



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas
Coordenação do Programa de Mestrado em Ciências Moleculares

**AVALIAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DA CASCA DE JABUTICABA
PARA A OBTENÇÃO DE XILITOL POR *Candida guilliermondii***

Joviano Alves de Souza

Orientadora: Prof^ª Dra Valdirene Neves Monteiro

ANÁPOLIS
AGOSTO
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas
Coordenação do Programa de Mestrado em Ciências Moleculares

Joviano Alves de Souza

**AVALIAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DA CASCA DE JABUTICABA
PARA A OBTENÇÃO DE XILITOL POR *Candida guilliermondii***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto-Sensu* em Ciências-Moleculares, da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas da Universidade Estadual de Goiás, como parte das exigências, para obtenção do título de mestre em Ciências Moleculares na área de concentração em Química Orgânica.

Orientador: Dr^a. Valdirene Neves Monteiro

ANÁPOLIS
AGOSTO
2013

AVALIAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DA CASCA DE JABUTICABA
PARA A OBTENÇÃO DE XILITOL POR *Candida guilliermondii*

JOVIANO ALVES DE SOUZA

Dissertação apresentada ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Moleculares da Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, da Universidade Estadual de Goiás, apresentada como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciências Moleculares.

Aprovada por:



Prof. Dra. Valdirene Neves Monteiro (UEG)



Prof. Dr. Diego Palmiro Ramirez Ascheri (UEG)



Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva (USP)

ANÁPOLIS, GO - BRASIL
AGOSTO 2013

Dedico este trabalho a toda minha família, especialmente a Fernanda, minha esposa, pela paciência, amor, dedicação, incentivo, apoio, confiança e principalmente por não me deixar desanimar.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

A Prof^ª. Dra. Valdirene Neves Monteiro pela amizade, confiança, paciência e orientação desde a iniciação científica.

Aos professores Dr. Eduardo Ramirez Ascheri (Universidade Federal de Goiás), Dr. Diego Palmiro Ramirez Ascheri (Universidade Estadual de Goiás), Dr. Silvio Silvério da Silva (Faculdade de Engenharia Química de Lorena) e Dr. Cirano José Ulhoa (Universidade Federal de Goiás).

Aos amigos doutorandos Wagner, Paulo, Bruna e Dra. Ivi, Samira pela grande ajuda nos laboratórios da Faculdade de Engenharia Química de Lorena.

A Fazenda Jaboticabal, localizada em Hidrolândia no município de Nova Fátima em Goiás, pelo material cedido.

As grandes amigas Ieda, Margareti e Elizete.

A Secretaria Estadual de Educação pela licença concedida para estudo.

A Universidade Estadual de Goiás-UEG, ao Programa de Mestrado em Ciências Moleculares pela oportunidade e apoio à pesquisa.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Materiais lignocelulósicos, como a casca da jabuticaba são fontes de baixo custo com potenciais em bioprocessos. A fração hemicelulósica desses materiais pode ser hidrolisada usando ácidos diluídos, a liberação de seu açúcar, a xilose que é substrato para biotransformação em xilitol. Nesse estudo foi avaliada a capacidade de produção de xilitol a partir da casca de jabuticaba. Inicialmente o bagaço de jabuticaba foi lavado várias vezes com água corrente até que não houvesse mais impurezas. Após esse procedimento o bagaço foi submetido a secagem em estufa a 60 °C por 24 h e triturado com moinho de facas até 60 mesh. O material obtido foi submetido em aparelho de Soxhlet contendo hexano para retirada de extraíveis. A casca livre de extraíveis foi seca em estufa a 100 °C por 6 h e submetido á hidrólise com ácido sulfúrico a 1 %, 120 °C e 1 atm, na proporção 1:10 (m/v) por 30 e 60 minutos com a obtenção de dois hidrolisados. Análises de açúcares nos dois hidrolisados mostrou que não houve diferenças significativas na composição de açúcares e dessa forma o hidrolisado obtido com 60 minutos foi o utilizado para a fermentação. A composição química do hidrolisado usado para fermentação foi celobiose 0,51 gL⁻¹; glicose 2,64 gL⁻¹; xilose 3,02 gL⁻¹; arabinose 3,27 gL⁻¹; xilitol 0,00 gL⁻¹; glicerol 0,04 gL⁻¹; ác. fórmico 0,001 gL⁻¹; ác. acético 0,14 gL⁻¹. Para fermentação foi usada a levedura *Candida guilliermondii* em duas concentrações de células com 0,1 gL⁻¹ e 0,2 gL⁻¹ em uma produção de açúcares que variou de 0 a 21 horas de fermentação. Nestas condições obteve-se um consumo de xilose e eficiência de conversão de 61,71 % na fermentação com 0,1 gL⁻¹ de células e 67,86 % na fermentação com 0,2 gL⁻¹ de células da levedura *Candida guilliermondii*, com uma produtividade volumétrica de 0,56 e 0,62 gL⁻¹ e um rendimento na conversão de 0,15 e 0,16 gL⁻¹h⁻¹ em 0,1 e 0,2 gL⁻¹ de células da levedura respectivamente. Observou-se que a produção de etanol foi elevada com 21 h de fermentação com concentração de etanol de 9,73 gL⁻¹ e 9,04 gL⁻¹ em concentrações de células de 0,1 gL⁻¹ e 0,2 gL⁻¹ respectivamente. A bioconversão da xilose em xilitol com hidrolisado da casca de jabuticaba mostrou ser um material promissor para obtenção de xilitol como de etanol.

PALAVRAS-CHAVE: Aproveitamento de subprodutos, conversão biotecnológica, *Myrciaria cauliflora*.

ABSTRACT

Lignocellulosic materials, such as jaboticaba peel are sources of low cost with potential bioprocesses. The hemicellulose fraction of these materials can be hydrolyzed using dilute acids, with the release of xylose that is a substrate for biotransformation in xylitol. In this study was evaluated the capacity of production of xylitol from jaboticaba peel. Initially jaboticaba peel was washed several times with water until no more impurities. After this procedure the residue was subjected to drying in an oven at 60 ° C for 24 hours and ground with a Wiley mill to 60 mesh. The material obtained was subjected to Soxhlet containing hexane to remove extractable. The free of extractable residue was dried at 100 ° C for 6 hours and subjected to hydrolysis with 1% sulfuric acid, 120 ° C and 1 atm at 1:10 (m/v) for 30 and 60 minutes to obtain two hydrolyzates. Analysis of sugars in both hydrolyzates showed no significant differences in sugar composition and thus the hydrolyzate 60 minutes was used for fermentation. The chemical composition of the hydrolyzate was used for fermentation: cellobiose 0.51 gL⁻¹, glucose 2.64 gL⁻¹; xylose 3.02 gL⁻¹; arabinose 3.27 gL⁻¹; xylitol 0.00 gL⁻¹; glycerol 0.04 gL⁻¹; formic acid 0.001 gL⁻¹; acetic acid 0.14 gL⁻¹. Was used for fermentation the yeast *Candida guilliermondii* in cells with two concentrations of 0.1 gL⁻¹ and 0.2 gL⁻¹ kinetics of production of sugars which ranged from 0 to 21 hours of fermentation. Under these conditions yielded a xylose consumption and conversion efficiency of 61.71 % in the fermentation with 0.1 gL⁻¹ and 67.86 % of cells in the fermentation with 0.2 gL⁻¹ of cells *Candida guilliermondii*, with a productivity volume of 0.56 and 0.62 g / L and the conversion yield of 0.15 and 0.16 gL⁻¹ in 0.1 and 0.2 gL⁻¹ yeast cells, respectively. It was noted that ethanol production was elevated to 21 h of fermentation ethanol concentration of 9.73 gL⁻¹ and 9.04 gL⁻¹ cell concentration of 0.1 gL⁻¹ and 0.2 gL⁻¹ respectively. The bioconversion of xylose to xylitol with hydrolyzate of jaboticaba peel proved to be a promising material for obtaining xylitol and ethanol.

KEYWORDS: Utilization of by-products, biotechnological conversion, *Myrciaria cauliflora*.

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	4
2.1. Jaboticaba	4
2.2. Materiais Lignocelulósicos.....	7
2.3 Composição dos resíduos lignocelulósicos.....	8
2.3.1 Celulose	8
2.3.2 Hemicelulose	9
2.3.3 Lignina.....	10
2.4. Processos para hidrólise de materiais lignocelulósicos	11
2.5. Xilitol.....	13
2.5.1. Produção de xilitol via processo químico.....	15
2.5.2 Produção biotecnológica de xilitol	17
2.5.3. Xilose Redutase	19
2.5.4. Xilitol Desidrogenase	20
3. Objetivo geral	21
3.1. Objetivos específicos.....	21
4. Material e métodos.....	21
4.1. Matéria-prima	21
4.2. Retirada de extratíveis	22
4.3. Obtenção do hidrolisado da casca de jaboticaba	22
4.4. Tratamento do hidrolisado hemicelulósico de casca de jaboticaba.....	22
4.5. Determinação das concentrações de açúcares	23
4.6. Microrganismo e preparo do inóculo	23
4.6.1. Microrganismo	23
4.6.2. Preparo do inóculo.....	23
4.7. Meio e Condições de Fermentação.....	24
4.8. Métodos analíticos.....	24
4.9. Determinação dos parâmetros fermentativos.....	24
5. Resultados e Discussão.....	25
5.1. Hidrolisado	25
5.2. Composição do hidrolisado	27
6. Conclusão	38
7. Perspectivas futuras	38
8. Referências Bibliográficas	39
Apêndice	47

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição do meio de inóculo para <i>C. guilliermondii</i>	24
Tabela 2 – Composição química do hidrolisado bruto da casca de jaboticaba.	27
Tabela 3 - Fator de Conversão de substrato em Produto ($Y_{p/s}$) e produtividade Volumetrica em Xilitol (Q_p), em hidrolisados hemicelulósicos (CASTRO et al., 2011)	37

Lista de Figuras

Figura 1- Fórmula estrutural do xilitol. Fonte: LIMA (2006).	3
Figura 2 - Jabuticabeira. Fonte: arvoresvivas.wordpress.com (consulta 16/05/2013)	5
Figura 3 - Modelo da parede celular elucidando o complexo lignocelulolítico. Fonte: Sticklen (2008).	7
Figura 4 - Representação da cadeia linear de celulose (adaptado de RAVEN et al., 2001).	8
Figura 5 - Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. (1) D-glucose; (2) D-galactose; (3) L-arabinose; (4) D-xilose; (5) D-manose; (6) 4-o-metil-o-glucurônico; (7) L-ramnose (SJÔSTRÔM, 1999).	10
Figura 6 - Estrutura simplificada da lignina. Fonte: FENGEL E WEGNER (1991).	11
Figura 7 - Comparação das tecnologias para hidrólise de celulose de acordo com HAMELINK et al., (2005).	12
Figura 8 - Produção de xilose e xilitol (adaptado de HYVÖNEN et al., 1982).	16
Figura 9 - Metabolismo de xilose em levedura (adaptado de PARAJÓ et al., 1998).	19
Figura 10 – Hidrolisado da casca de jabuticaba com pH baixo	25
Figura 11 - Hidrolisado da casca de jabuticaba com pH neutro	26
Figura 12 - Hidrolisado da casca de jabuticaba com pH de 5,5	26
Figura 13 - Evolução da formação de Xilitol por <i>C. guilliermondii</i> em substratos de casca jabuticaba em concentrações de 0,1 g L ⁻¹ (—) e 0,2 g L ⁻¹ (-----) de células de levedura.	29
Figura 14 - Comparativo do consumo da xilose e glicose por <i>C. guilliermondii</i> em substratos de casca jabuticaba.	30
Figura 15 - Comparativo do consumo da xilose e arabinose por <i>C. guilliermondii</i> em substratos de casca jabuticaba.	31
Figura 16 - Consumo de xilose e produção de xilitol em substratos de jabuticaba contendo 0,1gL ⁻¹ e 0,2 gL ⁻¹ de células <i>C. guilliermondii</i>	33
Figura 17 - Consumo de xilose e produção de etanol em substratos de jabuticaba contendo 0,1gL ⁻¹ e 0,2 gL ⁻¹ de células <i>C. guilliermondii</i>	34
Figura 18 - Consumo de glicose e produção de etanol em substratos de jabuticaba contendo 0,1gL ⁻¹ e 0,2 gL ⁻¹ de células <i>C. guilliermondii</i>	35
Figura 19 - Consumo de glicose e produção de xilitol em substratos de jabuticaba contendo 0,1gL ⁻¹ e 0,2 gL ⁻¹ de células <i>C. guilliermondii</i>	36

1. Introdução

O bagaço de cana-de-açúcar, folhas e sabugo de milho, palha de arroz, casca de soja, farelo de cevada entre outros são exemplos de subprodutos gerados no Brasil. Muitas vezes os resíduos são queimados ou enterrados acarretando perdas de substratos importantes que poderiam resultar em produtos nobres e com valor agregado.

A jabuticabeira é conhecida há quase cinco séculos. O seu nome é originário do tupi, “iapotikaba”, que significa “fruta em bastão” e fruto de que se alimenta o jabuti (MENDONÇA, 2000). É uma planta nativa do Brasil, sendo encontrada em extensa faixa do país, desde o Pará até o Rio Grande do Sul. As frutas produzidas por esta espécie possuem alto teor de carboidratos, fibras, vitaminas, flavonóides, carotenóides e sais minerais como ferro, cálcio e fósforo (ASQUIERI et al., 2004); sendo muito apreciadas em todo o país, consumidas “*in natura*”, ou processadas na forma de suco, geléia, compotas, licores e até mesmo na forma de vinho (DONADIO, 2000).

A exploração dos frutos para a produção do fermentado de jabuticaba, em grande escala, é realizada em Goiás na Fazenda Jabuticabal, localizada em Hidrolândia no município de Nova Fátima, onde se encontram mais de 24 mil pés de jabuticabeiras. O bagaço resultante dessa produção é normalmente descartado, não sendo usado para outros fins produtivos a não ser, em parte, destinado à alimentação animal.

Materiais lignocelulósicos são constituídos por celulose, hemicelulose e lignina. A parede celular das plantas é composta por diferentes camadas diferindo uma das outras pela estrutura e composição química. Basicamente, a celulose forma um esqueleto formado por substâncias estruturais (hemiceluloses) e envoltórias (lignina). Essas substâncias estão fortemente associadas e ligadas covalentemente (FILHO, 2008).

A utilização de resíduos lignocelulósicos em processos biotecnológicos requer, muitas vezes, etapas preliminares de preparação, podendo ser utilizada a hidrólise química ou enzimática, para uma maior disponibilização das frações celulósicas ou hemicelulósicas, tanto na forma de oligossacarídeos como monossacarídeos.

A hidrólise com ácidos diluídos é uma técnica bem fundamentada e bastante difundida. É uma técnica de baixo custo rendendo a liberação de hexoses principalmente manose e galactose bem como a liberação de pentoses como xilose e arabinose (MICHEL, 2007).

Os hidrolisados hemicelulósicos oriundos desses resíduos são de grande importância na medida em que resulta em açúcares importantes como a xilose que pode ser convertida em produtos de interesse econômico como xilitol, etanol, acetona dentre outros. A produção de xilitol destaca-se pela sua ampla utilização na indústria farmacêutica e alimentícia (FREITAS, 2003).

O xilitol é um poliálcool contendo cinco átomos de carbono (Figura 01) sendo encontrado em vegetais, líquens e algas. Esse açúcar possui poder adoçante similar ao da sacarose, porém é um terço menos calórico e também aparece como intermediário no metabolismo de carboidratos de mamíferos (LIMA, 2006; MICHEL, 2007).

O xilitol se caracteriza por ter lenta absorção e participar de rotas metabólicas independente de insulina, sendo dessa forma o açúcar de escolha para diabéticos. Além disso, por não ser metabolizado pela microbiota bucal é considerado um composto cariostático impossibilitando a proliferação de bactérias, sobretudo *Streptococcus mutans* impedindo dessa forma a formação de ácidos que atacam os dentes (LIMA, 2006).

Por não apresentar grupos redutores em sua molécula, o xilitol não participa da reação de Maillard podendo ser utilizado em preparações a elevadas temperaturas na indústria alimentícia, soma-se ainda o fato de não ser

fermentado por muitos microorganismos pode ser utilizado em refrescos e refrigerantes sem a necessidade de pasteurização e ainda, pode ser um substituto da lactose em alimentos infantis podendo ser consumido por crianças intolerantes a lactose (LIMA & BERLINCK, 2003).

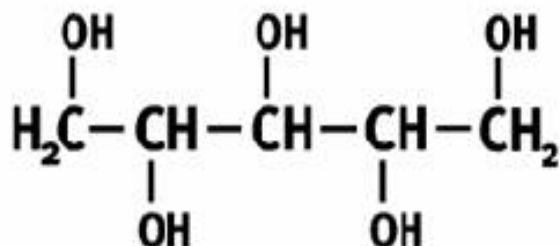


Figura 1- Fórmula estrutural do xilitol. Fonte: LIMA (2006).

O xilitol pode ser obtido de três formas: extração líquido-sólido, redução química da xilose e conversão biotecnológica de soluções contendo xilose. A extração líquido-sólido é feita em frutas e vegetais ou mesmo em leveduras, algas e cogumelos, mas é um processo de pouco rendimento o que torna economicamente inviável economicamente. O processo por redução química é realizado em escala comercial em um processo patenteado em 1977 (MELAJA e HAMALAINEN), consistindo basicamente por uma hidrólise ácida do material vegetal rico em xilana, purificação da xilose obtida, hidrogenação catalítica da xilose com formação do xilitol, cristalização do composto. Esse processo se torna oneroso uma vez que a presença de impurezas requer etapas adicionais de purificação como troca iônica descoloração e fracionamento cromatográfico. O xilitol pode ser produzido principalmente por leveduras constituindo um processo de conversão biotecnológica em soluções contendo xilose. É um processo que consiste na fermentação de hidrolisados hemicelulósicos oriundo de resíduos agroindustriais (LIMA & BERLINCK, 2003; TAMANINI & HAULY, 2004a).

Vários microrganismos foram avaliados quanto a capacidade de conversão da xilose em xilitol. Dentre todos os microrganismos estudados por essa capacidade, as leveduras são aqueles que apresentam maior eficiência em fermentar a xilose em xilitol (FREITAS, 2003; LIMA, 2006).

Espécies de *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* e *Candida mogii* são tidas como as mais eficientes na produção do xilitol. Essas espécies apresentam essa capacidade por que contêm a enzima xilose redutase que catalisa a conversão de xilose em xilitol a qual requer como cofator o NADPH e/ou NADH (WEST, 2009).

O desenvolvimento desse trabalho pode contribuir para otimização do aproveitamento da biomassa de jabuticaba através de processos biotecnológicos resultando em um produto com algumas aplicações biotecnológicas e com valor agregado. Além disso, permitir a aplicação e desenvolvimento de ciência e tecnologia na região Centro-Oeste.

2. Revisão da Literatura

2.1. Jabuticaba

Alguns autores descrevem que o nome Jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*) que vem do Tupi guarani significa “Sebo de Jaboti ou Fruta de Jaboti” alusão a sua polpa branca semelhante a gordura ou sebo do jaboti. Porém, segundo Silveira Bueno em seu Vocabulário Tupi-Guarani-Português, dos indígenas do tronco tupi-guarani vem o nome cujo significado é "a fruta em forma de botão (de flor)" e esclarece que não tem qualquer relação com Jaboti (MENDONÇA, 2000).

É na primavera que os frutos de casca brilhante e fina, do tipo baga, surgem esféricos, de coloração verde no início que se tornam vermelhos e finalmente negros quando completamente maduros, de polpa branca a

translúcida, com sabor levemente adocicado e suculento aderida a semente, crescem diretamente do seu tronco e ramos (ASQUIERI, 2006).

A jabuticabeira é uma árvore de tamanho médio, cujas folhas são lanceoladas, as flores brancas e os frutos globosos (figura 2). Entre as espécies comerciais de jabuticaba atualmente conhecidas, destaca-se a *Myrciaria cauliflora* (Mart. e O. BERG.) e a *Myrciaria jaboticaba* (VELL. BERG.). A cultivar Sabará, da espécie *M. jaboticaba* (VELL. BERG.), sendo a mais difundida no Brasil, tendo frutos próprios para a industrialização como para consumo *in natura* (DONALDIO, 2000; VIETES, 2011). A jabuticabeira é uma espécie frutífera nativa do Brasil, originária do Centro-sul, podendo ser encontrada desde o extremo Sul até o extremo Norte do País (MANICA, 2000), mas é nos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo que ocorrem as maiores produções (OLIVEIRA et al., 2003).



Figura 2 - Jabuticabeira. Fonte: arvoresvivas.wordpress.com (consulta 16/05/2013)

Uma característica dos frutos é que são altamente perecíveis, tendo um período de comercialização dos frutos maduros curto devido uma rápida alteração da aparência, decorrente da rápida perda de umidade, deterioração e fermentação da polpa, constatadas em dois a três dias pós-colheita. O uso de

tecnologias pós-colheita que visem à minimizar o metabolismo dos frutos, objetivando a redução da aceleração da maturação e, com isso o prolongamento da conservação, é própria para o sucesso comercial das jabuticabas (CORRÊA et al., 2007; VIETES, 2011).

O potencial de comercialização do fruto é grande, em função de suas características organolépticas (MAGALHÃES et al., 1996). DONADIO (2000) relata que, além do consumo ao natural, o fruto pode ser utilizado para fabricação de xaropes, vinho, licor, vinagre e geléia, tendo grande potencial econômico, com significativo crescimento na sua comercialização que, em 1998, foi superior a 4 mil toneladas na Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo (CEAGESP, 2009).

Há poucos trabalhos com a finalidade de aproveitar o bagaço obtido da prensagem das massas “vinicas”, da indústria de “vinhos e cachaça” de jabuticaba, em 2006, ASCHERI et al., produziram e caracterizaram as farinhas pré-gelatinizadas misturando o bagaço às farinhas pré-gelatinizadas misturando o bagaço à farinha de arroz polido usando um processo de extrusão termoplástica. A casca da jabuticaba contém antocianinas, pigmentos naturais presentes em frutas e flores cujas cores puxam para o roxo ou o vermelho sendo o emprego dessas, em substituição aos corantes sintéticos usados em alimentos (CEAGESP, 2009).

A casca de jabuticaba apresenta material lignocelulósico que é constituído por celulose, hemicelulose e lignina. A parede celular das plantas é composta por diferentes camadas diferindo uma das outras pela estrutura e composição química. Basicamente, a celulose forma um esqueleto formado por substâncias estruturais (hemicelulose) e envoltórias (lignina). Essas substâncias estão fortemente associadas e ligadas covalentemente (FILHO, 2008).

2.2. Materiais Lignocelulósicos

Materiais lignocelulósicos em forma de resíduos agroindustriais são acumulados em grande número no mundo todo, inclusive no Brasil (FREITAS, 2003). O aproveitamento de materiais lignocelulósicos a partir de processos fermentativos tem sido pesquisado em virtude do impacto ambiental causado pela grande quantidade de materiais liberados. Entre os resíduos lignocelulósicos está a casca da jabuticaba, atualmente ela é usada como ração animal e/ou descartada no ambiente.

A maior parte dos materiais lignocelulósicos são constituídos por três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina (TAIZ, 2004).

A Figura 3 mostra que a disposição das moléculas de hemicelulose estão quase paralelas às fibrilas de celulose, enquanto a lignina apresenta-se em uma forma aleatória, o que confere maior estabilidade à parede.

A difícil conversão de materiais lignocelulósicos em insumos químicos está nas características morfológicas que existe entre os principais componentes da parede celular de plantas. Para isso é importante a compreensão da complexidade estrutural desses materiais com o conhecimento das características e propriedades de cada um dos seus componentes (PITARELO, 2007).

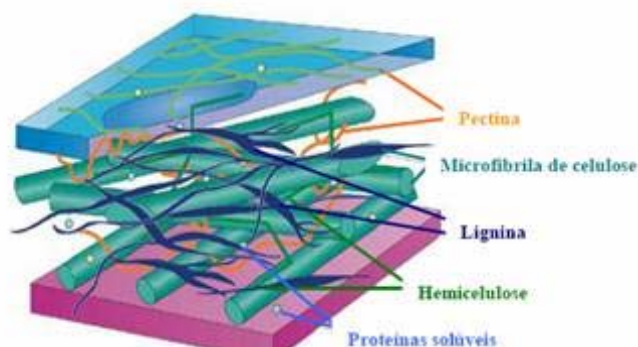


Figura 3 - Modelo da parede celular elucidando o complexo lignocelulolítico. Fonte: Sticklen (2008).

2.3 Composição dos resíduos lignocelulósicos.

2.3.1 Celulose

A celulose é um homopolímero de glicose composto de unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β (1 - 4), que constitui o polissacarídeo predominante nos resíduos vegetais, representando entre 30 a 60% do seu peso seco total (HECK et al, 2002). É um polímero linear insolúvel em água com massa molecular variando de 50 mil a 2,5 milhões de Dalton. A celulose é constituída por unidades monoméricas de celobiose, a qual é formada pela junção de duas moléculas de glicose (Figura 4) seguida da eliminação da água através das hidroxilas ligadas ao carbono 1 e 4 (FENGEL & WEGENER, 1989).

As cadeias de celulose são longas e paralelas sendo as fibrilas densamente empacotadas (Figura 3). Em estado sólido, existem ligações de hidrogênio entre as moléculas de celulose que levam a formação de estruturas supramoleculares arranjadas em um sistema ordenado semelhante a cristas. Entretanto, certa porção de celulose apresenta-se sob a forma de cadeias interligadas de maneira caótica formando a celulose amorfa. A porcentagem de cristalinidade da celulose em forma nativa é de 60-90%, podendo apresentar formas diferentes, numeradas de I a IV, sendo a forma nativa denominada “Celulose I”. A porcentagem e a forma cristalina da celulose na parede celular variam de acordo com o estágio de desenvolvimento e o tipo da célula. A característica semicristalina da celulose constitui um problema para a sua degradação (FILHO, 2008).

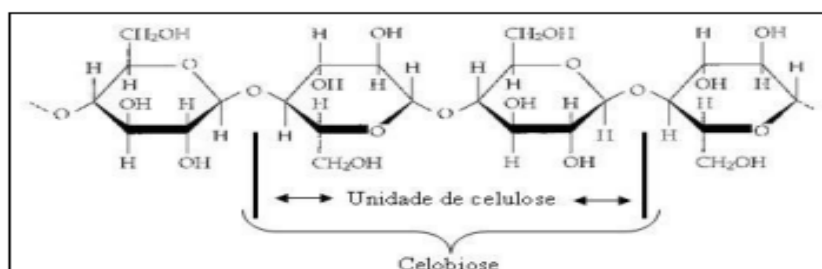


Figura 4 - Representação da cadeia linear de celulose (adaptado de RAVEN et al., 2001).

2.3.2 Hemicelulose

As microfibrilas de celulose são embebidas em uma matriz de polissacarídeos não celulósica, composta principalmente de hemicelulose e substâncias pécnicas. Esses polissacarídeos unem as microfibrilas, mantendo-as juntas lado a lado (CASTRO, 2005).

As hemiceluloses são heteropolímeros que podem ser extraídos da parede celular de vegetais superiores. São formadas por uma variedade de unidades monossacarídicas, como pentoses (D-xilose, L-arabinose e L-ramnose), hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose) e ácidos urônicos (ácido 4-O-metil-glicurônico e ácido galacturônico). Estruturalmente são mais parecidas com a celulose do que com a lignina sendo depositadas na parede celular em um estágio anterior a lignificação. Sua estrutura ramificada e com cadeias laterais que interagem facilmente com a celulose permite uma estabilidade e flexibilidade ao agregado (RAMOS, 2003).

As hemiceluloses são mais susceptíveis a hidrólise ácida do que as celulosas. Essa acessibilidade se deve ao caráter relativamente amorfo desses polissacarídeos (PITARELO, 2007). As cadeias de hemiceluloses podem ser constituídas por apenas uma unidade monossacarídica, como xilanas, ou por duas ou mais unidades como 4-O-metil-glicuronoxilanas, xiloglicanas ou arabinoxilanas (FENGEL & WEGENER, 1989).

Elas apresentam uma complexa mistura heterogênea de açúcares altamente ramificados. Os xilanos, arabinoxilanos, galactomananos, glucomananos e xiloglucanos são as classes mais freqüentes de hemicelulose. Todas as hemiceluloses possuem uma espécie de eixo formado por uma cadeia plana de açúcares unidos quase sempre por ligações β -1,4 podendo sair ramificações curtas, as fórmulas de alguns dos principais açúcares componentes das polioses são apresentados na Figura 5. Possuem também algumas

características estruturais que as impedem de formar agregados fibrilares, como ocorre nas cadeias de celulose (CASTRO, 2005).

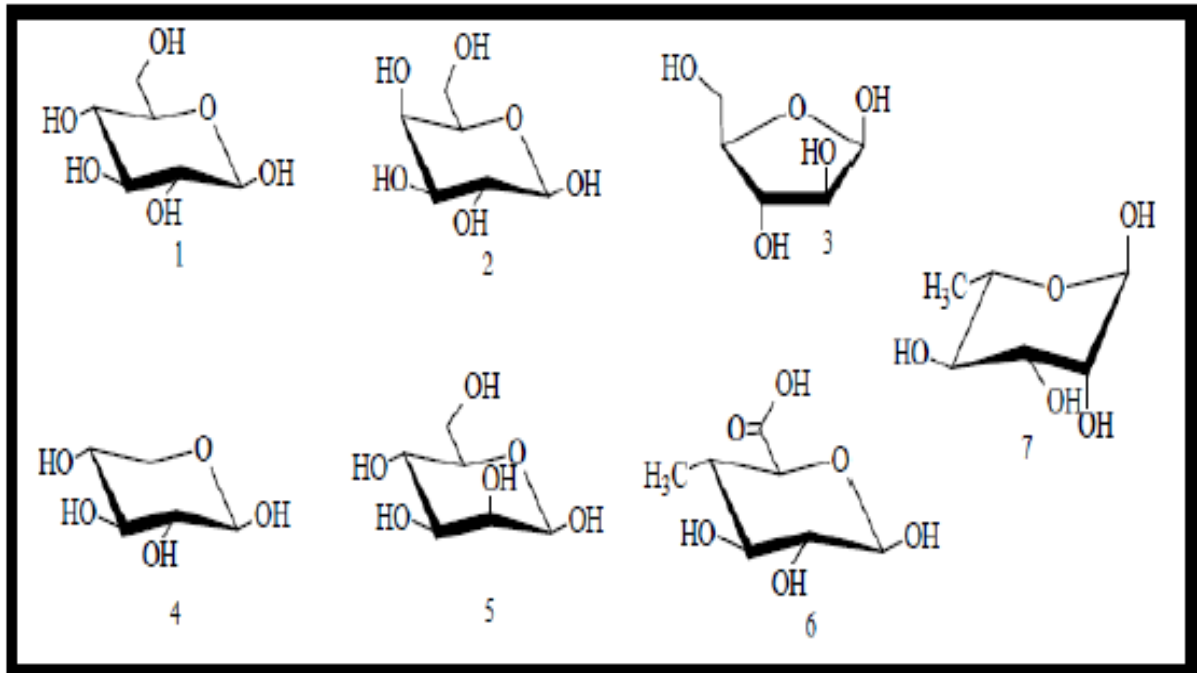


Figura 5 - Monossacarídeos constituintes das hemiceluloses. (1) D-glucose; (2) D-galactose; (3) L-arabinose; (4) D-xilose; (5) D-manose; (6) 4-o-metil-o-glucurônico; (7) L-ramnose (SJÖSTRÖM, 1999).

2.3.3 Lignina

Depois da celulose, a substância orgânica mais abundante nas plantas é a lignina, um polímero de grupos fenilpropanóides altamente ramificado que representa funções primárias e secundárias. A estrutura precisa da lignina não é conhecida devido à dificuldade de extrair lignina das plantas, pois está covalentemente ligada à celulose e a outros polissacarídeos da parede celular. A lignina é encontrada nas paredes celulares de vários tipos de tecidos de sustentação e vascular. É depositada, sobretudo no espessamento da parede secundária, mas também pode ocorrer na parede primária e na lamela média em íntimo contato com a celulose e hemicelulose já presentes (TAIZ, 2004).

A lignina é o segundo biopolímero mais abundante da terra. Em plantas é encontrada como parte integral da parede celular, emaranhada em uma

complexa matriz de celulose e hemicelulose, representando entre 20 a 30% do total de lignocelulósicos (FENGEL & WEGENER, 1983; PALONEN, 2004).

A lignina pode ser definida como material polifenólico amorfo com estrutura tridimensional baseada em três precursores monoméricos: os álcoois coniferílico, sinapílico e p-cumarílico (DENCE & LIN, 1992). A estrutura da lignina é muito complexa (figura 6) possuindo vários tipos de ligações químicas estáveis do tipo C-C, aril-éter e diarílicas (HIGUCHI, 1985).

A lignina é em geral formada por três diferentes alcoóis de fenilpropanóides: coniferil, cumaril e sinapil, que são sintetizados a partir da fenilalanina através de vários derivados do ácido cinâmico (TAIZ, 2004). As moléculas de celulose estão unidas em microfibrilas e possuem propriedades cristalinas devido ao arranjo ordenado de suas moléculas em certas partes, as micelas das microfibrilas. As microfibrilas de celulose se entrelaçam para formar finos filamentos que podem enrolar-se uns sobre os outros (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001).

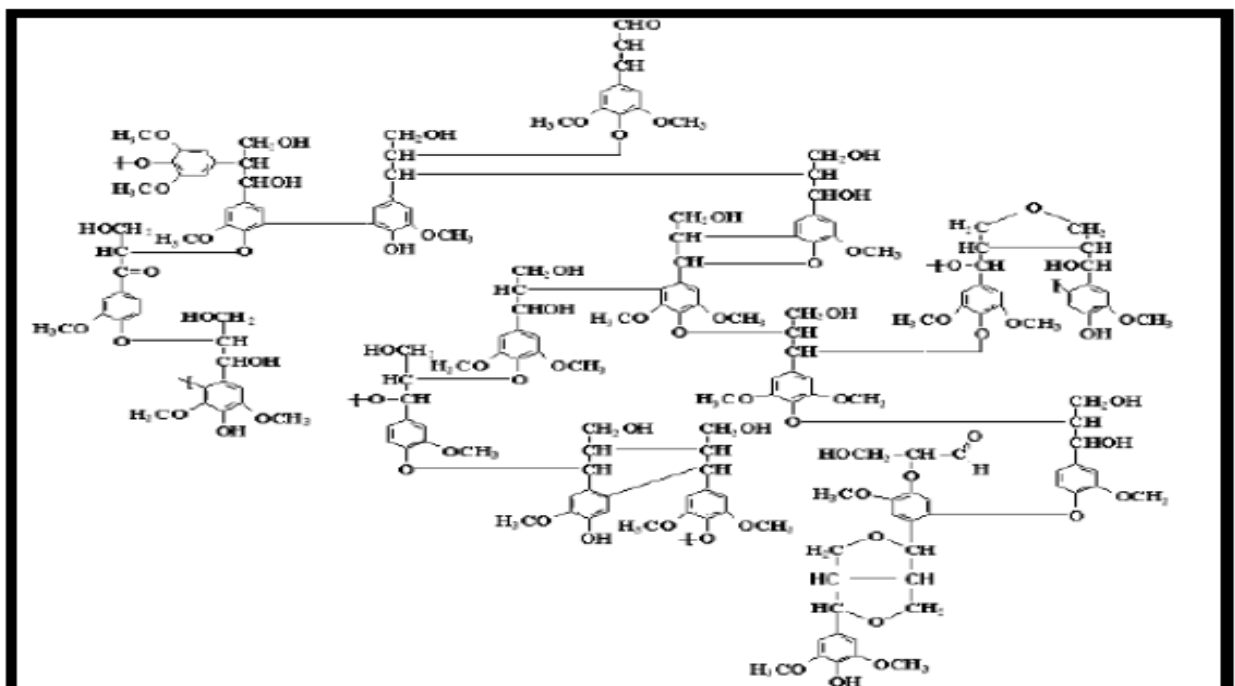


Figura 6 - Estrutura simplificada da lignina. Fonte: FENGEL E WEGNER (1991).

2.4. Processos para hidrólise de materiais lignocelulósicos

A hidrólise tem como objetivo converter a celulose em glicose, após a quebra das ligações glicosídicas, conforme fórmula: $[(C_6H_{10}O_5)_n + H_2O \rightarrow n C_6H_{12}O_6]$. Este processo pode ser catalisado pelo tratamento com diferentes tipos de ácidos diluídos ou concentrados, além da hidrólise enzimática (por celulase). A Figura 7 apresenta uma comparação entre os diferentes processos de hidrólise.

Métodos	Consumo	Temperatura (°C)	Tempo	Rendimento de glicose (%)
Ácido diluído	< 1% H ₂ SO ₄	215	3min	50-70
Ácido concentrado	30-70% H ₂ SO ₄	40	2-6 h	90
Enzimático	Celulase	70	36 h	75-95

Figura 7 - Comparação das tecnologias para hidrólise de celulose de acordo com HAMELINK et al., (2005).

Os materiais necessitam ser tratados por processos físico-químicos ou enzimáticos de forma a liberar os açúcares fermentáveis ou aumentar sua facilidade à hidrólise enzimática. Entre os diversos processos de hidrólise conhecidos a hidrólise ácida configura como o mais antigo e melhor processo, sendo a hidrólise ácida diluída a mais utilizada para a produção de xilitol (SAHA; HAYASHI, 2004; MICHEL, 2007).

A hidrólise com ácido diluído é um processo que utiliza condições menos rígidas, alcançando altos rendimentos de conversão de xilana à xilose. Existem basicamente, dois tipos de tratamento com ácido diluído:

1º-Com elevadas temperaturas ($> 160^{\circ}\text{C}$), processo de fluxo contínuo para baixa concentração de sólidos de 5-10 % (substrato/mistura de reação);

2º-e com baixa temperatura ($< 160^{\circ}\text{C}$), processo por batelada e alto teor de sólidos (10-40 %).

Portanto, o emprego de hidrólise ácida diluída apresenta muitas vantagens quando comparada ao uso de ácidos concentrados. Ácidos concentrados são perigosos, corrosivos, tóxicos, necessitando de reatores resistentes à corrosão. Além disso, ácidos concentrados devem ser recuperados após a hidrólise a fim de fazer com que o processo torne economicamente viável (SUN; CHENG, 2002; MICHEL, 2007).

A fase líquida produzida por tal reação de hidrólise possui açúcares constituintes da hemicelulose (xilose, arabinose entre outros), assim como outros compostos considerados inibidores do processo fermentativo, sendo tóxicos aos microrganismos empregados. Esses compostos incluem produtos de degradação de hexoses e pentoses como furfural e hidroximetilfurfural respectivamente, o ácido fórmico oriundo da degradação do furfural e hidroximetilfurfural, os ácidos acético, vanílico, siríngico e palmítico como compostos fenólicos decorrentes da degradação da lignina (SAHA; HAYASHI, 2004). Portanto, vários métodos de detoxificação de hidrolisados têm sido desenvolvidos, dentre eles o emprego de resinas de troca iônica, carvão ativado, enzimas lignolíticas, pré-fermentação com fungos filamentosos, tratamentos com álcalis ou sulfitos (MICHEL, 2007).

2.5. *Xilitol*

O xilitol é um álcool pentahidroxilado, encontrado em vegetais, líquens, algas, cogumelos, frutas e legumes, também é encontrado como intermediário no metabolismo de carboidratos de mamíferos, tendo a forma estrutural apresentada na figura 1 (LIMA, 2006; MICHEL, 2007).

Encontra-se o xilitol entre os adoçantes nutritivos que auxilia na redução e manutenção do peso, redução de cáries e de riscos associados com a obesidade e controle da diabete (MORAIS, 2008). O xilitol é um produto químico industrial com alta aplicabilidade comercial, cuja produção anual se aproxima de 40.000 toneladas (GRANSTROM et al. , 2007). A aplicação industrial mais importante do xilitol é como um adoçante alternativo por causa de seu substancial poder edulcorante (EDOMI, 1978).

Xilitol também tem aplicações médicas, sendo inclusive usado para prevenir otites e estimular a produção de células de hibridoma murino (PETCH e BUTLER, 1996;. UHARI et al., 1998). Os custos para sintetizar comercialmente xilitol são altos, porque o processo de produção envolve a hidrogenação catalítica de xilose usando um catalisador químico (Silva et al., 2005).

Uma das vantagens do xilitol sobre a sacarose é em virtude de sua elevada estabilidade química e microbiológica, ele atua, até mesmo em baixas concentrações, como conservante de produtos alimentícios, apresentando resistência ao crescimento de microrganismos e prolongando a vida dos produtos nas prateleiras (BAR, 1991; MUSSATTO et al., 2002; LIMA, 2006). Uma boa vantagem industrial é que, devido à ausência de grupos aldeídicos ou cetônicos em sua molécula, o xilitol não participa de reações com aminoácidos, conhecidas como reações de “Maillard”, isto significa que ele não sofre reações de escurecimento não enzimático, que provocam diminuição do valor nutricional das proteínas. Dessa forma, recomenda-se sua utilização na manufatura de produtos nos quais as reações de Maillard são indesejáveis, tais como os alimentos infantis obtidos por secagem (MUSSATTO et al., 2002; LIMA & BERLINCK, 2003).

Entretanto, em produtos de padaria, o uso exclusivo de xilitol oferece problemas, uma vez que as reações de escurecimento são responsáveis pela

aparência e pelas características flavorizantes desses produtos (MANZ et al., 1973; MUSSATTO et al., 2002). Em razão de seu elevado calor de solução endotérmico (34,8 cal/g), o xilitol produz um agradável efeito refrescante na boca, quando entra em contato com a saliva. Devido a essa propriedade organoléptica, o xilitol realça o efeito refrescante dos produtos com sabor de menta, tais como balas e gomas de mascar (PEPPER, 1988; MUSSATTO et al., 2002).

O uso de xilitol em produtos industrializados já foi aprovado em mais de quarenta países, e as indústrias que mais o utilizam são, pela ordem, a de alimentos, a de fármacos e a de cosméticos (MUSSATTO et al., 2002).

2.5.1. Produção de xilitol via processo químico

O xilitol pode ser obtido de fontes naturais como vegetais, fungos e líquens por extração sólido-líquido, porém como está presente em pequena proporção, menos de 0,9g/100g, este processo se torna economicamente inviável (LIMA, 2006).

A produção em larga escala de xilitol ocorre pelo processo químico, que consiste na redução de xilose, derivada principalmente de hidrolisados de materiais lignocelulósicos ricos em xilana. O processo patenteado desde 1977, por MELAJA e HAMALAINEN ocorre basicamente em quatro passos: (1º) hidrólise ácida de material vegetal; (2º) purificação do hidrolisado até obtenção de xilose pura; (3º) hidrogenação catalítica da xilose a xilitol e; (4º) purificação e cristalização do produto (LIMA, 2006).

O rendimento do processo químico, assim como a qualidade do xilitol é dependente da pureza da solução inicial de xilose uma vez que a presença de impurezas interfere na redução catalítica. Para a obtenção de uma solução de xilose de elevada pureza, são necessários operações de troca-iônica, descoloração e fracionamento cromatográfico. Além disto, após a remoção do

catalisador por filtração e troca-iônica, a solução de xilitol concentrada, sofre fracionamento cromatográfico utilizando resinas catiônicas e é cristalizada para obtenção do produto puro (figura 8). Com as várias etapas de purificação para remoção de resíduos e subprodutos resultam no aumento de tempo de processamento e encarecimento do produto. O alto custo de produção de xilitol, dez vezes maior ao da sacarose ou sorbitol, limita a sua utilização em larga escala (LIMA, 2006; MICHEL, 2007). Então, como alternativa a este processo, o xilitol pode ser produzido por via enzimática.

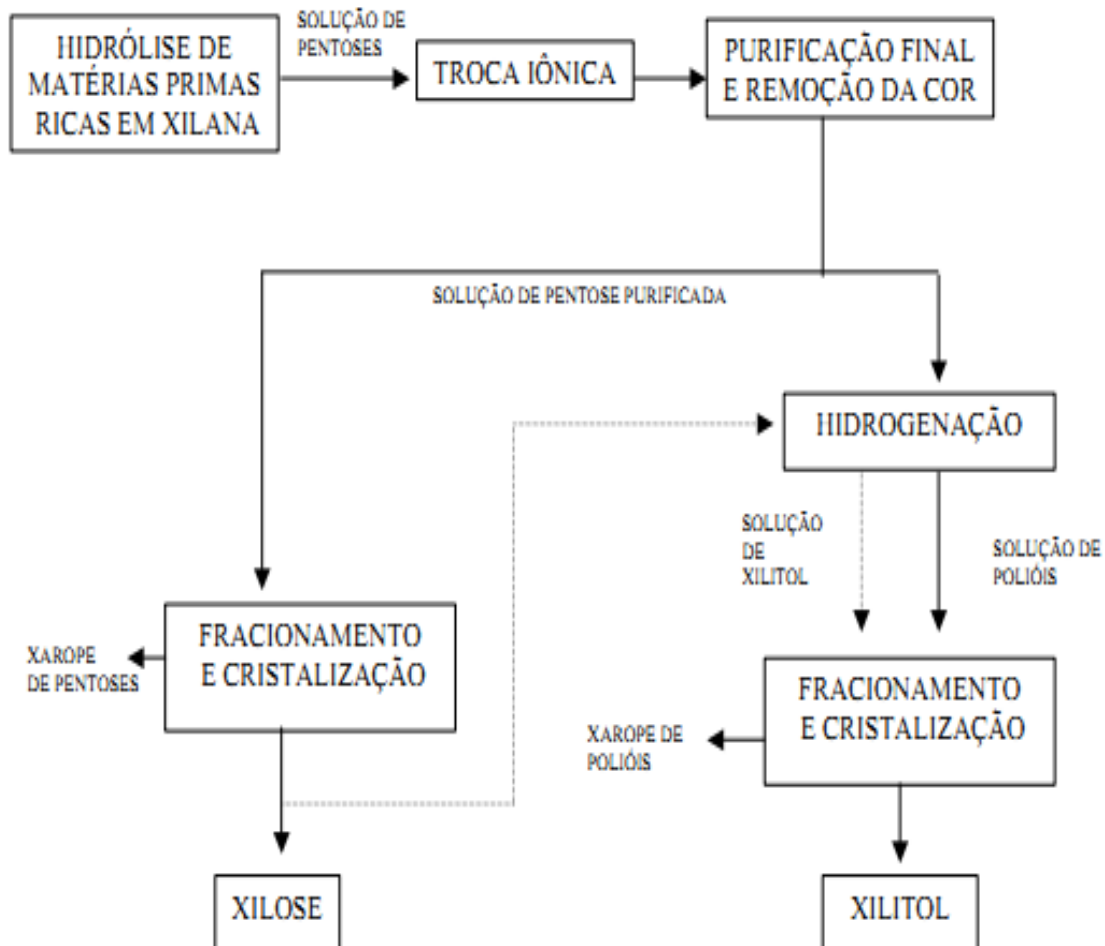


Figura 8 - Produção de xilose e xilitol (adaptado de HYVÖNEN et al., 1982).

2.5.2 Produção biotecnológica de xilitol

O xilitol pode ser produzido microbiologicamente a partir da xilose obtida na hidrólise de materiais lignocelulósicos, sem a necessidade de purificação da matéria prima (LIMA, 2006). Embora os microrganismos assimilem e fermentem mais prontamente glicose do que xilose há algumas bactérias, fungos filamentosos e leveduras capazes de assimilar e fermentar xilose a xilitol, e outros metabólitos como etanol, dependendo, contudo, do microrganismo e das condições de cultivo utilizadas (LIMA, 2006).

De forma geral, entre os microrganismos, as leveduras são consideradas os melhores produtores de xilitol. As espécies de *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* e *Candida mogii* são tidas como as mais eficientes na produção do xilitol (WEST, 2009). Nas leveduras, após ser transportada para o interior da célula, por difusão facilitada ou processo ativo, a D-xilose é convertida em D-xilulose, mediante duas reações (Figura 9). A primeira consiste na redução de D-xilose a xilitol mediante xilose redutase NADPH ou NADH-dependente e a segunda é a oxidação do xilitol a D-xilulose mediante xilitol desidrogenase NAD^+ ou NADP^+ -dependente. A D-xilulose é fosforilada a D-xilulose-5-fosfato pela D-xiluloquinase antes de participar do ciclo das pentoses fosfato (MICHEL, 2007).

A atividade da xilose redutase em leveduras produtoras de xilitol é preferencialmente, NADPH-dependente e a xilitol desidrogenase, especificamente NAD^+ -dependente. A regeneração do cofator NADPH ocorre no ciclo das pentoses fosfato enquanto a regeneração de NAD^+ , a partir de NADH, ocorre na cadeia respiratória, tendo o oxigênio como acceptor final de elétrons. Sendo que sob condições limitadas de oxigênio, não há a completa re-oxidação de NADH a NAD^+ , promovendo um desequilíbrio redox. A baixa concentração de NAD^+ diminui a oxidação do xilitol a xilulose, induzindo a

excreção de xilitol ao meio de cultura (YABLOCHKOVA et al., 2004; MICHEL, 2007).

Assim, sob condições limitadas de oxigênio, a xilose não é completamente metabolizada nas leveduras, levando à produção de xilitol e/ou etanol, dependendo basicamente, dos cofatores das enzimas envolvidas nas reações de metabolização da xilose, assim como, a regeneração de tais cofatores, de acordo com as condições de oxigênio empregadas ao longo do cultivo (PANAGIOTOU et al., 2005; MICHEL, 2007).

As leveduras que produzem predominantemente xilitol apresentam 97-98% atividade de xilose redutase para NADPH, produzindo portanto xilitol sob condições microaeróbias de oxigênio de modo a impedir a oxidação do xilitol formado. Sendo que as leveduras que produzem etanol como principal metabólito demonstram atividades de xilose redutase, principalmente, NADH-dependente. Nelas, a redução da xilose implica na obtenção de NAD^+ , recuperando, independentemente da cadeia respiratória, o cofator do xilitol desidrogenase, permitindo assim a fermentação de xilose a etanol. As leveduras que se caracterizam por produzirem etanol e xilitol em quantidades consideráveis, apresentam atividades de xilose redutase NADPH e NADH similares, sendo a atividade NADPH-dependente favorecida sob condições limitadas de oxigênio. A bioconversão de xilose a xilitol e/ou etanol é um processo complexo influenciado por diversos fatores, incluindo o tipo de levedura, a idade e concentração do inóculo, pH, temperatura, concentração inicial de xilose, tipo de fonte de nitrogênio, aeração e tipo de meio de cultura, segundo sua natureza como solução sintética ou hidrolisado hemicelulósico, sendo esse último afetado pela presença de outros açúcares e compostos inibidores (YABLOCHKOVA et al., 2004; MICHEL, 2007).

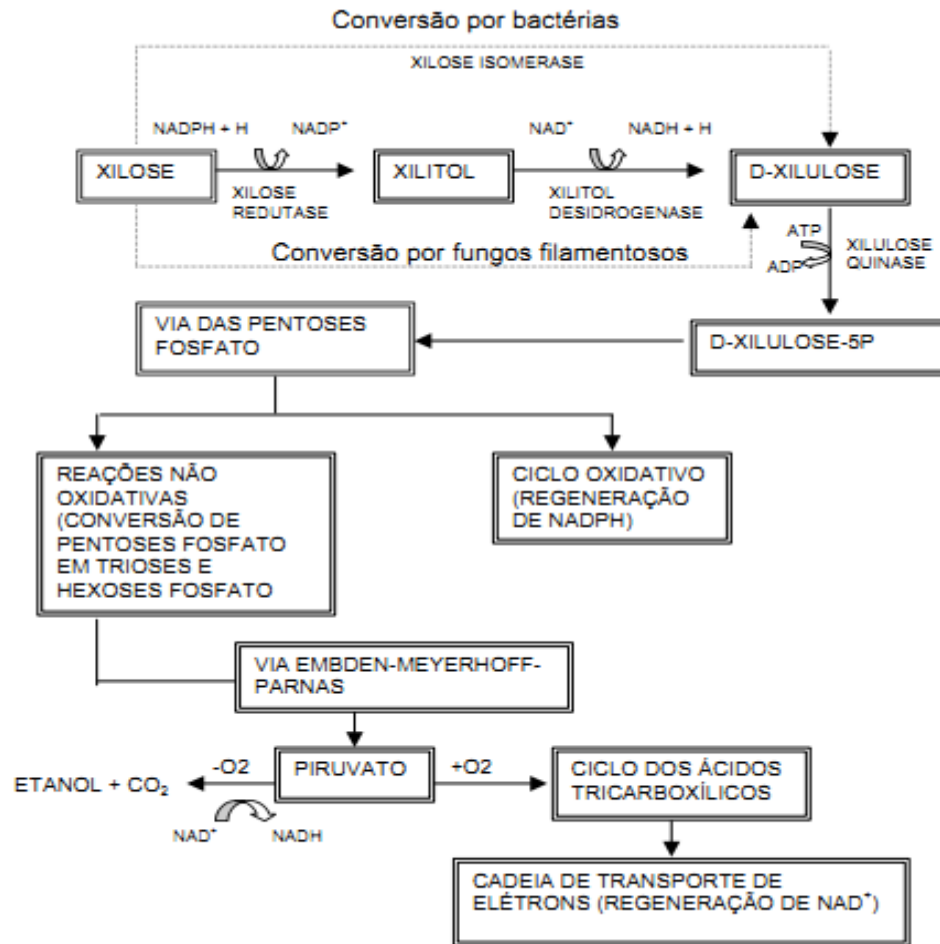


Figura 9 - Metabolismo de xilose em levedura (adaptado de PARAJÓ et al., 1998).

2.5.3. Xilose Redutase

A xilose redutase de leveduras pertence à família das aldoreductases, superfamília aldocetoreductase, e catalisam a redução reversível de aldeído e cetona em seus álcoois correspondentes (Figura 09). Estas enzimas estão presentes no citoplasma de microrganismos capazes de metabolizar xilose como fonte de carbono e, devido ao interesse em utilizar esta pentose em processos fermentativos, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas. As enzimas xilose redutase de diferentes leveduras e fungos já foram purificadas e caracterizadas, sendo em sua maioria monoméricas, com massa molecular entre 33 e 40 kDa, porém em *P. stipitis*, *Neurospora crassa*, *C. tropicalis* e *Candida parapsilosis*, a

enzima apresenta duas subunidades (LEE et al., 2003; LIMA, 2006). Algumas enzimas possuem especificidade somente por NADPH-mono-específica, e outras podem usar tanto NADPH como NADH-duplo-específica. Já a *Candida intermédia* apresenta isoenzimas, onde uma é mono-específica e a outra com dupla especificidade (NIDETZKY et al., 2003; LIMA, 2006). A maioria das leveduras já estudadas apresenta xilose redutase com dupla especificidade e elas preferem NADPH como cofator excepcionalmente *Candida parapsilosis* apresenta uma enzima que prefere NADH (LEE et al., 2003). Microrganismos que apresentam xilose redutase NADH-dependente são melhores produtores de etanol, ao contrário daqueles que apresentam xilose redutase NADPH-dependente que produzem xilitol ao invés de etanol (LEE et al., 2003; LIMA, 2006).

2.5.4. Xilitol Desidrogenase

A enzima xilitol desidrogenase, pertencente à família álcool desidrogenase é encontrada em microrganismos que metabolizam xilose pela formação de xilitol, sendo que a enzima catalisa a oxidação do álcool em cetona utilizando NAD^+ como cofator (Figura 09), porém já foram isoladas formas de enzimas que são capazes de utilizar as duas formas do cofator: fosforilada ou não (LIMA, 2006).

TAKAMIZAWA et al., (2000) purificaram parte da enzima xilitol desidrogenase de *Candida tropicalis* IFO 0618 em busca de desenvolver um biosensor de xilitol. Observaram que o pH ótimo (8,0) foi semelhante ao de xilitol desidrogenase de *Candida shehatae*, *P. stipitis* e *P. tannophilus*, mas a temperatura ótima (50°C) foi superior. Comparada com enzimas de outras leveduras, o K_M de xilitol desidrogenase de *Candida tropicalis* para xilitol é maior (49,8 μM) e, portanto como biosensor é menos sensível, porém este pode

ser um dos motivos que explicam porque *Candida tropicalis* é uma das melhores espécies de levedura para produção de xilitol. Entre os álcoois testados, xilitol foi oxidado mais rapidamente, apresentando atividade também por sorbitol e ribitol, a enzima não mostrou atividade em arabitól, glicerol e etanol.

Em *Aspergillus niger*, foram caracterizadas duas maneiras de produção de xilitol desidrogenase: uma NAD^+ dependente já isolada em diferentes leveduras, como xilitol: NAD^+ 2-oxidoreductase (EC 1.1.1.9), e outra, NADP^+ dependente, que atuaria principalmente na redução de xilulose, identificada como xilitol: NADP^+ 4-oxidoreductase (EC 1.1.1.10) permitindo a formação de xilitol a partir de arabinose (LIMA, 2006).

3. Objetivo geral

Avaliação do hidrolisado hemicelulósico da casca de jaboticaba para a obtenção de xilitol por *Candida guilliermondii*.

3.1. Objetivos específicos

1. Caracterização química do hidrolisado em relação aos açúcares.
2. Avaliação de parâmetros fermentativos relacionados a produção de xilitol.

4. Material e métodos

4.1. Matéria-prima

O bagaço da jaboticaba resultante da produção do fermentado de jaboticaba foi cedida pela Fazenda Jaboticabal, localizada em Hidrolândia no município de Nova Fátima em Goiás. O bagaço foi lavado abundantemente em água de torneira sendo as sementes separadas das cascas, e resíduos provenientes da polpa e das cascas. Logo após, as cascas foram secadas em

estufa por 24 h a 50 °C. Após esse procedimento as cascas foram trituradas em moinho Manesco e Ranieri Ltda, tipo MR 340 a 60 mesh e armazenadas em potes de polipropileno.

4.2. Retirada de extraíveis

Aproximadamente 100 g das cascas moídas foram submetidas em aparelho de Soxhlet contendo hexano e etanol (1:1(v/v)) para retirada de extraíveis. O material foi lavado com água quente para retirada dos solventes e posteriormente seco em estufa a 100 °C por 1 h.

4.3. Obtenção do hidrolisado da casca de jabuticaba

As cascas sem extraíveis foram submetidas à hidrólise com ácido sulfúrico a 1%, na proporção 1:10 (m/v) em frascos Erlenmeyers a uma pressão de vapor de 1atm a 120 °C por 30 e 60 min.. Obtendo dois hidrolisados.

4.4. Tratamento do hidrolisado hemicelulósico de casca de jabuticaba

Inicialmente o hidrolisado hemicelulósico fora neutralizado a pH 7 ajustando com adição de CaO seguido do abaixamento para pH 5,5 com H₃PO₄. Após cada alteração de pH, o precipitado foi removido por centrifugação a 5000 rpm por 15 minutos. O hidrolisado foi então submetido à adsorção em carvão ativado (1%) em frascos e agitados a 200 rpm, a 60 °C, por 30 minutos e agitados em incubadora tipo “Shaker” rotatório (New Brunswick, Scientific Co). Após este tempo, os hidrolisados foram centrifugados a 5000 rpm por 15 min., para remoção de sólidos. O hidrolisado tratado foi caracterizado quanto à concentração dos açúcares: xilose, glicose, arabinose, celobiose, glicerol, ác. fórmico, ác. acético e etanol.

4.5. Determinação das concentrações de açúcares

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, xilitol, celobiose, glicerol, ác. fórmico, ác. acético e etanol, presentes no hidrolisado foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando as seguintes condições: coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura: 45 °C; eluente: ácido sulfúrico 0,01N; fluxo: 0,6 mL min⁻¹; volume de amostra: 20 µl; detector: índice de refração. Após a diluição das amostras, estas foram filtradas em filtro Sep Pak C18.

4.6. Microrganismo e preparo do inóculo

4.6.1. Microrganismo

Os experimentos foram conduzidos com a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 (BARBOSA et al.,1998), da coleção de culturas do Departamento de Biotecnologia- Faculdade de Engenharia Química de Lorena-SP (EEL/USP), obtida a partir da cultura-estoque mantida em Ágar extrato de malte à 4 °C .

4.6.2. Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio autoclavado contendo xilose, solução de extrato de farelo de arroz, (NH₄)₂SO₄ e CaCl₂.2H₂O em pH 5,5, em proporções segundo a Tabela 01, a 30 °C sob agitação de 200 rpm por 24 h. Em seguida as células foram recuperadas por centrifugação e lavadas em água destilada esterilizada, centrifugadas novamente e após o descarte do sobrenadante, foram utilizadas para preparar uma suspensão de células a qual foi empregada como inóculo.

Tabela 1 - Composição do meio de inóculo para *C. guilliermondii*

Composição	gL ⁻¹
Sulfato de amônio ((NH ₄) ₂ SO ₄)	2
Cloreto de cálcio (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,1
Extrato de farelo de arroz	20
Xilose	30

4.7. Meio e Condições de Fermentação

Como meio de fermentação foi utilizado o hidrolisado hemicelulósico da casca de jabuticaba previamente tratado e autoclavado por 60 minutos a 1,0 atm. O hidrolisado foi suplementado com o meio descrito na Tabela 01, não sendo adicionada a xilose, e o inóculo obtido em 4.5.2 foi adicionado ao meio. A fermentação foi realizada em frasco Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de volume de trabalho em agitador rotatório por 21 h a 30 °C a 200 rpm. Foi retirada a amostra após 21 h para avaliar o consumo de açúcares e produção de xilitol, fator de rendimento e produtividade.

4.8. Métodos analíticos

Os açúcares: glicose, arabinose, xilose, xilitol, etanol, glicerol, ác. fórmico e ácido acético, foram quantificados pôr CLAE como descrito no item 4.5.

4.9. Determinação dos parâmetros fermentativos.

O fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{p/s}$) foi determinado segundo Tamanini et al., 2004b. Este fator expressa a produção de xilitol em relação ao consumo de xilose e é calculado pela equação:

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

onde: S_i e S_f correspondem às concentrações inicial e final de xilose (gL^{-1}); P_i e P_f correspondem às concentrações inicial e final de xilitol (gL^{-1}).

A produtividade volumétrica de xilitol também segundo Tamanini et al, 2004b, (Q_p) foi expressa pela concentração de xilitol produzida (gL^{-1}) em função do tempo (h) e calculada de acordo com a Equação abaixo:

$$Q_p = \frac{\Delta_P}{\Delta_t} = \frac{P_f - P_i}{T_f - T_i}$$

onde: P_i e P_f correspondem às concentrações inicial e final de xilitol (gL^{-1}); T_i e T_f correspondem aos tempos inicial e final de fermentação (h).

5. Resultados e Discussão

5.1. Hidrolisado

Durante a obtenção do hidrolisado da casca de jabuticaba foi observado que o hidrolisado possui coloração roxo escuro característico da casca de jabuticaba (Figura10).



Figura 10 – Hidrolisado da casca de jabuticaba com pH baixo

Elevando-se o pH para 7, tanto com óxido de cálcio (CaO) como com hidróxido de sódio (NaOH) percebe-se uma coloração vinho escuro tendendo

para verde musgo. Ao se agitar essa solução observou-se uma formação de espuma provavelmente pela quantidade de saponinas presentes nas cascas de jaboticaba (Figura 11), necessitando em muitos casos de anti-espumante.



Figura 11 - Hidrolisado da casca de jaboticaba com pH neutro

Com a diminuição do pH para 5,5 com ácido fosfórico, observou-se que a cor do hidrolisado torna-se mais clara. A obtenção de um hidrolisado de coloração amarelo límpido foi obtida usando carvão ativo 1% (Figura 12). Esse composto é muito utilizado para retirada de compostos inibidores como os fenólicos (FELIPE et al.,1995) presentes no hidrolisado que pode reduzir a conversão da xilose em xilitol pela levedura (Figura-12).



Figura 12 - Hidrolisado da casca de jaboticaba com pH de 5,5

5.2. Composição do hidrolisado

A Tabela 2 mostra a composição de açúcares nos dois hidrolisados produzidos. Notam-se diferenças nos teores de celobiose, arabinose e ácido acético. Esses compostos, principalmente o ácido acético, podem ser inibidores da formação do xilitol. No hidrolisado com 30 min se observou o teor de ácido acético foi $0,141\text{g L}^{-1}$, enquanto que o hidrolisado por 1 h mostrou menor formação de ácido acético ($0,099\text{g L}^{-1}$).

Tabela 2 – Composição química do hidrolisado bruto da casca de jabuticaba.

COMPOSTO (g L^{-1})	30 min	1 h
Celobiose	0,510	0,326
Glicose	2,641	2,576
Xilose	3,022	3,056
Arabinose	3,274	2,682
Xilitol	0,000	0,000
Glicerol	0,046	0,039
Ác. fórmico	0,001	0,003
Ác. acético	0,141	0,099

FELIPE et al. (2004) mostraram que o ácido acético é liberado a partir da estrutura lignocelulósica, originados de grupos acetil da xilana, sendo considerado inibidor importante do processo da bioconversão dos açúcares. Sua ação inibitória depende da concentração e da forma não dissociada, que é pH dependente. Em pH acidificado, o ácido acético pode difundir-se no citoplasma da célula, onde ele se dissocia e reduz o pH intracelular, resultando em desacoplamento da produção de energia e impedindo o transporte de vários nutrientes, aumentando os requerimentos de ATP. O efeito do ácido acético depende do microrganismo e os dados disponíveis dificultam comparações devido às diferentes condições em que os estudos são realizados (PARAJÓ et al., 1998).

O ácido acético foi o principal composto inibitório do metabolismo de D-xilose por *C. guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (FELIPE et al., 1993). SILVA (2001) observou que o efeito tóxico do ácido acético em *C. guilliermondii* cultivada em hidrolisado de bagaço de cana parece ser potencializado pela presença de outros compostos tóxicos como furfural, 5-hidroximetilfurfural e fenóis. Segundo PARAJÓ (1996), quando o caldo é concentrado, os compostos voláteis como o ácido acético e o furfural são parcialmente removidos, fato que não ocorreu quando o hidrolisado da casca de jabuticaba foi concentrado por seis vezes (Apêndices A1 e A2, os valores permaneceram entre 0,7 e 0,9 g L⁻¹, praticamente, seis vezes os valores encontrados nos hidrolisados brutos (Tabela 2).

Segundo FELIPE et al. (2004), a produção de xilitol com *C. guilliermondii* é favorecida num meio contendo concentrações de ácido acético abaixo de 1,0 g L⁻¹. Os autores explicaram que essas concentrações de ácido acético entram diretamente no ciclo de Krebs e o restante é utilizado por uma via metabólica que requer energia, como o ciclo do ácido glioxílico. Por outro lado o efeito inibitório do ácido acético é dependente de sua concentração, acima de 3 g L⁻¹, retarda a produção de xilitol (FELIPE et al., 2004).

No presente trabalho observou-se que o aumento do ácido acético não teve efeito inibidor na formação de Xilitol nos hidrolisados contendo 0,1 e 0,2 g L⁻¹ de células de *C. guilliermondii* (Figura13), o teor de xilitol aumentou com o incremento do ácido acético. As correlações entre esses compostos foi 0,759 (p=0,047) e 0,888 (p=0,008) para os hidrolisados 1 e 2, respectivamente.

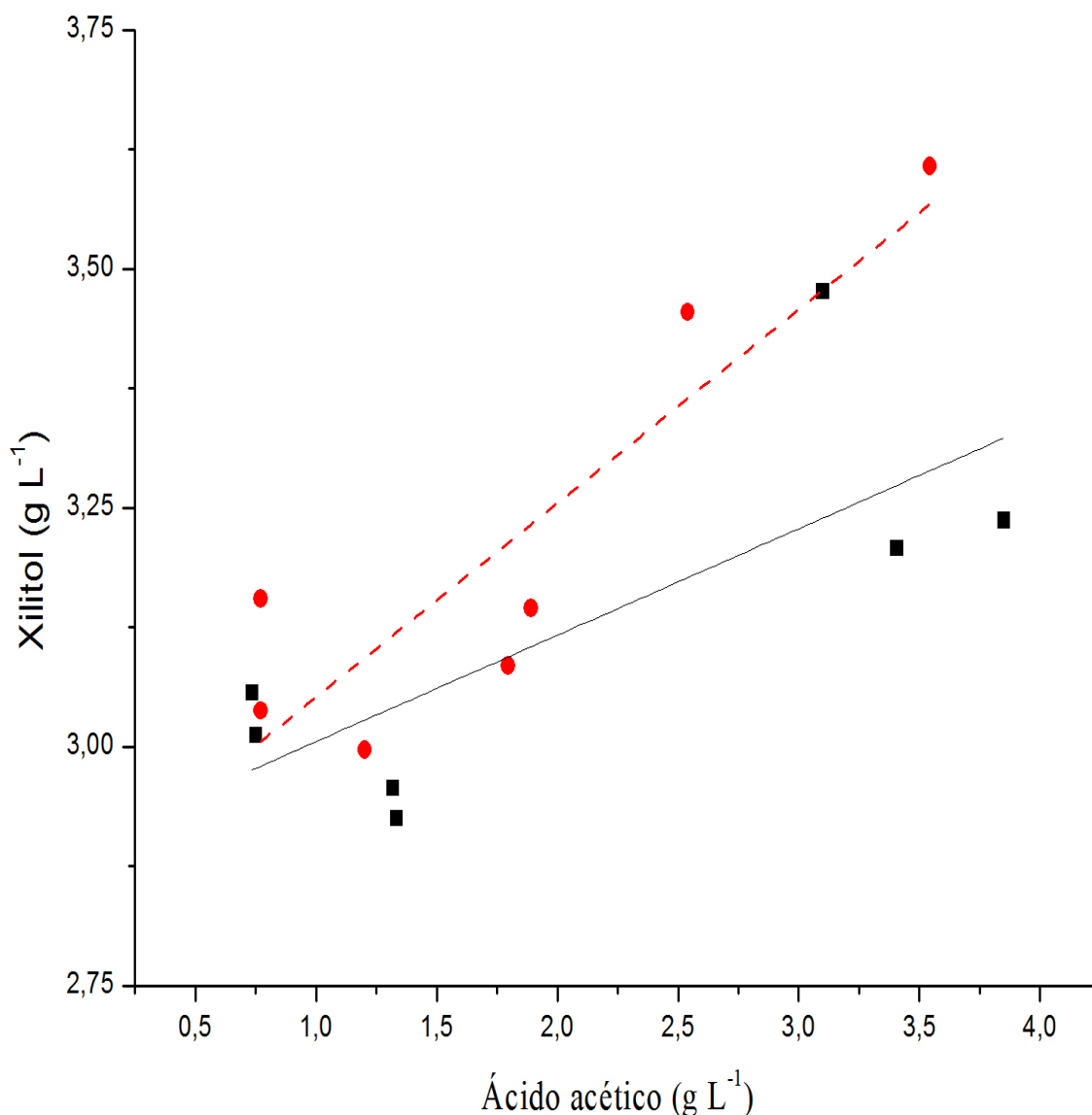


Figura 13 - Evolução da formação de Xilitol por *C. guilliermondii* em substratos de casca jaboticaba em concentrações de 0,1 g L⁻¹ (—) e 0,2 g L⁻¹ (----) de células de levedura.

Nota-se que a levedura *C. guilliermondii* consumiu a glicose e xilose proporcionalmente no tempo estabelecido (Figura 14), apresentaram forte correlação positiva entre 0,862 ($p=0,013$) e 0,791 ($p=0,019$). Não foi observada nenhuma limitação quanto ao consumo da xilose pela glicose, isto é, não houve competitividade entre esses açúcares, como observado por MORAIS (2008), isto é, a glicose não agiu como fator limitante na fermentação da xilose em xilitol.

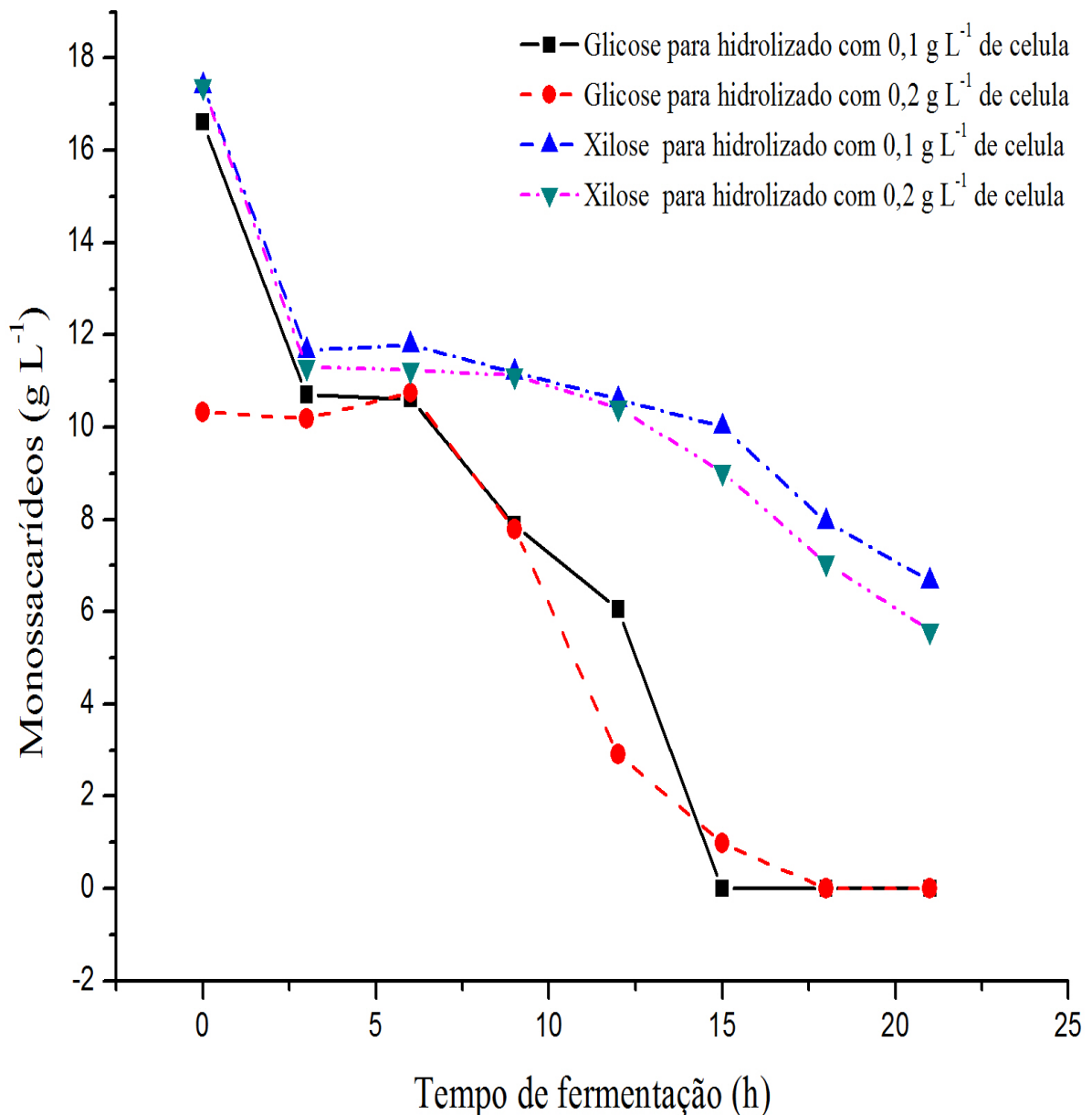


Figura 14 - Comparativo do consumo da xilose e glicose por *C. guilliermondii* em substratos de casca jaboticaba.

Segundo CARVALHEIRO et al. (2005), a alta concentração de arabinose pode suprimir o consumo de xilose, o que não foi observado no presente estudo. Ambos os açúcares diminuem no decorrer da fermentação (Figura 15), apresentando uma forte correlação positiva ($r=0,928$, $p=0,001$) para a fermentação do substrato contendo $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de células de *C. guilliermondii*,

enquanto que para o substrato contendo $0,2 \text{ g L}^{-1}$ de células a correlação fraca positiva, porém, não significativa ($r=0,655$, $p=0,078$).

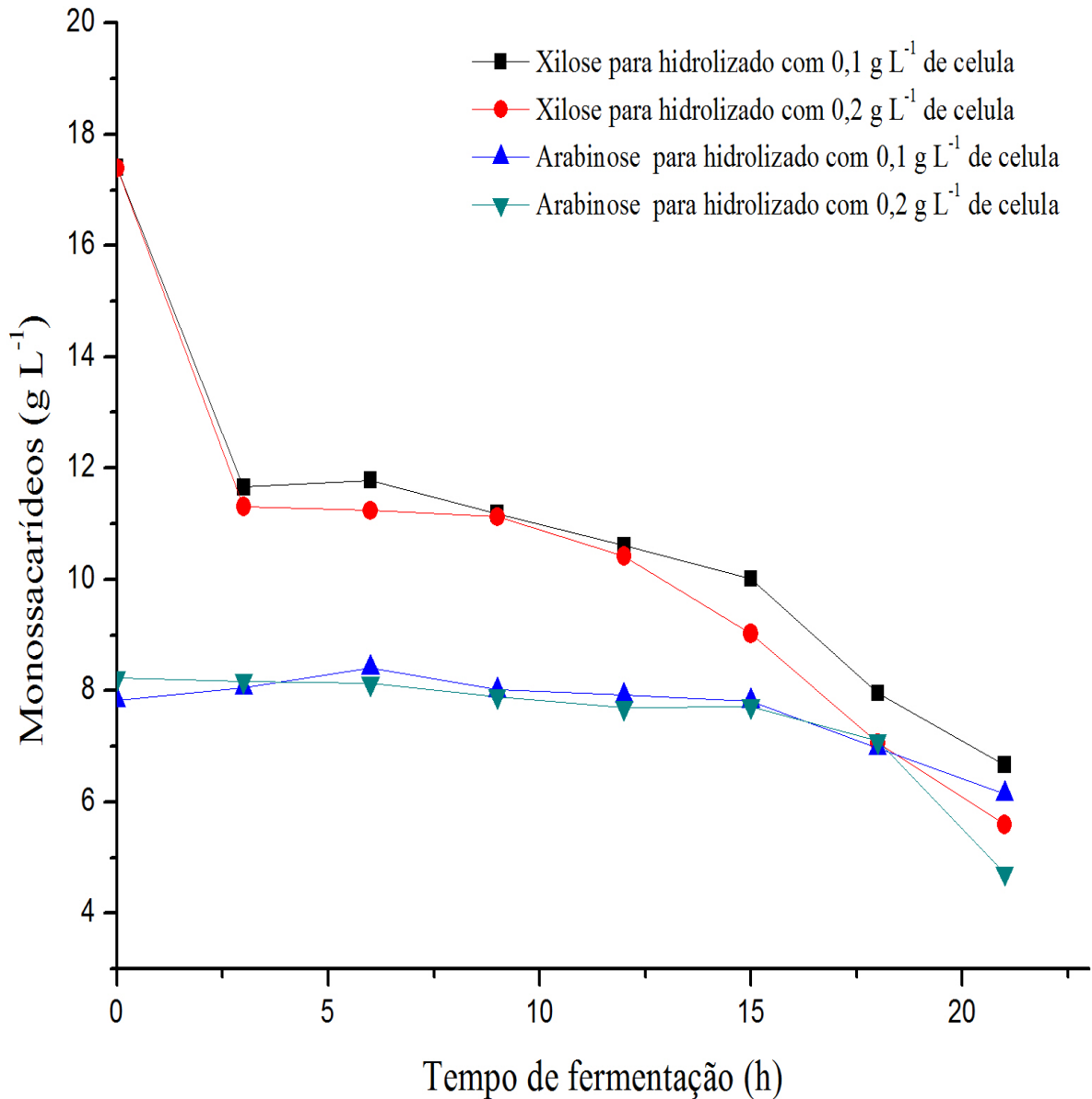


Figura 15 - Comparativo do consumo da xilose e arabinose por *C. guilliermondii* em substratos de casca jaboticaba.

O maior consumo de xilose pela *C. guilliermondii* foi observada nas três primeiras horas de fermentação, consumindo aproximadamente um terço da quantidade de xilose presente nos substratos. Logo após, o consumo foi lento até

o final da fermentação, obtendo-se um consumo total de 61,7 e 67,9% da xilose contido nos substratos 0,1 e 0,2 g L⁻¹ de células, respectivamente.

O consumo da arabinose se deu logo após as 15 h de fermentação. O maior consumo foi observado no substrato contendo 0,1 g L⁻¹ de células com um total de 42,6% da arabinose consumida, o dobro do que foi consumido quando o substrato continha 0,2 g L⁻¹ de células de *C. guilliermondii*, sendo de 21,6% da arabinose consumida esse lento consumo pode estar ligado à presença de xilose. Este fato reforça as observações feitas por FELIPE et al. (2001) em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana.

Em relação á fermentação do hidrolisado hemicelulósico de casca de jaboticaba, o resultado apresentado na Figura 16, onde apresenta o consumo de xilose e a produção de xilitol, mostra uma correlação negativa ($r = -0,87$) para a fermentação com 0,2 gL⁻¹ de células, já para 0,1 gL⁻¹ de células apresenta uma correlação negativa ($r = -0,50$). Observa-se que com 0,1 gL⁻¹ de células a levedura consumiu 61,71% da xilose em quanto com 0,2 gL⁻¹ de células a levedura consumiu 67,86% de xilose, indicando que para uma otimização de processo de fermentação utilizando-se 0,2 gL⁻¹ de células é o melhor caminho, uma vez que ele demonstrou uma redução na concentração do ácido acético que é um potencial inibidor do metabolismo de xilose pela levedura *C. guilliermondii*.

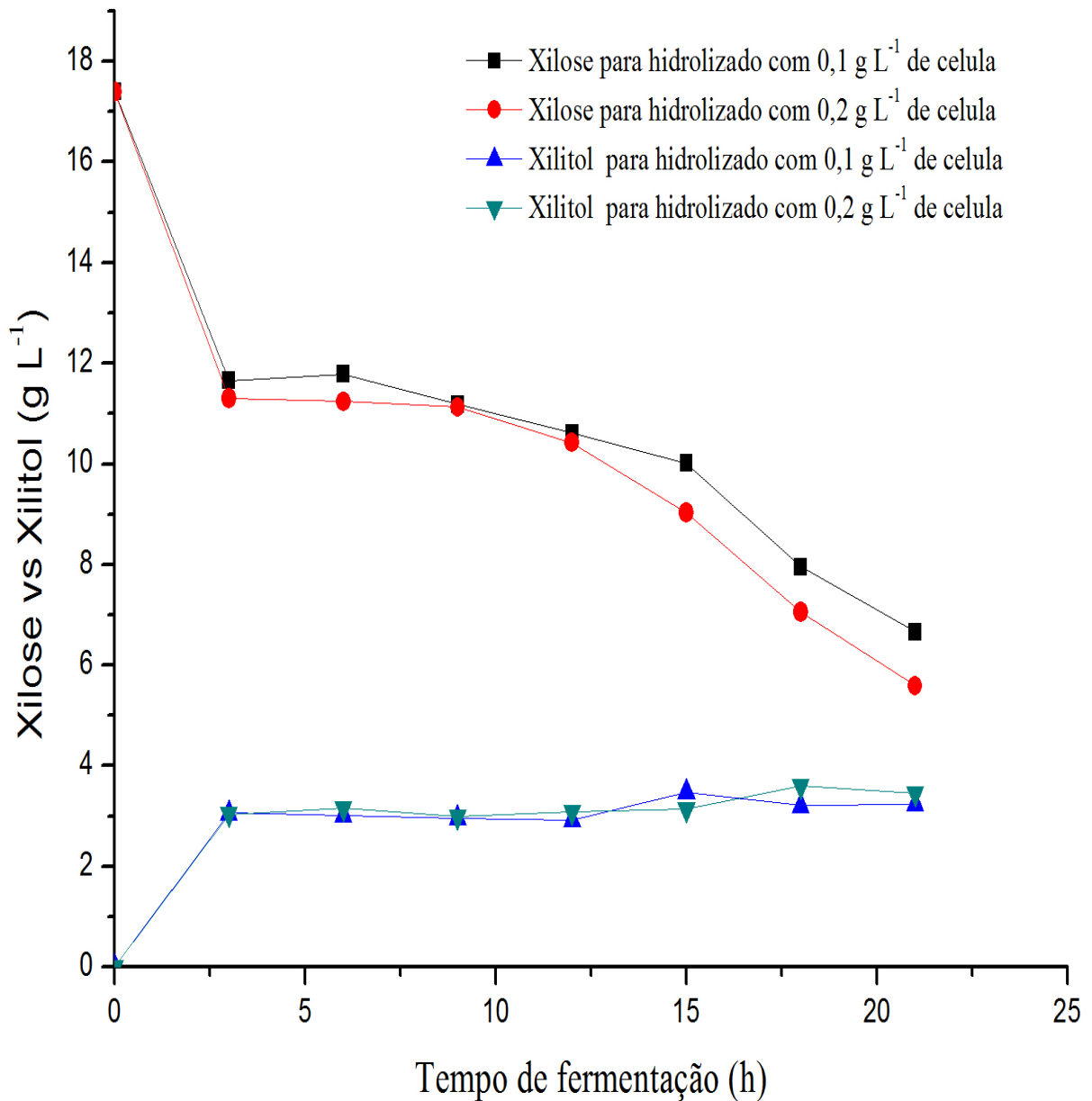


Figura 16 - Consumo de xilose e produção de xilitol em substratos de jaboticaba contendo 0,1gL⁻¹ e 0,2 gL⁻¹ de células *C. guilliermondii*

Foi constatada a presença de etanol como subprodutos dessa fermentação, conforme mostra a Figura 17. A concentração de etanol no meio (9,129 gL⁻¹ em 0,1 gL⁻¹ de células e 8,528 gL⁻¹ em 0,2 gL⁻¹ de células) foi aproximadamente 3 vezes superior a formação de xilitol observando-se um aumento proporcional do etanol no decorrer das 21 h de fermentação.

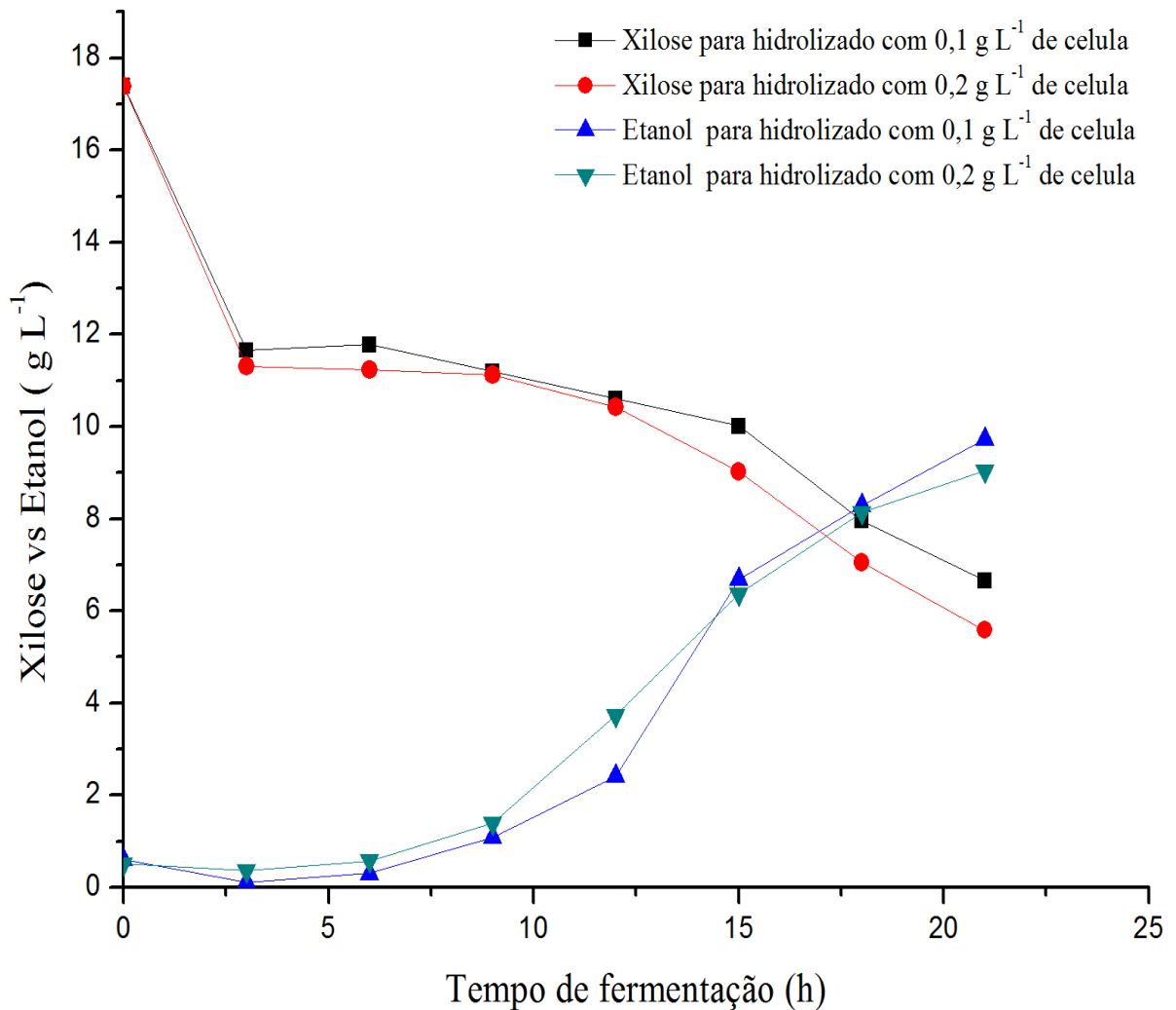


Figura 17 - Consumo de xilose e produção de etanol em substratos de jabuticaba contendo 0,1gL⁻¹ e 0,2 gL⁻¹ de células *C. guilliermondii*

O experimento do presente trabalho foi realizado com a microaerobiose, ou seja, não se variou a aeração, com uma correlação negativa ($r = -0,95$) para 0,1 gL⁻¹ de células e uma correlação positiva ($r = 0,16$) para 0,2 gL⁻¹ de células da levedura. Na Figura 18, toda a glicose foi consumida por *C. guilliermondii* com produção de etanol, com uma correlação negativa ($r = -0,96$) para 0,1 gL⁻¹ de células e uma correlação positiva ($r = 0,31$) para 0,2 gL⁻¹ de células da levedura. A produção de etanol esta ligada a aeração, BARBOSA et al. (1988), trabalhando com *C. guilliermondii*, detectaram que, com decréscimo na aeração,

ocorreu aumento no rendimento de xilitol, enquanto a concentração de etanol e xilose diminuíram. Em 1985, Du PREZ e PRIOR, interessados na produção de etanol por *Candida shehatae* CSIR-Y492, verificaram que o aumento na aeração minimizou a produção de xilitol.

O oxigênio parece regular a produção de xilitol por influenciar o potencial redox no interior da célula. Em condições de microaerobiose, que ocorre em condições de rotação a (200 rpm), há pouco oxigênio e excesso de NADH levando ao desequilíbrio na taxa NADH/NAD⁺, o que não ocorre com o aumento na taxa de aeração em condições de cultivo, que ocorre em condições de rotação a (300 rpm). Entretanto, a presença do oxigênio é necessária para maior crescimento microbiano e para assimilação de xilose. O cultivo em anaerobiose não é condição ideal para produção de xilitol (FURLAN et al., 1991; NOLLEAU et al., 1995).

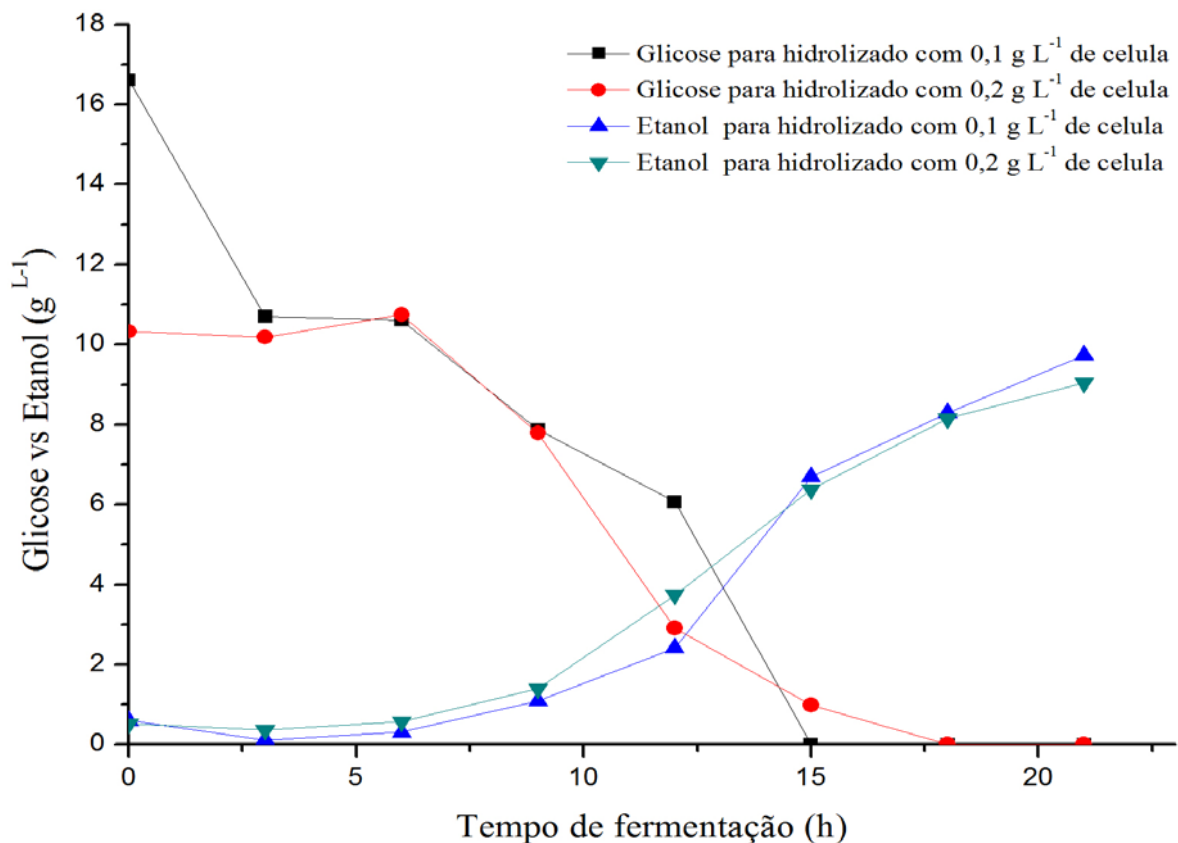


Figura 18 - Consumo de glicose e produção de etanol em substratos de jabuticaba contendo 0,1g L⁻¹ e 0,2 g L⁻¹ de células *C. guilliermondii*

A presença de altas concentrações de glicose em relação à xilose no hidrolisado hemicelulósico de casca da jabuticaba não é um ponto favorável para a bioconversão de xilose em xilitol uma vez que elevadas concentrações desta hexose junto à xilose pode acarretar em repressão catabólica interagindo nas atividades das enzimas-chave deste bioprocessos, a xilose redutase e xilitol desidrogenase (SILVA et al., 2004). Observa-se na Figura 19, que depois das 3 h iniciais houve um consumo de glicose semelhante as duas concentrações de células ($0,1$ e $0,2 \text{ gL}^{-1}$). Mas nota-se que a levedura mantém a produção de xilitol até no momento que houve a interrupção da fermentação com 21 h, apresentando uma correlação negativa ($r = -0,56$ e $r = -0,52$) correspondente as concentrações de células $0,1$ e $0,2 \text{ gL}^{-1}$, respectivamente.

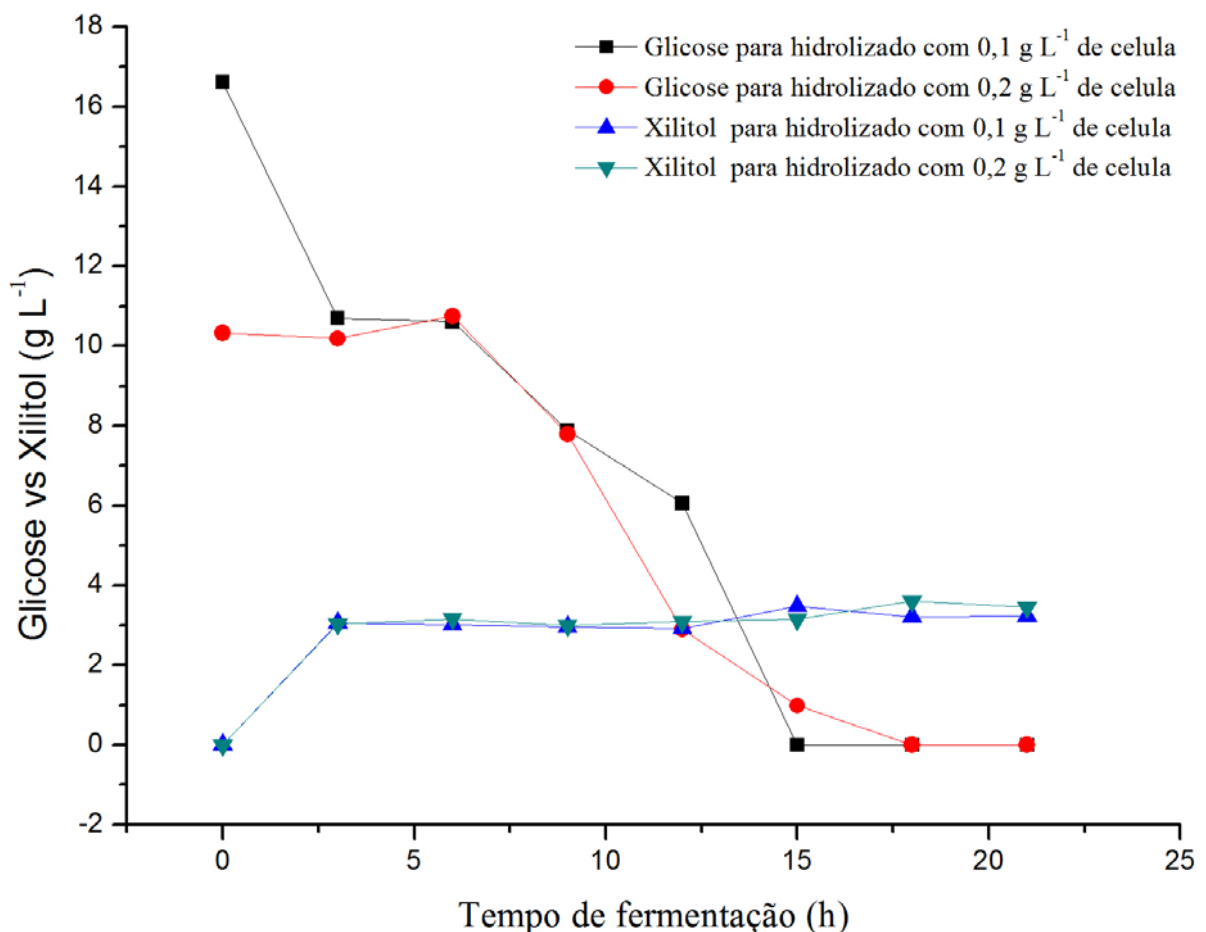


Figura 19 - Consumo de glicose e produção de xilitol em substratos de jabuticaba contendo $0,1 \text{ gL}^{-1}$ e $0,2 \text{ gL}^{-1}$ de células *C. guilliermondii*

O maior rendimento foi favorecido com o cultivo com $0,2 \text{ gL}^{-1}$ de células chegando a $0,62 \text{ gg}^{-1}$ ficando na frente do encontrado no sabugo de milho com $0,52 \text{ gg}^{-1}$ e farelo de cevada com $0,61 \text{ gg}^{-1}$ e o de $0,1 \text{ gL}^{-1}$ de células com $0,56 \text{ gg}^{-1}$. Enquanto a produtividade de xilitol não teve uma variação significativa, pois com $0,1$ e $0,2 \text{ gL}^{-1}$ de células tiveram $0,15$ e $0,16 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$.

Tabela 3 - Fator de Conversão de substrato em Produto ($Y_{p/s}$) e produtividade Volumetrica em Xilitol (Q_p), em hidrolisados hemicelulósicos (CASTRO et al., 2011)

Matéria-prima	$Y_{p/s} (\text{gg}^{-1})$	$Q_p (\text{gL}^{-1}\text{h}^{-1})$	Referência
Farelo de cevada	0,61	0,33	Cruz et al., 2000
Sabugo de milho	0,71	0,60	Kim et al., 1999
Sabugo de milho	0,52	0,26	Cruz et al., 2000
Bagaço de cana-de-açúcar	0,79	0,52	Alves et al., 1998
Folhas de milho	0,64	0,36	Cruz et al., 2000
Madeira de eucalipto	0,63	0,41	Coment et al., 2000
Madeira de eucalipto	0,04	0,02	Cruz et al., 2000
Palha de arroz	0,72	0,57	Castro et al., 2011

O que ficou claro que é possível produzir xilitol através da casca de jabuticaba, pois a *C. guilliermondii* consumiu bem a xilose em 21h de fermentação numa concentração de $0,2 \text{ gL}^{-1}$ de células (Tabela-04).

A comparação dos teores de açúcares e de compostos inibidores de hidrolisados hemicelulósicos de diferentes resíduos é interessante quando se discute a produção de xilitol, mas as condições de hidrólise, em geral, são diferentes em função da estrutura química do resíduo. Portanto, é relevante a determinação das condições ótimas de hidrólise para cada resíduo visando à maior concentração de xilose e menor concentração de compostos tóxicos. Com relação ao processo fermentativo, os parâmetros de produção de xilitol podem ser melhorados reduzindo-se o teor de compostos tóxicos e determinando as melhores condições de fermentação.

6. Conclusão

A utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos para obtenção de produtos úteis é de grande relevância tanto para as indústrias quanto para o meio-ambiente. A demanda crescente de xilitol pelas indústrias de alimentos e farmacêuticas têm resultado no desenvolvimento de processos alternativos que proporcionem maiores rendimentos e custos mais baixos do que o processo químico empregado atualmente na obtenção deste açúcar. Diante disso, o hidrolisado de bagaço da casca de jabuticaba foi avaliado neste trabalho como substrato para a produção de xilitol por *Candida guilliermondii*.

A análise do bagaço da casca de jabuticaba, após a hidrólise ácida e a bioconversão, demonstrou que há uma produção de etanol e xilitol a partir deste resíduo. Assim, considerando a importância destes alcoóis para as indústrias e a grande proporção de bagaço de casca de jabuticaba gerado anualmente no Brasil, torna-se relevante os resultados obtidos neste trabalho.

7. Perspectivas futuras

Efetuar uma caracterização completa do hidrolisado quanto a identificação e quantificação dos compostos aromáticos, furfural e 5-hidroximetilfurfural, dentre outros.

Utilizar estudos sobre outros tratamentos do hidrolisado da casca de jabuticaba para melhorar a bioconversão de xilose em xilitol e/ou etanol, empregando-se combinações de técnicas que permitam a remoção seletiva dos compostos que realmente exercem efeito tóxico no metabolismo da xilose por *C. guilliermondii*.

Analisar o caroço e as folhas da jabuticaba, quanto a quantidades de açúcares e compostos inibidores, na busca de viabilizar o processo de lavagem inicial antes da secagem.

8. Referências Bibliográficas

ANDERSEN, O. & ANDERSEN, V. U. 1989. **As frutas silvestres brasileiras**. Globo, São Paulo, p.130-135.

ASCHERI, Diego Palmiro Ramirez; ASCHERI, José Luis Ramírez ; CARVALHO, Carlos Wanderlei Piller de. **Caracterização da farinha de bagaço de jabuticaba e propriedades funcionais dos extrusados**. Ciênc. Technol. Aliment. vol.26 n.4 Campinas Oct./Dec. 2006.

ASQUIERI, E. R.; DAMIANI, C.; CANDIDO, M. A.; ASSIS, E. M. **Vino de jabuticaba (Myrciaria cauliflora Berg): estudo de las características físico-químicas y sensoriales de los vinos tintos seco y dulce, fabricados con la fruta integral**. Alimentária, n. 355, p. 111-121, 2004.

BAR, A. Xylitol. In: O'BREIN NABORS, L., GELARDI, R. C., eds. **Alternative Sweeteners**. 2. ed., New York: Marcel Dekkor Inc., 1991. p.349-379.

BARBOSA, M. F. S.; MEDEIROS, M. B.; MANCILHA, I. M.; SCHNEIDER, H.; LEE, H. Screening of Yeasts for Production of Xylitol from D-Xilose and some factors which affect Xylitol yield in *Cândida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, p.241-251, 1988.

Bitter, V.; Muir, H.M. (1962). **A modified uronic acid carbazole reaction**. **Analytical Biochemistry**,.4, 330-334.

Brunini, M. A.; Macedo, N. B.; Coelho, C. V.; Siqueira, G. F. Caracterização física e química de acerolas provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 26, n. 3, p. 486-489, 2004.

BLUMENKRANTZ, NELLY; ASBOE-HANSEN, GUSTAV. New Method for Quantitative Determination of Uronic Acids. Univer& of Copenhagen, Departme& of Dermatology (with Connective Tissue Research Laboratories), **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY** 54, 484-489 (1973).

CASTRO, P.R.C.; KLUGE, R.A.; PERES, L.E.P. **Manual de fisiologia vegetal: teoria e prática**. Piracicaba: Editora Agronômica Ceres, 2005.

CASTRO, D. B. A.; BARDELLA, D.; MACABELLI, C. H.; CURTOLO, M.;GIORGIANO, T. E. **“Produção biológica de xilitol a partir de resíduos.”**

Trabalho de iniciação científica. UFSCar. São Paulo, 2011. (Acesso em 10/03/2013)

CITADIN, Idemir; Moeses Andrigo Danner; Simone Zolet Sasso. Jaboticabeiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Rev. Bras. Frutic. vol.32 no.2 Jaboticabal June, 2010. (Acesso em 10/03/2013) <http://www.revista-fi.com/materias/141.pdf>

CORRÊA, P. E. O.; RAMOS, R. M.; SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M.. Avaliação do fator de concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar no crescimento e consumo de açúcares por *Candida guilliermondii*. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA-INICIAÇÃO CIENTÍFICA**. 1. São Carlos, SP. 8-10 ago., 1995. Anais.

CULBERT, S. J., WANG, Y. M., FRITSCHÉ, H. A., CARR, D., LANTIN, E., van EYS, J. **Oral xylitol in American adults**. *Nutr. Res.*, v.6, p.913-922, 1986.

DENCE, C. W.; LIN, S.Y. **Methods in Lignin Chemistry**, New York: Springer Verlag, 1992.

DONADIO, L. C. Jaboticaba [*Myrciaria jaboticaba* (vell.) Berg]. **Série Frutas nativas**. Jaboticabal: Funep, 55p. 2000.

du PREEZ, J. C.; MEYER, P. S.; KILIAN, S. G.. **The effect of mistures of acetic acid and D-xylose on the growth rate of *Candida blankii***. *Biotechnology Letters*. V. 13. Nr. 1. P. 827-832, 1991.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure and reactions**. New York: Walter de Gruyter, 1989. 613p.

FILHO, J. M. M. **A Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 79p. Dissertação (mestrado). 2008. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba-SP.

FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; VIOLO, M.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S.; ROSA, S. A. Preparação de xilitol por fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 36, n. 1, p. 103-14, 1993.

FELIPE, M. G. A. **Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic materials**. Lignocelluloses biodegradation, American Chemical Society, p. 300-315, 2004.

FREITAS, M. T. **Utilização da casca de semente de algodão como substrato para produção microbiológica de xilitol**. 57p. Dissertação (mestrado). 2003. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa-MG.

GOUVEIA, Ester Ribeiro, Renata Trajano do Nascimento e Ana Maria Souto-Maior, George Jackson de Moraes Rocha. **Validação de Metodologia para a Caracterização Química de Bagaço de Cana-de-açúcar**. Química Nova, Vol. 32, No.6, 1500-1503, 2009.

GRAFT DL, MADDURI KM, ESHOO M, WILSON CR (2003) **Identification and characterization of the CYP52 family of *Candida Tropicalis* ATCC 20336, important for the conversion of fatty acids and alkanes to alpha, omega-dicarboxylic acids**. Appl Environ Microbiol 69:5983-5891.

GRANSTRÖM, T.; LEISOLA, M. 2007. **Controlled transient changes reveal differences in metabolite production in two *Candida* yeasts**. Applied microbiology and Biotechnology. 58 (4): 511-516.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A.Z., Cellulase and Xylanase production by isolated Amazon Bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, Porto Alegre, p.213-218, agosto. 2002.

HIGUCHI, T. Degradative Pathways of Lignin Model Compounds. **In HIGUCHI, T. Biosynthesis and biodegradation of Wood Components**. London: Academic Press Inc. 1985. p.557-577.

HEIPIEPER, H. J.; WEBER, F. J.; SIKKEMA, J.KEWELO, H.; DE BONT, J. A. M. Mechanism of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends in Biotechnology**, v. 12, p. 409-615, 1994.

HYVÖNEN, L.; KOIVISTONEN, P. Food technological evaluation of xylitol. **Advances in Food Research**, v.28, p. 373-403, 1982.

IAL (Instituto Adolfo Lutz). **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 3 ed. São Paulo: IAL. 1985. 195 p.

IRANMAHNHOOB, J.; NADIM, F.; MONEMI, S. Optimization acid-hydrolysis: A critical step for production of ethanol from mixed Wood chips. **Biomass and bioengineering**, v.22, p.401-404, 2002.

KIM SY, OH DK, JUNG SR. 1999a. **Fermentation process for preparing xilitol using *Candida tropicalis***. US N. 5.998.181.

KIM SY, OH DK, JUNG SR. 2000. **Fermentation for production of xilitol using *Candida tropicalis***. Japan N. 2000-093188-A.

LARSSON, S.; QUINTANA-SÁINS, A.; REIMANN, A.; NILVERBRANT, N-O.; JÖNSSON, L. J. Influence of Lignocellulosic-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and biotechnology**, v.84-86, p.617-632, 2000.

LEE W-J, KOO B, KIM M-D. 2003. Cloning and characterization of the xy/1 gene encoding an NADH-preferring xilose reductase from *Candida parapsilosis*, and its functional expression in *Candida tropicalis*. **Applied and Environmental Microbiology** 69 (10): 6179-6188.

LIMA, L. H. A. & Berlinck, C. N. **Ciência Hoje**. Vol. 33 nº 195. p. 66-69. Julho de 2003.

LIMA, L. H. A. **Estudo Moleculares dos genes XYL1 e XYL2 de *Candida tropicalis* visando a produção de xilitol**. 162p. Tese (Doutorado). 2006. Universidade de Brasília. Brasília. DF.

MARTON, J. M.; FELIPE, M. G. A.. ALMEIDA E SILVA, J. B.. SILVA, S. S. Importance of Pretreating Sugar Cane Bagasse Hemicellulosi Hydrolysate with Activated Charcoal for Xylitol Production. In: **III BRAZILIAN MEETING ON CHEMISTRY OF FOODS AND BEVERAGES**, São Carlos, SP, 1-3 Dec., 2000. Anais.

MANZ, U., VANNINEN, E., VOIROL, F. Xylitol - it's properties and use as a sugar substitute in foods. In: **F. R. A. SYMPOSIUM ON SUGAR AND SUGAR REPLACEMENTS**, 10., London, 1973.

McMILLAN, J.D. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In: **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Productin**, p. 292-324, (eds) Himmel, M.F., Baker, J.O., Overend, R.P. American Chemical Society, Washington, 1994.

McCREADY, R.M.; McCOMB, E.A. **Extraction and determination of total pectic materials in fruits.** Analytical Chemistry. v. 24, n. 12, p. 1586-1588, 1952.

MELAJA, A. J.; HÄMÄLÄINEN, L. Process for making xylitol. **US Patent 4.008.285.** Dep. 18/06/75. Publ. 15/02/77

MENDONÇA, R.M.N. **Maturação, secagem e armazenamento de sementes e propagação vegetativa de jabuticabeiras (*Myrciaria* sp.).** 136p. Tese (doutorado). 2000. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. MG.

MICHEL, A. C. S. **Produção biotecnológica de xilitol e etanol a partir de hidrolisado de casca de soja.** 74p. Dissertação (mestrado). 2007. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS.

MORAIS, Elisângela de Jesus Cândido. **Estudo de viabilidade econômica da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada.** 157 p. Tese (Doutorado). 2008. Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena-SP.

MOREIRA, R. A. ; CRUZ, M. C. M. . **Fruticultura : Particularidades da jabuticaba.** Jornal Democrata, São José do Rio Pardo - SP, v. 1137, p. 6 - Segundo Caderno, 05 de março de 2011.

MUSSATO, Solange Inês, ROBERTO, Inês Conceição. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.*** vol. 38, n. 4, out./dez., 2002.

NIDETZKY B, BRUGGLER K, DRATZER R, MAYR P. 2003. Multiple forms of xilose reductase in *Candida intermedia*: comparison of their functional properties using quantitative structure-activity relationships, steady-state kinetic analysis, and pH studies. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 51: 7930-7935.

OLIVEIRA, A. L. et al. Caracterização tecnológica de jabuticabas “sabará” provenientes de diferentes regiões de cultivo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, São Paulo. V. 25, n. 3, p. 397-400, dez., 2003.

PALONEN, H. **Role of lignin in enzymatic hydrolysis of lignocellulose**. VTT: Espoo, 2004. 80 p.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition**. *Bioresource Technology*, v.74, p.25-23, 2000.

PANAGIOTOU,G. et al. **Fermentation performance and intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* cultivated on glucose-sylose mixture**. *Enzyme and Microbial Technology*, New York, v.36, p.100-106, 2005.

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, 1998^a.

PARAJÓ,J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. **Charcoal Adsorption of Wood Hydrolysate for Improving their fermentability: Influence of the Operational Conditions..** *Bioresource Technology*, v. 57. p. 179-185, 1998^a.

PITARELO, A. P. **Avaliação da susceptibilidade do bagaço e da palha d cana-de-açúcar à bioconversão via pré-tratamento a vapor e hidrólise enzimática**. 125p. Dissertação (mestrado). 2007. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. Paraná.

PEPPER, T., OLINGER, P. M. **Xylitol in sugar – free confections**. *Food technol.*, v.42, n.10, 1988.

RAMOS, L.P. **The Chemistry involved in the pretreatment of lignocellulosic materials**. *Quimica Nova*. V.26, p.863-871, 2003.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia vegetal**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SAHA, B.C.; HAYASHI, K. **Lignocellulose biodegradation**. New Orleans: American Chemical Society, 2004. 315p.

SAMPAIO, F. C. **Seleção de microrganismos para a conversão de xilose em xilitol**. Viçosa, M. G.: UFV, 2001. 71p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa .

SILVA, S. S.; QUESADA-CHANTO, A.; VITOLO, M. Up Stream Parametres Affecting the Cell Growth and Xylitol Production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Zeitschrift Naturforschung**, v. 52c, p. 359-363, 1997.

SJÖSTRÖM, E.; WESTERMARK, U. Chemical Composition of Wood and Pulps: Basic Constituents and Their Distribution. *In*: SJÖSTRÖM, E.; ALÉN, R. **Analytical Methods in Wood Chemistry**, Pulping and Papermaking. Berlin: Springer-Verlag, 1999.

STICKLEN, M.B. **Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol**. Nature Reviews Genetics, Londres, v.9, p. 433-443, 2008.

SUN, Y.; CHENG, J. **HYDROLYSIS of lignocellulosic materials for ethanol production: a review**. Bioresource Tecnology, Essex, v.83, p.1 – 11, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.
TAMANINI, C. & OLIVEIRA, M. C. Haully. **Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 25, n. 4, p. 315-330, out./dez. 2004a.

TAMANINI, C.; Oliveira, A.S.; Felipe, M. G. A.; Canettieri, E.V.; Cândido, E. J.; Haully, M.C.O. **Avaliação da casca de aveia para produção biotecnológica de xilitol**. Acta Scientiarum. Technology. Maringá, v. 26, no. 2, p. 117-125, 2004b.

TAKAMIZAWA K, UCHIDA S, HATSU M, SUZUKI T, KAWAI K (2000) **Development of a xylitol biosensor composed of xylitol dehydrogenase and diaphorase**. Can j Microbiol 46:350-357.

UHARI, M., KONTIOKARI, T., NIEMELA, M. **A Novel use of xylitol sugar in preventing acute otitis media**. *Pediatrics*, v.102, p.879-884, 1998.

VIEITES, ROGÉRIO LOPES; ÉRICA REGINA DAIUTO; MARIA ROSA DE MORAES; LEANDRO CAMARGO NEVES; Lídia Raquel de Carvalho. **Caracterização físico-química, bioquímica e funcional da jaboticaba armazenada sob diferentes temperaturas**. Rev. Bras.Frutic. vol.33 no.2 Jaboticabal June 2011

YABLOCHKOVA, E. N. et al. The activity of key enzymes in xilose-assimilating yeasts at different rates of oxygen transfer to the fermentation medium. Microbiology, Moscow, v. 73, n.2, p. 129-133, 2004.

WEST, T. P. Xylitol production by Candida species grown on a grass Hydrolysate. World J. Microbiol. Biotechnol. 25:913–916. 2009.

Apêndice

A1 – Composição do hidrolisado fermentado com 0,1g L⁻¹ de células da *C. guilliermondii*.

COMPOSTOS (g L ⁻¹)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)							
	0h	3h	6h	9h	12h	15h	18h	21h
CELOBIOSE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,753	2,330
GLICOSE	16,613	10,700	10,610	7,875	6,063	0,000	0,000	0,000
XILOSE	17,402	11,657	11,785	11,187	10,608	10,013	7,955	6,663
ARABINOSE	8,220	8,173	8,133	7,898	7,695	7,720	7,102	4,722
XILITOL	0,000	3,057	3,012	2,957	2,925	3,477	3,208	3,237
GLICEROL	0,585	0,525	0,568	0,710	1,052	1,677	1,825	2,087
ÁC. FORMICO	0,06	0,082	0,065	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
ÁC. ACÉTICO	0,84	0,735	0,750	1,318	1,333	3,100	3,407	3,850
ETANOL	0,602	0,112	0,308	1,090	2,415	6,688	8,287	9,732

A2 – Composição do hidrolisado fermentado com 0,2g/L de células da *C. guilliermondii*.

COMPOSTOS (g L ⁻¹)	TEMPO DE FERMENTAÇÃO (h)							
	0h	03h	06h	09h	12h	15h	18h	21h
CELOBIOSE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,388	0,697
GLICOSE	10,327	10,185	10,747	7,793	2,907	0,983	0,000	0,000
XILOSE	17,390	11,305	11,235	11,125	10,423	9,028	7,058	5,588
ARABINOSE	7,830	8,057	8,418	8,015	7,915	7,813	6,975	6,142
XILITOL	0	3,038	3,155	2,997	3,085	3,145	3,608	3,455
GLICEROL	0,505	0,555	0,618	0,795	1,248	1,812	2,280	2,300
ÁC. FORMICO	0,068	0,087	0,062	0,073	0,040	0,000	0,000	0,000
ÁC. ACÉTICO	0,720	0,772	0,770	1,202	1,795	1,892	3,543	2,540
ETANOL	0,512	0,367	3,490	1,402	3,74	6,373	8,143	9,040