

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

TAÍS CÚGOLA COELHO

**Avaliação das condições de imobilização de células de
Candida guilliermondii FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*)
visando a produção de xilitol**

Lorena – SP

2007

TAÍS CÚGOLA COELHO

**Avaliação das condições de imobilização de células de
Candida guilliermondii FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*)
visando a produção de xilitol**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Área de concentração: Conversão de Biomassa

Orientador: Dr. Sílvio Silvério da Silva

Lorena – SP

2007

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Coelho, Taís Cúgola

Avaliação das condições de imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) visando a produção de xilitol / Taís Cúgola Coelho ; orientador Sílvio Silvério da Silva. -- 2007
90 f. : fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2007

1. Biotecnologia 2. Xilitol 3. Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar 4. Bucha vegetal 5. Imobilização 6. *Candida guilliermondii* 7. Fermentação . I. Título.

574.6 - CDU

***Aos meus pais, Adilson e Helena,
aos meus irmãos, Vivian e Bruno,
e ao meu esposo, José Otávio,
com amor e gratidão.***

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e luz em todos os dias da minha vida.

Ao Dr. Sílvio Silvério da Silva, que, nos anos de convivência, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico, intelectual e, sobretudo, pessoal.

À Escola de Engenharia de Lorena e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela oportunidade de realização do curso de mestrado e concessão de bolsa para a realização desta pesquisa.

Ao Dr. Júlio César dos Santos, pela atenção e apoio durante o processo de definição e orientação.

Aos Professores Marco Antônio, Arnaldo Márcio, Graça, Inês, Ismael e Adriane, pelos conhecimentos compartilhados, sugestões e amizade.

A Juliana Polizel, pelo contato inicial com a técnica de imobilização celular. Aos alunos de iniciação científica Diego, Rodolfo, Pche, Rafael e Rodrigo, pela ajuda e atenção.

Aos queridos Djalma, Jussara, Nicanor, Paulinho, Rita e Zé Cobrinha, pelo auxílio nas dificuldades laboratoriais e pelo carinho. Sem deixar de agradecer a: Bárbara, Fabrício, André, Ismael, Lílian, Valquíria, Isnaldi e colegas da Biblioteca, pela atenção e boa vontade sempre.

A Aline, pela companhia e amizade. A minha querida família de Guaratinguetá: Priscila, Dora e Clóves, por me acolherem e me ajudarem a reconhecer o meu valor. A Priscila Duarte, por sua amizade, ajuda e cumplicidade nos vários momentos. A Olívia, pelo auxílio, companhia e amizade. Aos amigos João Paulo e Lívia, Rogério e Tânia, Dani Cortez, Juliana, Gina, Michel e Tati pela amizade e momentos divertidos. Aos amigos queridos Fran, Dani Borba, Carlinhos, Giovani, Ciro, Talita, Solange e Giuliano, Regininha, Larissa e Waltinho, Soninha e Baby, André, Lili, Boutros e Juan, pela força, companhia e pelos momentos divertidos que passamos juntos. A grande amiga Renata (Ubá) pela força mesmo que de longe.

A minha família, meus pais, meus irmãos e ao José Otávio, pela confiança e apoio para perseverar sempre.

Todos vocês fazem parte deste trabalho, muito obrigada.

"Daqui a alguns anos você estará mais arrependido pelas coisas
que não fez do que pelas que fez. Então solte as amarras.
Afastese do porto seguro. Agarre o vento em suas velas.
Explore. Sonhe. Descubra."
Mark Twain

RESUMO

COELHO, T. C. **Avaliação das condições de imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) visando a produção de xilitol.** 2007. 90f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

Este trabalho teve como objetivo a utilização da bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) como biosuporte para a imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 para a produção de xilitol. Na primeira fase do trabalho, que consistiu na escolha do melhor tratamento aplicado à bucha, diferentes tratamentos foram aplicados ao suporte na tentativa de se promover uma maior capacidade de imobilização. Foram utilizados tratamentos com polietilenoimina, hidróxido de sódio, a associação destes dois tratamentos e vapor. Inicialmente, a bioconversão de xilose em xilitol foi realizada em frascos Erlenmeyer de 125 mL utilizando meio semi-sintético, composto de xilose, sulfato de amônio, cloreto de cálcio e extrato de farelo de arroz, com agitação de 200 rpm, sob temperatura de 30 °C. A indução da floculação das células por adição de quitosana também foi avaliada. O tratamento do suporte com vapor de 1,5 Kgf/cm², sob temperatura de 127 °C, por 35 minutos permitiu a obtenção dos melhores valores para eficiência de imobilização (50%), produtividade volumétrica (0,47 g/L.h) e rendimento em xilitol (0,66 g/g). O desempenho com hidrolisado, permitiu apenas 13% de células imobilizadas no suporte ao final da fermentação, porém, com produtividade e rendimentos semelhantes aos encontrados anteriormente, 0,45 g/L.h e 0,67 g/g, respectivamente. A bioconversão de xilose em xilitol foi também avaliada sob sistema de bateladas repetidas, com reciclo de células. A reutilização das células imobilizadas em sistema de bateladas repetidas de fermentação possibilitou um aumento de aproximadamente 30% nos valores de produtividade e rendimento após o primeiro ciclo. Ao final de cinco ciclos, os valores de produtividade e rendimento aumentaram em 14,06% e 32,57%, respectivamente. A indução da floculação das células com quitosana não foi observada, resultando em valores de imobilização bem próximos àqueles obtidos sem agente floculante. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o potencial da bucha vegetal como um biosuporte abundante e de baixo custo utilizado na produção biotecnológica de xilitol.

Palavras-chave: Xilitol. Imobilização. *Candida guilliermondii*. Bucha vegetal. Fermentação. Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

ABSTRACT

COELHO, T. C. **Evaluation of the conditions of *Candida guilliermondii* FTI 20037 cells immobilization in loofa sponge (*Luffa cylindrica*) for xylitol production.** 2007. 90f. Dissertation (Master of Science in Industrial Biotechnology) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

The principal aim of this work was the use of loofa sponge (*Luffa cylindrica*) as a biosupport for the immobilization of *Candida guilliermondii* FTI 20037 cells for xylitol production. In the first part of the work, which consisted in choosing the best treatment method of loofa, the support was treated by different methods, as polyethylenimine, sodium hydroxide, their association and steam. Initially, xylose-to-xylitol bioconversion was performed in 125 mL Erlenmeyer flasks containing xylose, ammonium sulfate, calcium chloride and rice straw extract, operated at 200-rpm agitation speed, at 30°C. The flocculation induction by the addition of chitosan was also evaluated. The treatment of loofa with 1.5 Kgf/cm² steam, at 127°C, for 35 minutes provided the highest values of immobilization efficiency (50%), volumetric xylitol productivity (0.47 g/L.h) and yield (0.66 g/g). However, the performance with sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate provided only 13% of immobilized cells at the end of fermentation, but the values of volumetric xylitol productivity and yield were similar to those of synthetic medium, corresponding to 0,45 g/L.h and 0,67 g/g, respectively. Xylose-to-xylitol conversion was also evaluated in a repeated batch system with cell recycling. The system was cultured during five successive cycles and the immobilized cells recycling lead to 30% increase of xylitol productivity and yield after the first cycle. At the end of the five cycles, xylitol productivity and yield increased 14.06% and 32.57%, respectively. The flocculation of cells by chitosan was not observed, resulting in values of immobilization efficiency similar to those found for the experiments without flocculant agent. The experimental data presented in this work demonstrated the potential of loofa sponge as a low cost and abundant biosupport in the biotechnological production of xylitol.

Key-words: Xylitol. Immobilization. *Candida guilliermondii*. Loofa sponge. Fermentation. Sugarcane bagasse hydrolysate.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Materiais Lignocelulósicos – <i>Produção, Composição e Utilização em Processos Biotecnológicos</i>	14
2.1.1 Bagaço da Cana-de-Açúcar – <i>Composição, Produção e Utilização</i>	18
2.1.2 Bucha Vegetal – <i>Características e Aplicações</i>	20
2.2 Xilitol – <i>Propriedades e Aplicações</i>	23
2.2.1 Produção de Xilitol em Escala Industrial.....	26
2.2.2 Produção de Xilitol por Via Biotecnológica.....	27
2.3 Imobilização de Células	30
2.3.1 Uso de biosuportes para a imobilização de células.....	36
2.3.1.1 <i>Tratamento do suporte</i>	36
2.3.2 Uso da Quitosana como Agente de Flocculação Celular.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Obtenção do Hidrolisado Hemicelulósico do Bagaço de Cana-de-açúcar	40
3.2 Concentração e Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico	40
3.3 Obtenção e Preparo do Suporte de Imobilização Celular	40
3.4 Tratamento do Suporte	41
3.4.1 Tratamento com Polietilenoimina 2% (v/v).....	41
3.4.2 Tratamento com Hidróxido de Sódio 2% (p/v).....	41
3.4.3 Tratamento com Hidróxido de Sódio 2% (p/v) e Polietilenoimina 2% (v/v)..	41
3.4.4 Tratamento com Vapor de 1,5 Kgf/cm ²	41
3.5 Microrganismo e Preparo do Inóculo	42
3.6 Imobilização das Células	42
3.7 Meio e Condições de Fermentação	42
3.8 Efeito do Tratamento do Suporte Sobre a Capacidade de Imobilização Celular em Meio Semi-Sintético	43
3.9 Efeito da Quitosana Sobre a Capacidade de Flocculação Celular	43
3.10 Efeito do Tratamento do Suporte Sobre a Capacidade de Imobilização Celular em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-açúcar	43

3.11 Métodos Analíticos	44
3.11.1 Determinação do pH, teor de açúcares, xilitol, ácido acético e etanol.....	44
3.11.2 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural.....	44
3.11.3 Determinação de células livres.....	44
3.11.4 Determinação de células imobilizadas.....	44
3.11.5 Cálculo dos Parâmetros Fermentativos e de Imobilização.....	45
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 Caracterização do Hidrolisado Hemicelulósico do Bagaço de Cana-de-açúcar	47
4.2 Avaliação da capacidade de imobilização celular do suporte sob diferentes tratamentos	50
4.2.1 Avaliação da capacidade de imobilização celular em bucha vegetal <i>in natura</i> e sua influência sobre a produção de xilitol.....	50
4.2.2 Avaliação da capacidade de imobilização celular em bucha vegetal tratada com polietilenoimina (PEI) e sua influência sobre a produção de xilitol.....	52
4.2.3 Avaliação da capacidade de imobilização celular em bucha vegetal tratada com hidróxido de sódio e sua influência sobre a produção de xilitol.....	54
4.2.4 Avaliação da capacidade de imobilização celular em bucha vegetal tratada com hidróxido de sódio e polietilenoimina (PEI) e sua influência sobre a produção de xilitol.....	56
4.2.5 Avaliação da capacidade de imobilização celular em bucha vegetal tratada com vapor e sua influência sobre a produção de xilitol.....	58
4.3 Avaliação da adição de quitosana ao biosuporte e sua influência sobre a eficiência de imobilização e produção de xilitol	61
4.4 Produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana: o desempenho de células de <i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037 livres	61
4.5 Produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana: o desempenho de células de <i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037 imobilizadas em bucha vegetal	63
4.6 Produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana: o desempenho de células de <i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037	

imobilizadas em bucha vegetal sob sistema de bateladas repetidas.....	65
5 CONCLUSÕES.....	77
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	79
REFERÊNCIAS.....	80

1 INTRODUÇÃO

É crescente o interesse em se buscar novas estratégias tecnológicas que estejam fundamentadas no conceito de sustentabilidade, que se baseia na continuidade dos aspectos econômicos, políticos e ambientais da sociedade humana. Faz-se necessário hoje criar alternativas viáveis a processos industriais dispendiosos e/ou poluidores, que encarecem o produto final, além de ir de encontro à questão ambiental.

O Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos desenvolve projetos de caráter sustentável, baseados na Biotecnologia, para o aproveitamento de resíduos e materiais lignocelulósicos, ou seja, biomassa vegetal, que são utilizados em bioprocessos. Resíduos florestais e subprodutos agroindustriais são fontes importantes de açúcares e outros compostos que podem ser convertidos por processos biotecnológicos em produtos de interesse. Dentre os mais estudados encontram-se o bagaço de cana-de-açúcar, a palha e casca de arroz, a fibra de côco e cavacos de eucalipto.

A proposta deste trabalho foi desenvolver uma metodologia de imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) para a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. A característica motivadora foi estabelecer uma condição de imobilização de células em bucha vegetal, um material lignocelulósico abundante, de baixo valor econômico, que vêm se mostrando adequado para a imobilização de células microbianas e vegetais.

O xilitol é um poliálcool com importantes propriedades, as quais têm atraído um interesse crescente de pesquisadores nos últimos anos. Por ter seu metabolismo independente de insulina, o xilitol é adequado como substituto da sacarose indivíduos diabéticos e como fonte energética em nutrição intravenosa. Por inibir a adesão de microrganismos a células epiteliais, diversos trabalhos relacionaram seu uso com a prevenção de doenças que são desencadeadas através da adesão. O xilitol impede a adesão de bactérias, como *Streptococcus mutans* à superfície dos dentes, *Clostridium difficile*, à mucosa intestinal, agente responsável pela colite pseudomembranosa, além da prevenção de otites, por inibir o também o mecanismo de adesão do *Pneumococci*.

O xilitol tem sido produzido em escala industrial por um processo químico, através da redução de xilose pura sob elevadas condições de temperatura e pressão, com a utilização de níquel como catalisador. A bioconversão de xilose a xilitol utilizando o hidrolisado da fração hemicelulósica da biomassa vegetal tem sido estudada por vários pesquisadores. A obtenção biotecnológica do xilitol mostra-se como uma alternativa ao processo químico, por não requerer a purificação inicial da xilose, o que representa menores custos na produção de xilitol, além de se trabalhar sob condições amenas de temperatura e pressão.

A tecnologia de produção de xilitol por células imobilizadas vem se destacando nos últimos anos, por permitir melhores índices de produtividade, além do caráter econômico. A proposta deste trabalho surgiu para dar continuidade às pesquisas referentes à produção biotecnológica do xilitol com a utilização de células imobilizadas, utilizando suportes naturais de baixo custo para a imobilização celular.

Pretende-se com este trabalho contribuir para os estudos que envolvem a obtenção de xilitol a partir de processos biotecnológicos, abordando a produção deste poliálcool a partir de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 imobilizadas em bucha vegetal. Dentro deste contexto, diferentes tratamentos foram aplicados ao biosuporte e avaliados quanto ao desempenho de imobilização celular. O tratamento mais adequado foi escolhido para os experimentos seguintes em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e avaliado sob o sistema de bateladas repetidas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Materiais Lignocelulósicos – *Produção, Composição e Utilização em Processos Biotecnológicos*

Atualmente, as atenções estão voltadas para um aproveitamento mais eficiente dos resíduos agrícolas e florestais, devido ao seu caráter renovável, grande disponibilidade e por serem materiais de custo relativamente baixo. Em países com intensa atividade agrícola, como o Brasil, os resíduos das safras são geralmente queimados no campo, deixando a terra pronta para o próximo plantio. Esta prática, além de gerar poluição, em função da queima, contribui para a destruição da microflora da superfície e redução da fertilidade do solo. O aproveitamento mais eficiente destes resíduos é uma alternativa para contornar tais problemas (KUHAD; SINGH, 1993; PANDEY et al., 2000). A Tabela 1 apresenta algumas fontes e seus respectivos resíduos.

Tabela 1- Exemplos de Materiais Lignocelulósicos

Fonte	Materiais
Produtos da Agricultura (arroz, trigo, milho, mandioca, coco, bambu)	Palha de arroz, de trigo, de cevada; talo (haste) de milho, talo de mamona, talo de mandioca, tronco de bananeira, tronco de coqueiro, galho de algodoeiro, sabugo de milho
Resíduos da Agroindústria (indústria de arroz, açúcar, algodão, juta, serraria, coco)	Farelo, bagaço, casca, resíduos da máquina descaroçadora de algodão, serragem, lascas, cavacos, cascas

Fonte: BISARIA (1991)

Os resíduos agrícolas, sendo materiais lignocelulósicos, são constituídos basicamente de celulose, hemicelulose, lignina, uma pequena quantidade de extrativos e cinzas. As proporções de todos os constituintes variam para cada espécie vegetal (KUHAD; SINGH, 1993). A Tabela 2 apresenta a composição aproximada de alguns materiais lignocelulósicos encontrados na natureza.

A celulose, considerada como o mais abundante e importante biopolímero, é formada por moléculas de glicose unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$. A molécula de celulose é linear, ocorrendo ligações de hidrogênio intra- e intermoleculares. As ligações intramoleculares auxiliam na manutenção da rigidez da cadeia de celulose, enquanto que as intermoleculares mantêm as cadeias em um arranjo firme e compacto. Duas regiões distintas são visualizadas na molécula: a região cristalina,

que apresenta moléculas altamente orientadas e apresenta resistência à degradação microbiana, e a região amorfa, onde há uma menor orientação entre as moléculas, sendo, portanto, mais facilmente hidrolisada (FENGEL; WEGENER, 1989).

Tabela 2 - Composição (%) de alguns materiais lignocelulósicos

Material	Hexosanas	Pentosanas	Lignina	Cinzas
Bagaço de cana-de-açúcar	33	30	29	4
Casca de amendoim	38	36	16	5
Casca de arroz	36	15	19	20
Palha de arroz	32	24	13	12
Palha de aveia	41	6	11	12
Palha de cevada	40	20	15	11
Palha de sorgo	33	18	15	10
Palha de trigo	30	24	18	10
Pinus	41	10	27	8
Sabugo de milho	42	39	14	2
Serragem	55	14	21	5
Talo de Milho	35	15	19	5

Fonte: KUHAD; SINGH (1993)

Assim como a celulose, as hemiceluloses são polímeros que aparecem em grandes quantidades nos resíduos lignocelulósicos. São heteropolissacarídeos formados por cadeias lineares apresentando ramificações laterais, sendo compostas por hexoses (D-glicose, D-manose, D-galactose), pentoses (D-xilose, L- e D-arabinose) e ácidos urônicos. Acredita-se que, devido ao baixo grau de polimerização e falta de cristalinidade, as estabilidades química e térmica desta fração são menores do que da celulose. A fração hemicelulósica é mais facilmente hidrolisável do que a celulose graças à heterogeneidade dos componentes e seu estado amorfo (JEFFRIES, 1983), o que permite a utilização dos seus açúcares, como a D-xilose, para a produção de diferentes produtos de interesse, como, por exemplo, o xilitol (CARVALHO, 2004; SANTOS et al., 2005a; SANTOS et al., 2005b).

A lignina é uma macromolécula mais complexa e segundo Adler (1977 apud PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000), a estrutura da lignina caracteriza-se como uma molécula aromática que é sintetizada a partir de precursores fenilpropanóicos e que pode pertencer a duas classes, como: a guaiacil-lignina e a guaiacil-siringuil-lignina, que diferem no esqueleto fenilpropanóico. De estrutura polifenólica tridimensional, a lignina confere elevada rigidez ao vegetal e não é convertida em açúcares fermentescíveis. Sua degradação através da hidrólise dos resíduos

lignocelulósicos libera compostos fenólicos, como álcoois aromáticos e aldeídos, caracterizados como inibidores do metabolismo microbiano (ZALDIVAR; MARTINEZ; INGRAM, 2000).

A hemicelulose e a lignina juntas formam uma matriz em torno da celulose, e assim penetram nos espaços vazios entre as moléculas de celulose na região amorfa, contribuindo com o aumento na rigidez do vegetal. Os materiais lignocelulósicos *in natura*, devido as suas características, não permitem acessibilidade adequada aos seus componentes. Diversos fatores afetam a hidrólise dos resíduos lignocelulósicos, como a porosidade do material, a cristalinidade da celulose e os conteúdos de lignina e hemicelulose (McMILLAN, 1994).

Assim, uma etapa de pré-tratamento é conveniente para alterar as dimensões macro e microscópicas do resíduo e a sua estrutura (LASER et al., 2002; MOSIER et al., 2005), liberando dessa forma a fração hemicelulósica para a hidrólise. Os processos de pré-tratamento se dividem em: mecânicos, como a moagem; físicos, como o tratamento com vapor; físico-químicos (explosão a vapor); químicos (hidrólise ácida) e biológicos, como a biodegradação (SUN; CHENG, 2002).

Os processos mecânicos, como a moagem, reduzem o tamanho da partícula, reduzem a cristalinidade e causam a quebra de ligações de longas cadeias moleculares (LASER et al., 2002).

O processo de tratamento com vapor, um exemplo de tratamento físico, envolve o aquecimento do material a uma temperatura entre 120 e 250 °C, promovendo uma hidrólise parcial da fração hemicelulósica e um aumento no tamanho dos poros do material (MOSIER, et al., 2005).

A explosão a vapor, um tratamento físico-químico, envolve o aquecimento do material lignocelulósico numa faixa de temperatura entre 160-260 °C, por segundos até alguns minutos, seguindo-se de rápida descompressão. Esta descompressão provoca quebras bem mais acentuadas na estrutura dos materiais lignocelulósicos. A explosão a vapor promove abertura das fibras, solubilização da fração hemicelulósica em razão da hidrólise ocasionada pela ação de ácidos formados durante o tratamento, como o ácido acético, e despolimerização parcial da estrutura da lignina. Os fatores que afetam este processo são o tempo de residência, temperatura, tamanho e conteúdo do material lignocelulósico (DUFF; MURRAY, 1996). Neste processo o gasto de energia é baixo e não há problemas de toxicidade

ambiental. Por outro lado, ocorre a formação de produtos tóxicos (SUN; CHENG, 2002).

No processo biológico, como a biodegradação, são utilizados microrganismos (bactérias e fungos) para degradar determinadas frações do material lignocelulósico. As vantagens deste tipo de pré-tratamento são a baixa energia requerida e condições ambientais brandas. Entretanto, a taxa de hidrólise é ainda considerada baixa (SUN; CHENG, 2002).

Assim, após a etapa de pré-tratamento, o material lignocelulósico pode, então, passar pelo processo de hidrólise. Segundo Mosier et al. (2005), diferentes métodos podem ser utilizados para a separação das frações e liberação dos açúcares monoméricos incluindo: hidrólise enzimática (GNANSOUNOU; DAURIAT; WYMAN, 2005; MOSIER et al., 2005), hidrólise ácida (RODRÍGUEZ-CHONG et al., 2004; SUN et al., 2005), hidrólise alcalina (SUN et al., 2005) e explosão a vapor (DUFF; MURRAY, 1996; McMILLAN, 1994).

O processo de hidrólise enzimática é conduzido por enzimas altamente específicas, liberando açúcares redutores incluindo a glicose. O custo do processo é baixo quando comparado com a hidrólise ácida ou alcalina, uma vez que se trabalha com condições brandas (pH 4,8 e temperatura de 45-50 °C), além de se evitar a ocorrência de corrosão (DUFF; MURRAY, 1996). Três tipos de celulasas estão envolvidas no processo de hidrólise: (1) endoglucanase (endo-1,4-D-glucanohidrolase), que age em regiões de baixa cristalinidade na fibra de celulose, (2) exoglucanase (celobiohidrolase ou 1,4- β -D-glucanocelobiohidrolase), que libera unidades de celobiose, (3) β -glicosidase, que hidrolisa a celobiose liberando, assim, moléculas de glicose. Existem outras enzimas que agem sobre a fração hemicelulósica, como a glicuronidase, acetilesterase, xilanase, β -xilosidade, galactomananase e glucomananase (DUFF; MURRAY, 1996). A atividade da enzima celulase é inibida por celobiose e glicose, o que levou ao desenvolvimento de vários métodos para a redução desta inibição, como a utilização de altas concentrações de enzimas, a suplementação de β -glicosidases durante o processo de hidrólise, e a remoção de açúcares durante o processo por ultrafiltração ou por sacarificação e fermentação espontâneas. No processo de sacarificação e fermentação espontâneas, os açúcares redutores produzidos na hidrólise da celulose ou sacarificação são simultaneamente fermentados, reduzindo, assim, a inibição pelo produto durante a hidrólise enzimática (SUN; CHENG, 2002).

No processo de hidrólise ácida, o uso de ácidos concentrados como H_2SO_4 e HCl pode levar à ocorrência de corrosão, além do risco no manuseio do produto. Desta forma, o emprego de ácidos diluídos tem mostrado eficiência ao fornecer soluções com alta concentração de açúcares, baixas concentrações de compostos inibitórios, sem causar os problemas causados pelos ácidos concentrados. O processo consiste em hidrolisar a fração hemicelulósica, sendo que as frações lignina e celulose permanecem quase inalteradas. Alguns ácidos diluídos utilizados para a hidrólise ácida são: ácido sulfúrico, hidrocloreto, acético e nítrico. O produto da hidrólise é uma solução contendo principalmente açúcares, como xilose, glicose e arabinose. Outros produtos como oligômeros, furfural e ácido acético são também liberados após o procedimento de hidrólise (TEIXEIRA; LINDEN; SCHROEDER, 1999). A temperatura de hidrólise, o tempo e a concentração do ácido influenciam na formação de inibidores do crescimento microbiano (BUSTOS et al., 2003; RODRÍGUEZ-CHONG et al., 2004).

Na hidrólise alcalina ocorre o rompimento nas ligações éster entre hemiceluloses e lignina, sendo que o efeito vai depender do conteúdo de lignina do material lignocelulósico. Ocorre um aumento na porosidade do material quando as ligações éster são rompidas. O uso de NaOH diluído causa uma intumescência no material, aumenta a área de superfície interna, diminui o grau de polimerização e a cristalinidade, leva a ruptura da estrutura da lignina (SUN; CHENG, 2002; SUN et al., 2004).

O aproveitamento de resíduos lignocelulósicos vem sendo amplamente estudado para a produção de diferentes produtos de interesse, como o xilitol, etanol, 2,3-butanodiol, ácido cítrico, ácido láctico, enzimas, entre outros.

Dentre os resíduos estudados, destaca-se no Brasil o bagaço da cana-de-açúcar, a palha de arroz, a palha de trigo e o cavaco de eucalipto, que são abundantes em diversas regiões do país.

2.1.1 Bagaço da Cana-de-Açúcar – *Composição, Produção e Utilização*

O processamento industrial da cana-de-açúcar proporciona um aproveitamento total da matéria-prima, ou seja, além da produção de açúcar e álcool, subprodutos podem ser utilizados como fontes geradoras de energia, na produção de adubos, papel e plásticos biodegradáveis (IEA - SP, 2006).

O bagaço da cana-de-açúcar é um dos principais subprodutos da indústria sucroalcooleira (PANDEY et al., 2000), sendo caracterizado como um resíduo fibroso que é produzido após a moagem e extração do xarope da cana-de-açúcar (ANSELMO FILHO; BADR, 2004; PANDEY et al., 2000). Numa primeira fase, o bagaço substituiu a lenha para a geração de calor nas usinas. Atualmente, o vapor produzido através da queima do bagaço é utilizado para gerar três tipos de energia: térmica, transferindo calor para os processos industriais; mecânica, na movimentação de máquinas; e elétrica, através da movimentação de turbinas, suprimindo o consumo energético do parque industrial (COSTA, 2006).

No Brasil, a safra de cana-de-açúcar para 2006/07 está estimada em 471,17 milhões de toneladas, um valor 9,2% superior à safra anterior devido ao aumento na área de plantio e na produtividade (CONAB, 2006). O Estado de São Paulo, em 2006, responde por 59,9% da produção de cana-de-açúcar no Brasil (IEA-SP, 2006; CONAB, 2006). Do total produzido, aproximadamente 50% é destinado à produção de açúcar, 39% para o álcool e cerca de 10% destina-se à fabricação de outros produtos, como cachaça, rapadura e açúcar mascavo (CONAB, 2006).

No processamento da cana-de-açúcar são gerados cerca de 270 kg de bagaço a partir de 1 tonelada de matéria-prima, sendo que 50% do total de bagaço gerado se destina à demanda de energia da usina sucroalcooleira (FROLLINI; PIMENTA, 1997). O excedente de bagaço por possuir baixo valor econômico se acumula de tal forma a ser considerado um problema ambiental, uma vez que seu acúmulo por longos períodos pode desencadear uma combustão espontânea, oferecendo riscos à usina e regiões vizinhas (DAWSON; DIXON; INKERMAN, 1990).

Vários estudos têm sido desenvolvidos em busca de uma utilização sustentável do bagaço de cana-de-açúcar, que contém cerca de 40-45% de celulose, 30-35% de hemicelulose e 25% de lignina. Além da geração de energia elétrica, o bagaço pode ser utilizado ainda para a produção de papel e papelão, aglomerados, ração animal e adubo (PANDEY et al., 2000). Através de um mecanismo de hidrólise, a fração hemicelulósica é separada e os açúcares, como xilose, glicose e arabinose são liberados, podendo ser utilizados em diversos processos biotecnológicos (LAVARACK; GRIFFIN; RODMAN, 2002; MOSIER et al., 2005; PANDEY et al., 2000).

2.1.2 Bucha Vegetal – Características e Aplicações

A bucha vegetal é um material natural que consiste em uma rede de fibras, obtida da fruta madura e seca de *Luffa cylindrica*, conforme ilustrado na Figura 1. É produzida em abundância em muitos países, dentro das zonas tropicais e subtropicais. Seu uso está basicamente voltado para a esfoliação corporal (OGBONNA et al., 1997).



FIGURA 1. Foto ilustrativa de um fragmento de bucha vegetal (*Luffa cylindrica*)

A bucha vegetal apresenta alto grau de porosidade, alto volume específico de poro, propriedades físicas estáveis, é biodegradável, não tóxica e de baixo custo. Tais características evidenciam, portanto, sua possibilidade de uso como suporte para imobilização de células microbianas em processos fermentativos. A Tabela 3 apresenta a composição química das fibras da bucha vegetal (TANOBE et al., 2005).

Tabela 3 - Composição química da bucha vegetal

Componente	Conteúdo (%)
Holocelulose	82,4
α -celulose	63,0
Hemicelulose	19,4
Lignina	11,2
Extrativos	3,2
Cinzas	0,4

Fonte: TANOBE et al., 2005

Neste contexto, alguns trabalhos já mostraram a importância deste material como um suporte adequado para a imobilização celular. Ogbonna et al. (1994), em experimentos com bucha vegetal, observaram que a natureza, a estrutura do suporte

e a propriedade de do microrganismo são fatores primordiais no processo de imobilização.

Ogbonna et. al (1994) observaram que uso de microrganismos floculantes, como *Saccharomyces cerevisiae*, permitiu que os flocos formados penetrassem na matriz na bucha, alcançando, desta forma, altas concentrações de células imobilizadas (4,4 g células/g de suporte). Por outro lado, a utilização de microrganismos não floculantes, como *Candida brassicae*, não mostrou um desempenho adequado de imobilização em bucha vegetal. Constatou-se, com este resultado, que somente a adesão celular não foi suficiente para se atingir uma imobilização em níveis desejáveis. Em outro trabalho, Ogbonna, Tomiyama e Tanaka (1996) introduziram a quitosana como agente floculante nos experimentos. O uso da quitosana permitiu a formação de flocos de células não-floculantes, possibilitando, dessa forma, melhores valores de imobilização (mais de 70% de células imobilizadas). O uso de fragmentos bucha vegetal obtidos a partir de cortes longitudinais permitiu melhores valores de imobilização (9,9 g células/g suporte) e produtividade de etanol (OGBONNA et al. 1997). Ogbonna, Mashima e Tanaka (2001) utilizaram novamente este biosuporte para a imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* em reator de coluna de bolhas com recirculação de meio para alcançar uma distribuição celular melhor, o que permitiu aumentar a escala do processo de 2L para um reator de 50 L.

Células de microalgas verdes, *Chlorella sorokiniana*, foram imobilizadas em bucha vegetal para a remoção e recuperação de níquel de soluções aquosas (AKHTAR; IQBAL, J.; IQBAL, M., 2004). O uso da microalga imobilizada neste biosuporte permitiu um aumento de 25,3% na remoção do metal realizada pela microalga livre. Além disso, a adsorção de níquel (II) atingiu um valor máximo, não diminuindo com o tempo, ao contrário de outros tipos de suporte, como a sílica gel ou esferas de ágar, com outros microrganismos imobilizados.

Liu et al. (1998) avaliaram a imobilização de células vegetais em diferentes frações da bucha vegetal. O uso da fração contendo as partes externa (periférica) e interna (core) proporcionou maior imobilização celular (0,38g células/g suporte), enquanto que o uso da fração periférica ou do core resultaram em 0,32 e 0,26g célula/g suporte, respectivamente. O uso da bucha vegetal contendo as duas frações em reator de coluna de bolhas permitiu uma imobilização celular de 0,42 g células/g suporte. Os resultados obtidos demonstraram que a bucha vegetal

desempenha um importante papel como suporte de imobilização em processos biotecnológicos para a obtenção de compostos importantes, como flavonóides, terpenóides e vitaminas a partir de células vegetais.

Em outros estudos, células bacterianas de *Zymomonas mobilis* imobilizadas em bucha vegetal e utilizadas na produção de sorbitol permitiram uma melhor conversão do substrato sacarose em produto final (50 g/L) do que células livres (25 g/L), de acordo com Vignoli, Celligoi e Silva (2005).

O uso da bucha vegetal e fibras de côco como suportes de imobilização celular proporcionou melhores resultados de remoção e degradação de carbendazin e ácido 2,4-diclorofenoxiacético, fungicida e herbicida, respectivamente, utilizados em lavouras de arroz (PATTANASUPONG et al., 2004). Foi utilizada uma associação de microrganismos extraídos de amostras de solos do Japão capazes de degradar os compostos tóxicos mencionados. Após 4 dias de cultivo, os microrganismos imobilizados em bucha vegetal e em fibra de côco apresentaram 95% e 80% de degradação do carbendazin, respectivamente, enquanto que o uso da associação de microrganismos livres conseguiu degradar apenas 12%. O ácido 2,4-diclorofenoxiacético foi degradado quase completamente em apenas 1 dia por microrganismos imobilizados, e em 2 dias por células livres. Embora a habilidade de degradação dos microrganismos imobilizados na bucha vegetal ter se mostrado equivalente àquela em fibra de côco, a estabilidade da imobilização em bucha vegetal durante o cultivo foi superior. Os resultados demonstraram também a possibilidade promissora do uso da bucha vegetal na biorremediação de águas poluídas com compostos tóxicos utilizados nas lavouras.

A utilização da bucha vegetal como suporte requer uma etapa de pré-tratamento, visando aumentar a adsorção de células microbianas em sua estrutura. O uso de diferentes tipos de tratamentos físicos ou químicos causa alterações na superfície da fibra, o que vai influenciar diretamente no grau de retenção celular no suporte. Para o uso em compostagem, a bucha vegetal passou por tratamentos químicos com NaOH e metacrilamida de forma a induzir modificações na estrutura da superfície das fibras (TANOBE et al., 2005). Foi determinada a densidade aparente da bucha vegetal ($0,92 \text{ g/cm}^3$), valor este inferior à de outras fibras vegetais ($>1,0 \text{ g/cm}^3$). Através de micrografias obtidas por Microscópio de Varredura Eletrônica, as fibras tratadas com NaOH mostraram irregularidade na superfície, proporcional à concentração de NaOH utilizada, devido à remoção de material da

superfície. Já o tratamento com metacrilamida foi mais drástico, acarretando em danos maiores à integridade da fibra.

2.2 Xilitol – *Propriedades e Aplicações*

O xilitol, composto orgânico de fórmula molecular $C_5H_{12}O_5$, apresenta-se como um cristal rômboico branco altamente solúvel em água. Foi sintetizado e descrito pela primeira vez por Emil Fisher e sua equipe em 1891 (BAR, 1991).

Com poder adoçante semelhante ao da sacarose, o xilitol é o único açúcar-álcool com esta característica. Todos os outros da mesma classe, como sorbitol, maltitol, manitol, apresentam poder adoçante inferior e por isso devem ser utilizados em conjunto com outros adoçantes para alcançar o grau de dulçor desejado (BAR, 1991).

Uma propriedade organoléptica importante do xilitol é o seu valor de calor de dissolução (-34.8 cal/g – endotérmico), que promove uma sensação agradável de frescor quando o xilitol é dissolvido na boca. Tal característica é interessante para o uso em produtos que oferecem efeito refrescante, como gomas de mascar e balas, por exemplo (BAR, 1991). Na indústria alimentícia, as reações de escurecimento do tipo Maillard interferem nas características finais do produto. Quando reações deste tipo não são desejáveis pode-se optar pelo uso do xilitol, já que este poliol não participa de reações do tipo Maillard (EMODI, 1978).

O xilitol tem seu uso aprovado em vários países, sendo usado como adoçante, principalmente em produtos não-cariogênicos, como gomas de mascar, balas e chocolates, e com menor frequência em alimentos dietéticos, preparações farmacêuticas, cosméticas e produtos de uso odontológico (BAR, 1991). Algumas propriedades físico-químicas do xilitol são listadas na Tabela 4.

Estudos comprovaram que o metabolismo do xilitol no organismo independe da produção de insulina, possibilitando, assim, seu uso em dieta alimentar de pessoas diabéticas (BAR, 1991; MANZ et al., 1973; PEPPER; OLINGER, 1988). De acordo com Ylikahri (1979), a assimilação do xilitol pelo organismo processa-se de forma que toda a D-glicose formada a partir do xilitol seja estocada sob a forma de glicogênio, sendo liberada gradualmente, sem aumentar rapidamente a concentração sérica de D-glicose. Isso ocorre não só porque o xilitol pode ser rapidamente metabolizado no fígado e transformado em energia, mas também devido à sua absorção no intestino ocorrer de forma lenta.

Tabela 4 - Características e propriedades físico-químicas do xilitol

Propriedades	Características ou Valores
Fórmula	C ₅ H ₁₂ O ₅
Massa molar	152,15g/mol
Aparência	Pó cristalino de cor branca
Sabor	Doce
Odor	Nenhum
Atividade óptica	Não
Ponto de fusão	92-96°C
Ponto de ebulição	216°C (1 atm)
Solubilidade em água a 20°C	63g/100g solução
pH (solução aquosa a 10%)	5-7
Densidade (solução aquosa a 10%)	1.03g/ml
Viscosidade (solução aquosa a 10%)	1.23 cP (a 20°C)
Calor de dissolução	-34,8 cal/g
Índice de Refração (25°C)	1,3471 (solução aquosa a 10%)
Higroscopicidade	Sorbitol > xilitol > sacarose (em elevada umidade relativa)
Poder adoçante	Xilitol = sacarose > sorbitol e manitol
Estabilidade	Estável a 120°C, não sofre caramelização

Fonte: HYVONEN et al. (1982); BAR (1991).

Há evidências consideráveis de que o xilitol não é metabolizado pela maioria dos microrganismos orais (MAKINEN, 1979; PEPPER; OLINGER, 1988). Um estudo realizado por Manz, Vanninen e Voirol (1973) revelou que o uso de uma solução de xilitol a 10% em lavagem bucal impediu a liberação de ácidos responsáveis pelo desgaste do esmalte dos dentes. Sem a liberação de tais ácidos, o pH na superfície dos dentes não é reduzido, e, portanto, o desenvolvimento de cáries é dificultado. O xilitol impede a adesão de bactérias, como *Streptococcus mutans* à superfície dos dentes (TRAHAN; BORGEAU; BRETON, 1996). De acordo com Iwata et al. (2003), o processo de formação da cárie está relacionado com uma série de fatores, como a microbiota oral, o consumo de alimentos que levem a produção de ácidos, o aumento na sensibilidade da dentina com o passar dos anos e a produção de glucana insolúvel, isto é, polissacarídeos constituintes da placa bacteriana que são formados a partir da metabolização de açúcares pela microbiota oral. Neste trabalho, os autores observaram que o uso de xilitol não possibilitou a produção de glucana insolúvel, reduzindo, assim, a acumulação de placa na superfície dos dentes. Verificou-se que o uso regular do xilitol pode reduzir até 50% da placa na superfície dos dentes. Mäkinen (1979) observou que, em indivíduos com uma dieta contendo xilitol em detrimento de outros açúcares, ocorrera a remineralização de

cáries já existentes. O consumo de bebidas ácidas, especialmente as cítricas é um fator de risco para a ocorrência de erosão na superfície dos dentes (AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1998). Um trabalho realizado *in vitro*, utilizando suco de laranja puro, demonstrou o efeito aditivo do xilitol e flúor na redução da erosão da superfície dos dentes. O xilitol forma um complexo com íons cálcio, reduzindo, dessa forma, a difusão de íons cálcio e fosfato da lesão para a solução (AMAECHI; HIGHAM; EDGAR, 1998).

A absorção intestinal de cálcio está diretamente relacionada com a presença de vitamina D. Com o passar dos anos, o organismo passa a expressar uma resistência a nível intestinal a 1,25-dihidroxitamina D₃ e ocorre um decréscimo nos receptores de vitamina D no intestino, o que prejudica a absorção deste íon (EBELING; SANDGREN; DiMAGNO; 1992). O complexo formado pelo xilitol com íons Ca²⁺ no intestino pode facilitar a absorção de cálcio através da parede intestinal, independentemente da ação da vitamina D (SVANBERG; KNUUTTILA, 1994). Portadores de diabetes apresentam taxa de glicosilação do colágeno aumentada e síntese desta proteína diminuída. Um trabalho realizado por Knuuttila et al. (2000) demonstrou a influência do xilitol na síntese do colágeno. Uma dieta suplementada com xilitol para ratos com diabetes induzida por *Streptozotocin* possibilitou um aumento na síntese de colágeno e diminuição na glicosilação desta proteína. O metabolismo do xilitol, por aumentar a razão NAD(P)H / NAD(P), estimula a síntese do colágeno. Além disso, o xilitol impede a redução da densidade óssea, contribui para uma menor perda de volume trabecular e aumenta a resistência mecânica dos ossos (MATTILA; KNUUTTILA; SVANBERG, 1998). O trabalho de Mattila et al. (2002) demonstrou o efeito benéfico de uma suplementação dietética de xilitol nas propriedades mecânicas e nas dimensões ósseas de ratos, além de uma diminuição na reabsorção óssea. Em um trabalho mais recente, Mattila, Kangasmaa e Knuuttila (2005) avaliaram a influência do uso concomitante de xilitol e etanol a nível ósseo, já que o etanol aumenta concentração sérica do poliálcool (YLIKAHRI; LEINO, 1979). A suplementação da dieta com xilitol e etanol diminuiu a reabsorção e aumentou a densidade óssea em níveis superiores aos encontrados para a suplementação apenas com xilitol.

O xilitol pode ser usado como fonte energética em nutrição intravenosa, uma vez que os tecidos são capazes de utilizar o xilitol em condições pós-operatórias e pós-traumáticas, nas quais ocorre uma resistência em nível de insulina, impedindo a

utilização efetiva da glicose (FOSTER, 1974 apud MATTILA; KNUUTTILA; SVANBERG, 1998).

Uhari *et al.* (1998) avaliaram a eficácia do xilitol na prevenção de otites médias agudas, uma vez que o xilitol atua na inibição do crescimento de bactérias que influem na incidência da doença, como *Pneumococci*. Esta aplicação foi verificada quando o xilitol foi administrado sob a forma de xarope ou goma de mascar em crianças. Além disso, o xilitol impede a formação do biofilme de *Staphylococcus aureus* sobre a epiderme, que caracteriza a manifestação da dermatite atópica. O biofilme é o primeiro passo para o estabelecimento da adesão da bactéria contra a ação de anticorpos do indivíduo e antibióticos. A composição do biofilme é basicamente fibras de fibrina e glicocálix, cuja síntese é inibida pelo xilitol (MASAKO *et al.*, 2005a; MASAKO *et al.*, 2005b).

A administração de fármacos a pacientes pediátricos, geriátricos e psiquiátricos pode ser facilitada pela utilização de formas farmacêuticas de desintegração rápida (WILSON *et al.*, 1987). Ciper e Bodmeier (2005) avaliaram o uso do xilitol como aditivo hidrofílico em cápsulas de desintegração rápida, obtendo como resultado um tempo mais curto de desintegração, maior flexibilidade da cápsula, além do sabor agradável atribuído ao seu baixo calor de dissolução.

O xilitol participa como produto intermediário no metabolismo de carboidratos em homens e animais, sendo sua concentração sérica na faixa de 0,03-0,06 mg/100 mL (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973; PEPPER; OLINGER, 1988). É inclusive encontrado em frutas e vegetais em concentrações menores que 900 mg/100 g, o que inviabiliza sua obtenção a partir destas fontes através de extração sólido-líquido (EMODI, 1978).

2.2.1 Produção de Xilitol em Escala Industrial

Atualmente, o xilitol é produzido por processo químico através da redução catalítica de xilose obtida através de hidrólise de materiais lignocelulósicos, em presença do catalisador níquel. A produção em escala comercial por via química iniciou-se na Finlândia pela Finish Sugar Co. Ltd., Helsink, com capacidade de produção acima de 3000 ton/ano. Como se trata de um processo que requer o uso de elevada pressão e temperatura além de várias etapas de purificação para a remoção do catalisador antes da etapa de hidrogenação o custo é elevado (HYVONEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982; NOLLEAU *et al.* 1993). Este fato

impulsionou os estudos de novas formas de obtenção do xilitol, sendo a via microbiológica considerada como uma forma alternativa ao processo convencional (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998). A Figura 2 ilustra as tecnologias disponíveis para a produção de xilitol.

2.2.2 Produção de Xilitol por Via Biotecnológica

A via biotecnológica apresenta-se atrativa em relação ao processo convencional, por não requerer uma solução inicial de xilose pura, além de que as condições de temperatura e pressão são mais amenas (SILVA et al., 1997).

Foi a partir da descoberta por Onishi e Suzuki (1966) de leveduras que, em presença de xilose, seriam capazes de induzir a enzima xilose redutase (XR) (E.C.1.1.1.2.1) a catalisar a redução de xilose em xilitol, com a participação dos cofatores NAD(P)H E NADH, que tornou possível a obtenção deste poliálcool através do processo microbiológico. Esta ficou conhecida como a primeira etapa do metabolismo da xilose (JEFFRIES, 1983). O próximo passo refere-se à oxidação de xilitol a xilulose através a enzima xilitol desidrogenase (XD) (E.C.1.1.1.9) em presença dos cofatores NAD⁺ ou NADP⁺. A xilulose é convertida em piruvato, um intermediário que conecta a via das fosfopentoses com a via glicolítica (ROSEIRO et al., 1991). A Figura 3 ilustra um esquema simplificado do metabolismo de xilose realizado por leveduras.

Conforme dispõem Winkelhausen e Kuzmanova (1998), as condições de cultivo exercem influência na bioconversão de xilose em xilitol. Desta forma, a presença de compostos inibidores no hidrolisado, a concentração de oxigênio dissolvido e a concentração celular no meio são fatores primordiais e reguladores desta bioconversão, principalmente quando se deseja obter elevadas produtividades em xilitol.

Conforme descrito no item 3.1, a presença de compostos inibitórios prejudica a bioconversão de materiais lignocelulósicos em produtos de interesse, reduzindo o rendimento e a produtividade.

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar pode apresentar compostos tóxicos como furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e produtos da degradação da lignina, os quais interferem negativamente no metabolismo celular e conseqüentemente na formação de xilitol (FELIPE et al., 1997a,b; PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1997, 1998a; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

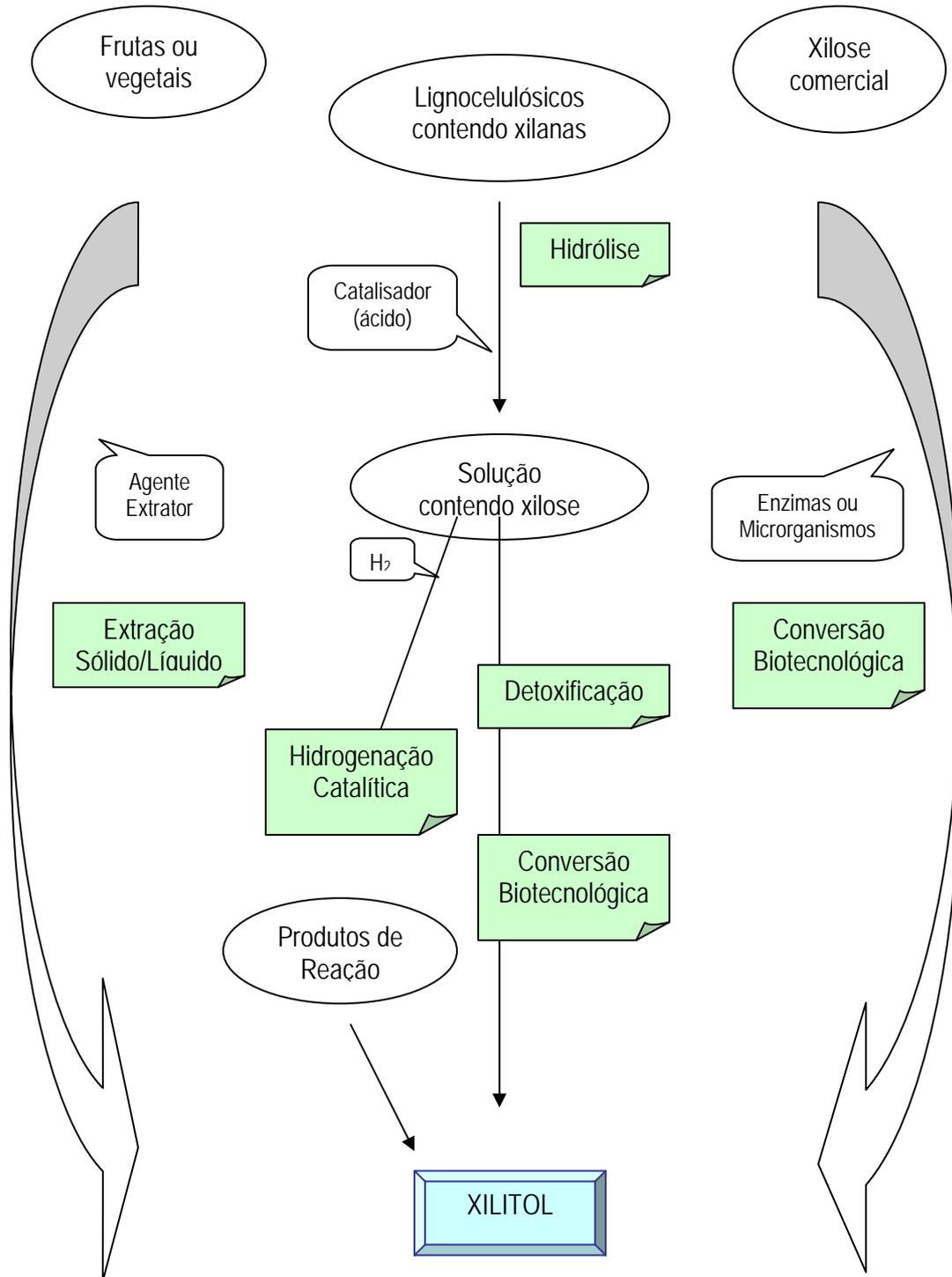


FIGURA 2. Tecnologias disponíveis para a produção de xilitol
 Fonte: PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ (1998a)

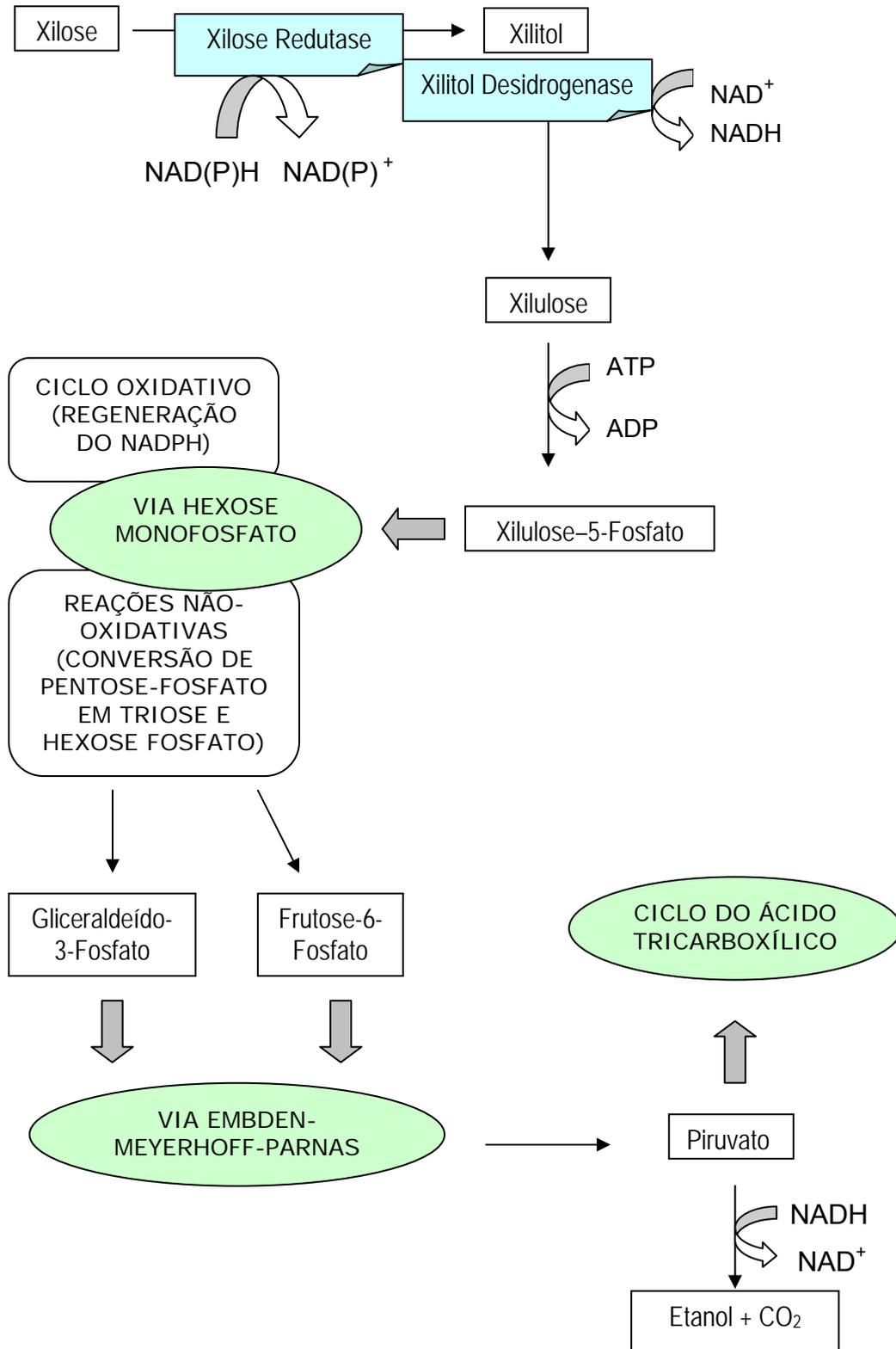


FIGURA 3. Esquema simplificado do metabolismo de xilose por leveduras
 Fonte: PARAJO; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ (1998a)

A toxicidade observada por estes compostos sobre a produção de xilitol é fortemente influenciada pelo pH, concentração de oxigênio dissolvido e concentração celular (FELIPE et al., 1997a; PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1997, 1998a). Experimentos revelaram que a adaptação e a reciclagem de células contribuem para contornar o efeito tóxico destes inibidores, contribuindo para uma melhora significativa dos parâmetros deste bioprocessos (FELIPE et al., 1995,1996).

Ácidos fracos, como o ácido acético, inibem o desenvolvimento celular ao passar para o citosol e dissociar-se, devido ao pH intracelular neutro, diminuindo o pH citosólico (PAMPULHA; LOUREIRO-DIAS, 1989). O furfural e o hidroximetilfurfural causam inativação da replicação celular. Os compostos fenólicos interagem com a membrana celular, levando a perda da integridade, que afeta a função de barreira seletiva e síntese de enzimas (HEIPIEPER et al., 1994 apud PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). A otimização das condições de pré-tratamento e hidrólise pode minimizar a formação de tais compostos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

A utilização de fermentações sucessivas, em que os microrganismos de cada experimento são reutilizados como inóculo no experimento seguinte, gera uma adaptação do microrganismo ao hidrolisado, sendo, portanto, uma alternativa para melhorar a produtividade e a eficiência do processo biotecnológico para a produção de xilitol (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998b).

A disponibilidade de oxigênio no meio de fermentação exerce forte influência sobre conversão de xilose em xilitol por leveduras. O fator de rendimento em xilitol depende da velocidade de transferência de oxigênio, estando esta influência relacionada com a regeneração de coenzimas e com a produção de ATP durante a fosforilação oxidativa (NÁHLIK et al., 2003; NOLLEAU et al., 1993; SILVA; FELIPE; MANCILHA, 1998). Em condições aeróbias, ocorre desvio no metabolismo microbiano para a produção de células, diminuindo a produção de xilitol. Já em condições limitadas de oxigênio, a quantidade de cofator oxidado necessário à ação da enzima xilitol desidrogenase é limitada, ocorrendo, portanto, o acúmulo de xilitol (KIM; KIM; OH, 1997, NÁHLÍK et al., 2003).

2.3 Imobilização de Células

Segundo Webb e Atkinson (1992), “define-se imobilização de células como o confinamento ou a localização de células em uma determinada região do espaço de

tal forma que as mesmas possam exibir propriedades que as diferenciem do meio ao seu redor”.

A tecnologia de imobilização de células vem sendo extensivamente estudada nos últimos anos como um meio de melhorar a produtividade e a eficiência dos processos fermentativos, já que permite uma alta concentração de células no meio de cultivo (OGBONNA; TOMIYAMA; TANAKA, 1996). Além disso, de acordo com Ramakrishna; Prakasham (1999), o uso de células imobilizadas reduz os custos do processo de produção, por possibilitar a reutilização de catalisadores biológicos (LIU et al., 1998; PARK; CHANG, 2000).

Problemas em relação ao transporte de substratos e produtos são passíveis de ocorrer com o uso de células imobilizadas, com conseqüente limitação nas taxas de reação, devido à alta concentração celular, sendo, portanto, uma desvantagem do método de imobilização (BRODELIUS; VANDAMME, 1987).

Existem diversos métodos de imobilização celular que são extensões de métodos desenvolvidos para a imobilização de enzimas. Porém, diferenças importantes entre estes dois biocatalisadores devem ser criteriosamente consideradas, como o tamanho e as exigências fisiológicas das células (BRODELIUS; VANDAMME, 1987; RAMAKRISHNA; PRAKASHAM, 1999).

Conforme sustenta Akin (1987), o método de imobilização deve seguir alguns critérios, como: causar o mínimo de efeitos adversos nas propriedades biocatalíticas desejadas; ser simples e seguro; não requerer muitas etapas e materiais; não gerar subprodutos; possibilitar ampliação de escala; ser adaptável a automação e ser econômico.

Os métodos para a imobilização de biocatalisadores podem ser divididos em quatro grandes grupos, conforme ilustrado na Figura 4 e descritos a seguir:

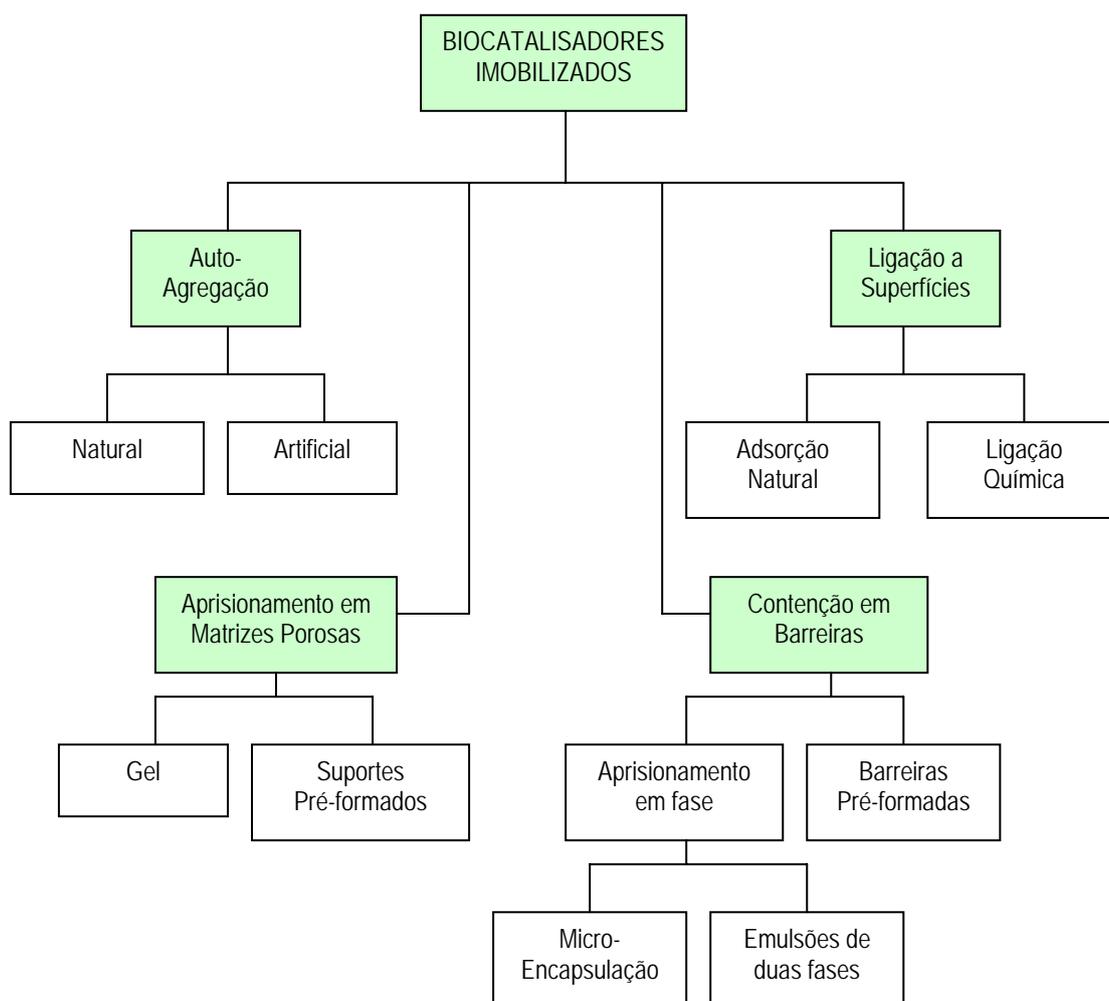


FIGURA 4. Métodos de imobilização de enzimas e células.
Fonte: BÁLES (1994)

- i) Auto-agregação: são consideradas como células imobilizadas as células agregadas, sem a presença de um suporte, quando exibem propriedades que as diferenciem do meio (WEBB; ATKINSON, 1992). Exemplos de células que sofrem auto-agregação são os mofos que formam pellets naturalmente e células vegetais. Quando é desejável a auto-agregação em células que não floculam naturalmente são utilizados os agentes floculantes artificiais ou naturais, como o quitosana (KAREL; LIBICKI; ROBERTSON, 1985).
- ii) Ligação a superfícies: pode ocorrer por ligação química, sendo mais empregado para imobilização de enzimas, e por adsorção, cuja simplicidade

de execução e grande estabilidade química e física levaram a uma ampla utilização desta técnica (FREEMAN; LILLY, 1998).

- iii) Aprisionamento em matrizes porosas: método de imobilização mais extensivamente estudado; baseia-se no confinamento do biocatalisador no interior da matriz ou em membranas semipermeáveis. Para tal método, as seguintes matrizes são empregadas: ágar, alginato, quitosana, xantana, carragena, gelatina, colágeno, poliacrilamida, poliuretanos e algumas matrizes poliméricas adicionais (RAMAKRISHNA; PRAKASHAM, 1999).
- iv) Contenção em barreiras: são utilizadas membranas semipermeáveis pré-formadas ou que se formam ao redor das células a serem imobilizadas, ou ainda uma simples interface entre duas fases líquidas imiscíveis (KAREL et al., 1985).

De acordo com Liu et al. (1998), um suporte para a imobilização celular ideal deve apresentar as seguintes características: ser não reativo, insolúvel, de baixo custo, de fácil manuseio, apresentar alta estabilidade química, térmica e mecânica em culturas por longos períodos, permeabilidade suficiente, grande superfície específica e resistência ao ataque microbiano.

O suporte deve ser composto preferencialmente por um material biodegradável para que não ocasione poluição ambiental após o uso e, finalmente, deve estar disponível em grandes quantidades. Entretanto, não existe um suporte ideal que reúna todas as características pertinentes e que possa ser aplicado a qualquer situação (CORCORAN, 1985).

Alguns suportes lignocelulósicos, utilizados para a imobilização de *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de etanol em diferentes fermentadores foram avaliados por Das et al. (1993). Os suportes testados foram: bagaço de cana-de-açúcar, serragem, casca e palha de arroz, obtendo-se os melhores resultados com a palha de arroz. Micrografias mostraram uma superfície altamente rugosa deste material, característica que permitiu os maiores valores de adsorção celular, o que pode ter contribuído para uma maior produtividade em etanol. A produção de H₂ por *Enterobacter cloacae* imobilizado em palha de arroz, fibra de côco e bagaço de cana-de-açúcar foi avaliado por Kumar e Das (2001). Dos suportes testados, a fibra de côco mostrou o melhor valor de retenção celular ($4,4 \times 10^{11}$ células/g suporte). Micrografias eletrônicas mostraram que a formação de exopolissacarídeo pelo

microrganismo influenciou positivamente na agregação e adesão das células ao suporte.

Especificamente para a produção de xilitol, o uso de células imobilizadas está começando a ganhar maior destaque nos últimos anos. Neste estudo destacam-se principalmente os trabalhos de Carvalho, 2000, 2004; Carvalho et al., 2003; Santos et al., 2005a,b; Silva et al., 2003).

Carvalho (2000) avaliou a influência das condições de imobilização de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em gel de alginato de cálcio para a obtenção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Este autor observou que a condução dos experimentos em bateladas repetidas sob as seguintes condições: concentração de alginato de sódio de 2%, cloreto de cálcio a 0,1 M e tempo de cura das esferas de 24 horas levou a um aumento nas produtividades volumétricas (de 52,6% para 61,4%) e nas eficiências de conversão de xilose a xilitol ao longo das reutilizações sucessivas dos biocatalisadores (de 0,43 g/(L.h) para 0,6 g/(L.h)). Posteriormente, Carvalho et al. (2003) deram continuidade ao estudo de imobilização de *Candida guilliermondii* FTI 20037 em gel de alginato de cálcio. Desta vez foi avaliada a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar sob três sistemas de fermentação: frascos Erlenmeyer, reator de tanque agitado e reator de tanque agitado tipo cesta. A produção de xilitol foi equivalente para os sistemas em frascos Erlenmeyer e em reator de tanque agitado. O atrito das esferas de gel de alginato de cálcio com o agitador mecânico resultou em diminuição de 10,7% no volume das esferas. Assim, uma cesta foi adaptada ao reator de tanque agitado para o confinamento das células, o que resultou em valores inferiores de produção de xilitol, quando comparado aos outros dois sistemas. Tais resultados foram ocasionados por limitações na transferência de massa.

Carvalho (2004) trabalhou com sistema de reator de tanque agitado sob as condições: fator de concentração de hidrolisado igual a 5,0, vazão de ar de 1,30 L/min, agitação de 300 rpm, concentração inicial de células equivalente a 1,4 g/L, pH inicial do meio de fermentação igual a 6,0, obtendo um valor de produção de xilitol de 47,5 g/L após 120 horas de fermentação. Observou-se que a produção de xilitol permaneceu sem alterações por cinco bateladas repetidas de fermentação com reutilização das células imobilizadas. É de ser relevado, inclusive, que o uso de sulfato de amônio e extrato de farelo de arroz acrescentados ao

hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar aumentou a produção de xilitol pela levedura.

Silva et al. (2003) avaliaram a bioconversão de xilose a xilitol em reator de leito fluidizado operado de modo semicontínuo empregando *Candida guilliermondii* FTI 20037 imobilizada em vidro poroso. O reator foi alimentado com 200 g de células imobilizadas, com volume constante de 1,4 L em modo semicontínuo e taxa de aeração equivalente a 15 mL/min. A fermentação se processou em sete ciclos (duração de 672 h), sendo acrescentado novo volume de meio em cada ciclo. Os maiores valores de fator de rendimento de xilitol e produtividade volumétrica foram observados nos dois primeiros ciclos. Foi verificado que parte da xilose produziu biomassa, ao invés de xilitol, como consequência à retirada de células que ocorria quando o meio de fermentação era trocado ao final de cada ciclo (“wash-out”), tornando as partículas de vidro insaturadas ao início de cada ciclo.

Em outros estudos, as influências da taxa de aeração e da concentração do suporte para a imobilização de células foram avaliadas por Santos et al. (2005a) para a produção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. O experimento foi conduzido em reator de leito fluidizado e as células foram imobilizadas *in situ* em vidro poroso por adsorção natural no início da fermentação. Trabalhando-se com uma taxa de aeração de $0,031 \text{ min}^{-1}$ e com uma concentração de suporte de 62,5 g/L obteve-se a maior concentração de xilitol (13,1 g/L). Para tais condições o fator de rendimento foi alto (0,38 g/g) enquanto que a produtividade volumétrica foi a menor (0,18 g/L). Valores superiores foram obtidos em trabalhos realizados em reator de leito fluidizado utilizando xilose comercial, sendo atribuído, portanto, aos inibidores liberados durante o processo de hidrólise os valores inferiores obtidos com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Foi verificada neste trabalho a existência de uma interação significativa entre a concentração de suporte utilizada e a taxa de aeração. O aumento na concentração de suporte promoveu um desvio no metabolismo da levedura para a formação de biomassa.

Dois suportes para a imobilização de células de *Candida guilliermondii*, vidro poroso e zeolitas, foram avaliados para a produção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (SANTOS et al., 2005b). O processo de imobilização das células ocorrera *in situ* por adsorção natural. Os resultados obtidos de concentração de xilitol para ambos os sistemas foram inferiores quando comparados com células livres. Entretanto, a imobilização celular foi maior em vidro poroso (50 %

de células imobilizadas), do que em zeolitas (30 % de células imobilizadas). A estrutura porosa do vidro favoreceu a adesão celular e a conseqüente formação do biofilme entre os poros, enquanto que o tamanho reduzido dos poros de zeolitas permitiu uma imobilização apenas sobre a superfície do material.

2.3.1 Uso de biosuportes para a imobilização de células

É importante que a etapa de imobilização represente um custo adicional mínimo ao processo fermentativo, desta forma, a escolha do suporte e do método de imobilização refletirá diretamente no caráter econômico do processo (OGBONNA et al., 2001).

O uso de materiais lignocelulósicos em processos de imobilização aliado à técnica de adsorção representa uma alternativa econômica e sustentável, graças à diversidade, disponibilidade, biodegradabilidade e baixo custo (DAS et al., 1993).

Kumar e Das (2001) avaliaram diferentes materiais lignocelulósicos, tais como o bagaço de cana-de-açúcar, a fibra de côco e a palha de arroz, como suportes de imobilização de *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 para a produção de hidrogênio. Dos três exemplos, a fibra de côco alcançou o melhor valor de retenção de células.

2.3.1.1 Tratamento do suporte

A superfície do suporte representa um aspecto importante a ser considerado no processo de imobilização, de forma que a aplicação de tratamentos físicos e químicos influencia diretamente na intensidade de adesão das células às fibras do suporte (GEMEINER et al., 1994).

Polieletrólitos como a polietilenoimina (PEI) podem ser utilizados para a modificação da superfície de suportes, promovendo uma maior interação iônica entre a célula e o suporte (ARICA; BAYRAMOĞLU, 2004). Polietilenoimina é um polímero que apresenta grupos imina (NH_2) nas cadeias laterais, conforme pode ser observado na Figura 5.

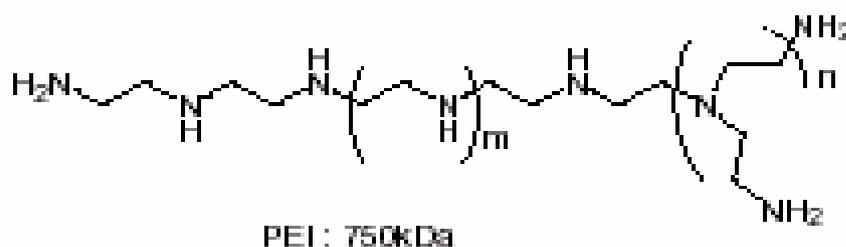


Figura 5. Estrutura da Polietilenoimina

A aplicação de PEI no revestimento de esferas de poli-glicidilmetacrilato metilmetacrilato utilizadas para a imobilização da enzima invertase permitiu melhores taxas de imobilização e uma maior atividade enzimática para a hidrólise da sacarose (ARICA; BAYRAMOĞLU, 2006). Além disso, é aplicável como floculante para melhorar a eficiência de remoção de metais pesados no tratamento de efluentes industriais (BELL; SAUNDERS, 2005).

O tratamento com soluções alcalinas, como hidróxido de sódio a 2% (p/v), remove a parte da lignina e hemicelulose, causa modificações na estrutura cristalina da celulose, promove um inchamento das fibras, o que aumenta a área de superfície do material (BISARIA, 1997). O mecanismo mais provável seria a saponificação das ligações tipo éster intermoleculares entre a fração hemicelulósica e outros componentes (TARKOW; FEIST, 1969 apud SUN; CHENG, 2002).

O tratamento com vapor, como mencionado anteriormente, envolvendo aquecimento a temperaturas entre 120 a 250 °C, promove uma hidrólise parcial da hemicelulose e aumento no tamanho dos poros do material lignocelulósico (HEITZ et al., 1991; MOSIER, et al.; 2005). Diferente do processo de explosão a vapor, que combina alta temperatura e tempos mais curtos, o tratamento com vapor é realizado a temperaturas mais brandas, por um período de tempo maior. De acordo com Sendelius (2005), o pré-tratamento é utilizado principalmente para se obter uma maior exposição das fibras do material. Se muito drástico, libera açúcares e compostos inibidores. Por outro lado também, se muito branda, não promove alterações suficientes no material. No presente trabalho, a função do tratamento com vapor é alterar a superfície da bucha vegetal de forma a aumentar os sítios de adsorção para as células, permitindo uma maior imobilização celular. Dessa forma, o uso de temperaturas mais brandas por um tempo maior, como 127° C, a 1,5 kgf, por 35 minutos (SANTOS et al., 2004) é considerado ideal para este trabalho.

2.3.2 Uso da Quitosana como Agente de Flocculação Celular

A quitosana é um biopolímero formado por aminopolissacarídeos (D-glicosamina), obtida a partir da desacetilação da quitina, substância com função estrutural encontrada em crustáceos, insetos e em alguns microrganismos (STRAND; VARUM; OSTGAARD, 2003).

O processo de hidrólise da quitina para a obtenção de quitosana remove parcial ou totalmente os grupos acetila da quitina, liberando grupos amino, responsáveis pela natureza catiônica da quitosana. As condições reacionais aplicadas determinam a obtenção de quitosanas diferentes quanto ao grau de desacetilação, viscosidade e massa molar. Tais características influenciam diretamente nas propriedades finais deste polímero, como, por exemplo, na solubilidade (CANELA; GARCIA, 2001).

A quitosana é utilizada atualmente em diferentes áreas industriais, apresentando diversas aplicações, tais como: no tratamento de efluentes para a remoção de íons metálicos; como estabilizantes de gorduras e aromas em preparações de alimentos; formação de membranas; como aditivos em cosméticos; para a proteção bactericida de sementes; como estabilizante de frutas e verduras; no microencapsulamento de fármacos; suplemento alimentar e agente flocculante de microrganismos (CRAVEIRO, 2006; PEREIRA, 1999).

Como suplemento alimentar, a quitosana interfere na absorção de gordura pelo organismo. Há duas hipóteses para que a quitosana reduza a absorção de gorduras: (1) Por ser uma substância catiônica, a quitosana atrai moléculas com carga negativa, como gorduras e ácidos biliares. A estrutura formada é não digerível, sendo, portanto, eliminada sem ser metabolizada. (2) a fibra de quitosana envolve a molécula de gordura impedindo, assim, a ação de lipases. Cerca de 1 g de quitosana é capaz de se ligar a 8 g de gordura, que é excretada, gerando um déficit calórico para o organismo. O organismo passa, então, a utilizar reservas para compensar este déficit, sendo esta a ação da quitosana como um auxiliar em dietas e perda de peso. A quitosana interfere na colesterolemia ao se ligar a ácidos biliares, impedindo sua absorção. Na falta de tais ácidos, moléculas de colesterol LDL (Lipoproteína de Densidade Baixa) são requeridas pelo organismo para sintetizar novos ácidos biliares. Esta compensação de ácidos biliares pelo organismo reduz o teor sérico de colesterol LDL (CRAVEIRO, 2006).

A adesão das células a superfícies sólidas pode ser facilitada não só pelas modificações da superfície do suporte, como também através da modificação da própria célula (MICHAUX et al., 1982). A floculação das células pode ser realizada através da adição de um agente floculante ao meio de fermentação, como a quitosana (KUBOTA; EGUCHI, 1997).

Como agente floculante, existem dois possíveis mecanismos de floculação, de acordo com Barany e Szepesszentgyorgyi (2004): (1) formação de pontes entre as células, como resultado da adsorção de macromoléculas na superfície das células e (2) neutralização da carga de superfície, formando camadas sobre a superfície das células.

Diferentes concentrações de quitosana adicionadas ao meio de fermentação foram avaliadas por Ogbonna, Tomiyama e Tanaka (1996). Foi observado que para células de *Candida brassicae* a concentração de 10 mg de quitosana para cada 1g de células permitiu o melhor índice de floculação (93,4%). Logo, esta concentração de quitosana é importante para manter uma floculação adequada durante a fermentação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do Hidrolisado Hemicelulósico do Bagaço de Cana-de-açúcar

O bagaço de cana-de-açúcar fornecido pela Usina Costa Pinto, do grupo Cosan, localizada na cidade de Piracicaba-SP foi exposto ao sol por 1 dia para secagem e conseqüente determinação de umidade.

A hidrólise ácida realizada conforme metodologia estabelecida por Pessoa Jr. et al. (1991), foi executada em reator de aço inox AISI 316, com capacidade de 250L, na Escola de Engenharia de Lorena - USP. O bagaço passou por uma percolação com H₂SO₄ 98%, em uma razão de 100 mg H₂SO₄ /g de matéria seca de bagaço, durante 10 minutos à temperatura de 121°C, utilizando-se uma proporção de 1:10 entre massa de bagaço e volume da solução de H₂SO₄. Após o resfriamento, o hidrolisado foi centrifugado e estocado em câmara fria a 4 °C.

3.2 Concentração e Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico

O hidrolisado foi concentrado sob pressão reduzida em concentrador com capacidade volumétrica de 32 L, sob temperatura de 70 °C (ROBERTO et al. 1991), a fim de se obter uma concentração de xilose adequada de forma que sua concentração inicial nos ensaios fermentativos estivesse entre 40-60 g/L.

A seguir, o hidrolisado foi caracterizado quimicamente quanto ao teor de açúcares e demais componentes e tratado conforme metodologia descrita por ALVES et al. (1998). Na primeira etapa do tratamento, o pH do hidrolisado foi elevado a 7,0 por adição de óxido de cálcio; na segunda etapa, o pH foi reduzido a 5,5 através da adição de H₃PO₄; na terceira etapa, foi adicionado carvão 2,5% massa de carvão / volume de hidrolisado e mantido sob agitação de 200 rpm em incubadora de movimento rotatório, a 30 °C, por 1 h. Entre as etapas, o hidrolisado foi filtrado sob vácuo, sendo ao final do tratamento autoclavado sob 111 °C durante 15 minutos.

3.3 Obtenção e Preparo do Suporte de Imobilização Celular

Neste trabalho, o material obtido do fruto maduro e seco da planta *Luffa cylindrica* - a bucha vegetal, foi utilizado como suporte para a imobilização celular. Este suporte foi reduzido a fragmentos com cerca de 1 cm³ para ser avaliado sob esta forma nos ensaios fermentativos e também para facilitar o processo de

moagem. O processo de moagem ocorreu em peneiras padrão série Tyler com número de malhas 14 e 35. O suporte moído ou fragmentado foi lavado com água destilada e seco em estufa a 100 °C por 48 h.

3.4 Tratamento do Suporte

O suporte foi submetido a diferentes tipos de tratamentos, sendo seu desempenho avaliado quanto à capacidade de imobilização em ensaios fermentativos conduzidos em meio semi-sintético. Quantidades equivalentes a 1,0 g de suporte fragmentado ou moído foram adicionados em frascos Erlenmeyer de 125 mL e submetidos aos seguintes tratamentos:

3.4.1 Tratamento com Polietilenoimina 2% (v/v)

Uma solução de polietilenoimina (PEI) a 2% (v/v) foi preparada e 50 mL foram acrescentados aos frascos, ajustando-se o pH para 7,0 com HCl. Os frascos permaneceram sob agitação de 120 rpm por 24 h. Em seguida, o suporte passou pelas seguintes etapas: lavagem com água destilada, esterilização a 120 °C por 20 minutos e secagem a 60°C por 24 h.

3.4.2 Tratamento com Hidróxido de Sódio 2% (p/v)

Um volume de 50 mL de uma solução de NaOH 2% (p/v), foi adicionado aos frascos Erlenmeyer e submetido às mesmas condições do item anterior.

3.4.3 Tratamento com Hidróxido de Sódio 2% e Polietilenoimina 2%

Nesta terceira metodologia foi feita a junção das metodologias anteriores, na qual o suporte, primeiramente foi tratado com NaOH 2% (p/v) de acordo com a metodologia anterior, sendo em seguida adicionado PEI 2% e foi seguida a primeira metodologia.

3.4.4 Tratamento com Vapor de 1,5 Kgf/cm²

Os frascos Erlenmeyer foram submetidos ao tratamento com vapor de 1,5 Kgf/cm², a 127 °C por 35 minutos, sendo, em seguida, secos a 60 °C por 24 h.

Como controle, avaliou-se o suporte na forma in natura, ou seja, sem tratamento algum, somente esterilização a 120 °C por 20 minutos e secagem a 60°C por 24 h.

3.5 Microrganismo e Preparo do Inóculo

Em todos os experimentos foi utilizada a linhagem de levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 mantida em meio ágar extrato de malte à 4°C.

O inóculo foi preparado para cultivo da levedura em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio composto de xilose (30 g/L), sulfato de amônio (3 g/L), cloreto de cálcio (3 g/L) e extrato de farelo de arroz (10% v/v). As células cultivadas em incubadora com movimento rotatório com agitação de 200 rpm, à temperatura de 30 °C por 24 horas, foram recuperadas por centrifugação a 2000 X g por 20 minutos, lavadas e ressuspensas em água destilada esterilizada. Volumes adequados desta solução foram utilizados como inóculo de forma a se obter uma concentração celular inicial de 1 g/L em cada frasco.

A solução de extrato de farelo de arroz foi preparada em água destilada numa concentração de 200 g/L, que, em seguida foi autoclavada por 15 minutos sob 111°C. Após o resfriamento, o sobrenadante foi separado por centrifugação sob 2000 X g por 30 minutos e utilizado nos ensaios.

3.6 Imobilização das Células

As células foram imobilizadas por adsorção bucha vegetal tratada e in natura no início de cada ensaio fermentativo.

3.7 Meio e Condições de Fermentação

Para a primeira etapa, que consistiu em se avaliar os diferentes tipos de tratamento do suporte trabalhou-se com meio semi-sintético. Preparou-se um meio contendo xilose (50 g/L), sulfato de amônio (3 g/L), 10% (v/v) de extrato de farelo de arroz e cloreto de cálcio (0,1 g/L).

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 1,0 g de suporte tratado e esterilizado, 50 ml de meio de fermentação e 1 g/L de células, sendo estes frascos mantidos em incubadora de movimento rotatório (G25-KC, New Brunswick, Scientific Co) sob agitação de 200 rpm e temperatura de 30 °C.

3.8 Efeito do Tratamento do Suporte Sobre a Capacidade de Imobilização Celular em Meio Semi-Sintético

Para avaliação do tratamento da bucha vegetal como suporte de imobilização foram realizados ensaios fermentativos em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo meio semi-sintético, com um volume de meio de 50 mL sob 200 rpm e 30 °C, utilizando-se 1,0 g de suporte em cada frasco.

Todos os experimentos foram realizados em duplicata. A capacidade de imobilização foi avaliada ao final de cada batelada.

3.9 Efeito da Quitosana Sobre a Capacidade de Flocculação Celular

O suporte foi avaliado sob presença de quitosana, capaz de induzir a flocculação das células. Uma solução de quitosana 1% (p/v) com ácido acético 2% (v/v) foi preparada e adicionada ao meio de fermentação, numa concentração de 10 mg/g de células (OGBONNA et al., 1996).

3.10 Efeito do Tratamento do Suporte Sobre a Capacidade de Imobilização Celular em Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-açúcar

Nas etapas seguintes, buscou-se avaliar o desempenho das células imobilizadas nas condições escolhidas na primeira etapa, além da avaliação do desempenho de células livres, em sistemas de bateladas simples e repetidas com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Preparou-se um meio contendo hidrolisado, suplementado com sulfato de amônio (3 g/L), 10% (v/v) de extrato de farelo de arroz e cloreto de cálcio (0,1 g/L).

Para bateladas simples, as fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 1,0 g de suporte tratado e esterilizado, 50 mL de meio de fermentação e 1 g/L de células, sendo estes frascos mantidos em incubadora de movimento rotatório, sob agitação constante de 200 rpm e temperatura de 30 °C.

No sistema de bateladas repetidas, os frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 1,0 g de suporte, 1,0 g/L de células (concentração inicial) e 50 mL de meio constituído de hidrolisado suplementado, foram mantidos em incubadora de movimento rotatório, sob agitação de 200 rpm e temperatura de 30 °C. Ao final de cada batelada, as células imobilizadas foram recicladas para atuarem como o inóculo para a batelada seguinte.

3.11 Métodos Analíticos

3.11.1 Determinação do pH, teor de açúcares, xilitol, ácido acético e etanol

O pH das amostras foi medido em pHmetro modelo B 474. As concentrações de glicose, xilose, arabinose, xilitol, ácido acético, etanol, furfural e hidroximetilfurfural foram determinadas por HPLC em cromatógrafo SHIMADZU LC-10-AD. Para a análise do teor de açúcares, xilitol, ácido acético e etanol, as amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro Sep Pak C18 e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 45 °C; volume de injeção de 20 µl; detector de índice de refração RID 6A; fase móvel H₂SO₄ 0,01 N e fluxo de 0,6 mL/min.

3.11.2 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural

Para a análise do teor de furfural e hidroximetilfurfural, as amostras foram previamente filtradas em membrana Minisart e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna RP 18 (200 X 4,6 mm) mantida à temperatura de 25 °C; volume de injeção de 20 µl; detector de ultravioleta SPD-10a UV-VIS (276 nm); fase móvel acetonitrila/água 1:8 com 1% de ácido acético e fluxo de 0,8 mL/min.

3.11.3 Determinação de células livres

A concentração de células livres no meio de fermentação foi determinada pela leitura da densidade óptica (DO) a 640 nm em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B e correlacionada com a massa seca de células (g/L) por meio de uma curva de calibração previamente construída. Para isto foram retiradas amostras que foram centrifugadas a 2000 X g por 20 min. O precipitado foi ressuspensionado em água destilada e foi diluído, sendo então feita a leitura no espectrofotômetro.

3.11.4 Determinação de células imobilizadas

Para se determinar a massa de células imobilizadas no suporte, realizou-se uma análise gravimétrica por diferença da massa seca do suporte antes e após o contato com as células no meio de fermentação. A cada 24 h de fermentação o

suporte foi filtrado para a retirada do excesso de meio de fermentação e em seguida, lavado com 50 mL de água destilada. Este suporte foi colocado numa estufa a 100°C até massa constante, sendo então realizada a análise gravimétrica.

3.11.5 Cálculo dos Parâmetros Fermentativos e de Imobilização

I. Fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{p/s}$, g xilitol/g xilose)

$$Y_{p/s} = \Delta P / -\Delta S = (P_f - P_i) / (S_i - S_f)$$

Sendo:

P_f : concentração final de xilitol

P_i : concentração inicial de xilitol

S_f : concentração final de xilose

S_i : concentração inicial de xilose

II. Fator de conversão de xilose em massa celular ($Y_{x/s}$, g célula/g xilose)

$$Y_{x/s} = \Delta X / -\Delta S = (X_f - X_i) / (S_i - S_f)$$

Sendo:

X_f : concentração celular total final

P_i : concentração celular inicial

S_f : concentração final de xilose

S_i : concentração inicial de xilose

III. Eficiência de conversão de xilose em xilitol ($\eta\%$)

$$\eta (\%) = (Y_{p/s} \text{ obtido} / Y_{p/s} \text{ teórico}) \times 100$$

Sendo:

$Y_{p/s} \text{ teórico} = 0,917 \text{ g xilitol/g xilose}$ (BARBOSA et al, 1988)

IV. Produtividade em xilitol (Q_p , g xilitol.L⁻¹.h⁻¹)

$$Q_p = (P_f - P_i) / t$$

Sendo:

t: tempo de fermentação.

V. Taxa de consumo de açúcares (Q_n , g.L⁻¹.h⁻¹)

$$Q_n = (C_i - C_f) / t$$

Sendo:

Q_n : Taxa de consumo de açúcares em determinado tempo

C_i : concentração inicial de açúcares

C_f : concentração final de açúcares

t: tempo de fermentação

VI. Concentração de células imobilizadas ($C_{el \text{ imob}}$)

$$C_{el \text{ imob}} = (m_f - m_i) / V$$

m_f : massa de suporte após lavagem e secagem

m_i : massa de suporte antes da fermentação

V: volume do reator

VII. Eficiência de imobilização (η_{imob} %)

$$\eta_{\text{imob}} (\%) = [(m_{\text{imob}}) / (m_{\text{imob}} + m_{\text{liv}})] \times 100$$

Sendo:

m_{imob} : massa de células imobilizadas no suporte no instante t

m_{liv} : massa total de células livres no meio de fermentação no mesmo instante t (g)

VIII. Retenção de células no suporte (λ)

$$\lambda = m_{\text{cel}} / m_{\text{sup}} \text{ (g/g)}$$

Sendo:

m_{cel} = massa de células imobilizadas no suporte (g)

m_{sup} = massa de suporte (g)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização do Hidrolisado Hemicelulósico do Bagaço de Cana-de-açúcar

Após a secagem ao sol e determinação do teor de umidade (14,40%), o bagaço de cana-de-açúcar foi submetido à hidrólise ácida e, em seguida à concentração, tratamento e autoclavagem. A Tabela 5 apresenta a composição média do hidrolisado submetido a estes procedimentos.

Tabela 5 - Caracterização do hidrolisado hemicelulósico após as etapas de hidrólise, concentração e tratamento

Variáveis	Original*	Após Concentração	Após Tratamento
pH	1,05	0,60	5,31
Arabinose (g/L)	0,74	3,22	3,08
Glicose (g/L)	0,52	2,41	2,33
Xilose (g/L)	17,0	67,06	59,53
Ác. acético (g/L)	0,87	2,94	2,82
Furfural (g/L)	0,093	0,053	0,0044
HMF (g/L)	0,060	0,23	0,0026

*GUEDES, 2005.

Observa-se, pela Tabela 5, que a hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar permitiu a obtenção de um hidrolisado hemicelulósico composto de xilose (17,0 g/L), o açúcar predominante, arabinose (0,74 g/L) e glicose (0,52 g/L) em pequenas concentrações. Além disso, verifica-se que após a concentração do hidrolisado houve um aumento no teor de tais açúcares proporcional ao fator de concentração, conforme observado por Carvalho (2004) e Rodrigues (1999). Tal fato demonstra que durante a etapa de concentração não houve degradação destes açúcares.

Na Tabela 5 é possível observar a ocorrência de um decréscimo no pH inicial após a etapa de concentração do hidrolisado. Tal queda no valor de pH pode ser atribuída ao aumento da concentração de íons H^+ provenientes do ácido sulfúrico utilizado na hidrólise do bagaço e ao aumento da concentração de ácido acético.

As razões xilose/glicose e xilose/arabinose no hidrolisado original foram 32,69 e 22,97, respectivamente. Após a etapa de concentração, as razões xilose/glicose e xilose/arabinose reduziram para 27,83 e 20,83, respectivamente. O tratamento

aplicado ao hidrolisado permitiu a obtenção de razões xilose/glicose e xilose/arabinose de 18,66 e 16,35, respectivamente. As razões de xilose/glicose e xilose/arabinose decrescem ao longo das etapas de hidrólise, concentração e tratamento do hidrolisado, fato também observado por Carvalho (2004), Guedes (2005) e Santos (2005). Os resultados encontrados por estes autores estão dispostos na Tabela 6. A explicação para este decréscimo é atribuída, provavelmente, à ocorrência de uma degradação parcial da molécula de xilose, aliada ao aumento nas concentrações de glicose e arabinose ao longo das etapas de concentração e tratamento.

As razões xilose/glicose e xilose/arabinose determinadas em todas as etapas de obtenção do hidrolisado foram, em geral, superiores aos valores citados na literatura, atribuindo à variabilidade da matéria-prima utilizada as diferenças encontradas na composição dos hidrolisados.

Tabela 6 - Razões de xilose/glicose e xilose/arabinose de outros autores

Autores	Original		Etapa de Concentração (fC=4)		Etapa de Tratamento	
	X/G ^a	X/A ^b	X/G	X/A	X/G	X/A
Carvalho (2004)	15,86	12,33	14,02	9,94	13,41	9,37
Guedes (2005)	32,69	22,97	22,51	20,15	22,99	22,40
Santos (2005)	17,67	17,15	22,71	15,32	26,91	10,21
Presente trabalho	32,69	22,97	27,83	20,83	18,66	16,35

^a Razão xilose/glicose

^b Razão xilose/arabinose

A concentração de ácido acético obtida após a hidrólise ácida (0,87 g/L) foi 66,54%, 57,56% e 74,26% menor do que a obtida por Carvalho (2004), Rodrigues (1999) e Santos (2005). A diferença observada entre estes valores pode ser atribuída às condições empregadas no processo de hidrólise, uma vez que este ácido é oriundo dos grupos acetila presentes na fração hemicelulósica da biomassa utilizada (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). O teor de ácido acético não aumentou proporcionalmente ao fator de concentração, durante a etapa de concentração, fato também observado por Carvalho (2004), Guedes (2005), Rodrigues (1999) e Santos (2005). A etapa de concentração do hidrolisado foi realizada em pH igual a 1,05, no qual o ácido acético encontra-se sob a forma não-dissociada, permitindo, portanto, a volatilização parcial deste composto, conforme

afirma Windholz (1983). O tratamento aplicado ao hidrolisado reduziu em apenas 4,08% o teor de ácido acético, considerado um inibidor do crescimento celular. Melhores resultados foram encontrados por Santos (2005), o qual conseguiu obter uma redução de 18,25% no teor de ácido acético após o tratamento de um hidrolisado com fator de concentração igual a 4,25. Por outro lado, Carvalho (2004) obteve, após o tratamento, um hidrolisado com o mesmo teor de ácido acético da etapa de concentração, ou seja, não houve remoção deste ácido.

A concentração de furfural obtida após a realização da hidrólise ácida (0,093 g/L) foi superior à encontrada por Rodrigues (1997), Rodrigues (1999) e Santos (2005), cujos valores encontrados foram 0,034 g/L, 0,084 g/L e 0,086 g/L, respectivamente. Por outro lado, valores superiores foram observados por Carvalho (2004) e Morita (1998), cujos valores encontrados foram 0,15 g/L e 0,16 g/L, respectivamente. Após a concentração do hidrolisado observou-se que a concentração de furfural (0,053 g/L) foi 43,01% menor do que aquela obtida após hidrólise (0,093 g/L), fato também observado por Carvalho (2004), Rodrigues (1997) e Santos (2005). Segundo Windholz (1983), o furfural, gerado a partir da degradação de pentoses, apresenta ponto de ebulição igual a 54-55 °C sob pressão reduzida, atribuindo a redução do seu teor à provável volatilização parcial de suas moléculas durante a etapa de concentração do hidrolisado. A etapa de tratamento reduziu drasticamente a sua concentração (91,7% de redução), evidenciando a eficácia do tratamento aplicado em remover tal composto.

O hidroximetilfurfural é um outro composto tóxico que pode ser encontrado em hidrolisados hemicelulósicos, sendo gerado a partir da degradação de hexoses. O teor de hidroximetilfurfural obtido após a etapa de hidrólise do bagaço foi 0,060 g/L, aumentando proporcionalmente ao fator de concentração para 0,23 g/L, após a etapa de concentração. Resultado semelhante foi observado por Carvalho (2004), Morita (1998) e Rodrigues (1997). Após o tratamento do hidrolisado, observou-se que houve uma drástica redução deste composto, conforme ocorrera com o composto furfural, comprovando que o tratamento de destoxificação aplicado ao hidrolisado foi satisfatório na remoção de compostos tóxicos, inibidores do crescimento celular, conforme também observado por Guedes (2005) e Morita (1998).

4.2 Avaliação da capacidade de imobilização celular do suporte sob diferentes tratamentos

4.2.1 Avaliação da capacidade de imobilização celular em bucha vegetal *in natura* e sua influência sobre a produção de xilitol

A Figura 6 ilustra a capacidade de imobilização celular em bucha vegetal *in natura*, sob as formas moída e fragmentada, e o efeito da adição de quitosana.

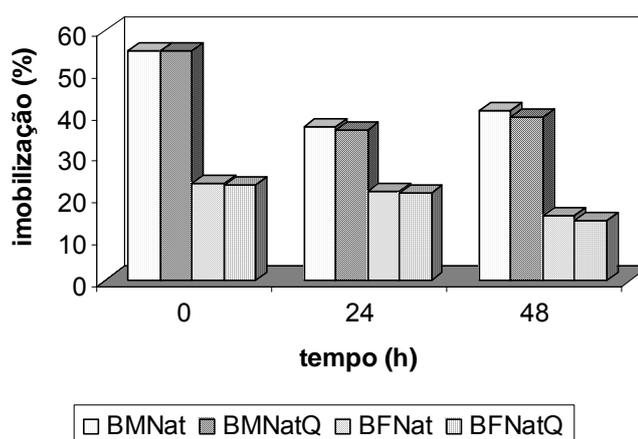


FIGURA 6. Imobilização celular em bucha *in natura*. (Onde, *BMNat*: Bucha moída *in natura*; *BMNatQ*: Bucha moída *in natura* e quitosana; *BFNat*: Bucha fragmentada *in natura*; *BFNatQ*: Bucha fragmentada *in natura* e quitosana).

Observa-se, na Figura 6, que a forma do suporte influenciou fortemente a capacidade de imobilização celular. O uso da bucha fragmentada não permitiu uma imobilização tão eficiente quanto à forma moída. Neste experimento com a bucha *in natura*, denominado de controle, a eficiência de imobilização celular do suporte na forma fragmentada foi 62,17% inferior à forma moída (Tabela 7). A retenção de células no suporte, do mesmo modo, foi inferior na bucha fragmentada. Este resultado repercutiu diretamente sobre a produção de xilitol, cuja eficiência de conversão de xilose em xilitol na forma fragmentada (38,17%) foi 41,66% menor do que o valor encontrado para a forma moída (65,43%). A produtividade volumétrica também foi prejudicada, reduzindo de 0,41 g/L.h na forma moída pra 0,23 g/L.h na forma fragmentada (redução de 43,90%, conforme Tabela 7).

Os resultados obtidos neste experimento e nos próximos nos quais se avaliou a bucha sob a forma fragmentada evidenciam que a forma do suporte exerce grande influência sobre a capacidade de imobilização celular. Esta observação repercute diretamente sobre a produção de xilitol. A baixa eficiência de imobilização celular

observada para o biosuporte na forma fragmentada pode ser atribuída à sua estrutura altamente reticulada. A presença de poros de grande abertura permite uma maior fluidez do meio reacional e de células pelos espaços intersticiais, favorecendo, desta forma, o fenômeno de lavagem das células dos sítios de adsorção.

A adição de quitosana não exerceu influência significativa sobre a capacidade de imobilização, seja na forma fragmentada ou moída. A eficiência de imobilização celular em bucha moída acrescida de quitosana foi 3,78% menor que na bucha moída sem quitosana. A adição deste agente floculante à bucha na forma fragmentada resultou em uma eficiência de imobilização celular 6,55% inferior à bucha fragmentada sem quitosana (Tabela 7).

É conhecido que o método de imobilização por adsorção a superfícies, através do contato do suporte com as células, possui a inconveniência de possibilitar a ocorrência simultânea do fenômeno da dessorção, ou seja, o desprendimento das células do suporte. A facilidade em que ocorre a adsorção é equivalente para o fenômeno contrário – a dessorção, já que as células se aderem ao suporte por adsorção física ou ligações iônicas (DUMITRIU; CHORNET, 1996). De fato, a taxa de imobilização variou durante o cultivo para ambas as formas de suporte ao longo da fermentação, evidenciando o caráter dinâmico do processo de imobilização por adsorção.

Tabela 7 - Parâmetros fermentativos de obtenção de xilitol por células imobilizadas em bucha *in natura* com e sem quitosana

Parâmetros Fermentativos	BMNat ^a	BMNatQ ^b	BFNat ^c	BFNatQ ^d
P _F (g/L)	29,52	26,11	17,01	14,11
Y _{P/S} (g/g)	0,60	0,54	0,35	0,29
η %	65,43	58,89	38,17	31,62
Q _P (g/L h)	0,41	0,36	0,23	0,20
q _P (g/g h)	0,05	0,05	0,02	0,02
Y _{X/S} (g/g)	0,16	0,15	0,25	0,25
Q _S (g/L h)	0,69	0,67	0,68	0,68
q _S (g/g h)	0,10	0,09	0,06	0,06
η _{IMOB} %	40,73	39,19	15,41	14,40
Λ (g/g)	0,16	0,14	0,09	0,09

^a: Bucha moída *in natura* (S₀ = 49,58 g/L; X₀ = 0,96 g/L)

^b: Bucha moída *in natura* com quitosana (S₀ = 48,46 g/L; X₀ = 0,85 g/L)

^c: Bucha fragmentada *in natura* (S₀ = 48,84 g/L; X₀ = 1,03 g/L)

^d: Bucha fragmentada *in natura* com quitosana (S₀ = 48,79 g/L; X₀ = 1,02 g/L)

Conforme se observa na Tabela 7, o uso da bucha moída permitiu que aproximadamente 40% das células estivessem imobilizadas no suporte, com

retenção celular de 0,16 g de células para cada 1 g de suporte ao final da fermentação (72 h). Tal valor de retenção celular é inferior aos encontrados em outros trabalhos, como, o de Liu et al. (1998), que investigou a imobilização de células vegetais em bucha vegetal, alcançando, após três dias de incubação, uma retenção de 0,38 g de células/ g de suporte. Vignoli, Celligoi e Silva (2005) avaliaram a produção de sorbitol a partir de sacarose por células de *Zymomonas mobilis* ATCC29194 imobilizadas em bucha vegetal e obtiveram 52% de células imobilizadas ao final da fermentação.

O uso do suporte na forma *in natura* neste trabalho serviu principalmente como um referencial para se avaliar a influência dos tratamentos aplicados ao suporte, conforme pode ser observado a seguir.

4.2.2 Avaliação da capacidade de imobilização celular em bucha vegetal tratada com polietilenoimina (PEI) e sua influência sobre a produção de xilitol

Conforme Michaux et al. (1982), a adesão de células a superfícies sólidas pode ser facilitada através da modificação da superfície do suporte por tratamentos com polímeros catiônicos.

Neste experimento, o revestimento da superfície da bucha vegetal com cargas positivas foi obtido aplicando-se ao suporte um tratamento com polietilenoimina 2% (v/v). Tal revestimento permite maior interação entre as células e o suporte, influenciando, assim, sobre a adesão e imobilização celular.

A Figura 7 ilustra o comportamento dinâmico das células quanto à eficiência de imobilização celular em bucha vegetal tratada com polietilenoimina (PEI). Percebe-se que ocorreu o fenômeno de dessorção, evidenciado pelo decréscimo na capacidade (eficiência) de imobilização ao longo da fermentação. Ainda na Figura 6 é possível observar que a adição de quitosana neste experimento, conforme observado com a bucha *in natura*, não apresentou um efeito positivo sobre a imobilização celular, reduzindo em 4,71% a eficiência de imobilização em bucha moída e em 3,22% na forma fragmentada.

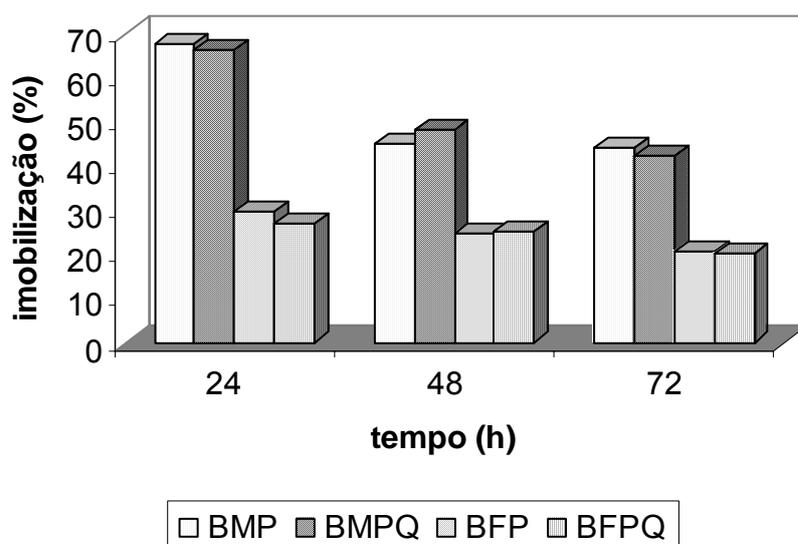


Figura 7. Imobilização celular em bucha tratada com polietilenoimina (PEI). (Onde, *BMP*: Bucha moída tratada com PEI; *BMPQ*: Bucha moída tratada com PEI e quitosana; *BFP*: Bucha fragmentada tratada com PEI; *BFPQ*: Bucha fragmentada tratada com PEI e quitosana).

O tratamento com PEI aplicado ao suporte sob a forma moída permitiu que 44,41% das células estivessem imobilizadas ao final da fermentação (Tabela 8), ou seja, este tratamento proporcionou um aumento de 9,04% na eficiência de imobilização celular em relação ao controle (bucha *in natura*).

Tabela 8 - Parâmetros fermentativos de obtenção de xilitol por células imobilizadas em bucha tratada com polietilenoimina com e sem quitosana

Parâmetros Fermentativos	BMP ^a	BMPQ ^b	BFP ^c	BFPQ ^d
P_F (g/L)	33,05	31,65	24,17	21,61
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,66	0,64	0,49	0,44
η %	71,97	69,79	53,44	47,98
Q_P (g/L h)	0,46	0,44	0,34	0,30
q_P (g/g h)	0,04	0,04	0,03	0,02
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,21	0,21	0,27	0,26
Q_S (g/L h)	0,69	0,69	0,69	0,68
q_S (g/g h)	0,07	0,07	0,05	0,051
η_{IMOB} %	44,41	42,32	20,80	20,13
Λ (g/g)	0,25	0,24	0,14	0,13

^a: Bucha moída tratada com PEI ($S_0 = 50,65$ g/L; $X_0 = 0,97$ g/L)

^b: Bucha moída tratada com PEI e quitosana ($S_0 = 50,01$ g/L; $X_0 = 0,95$ g/L)

^c: Bucha fragmentada tratada com PEI ($S_0 = 49,33$ g/L; $X_0 = 0,92$ g/L)

^d: Bucha fragmentada tratada com PEI e quitosana ($S_0 = 48,84$ g/L; $X_0 = 0,89$ g/L)

Tal resultado refletiu sobre a produção de xilitol, cuja eficiência de conversão de xilose em xilitol (71,97%) aumentou em 10% e a produtividade volumétrica, em 12,20%, em relação ao controle.

A bucha fragmentada acrescida de PEI apresentou uma eficiência de imobilização celular 34,98% maior do que o controle, sendo que a eficiência de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica aumentaram em 40,0% e 47,83%, respectivamente.

Os resultados obtidos neste experimento mostram-se mais expressivos do que o controle, conforme esperado, uma vez que o revestimento do biosuporte com cargas positivas promove uma maior interação iônica entre a célula e o suporte, conforme sustenta Arica e Bayramoğlu (2004).

4.2.3 Avaliação da capacidade de imobilização celular em bucha vegetal tratada com hidróxido de sódio e sua influência sobre a produção de xilitol

O tratamento com hidróxido de sódio 2% (p/v) não impediu a ocorrência da dessorção (Figura 8), semelhante ao que se observou no experimento controle e no tratamento com PEI. A adição de quitosana não provocou mudanças consideráveis na capacidade de imobilização celular.

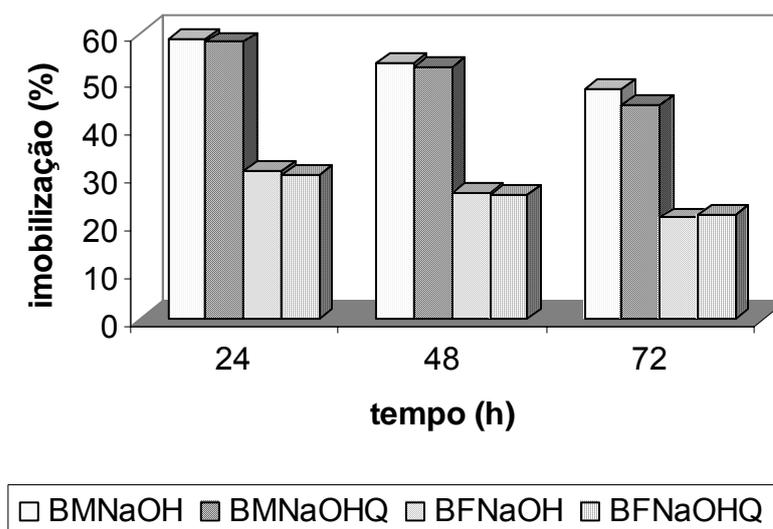


Figura 8. Imobilização celular em bucha vegetal tratada com hidróxido de sódio. (Onde: *BMNaOH*: Bucha moída tratada com NaOH; *BMNaOHQ*: Bucha moída tratada com NaOH e quitosana; *BFNaOH*: Bucha fragmentada tratada com NaOH; *BFNaOHQ*: Bucha fragmentada tratada com NaOH e quitosana).

A eficiência de imobilização celular na forma moída tratada com NaOH

acrescida de quitosana reduziu em 7,15% e aumentou em 2,74% na forma fragmentada. Tais observações estão de acordo com os resultados encontrados no experimento controle e no tratamento com PEI. O aumento na eficiência de imobilização da bucha moída tratada com NaOH foi de 18,76% em relação ao controle (Tabela 9). Tal resultado é 8,92% superior ao encontrado no tratamento com PEI (Tabela 8). Os valores de eficiência de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica aumentaram em 10,0% e 4,88%, respectivamente, em relação ao controle.

Tabela 9 - Parâmetros fermentativos de obtenção de xilitol por células imobilizadas em bucha tratada com hidróxido de sódio e sob influência da quitosana

Parâmetros Fermentativos	BMNaOH ^a	BMNaOHQ ^b	BFNaOH ^c	BFNaOHQ ^d
P_F (g/L)	31,07	30,96	23,15	19,15
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,66	0,65	0,47	0,39
η %	71,97	70,88	51,25	42,53
Q_P (g/L h)	0,43	0,43	0,32	0,27
q_P (g/g h)	0,04	0,04	0,02	0,02
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,25	0,23	0,28	0,28
Q_S (g/L h)	0,66	0,66	0,68	0,68
q_S (g/g h)	0,06	0,06	0,05	0,05
η_{IMOB} %	48,37	44,91	21,19	21,77
Λ (g/g)	0,34	0,29	0,15	0,15

^a: Bucha moída tratada com NaOH ($S_o = 47,39$ g/L; $X_o = 0,84$ g/L)

^b: Bucha moída tratada com NaOH e quitosana ($S_o = 47,79$ g/L; $X_o = 0,80$ g/L)

^c: Bucha fragmentada tratada com NaOH ($S_o = 49,43$ g/L; $X_o = 0,74$ g/L)

^d: Bucha fragmentada tratada com NaOH e quitosana ($S_o = 49,10$ g/L; $X_o = 0,79$ g/L)

Dentre os experimentos estudados: controle, tratamento com PEI e tratamento com NaOH, este último apresentou os melhores resultados, fato que pode ser atribuído ao aumento da área de superfície do biosuporte quando submetido ao tratamento com hidróxido de sódio. Conforme Bisaria (1997), a aplicação de tratamentos químicos promove a intumescência do material, levando a um aumento na área de superfície interna, uma redução no grau de polimerização e cristalinidade, ruptura na estrutura da lignina e remoção parcial da hemicelulose.

4.2.4 Avaliação da capacidade de imobilização celular em bucha vegetal tratada com hidróxido de sódio e polietilenoimina (PEI) e sua influência sobre a produção de xilitol

Conforme a Figura 9, a combinação dos tratamentos, hidróxido de sódio e polietilenoimina, não impediu a ocorrência de dessorção, fenômeno observado também em todos os experimentos anteriores. Além disso, a adição de quitosana, assim como nos outros tratamentos, não apresentou influência significativa sobre a eficiência de imobilização celular do biosuporte. O acréscimo de quitosana reduziu em 2,04% a eficiência de imobilização em bucha moída e 5,70% em bucha fragmentada (Tabela 10).

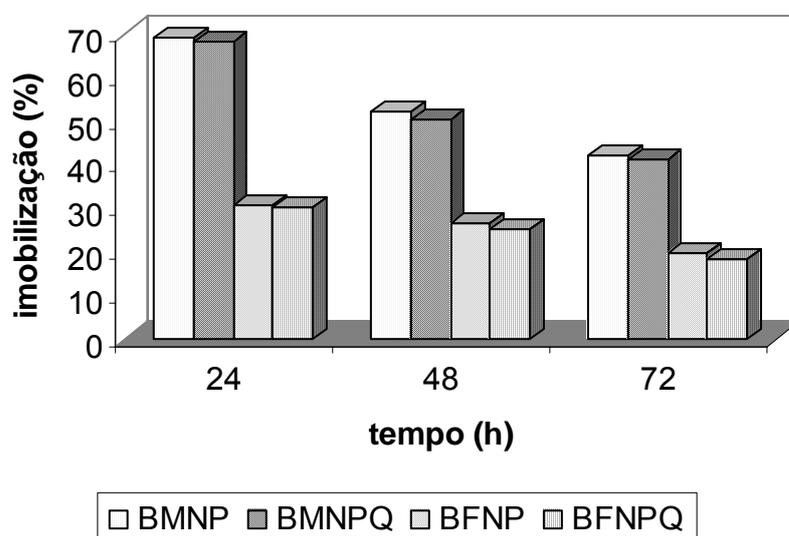


Figura 9. Imobilização celular em bucha vegetal tratada com hidróxido de sódio e polietilenoimina. (Onde: *BMNP*: Bucha moída tratada com NaOH e PEI; *BMNPQ*: Bucha moída tratada com NaOH, PEI e quitosana; *BFNP*: Bucha fragmentada tratada com NaOH e PEI; *BFNPQ*: Bucha fragmentada tratada com NaOH, PEI e quitosana).

A eficiência de imobilização na bucha vegetal na forma moída submetida à combinação de tratamentos foi 3,58% maior do que o controle (Tabela 10), 5,0% menor do que o tratamento com PEI (Tabela 8) e 12,78% menor do que o tratamento com NaOH (Tabela 9). Estes resultados demonstram que a combinação de tratamentos prejudicou a imobilização celular, embora os resultados obtidos tenham sido maiores do que o experimento controle (Tabelas 7 e 140). Os valores de eficiência de conversão e produtividade volumétrica para a bucha moída submetida à combinação de tratamentos foram 11,66% e 17,07% superiores ao controle. A bucha fragmentada demonstrou a mesma tendência da bucha moída submetida á

combinação de tratamentos, cujos valores de eficiência de imobilização, eficiência de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica foram 26,35%, 34,27% e 39,13% maiores do que o controle (Tabela 10).

A combinação de tratamentos aplicados a suportes lignocelulósicos é uma alternativa quando se deseja alcançar alterações no material diferente das obtidas com tratamentos simples, de forma que aumente a capacidade de adsorção das células ao suporte.

Tabela 10 - Parâmetros fermentativos de obtenção de xilitol por células imobilizadas em bucha tratada com hidróxido de sódio e polietilenoimina sob influência da quitosana

Parâmetros Fermentativos	BMNaOHP ^a	BMNaOHPQ ^b	BFNaOHP ^c	BFNaOHPQ ^d
P _F (g/L)	34,57	30,74	23,20	24,96
Y _{P/S} (g/g)	0,67	0,59	0,47	0,50
η %	73,06	64,34	51,25	54,53
Q _P (g/L h)	0,48	0,43	0,32	0,35
q _P (g/g h)	0,05	0,04	0,02	0,03
Y _{X/S} (g/g)	0,20	0,20	0,28	0,28
Q _S (g/L h)	0,71	0,71	0,68	0,69
q _S (g/g h)	0,07	0,07	0,05	0,05
η _{IMOB} %	42,19	41,33	19,47	18,36
Λ (g/g)	0,23	0,23	0,14	0,13

^a: Bucha moída tratada com NaOH e PEI (S₀ = 51,37 g/L; X₀ = 0,86 g/L)

^b: Bucha moída tratada com NaOH, PEI e quitosana (S₀ = 50,93 g/L; X₀ = 0,86 g/L)

^c: Bucha fragmentada tratada com NaOH e PEI (S₀ = 49,50 g/L; X₀ = 0,96 g/L)

^d: Bucha fragmentada tratada com NaOH, PEI e quitosana (S₀ = 49,92 g/L; X₀ = 0,99 g/L)

Neste experimento, a combinação dos tratamentos NaOH 2% (p/v) e PEI 2% (v/v) teve como objetivo a promoção do inchamento das fibras, num primeiro momento, pelo NaOH, e posterior revestimento com grupos imina, tornando a superfície carregada positivamente. Os resultados obtidos com a combinação dos tratamentos foram inferiores a ambos os experimentos realizados isoladamente, não sendo observado sinergismo de ação dos dois tratamentos sobre o suporte, fato provavelmente atribuído à concentração de hidróxido de sódio e polietilenoimina utilizada.

4.2.5 Avaliação da capacidade de imobilização celular em bucha vegetal tratada com vapor e sua influência sobre a produção de xilitol

Assim como o que se observou em todos os tratamentos e no experimento controle, houve um decréscimo na eficiência de imobilização celular ao longo da fermentação, evidenciando a ocorrência da dessorção, para as duas formas do biosuporte (Figura 10). Ainda nesta figura, observa-se que a quitosana não exerceu um efeito significativo sobre a imobilização celular para ambas as formas do biosuporte, conforme o ocorrido com os outros tratamentos e com o controle.

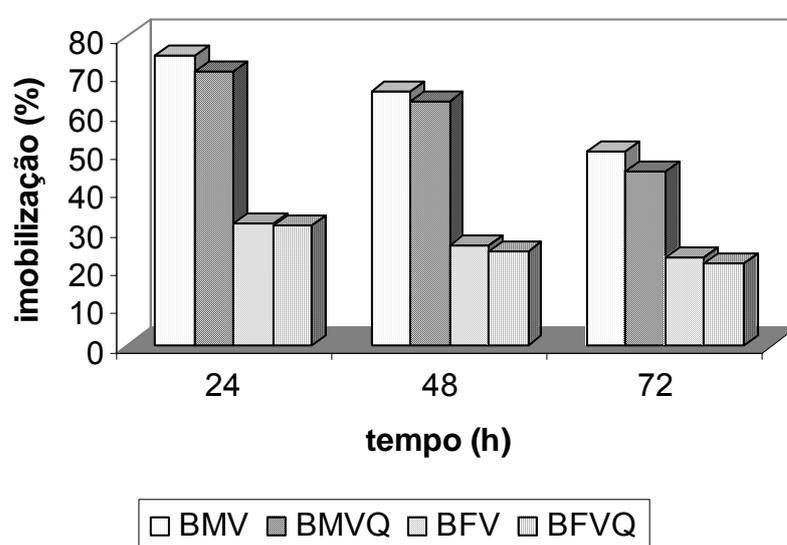


Figura 10. Imobilização celular em bucha vegetal tratada com vapor. (Onde: *BMV*: Bucha moída tratada com vapor; *BMVQ*: Bucha moída tratada com vapor e quitosana; *BFV*: Bucha fragmentada tratada com vapor; *BFVQ*: Bucha fragmentada tratada com vapor e quitosana).

De acordo com a Tabela 11, observa-se que, dentre todos os tratamentos aplicados, os melhores resultados de eficiência de imobilização foram encontrados no tratamento com vapor, obtendo-se, ao final da fermentação, cerca de 50% de células imobilizadas no suporte moído.

Em relação aos outros tratamentos e ao experimento controle, o tratamento com vapor aplicado ao biosuporte na forma moída permitiu uma eficiência de imobilização 23,25% superior ao controle, 13,04% superior ao tratamento com PEI, 3,78% superior ao tratamento com NaOH e 18,99% superior à combinação dos tratamentos.

Em relação à produção de xilitol, a aplicação do tratamento com vapor ao biosuporte na forma moída permitiu a obtenção de valores de eficiência de

conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica 20,01% e 24,39% superiores ao controle.

O tratamento com vapor aplicado ao biosuporte sob a forma fragmentada propiciou um aumento na eficiência de imobilização, eficiência de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica de 45,88%, 42,86% e 52,17% em relação ao controle. Em relação à forma moída, os resultados encontrados para tais parâmetros na forma fragmentada foram 55,22%, 30,56% e 31,37% menores do que os encontrados para a forma moída (Tabela 11).

Tabela 11 - Parâmetros fermentativos de obtenção de xilitol por células imobilizadas em bucha tratada com vapor e sob influência da quitosana

Parâmetros Fermentativos	BMV ^a	BMVQ ^b	BFV ^c	BFVQ ^d
P _F (g/L)	37,23	30,85	25,26	24,47
Y _{P/S} (g/g)	0,72	0,59	0,50	0,48
η %	78,52	64,34	54,53	52,34
Q _P (g/L h)	0,51	0,43	0,35	0,34
q _P (g/g h)	0,05	0,04	0,03	0,03
Y _{X/S} (g/g)	0,21	0,21	0,26	0,27
Q _S (g/L h)	0,72	0,72	0,70	0,70
q _S (g/g h)	0,07	0,07	0,05	0,05
η _{IMOB} %	50,20	45,17	22,48	20,86
Λ (g/g)	0,30	0,27	0,15	0,14

^a: Bucha moída tratada com vapor (S₀ = 51,67 g/L; X₀ = 0,92 g/L)

^b: Bucha moída tratada com vapor e quitosana (S₀ = 51,88 g/L; X₀ = 1,04 g/L)

^c: Bucha fragmentada tratada com vapor (S₀ = 50,58 g/L; X₀ = 1,06 g/L)

^d: Bucha fragmentada tratada com vapor e quitosana (S₀ = 50,75 g/L; X₀ = 1,09 g/L)

A Tabela 12 apresenta os resultados obtidos em todos os tratamentos, quanto à eficiência de imobilização (η_{IMOB}, %), fator de conversão de xilose em xilitol (Y_{p/s}, g/g), eficiência de conversão de xilose em xilitol (η, %) e produtividade volumétrica em xilitol (Q_p, g/L.h).

Conforme a Tabela 12, dentre todos os tratamentos aplicados à bucha vegetal moída, o tratamento com vapor permitiu a obtenção dos melhores resultados de parâmetros fermentativos, possivelmente devido à maior formação de sítios de adsorção na superfície do suporte. Estes sítios de adsorção facilitam a adesão de células de *Candida guilliermondii* a este biosuporte.

O vapor promove um aumento no tamanho dos poros do biosuporte e uma hidrólise parcial da fração hemicelulósica, conforme sustentam Heitz et al. (1991) e Mosier et al. (2005).

Tabela 12 - Parâmetros fermentativos de obtenção de xilitol por células imobilizadas em bucha vegetal moída sob diferentes tratamentos

Parâmetros Fermentativos	BMNat	BMP	BMNaOH	BMNaOHP	BMV
$\eta_{\text{IMOB}} \%$	40,73	44,41	48,37	42,19	50,20
$Y_{\text{P/S}} \text{ (g/g)}$	0,60	0,66	0,66	0,67	0,72
$\eta \%$	0,65	0,72	0,72	0,74	0,79
$Q_{\text{P}} \text{ (g/L h)}$	0,41	0,46	0,43	0,48	0,51

Na Tabela 13 observam-se os resultados obtidos para a bucha vegetal fragmentada sob diferentes tratamentos ao final da fermentação.

Tabela 13 - Parâmetros fermentativos de obtenção de xilitol por células imobilizadas em bucha vegetal moída sob diferentes tratamentos

Parâmetros Fermentativos	BFNat	BFP	BFNaOH	BFNaOHP	BFV
$\eta_{\text{IMOB}} \%$	15,41	20,80	21,19	19,47	22,48
$Y_{\text{P/S}} \text{ (g/g)}$	0,35	0,49	0,47	0,47	0,50
$\eta \%$	0,38	0,53	0,51	0,52	0,55
$Q_{\text{P}} \text{ (g/L h)}$	0,23	0,34	0,32	0,32	0,35

De acordo com a Tabela 13, é possível comparar os resultados obtidos com a bucha fragmentada sob os diferentes tratamentos aplicados. Da mesma forma com o que ocorreu para a bucha moída, o tratamento com vapor permitiu a obtenção dos melhores resultados dentre todos os tratamentos, revelando, mais uma vez, a eficiência deste tratamento na modificação das fibras do material (MOSIER et al., 2005). Em uma análise comparativa entre as Tabelas 12 e 13, torna-se evidente o melhor desempenho da bucha moída, tanto em termos de imobilização, quanto em formação de xilitol. Estes resultados podem ser explicados baseando-se nas características macroscópicas da bucha vegetal na forma fragmentada. Sua estrutura altamente reticulada, apresentado poros de grande abertura, poderia favorecer o fenômeno de lavagem das células dos sítios de adsorção.

Com base nestas considerações, para as próximas etapas foi utilizada a bucha moída e o tratamento de escolha foi vapor de 1,5 Kgf/cm², a 127°C, por 35 minutos.

4.3 Avaliação da adição de quitosana ao biosuporte e sua influência sobre a eficiência de imobilização e produção de xilitol

A adição de quitosana ao início da fermentação não foi suficiente para permitir resultados expressivos de floculação e imobilização (Figuras 6 a 10), provavelmente devido ao fenômeno de dessorção e crescimento de células livres no meio reacional. Sabe-se que a adição de quitosana induz células não-floculantes à floculação (OGBONNA; TOMIYAMA; TANAKA, 1996). Entretanto, as novas células que são geradas durante o crescimento celular não possuem a capacidade de floculação, uma vez que são consideradas não floculantes. Dessa forma, torna-se necessário que a adição de quitosana não aconteça apenas no início da fermentação, e sim durante todo o processo fermentativo, com o acompanhamento do crescimento celular. Assim, as células jovens serão capazes de flocular, possibilitando melhores valores de imobilização. Tal fenômeno foi também observado por Ogbonna, Tomiyama e Tanaka (1996). Estes autores atribuíram o aumento de células não-floculantes ao crescimento pós-dessorção e a ocorrência do fenômeno de defloculação das células, sugerindo, portanto que as células podem perder a capacidade de floculação ao longo do processo. Em virtude dos resultados obtidos, para as próximas etapas, a adição de quitosana foi realizada sucessivamente ao longo da fermentação, acompanhando o crescimento celular.

4.4 Produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana: o desempenho de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 livres

Conforme se observa na Figura 11, a produção de xilitol atingiu uma concentração de 34,30 g/L, resultando em um fator de conversão de xilose em xilitol de 0,70 g/g e produtividade volumétrica em xilitol de 0,41 g/L h (Tabela 14).

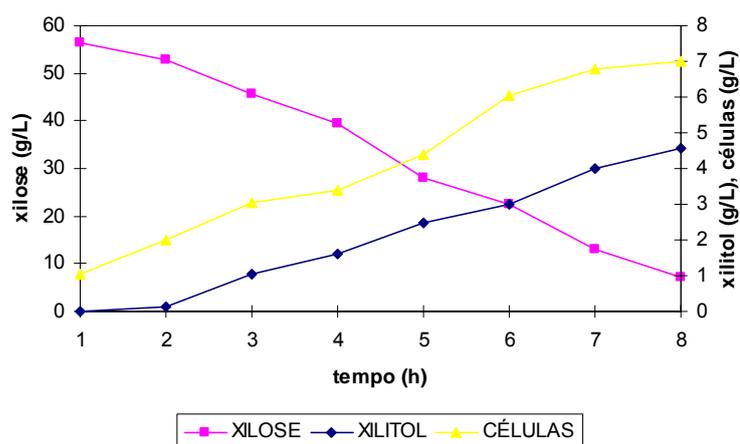


Figura 11. Concentração de xilose, xilitol e células em ensaio com células livres.

Resultados superiores são citados na literatura, como Santos (2005), que encontrou valores de fator de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica 2,86% e 19,51% superiores aos obtidos neste trabalho. Felipe et al. (1997b) obtiveram valores para estes parâmetros 5,71% e 82,93% superiores aos obtidos neste trabalho.

Tais diferenças podem ser explicadas considerando-se a variabilidade do bagaço utilizado para a obtenção do hidrolisado, as condições de hidrólise empregadas, as condições de concentração e tratamento empregadas no hidrolisado obtido.

Tabela 14 - Parâmetros fermentativos de obtenção de xilitol por células livres a partir de hidrolisado

Parâmetros Fermentativos	CL
P_F (g/L)	34,30
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,70
η %	76,34
Q_P (g/L h)	0,41
q_P (g/g h)	0,06
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,14
Q_S (g/L h)	0,59
q_S (g/g h)	0,08

A Figura 12 ilustra os perfis de glicose, arabinose, glicerol, ácido acético e etanol em ensaio com células livres.

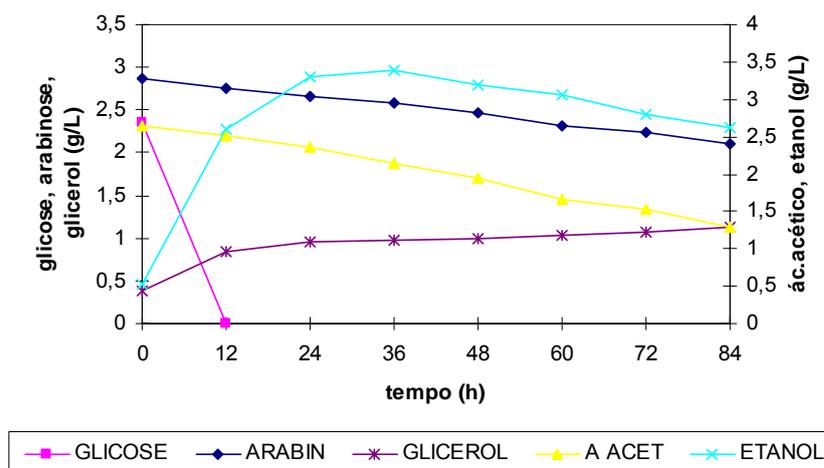


FIGURA 12. Variação nas concentrações de glicose, arabinose, glicerol, ácido acético e etanol em ensaio com células livres.

Com relação à glicose, observa-se que, após 12 h de cultivo, este açúcar foi completamente consumido, em coerência com outros trabalhos (GUEDES, 2005; SANTOS, 2005). A arabinose foi consumida lentamente durante todo o processo fermentativo, sem aumento ou diminuição expressiva no seu consumo. Santos (2005) observou um fato semelhante, atribuindo à presença de xilose em concentrações elevadas o consumo lento de arabinose. O ácido acético, por sua vez, foi consumido de forma mais rápida do que a arabinose, sem, no entanto, ser totalmente consumido. A metabolização de ácido acético pela levedura como fonte de carbono é verificada na literatura

4.5 Produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana: o desempenho de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 imobilizadas em bucha vegetal

Conforme se observa na Figura 13, a produção de xilitol atingiu uma concentração de 37,56 g/L, resultando em um fator de conversão de xilose em xilitol de 0,67 g/g e produtividade volumétrica em xilitol de 0,45 (g/L h) (Tabela 15).

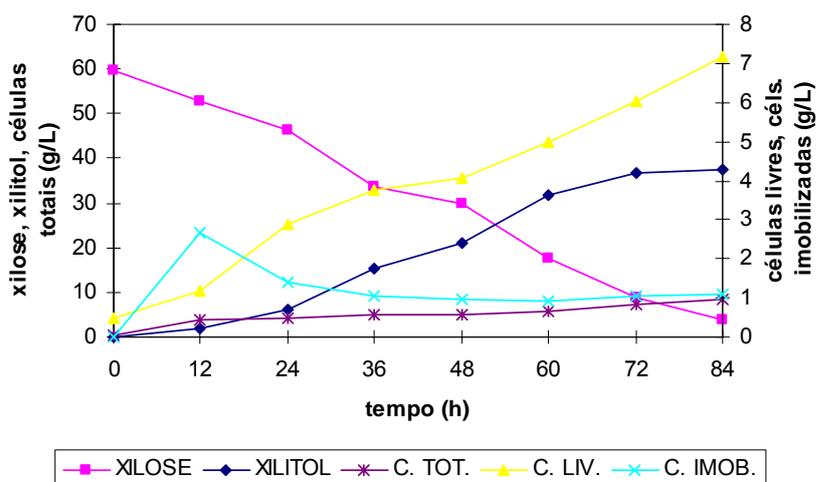


FIGURA 13. Variação nas concentrações de xilose, xilitol, células totais, livres e imobilizadas sem quitosana.

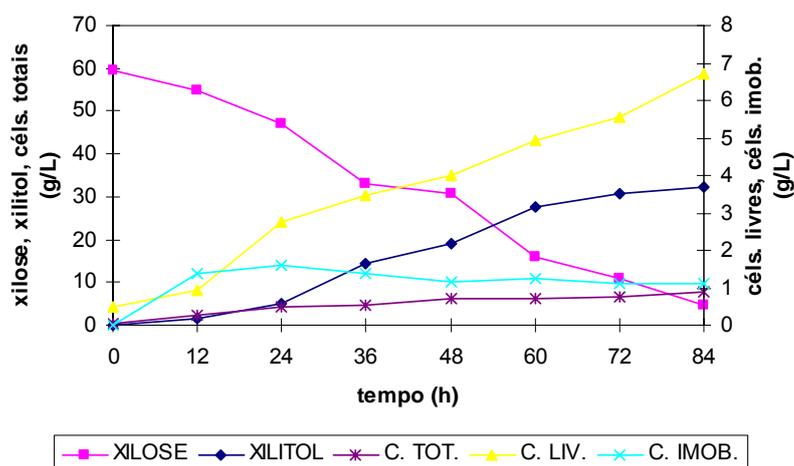


FIGURA 14. Variação nas concentrações de xilose, xilitol, células totais, livres e imobilizadas com quitosana.

A produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico por células imobilizadas foi 9,50% superior do que com células livres, sendo o fator de conversão de xilose em xilitol 4,29% inferior e a produtividade volumétrica 9,76% maior do que os valores encontrados com células livres (Tabela 15). Com relação à eficiência de imobilização, observou-se que a utilização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana como principal fonte de carbono prejudicou a capacidade de imobilização celular do suporte. Enquanto que no experimento com meio semi-sintético o tratamento com vapor aplicado ao suporte permitiu uma eficiência de imobilização de 50% ao final da fermentação, este mesmo tratamento, no experimento com hidrolisado possibilitou uma eficiência de imobilização de

apenas 13% ao final do processo. Uma possível explicação para esta baixa taxa de imobilização obtida com hidrolisado seria a ocupação dos sítios de adsorção do suporte por outras substâncias, que não células, diminuindo, desta forma, a área disponível para a imobilização celular. A princípio, pode-se afirmar que, pelo sistema de bateladas simples, não há diferenças significativas entre o uso de células livres e o uso de células imobilizadas para a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico, uma vez que os resultados encontrados são semelhantes. Atribui-se provavelmente à lenta adaptação das células ao hidrolisado a semelhança de resultados encontrados para células livres e imobilizadas.

A adição de quitosana ao meio reacional ao longo do processo fermentativo não influenciou significativamente o processo de imobilização celular, acarretando em queda de 11,94% no fator de conversão de xilose em xilitol e 15,56% na produtividade volumétrica, em relação ao experimento sem o agente floculante (Tabela 15). Numa análise comparativa entre as Figuras 13 e 14 observam-se perfis semelhantes nos experimentos com e sem o agente floculante, exceto pelo perfil de eficiência de imobilização: na ausência do agente floculante, a taxa de imobilização aumenta bruscamente no início do processo, seguido de queda inicialmente abrupta e logo em seguida mais lenta, permanecendo, ao final da fermentação, 13,08% de células imobilizadas. A adição de quitosana impediu este aumento seguido de queda abruptos, permanecendo mais estável a taxa de imobilização ao longo do processo, finalizando com 14,44% de células imobilizadas no biosuporte.

Tabela 15 - Parâmetros fermentativos obtidos a partir hidrolisado com células imobilizadas em bucha vegetal

Parâmetros Fermentativos ^a	BMVH ^b	BMVHQ ^c
P_F (g/L)	37,56	32,16
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,67	0,59
η %	0,74	0,64
Q_P (g/L h)	0,45	0,38
q_P (g/g h)	0,055	0,048
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,19	0,18
Q_S (g/L h)	0,66	0,65
q_S (g/g h)	0,082	0,083
η_{IMOB} %	13,08	14,44
Λ (g/g)	0,0597	0,0629

^a: Valores obtidos em 84h de fermentação

^b: Bucha moída tratada com vapor em hidrolisado ($S_o = 59,50$ g/L; $X_o = 0,49$ g/L)

^c: Bucha fragmentada tratada com vapor e quitosana em hidrolisado ($S_o = 59,31$ g/L; $X_o = 0,48$ g/L).

A imobilização de células de *Candida guilliermondii* em bucha vegetal permitiu encontrar valores de fator de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica 26,42% e 36,36% superiores aos obtidos por Santos (2005), trabalhando com células imobilizadas em vidro poroso, e 28,85% e 40,63% superiores aos obtidos pelo mesmo autor com zeólita como suporte de imobilização. O fator de conversão de xilose em xilitol, entretanto, é 17,28% inferior ao encontrados por Carvalho et al. (2004), cujo suporte empregado foi alginato de cálcio, sendo a produtividade volumétrica 12,5% superior àquela encontrada pelo autor.

4.6 Produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana: o desempenho de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 imobilizadas em bucha vegetal sob sistema de bateladas repetidas

A Tabela 16 apresenta os parâmetros fermentativos determinados ao final de cada ciclo de bateladas repetidas. Conforme pode se observar ocorreu um aumento significativo em todos os parâmetros citados, exceto pela eficiência de imobilização, do primeiro para o segundo ciclo de batelada, independente da adição de quitosana. Os valores obtidos no segundo ciclo de batelada evidenciam um aumento na concentração de xilitol de 46,03%, o que resultou em um fator de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica iguais a 0,83 g/g e 0,57 g/L.h, respectivamente, no ensaio sem quitosana. A adição deste agente flocculante também resultou em aumento destes mesmos parâmetros, porém, inferiores aos encontrados no ensaio sem quitosana. O aumento na concentração de xilitol foi de 36,35%, com valores de fator de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica iguais a 0,77 g/g e 0,57 g/L.h, respectivamente, no ensaio com quitosana. Ao final do quinto ciclo, a concentração de xilitol era semelhante (coeficiente de variação inferior a 10%) em ambos os ensaios, obtendo-se um valor médio de 42,28 g/L de xilitol, o que significa um aumento de 24,10% da primeira para a quinta batelada. Os melhores valores de produtividade volumétrica foram encontrados ao final da terceira batelada, seja na presença de quitosana (0,65 g/L.h) ou na sua ausência (0,61 g/L.h), conforme Tabela 16. A partir deste ciclo, este parâmetro sofreu um decréscimo nos ciclos n° 4 e n° 5 de 1,59% e 6,36%, respectivamente, para ambos os experimentos, uma vez que os valores obtidos mesmo com a adição de quitosana foram semelhantes. O maior valor encontrado

para o fator de conversão de xilose em xilitol, no ensaio sem quitosana, ocorreu no segundo ciclo, decaindo em 9,64%, 8,43% e 12,05%, ao final dos ciclos seguintes, respectivamente. A adição de quitosana, por sua vez, proporcionou um fator de conversão de xilose em xilitol mais alto no quarto ciclo (0,81 g/g), decaindo em 3,70% ao final do quinto ciclo.

Tabela 16 - Parâmetros fermentativos de obtenção de xilitol obtidos ao final de cada ciclo de bateladas repetidas

	Ciclo 1		Ciclo 2		Ciclo 3		Ciclo 4		Ciclo 5	
	SQ ¹	CQ ²	SQ	CQ	SQ	CQ	SQ	CQ	SQ	CQ
P _F (g/L)	32,78	33,18	47,87	45,24	43,64	46,44	43,36	46,07	40,68	43,88
Y _{P/S} (g/g)	0,64	0,65	0,83	0,77	0,75	0,79	0,76	0,81	0,73	0,78
η %	69,79	70,88	90,51	83,97	81,79	86,15	82,88	88,33	79,61	85,06
Q _P (g/L h)	0,43	0,43	0,57	0,57	0,61	0,65	0,60	0,64	0,57	0,61
Q _S (g/L h)	0,61	0,61	0,69	0,70	0,77	0,77	0,79	0,79	0,78	0,78
η _{IMOB} %	22,6	23,20	19,70	20,90	20,40	28,30	21,90	23,90	25,90	26,70

¹ Ensaio sem quitosana

² Ensaio com quitosana

Conforme a Tabela 16, a adição de quitosana não influenciou significativamente de forma a aumentar a eficiência de imobilização e, desta forma, favorecer a produção de xilitol. Mesmo com alteração da metodologia de adição de quitosana, ou seja, passando a adicionar quitosana ao longo de todo o experimento, acompanhando o crescimento celular, os resultados obtidos evidenciam a baixa ou nenhuma interferência da adição de quitosana sobre a capacidade de imobilização de células no suporte. Esta observação corrobora com os resultados obtidos nos ensaios preliminares discutidos anteriormente.

A partir dos valores dos parâmetros fermentativos apresentados na Tabela 16 é possível afirmar que o processo de produção de xilitol pelo sistema de bateladas repetidas permitiu a obtenção de melhores índices em tais parâmetros, quando comparado ao ensaio em sistema de batelada simples. Esta observação pode ser atribuída ao processo de adaptação das células ao hidrolisado ao longo das bateladas sucessivas, conforme citam outros autores (CANILHA, 2006; SANTOS, 2005).

As Figuras 15 e 16 ilustram o consumo de xilose ao longo dos cinco ciclos de bateladas repetidas. Nos dois primeiros ciclos, o consumo de xilose se prolonga até 84 h de fermentação, sendo que nos ciclos seguintes o consumo desta pentose se torna mais rápido, em 72 h a xilose já está quase totalmente consumida. Em 72 h do

primeiro ciclo, sem agente floculante, 70,54% da xilose havia sido consumido. Já no segundo ciclo, este consumo aumentou para 86,82% em 72 h de fermentação. Nos próximos ciclos, em 48 h de fermentação aproximadamente 68,34% da xilose já havia sido consumida pela levedura. A adição de quitosana não influenciou no consumo de xilose. Em 72 h do primeiro ciclo, na presença de quitosana, 73,35% da xilose havia sido consumida.

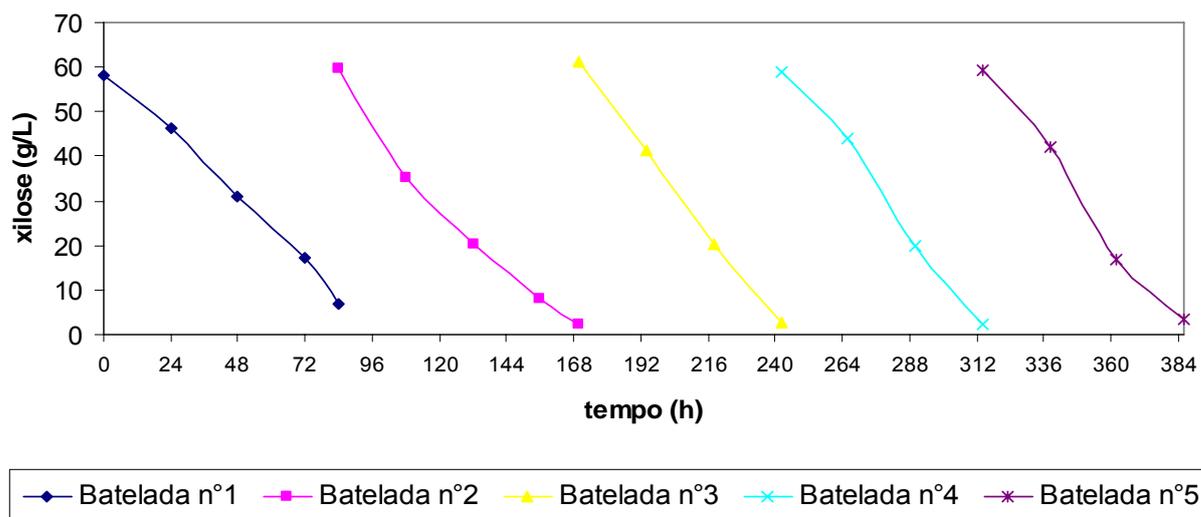


FIGURA 15. Variação na concentração de xilose ao longo das bateladas repetidas.

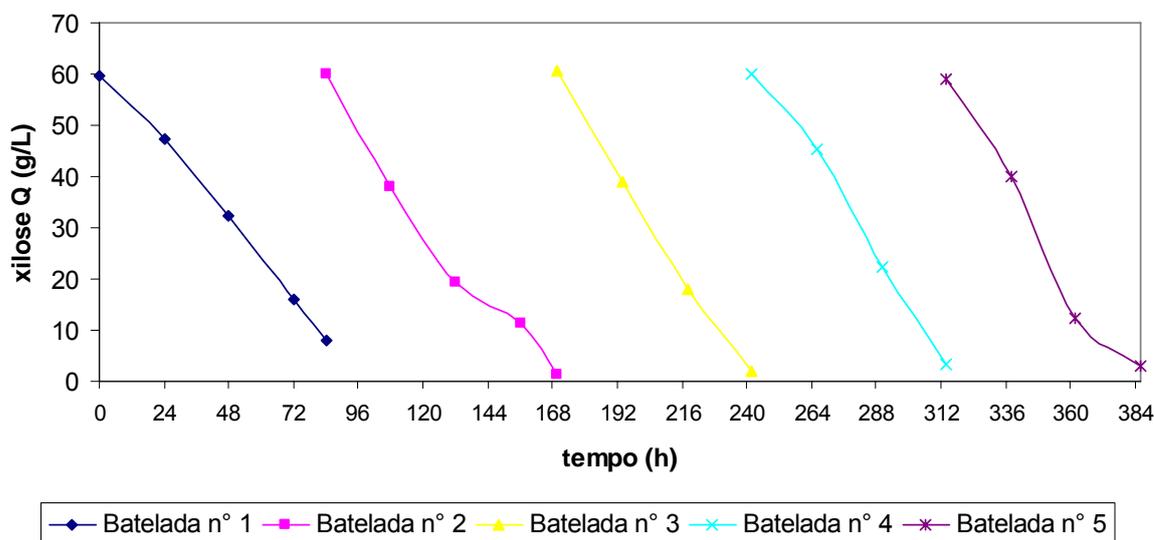


FIGURA 16. Variação na concentração de xilose ao longo das bateladas repetidas sob influência da adição de quitosana.

No segundo ciclo, este consumo aumentou para 81,29% em 72 h de fermentação. Nos próximos ciclos, em 48 h de fermentação, 70,65% da xilose já havia sido consumida pela levedura, um consumo 3,38% superior àquele sem quitosana. Este

aumento no consumo de xilose foi também observado Santos (2005), trabalhando com células imobilizadas em vidro poroso, e Carvalho (2000), trabalhando com células imobilizadas em alginato de cálcio.

As Figuras 17 e 18 ilustram a produção de xilitol ao longo dos ciclos de bateladas repetidas. A produção de xilitol foi máxima no segundo ciclo, mesmo em presença de quitosana. Na ausência do agente floculante, a produção de xilitol aumentou em 44,81% no segundo ciclo, enquanto que na presença de quitosana, este aumento foi de 36,47%.

Os parâmetros fermentativos fator de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica em xilitol estão apresentados na Figura 19. Conforme se observa nesta figura, o maior valor para o fator de conversão de xilose em xilitol, no ensaio sem quitosana, é encontrado no segundo ciclo de batelada (0,83 g/g). Com quitosana, este parâmetro foi melhor no quarto ciclo (0,81 g/g). Já a produtividade volumétrica, no ensaio sem quitosana, foi maior no terceiro ciclo (0,61 g/L.h), diminuiu no quarto ciclo (0,60 g/L.h) e volta para 0,61 g/L.h no quinto ciclo (41,86% de aumento na produtividade ao final das bateladas). Com quitosana, este parâmetro foi maior também no terceiro ciclo (0,65 g/L.h), diminuindo para 0,64 g/L.h no quarto ciclo e terminando com 0,61 g/L.h no quinto ciclo (aumento de 41,86% na produtividade do primeiro para o quinto ciclo).

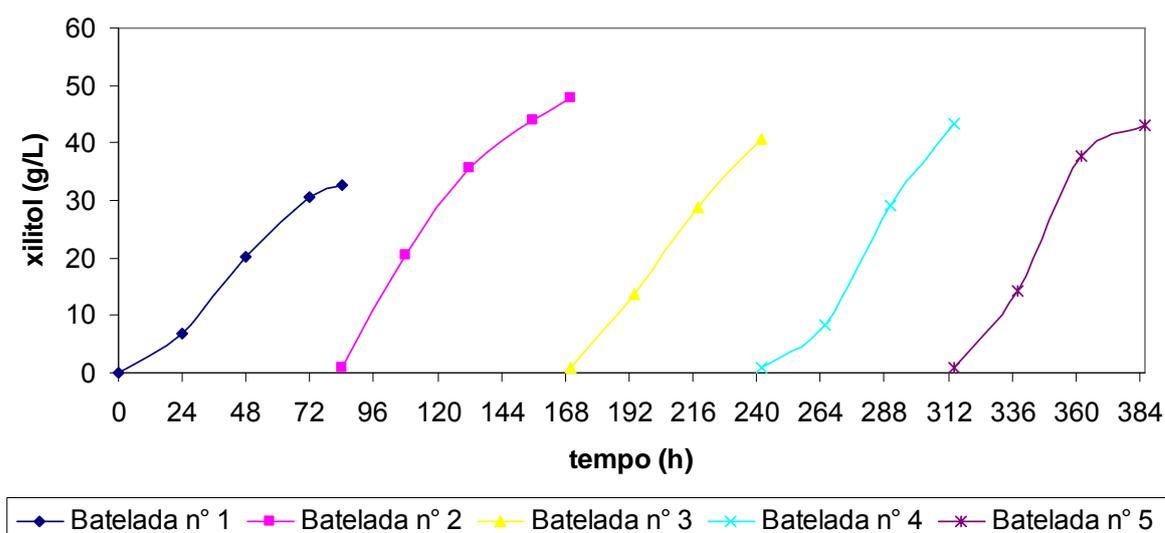


FIGURA 17. Variação na concentração de xilitol ao longo das bateladas repetidas.

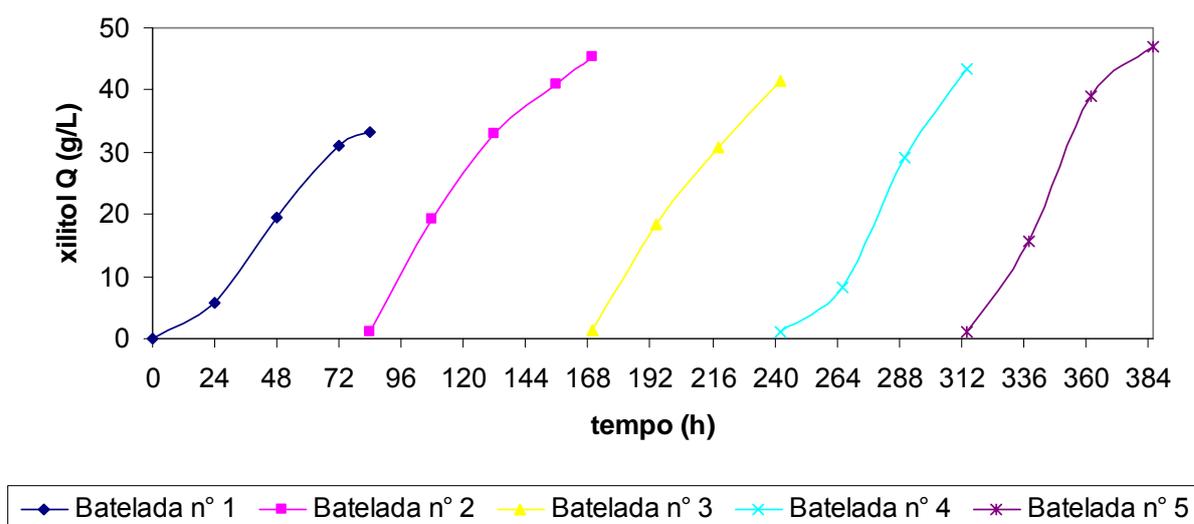


FIGURA 18. Variação na concentração de xilitol ao longo das bateladas repetidas sob a influência da adição de quitosana.

Conforme pode ser observado nas Figuras 20 e 21, o consumo de arabinose foi lento ao longo das sucessivas bateladas. Na ausência de quitosana, apenas 20,45% da arabinose havia sido consumida ao final do primeiro ciclo. Este consumo tornou-se mais lento ao longo dos próximos ciclos, não ultrapassando 15% de consumo. Na presença do agente floculante, o consumo de arabinose também foi lento. Ao final do primeiro ciclo, apenas 11,40% do total de arabinose havia sido consumido. Da mesma forma com que ocorreu sem o agente floculante, nas bateladas sucessivas com quitosana, a partir do segundo ciclo o consumo de arabinose foi inferior a 15%. Santos (2005) observou comportamento contrário, ao avaliar o desempenho de células imobilizadas em vidro poroso pelo sistema de bateladas repetidas, no qual o consumo de arabinose tornou-se mais rápido ao longo das sucessivas fermentações.

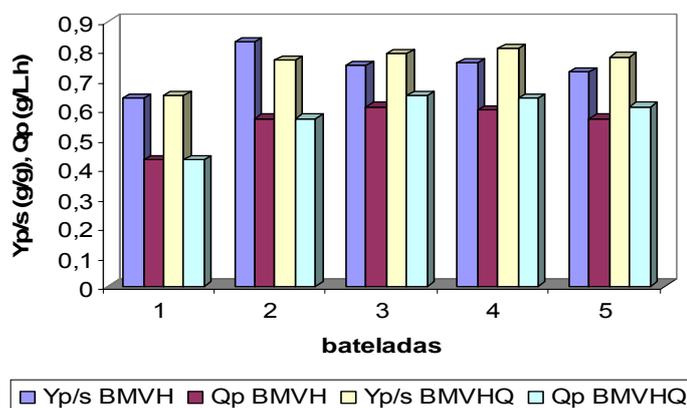


FIGURA 19. Fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$) e produtividade volumétrica (Q_P) ao longo das bateladas repetidas. (Onde, BMVH: Bucha moída tratada com vapor em hidrolisado; BMVHQ: Bucha moída tratada com vapor em hidrolisado com adição de quitosana).

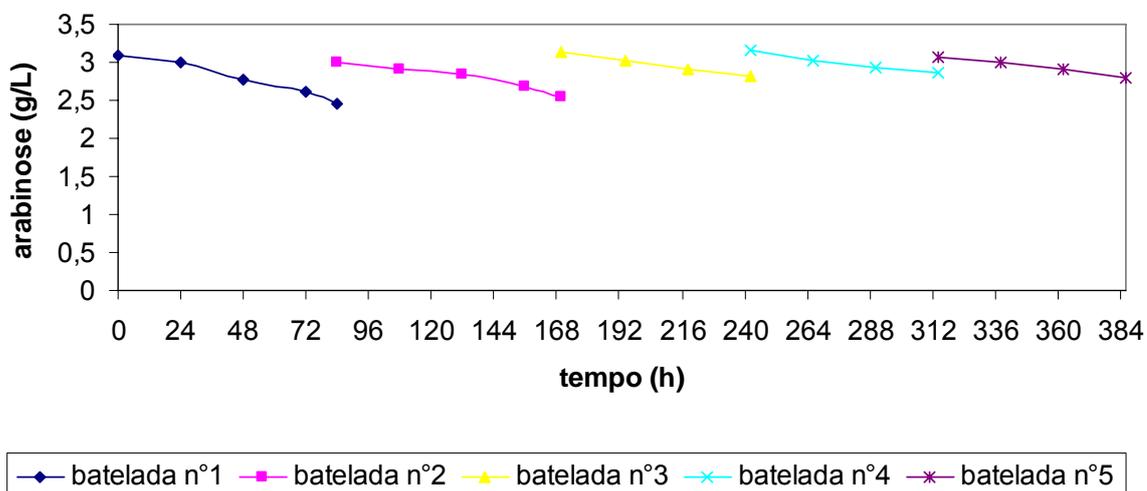


FIGURA 20. Variação na concentração de arabinose ao longo das bateladas repetidas.

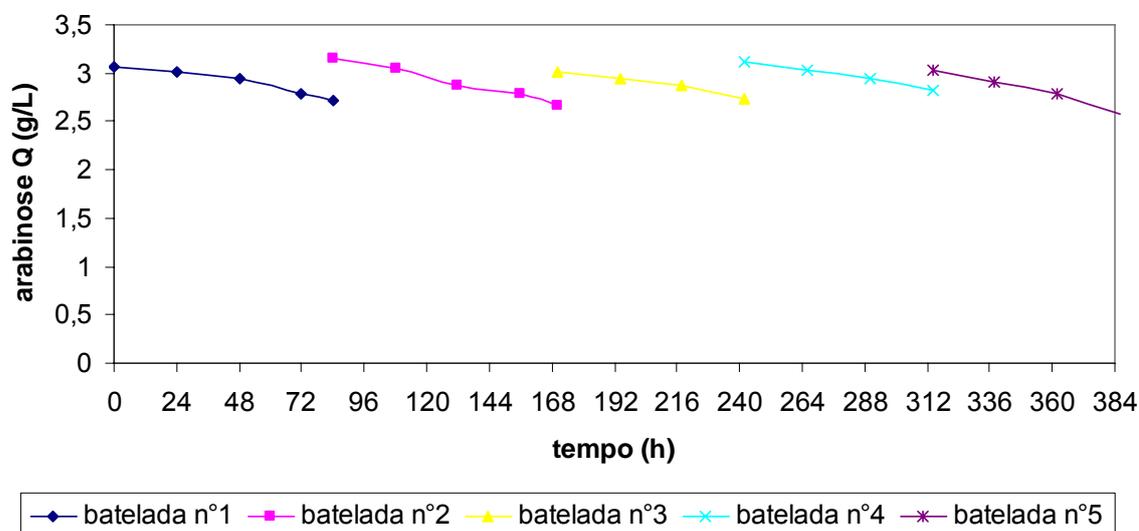


FIGURA 21. Variação na concentração de arabinose ao longo das bateladas repetidas sob a influência da adição de quitosana.

Com relação à glicose, o comportamento foi semelhante tanto na presença quanto na ausência do agente flocculante, conforme Figuras 22 e 23. Observou-se que a glicose foi consumida completamente nas primeiras 24 horas de fermentação de todos os ciclos.

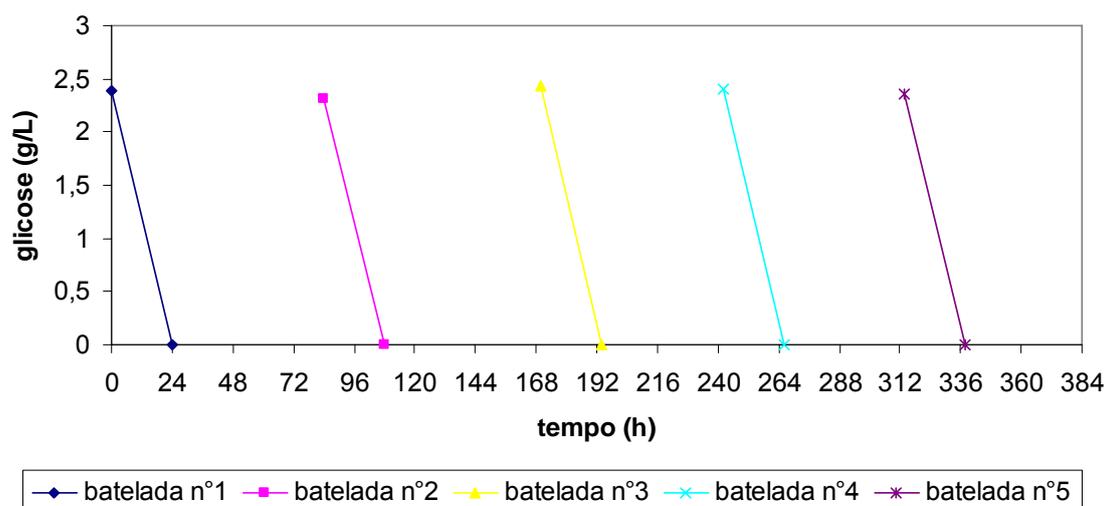


FIGURA 22. Variação na concentração de glicose ao longo das bateladas repetidas.

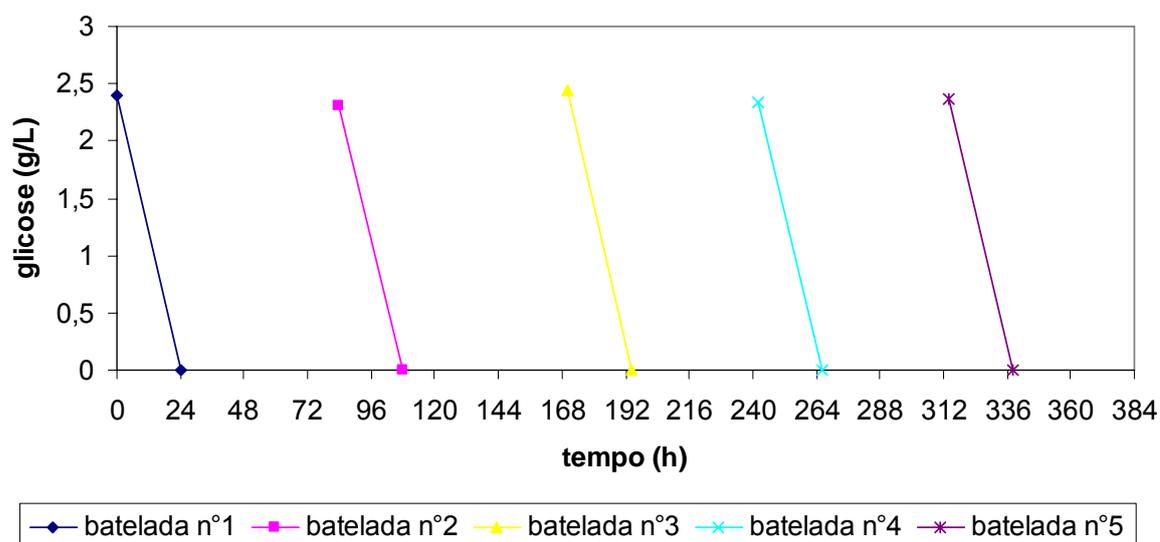


FIGURA 23. Variação na concentração de glicose ao longo das bateladas repetidas sob a influência da adição de quitosana.

A adição de quitosana também não influenciou o consumo de ácido acético (Figuras 24 e 25), que apresentou comportamento semelhante em ambos os ensaios. O ácido acético foi consumido mais rapidamente no primeiro ciclo, no qual observou-se um consumo médio de 47% em ambos os ensaios. Nos próximos ciclos, este consumo foi inferior a 40% aproximadamente.

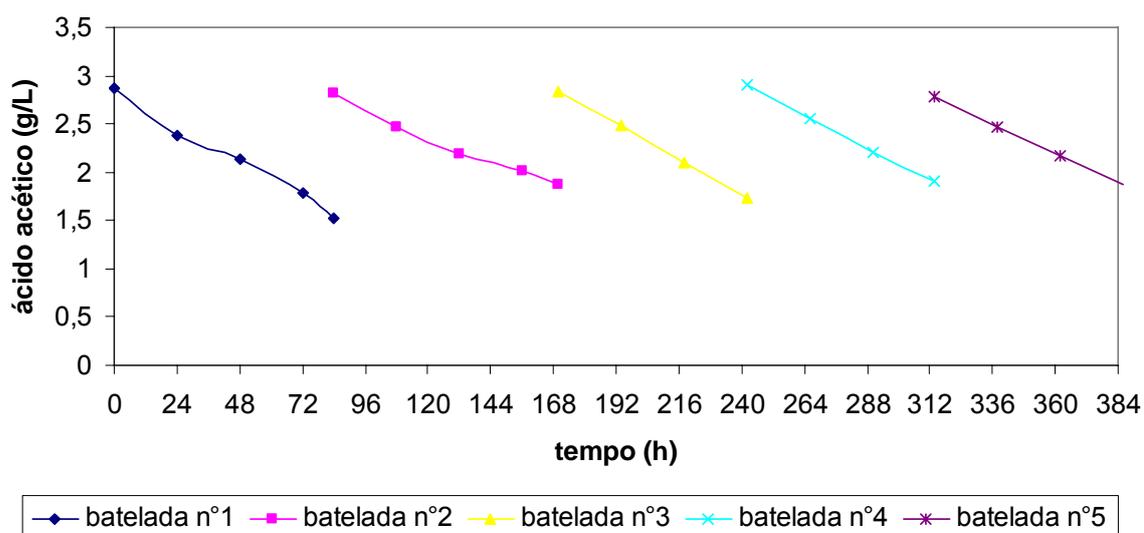


FIGURA 24. Variação na concentração de ácido acético ao longo das bateladas repetidas.

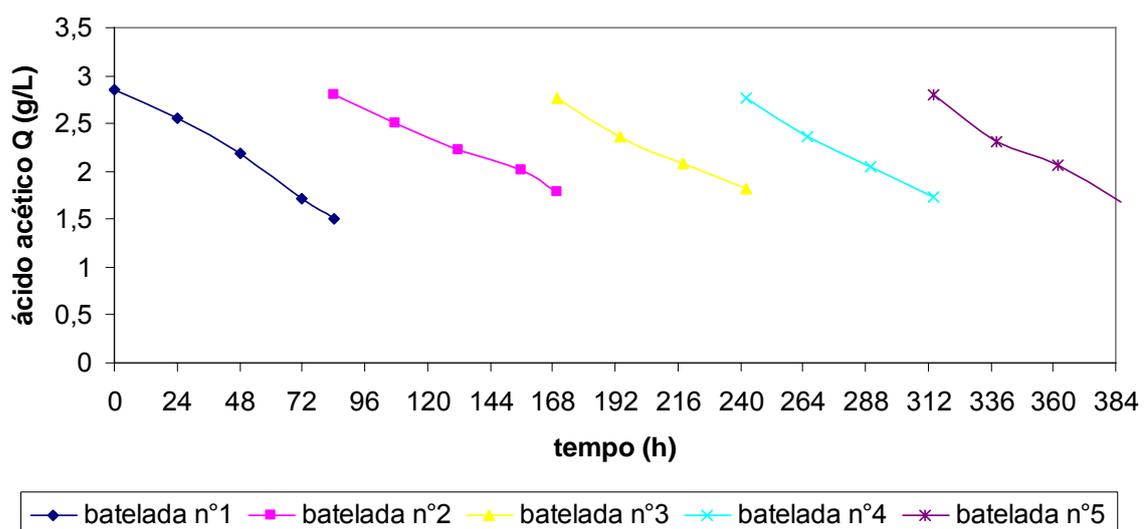


FIGURA 25. Variação na concentração de ácido acético ao longo das bateladas repetidas sob a influência da adição de quitosana.

As Figuras 26 e 27 ilustram o comportamento do glicerol ao longo das bateladas sucessivas. Conforme pode ser observado nas Figuras 28 e 29, o etanol é produzido e consumido ao final dos ciclos, provavelmente devido à diminuição na concentração de xilose.

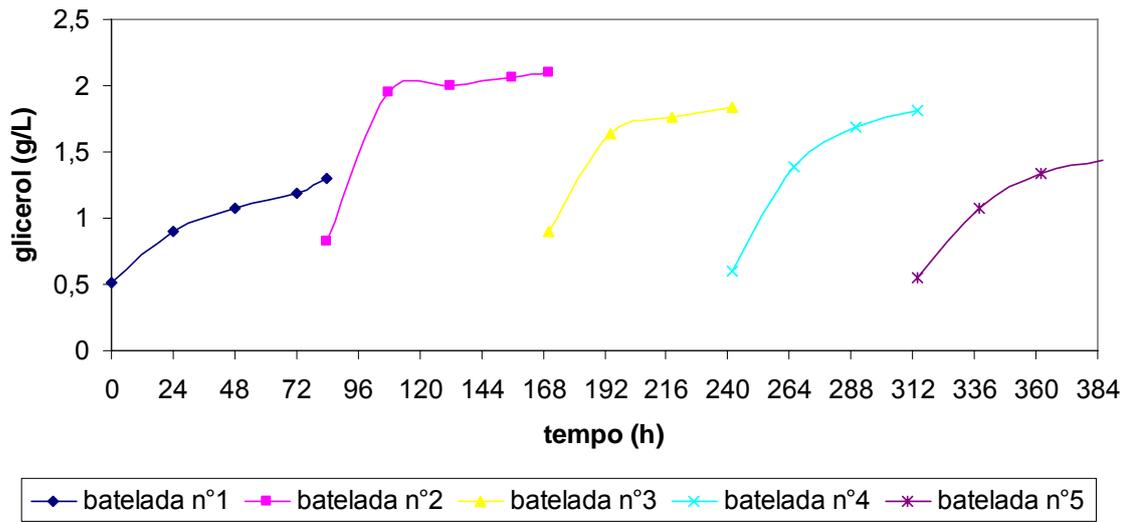


FIGURA 26. Variação na concentração de glicerol ao longo das bateladas repetidas.

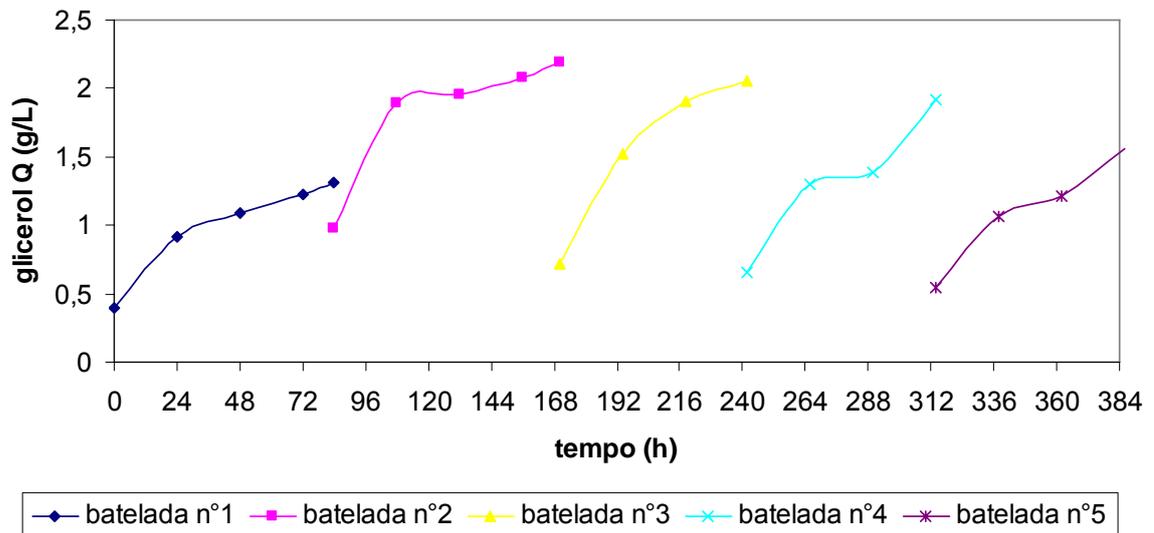


FIGURA 27. Variação na concentração de glicerol ao longo das bateladas repetidas sob a influência da adição de quitosana.

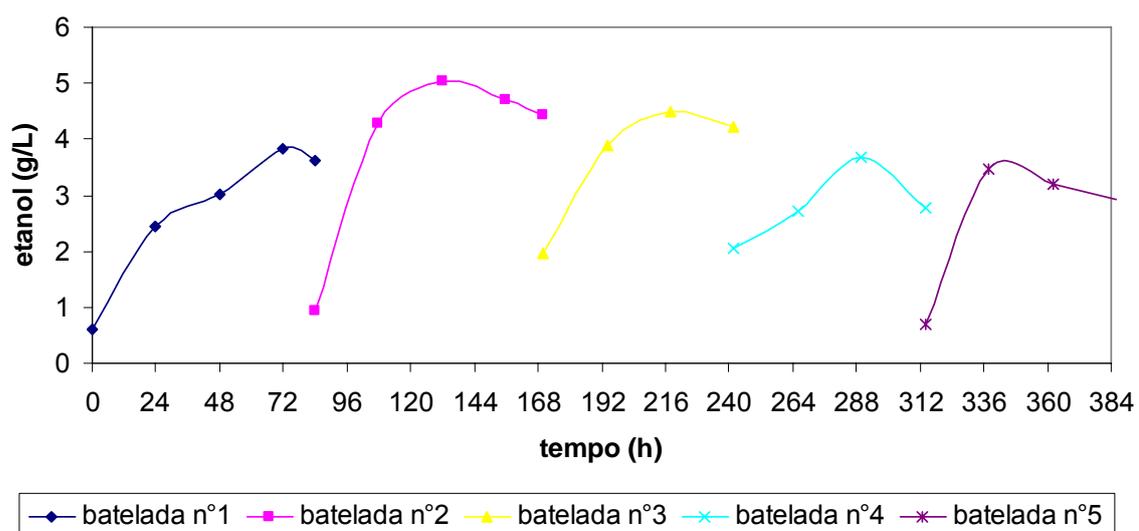


FIGURA 28. Variação na concentração de etanol ao longo das bateladas repetidas.

A eficiência de imobilização celular é apresentada nas Figuras 30 e 31. A adição de quitosana não interferiu na imobilização celular, conforme observado em todos os experimentos anteriores, mesmo sendo adicionada a cada 24h de cada ciclo, acompanhando o crescimento celular.

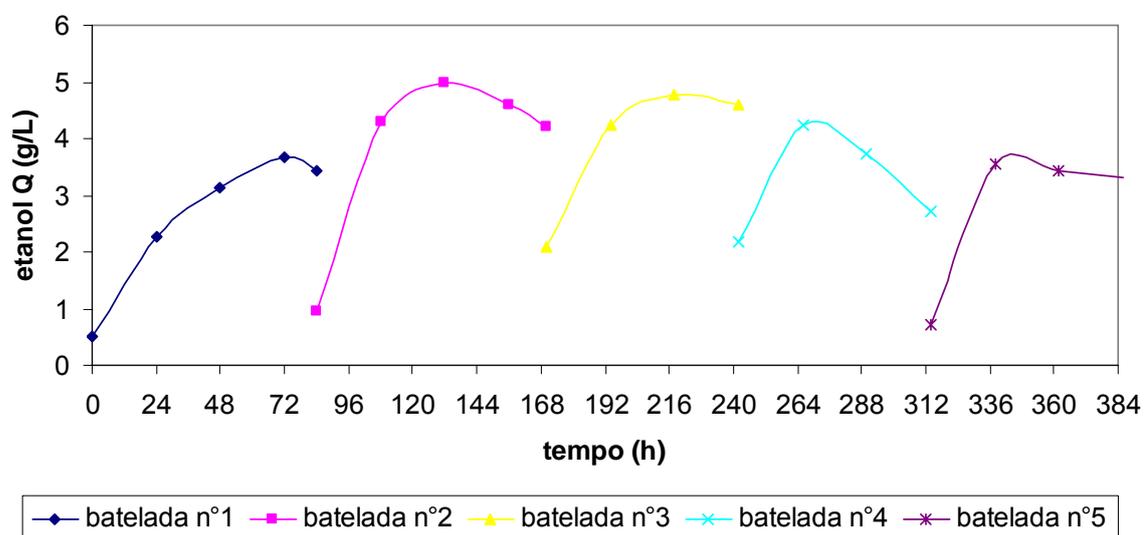


FIGURA 29. Variação na concentração de etanol ao longo das bateladas repetidas sob a influência da adição de quitosana.

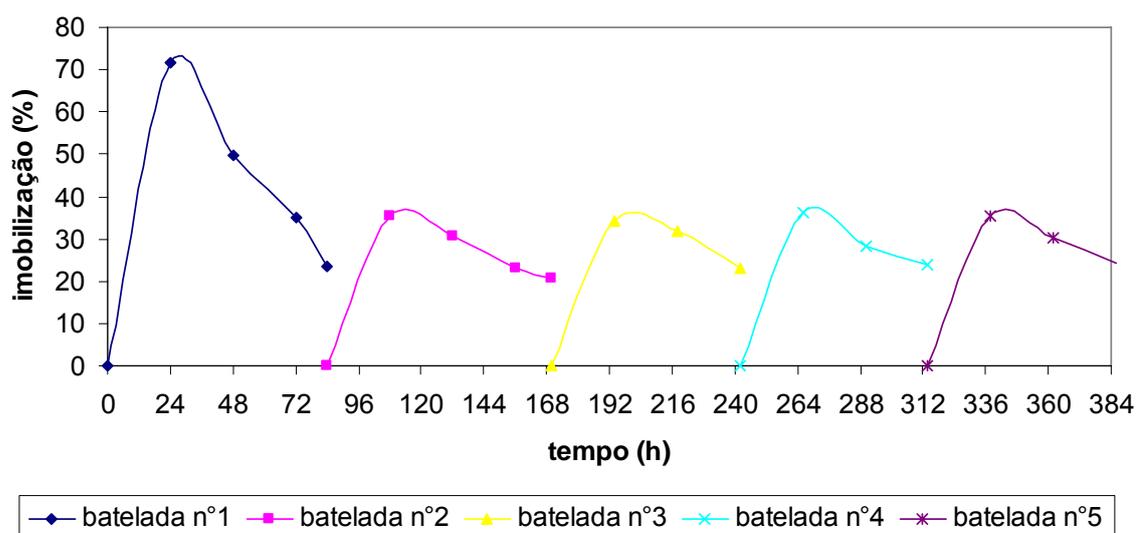


FIGURA 30. Variação na eficiência de imobilização celular ao longo das bateladas repetidas.

Mesmo em presença de quitosana, as primeiras 24 horas do primeiro ciclo apresentaram um valor médio de eficiência de imobilização de 70%, reduzindo para 23% ao final do primeiro ciclo. Nos ciclos seguintes, este parâmetro não ultrapassou 35% nas primeiras 24 horas, terminando, cada ciclo com apenas 20% de células imobilizadas. Esta baixa eficiência de imobilização pode estar relacionada não só com o fenômeno de desorção, mas também com a ocupação dos sítios de adsorção do suporte com outras substâncias, impedindo a adsorção de novas células.

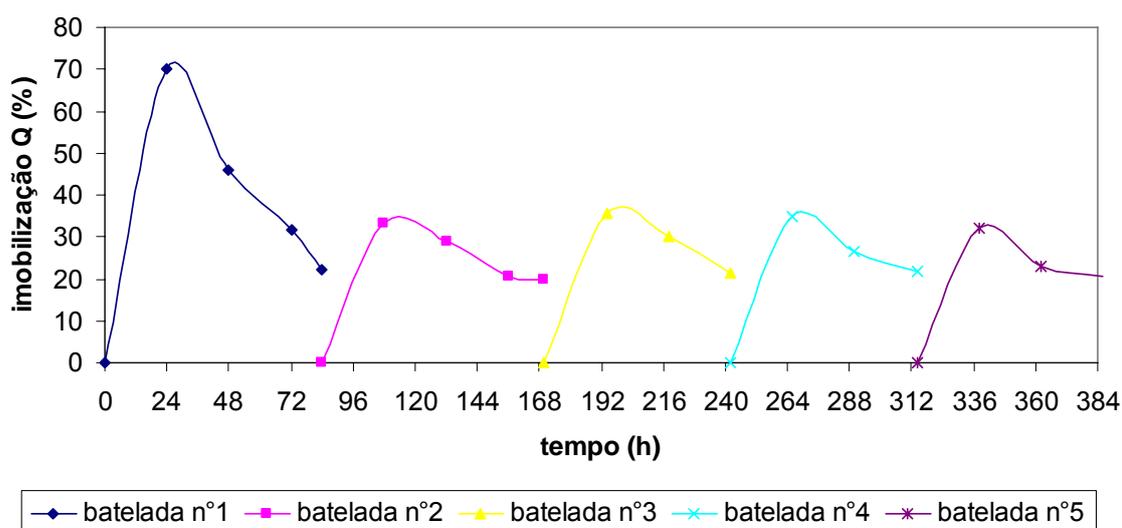


FIGURA 31. Variação na eficiência de imobilização celular ao longo das bateladas repetidas sob a influência da adição de quitosana.

Entretanto, os baixos índices de eficiência de imobilização observados no sistema de bateladas repetidas não interferiram na produção de xilitol, que apresentou um aumento de 24% do primeiro para o quinto ciclo, independente da adição de quitosana, acompanhado de um aumento de 17% e 37% nos índices de eficiência de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica em xilitol, respectivamente.

5 CONCLUSÕES

- ❖ A utilização da bucha vegetal, um biosuporte abundante e de baixo custo, como suporte de imobilização de células de *Candida guilliermondii* FTI20037 para a produção de xilitol mostrou-se possível e de fácil execução.
- ❖ Em relação à imobilização celular, a eficiência de imobilização foi influenciada tanto pela forma do suporte como também pelo tratamento aplicado a este. A forma fragmentada apresentou taxas de imobilização, fator de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica 62,17%, 21,67% e 21,95%, respectivamente, inferiores à bucha moída. Todos os tratamentos aplicados induziram ao aumento da eficiência de imobilização em relação ao experimento com o suporte *in natura*, evidenciando a necessidade de aplicação de tratamentos químicos ao suporte como forma de se obter melhores índices de eficiência de imobilização.
- ❖ O tratamento com vapor de 1,5 Kgf/cm², a 127°C, por 35 minutos, aplicado à bucha vegetal moída, determinou os melhores valores de imobilização celular, refletindo sobre o fator de conversão de xilose em xilitol (0,66 g/g) e produtividade volumétrica em xilitol (0,47 g/L.h), sendo os melhores índices obtidos dentre todos os tratamentos. Quando estas condições foram aplicadas em experimento com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana a eficiência de imobilização celular foi baixa, refletindo nos parâmetros fermentativos de produção de xilitol de tal forma que se assemelharam aos obtidos com células livres. Tal fato demonstra que em sistema de batelada simples o uso de células imobilizadas não é considerado vantajoso.
- ❖ Em sistema de bateladas repetidas, o uso de células imobilizadas em bucha vegetal moída e tratada com vapor permitiu uma produção de xilitol 24% maior ao final do quinto ciclo de batelada. Os valores de fator de conversão de xilose em xilitol e produtividade volumétrica em xilitol aumentaram, em 5 bateladas sucessivas de fermentação, 14,06% e 32,56%, respectivamente.
- ❖ O uso de quitosana como agente de floculação adicionado ao início do processo fermentativo não foi suficiente para aumentar a eficiência de imobilização. A adição deste agente de floculação a cada 24 horas do processo, acompanhando o crescimento celular, também não foi capaz de influenciar expressivamente as taxas de imobilização celular. Com bases

nestas considerações, é possível afirmar que a adição de quitosana como um agente de floculação, neste trabalho, não interferiu na produção de xilitol a partir de células de *Candida guilliermondii* FTI20037 imobilizadas em bucha vegetal.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Associar o tratamento com vapor de 1,5 Kgf/cm², por 35 minutos, a 127 °C, com o segundo melhor tratamento aplicado, o tratamento com hidróxido de sódio 2% (p/v) à bucha vegetal para a imobilização de *Candida guilliermondii* FTI 20037 para a produção de xilitol;
- Avaliar a produção de xilitol a partir de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 imobilizadas em bucha vegetal em processo contínuo;
- Avaliar as modificações ocorridas na bucha vegetal resultantes dos tratamentos aplicados através de uma análise elemental;
- Avaliar a produção de xilitol a partir de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 imobilizadas em bucha vegetal em reator de leito fluidizado sob diferentes modos de condução.

➤ REFERÊNCIAS

- ADLER, E. Lignin chemistry: past, present and future. **Wood Science Technology**, v. 11, p. 169-218, 1977.
- AKIN, C. Biocatalysis with immobilized cells. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 5, p. 319-367, 1987.
- AKHTAR, N.; IQBAL, J.; IQBAL, M. Removal and recovery of nickel (II) from aqueous solution by loofa sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: characterization studies. **Journal of Hazardous Materials**, B108, p. 85-94, 2004.
- ALVES, L. A. **Avaliação do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para produção biotecnológica de xilitol**. 1997. 92p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 1997.
- ANSELMO FILHO, P.; BADR, O. Biomass resources for energy in North-Eastern Brazil. **Applied Energy**, v. 77, p. 51-67, 2004.
- AMAECHI, B. T.; HIGHAM, S. M.; EDGAR, W. M. The influence of xylitol and fluoride on dental erosion in vitro. **Archives of Oral Biology**, v. 43, p. 157-161, 1998.
- ARICA, M. Y.; BAYRAMOĞLU, G. Invertase reversibly immobilized onto polyethylenimine grafted poly(GMA-MMA) beads for sucrose hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.38, p. 131-138, 2006.
- BÁLES, V. Bioprocesses with immobilized biocatalyst – Engineering aspects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, p. 5-10, 1994.
- BAR, A. Xylitol. In: O'BREEN NABORS, L.; GELARDI, R. C. **Alternative Sweeteners**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1991, p. 349-379.
- BARANY, S.; SZEPESSZENTGYORGYI, A. Flocculation of cellular suspensions by polyelectrolytes. **Advance in Colloid and Interface in Science**, v. 111, p. 117-129, 2004.
- BELL, R. R.; SAUNDERS, G. C. Cadmium adsorption on hydrous aluminium (III) oxide: effect of adsorbed polyelectrolyte. **Applied Geochemistry**, v. 20, p. 529-536, 2005.
- BISARIA, V. S. Bioprocessing of agro-residues to value added products. In: MARTIN, M. **Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products**, 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998, 556p.
- BRODELIUS, P.; VANDAMME, E. J. Immobilized cell systems. In: REHM, H. J., REED, G. **Biotechnology – A Comprehensive Treatise**, Weinheim: Verlag Chemie, 1987, v. 7a, p. 405-464.

BUSTOS, G.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Modelling of the hydrolysis of sugarcane bagasse using hydrochloric acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 104, n. 1, p.51-68, 2003.

Cana-de-açúcar Para Indústria: O Quanto Vai Precisar Crescer. In: Instituto de Economia Agrícola do Estado de São Paulo. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=7448>>. Acesso em: 19 dez. 2006.

CANELA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por Cromatografia de Permeação em Gel - Influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 23, p. 13-17, 2001.

CANILHA, L. **Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo**. 2006. 153p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2006.

CARVALHO, W. **Estudo da imobilização de *Candida guilliermondii* FTI 20037 para a obtenção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2000. 129p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2000.

CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; SANTOS, J. C.; CONVERTI, A. Xylitol production by Ca-alginate entrapped cells: comparison of different fermentation systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 553-559, 2003.

CARVALHO, W.; SANTOS, J. C.; CANILHA, L.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. A study on xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by Ca-alginate entrapped cells in a stirred tank reactor. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2135-2141, 2004.

CARVALHO, W. **Estudo da obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana com células imobilizadas em gel de alginato de cálcio**. 2004. 110p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2004.

CIPER, M.; BODMEIER, R. Preparation and characterization of novel fast disintegrating capsules (Fastcaps) for administration in the oral cavity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 303, p. 62-71, 2005.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Disponível em:<<http://www.conab.gov.br/conabweb/index.php?PAG=73&NSN=305>>. Acesso em: 19 dez. 2006.

CORCORAN, E. The production and use of immobilized living microbial cells. In: WISEMAN, A. **Topics in Enzyme and Fermentation Biotechnology**. England: Ellis Horwood, 1985, v. 10, p. 12-50.

COSTA, F. Moagem: a Transformação da cana em riqueza. Disponível em: <http://www.revistarural.com.br/Edicoes/2005/artigos/rev86_moagem.htm>. Acesso em: 19 dez. 2006.

CRAVEIRO, A. C. Quitosana – a fibra do futuro. Disponível em: <http://www.polymar.com.br/produtos/lv_quitosana/cap3.pdf>. Acesso em: 02 nov. 2006.

DAS, D.; GAIDHANI, N. R.; MURARI, K.; GUPTA, P. S. Ethanol production by whole cell immobilization using lignocellulosic materials as solid matrix. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 132-137, 1993.

DUFF, S. J. B., MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 1-33, 1996.

DUMITRIU, S.; CHORNET, E. Processes with immobilized enzymes and cells. In: MARTIN, M. **Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products**. 2nd ed. London: Blackie Academic & Professional, 1998, 556p.

EBELING, P. R.; SANDGREN, M. E.; DiMAGNO, E. P. Evidence of a aged-related decrease in intestinal responsiveness to vitamin D: Relationship between serum 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and intestinal vitamin D receptor concentrations in normal women. **Journal of Clinical Endocrinology Metabolism**, v.75, p.176-182, 1992.

EMODI, A. Xylitol: It's properties and food applications. **Food Technology**, p.28-32, jan. 1978.

FELIPE, M. G. A.; VIEIRA, D. C.; VITOLO, M.; SILVA, S. S.; ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**. v.35, n.3, p.171-177, 1995.

FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M. Xylitol formation by *Candida guilliermondii* grown in a sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate: effect of aeration and inoculum adaptation. **Acta Biotechnologica**. v.16, n.1, p.73-79, 1996.

FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysates for xylitol production: effect of pH. **Biomass and Bioenergy**. v.13, n.1/2, p.11-14, 1997a.

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

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989, 613 p.

FOSTER, H. Comparative metabolism of xylitol, sorbitol and fructose. In: SIPPLE, H. L.; McNUTT, K. W. **Sugars in Nutrition**. New York: Academics Press, 1974. 259p.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 335-345, 1998.

FROLLINI, F.; PIMENTA, M. S. A. Lignin: Utilization as a macromonomer in the synthesis of phenolic type resins. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v. 46, n. 1, p. 43-49, 1997.

GNANSOUNOU, E.; DAURIAT, A.; WYMAN, C, E. Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China. **Bioresource Technology**, v. 96, p.985-1002, 2005.

GUEDES, R. P. **Avaliação da produção biotecnológica de xilitol em biorreator de coluna de bolhas utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar: Efeito da aeração e do fator de concentração do hidrolisado**. 2005. 94p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

HYVÖNEN, L.; KOIVISTOINEN, P.; VOIROL, F. Food technological evaluation of xilitol. **Advances in Food Research**, v. 27, p. 373-403, 1982.

HEITZ, M.; CAPEK-MÉNARD, E.; KOEBERLE, P. G.; GAGNÉ, J.; CHORNET, E.; OVEREND, R. P. TAYLOR, J. D.; YU, E. Fractionation of *Populus tremuloides* at the pilot plant scale: Optimization of steam pretreatment conditions using the STAKE II technology. **Bioresource Technology**, v. 35, p. 23-32, 1991.

IWATA, C.; NAKAGAKI, H.; MORITA, I.; SEKIYA, T.; GOSHIMA, M.; ABE, T.; ISOGAI, A.; HANAKI, M.; KUWAHARA, M.; TATEMATSU, M.; ROBINSON, C. Daily use of dentifrice with and without xylitol and fluoride: effect on glucose retention in humans *in vivo*. **Archives of oral Biology**, v. 48, p. 389-395, 2003.

JEFFRIES, T. W. Utilization of xilose by bacteria, yeast and fungi. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 27, p. 1-32, 1983.

KAREL, S. F.; LIBICKI, S. B.; ROBERTSON, C. R. Review: The immobilization of whole cells: Engineering principles. **Chemical Engineering Science**, v. 40, p. 1321-1354, 1985.

KIM, S. Y.; KIM, J. H.; OH, D. K. Improvement of xylitol production by controlling oxygen supply in *Candida parapsilopsis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, p. 267-270, 1997.

KNUUTTILA, M. L. E.; KUOKSA, T. H.; SVANBERG, M. J.; MATTILA, P. T.; KARJALAINEN, K. M.; KOLEHMAINEN, E. Effects of dietary xylitol on collagen content and glycosylation in healthy and diabetic rats. **Life Sciences**, v. 67, p. 283-290, 2000.

KUHAD, R. C.; SINGH, A. A lignocellulose biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 72, p. 151-172, 1993.

KUMAR, N.; DAS, D. Eletron microscopy of hydrogen producing immobilized *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 on natural polymers. **International Journal of Hydrogen Energy**, v.26, n. 11, p. 1155-1163.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL Jr., M. J.; LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatment of sugarcane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 33-44, 2002.

LAVARACK, B. P.; GRIFFIN, G. J.; RODMAN, D. The acid hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose to produce xilose, arabinose, glucose and other products. **Biomass and Bioenergy**, v. 23, p. 367-380, 2002.

LIU, Y. K.; SEKI, M.; TANAKA, H.; FURUSAKI, S. Characteristics of Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge as a carrier for plant cell immobilization. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 85, n. 4, p. 416-421, 1998.

Luffa cylindrica. Disponível em: <http://www.biologie.uni-halle.de/bot/boga/kult_luf.html>. Acesso em: 15 jul. 2005.

MÄKINEN, K. K. Xylitol and oral health. **Advances in Food Research**, v. 25, p. 137-158, 1979.

MANZ, U.; VANNINEN, E.; VOIROL, F. Xylitol: it's properties and use as a sugar substitute in foods. In: **Food, Sugar and Sugar Replacements**, London, 1973, p. 21-38.

MASAKO, K.; HIDEYUKI, I.; SHIGEYUKI, O.; ZENRO, I. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1: Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. **Dermatological Science**, v. 38, n. 3, p. 197-205, 2005a.

MASAKO, K.; YUSUKE, K.; HIDEYUKI, I.; ATSUKO, M.; YOSHIKI, M.; KAYOKO, M.; MAKOTO, K. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 2: A study to assess the effect of a cream containing farnesol and xylitol on atopic dry skin. **Dermatological Science**, v. 38, n. 3, p. 207-213, 2005b.

MATTILA, P. T.; KANGASMAA, H.; KNUUTTILA, M. L. E. The effect of a simultaneous dietary administration of xylitol and ethanol on bone resorption. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.54, p. 548-551, 2005.

MATTILA, P. T.; KNUUTTILA, M.; SVANBERG, M. Dietary xylitol supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin-diabetic rats. **Metabolism**, v. 47, n. 5, p. 578-583, 1998.

MATTILA, P. T.; SVANBERG, M. J.; JAMSA, T.; KNUUTTILA, M. L. E. Improved bone biomechanical properties in xylitol-fed aged rats. **Metabolism**, v. 51, n. 1, p.92-96, 2002.

Mc MILLAN, J. D. Conversion of Hemicellulose Hydrolysates to Ethanol, In: HIMMEL, M. E. **Pretreatment of Lignocellulosic Biomass**. American Chemical Society Symposium. Série 566, 1994, p. 411-437.

MICHAUX, M.; PAQUOT, M.; BAIJOT, B.; THONART, P. Continuous fermentation: improvement o cell immobilization by zeta potential measurement. **Biotechnology and Bioengineering Simposium**, v. 12, p. 475-484, 1982.

MORITA, T. A. **Estudo da produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar: efeito do pH e da aeração**. 1998. 78p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 1998.

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

NÁHLÍK, J.; PALATOVÁ, M.; GÍRIO, F.; ROSEIRO, C. Model identification and physiological control of xylitol production using *Debaryomyces hansenii*. **Process Biochemistry**, v. 38, n.12, p. 1695-1705, 2003.

NOLLEAU, V.; PREZIOSI-BELLOY, L.; DELGENES, J. P.; DELGENES, J. M. Xilitol production from xilose by two yeast strains: sugar tolerance. **Current Microbiology**, v. 27, p. 191-197, 1993.

OGBONNA, J. C.; LIU, Y. C.; LIU, Y. K.; TANAKA, H. Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge as a carrier for microbial cell immobilization. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, p. 434-442, 1994.

OGBONNA, J. C.; TOMIYAMA, S.; TANAKA, H. Development of a method for immobilization of non-flocculating cells in Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge. **Process Biochemistry**, v. 31, n. 8, p. 737-744, 1996.

OGBONNA, J. C.; TOMIYAMA, S.; LIU, Y. C.; TANAKA, H. Efficient Production of ethanol by cells immobilized in Loofa (*Luffa cylindrica*) Sponge. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 3, p. 271-274, 1997.

OGBONNA, J. C.; MASHIMA, H.; TANAKA, H. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 1-8, 2001.

ONISHI, H.; SUZUKI, T. The production of xylitol, L-arabitol and ribitol by yeasts. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 30, n 11, p. 1139-1144, 1966.

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

PAMPULHA, M. E.; LOUREIRO-DIAS, M. C. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 31, p. 547-550, 1989.

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

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v. 65, p.191-201, 1998a.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **BioresourceTechnology**, v. 66, p. 25-40, 1998b.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Improved xylitol production with *Debaromyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysate. **Enzyme and Microbial Technology**. v.21, p.18-24, 1997.

PARK, J. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 303-319, 2000.

PATTANASUPONG, A.; NAGASE, H.; SUGIMOTO, E.; HORI, Y.; HIRATA, K.; TANI, K.; NASU, M.; MIYAMAMOTO, K. Degradation of carbendazim and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by immobilized consortium on loofa sponge. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 98, n.1, p. 28-33, 2004.

PEPPER, T.; OLINGER, P. M. Xylitol in sugar-free confections. **Food Technology**, v. 42, n.10, p. 98-106, 1988.

PEREIRA, E. B. **Lipase livre e imobilizada em quitosana: caracterização e potencial de aplicação em reações de hidrólise e síntese**. 1999. 127p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 1999.

PESSOA Jr., A. **Produção de biomassa microbiana a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 1991. 187p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

RAMAKRISHNA, S. V.; PRAKASHAM, R. S. Microbial fermentation with immobilized cells. **Current Science**, v. 77, n. 1, p. 87-100, 1999.

RODRIGUES, D. C. G. A. **Obtenção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em sistema descontínuo alimentado**. 1997. 104p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 1997.

RODRIGUES, R. C. L. B. **Avaliação das condições de concentração a vácuo do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para a produção de xilitol**. 1999. 112p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia de Lorena, Lorena, 1999.

RODRÍGUEZ-CHONG, A.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁSQUEZ, M. Hydrolysis of sugarcane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 143-152, 2004.

ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; LACIS, L. S.; SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M. Utilization of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource Technology**, v. 36; p. 271-75, 1991.

ROSEIRO, J. C.; PEITO, M. A.; GIRIO, F. M.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. The effects of oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaromyces hansenii*. **Archives of Microbiology**, v. 165, p. 484-490, 1991.

SANTOS, J. C. **Processo fermentativo de obtenção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado: avaliação das condições operacionais**. 2005. 159p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

SANTOS, J.; CASTRO, A. L. A.; PAIVA, P. C. A.; BANYS, V. L. Efeito dos tratamentos físicos e químicos no resíduo de lixadeira do algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n.4, p. 919-923, 2004.

SANTOS, J. C.; CONVERTI, A.; CARVALHO, W.; MUSSATTO, S. I.; SILVA, S. S. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 113-118, 2005a.

SANTOS, J. C.; MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Evaluation of porous glass and zeolite as cells carriers for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, p. 1-9, 2005b.

SENDELIUS, J. **Steam pretreatment optimization for sugarcane bagasse in bioethanol production**. 2005. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Lund University, Suécia, 2005.

SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M. Factors that affect the biosynthesis of xylitol by xylose-fermenting yeasts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 331-339, 1998.

SILVA, S. S.; RIBEIRO, J. D.; FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M. Maximizing the xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by controlling the aeration rate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63/64, p. 557-563, 1997.

SILVA, S. S., SANTOS, J. C., CARVALHO W., ARACAVALA, K. K., VITOLO, M. Use of a fluidized bed reactor operated in semi-continuous mode for xylose-to-xylitol conversion by *Candida guilliermondii* immobilized on porous glass. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 903-907, 2003.

STRAND, S. P.; VÅRUM, K. M.; ØSTGAARD, K. Interactions between chitosans and bacterial suspensions: adsorption and flocculation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 27, p. 71-81, 2003.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; SUN, R.C.; SU, Y.Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 195-204, 2004.

SUN, X. F.; XU, F.; ZHAO, H.; SUN, R. C.; FOWLER, P.; BAIRD, M. S. Physicochemical characterisation of residual hemicelluloses isolated with cyanamide-activated hydrogen peroxide from organosolv pre-treated wheat straw. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1342-1349, 2005.

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

SVANBERG, M.; KNUUTTILA, M. Dietary xylitol prevents ovariectomy-induced changes of bone inorganic fraction in rats. **Bone and Mineral**, v. 26, p. 81-88, 1994.

TANOBE, V.O. A.; SYDENSTRICKER, T. H. D.; MUNARO, M.; AMICO, S. C. A comprehensive characterization of chemically treated Brazilian sponge-gourds (*Luffa cylindrica*). **Polymer Testing**, v. 24, p. 474-482, 2005.

TARKOW, H.; FEIST, W. C. A mechanism for improving the digestibility of lignocellulosic materials with dilute alkali and liquid NH₃. **Advance Chemistry Series 95**. Washington, DC: American Chemical Society, 1965, p. 197-218.

TEIXEIRA, L. C.; LINDEN, J. C.; SCHROEDER, H. A. Optimizing peracetic acid pretreatment conditions for improved simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of sugarcane bagasse to ethanol fuel. **Renewable Energy**, v. 16, p. 1070-1073, 1999.

TRAHAN, L.; BOURGEOU, G.; BRETON, R. Emergence of multiple xylitol-resistant (fructose PTS-) mutants from human isolates of Mutans streptococci during growth on dietary sugars in the presence of xylitol. **Journal of Dental Research**, v. 75, n.11, p. 1892-1900, 1996.

UHARI, M.; KONTIOKARI, T.; NIEMELÄ, M. A novel use of xylitol sugar in prevention of acute otitis media. **Pediatrics**, v. 102, p. 879-884, 1998.

VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. P. C.; SILVA, R. S. F. Development of a statistical model for sorbitol production by free and immobilized *Zymomonas mobilis* in loofa sponge (*Luffa cylindrica*). **Process Biochemistry**, v.41, p. 240-243, 2005.

WEBB, C.; ATKINSON, B. The role of chemical engineering in biotechnology. **The Chemical Engineering Journal**, v. 50, p. B9-B16, 1992.

WINDHOLZ, M. **The Merck Index: an Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**. Ed. 10, Rahway: Merck, 1983.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 86, p. 1-14, 1998.

WILSON, C. G.; WASHINGTON, N.; PEACH, J.; MURRAY, G. R.; KENNERLEY, J. The behaviour of a fast dissolving dosage form (Expidet) followed by γ -scintigraphy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 40, p. 119-123, 1987.

YLIKAHRI, R. H.; LEINO, T. Metabolic interactions of xylitol and ethanol in healthy males. **Metabolism**, v. 28, p. 25-29, 1979.

YLIKAHRI, R. H. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. **Advances in Food Research**, v. 25, p. 159-180, 1979.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L. O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, p. 524-530, 2000.