and Bioenergy, v. 13, n. 1/2, p. 11-14, 1997 b.
- FITZGERALD, D.J., STRATFORD, M., NARBAD, A. Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. International Journal of Food Microbiology, v. 2708, p. 1-10, 2003.
- FITZGERALD, D.J., STRATFORD, M., GASSON, M.J., UECKERT, J., BOS, A., NARBAD, A. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. Journal of Applied Microbiology, v. 97, p. 104-113, 2004.
- GIMENES, M.A.P., CARLOS, L.C.S., PEREIRA Jr, N. Influência da idade do inóculo na bioprodução de xilitol por *Candida guilliermondii* IM/UFRJ 50088. Anais do XIII Sinaferm, Teresópolis / Rio de Janeiro- ago/2000.
- IBGE. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 18 jan. 2005.
- ISOKANGAS, P., SÖDERLING, E., PIENIHÄKKINEN, K., ALANEN, P. Occurrence of dental decay in children after maternal consumption of xylitol chewing gum, a follow-up from 0 to 5 years of age. Journal of Dental Research, v. 79, n. 11, p. 1885-1889, 2000.
- JAFFE, G.M., SZKRYBALO, W., WEINERT, P.H. Process for producing xylose. Patent US.n 3.784.408. Publ. 08/jan/1974.
- KANDELMAN, D. Sugar, Alternative sweeteners and meal frequency in relation to caries prevention: New perspectives. British Journal of Nutrition, v. 77, Suppl. 1, p. S121-S128, 1997.
- KLINKE, H.B.; OLSSON, L.; THOMSEN, A.B.; AHRING, B.K. Potential inhibitors from wet oxidation of wheat straw and their effect on ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae*: wet oxidation and fermentation by yeast. Biotechnology and Bioengineering, v. 81, n. 6, p. 738-747, 2003.
- KUHAD, R.C., SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: Current and future prospects. Critical Reviews in Biotechnology, v. 13, n. 2, p. 151-172, 1993.

- LEE, W.G., LEE, J.S., SHIN, C.S., PARK, S.C., CHANG, H.N., CHANG, Y.K. Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 77-79, p. 547-559, 1999.
- LIN, S.Y. e DENCE, C.W. Methods in lignin chemistry, Germany: Springer-Verlag, 1992, p. 3-19.
- LOPEZ-MALO, A.; ALZAMORA S. M.; ARGAIZ, A. Effect of vanillin concentration, pH and incubation temperature on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus parasiticus* growth. Food Microbiology, v. 14, p. 117-124, 1997.
- MÄKINEN, K.K. Dietary prevention of dental caries by xylitol - Clinical effectiveness and safety. Journal of Applied Nutrition, v. 44, n. 1, p. 16-28, 1992.
- MÄKINEN, K.K., OLAK, J., RUSSAK, S., SAAG, M., SEEDRE, T., VASAR, R., VIHALEMM, T., MIKELSAAR, M., MÄKINEN, P. Polyol-combinant saliva stimulants: a 4-month pilot study in young adults. Acta Odontologica Scandinavica, v. 56, p. 90-94, 1998.
- MÄKINEN, K.K. Can the pentitol-hexitol theory explains the clinical observations made with xylitol? Medical Hypotheses, v. 54, n. 4, p. 603-613, 2000.
- MÄKINEN, K.K., ISOTUPA, K.P., KIVILOMPO, T., MÄKINEN, P.L., TOIVANEN, J., SÖDERLING, E. Comparison of erythritol and xylitol saliva stimulants in the control of dental plaque and mutans *Streptococci*. Caries Research, v. 35, n. 2, p. 129-135, 2001.
- MANZ, U., VANNINEN, E., VOIROL, F. Xylitol - It's properties and use as a sugar substitute in foods. In: Food R.A. Symp. Sugar and Sugar Replacements, 10 out., 1973.
- MATTILA, P.T., KNUUTTILA, M.L.E., SVANBERG, M.J. Dietary xylitol supplementation prevents osteoporotic changes in *Streptozotocin* - Diabetic rats. Metabolism, v. 47, p. 578-583, 1998 a.
- MATTILA, P.T., SVANBERG, M.J., KNUUTTILA, M.L.E. Dietary xylitol protects against osseal changes in experimental osteoporosis. In: Nutritional Aspects of Osteoporosis, Burckhardt, P. (ed.), cap. 16, p. 157-162, 1998 b.
- MATTILA, P.T., SVANBERG, M.J., PÖKKÄ, P., KNUUTTILA, M.L.E. Dietary xylitol protects against weakening of bone biomechanical properties in ovariectomized Rats. The Journal of Nutrition, v. 128, n. 10, p. 1811-1814, 1998 c.
- MAYERHOFF, Z.D.V.L., ROBERTO, I.C., SILVA, S.S., FELIPE, M.G.A., MANCILHA, I.M. Seleção de leveduras para produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Anais do XI Sinaferm. ago/1996.
- MELAJA, A.J., HAMÄLÄINEN, L., Process for making xylitol. U.S. Patent n. 4.008.285. 18 jun. 1975. Publ. 15/fev/1977.

- MORITA, T.A.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. Effects of initial pH on biological synthesis of xylitol using xylose-rich hydrolysate. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 84-86, p. 751-759, 2000.
- MUSSATTO, S.I., ROBERTO, I.C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. Biotechnology Letters, v. 23, p. 1681-1684, 2001.
- MUSSATTO, S.I., ROBERTO, I.C. Xylitol production from high xylose concentration: evaluation of the fermentation in bioreactor under different stirring rates. Journal of Applied Microbiology, v. 95, p. 331-337, 2003.
- NISHIKAWA, N.K., SUTCLIFFE, R., SADDLER, J.N. The effect of wood-derived inhibitors on 2,3-butanediol production by *klebsiella pneumoniae*. Biotechnology and Bioengineering, v. 31, p. 624-627, 1988.
- OJAMO, H., YLINEN, L., LINKO, M. Process for the preparation of xylitol from xylose by cultivating *Candida guilliermondii*. US Patent WO 88/05467, 28 jul 1988. Publ. 08/dez/1987.
- OLSSON, L., HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. Enzyme and Microbial Technology, v. 18, p. 312-331, 1996.
- PALMQVIST, E., GRAGE, H., MEINANDER, N.Q., HAHN-HÄGERDAL, B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. Biotechnology and Bioengineering, v. 63, n. 1, p. 46-55, 1999.
- PALMQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. Bioresource Technology, v. 74, p. 17-24, 2000 a.
- PALMQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology, v. 74, p. 25-33, 2000 b.
- PARAJÓ, J.C., DOMINGUEZ, H., DOMINGUEZ, J.M. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. Enzyme and Microbial Technology, v. 21, p. 18-24, 1997.
- PARAJÓ, J.C., DOMINGUEZ, H., DOMINGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. Bioresource Technology, v. 65, p. 191-201, 1998 a.
- PARAJÓ, J.C., DOMINGUEZ, H., DOMINGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. Bioresource Technology, v. 65, p. 203-212, 1998 b.
- PARAJÓ, J.C., DOMÍNGUEZ, H., DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol, Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. Bioresource Technology, v. 66, p. 25-40, 1998 c.

- PARISI, F. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolysates. In: FIECHTER, A. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology, v. 38, p. 53-87, 1989.
- PEPPER, T., OLINGER, P.M. Xylitol in sugar-free confections. Food Technology, v. 42, n. 10, 1988.
- PFEIFER, P.A., BONN, G., BOBLETER, O. Influence of biomass degradation products on the fermentation of glucose to ethanol by *Saccharomyces carlsbergensis* W 34. Biotechnology Letters, v. 6, n. 8, p. 541-546, 1984.
- PREZIOSI-BELLOY, L., NOLLEAU, V., NAVARRO, J.M. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixture to xylitol by *Candida parapsilosis*. Enzyme and Microbial Technology, v. 21, p. 124-129, 1997.
- RAGNAR, M., LINDGREN, C.T., NILVEBRANT, N.-O. pKa-values of guaiacyl and syringyl phenols related to lignin. Journal of Wood Chem. Technol., v. 20, n. 3, p. 277-305, 2000.
- RANATUNGA, T.D., JERVIS, J., HELM, R.F., Mc MILLAN, J.D., HATZIS, C. Identification of inhibitory components toxic toward *Zymomonas mobilis* CP4 (pZB5) xylose fermentation. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 67, p. 185-198, 1997.
- Resolução CONSEMA Nº 002/00. Disponível em <<http://www.sema.rs.gov.br>>. Acesso em: 01 set. 2004.
- ROBERTO, I.C., SATO, S., MANCILHA, I.M, TAQUEDA, M.E.S. Influence of media composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. Biotechnology Letters, v. 17, n. 11, p. 1223 - 1228, 1995.
- ROBERTO, I.C., SATO, S., MANCILHA, I.M. Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. Journal of Industrial Microbiology, v. 16, p. 348-350, 1996 a.
- ROBERTO, I.C., SILVA, S.S., FELIPE, M.G.A., MANCILHA, I.M., SATO, S. Bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate for the production of xylitol: Effect of pH and nitrogen source. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 57/58, p. 339-347, 1996 b.
- ROBERTO, I.C., MUSSATTO, S.I., RODRIGUES, R.C.L.B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. Industrial Crops and Products, v. 17, p. 171-176, 2003.
- RODRIGUES, R.C.L.B., FELIPE, M.G.A., ROBERTO, I.C., VITOLO, M. Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate at controlled pH values. Bioprocess Biosystem. Eng., v. 26, p. 103-107, 2003.
- RODRIGUES, S., LONA, L.M.F., FRANCO, T.T. Effect of phosphate concentration on the production of dextransucrase by *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512F. Bioprocess Biosyst. Eng., v. 26, p. 57-62, 2003.

- SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, v. 30, p. 279-291, 2003.
- SIGMA ALDRICH. Disponível em <www.sigmaaldrich.com.br>. Acesso em: 18 jan. 2005.
- SIKKEMA, J., DE BONT, J.A.M., POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. Microbiological Reviews, p. 201-222, 1995.
- SILVA, C.J.S.M. Planejamento e otimização de parâmetros no processo fermentativo de obtenção de xilitol empregando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Lorena/Faenquil, 1999. 116p. (Dissertação de Mestrado).
- SILVA, S.S., VITOLLO, M., PESSOA JR, A., FELIPE, M.G.A. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of D-xylose-xylitol-fermenting *Candida guilliermondii*. Journal of Basic Microbiology, v. 36, p. 187-191, 1996.
- SINGLETON, V., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTÓS, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology, v. 299, p. 152-178, 1999.
- SÖDERLING, E., ISOKANGAS, P., PIENIHÄKKINEN, K., TENOVUO, J. Influence of maternal xylitol consumption on acquisition of *mutans Streptococci* by infants. Journal of Dental Research, v. 79, n. 3, p. 882-887, 2000.
- SUN, R., TOMKINSON, J., MAO, F.C., SUN, X.F. Physicochemical characterization of lignins from rice straw by hydrogen peroxide treatment. Journal of Applied Polymer Science, v. 79, p. 719-732, 2001.
- TANAKA, M., HIROKANE, Y. Oxidation of aromatic aldehyde to aromatic carboxylic acid by *Burkholderia cepacia* TM1 isolated from humus. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 90, n. 3, p. 341-343, 2000.
- TRAN, A.V., CHAMBERS, R.P. Red oak wood derived inhibitors in the ethanol fermentation of xylose by *Pichia stipitis* CBS 5776. Biotechnology Letters, v. 7, n. 11, p. 841-846, 1985.
- TRAN, A.V., CHAMBERS, R.P. Lignin and extractives derived inhibitors in the 2,3- butanediol fermentation of mannose-rich prehydrolysates. Applied Microbiology and Biotechnology, v.23, p. 191-197, 1986.
- UHARI, M., KONTIOKARI, T., NIEMELA, M. A novel use of xylitol sugar in preventing acute otitis media. Pediatrics, v. 102, n. 4, p. 879-884, Part 1, 1998.
- VAN ZYL, C., PRIOR, B.A., DU PREEZ, J.C. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 17, p. 357-369, 1988.
- VOGEL, H.C., TADARO, C.L. Fermentation and biochemical engineering handbook. Principles, process design, and equipment. New Jersey: Noyes Publications, 2 ed., 1997.

- WASHÜTTL, J., RIEDERER, P., BANCHER, E.A. Qualitative and Quantitative Study of Sugar-Alcohols in Several Foods. Journal of Food Science, v. 38, p. 1262-1263, 1973.
- WINKELHAUSEN, E., KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. Journal of Fermentation and Bioengineering, v. 86, n. 1, p. 1-14, 1998.
- YLIKAHRI, R. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. Advances in Food Research, v. 25, p. 159-180, 1979.
- ZABNER, J., SEILER, M.P., LAUNSPACH, J.L., KARP, P.H., KEARNEY, W.R., LOOK, D.C., SMITH, J.J., WELSH, M.J. The Osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 97, n. 21, p. 11614 - 11619, 2000.
- ZALDIVAR, J., MARTINEZ, A., INGRAM, L.O. Effect of selected aldehydes on growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering, v. 65, n. 1, p. 24-33, 1999.
- ZALDIVAR, J., INGRAM, L.O. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY 01. Biotechnology and Bioengineering, v. 66, n. 4, p. 203-210, 1999.
- ZALDIVAR, J., MARTINEZ, A., INGRAM, L.O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. Biotechnology and Bioengineering, v. 68, n. 5, p. 524-530, 2000.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1. CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR, DE AÇÚCARES, ÁCIDO ACÉTICO, GLICEROL, ETANOL, FURANOS, COMPOSTOS FENÓLICOS E DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS (MÉTODO DE FOLIN MODIFICADO - PADRÃO VANILINA)

Encontram-se a seguir, as curvas de calibração da concentração celular e das concentrações dos açúcares, ácido acético, etanol, glicerol, furanos e compostos fenólicos

- **Concentração celular:**

$$DO_{(600\text{ nm})} = -0,0054 + 1,7431 \cdot \text{Células (g/L)} \quad (R^2 = 0,9973)$$

- **Açúcares:**

**Glicose:** Área =  $3,03 \times 10^4 + 1,88 \times 10^6$  Glicose (g/L) ( $R^2 = 0,999340$ )

**Xilose:** Área =  $4,11 \times 10^4 + 1,83 \times 10^6$  Xilose (g/L) ( $R^2 = 0,999325$ )

**Arabinose:** Área =  $2,28 \times 10^4 + 1,82 \times 10^6$  Arabinose (g/L) ( $R^2 = 0,999415$ )

**Xilitol:** Área =  $3,10 \times 10^4 + 1,85 \times 10^6$  Xilitol (g/L) ( $R^2 = 0,999326$ )

- **Glicerol:**

$$\text{Área} = 3,29 \times 10^3 + 1,51 \times 10^6 \text{ Glicerol (g/L)} \quad (R^2 = 0,999982)$$

- **Ácido acético:**

$$\text{Área} = -1,86 \times 10^4 + 8,45 \times 10^5 \text{ Ácido acético (g/L)} \quad (R^2 = 0,999966)$$

- **Etanol:**

$$\text{Área} = -3,14 \times 10^4 + 7,62 \times 10^5 \text{ Etanol (g/L)} \quad (R^2 = 0,999938)$$

- **Furanos:**

**Furfural:** Área =  $5,44 \times 10^2 + 2,14 \times 10^8$  Furfural (g/L) ( $R^2 = 0,999996$ )

- **Compostos fenólicos:**

**Vanilina:** Área =  $3,25 \times 10^4 + 8,24 \times 10^7$  Vanilina (g/L) ( $R^2 = 0,999913$ )

**Ácido vanílico:** Área =  $3,14 \times 10^3 + 3,87 \times 10^7$  Ácido vanílico (g/L) ( $R^2 = 0,999531$ )

**Álcool vanilil:** Área =  $1,22 \times 10^4 + 1,77 \times 10^7$  Álcool vanilil] (g/L) ( $R^2 = 0,999509$ )

**Siringaldeído:** Área =  $-2,08 \times 10^3 + 3,21 \times 10^7$  Siringaldeído (g/L) ( $R^2 = 0,99993$ )

**Ácido siríngico:** Área =  $1,78 \times 10^3 + 6,90 \times 10^7$  Ácido siríngico (g/L) ( $R^2 = 0,999887$ )

**Ácido ferúlico:** Área =  $-1,83 \times 10^4 + 5,12 \times 10^7$  Ácido ferúlico (g/L) ( $R^2 = 0,999937$ )

- **Compostos fenólicos totais (Método de Folin modificado – padrão vanilina):**

$$Abs_{(760\text{ nm})} = 0,0453 + 0,04505 \cdot \text{Vanilina (mg/L)} \quad (R^2 = 0,99769)$$

**APÊNDICE 2: TABELAS DOS RESULTADOS DE FERMENTAÇÃO, OBTIDOS NOS ENSAIOS EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE ARROZ**

Nesta seção, encontram-se representados por tabelas, os valores de variação do pH, crescimento celular, consumo de açúcares e formação de xilitol, ácido acético e etanol, obtidos no cultivo de *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz concentrado 6 vezes.

**Tabela A.2.1.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado e concentrado 6 vezes (HC).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Ácido acético (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,7	2,2	7,7	86,0	14,9	nd	2,4	nd
48	5,1	3,8	nd	64,8	15,5	10,9	2,1	4,3
72	4,9	4,1	nd	56,1	15,7	14,8	2,3	4,5
96	4,9	4,1	nd	48,8	15,5	17,3	2,6	4,7

nd = não detectado

**Tabela A.2.2.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz destoxificado com carvão ativado e concentrado 6 vezes (HDC).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Ácido acético (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,4	3,1	10,4	84,7	13,4	nd	1,8	nd
48	5,8	6,0	nd	46,2	13,5	27,3	1,2	3,2
72	5,6	7,0	nd	25,7	13,1	41,1	0,63	2,9
96	5,9	7,3	nd	10,9	13,0	52,7	nd	3,7

nd = não detectado

**Tabela A.2.3.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz destoxificado com carvão ativado (concentrado 6 vezes) e suplementado com 1,6 g/L de vanilina (HDV).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Ácido acético (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,3	3,1	10,3	82,1	14,0	nd	1,8	nd
48	5,1	4,3	0,66	65,9	13,7	12,5	2,3	2,8
72	4,6	4,8	0,55	50,8	13,7	23,3	2,7	3,1
96	4,6	4,9	0,53	39,6	13,9	30,2	3,1	3,6

nd = não detectado

**Tabela A.2.4.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz não tratado (concentrado 6 vezes) e suplementado com 0,6 M de sais de fosfato de potássio pH 5,5.

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Ácido acético (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,8	2,1	5,7	79,8	13,1	nd	2,0	nd
48	5,7	3,5	nd	68,8	15,0	5,4	2,0	3,5
72	5,6	3,9	nd	61,3	14,5	9,2	2,2	2,7
96	5,6	3,8	nd	58,6	15,2	11,6	2,0	2,5

nd = não detectado

### APÊNDICE 3. RESULTADOS DE FERMENTAÇÃO, OBTIDOS NOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2<sup>4</sup>

Nesta seção, encontram-se representados por tabelas, os valores de variação do pH, crescimento celular, consumo de açúcares, formação de xilitol, glicerol e etanol, assim como os valores de variação dos compostos fenólicos (vanilina e siringaldeído) e de seus álcoois ou ácidos correspondentes, obtidos no cultivo de *C. guilliermondii* FTI 20037 em meio semi-sintético (ensaios do planejamento fatorial 2<sup>4</sup>).

**Tabela A.3.1.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 1,0 g/L inicial de células e pH 5,5 (Ensaio 1).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,7	1,0	13,0	85,5	nd	nd	nd
24	5,7	5,6	nd	73,8	7,3	1,7	4,3
48	5,6	7,3	nd	49,0	26,0	1,8	4,2
72	5,6	7,7	nd	24,5	43,4	2,1	3,3
96	5,6	8,5	nd	4,3	57,9	2,3	6,7

nd = não detectado

**Tabela A.3.2.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 1,0 g/L inicial de células e pH 5,5, suplementado com 2,0 g/L de vanilina (Ensaio 2).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanilina (g/L)	Álcool vanilil (g/L)
0	5,7	1,2	16,0	96,4	nd	nd	nd	2,0	nd
24	5,6	3,5	nd	77,6	0,83	1,5	5,2	nd	2,4
48	5,5	5,0	nd	56,0	20,8	1,6	6,5	nd	2,3
72	5,5	5,3	nd	26,3	42,7	2,0	6,4	nd	2,3
96	5,4	7,1	nd	5,4	59,3	2,5	6,4	nd	2,5

nd = não detectado

**Tabela A.3.3.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 1,0 g/L inicial de células e pH 5,5, suplementado com 2,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 3).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Siringaldeído (g/L)	Ácido siríngico (g/L)
0	5,7	1,1	14,8	87,4	nd	nd	nd	1,9	nd
24	5,6	1,9	7,8	84,0	nd	0,80	7,0	2,0	0,014
48	5,6	2,3	nd	78,0	1,8	1,2	7,2	1,7	0,020
72	5,6	2,6	nd	70,5	7,9	1,1	7,8	1,5	0,026
96	5,5	3,0	nd	56,3	13,4	1,3	9,1	1,3	0,034

nd = não detectado

**Tabela A.3.4.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 1,0 g/L inicial de células e pH 5,5, suplementado com 2,0 g/L de vanilina e 2,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 4).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanil. (g/L)	Álcool vanilil (g/L)	Siringal. (g/L)	Ácido siríngico (g/L)
0	5,5	1,0	13,0	84,2	nd	nd	nd	2,0	nd	2,1	nd
24	5,6	1,1	12,8	81,5	nd	nd	nd	1,7	0,62	2,2	nd
48	5,6	1,1	11,4	80,6	nd	nd	nd	1,4	0,77	2,0	0,013
72	5,6	1,1	13,5	82,9	nd	nd	nd	1,3	0,73	1,9	0,017
96	5,5	1,0	13,5	82,5	nd	nd	nd	1,5	0,85	2,2	0,017

nd = não detectado

**Tabela A.3.5.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 1,0 g/L inicial de células e pH 7,0 (Ensaio 5).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)
0	7,3	1,2	14,0	90,4	nd	nd	nd
24	7,2	5,2	nd	78,1	4,0	1,9	4,1
48	7,2	7,7	nd	60,4	12,7	1,9	3,8
72	7,1	7,8	nd	50,2	22,9	2,2	3,0
96	7,1	9,4	nd	36,5	34,2	2,5	6,7

nd = não detectado

**Tabela A.3.6.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 1,0 g/L inicial de células e pH 7,0, suplementado com 2,0 g/L de vanilina (Ensaio 6).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanilina (g/L)	Álcool vanilil (g/L)
0	7,0	1,3	14,6	86,4	nd	nd	nd	2,0	nd
24	7,0	2,8	4,5	82,6	nd	1,1	3,1	nd	2,4
48	7,0	5,3	nd	66,4	9,9	1,6	3,8	nd	2,2
72	7,0	6,1	nd	49,9	23,4	1,7	3,4	nd	2,2
96	7,0	7,3	nd	31,8	34,5	0,94	4,6	nd	2,5

nd = não detectado

**Tabela A.3.7.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 1,0 g/L inicial de células e pH 7,0, suplementado com 2,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 7).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Siringaldeído (g/L)	Ácido síringico (g/L)
0	7,0	1,3	14,1	84,1	nd	nd	nd	1,3	nd
24	7,0	1,1	13,6	83,3	nd	0,31	nd	1,3	0,10
48	7,0	1,1	12,3	76,6	nd	0,15	1,3	1,2	0,085
72	7,0	1,1	13,1	83,9	nd	0,20	1,4	1,1	0,12
96	6,9	1,6	10,0	84,3	nd	0,30	1,6	1,1	0,23

nd = não detectado

**Tabela A.3.8.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 1,0 g/L inicial de células e pH 7,0, suplementado com 2,0 g/L de vanilina e 2,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 8).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanil. (g/L)	Álcool vanilil (g/L)	Siringal. (g/L)	Ácido síringico (g/L)
0	7,0	1,1	14,9	87,2	nd	nd	nd	1,8	nd	1,8	nd
24	7,0	1,1	18,4	86,2	nd	nd	nd	2,0	0,030	1,9	0,079
48	7,0	1,0	12,5	79,2	nd	nd	nd	1,8	0,040	1,8	0,056
72	7,0	1,1	14,2	83,0	nd	nd	nd	1,9	0,040	1,8	0,067
96	7,0	0,9	14,4	83,4	nd	nd	nd	2,2	0,040	2,0	0,071

nd = não detectado

**Tabela A.3.9.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 5,5 (Ensaio 9).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,6	2,9	14,5	92,2	nd	nd	nd
24	5,5	6,8	nd	65,2	12,4	1,9	7,1
48	5,5	8,2	nd	36,0	33,7	2,1	8,1
72	5,5	8,4	nd	9,9	53,2	2,4	8,9
96	5,5	11,4	nd	0,50	53,2	1,5	10,4

nd = não detectado

**Tabela A.3.10.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 5,5, suplementado com 2,0 g/L de vanilina (Ensaio 10).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanilina (g/L)	Álcool vanilil (g/L)
0	5,7	2,5	13,7	82,1	nd	nd	nd	1,9	nd
24	5,6	4,3	nd	69,7	8,7	2,0	7,9	nd	2,3
48	5,5	4,8	nd	42,0	30,2	2,0	8,7	nd	2,2
72	5,5	5,1	nd	15,8	50,5	2,2	8,0	nd	2,3
96	5,5	7,4	nd	1,7	55,0	2,2	5,3	nd	2,5

nd = não detectado

**Tabela A.3.11.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 5,5, suplementado com 2,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 11).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Siringaldeído (g/L)	Ácido siríngico (g/L)
0	5,6	2,3	14,5	88,2	nd	nd	nd	1,9	nd
24	5,6	3,2	1,2	73,6	0,90	1,3	6,9	1,6	0,024
48	5,6	3,5	nd	62,9	7,3	1,4	8,9	1,4	0,032
72	5,6	3,8	nd	56,3	16,3	1,9	9,4	1,5	0,042
96	5,5	3,9	nd	40,8	25,1	1,7	9,7	1,0	0,058

nd = não detectado

**Tabela A.3.12.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 5,5, suplementado com 2,0 g/L de vanilina 2,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 12).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanil. (g/L)	Álcool vanilil (g/L)	Siringal. (g/L)	Ácido síringico (g/L)
0	5,6	3,0	13,6	84,2	nd	nd	nd	1,9	nd	2,0	nd
24	5,6	2,7	10,9	82,4	nd	nd	nd	0,86	1,4	2,1	0,019
48	5,6	2,9	10,9	81,9	0,23	0,15	4,5	0,49	1,6	1,9	0,017
72	5,6	2,5	10,9	81,6	0,71	0,18	3,4	0,47	1,7	1,8	0,022
96	5,5	2,2	10,0	82,2	0,78	0,25	2,4	0,53	1,8	2,1	0,024

nd = não detectado

**Tabela A.3.13.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 7,0 (Ensaio 13).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)
0	7,1	3,1	13,5	81,4	nd	nd	nd
24	7,1	6,1	nd	65,8	9,4	2,4	6,4
48	7,1	8,6	nd	45,9	22,5	2,9	7,7
72	7,0	9,4	nd	30,0	35,0	3,4	7,3
96	7,0	9,8	nd	13,3	43,2	3,8	6,8

nd = não detectado

**Tabela A.3.14.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 7,0, suplementado com 2,0 g/L de vanilina (Ensaio 14).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanilina (g/L)	Álcool vanilil (g/L)
0	7,0	3,1	13,8	86,1	nd	nd	nd	2,4	nd
24	7,0	5,3	nd	75,6	5,4	1,6	3,9	nd	2,4
48	7,0	6,6	nd	50,1	20,8	2,1	3,4	nd	2,1
72	7,0	7,0	nd	35,3	33,4	1,9	4,3	nd	2,2
96	7,0	8,4	nd	18,3	41,0	2,1	4,2	nd	2,1

nd = não detectado

**Tabela A.3.15.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 7,0, suplementado com 2,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 15).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Siringaldeído (g/L)	Ácido síringico (g/L)
0	7,0	3,2	9,7	81,2	nd	nd	nd	2,1	nd
24	7,0	3,7	6,3	69,9	nd	0,21	2,9	0,92	0,10
48	7,0	4,1	4,5	75,4	0,14	0,56	2,6	1,1	0,19
72	6,9	4,3	2,4	69,8	0,45	0,68	5,4	0,87	0,28
96	6,9	4,7	1,1	65,7	0,93	0,90	5,5	0,41	0,51

nd = não detectado

**Tabela A.3.16.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 7,0, suplementado com 2,0 g/L de vanilina e 2,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 16).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanil. (g/L)	Álcool vanilil (g/L)	Siringal. (g/L)	Ácido síringico (g/L)
0	7,1	3,2	13,5	86,3	nd	nd	nd	2,4	nd	2,4	nd
24	7,1	3,0	11,0	84,4	nd	0,63	1,8	1,4	0,69	1,9	0,033
48	7,1	3,0	7,9	84,6	nd	0,35	1,1	1,3	0,65	1,8	0,014
72	7,1	2,9	4,3	84,4	nd	0,21	2,4	1,3	0,68	1,9	0,016
96	7,0	2,9	3,6	83,9	nd	0,077	1,3	1,4	0,63	1,8	0,017

nd = não detectado

**Tabela A.3.17.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 2,0 g/L iniciais de células e pH 6,3, suplementado com 1,0 g/L de vanilina e 1,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 17).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanil. (g/L)	Álcool vanilil (g/L)	Siringal. (g/L)	Ácido síringico (g/L)
0	6,4	2,3	13,6	83,3	nd	nd	nd	1,2	nd	1,2	nd
24	6,4	2,6	4,3	82,5	0,10	0,95	5,5	nd	1,1	0,89	nd
48	6,4	3,2	nd	61,7	7,0	1,1	3,9	nd	1,1	0,76	0,024
72	6,4	3,4	nd	59,4	17,5	1,6	7,3	nd	1,1	0,56	0,029
96	6,3	3,8	nd	45,8	28,6	2,2	6,4	nd	1,2	0,42	0,035

nd = não detectado

**Tabela A.3.18.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 2,0 g/L iniciais de células e pH 6,3, suplementado com 1,0 g/L de vanilina e 1,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 18).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanil. (g/L)	Álcool vanilil (g/L)	Siringal. (g/L)	Ácido siríngico (g/L)
0	6,4	1,8	14,5	83,7	nd	nd	nd	1,2	nd	1,3	nd
24	6,3	2,6	4,8	83,1	nd	0,67	4,2	nd	1,2	1,0	nd
48	6,3	3,2	nd	73,3	7,9	1,3	6,5	nd	1,2	0,86	0,022
72	6,3	3,7	nd	57,4	17,1	1,6	6,3	nd	1,2	0,67	0,029
96	6,3	3,9	nd	46,6	28,9	1,8	6,9	nd	1,3	0,52	0,035

nd = não detectado

**Tabela A.3.19.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 2,0 g/L iniciais de células e pH 6,3, suplementado com 1,0 g/L de vanilina e 1,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 19).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanil. (g/L)	Álcool vanilil (g/L)	Siringal. (g/L)	Ácido siríngico (g/L)
0	6,4	2,0	13,5	85,1	nd	nd	nd	1,0	nd	1,0	nd
24	6,4	2,7	1,0	78,4	0,66	0,18	6,2	nd	1,2	1,0	nd
48	6,4	3,1	nd	67,5	9,5	1,4	8,6	nd	1,2	0,85	0,022
72	6,4	3,5	nd	50,3	20,9	1,6	7,5	nd	1,2	0,66	0,027
96	6,3	3,6	nd	38,8	30,5	0,87	5,0	nd	1,4	0,54	0,036

nd = não detectado

#### APÊNDICE 4. RESULTADOS DE FERMENTAÇÃO, OBTIDOS NOS ENSAIOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2<sup>2</sup> COM FACE CENTRADA

Nesta seção, encontram-se representados por tabelas, os valores de variação do pH, crescimento celular, consumo de açúcares, formação de xilitol, glicerol e etanol, assim como os valores de variação dos compostos fenólicos (vanilina e siringaldeído) e de seus álcoois ou ácidos correspondentes, obtidos no cultivo de *C. guilliermondii* FTI 20037 em meio semi-sintético (ensaios do planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> com face centrada).

**Tabela A.4.1.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 5,5 (Ensaio 1).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)
0	5,6	2,9	14,5	92,2	nd	nd	nd
24	5,5	6,8	nd	65,2	12,4	1,9	7,1
48	5,5	8,2	nd	36,0	33,7	2,1	8,1
72	5,5	8,4	nd	9,9	53,2	2,4	8,9
96	5,5	11,4	nd	0,50	53,2	1,5	10,4

nd = não detectado

**Tabela A.4.2.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 5,5, suplementado com 2,0 g/L de vanilina (Ensaio 2).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanilina (g/L)	Álcool vanilil (g/L)
0	5,7	3,1	17,8	89,4	nd	ND	nd	ND	ND
24	5,7	4,8	nd	70,4	9,2	ND	3,1	ND	ND
48	5,7	5,0	nd	42,6	29,7	ND	3,0	ND	ND
72	5,7	5,9	nd	22,3	54,5	ND	2,9	ND	ND
96	5,6	7,3	nd	5,1	64,2	ND	2,7	ND	ND

nd = não detectado; ND = não determinado

**Tabela A.4.3.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 5,5, suplementado com 2,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 3).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Siringaldeído (g/L)	Ácido siríngico (g/L)
0	5,7	3,4	18,5	92,3	nd	ND	nd	ND	ND
24	5,7	4,1	nd	78,2	1,6	ND	2,8	ND	ND
48	5,7	4,8	nd	66,7	10,1	ND	3,6	ND	ND
72	5,7	4,8	nd	51,7	20,1	ND	3,6	ND	ND
96	5,7	5,0	nd	38,7	32,8	ND	3,7	ND	ND

nd = não detectado; ND = não determinado

**Tabela A.4.4.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 5,5, suplementado com 2,0 g/L de vanilina 2,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 4).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanil. (g/L)	Álcool vanilil (g/L)	Siringal. (g/L)	Ácido siríngico (g/L)
0	5,6	3,0	13,6	84,2	nd	nd	nd	1,9	nd	2,0	nd
24	5,6	2,7	10,9	82,4	nd	nd	nd	0,86	1,4	2,1	0,019
48	5,6	2,9	10,9	81,9	0,23	0,15	4,5	0,49	1,6	1,9	0,017
72	5,6	2,5	10,9	81,6	0,71	0,18	3,4	0,47	1,7	1,8	0,022
96	5,5	2,2	10,0	82,2	0,78	0,25	2,4	0,53	1,8	2,1	0,024

nd = não detectado

**Tabela A.4.5.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 5,5, suplementado com 1,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 5).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Siringaldeído (g/L)	Ácido siríngico (g/L)
0	5,7	3,2	18,7	109,9	nd	ND	ND	1,0	nd
24	5,6	4,6	nd	94,8	6,8	ND	ND	0,80	0,020
48	5,7	5,0	nd	75,7	22,7	ND	ND	0,59	0,030
72	5,6	5,4	nd	57,3	38,6	ND	ND	0,40	0,040
96	5,6	6,0	nd	39,6	53,3	ND	ND	0,25	0,050

nd = não detectado; ND = não determinado

**Tabela A.4.6.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 5,5, suplementado com 2,0 g/L de vanilina e 1,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 6).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanil. (g/L)	Álcool vanilil (g/L)	Siringal. (g/L)	Ácido síringico (g/L)
0	5,7	3,3	19,3	112,0	nd	ND	ND	2,3	nd	1,2	nd
24	5,6	3,4	nd	101,3	1,2	ND	ND	nd	2,2	0,87	0,020
48	5,7	4,1	nd	88,8	15,0	ND	ND	nd	2,4	0,64	0,020
72	5,6	4,9	nd	69,8	30,6	ND	ND	nd	2,3	0,36	0,030
96	5,6	4,9	nd	54,4	43,0	ND	ND	nd	2,7	0,21	0,040

nd = não detectado; ND = não determinado

**Tabela A.4.7.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 5,5, suplementado com 1,0 g/L de vanilina (Ensaio 7).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanilina (g/L)	Álcool vanilil (g/L)
0	5,7	3,3	19,0	110,9	nd	ND	ND	1,1	nd
24	5,5	5,7	nd	89,2	13,1	ND	ND	nd	1,1
48	5,6	6,2	nd	59,8	36,7	ND	ND	nd	1,1
72	5,5	8,1	nd	33,2	58,8	ND	ND	nd	1,1
96	5,4	7,4	nd	12,1	75,0	ND	ND	nd	1,0

nd = não detectado; ND = não determinado

**Tabela A.4.8.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 5,5, suplementado com 1,0 g/L de vanilina e 2,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 8).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanil. (g/L)	Álcool vanilil (g/L)	Siringal. (g/L)	Ácido síringico (g/L)
0	5,7	3,2	19,2	112,3	nd	ND	ND	0,92	nd	1,9	nd
24	5,6	3,3	Nd	106,1	0,48	ND	ND	nd	1,1	1,7	0,020
48	5,7	4,0	Nd	96,8	4,4	ND	ND	nd	1,3	1,6	0,030
72	5,6	4,4	Nd	85,8	13,4	ND	ND	nd	1,2	1,2	0,030
96	5,6	4,3	Nd	73,7	23,6	ND	ND	nd	1,0	0,93	0,040

nd = não detectado; ND = não determinado

**Tabela A.4.9.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 5,5, suplementado com 1,0 g/L de vanilina e 1,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 9).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanil. (g/L)	Álcool vanilil (g/L)	Siringal. (g/L)	Ácido síringico (g/L)
0	5,7	2,7	18,9	110,7	nd	ND	ND	1,0	nd	1,0	nd
24	5,7	3,7	nd	103,5	3,1	ND	ND	nd	1,1	0,90	0,010
48	5,7	4,2	nd	85,9	16,7	ND	ND	nd	1,2	0,68	0,020
72	5,7	4,5	nd	69,3	31,5	ND	ND	nd	1,2	0,49	0,030
96	5,7	4,5	nd	53,5	45,3	ND	ND	nd	1,3	0,32	0,040

nd = não detectado; ND = não determinado

**Tabela A.4.10.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 5,5, suplementado com 1,0 g/L de vanilina e 1,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 10).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanil. (g/L)	Álcool vanilil (g/L)	Siringal. (g/L)	Ácido síringico (g/L)
0	5,7	2,3	11,0	92,4	nd	nd	nd	0,87	nd	0,90	nd
24	5,6	3,5	nd	85,0	3,3	1,3	6,1	nd	1,1	0,81	0,030
48	5,6	3,8	nd	69,6	16,4	1,1	2,6	nd	1,1	0,67	0,020
72	5,6	4,0	nd	53,6	30,1	0,88	5,3	nd	1,1	0,46	0,030
96	5,6	4,4	nd	37,3	40,6	nd	nd	nd	1,1	0,28	0,030

nd = não detectado

**Tabela A.4.11.** Ensaio fermentativo de bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em meio semi-sintético com 3,0 g/L iniciais de células e pH 5,5, suplementado com 1,0 g/L de vanilina e 1,0 g/L de siringaldeído (Ensaio 11).

Tempo (h)	pH	X (g/L)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Glicerol (g/L)	Etanol (g/L)	Vanil. (g/L)	Álcool vanilil (g/L)	Siringal. (g/L)	Ácido síringico (g/L)
0	5,7	2,2	10,7	91,2	nd	nd	nd	0,87	nd	0,90	nd
24	5,6	3,6	nd	83,9	3,0	0,54	5,1	nd	1,1	0,84	0,010
48	5,6	3,9	nd	69,7	16,5	0,83	4,6	nd	1,1	0,62	0,020
72	5,6	4,2	nd	52,5	30,3	0,87	4,7	nd	1,0	0,47	0,030
96	5,6	4,5	nd	37,7	43,7	1,2	4,5	nd	1,2	0,30	0,040

nd = não detectado