

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COORDENAÇÃO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

JACKSON WILLIAN CARNEIRO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO CELULAR DE LEVEDURAS VISANDO A  
OBTENÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO  
2019

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
COORDENAÇÃO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA  
CURSO DE ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

JACKSON WILLIAN CARNEIRO DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO CELULAR DE LEVEDURAS VISANDO A  
OBTENÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado como requisito à obtenção do  
título de Bacharel em Engenharia de  
Bioprocessos e Biotecnologia, da  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Priscila Vaz de Arruda

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Karina Graziella  
Fiametti Colombo

TOLEDO  
2019

## TERMO DE APROVAÇÃO

### AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO CELULAR DE LEVEDURAS VISANDO A OBTENÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL

Por

**JACKSON WILLIAN CARNEIRO DE SOUZA**

Esse trabalho de conclusão de curso foi apresentado no dia vinte e cinco de novembro de dois mil e dezenove, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel, no Curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Toledo. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo relacionados.

Após deliberação, a banca Examinadora considerou o ***trabalho Aprovado***.

---

Prof. Dr<sup>a</sup>. Priscila Vaz de Arruda  
(Orientadora)

---

Dr<sup>a</sup>. Danielle Camargo  
(Membro – Universidade Tecnológica Federal do Paraná)

---

Prof. Dr. Luís Felipe Minozzo Figueiredo  
(Membro – Universidade Tecnológica Federal do Paraná)

**\*A versão assinada encontra-se arquivada na Coordenação da Especialização**

## RESUMO

O xilitol é uma substância edulcorante que vem sendo intensamente utilizada na alimentação, devido a sua alta capacidade de adoçar, bem como também vem sendo reportado seu uso no tratamento e prevenção de diabetes, uma vez que seu metabolismo é independente de insulina. A obtenção biotecnológica do xilitol pode ser realizada através da fermentação de pentoses, como a xilose, pela ação de leveduras, sendo um processo de baixo rendimento, o que vem despertando interesse nas pesquisas em métodos alternativos para melhorar sua produtividade. Neste sentido, a imobilização celular é uma técnica utilizada para estabilizar a célula e conseqüentemente melhorar produtividade do processo. Assim, o presente trabalho avaliou a influência da imobilização celular, utilizando fibra de coco e celulose como suportes, na produção biotecnológica de xilitol. Os suportes utilizados foram tratados com hidróxido de sódio, visando promover uma melhor eficiência de imobilização. Para as fermentações, utilizou-se o microrganismo *Candida tropicalis*, o qual a literatura reporta como um dos melhores produtores deste bioproduto. A imobilização celular foi realizada por adsorção, através da imersão do suporte a ser utilizado no meio rico em células. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, utilizando meio complexo constituído por xilose (50g/L), sulfato de amônio (2,0 g/L), extrato de levedura (3,0 g/L), cloreto de cálcio (0,1 g/L), com agitação de 200 rpm sob temperatura de 30°C por 36 horas e com concentração inicial de células de 1,0 g/L. De acordo com os resultados, o tratamento dos suportes permitiu uma maior eficiência de imobilização, uma vez que utilizando-se a fibra de coco foi possível observar 71% de eficiência, enquanto atingiu-se 45% no mesmo tipo de suporte *in natura*. A concentração máxima de xilitol utilizando células imobilizadas não apresentou grandes variações em função dos suportes utilizados, entretanto, quando se empregou suportes tratados ou *in natura* observou-se que o fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) foi de 0,49 g/g, quando da utilização de fibra de coco *in natura* e de 0,72 g/g na fermentação com fibra de coco tratada. Nesta última condição, obteve-se a maior eficiência de conversão (78,6%), conseqüentemente máxima produtividade volumétrica ( $Q_P$ ) (0,94 g/g L). Os resultados encontrados neste estudo demonstram o potencial de utilização da imobilização celular afim de otimizar a produção biotecnológica de xilitol.

**Palavras-chave:** imobilização celular, levedura, xilitol, xilose, biotecnologia.

## ABSTRACT

Xylitol is a sweetener that has been intensely used in the diet due to its high sweetening capacity, as well as its use in the treatment and prevention of diabetes, since its metabolism is insulin-independent. The biotechnological xylitol production can be produced through the fermentation of pentoses, such as xylose, by the action of yeasts. This process has low yield, which has been promoting the interest in the research with alternative methods to enhanced its productivity. In this sense, cellular immobilization is a technique used to stabilize the cell and consequently improve the productivity of the process. Thus, the present study evaluated the influence of cell immobilization, using coconut and cellulose fiber as supports, in the biotechnological production of xylitol. The supports used were treated with sodium hydroxide, aiming promote better immobilization efficiency. For the fermentations, the *Candida tropicalis* microorganism was used, which the literature reports as one of the best producers of this bioproduct. Cell immobilization was performed by adsorption, through support immersion in a rich cell medium. The experiments were performed in 125 mL Erlenmeyer flasks, using complex medium composed of xylose (50g/L), ammonium sulfate (2,0 g/L), yeast extract (3,0 g/L), calcium chloride (0,1 g/L), with agitation of 200 rpm at a temperature of 30°C for 36 hours and with an initial cells concentrations of 1,0 g/L. According to the results, the treatment of the supports allowed a higher immobilization efficiency, since using the coconut fiber it was possible to observe 71% efficiency, while 45% was achieved in the same type of *in natura* support. The maximum concentration of xylitol using immobilized cells did not show great variations as a function of the supports used, however, when using treated or *in natura* supports it was observed that the conversion factor from substrate to product ( $Y_{P/S}$ ) was 0.49 g/g, when using *in natura* coconut fiber and 0.72 g/g in fermentation with treated coconut fiber. In this last condition, the highest conversion efficiency was obtained (78.6%), consequently maximum volumetric productivity ( $Q_P$ ) (0.94 g/g L). The results of this study demonstrated the potential use of cell immobilization in order to improvement the biotechnological xylitol production.

**Keywords:** cellular immobilization, yeast, xylitol, xylose, biotechnology.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Modelo molecular de xilitol.....	10
Figura 2 - Possíveis vias para obtenção do xilitol.....	13
Figura 3 - Micrografias eletrônicas de varredura.....	19
Figura 4 - Estrutura molecular da celulose.....	20
Figura 5 - Colônias de <i>Candida</i> spp. em ágar batata dextrose após 48 h de incubação a 35°C.....	23
Figura 6 - Prova de assimilação de carboidratos de <i>Candida tropicalis</i> .....	24
Figura 7 - Efeito da imobilização celular sobre o consumo de xilose.....	33
Figura 8 - Efeito da imobilização celular sobre a concentração celular de <i>C. tropicalis</i> .....	36
Figura 9 - Efeito da imobilização celular sobre a concentração de glicose.....	37
Figura 10 - Efeito da imobilização celular sobre a formação de xilitol.....	38
Figura 11 - Imobilização celular em diferentes tratamentos.....	42

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do xilitol. ....	11
Tabela 2 - Aplicações biotecnológicas da imobilização celular. ....	15
Tabela 3 - Materiais lignocelulósicos e sua aplicação biotecnológica. ....	18
Tabela 4 - Consumo de D-xilose e formação de produto por várias leveduras. ....	21
Tabela 5 - Produção de xilitol em processos descontínuos com leveduras imobilizadas. .....	22
Tabela 6 - Efeito da relação xilose:glicose nos parâmetros fermentativos após 48 horas de fermentação. ....	25
Tabela 7 - Velocidade de consumo de xilose durante a fermentação por <i>C. tropicalis</i> em função do suporte para imobilização. ....	34
Tabela 8 - Parâmetros fermentativos de obtenção de xilitol por células imobilizadas em diferentes suportes e com diferentes tratamentos.....	39
Tabela 9 - Resultados obtidos no presente trabalho e dados da literatura sobre produção de xilitol. ....	40
Tabela 10 - Eficiência de imobilização em diferentes tratamentos.....	43

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	9
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	10
<b>2.1</b>	<b>Xilitol</b>	10
2.1.1	Propriedades e aplicações	10
2.1.2	Produção de xilitol – Via química	12
2.1.3	Produção de xilitol – Via biotecnológica	13
<b>2.2</b>	<b>Imobilização celular</b>	15
2.2.1	Vantagens do uso de células imobilizadas	16
2.2.2	Métodos de imobilização celular	16
2.2.3	Efeitos fisiológicos da imobilização celular	17
2.2.4	Mecanismo de imobilização por adsorção	17
<b>2.3</b>	<b>Suporte para imobilização</b>	18
2.3.1	Materiais lignocelulósicos	18
2.3.1.1	Fibra de coco	18
2.3.1.2	Celulose	19
2.3.2	Tratamento para o suporte	20
<b>2.4</b>	<b>Bioconversão de xilose em xilitol</b>	21
2.4.1	<i>Candida tropicalis</i>	23
2.4.2	Condições de cultivo	24
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	26
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	26
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	26
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	27
<b>4.1</b>	<b>Matéria prima e preparo dos suportes para imobilização</b>	27
4.1.1	Fibra de coco	27
4.1.2	Celulose	27
4.1.3	Tratamento dos suportes e experimentos controle	27
<b>4.2</b>	<b>Microrganismo e preparo do inóculo</b>	28
<b>4.3</b>	<b>Imobilização celular</b>	28
<b>4.4</b>	<b>Meio, condições de fermentação e imobilização celular</b>	29
<b>4.5</b>	<b>Métodos analíticos</b>	29
4.5.1	Determinação do pH	29
4.5.2	Determinação da concentração celular	29



4.5.3	Determinação de células livres.....	29
4.5.4	Determinação de células imobilizadas.....	29
4.5.5	Determinação da concentração de açúcares .....	30
4.5.6	Cálculo dos parâmetros fermentativos e de imobilização .....	30
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1</b>	<b>Consumo de xilose por <i>C. tropicalis</i> em função dos diferentes suportes utilizados para imobilização .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2</b>	<b>Crescimento celular de <i>C. tropicalis</i> e consumo de glicose em função dos diferentes suportes utilizados para imobilização.....</b>	<b>35</b>
<b>5.3</b>	<b>Avaliação dos parâmetros fermentativos e formação de xilitol por <i>C. tropicalis</i> em função dos diferentes suportes utilizados para imobilização .....</b>	<b>38</b>
<b>5.4</b>	<b>Avaliação da capacidade de imobilização celular do suporte sob diferentes tratamentos.....</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Diversos produtos têm sido utilizados ao longo dos tempos para adoçar os alimentos, como o mel ou o açúcar. Hoje em dia, existe também uma série de novos edulcorantes que constituem uma alternativa ao açúcar, dentre estes destaca-se o xilitol. Este é um açúcar que apresenta diversas propriedades peculiares, como poder adoçante semelhante à sacarose, não calórico, baixo índice glicêmico, o que permite sua indicação na dieta de diabéticos e obesos, destacando-se também a sua utilização no tratamento e prevenção da osteoporose.

O processo de obtenção do xilitol é realizado através da catálise química da xilose, a qual apresenta alto custo devido às diversas etapas de purificação desta pentose durante a reação, ocasionada principalmente pela remoção de um catalisador, bem como pela purificação do produto. Diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas nesta área, principalmente aquelas que visam o aproveitamento de resíduos agroindustriais, constituídos de biomassa lignocelulósica, ricas em xilose. Pentose esta que pode ser extraída e posteriormente empregada como fonte de carbono para microrganismos capazes de assimilá-la.

Tão importante quanto à escolha do microrganismo adequado para a fermentação é a escolha da forma de condução de um bioprocessamento. Neste sentido, o estado morfológico do microrganismo durante o bioprocessamento influencia diretamente a obtenção do produto de interesse, uma das alternativas para “estabilizar” a estrutura morfológica destes, a imobilização celular, que consiste no aprisionamento físico ou químico das células. Isso propicia diversas aplicações, dentre elas pode-se citar a possibilidade em se inocular um elevado número de células, o que geralmente acarreta em elevadas conversões do processo. Por exemplo, a retenção física, permite a manutenção da atividade catalítica de forma que as células possam ser reutilizadas. A utilização dessa técnica proporciona uma maior concentração de biomassa, acarretando assim no aumento da produtividade. Neste sentido, diferentes métodos de imobilização celular têm sido empregados para a obtenção de sistemas eficientes para utilização em processos fermentativos industriais, na tentativa de melhorar sua viabilidade.

Diversas vantagens podem ser atribuídas ao uso de células imobilizadas, dentre elas destacam-se: maior resistência mecânica, tolerância maior ao substrato, ao produto e substâncias inibitórias, relativa facilidade no processamento e purificação

do produto de interesse. Entre todas as vantagens, a facilidade de separação e reutilização das células em sistema de bateladas repetidas é uma estratégia atraente para a produção em larga escala, visando a redução do custo final do produto. Assim, a reutilização das células imobilizadas pode melhorar o rendimento da produção de xilitol e se mostra como uma excelente técnica para melhorar a produção deste açúcar. Porém, o sucesso da imobilização celular depende muito da escolha do suporte a ser utilizado.

Neste sentido, a proposta deste projeto foi avaliar dois suportes naturais (fibra de coco e celulose) tratados ou não, visando a imobilização da levedura *Candida tropicalis* para a obtenção biotecnológica de xilitol.

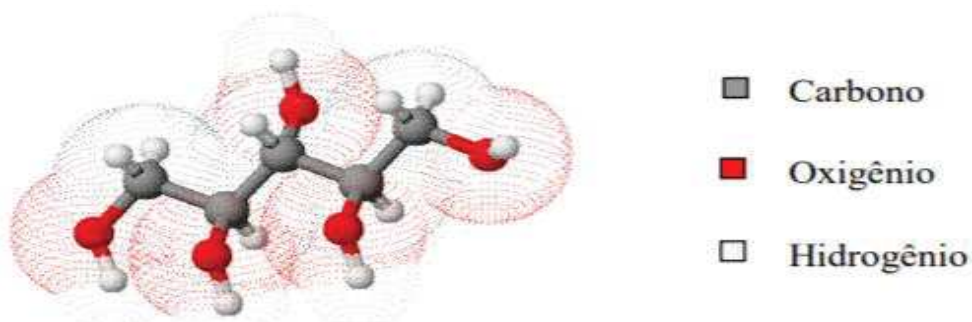
## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Xilitol

#### 2.1.1 Propriedades e aplicações

O xilitol (Figura 1) é um açúcar natural com uma grande variedade de aplicações industriais (MUSSATO e ROBERTO, 2002), é caracterizado como um álcool pentahidroxilado ( $C_5H_{12}O_5$ ) com massa molar de 152,15 g/mol, possui um poder adoçante semelhante ao da sacarose, além de valor calórico reduzido (HYVÖNEN, KOIVISTOINEN e VOIROL, 1982). As suas aplicações tem um grande leque nas indústrias farmacêutica e alimentícia (MUSSATO e ROBERTO, 2002), estas aplicações podem ser evidenciadas observando as suas propriedades físico-químicas (Tabela 1).

Figura 1 - Modelo molecular de xilitol.



Fonte: (MARTON, 2002).

O xilitol também é conhecido por ter cariogenicidade nula, uma vez que não é utilizado pelos microrganismos da microbiota bucal, evitando assim a formação de ácidos que atacam o esmalte dos dentes (BÄR, 1988).

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do xilitol.

Fórmula química	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>
Massa Molar	152,15 g/mol
Cor	Branca
Sabor	Doce
Odor	Nenhum
Aparência	Pó cristalino
Ponto de fusão	92-96°C
Ponto de ebulição	216°C
pH (solução aquosa a 10%)	5-7
Viscosidade a 20°C	A 10%: 1,23 cP; a 60%: 20,63 cP
Solubilidade a 30°C	68 g de xilitol /100 g de solução, igual à da sacarose (abaixo desta temperatura o xilitol é menos solúvel, com o aumento da temperatura o xilitol se torna significativamente mais solúvel que a sacarose)
Densidade	A 10%: 1,03 g m/L; a 60%: 1,23 g m/L
Calor de dissolução	-34,8 cal/g (“efeito refrescante”)
Poder adoçante	Igual ao da sacarose, superior ao sorbitol e manitol
Valor calórico	4,06 Kcal/g
Índice de refração a 25°C	1,347 (solução aquosa a 10%)
Estabilidade	Estável a 120°C (não carameliza)
Higroscopicidade	Em umidade relativa alta, o xilitol é mais higroscópico que a sacarose, mas menos que o sorbitol

Fonte: Baseado em (HYVÖNEN, KOIVISTOINEN e VOIROL, 1982).

Uma importante característica do xilitol está relacionado à área farmacêutica, uma vez que seu metabolismo é independente de insulina, o que o possibilita ser um substituto de outros açúcares, podendo ser empregado na dieta de pessoas portadoras de diabetes (PEPPER e OLINGER, 1989). Além disso, também pode ser

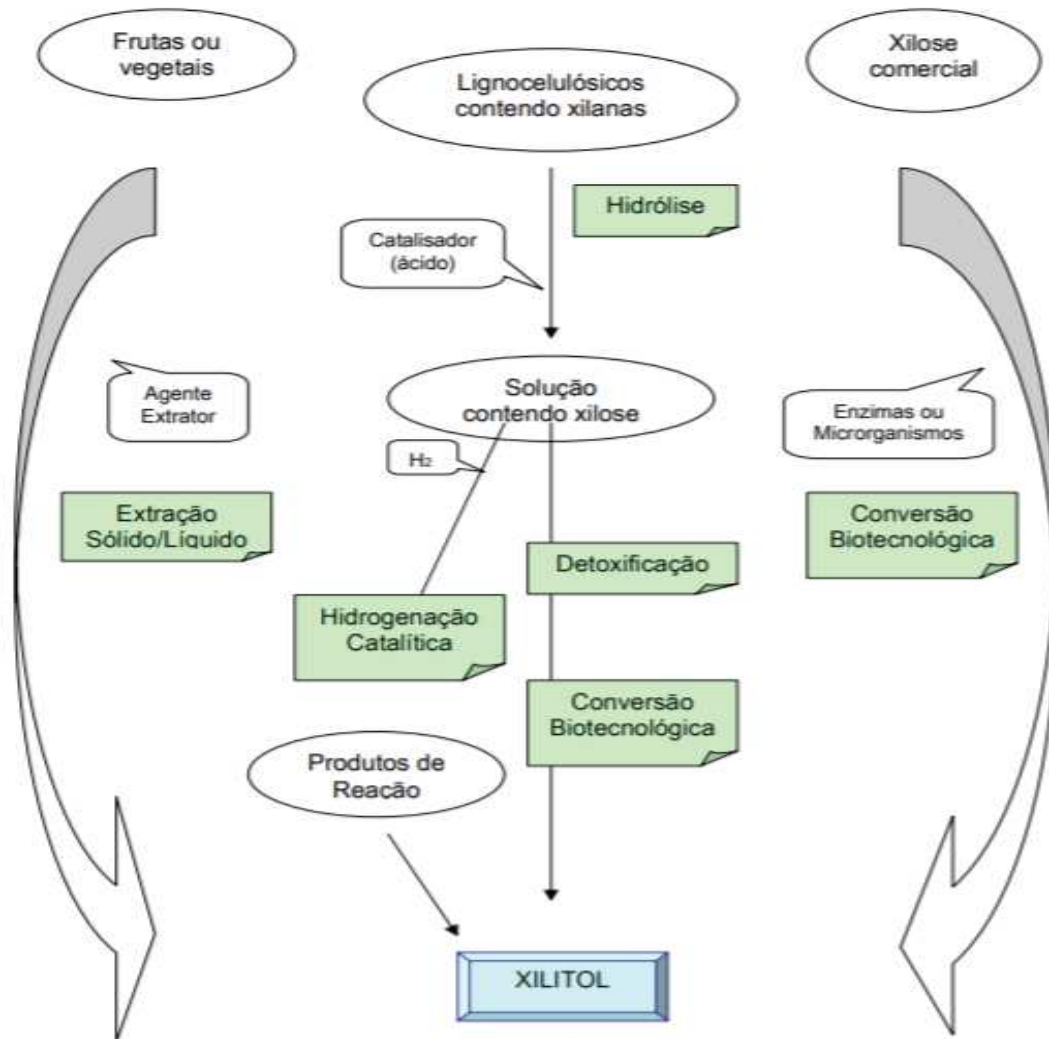
empregado no tratamento de outras desordens metabólicas, como por exemplo na dieta de obesos, uma vez que este exerce uma pequena contribuição na formação de tecidos gordurosos quando comparado a outros açúcares (YLIKAHRI, 1979). De acordo com estudos realizados em ratos, a ingestão de xilitol proporcionou a redução do ganho de peso e do consumo de alimento, bem como diminuiu os níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol nos animais avaliados (ELLWOOD *et al.*, 1999).

Este açúcar, pode ser encontrado em muitas frutas, vegetais e cogumelos, porém, em quantidades inferiores a 900 mg/100 g, o que torna sua extração um processo antieconômico e impraticável (PARAJÓ, DOMÍNGUEZ e DOMÍNGUEZ, 1998b). Desta forma, uma alternativa à extração do xilitol diretamente dessas fontes naturais é a sua obtenção pela hidrogenação da D-xilose presente na matéria vegetal, seja por via química (seção 2.1.2) ou biotecnológica (seção 2.1.3).

#### 2.1.2 Produção de xilitol – Via química

A via química de produção é realizada através da redução catalítica de xilose obtida por meio de hidrólise de materiais lignocelulósicos, em presença do catalisador níquel (HYVÖNEN, KOIVISTOINEN e VOIROL, 1982). O rendimento do processo, bem como a qualidade do xilitol, estão diretamente relacionados a pureza inicial da xilose, uma vez que a presença de impurezas interfere no processo da catálise (NOLLEAU *et al.*, 1993). Ainda segundo os mesmos autores, a produção iniciou-se na Finlândia pela Finish Sugar Co. Ltd. em Helsinki, com capacidade de produzir 3000 ton/ano. Como o processo requer elevada pressão e temperatura, além de várias etapas de purificação para a remoção do níquel utilizado como catalisador, o custo do processo torna-se elevado, o que estimulou estudos sobre outras maneiras de obtenção do xilitol, sendo a via microbiológica considerada uma forma alternativa (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998). A Figura 2 ilustra as possíveis vias para obtenção deste açúcar-álcool.

Figura 2 - Possíveis vias para obtenção do xilitol.



Fonte: adaptado de (PARAJÓ, DOMÍNGUEZ e DOMÍNGUEZ, 1998)

### 2.1.3 Produção de xilitol – Via biotecnológica

A via biotecnológica é uma excelente via alternativa para a produção de xilitol, por não requerer uma solução inicial de xilose pura, além do fato das condições do processo de temperatura e pressão serem mais brandas (SILVA *et al.*, 1997).

Os microrganismos mais utilizados nesse processo são as leveduras, cujo cultivo pode ser realizado em hidrolisados obtidos de diferentes matérias-primas, tais como palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, cavacos de eucalipto, casca de maçã, palha de cana, casca de aveia e fibra de sisal, por exemplo (ALVES *et al.*, 1998; CANNETIERI *et al.*, 2001; MUSSATTO, ROBERTO, 2001).

As leveduras na presença de xilose, são capazes de induzir a enzima xilose redutase (XR) (E.C.1.1.1.2.1) e catalisar a redução de xilose em xilitol na presença dos cofatores NAD(P)H e NADH (ONISHI e SUZUKI, 1969), o que possibilita a obtenção deste poli álcool através do processo biotecnológico.

De acordo com a literatura, as condições de cultivo influenciam diretamente na bioconversão de xilose em xilitol, sendo a presença de compostos inibidores no hidrolisado, como os fenólicos e ácido acético, um dos principais fatores responsáveis pela diminuição da produtividade do bioprocessamento. Outro fator, refere-se à concentração de oxigênio dissolvido e a concentração celular no meio, os quais são de suma importância, uma vez que são os reguladores desta bioconversão (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998). Assim, em condições aeróbicas, ocorre o desvio no metabolismo microbiano para a reprodução celular, diminuindo assim a produção de xilitol. Por outro lado, em condições de oxigênio controladas, a quantidade de cofator reduzido necessário à ação da enzima xilitol desidrogenase é limitada, assim há acúmulo de xilitol (KIM, KIM e OH, 1997).

De acordo com a literatura, a utilização de fermentações em sistema de batelada repetida, em que se empregam a reutilização do microrganismo, pode gerar uma adaptação do mesmo, melhorando assim a eficiência de conversão e, logicamente, a produtividade do processo (PARAJÓ, DOMÍNGUEZ e DOMÍNGUEZ, 1998).

Há muitos estudos sobre a bioconversão de xilose em xilitol por leveduras, a partir de hidrolisados oriundos da fração hemicelulósica da biomassa vegetal. Com vistas à otimização desse processo, diversos pesquisadores tentam estabelecer as melhores condições de cultivo das leveduras, avaliando os efeitos das seguintes variáveis: pH (ROBERTO *et al.*, 1996; FELIPE *et al.*, 1999; CANNETIERI *et al.*, 2001), temperatura (BARBOSA *et al.*, 1988; CONVERTI 2001), oxigênio dissolvido (ROBERTO *et al.*, 1999; MORITA, SILVA, 2000), concentração inicial de substrato (FELIPE *et al.*, 1993; SILVA, ROBERTO, 1999), fonte de nitrogênio (BARBOSA *et al.*, 1988; SILVA *et al.*, 1994; ROBERTO *et al.*, 1996), concentração celular inicial (DOMINGUEZ *et al.*, 1997; FELIPE *et al.*, 1997), presença de outros açúcares (FELIPE *et al.*, 1993; SILVA *et al.*, 1996) e presença de inibidores (ROBERTO *et al.*, 1991; ALVES *et al.*, 1998; PALMQVIST, HAHNHÄGERDAL, 2000; MUSSATTO, ROBERTO, 2001). Mais recentemente, um estudo avaliando a ampliação de escala

da produção biotecnológica de xilitol a partir da fração hemicelulósica de xilitol foi publicado (ARRUDA *et al.*, 2017).

Neste sentido, diferentes estratégias tem sido avaliadas na tentativa de se aumentar a produtividade deste açúcar que vem se destacando como *building block*, entre as já apresentadas, destaca-se a imobilização celular, que permite uma alta concentração de células no meio de cultivo, além de reduzir os custos do processo de produção, por possibilitar a reutilização de catalisadores biológicos (OGBONNA, TOMIYAMA e TANAKA, 1996; RAMAKRISHNA e PRAKASHAM, 1999).

## 2.2 Imobilização celular

A imobilização celular é definida como o confinamento ou a localização de células em uma determinada região do espaço onde as mesmas exibem propriedades que se diferenciam do seu redor (WEBB e ATKINSON, 1992). De um modo geral a imobilização celular consiste em “aprisionar” o microrganismo em um determinado suporte.

A imobilização celular vem ganhando importância em diversas áreas nos últimos anos podendo ser aplicada a quase todos os tipos celulares: fungos, bactérias, células vegetais e animais, conforme ilustra a Tabela 2.

Tabela 2 – Aplicações biotecnológicas da imobilização celular.

<b>Aplicação</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Material imobilizante</b>	<b>Referência</b>
Produção de ácidos orgânicos	<i>Rhizopus oryzae</i>	Criogel de PVA	MASLOVA <i>et al.</i> , 2019
Produção de bioetanol	<i>Saccharomyces diaststicus</i>	<i>Mucuna urens</i>	ADELABU <i>et al.</i> , 2019
Tratamento de efluentes	Microalgas	Alginato de cálcio	KATAM; BHATTACHAR YYA, 2019
Produção de lipase	<i>Bacillus subtilis</i>	Alginato de cálcio	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2019

Fonte: adaptado de (KOVALESKI, 2019).



A técnica de imobilização é efetiva no aumento da densidade celular, proteção do organismo imobilizado durante o armazenamento e processamento, melhora a resistência à contaminação além de, manter a estabilidade química e física das células (TRABELSI *et al.*, 2014).

### 2.2.1 Vantagens do uso de células imobilizadas

Em processos biotecnológicos a imobilização celular tem-se mostrado uma técnica evolutiva, com diversos estudos nos últimos anos. Esta consiste em um método para melhorar a produtividade e a eficiência dos processos fermentativos, pois permite a operação de fermentadores em condições de alta densidade celular (OGBONNA, TOMIYAMA e TANAKA, 1996; KOVALESKI, 2019), além de evitar o *washout* de células durante operações com elevadas vazões de alimentação e possibilitar a reutilização celular (BATISTA, 2005; MILESSI, 2012). Ademais, segundo Tanaka e Nakajima (1990), destacam-se as seguintes vantagens observadas:

- Controle da reprodução das células;
- Redução da fase de adaptação (fase lag);
- Maior porcentagem de conversão;
- Possibilidade de operar em sistema contínuo com maior controle sobre a permanência das células dentro do reator;
- Menor tempo reacional;
- Facilidade da separação do meio reacional.

### 2.2.2 Métodos de imobilização celular

As técnicas de imobilização celular podem ser classificadas em naturais, quando incluem a formação de biofilmes e a adesão/adsorção do microrganismo em suportes sintéticos ou naturais; ou artificiais quando ocorre a encapsulação em matrizes como alginato de cálcio ou uso de agentes ligantes (COVIZZI *et al.*, 2007).

A tendência natural dos microrganismos a se aderirem sobre superfícies sólidas é a base da imobilização por adsorção. O suporte pode ser de natureza orgânica ou inorgânica, onde o suporte é submetido às células em suspensão aquosa sob baixa agitação (WENDHAUSEN, 1998).

### 2.2.3 Efeitos fisiológicos da imobilização celular

A imobilização interfere no metabolismo da água e na suplementação de oxigênio no microambiente das células imobilizadas, e também na maior concentração de nutriente na região das células (MATTIASSON e HAHN-HAGERDAL, 1982; OLIVEIRA, BASTOS e DE LA TORRE, 2019). Pode-se dizer de uma maneira geral que as células imobilizadas em um determinado suporte se tornam mais estáveis, assim diminui a influência exercida pelo meio externo (WENDHAUSEN, 1998).

### 2.2.4 Mecanismo de imobilização por adsorção

O mecanismo de adesão das células em suporte sólido ocorre basicamente devido a atração eletrostática, área superficial do suporte e metabólitos de fixação produzidos pela célula (VERBELEN *et al.*, 2006).

O método de imobilização por meio de ligação a suporte sólido é considerado simples e barato. Não requer a ativação do suporte e possibilita a regeneração da matriz utilizada. Esse método envolve a adesão celular ao suporte de imobilização por meio de ligações iônicas ou covalentes (MILESSI, 2012; CORTEZ *et al.*, 2017).

A atração eletrostática está relacionada tanto ao suporte quanto à superfície celular e desempenha um importante papel na interação suporte/célula. Esta atração desenvolve uma interação de longo alcance, indispensável para a aproximação de ambos (VERBELEN *et al.*, 2006).

Estudos com microscopia eletrônica sobre o material adsorvido, demonstraram que a forma de adsorção dos microrganismos inclui adesão por secreção celular de substância aderentes (FURUSAKI e SEKI, 1992).

A adsorção de microrganismos por sólidos de baixa e alta energia livre superficial, demonstram que esse tipo de interação está diretamente relacionado com a quantidade e a força de adesão das células adsorvidas (BATISTA, 2005; CORTEZ, 2010).

## 2.3 Suporte para imobilização

### 2.3.1 Materiais lignocelulósicos

Os materiais lignocelulósicos são compostos de maneira geral por celulose, hemicelulose, lignina, extrativos, cinzas entre outros. Celulose e hemicelulose representam cerca de 70% da biomassa total, e são compostos formados por polímeros de monômeros com alto potencial em processos fermentativos (LIMAYEM e RICKE, 2012; PEREIRA, 2019).

Estes materiais correspondem à maior fonte de compostos orgânicos da biosfera, apresentam baixo custo e grande potencial de utilização em processos fermentativos (ZHAO e XIA, 2010). Por não serem aproveitados comercialmente, podem resultar em impacto ambiental, o que impulsiona sua utilização para otimização de produtos de interesse social (CORTEZ, 2010), como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 - Materiais lignocelulósicos e sua aplicação biotecnológica.

<b>Material</b>	<b>Célula imobilizada</b>	<b>Produto</b>	<b>Referência</b>
<b>Bucha vegetal</b>	<i>Candida guilliermondii</i>	Xilitol	(COELHO, 2007)
<b>Bagaço de caju</b>	<i>Candida tropicalis</i>	Biotransformação de fenol	(SILVA, 2017)
<b>Fibra de coco</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol	(SANTOS, 2008)
<b>Colmos de Bambu</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol	(SANTOS, 2008)

Fonte: autoria própria (2019).

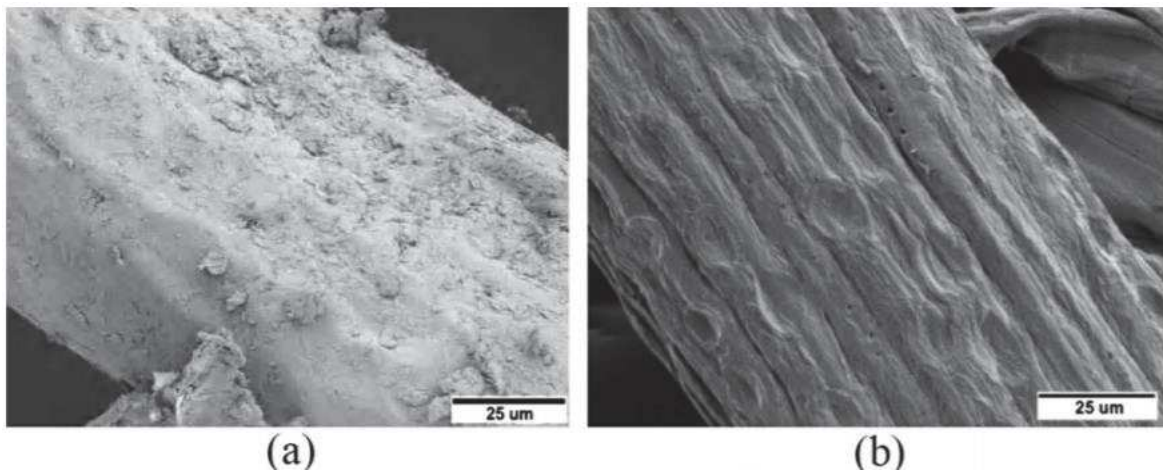
#### 2.3.1.1 Fibra de coco

A fibra de coco é um material lignocelulósico com potencial para ser utilizada como suporte para imobilização por possuir teores de lignina e celulose na faixa de 38 a 51,3% e 35 a 40%, respectivamente (VAN DAM *et al.*, 2004); além de metais em sua superfície e alta resistência mecânica (JÚSTIZ-SMITH, VIRGO e BUCHANAN, 2008). Características estas que possibilitam a utilização deste material para suportar células em processos biotecnológicos. De acordo com a literatura, a existência de uma

superfície hidrofílica/hidrofóbica, também é de fundamental importância no processo de imobilização celular (BRÍGIDA, 2010).

Rosa *et al.* (2010) avaliaram um tratamento térmico da fibra de coco e verificaram que este propiciou uma melhor adsorção celular devido a alteração na sua superfície (Figura 3). Segundo estes autores, tal comportamento pode ser explicado devido a um aumento da superfície livre para adsorção celular do material, o qual resultou em melhorias entre 10 a 20% dependendo da consistência do material utilizado.

Figura 3 - Micrografias eletrônicas de varredura.



Legenda: (a) fibra de *in natura*, (b) fibra de coco submetida a tratamento.

Fonte: (ROSA *et al.*, 2010).

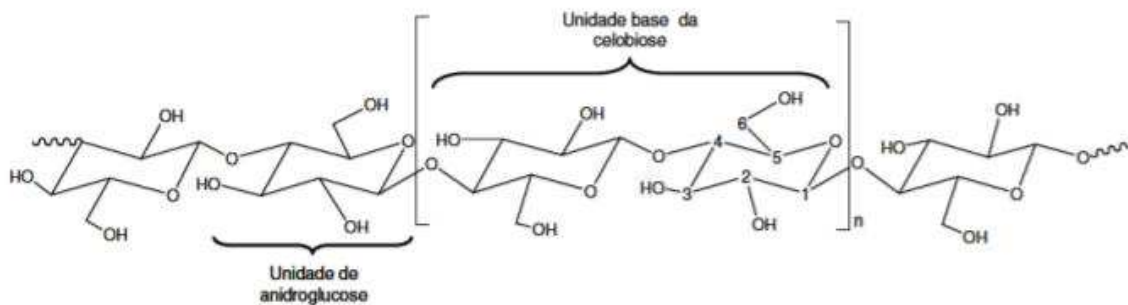
Só no ano de 2009, 1.676.222 frutos de coqueiro foram produzidos no Brasil (IBGE, 2009), o que representa, aproximadamente, um total de 2,5 milhões de toneladas de casca de coco gerados. Tal abundância e o baixo custo são outros fatores que impulsionam o uso deste material como suporte para imobilização celular (BRÍGIDA, 2010; SANTOS, MARTINEZ e JUIZ, 2019).

### 2.3.1.2 Celulose

A celulose é o componente majoritário da parede celular das fibras vegetais, no caso da madeira, esta representa cerca de 40-50% de sua matéria seca (SJÖSTRÖM, 1993; GILBERT e KADLA, 1998). É a matéria prima mais abundante no planeta, estima-se que haja aproximadamente  $7,5 \times 10^{10}$  toneladas dessa biomassa no mundo

(JIA *et al.*, 2014). Trata-se de um homopolímero linear, constituído por dois anéis de anidroglicose unidos por ligações  $\beta$ -1,4-D-glicosídicas (Figura 4) (KLEMM *et al.*, 1998). As ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila e o oxigênio dos anéis adjacentes das moléculas estabilizam a ligação estabilizam as mesmas, resultando assim em uma conformação linear das moléculas (MOON *et al.*, 2011).

Figura 4 - Estrutura molecular da celulose.



Fonte: (KLEMM *et al.*, 1998).

O Brasil é o quarto maior produtor de celulose do mundo, produziu aproximadamente 14,7 milhões de toneladas no ano de 2018, sendo uma área florestal certificada para exploração de 3,7 milhões de hectares (VERACEL, 2019).

A estrutura da celulosa à confere as seguintes propriedades características: hidrofiliçidade, quiralidade, degradabilidade e ampla variação química iniciada pela alta reatividade dos grupos hidroxila (OH) (KLEMM *et al.*, 2005), assim possibilitando pela interação química a adsorção de componentes a sua estrutura.

### 2.3.2 Tratamento para o suporte

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

O tratamento com soluções alcalinas, como hidróxido de sódio, remove parte da lignina e hemicelulose causando modificações na estrutura cristalina da celulose, promovendo assim o inchaço das fibras, o que aumenta a área de superfície do material (BISARIA, 1998; ADELABU *et al.*, 2019). O mecanismo mais provável ocorre

devido a saponificação das ligações do tipo éster intermoleculares entre a fração hemicelulósica e outros componentes (SUN e CHENG, 2002).

Outro tratamento, refere-se ao uso de vapor em temperaturas brandas por um período de tempo maior, o que propicia uma hidrólise parcial da hemicelulose e aumenta o tamanho dos poros do material lignocelulósico (MOSIER *et al.*, 2005). Diferentemente do processo de explosão de vapor, no qual se emprega maior temperatura em curto período de tempo, o que acarreta na liberação de açúcares, além de compostos inibidores. No caso do tratamento com vapor em temperaturas brandas, se o processo for muito brando, corre-se o risco de não se realizar as alterações suficientes no material (SENDELIUS, 2005).

## 2.4 Bioconversão de xilose em xilitol

Segundo trabalho de Barbosa *et al.* (1988) no qual foi feito um *screening* de microrganismos com potencial para produção de xilitol, a levedura *Candida tropicalis* foi a que apresentou uma melhor conversão de xilose no produto de interesse dentre todas as leveduras avaliadas, conforme é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Consumo de D-xilose e formação de produto por várias leveduras.

Leveduras	% Xilose consumida		[Xilitol] (g/L)		Etanol (g/L)		Massa de células (g/L)	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
<b><i>C. guilliermondii</i></b>								
FT-20037	95	100	13	16	0,75	-	6,0	10
IZ-1231	69	100	9,3	12	0,21	-	4,9	13
IZ-1322	61	100	8,3	11	-	-	4,5	12
<b><i>C. tropicalis</i></b>								
1004	95	100	15	17	1,1	-	5,9	9,2
IZ-1824	80	100	15	15	1,5	-	5,4	11
53-51	80	100	13	13	1,2	-	6,8	12
<b><i>C. utilis</i></b>								
FTI-20039	44	57	-	1,9	-	-	7,2	7,9
74-64	70	100	7,8	9,7	4,8	4,1	5,0	6,6
EQ2	53	100	2,7	11	-	-	7,3	15
<b><i>H. anômala</i></b>								
IZ-1420	35	56	-	6,1	-	-	2,3	6,0
IZ-229	25	51	-	4,5	-	-	1,9	5,8
<b><i>K. marxianus</i></b>								
IZ-1821	46	94	6,1	5,0	0,6	3,1	3,7	9,4
145	44	97	3,0	1,2	0,6	3,0	3,8	11

Fonte: Baseado em (BARBOSA *et al.*, 1988).

Como pode ser observado nesta Tabela 4, a grande maioria dos microorganismos avaliados apresentaram a formação de subproduto (etanol) em pequenas quantidades, com exceção de *C. utilis*, a qual produziu cerca de 4,8 g/L deste subproduto. Se uma análise for feita no período de 48 horas durante a bioconversão de xilose em xilitol por *C. tropicalis*, observa-se uma produção de até 17 g/L de xilitol, 100% de consumo de substrato e ausência de etanol, o que evidencia o potencial desta levedura como produtora deste açúcar-álcool. Tizazu, Roy e Vijayanand, (2018) avaliaram a produção de xilitol por *C. tropicalis* durante 36 horas de fermentação e observaram um rendimento de 0,65 g/g, valor este superior ao encontrado para a maioria das leveduras imobilizadas, conforme pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 - Produção de xilitol em processos descontínuos com leveduras imobilizadas.

<b>Microrganismo</b>	<b>Fonte de Carbono</b>	<b>Imobilização</b>	<b>Resultados (Y<sub>P/S</sub>)</b>	<b>Referência</b>
<b><i>C. guilliermondii</i></b>	Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	Hidrogel baseado em álcool polivinílico (PVA)	0,53 g/g	(CUNHA, <i>et al.</i> , 2006)
<b><i>C. guilliermondii</i></b>	Hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar	Esferas de vidro poroso	0,44 g/g	(SANTOS <i>et al.</i> , 2005)
<b><i>C. parapsilosis</i></b>	Açúcar sintético	Células livres	0,38 g/g	(FURLAN e CASTRO, 2001)

Fonte: Baseado em (SILVA e CHANDEL, 2012).

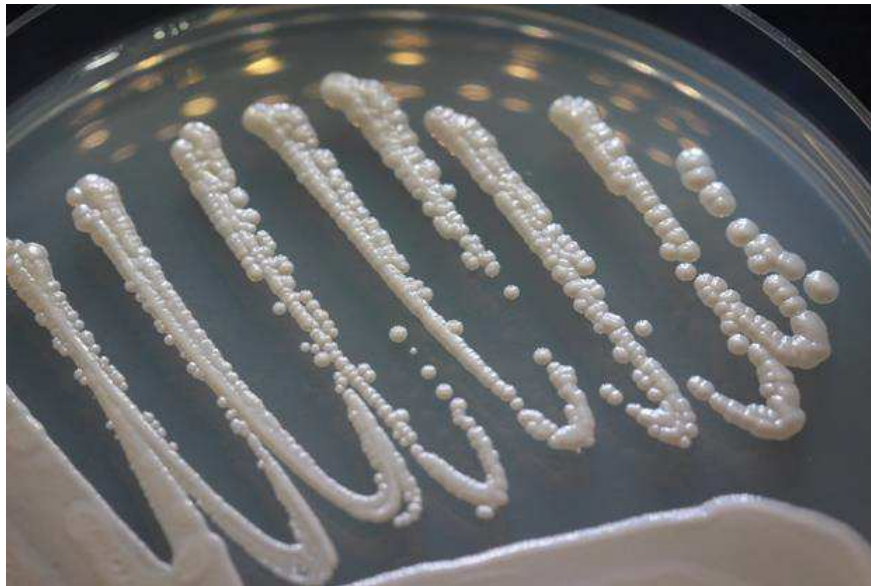
Destaca-se também a levedura *C. parapsilosis*, onde Zangirolami (1992) avaliou a eficiência de conversão desta levedura durante fermentação de 48 horas e encontrou fator de conversão de substrato em produto de 0,44 g/g.

### 2.4.1 *Candida tropicalis*

*Candida tropicalis*, primeiramente conhecida como *Oidium tropicale*, foi diferenciada das outras espécies de *Candida* spp., em 1910, pelo patologista e bacteriologista italiano Aldo Castellani (OLIVEIRA, 2013). Foram atribuídos diversos nomes a espécie, como *Monilia tropicalis*, *Candida vulgaris*, *Mycotorula dimorpha*, *Candida paratropicalis* e outros 58 sinônimos. Somente em 1923, o nome foi introduzido por Christine Marie Berkhout (NEGRI, SILVA e OLIVEIRA, 2012).

Espécies de *Candida* spp. apresentam aspectos únicos quando se trata da textura da colônia, micromorfologia e assimilação ou fermentação nos testes bioquímicos (EGGIMANN, GARBINO e PITTET, 2003). Macroscopicamente apresentam colônias lisas, úmidas ou secas na coloração branca ou creme (Figura 5) (HOOG e GUARRO, 1995).

Figura 5 - Colônias de *Candida* spp. em ágar batata dextrose após 48 h de incubação a 35°C.

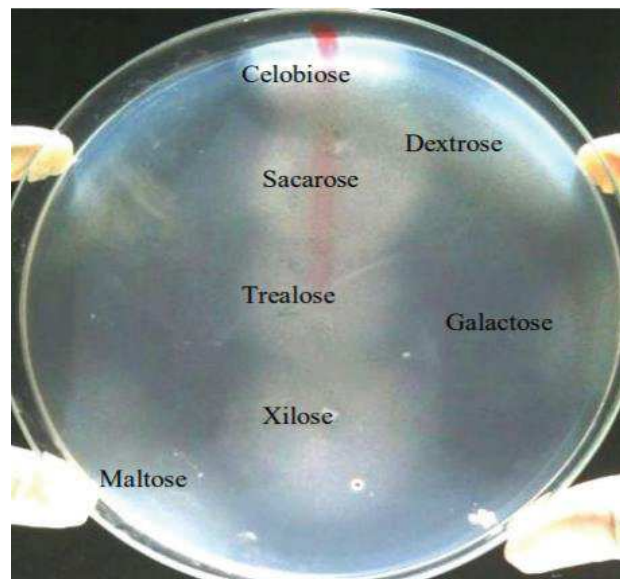


Fonte: (OLIVEIRA, 2013).

Em testes bioquímicos, esta levedura é capaz de fermentar e assimilar glicose, galactose, sacarose, maltose, xilose e trealose, dependendo da cepa utilizada, (Figura 6). Isolados de *Candida* spp. podem ainda não fermentar a sacarose e assimilar a celobiose, essas características são variáveis dependendo da cepa (HOOG e GUARRO, 1995; NEGRI, SILVA e OLIVEIRA, 2012).



Figura 6 - Prova de assimilação de carboidratos de *Candida tropicalis*.



Fonte: (OLIVEIRA, 2013).

É importante observar ainda na Figura 6, a turbidez do meio onde a levedura conseguiu assimilar os carboidratos em questão, neste caso xilose, trealose, sacarose e celobiose.

#### 2.4.2 Condições de cultivo

A concentração de substrato, de inóculo, pH, tempo de cultivo, temperatura, agitação, aeração, presença de microrganismos contaminantes são fatores que podem afetar o rendimento de uma fermentação, ou seja, a eficiência da conversão de açúcar no produto de interesse, geralmente há queda na eficiência do processo fermentativo ou na qualidade do produto final devido a contaminações (CARDOSO, 2006). No caso da produção biotecnológica de xilitol a partir de leveduras, há vários estudos que avaliaram as diferentes condições em função das diferentes linhagens microbianas. Rao *et al.* (2004) determinaram as condições otimizadas para cultivo de leveduras *Candida* sp., como temperatura entre 30 e 33°C, pH entre 4,5 - 5,5 e agitação de 200 rpm. Canilha *et al.* (2005) relataram os melhores parâmetros fermentativos da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* em pH 6,0. Cada levedura possui uma característica, assim variando suas condições de cultivo.

De acordo com Tizazu, Roy e Vijayanand (2018) que utilizaram tratamento ultrassônico para aumentar a porosidade da membrana celular da levedura *Candida*

*tropicalis*, os parâmetros ideais para se obter a máxima taxa de conversão de xilose em xilitol são: velocidade agitação constante de 151 rpm, temperatura de 29,3°C, pH inicial de 6,2 e concentração de substrato (xilose) igual a 20,9 g/L. Segundo estes autores, a máxima concentração de xilitol obtida foi de 11,89 g/L em meio sintético, o que proporcionou uma eficiência de conversão de 71 %.

Outra estratégia, avaliada na tentativa de não desviar o substrato principal da produção de xilitol, foi a adição de glicose ao meio de cultivo, objetivando-se o crescimento celular (TOCHAMPA *et al.*, 2005). Segundo estes autores, quando a glicose é adicionada ao meio, a resposta celular a essa adição é de consumo primário desta hexose, o que proporciona um rápido aumento da população celular, enquanto a xilose é utilizada principalmente para a formação do produto de interesse, sendo a concentração ideal de glicose em torno de 10% (m/m) da concentração total de xilose.

Silva *et al.* (2007) também estudaram a relação xilose/glicose em diversas proporções, e a razão que propiciou melhor resultado foi a de 5:1. Os resultados estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6 - Efeito da relação xilose:glicose nos parâmetros fermentativos após 48 horas de fermentação.

Parâmetros	Relação xilose:glicose (m/m)			
	25:1	12:1	5:1	2,5:1
Consumo de xilose (%)	87,5	89,9	91,4	96,9
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,51	0,45	0,59	0,55
$Q_P$ (g/L h)	0,43	0,39	0,53	0,52
$\eta$ (%)	55,6	49,1	64,3	60,0

$Y_{P/S}$  = Fator de conversão de xilose em xilitol

$Q_P$  = Produtividade volumétrica de xilitol

$\eta$  = Eficiência de conversão de xilose em xilitol

Fonte: Baseado em (SILVA *et al.*, 2007).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Produzir xilitol a partir do emprego de células imobilizadas em suportes de fibra de coco e celulose.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a fibra de coco e a celulose como materiais em potencial para serem empregados como suporte para a imobilização celular de *Candida tropicalis*;
- Avaliar o efeito do uso dos suportes *in natura* (experimento controle) e tratado sobre a produção biotecnológica de xilitol pelo microrganismo *Candida tropicalis* em meio complexo;
- Avaliar os parâmetros fermentativos obtidos nas diferentes condições experimentais.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Matéria prima e preparo dos suportes para imobilização

#### 4.1.1 Fibra de coco

A fibra de coco utilizada nos experimentos, foi adquirida na loja Camélia Flores, localizada no município de Toledo/PR. Primeiramente esta foi moída utilizando o moinho de facas, com peneira de aço inox com malha 10 mesh, para aumentar a superfície de contato do material. Posteriormente, o material moído foi submetido a lavagem com água destilada, para retirar possíveis impurezas indevidas no material. Após a lavagem, o mesmo passou por um período de secagem à 60°C por 24 horas em estufa. Esta metodologia foi baseada em trabalho previamente realizado por Coelho (2007), a qual empregou bucha vegetal como suporte de imobilização.

#### 4.1.2 Celulose

A celulose utilizada no experimento foi cedida pela empresa Iguaçu Celulose S.A, localizada no município de Piraí do Sul/PR. A metodologia de preparação do material foi análoga a seção 4.1.1.

Antes da utilização dos suportes no processo de imobilização celular, ambos foram empregados nos experimentos de forma *in natura*, ou seja, somente foi feito um tratamento térmico ou tratados, conforme está descrito na seção 4.1.3.

#### 4.1.3 Tratamento dos suportes e experimentos controle

Os suportes foram submetidos a um tratamento, o qual foi baseado em metodologia descrita por Coelho (2007). Assim, para cada experimento utilizou-se de 1 g do suporte moído (fibra de coco ou celulose), o qual foi adicionado em frascos Erlenmeyer de 125 mL acrescido de um volume de 50 mL de NaOH 2% (m/v). Posteriormente, os frascos foram submetidos a uma agitação de 120 rpm por 24 horas à 30°C. Em seguida, os suportes passaram por uma lavagem com água destilada e tratamento térmico de autoclavagem (0,5 kgf/cm<sup>2</sup> por 15 min.). Após esta etapa, estes foram secos em estufa à 60°C por um período de 24 horas sob condições assépticas.

Quanto ao desempenho de cada material, este foi avaliado quanto a capacidade de imobilização celular (seção 4.5.4) e posteriormente comparados entre si, bem com os suportes não tratados (experimentos controle).

Para os experimentos controle, da mesma forma foram avaliados a celulose e a fibra de coco como potenciais suporte de imobilização e estes foram denominados de “suportes *in natura*”. Esta etapa consistiu em submeter ambos materiais a um simples tratamento térmico em autoclave à 0,5 kgf/cm<sup>2</sup> durante um período de 15 minutos. Posteriormente os mesmos foram secos em estufa à 60°C por 24 horas (SILVA, 2017). Tal etapa foi realizada somente com o intuito de se garantir a assepsia do material (autoclavagem do mesmo).

## 4.2 Microrganismo e preparo do inóculo

Os experimentos foram realizados utilizando o microrganismo *Candida tropicalis*, mantida em glicerol à 4°C, provenientes de doação de Coleção de cultura da Universidade Estadual Oeste do Paraná (UNIOESTE), campus Toledo.

Para o preparo do inóculo foram utilizados frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL meio complexo composto por xilose (30 g/L), sulfato de amônio (2 g/L), cloreto de cálcio dihidratado (0,1 g/L) e extrato de levedura (3 g/L). As células foram cultivadas em incubadora *shaker* com agitação de 200 rpm, à temperatura de 30 °C por 24 horas, após esse período realizou-se a recuperação celular através de centrifugação a 2000 x g, seguida por uma lavagem com água destilada e nova centrifugação para descarte do sobrenadante. Os *pellets* foram ressuspensos em água esterilizada. Para a etapa de fermentação foi utilizado uma concentração celular de 1 g/L em cada ensaio, conforme metodologia descrita por Felipe *et al.* (1997).

## 4.3 Imobilização celular

As células foram imobilizadas por adsorção em fibra de coco e celulose, ambas tratadas, conforme tratamentos descritos no item 4.1.3, bem como foram empregados material *in natura*. Adicionou-se cerca de 1 g/L de *C. tropicalis* juntamente com 1 g do suporte no início da fermentação.

#### 4.4 Meio, condições de fermentação e imobilização celular

Para a etapa de avaliação dos diferentes tratamentos do suporte durante a fermentação, semelhante ao empregado no preparo do inóculo, frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL meio complexo contendo (g/L): xilose (50), sulfato de amônio (2,0), cloreto de cálcio dihidratado (0,1) e extrato de levedura (3,0) (COELHO, 2007), além de glicose (10,0) foram empregados (SILVA *et al.*, 2007).

Para cada frasco Erlenmeyer, adicionou-se cerca de 1,0 g de suporte, 50 mL de meio de fermentação e 1 g/L de células. Os cultivos foram realizados em incubadora tipo *shaker* sob agitação de 200 rpm e temperatura de 30°C (COELHO, 2007), por um período de 36 horas.

#### 4.5 Métodos analíticos

##### 4.5.1 Determinação do pH

O pH das amostras foi medido em pHmetro, devidamente calibrado.

##### 4.5.2 Determinação da concentração celular

Determinou-se a concentração celular através de espectrofotometria a 600 nm, onde a concentração de células em g/L foi calculada por meio de uma curva padrão que correlaciona a absorbância a 600 nm e o peso seco das células obtidas do cultivo por 24 horas em meio complexo empregado no preparo do inóculo.

##### 4.5.3 Determinação de células livres

A concentração de células livres no meio de fermentação foi determinada pela leitura da densidade óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) em espectrofotômetro e correlacionada com a massa seca de células (g/L) através da curva padrão citada no item 4.5.2.

##### 4.5.4 Determinação de células imobilizadas

Para a determinação da massa de células imobilizadas realizou-se uma análise gravimétrica por diferença de massa seca do suporte antes e após o contato com as

células no meio de fermentação. O suporte foi filtrado, para a retirada do excesso de meio, e em seguida lavado com água destilada e filtrado novamente. O suporte foi colocado em estufa à 100°C até permanecer com massa constante.

#### 4.5.5 Determinação da concentração de açúcares

As determinações dos açúcares (xilose e glicose), bem como de produto xilitol, foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (do inglês, HPLC) durante todo o processo fermentativo. As análises foram realizadas em parceria com a Escola de Engenharia de Lorena – USP no Laboratório de Microbiologia de responsabilidade da Profa. Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe. As condições das análises estão descritas em trabalho de Arruda (2011).

#### 4.5.6 Cálculo dos parâmetros fermentativos e de imobilização

- Fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ )

O fator de conversão ou fator de rendimento, expressa a massa de xilitol produzida em relação a massa de substrato consumido, em gramas. Foi calculado através da Equação 1:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{-\Delta S} = \frac{P_F - P_I}{S_I - S_F} \quad (1)$$

Onde:

- PF: concentração final de xilitol (g/L);
- PI: concentração inicial de xilitol (g/L);
- SF: concentração final de xilose (g/L);
- SI: concentração inicial de xilose (g/L).

- Fator de conversão de xilose em massa celular ( $Y_{X/S}$ )

O fator de conversão de xilose em massa celular expressa a massa de células produzidas em relação a massa de substrato consumida, em gramas. Calculou-se pela Equação 2:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} = \frac{X_F - X_I}{S_I - S_F} \quad (2)$$

Onde:

$X_F$ : concentração celular total (g/L);  
 $X_I$ : concentração celular inicial (g/L);  
 $S_F$ : concentração final de xilose (g/L);  
 $S_I$ : concentração inicial de xilose (g/L).

- Velocidade de consumo

Este parâmetro determina a velocidade de consumo de um componente (g/L h). É dado pela Equação 3, onde correlaciona-se a variação da sua concentração (g/L) com o tempo (h) necessário para esse consumo.

$$V = \frac{C_F - C_I}{t_F - t_I} \quad (3)$$

Onde:

$C_F$ : concentração final do componente (g/L);  
 $C_I$ : concentração inicial do componente (g/L);  
 $t_F$ : tempo final de fermentação (h);  
 $t_I$ : tempo inicial de fermentação (h).

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

Este parâmetro, dado em porcentagem, expressa a razão entre o fator de conversão de xilose em xilitol calculado anteriormente e o fator teórico de conversão.

Calculou-se pela Equação 4:

$$\eta (\%) = \frac{Y_{P/S} \text{ obtido}}{Y_{P/S} \text{ teórico}} \quad (4)$$

Onde:

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

- Produtividade volumétrica de xilitol ( $Q_P$ )

A produtividade volumétrica de xilitol demonstra a concentração de xilitol produzido (g/L) por tempo (h). Foi calculado de acordo com a Equação 5:

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta T} = \frac{P_F - P_I}{t_F - t_I} \quad (5)$$

Onde:

$P_F$ : concentração final de xilitol (g/L);  
 $P_I$ : concentração inicial de xilitol (g/L);



$t_f$ : tempo final de fermentação (h);  
 $t_i$ : tempo inicial de fermentação (h).

- Eficiência de imobilização ( $\eta_{imob}$ , %)

A eficiência de imobilização, em porcentagem, é expressa pela razão entre a massa de células imobilizadas e a massa de células totais do meio. Obteve-se pela Equação 6:

$$\eta_{imob} = \frac{m_{imob}}{m_{imob} + m_{liv}} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

$m_{imob}$ : massa de células imobilizadas no suporte (g);

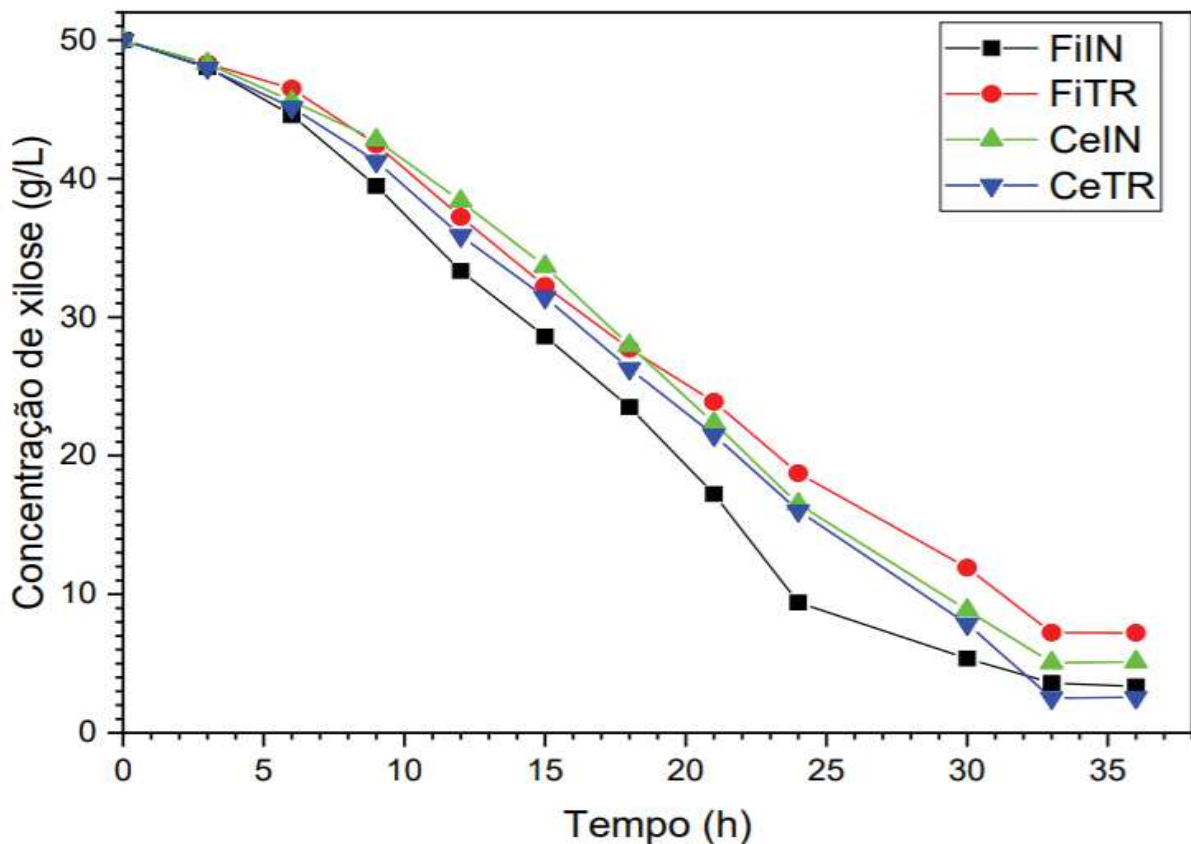
$m_{liv}$ : massa de células livres no meio de fermentação no mesmo instante  $t$  (g).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Consumo de xilose por *C. tropicalis* em função dos diferentes suportes utilizados para imobilização

Os diferentes suportes utilizados na fermentação proporcionaram diferentes perfis de consumo de xilose durante o processo fermentativo (Figura 7). Analisando esta figura é perceptível que a utilização da fibra de coco tratada com NaOH dificultou a assimilação de xilose, quando comparada com a fibra de coco *in natura*. Observa-se ainda nesta figura que ao passar 24 horas de fermentação o consumo de xilose com a fibra de coco tratada com NaOH foi 30% inferior ao consumo de xilose utilizando o mesmo suporte *in natura*. No entanto, esta diferença na assimilação de xilose, ao final do processo de fermentação (36 horas), a fibra de coco tratada foi apenas 9% menor em relação ao o mesmo suporte *in natura*.

Figura 7 - Efeito da imobilização celular sobre o consumo de xilose.



Legenda: FiIN: Fibra de coco in natura; FiTR: Fibra de coco tratada com hidróxido de sódio; CeIN: Celulose in natura e CeTR: celulose tratada com hidróxido de sódio.

Fonte: autoria própria (2019).

Com relação as células imobilizadas em celulose, observa-se semelhança nos perfis de consumo de xilose para os experimentos do referido suporte controle e tratado. Tal fato pode ser corroborado ao se analisar o tempo de 24 horas de fermentação, no qual o consumo de xilose utilizando celulose *in natura* como suporte foi de apenas 1,4% inferior ao consumo de xilose utilizando celulose tratada com NaOH para imobilização. Verifica-se ainda que ao final da fermentação (36 horas) o consumo de xilose foi 5,7% superior utilizando celulose tratada como suporte para imobilização, percentual este que foi a maior variação de consumo de xilose nesta condição. Silva (2017) e Ariyajaroenwong e colaboradores (2016) relatam não encontrar variações significativas de consumo de substrato dentre células imobilizadas em caules de sorgo com diferentes tratamentos, visando a produção de etanol.

Ainda com relação à Figura 7, sugere-se que a imobilização celular utilizando celulose tratada como suporte foi o cultivo que alcançou o maior consumo de xilose ao final do processo, consumindo 95% desta pentose. Em contrapartida, o cultivo utilizando a fibra de coco tratada consumiu apenas 85% da referida fonte de carbono, sendo esta a condição que propiciou o menor consumo dentre os cultivos avaliados.

A velocidade de consumo de xilose para cada cultivo realizado no presente estudo é apresentada na Tabela 7.

Tabela 7 - Velocidade de consumo de xilose durante a fermentação por *C. tropicalis* em função do suporte para imobilização.

Tempo (h)	Velocidade de consumo de xilose (g/L.h)			
	FiIN	FiTR	CeIN	CeTR
3	0,653	0,567	0,567	0,673
6	0,907	0,583	0,733	0,810
9	1,170	0,838	0,801	0,972
12	1,388	1,063	0,968	1,177
15	1,427	1,184	1,088	1,237
18	1,472	1,238	1,225	1,318
21	1,560	1,243	1,317	1,357
24	1,691	1,303	1,395	1,415
30	1,488	1,270	1,372	1,405
33	1,407	1,296	1,362	1,439
36	1,269	1,188	1,246	1,318

Fonte: autoria própria (2019).

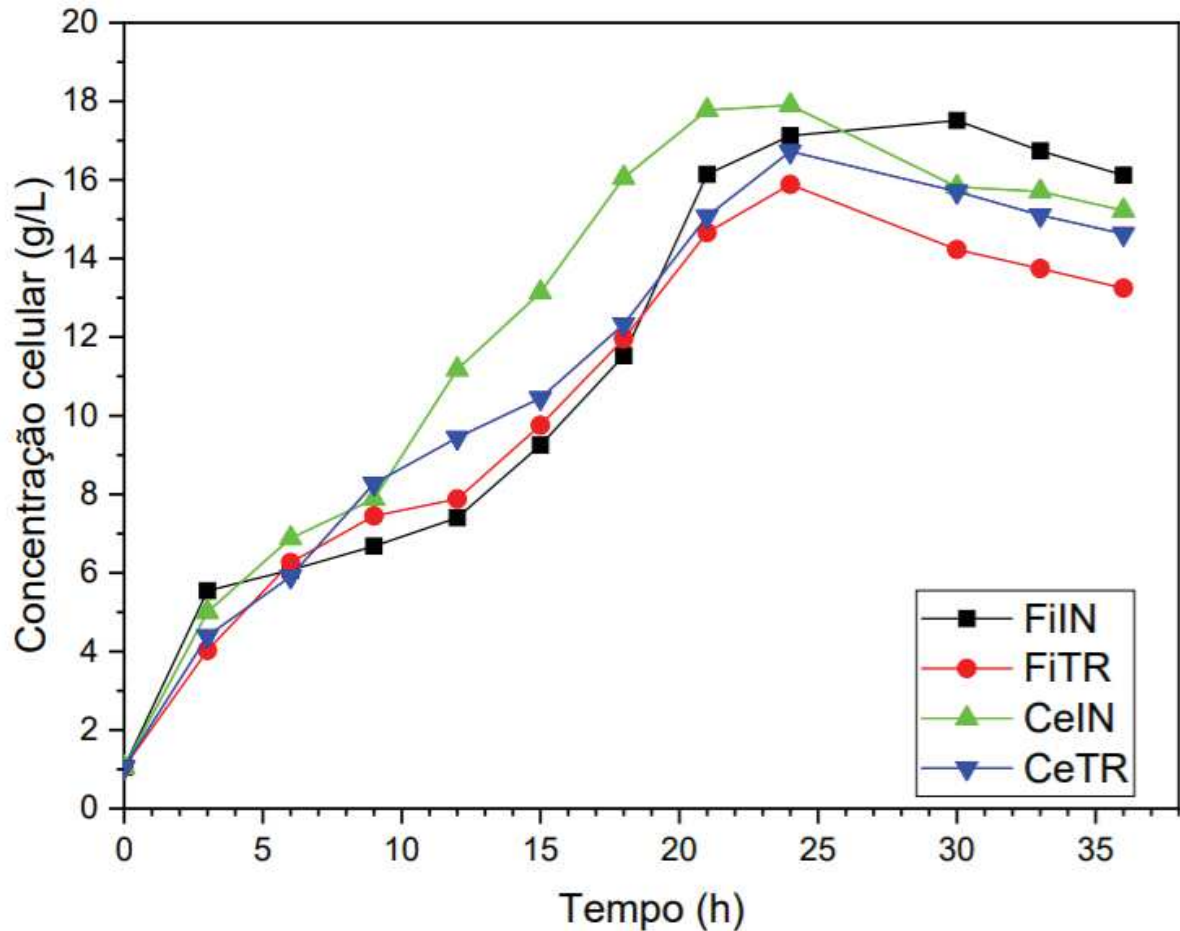
Analisando os dados dispostos na Tabela 7, associando com a Figura 7, é visível que o cultivo utilizando células imobilizadas em fibra de coco do experimento controle possuiu o consumo mais elevado de xilose durante as 30 primeiras horas de fermentação em comparação às demais condições avaliadas, alcançando ao final do processo (36 h) 93% de consumo de xilose disponível neste período. Uma possível justificativa para tal comportamento, deve-se ao fato de que havia mais células livres no meio controle em relação ao meio com suporte tratado, o que será discutido no item 5.2, provavelmente as células livres tiveram maior acesso à xilose, o que favoreceu a assimilação deste açúcar. É possível observar também que a maior velocidade de consumo do substrato ocorreu após 24 horas de fermentação em todos os cultivos testados.

## **5.2 Crescimento celular de *C. tropicalis* e consumo de glicose em função dos diferentes suportes utilizados para imobilização**

O crescimento de *C. tropicalis* foi analisado durante o processo fermentativo (Figura 8), sendo observado máxima concentração celular (17,89 g/L), quando se utilizou celulose tratada como suporte para imobilização.

Após decorrer o tempo de 24 horas de fermentação, pode ser observado que ocorreu praticamente a máxima concentração celular em todos os cultivos realizados, este fato pode ser vinculado a máxima velocidade de assimilação de xilose (Tabela 7). Posterior a este tempo observa-se um declínio da concentração de células para a condição da fibra de coco tratada, o que pode ser justificado pela ausência de fonte de carbono neste período (Figura 7), uma vez que mais de 81% da xilose já havia sido consumida.

Figura 8 - Efeito da imobilização celular sobre a concentração celular de *C. tropicalis*.



Legenda: FiIN: Fibra de coco in natura; FiTR: Fibra de coco tratada com hidróxido de sódio; CeIN: Celulose in natura e CeTR: celulose tratada com hidróxido de sódio.

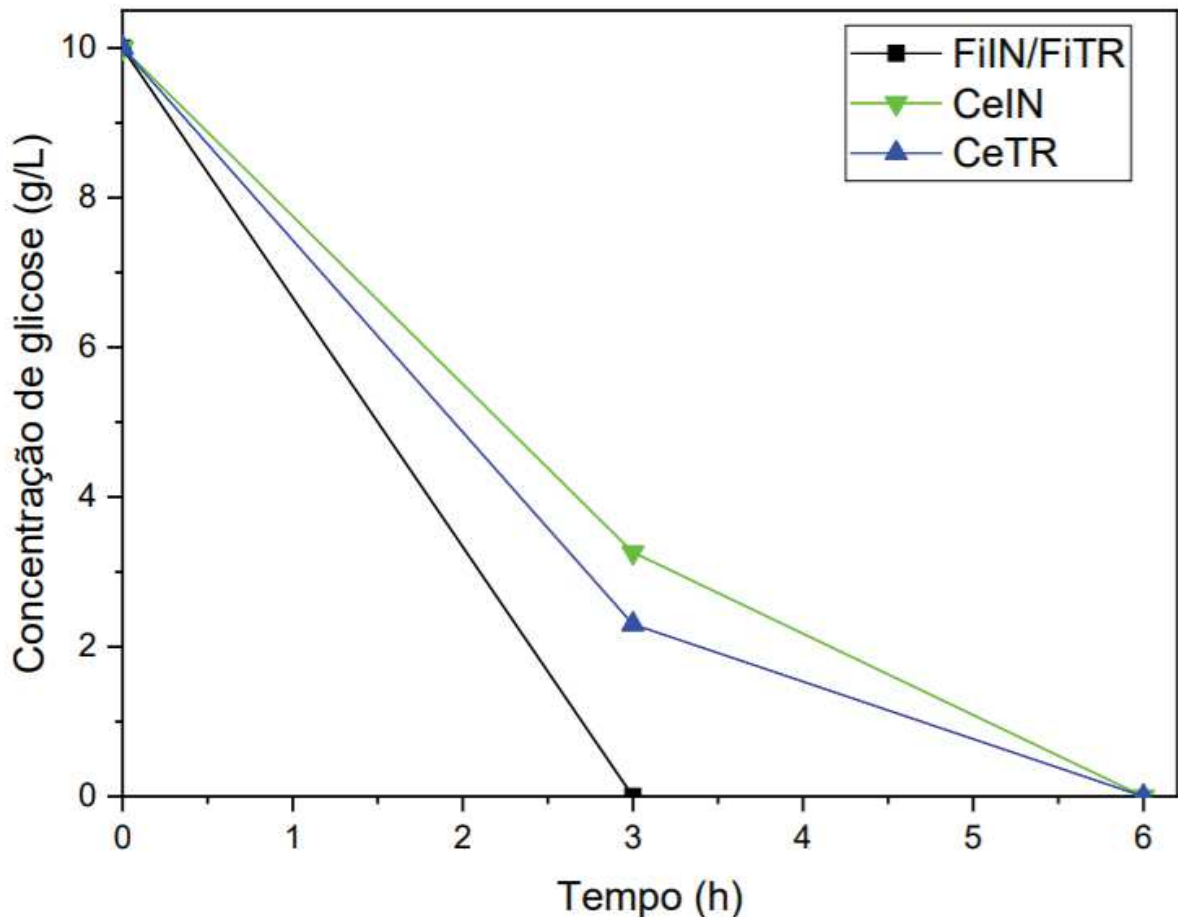
Fonte: autoria própria (2019).

O consumo mais exacerbado de xilose (Figura 7) decorreu nos cultivos utilizando os suportes *in natura*, onde a densidade celular foi maior (Figura 8), esse fato pode ser atribuído ao número de células livres disponíveis, as quais possuem um acesso maior ao substrato disponível, esse contato maior das células livres com o substrato também propicia uma maior reprodução celular quando comparada com as células imobilizadas, isso aumenta a densidade celular nos cultivos com uma menor eficiência de imobilização, eficiência essa que será discutida no item 5.4.

A adição de glicose ao meio fermentativo também foi acompanhada em função das diferentes condições empregadas (Figura 9). Esta adição, foi uma alternativa para facilitar a adaptação celular, bem como reprodução do microrganismo no início do processo. Verifica-se ainda nesta figura que a levedura *C. tropicalis* tem preferência

de consumo pela glicose, quando comparada a xilose e isso proporcionou um rápido consumo desse nutriente.

Figura 9 - Efeito da imobilização celular sobre a concentração de glicose.



Legenda: FiIN: Fibra de coco in natura; FiTR: Fibra de coco tratada com hidróxido de sódio; CeIN: Celulose in natura e CeTR: celulose tratada com hidróxido de sódio.

Fonte: autoria própria (2019).

Analisando os cultivos utilizando fibra de coco como suporte para imobilização, a glicose foi totalmente consumida nas primeiras três horas de fermentação ou antes, uma vez que não foi feita análise em tempo anterior a este. Nesse período, a levedura tende a destinar o seu metabolismo para a reprodução celular, quando ocorreu consumo total do mesmo (Figura 9).

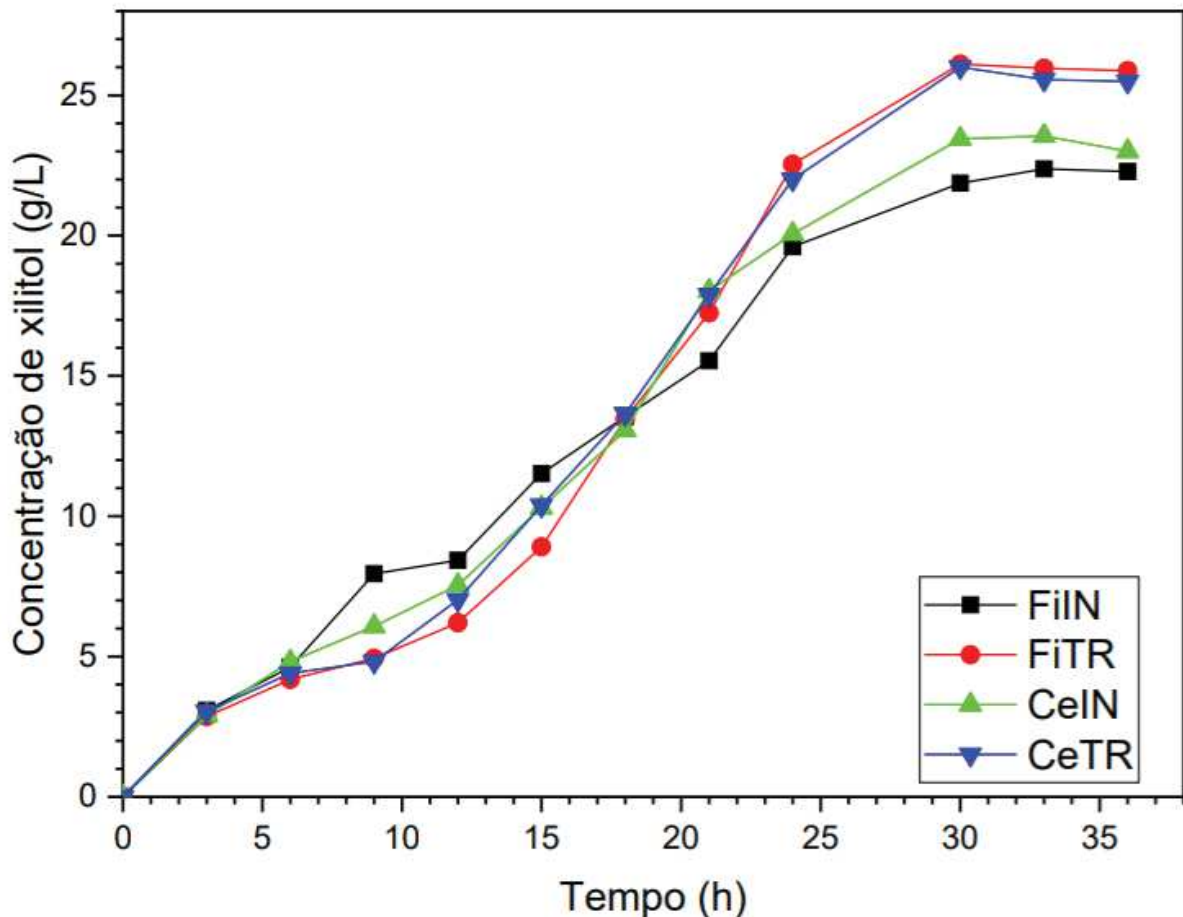
O consumo de glicose nos cultivos utilizando celulose como suporte para imobilização foi mais lento quando comparado aos cultivos em fibra de coco. O consumo total da glicose aconteceu após seis horas de fermentação, entretanto isso

não demonstrou variações significantes na concentração celular durante as fermentações.

### 5.3 Avaliação dos parâmetros fermentativos e formação de xilitol por *C. tropicalis* em função dos diferentes suportes utilizados para imobilização

Observou-se uma melhor eficiência de conversão de xilose em xilitol utilizando fibra de coco tratada como suporte para imobilização celular (Tabela 8), além disso, esse mesmo material também proporcionou uma maior concentração do produto do meio ao final do processo (Figura 10).

Figura 10 - Efeito da imobilização celular sobre a formação de xilitol.



Legenda: FiIN: Fibra de coco in natura; FiTR: Fibra de coco tratada com hidróxido de sódio; CeIN: Celulose in natura e CeTR: celulose tratada com hidróxido de sódio.

Fonte: autoria própria (2019).

Analisando a Figura 10, observa-se uma fase exponencial de formação do produto entre 12 e 24 horas de fermentação, nos cultivos utilizando suporte tratado

para imobilização, diferentemente do comportamento dos cultivos utilizando suporte *in natura* para imobilização, onde o comportamento de formação de produto é irregular.

Vinculando a análise com o consumo de xilose durante a fermentação (Figura 7), percebe-se que mesmo com um consumo inferior de xilose, o cultivo com fibra de coco tratada, produz as maiores concentrações de xilitol, e isso leva a uma taxa de conversão de substrato em produto superior, atingindo uma eficiência de conversão de 79%.

Tabela 8 - Parâmetros fermentativos de obtenção de xilitol por células imobilizadas em diferentes suportes e com diferentes tratamentos.

<b>Parâmetros fermentativos</b>	<b>FiIN<sup>1</sup></b>	<b>FiTR<sup>2</sup></b>	<b>CeIN<sup>3</sup></b>	<b>CeTR<sup>4</sup></b>
P <sub>F</sub> (g/L)	22,38	26,12	23,55	26,01
Y <sub>P/S</sub> (g/g)	0,49	0,72	0,65	0,65
η (%)	53,40	78,60	70,88	70,88
Q <sub>P</sub> (g/L h)	0,73	0,94	0,85	0,91
Y <sub>X/S</sub> (g/g)	0,36	0,51	0,45	0,49
Total de células (g/L)	17,51	15,88	16,73	17,89
η <sub>imob</sub> (%)	45,38	71,45	65,28	69,40

<sup>1</sup>: Fibra de coco *in natura*;

<sup>2</sup>: Fibra de coco tratada com hidróxido de sódio;

<sup>3</sup>: Celulose *in natura*;

<sup>4</sup>: Celulose tratada com hidróxido de sódio;

Fonte: autoria própria (2019).

Esses fatores estão diretamente relacionados a eficiência de imobilização de cada suporte utilizado, visto que a fibra de coco tratada obteve o percentual de imobilização mais alto (71,45%), o que resultou em uma produção mais elevada de xilitol (Figura 10). Além disso, neste cultivo obteve-se o maior fator de conversão de substrato em célula (0,51 g/g), isso significa que uma maior quantidade do substrato foi utilizada para a reprodução celular, assim obtendo a maior densidade celular dentre os cultivos. Tal fato favorece uma maior produção de xilitol, entretanto esse valor não deve elevar-se demasiadamente, pois caso isso ocorra, significa que o metabolismo celular está priorizando a reprodução celular ao invés da produção de xilitol.

Tomando como referência a imobilização em fibra de coco tratada e comparando com a produção por células livres estudada por Lourenço (2009), onde



foi realizado uma seleção de microrganismo capazes de converter xilose em xilitol, ele destacou a *Candida tropicalis* como microrganismo que obteve maior produção, atingiu um fator de conversão de xilose em xilitol de 0,65 g/g e uma eficiência de conversão de 71%, resultados estes inferiores aos obtidos neste trabalho. Meyrial e colaboradores (1991) avaliaram a capacidade de conversão de xilose em xilitol entre diversos microrganismos, a *Candida tropicalis* converteu 63% do substrato em produto ( $Y_{P/S} = 0,63$  g/g). Portanto, a imobilização celular desse microrganismo forneceu uma produção 11% superior comparada a Lourenço (2009) e 14% superior aos resultados de Meyrial e colaboradores (1991) (Tabela 9).

Tabela 9 - Resultados obtidos no presente trabalho e dados da literatura sobre produção de xilitol.

<b>Microrganismo</b>	<b>Material imobilizado</b>	<b><math>Y_{P/S}</math> (g/g)</b>	<b><math>Q_P</math> (g/L h)</b>	<b><math>\eta</math> (%)</b>	<b>Referencia</b>
<i>C. tropicalis</i>	Não imobilizado	0,63	0,19	68	(Meyrial <i>et. al.</i> , 1991).
<i>C. tropicalis</i>	Não imobilizado	0,65	0,35	71	Lourenço (2009)
<i>C. guilliermondii</i>	Bucha vegetal	0,66	0,43	72	Coelho (2007)
<i>C. tropicalis</i>	Alginato de cálcio	0,7	0,44	76	Sarrouh (2009)
<i>C. tropicalis</i>	Fibra de coco	<b>0,72</b>	<b>0,94</b>	<b>78</b>	<b>Presente trabalho</b>

Fonte: autoria própria (2019).

A imobilização celular é umas das alternativas mais promissoras para viabilizar a produção de xilitol, seja ela utilizando suporte químico ou suporte natural. Como visto na Tabela 9, Sarrouh (2009) utilizou o alginato de cálcio como suporte para imobilizar *Candida tropicalis* afim de otimizar a produção de xilitol, os resultados obtidos por ele foram superiores quando comparados a produção de xilitol com células não imobilizadas, comparando ao presente trabalho ele obteve uma produtividade volumétrica inferior, 0,44 g/L h comparado a 0,94 g/L h, entretanto a eficiência de conversão calculado por ele se equiparou ao presente estudo, resultando em apenas uma diferença de dois pontos percentuais.

Semelhante ao observado para o consumo de xilose e formação de células, a imobilização celular em diferentes suportes também resultou em diferentes perfis de formação de xilitol durante a fermentação (Figura 10). A máxima produção observada de xilitol foi 26,12 g/L, alcançada na fermentação utilizando a fibra de coco tratada como suporte para imobilização. Verifica-se nesta figura que independentemente do

material avaliado, a produção de xilitol foi superior quando se utilizou suporte tratado para imobilização, resultando em 10% e 17% a mais deste poliol ao final do processo quando se empregou celulose e fibra de coco tratadas, respectivamente.

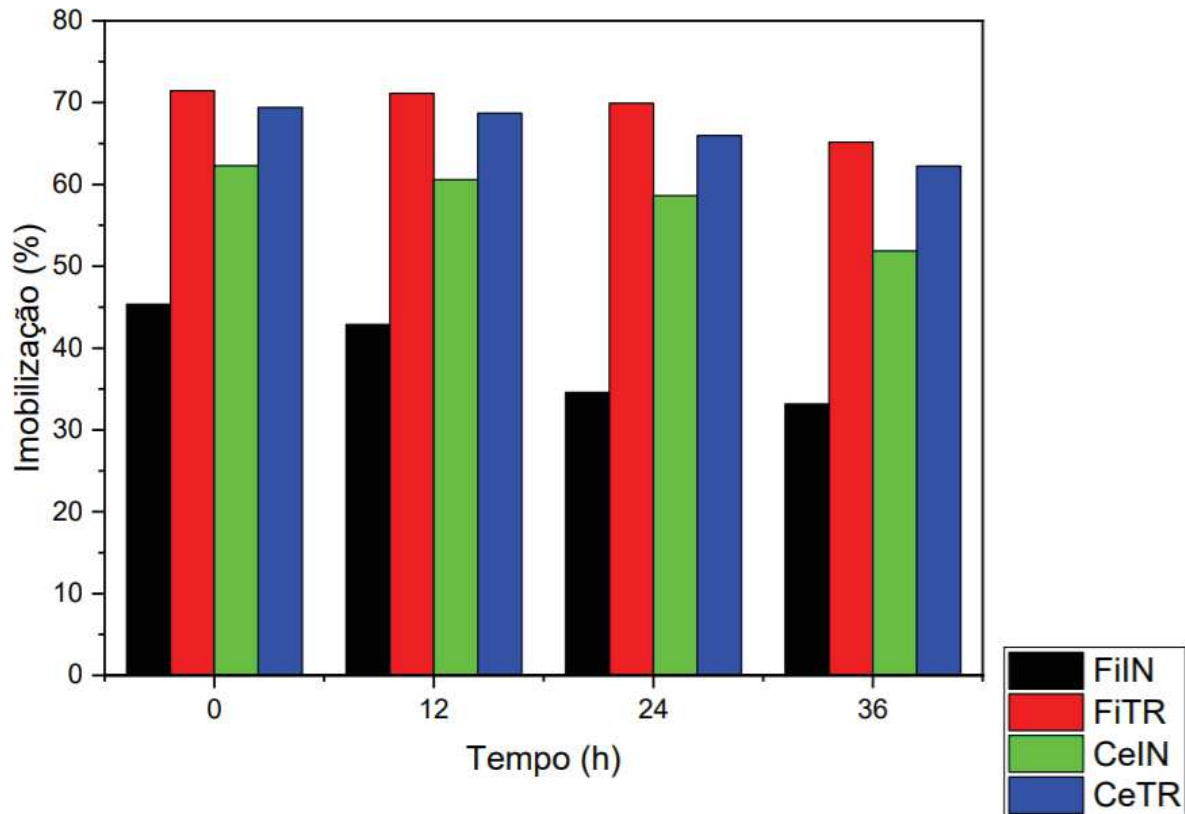
Observa-se ainda, que após o tempo de 24 horas de fermentação as melhores taxas de conversão de substrato em produto e também a produtividade volumétrica mais alta em ambos os cultivos realizados. Sendo o cultivo utilizando a fibra de coco tratada como suporte o mais eficiente na conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S} = 0,72$  g/g) e atingiu a maior produtividade volumétrica ( $Q_P = 0,94$  g/L.h), valores que superam em 47% e 27%, respectivamente, os parâmetros obtidos utilizando fibra de coco *in natura* como suporte para imobilização.

Coelho (2007) utilizou bucha vegetal tratada com hidróxido de sódio para imobilização celular, utilizando *C. guilliermondii*, visando a produção de xilitol, a concentração encontrada foi 18% superior à obtida neste estudo, a conversão de xilose em xilitol foi de 0,66 g/g, 32% inferior quando comparada a conversão de xilose em xilitol utilizando fibra de coco tratada como suporte para imobilização. Ademais a produtividade volumétrica de xilitol encontrada por Coelho (2007) foi de 0,43 g/L h, sendo este valor 118% abaixo do valor encontrado no presente estudo para o mesmo tratamento do suporte para imobilização.

#### **5.4 Avaliação da capacidade de imobilização celular do suporte sob diferentes tratamentos.**

A Figura 11 demonstra a capacidade de imobilização de cada suporte seja nos cultivos empregando-se o suporte controle ou sob tratamento com hidróxido de sódio 2% (p/v).

Figura 11 - Imobilização celular em diferentes tratamentos.



Legenda: FiIN: Fibra de coco in natura; FiTR: Fibra de coco tratada com hidróxido de sódio; CeIN: Celulose in natura e CeTR: celulose tratada com hidróxido de sódio.

Fonte: autoria própria (2019).

Verifica-se na Figura 11 que a eficiência de imobilização foi superior quando se empregou suportes tratados ao invés de *in natura*. Tal comportamento, pode ser explicado pois, o tratamento com NaOH possibilita um aumento da área superficial do suporte, assim aumentando a área de contato entre as células e o suporte, favorecendo a adsorção celular ao suporte utilizado. Bisaria (1997) afirma que durante o tratamento químico ocorre a intumescência do material, ocasionando um aumento na sua área superficial interna, reduzindo o grau de polimerização e cristalinidade, rompendo a estrutura da lignina e remove parcialmente a hemicelulose.

O tratamento químico quando implementado possibilitou uma imobilização celular, utilizando a fibra de coco, 57% superior a imobilização utilizando o mesmo suporte *in natura*. Esse fator implica diretamente nos resultados dos parâmetros fermentativos do bioprocessamento, os quais foram superiores utilizando o tratamento químico citado (Tabela 8). Do mesmo modo, a dissorção decorrente do tempo de fermentação é influenciada pelo tratamento empregado, sendo que o suporte tratado

resultou em um decréscimo de 10% na capacidade de imobilização celular durante o período de fermentação (36 horas), nesse mesmo período a fibra de coco *in natura* decresceu 37% na capacidade de imobilização celular.

O tratamento químico realizado na celulose também apresentou resultados superiores quando comparados ao uso do suporte *in natura*; porém, os resultados não apresentaram grandes variações assim como a fibra de coco. Ademais, a celulose sob o tratamento com hidróxido de sódio apresentou uma imobilização 3% inferior quando comparada com a fibra de coco tratada, assim como o percentual de imobilização (Tabela 10), os parâmetros fermentativos (Tabela 8) também se assemelham.

Tabela 10 - Eficiência de imobilização em diferentes tratamentos.

Tempo (h)	Eficiência de imobilização (%)			
	FiTr	CeTR	FiIN	CeIN
0	71,45	69,40	45,35	62,28
12	71,14	68,70	42,88	60,58
24	69,91	65,96	34,57	58,62
36	65,15	62,24	33,17	51,88

Legenda: FiIN: Fibra de coco *in natura*; FiTR: Fibra de coco tratada com hidróxido de sódio; CeIN: Celulose *in natura* e CeTR: celulose tratada com hidróxido de sódio.

Fonte: autoria própria (2019).

Coelho (2007) utilizou bucha vegetal tratada com NaOH 2% (p/v) para realizar a imobilização celular e obteve uma eficiência de aproximadamente 60% inicialmente, reduzindo para 48% ao final do processo fermentativo, parâmetros estes que se encontram a abaixo dos valores obtidos neste estudo. Estes resultados podem ser explicados devido as características de cada suporte, como área superficial, porosidade, entre outras. Cada material possui características próprias que influenciam no processo de adsorção celular ao mesmo.

Silva (2017) utilizou bagaço de caju *in natura* como suporte para imobilizar *Candida tropicalis*, este obteve uma eficiência de imobilização de 45%, a qual se assemelha aos resultados do presente trabalho, que também imobilizou 45% das leveduras utilizando fibra de coco *in natura*. Estes resultados foram inferiores aos de

Gondim e colaboradores (2014) que obtiveram uma imobilização de 60% das leveduras utilizando também o bagaço de caju *in natura* como suporte.

Destaca-se a alta produtividade ( $Q_P = 0,94$  g/L h) encontrada quando empregada a fibra de coco tratada como suporte para a imobilização celular e também a alta eficiência de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S} = 0,72$  g/g) obtida utilizando o mesmo cultivo. Parâmetros esses que estão relacionados a eficiência de imobilização de cada suporte, onde a fibra de coco tratada obteve a melhor eficiência de imobilização ( $\eta_{\text{imob}} (\%) = 71,45$ ).

Encontrou-se dificuldade para realizar a análise dos dados, visto que as amostras não foram realizadas em triplicata devido a limitação de uso do HPLC, com isso não foi possível a realização de análises estatísticas sob os resultados obtidos.

## 6 CONCLUSÃO

A utilização de células imobilizadas para produção de xilitol se mostrou uma técnica alternativa e eficiente para otimização da produção do mesmo. A partir da imobilização celular obteve-se resultados satisfatórios comparados a produção biotecnológica convencional de xilitol.

Os suportes testados (fibra de coco e celulose) obtiveram uma alta eficiência de imobilização quando tratados com hidróxido de sódio, o que resultou em altas concentrações do produto ao final do processo

O tratamento empregado nos suportes forneceu um percentual de imobilização superior aos suportes não-tratados, isso torna o tratamento um passo de fundamental importância para se obter uma maior eficiência de imobilização e conseqüentemente uma melhor produtividade de xilitol.

Ademais, avaliou-se os parâmetros fermentativos em ambos os experimentos realizados, o que possibilitou realizar comparação entres os diferentes suportes utilizados.

## REFERÊNCIAS

- ADELABU, B. *et al.* Bioconversion of corn straw to ethanol by cellulolytic yeasts immobilized in *Mucuna urens* matrix. **Journal of King Saud University**, v. 31, n. 1, p. 136-141, 2019.
- ALVES, L. A. *et al.* Pre treatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 89-98, 1998.
- ARIYAJAROENWONG, P. *et al.* Kinetic models for batch and continuous ethanol fermentation from sweet sorghum juice by yeast immobilized on sweet sorghum stalks. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 66, p. 210-216, Setembro 2016.
- ARRUDA, P. V. **Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado em Biotecnologia industrial) - EEL. Lorena. 2011.
- ARRUDA, P. V. *et al.* Scale up of xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry - Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 47, p. 297-302, 2017.
- BÄR, A. Caries Prevention with Xylitol. **Sociological and Medical Aspects of Nutrition**, v. 55, p. 183-209, 1988.
- BARBOSA, F. S. *et al.* Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, p. 241-251, 1988.
- BATISTA, M. D. A. **Estudo da Imobilização de células de Saccharomyces cerevisiae em gel de alginato de cálcio no processo de fermentação alcoólica**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, p. 18. 2005.
- BISARIA, V. S. **Bioprocessing of agro-residues to value added products**. 2. ed. [S.l.]: [s.n.], 1998.
- BRÍGIDA, A. I. S. **Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais**. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Biotecnológicos) - UFRJ. Rio de Janeiro. 2010.
- CANETTIERI, E. V.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, G. A. Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 159-168, 2001.
- CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Influence of Medium Composition on Xylitol Bioproduction from Wheat Straw Hemicellulosic Hydrolysate. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 6-7, p. 1087-1093, 2005.
- CARDOSO, M. D. G. **Produção de Aguardente de Cana**. 2. ed. [S.l.]: Lavras, 2006.

COELHO, T. C. **Avaliação das condições de imobilização de células de *Candida guilliermondii* FT 20037 em bucha vegetal (*Luffa cylindrica*) visando a produção de xilitol.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena. Lorena. 2007.

CONVERTI, A. *et al.* Effect of temperature on the microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 339-345, 2001.

CORTEZ, D. V. **Permeabilização de células de *Candida guilliermondii* empregando processos químicos e físicos e seu potencial para uso como biocatalisadores na síntese de xilitol.** Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena. Lorena, p. 125. 2010.

CORTEZ, D.; CASTRO, H.; ANDRADE, G. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química nova**, v. 40, n. 1, p. 85-95, 2017.

COVIZZI, L. G. *et al.* Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications. **Semina: Exact and Technological Sciences**, v. 28, n. 2, p. 143-160, 2007.

CUNHA, M. A. *et al.* Yeast Immobilization in LentiKats®: A New Strategy for Xylitol Bioproduction from Sugarcane Bagasse. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 1, p. 65-72, 2006.

DOMINGUEZ, J. M.; GONG, C. S.; TSAO, G. T. Production of xylitol from D-xylose by *Debaryomyces hansenii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 63-65, p. 117-127, 1997.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, p. 685-702, 2003.

ELLWOOD, K. C. *et al.* Biomarkers used to assess the effect of dietary xylitol or sorbitol in the rat. **Nutrition Research**, v. 19, p. 1637-1648, 1999.

FELIPE, M. G. A. *et al.* Preparation of xylitol by fermentation of a hydrolysate of hemicellulose obtained from sugarcane bagasse. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 36, n. 1, p. 103-114, 1993.

FELIPE, M. G. A. *et al.* Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 251-254, 1997.

FELIPE, M. G. A. *et al.* Toxicity of acetic acid during the production of xylitol by batch fermentation using lignocellulosic hydrolysate at low pH. **Symposium on biotechnology for fuels and chemicals**, v. 21, p. 3-12, 1999.

FURLAN, S. A.; CASTRO, H. F. Xylitol Production by *Candida parapsilosis* under Fed-Batch Culture. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 44, n. 2, 2001.



FURUSAKI, S.; SEKI, M. Use and Engineering Aspects of Immobilized Cells. **Modern Biochemical Engineering. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 46, p. 161-185, 1992.

GEMEINER, P. *et al.* **Natural and Synthetic Carriers Suitable for Immobilization of Viable Cells, Active Organelles, and Molecules**. [S.l.]: [s.n.], 1994.

GILBERT, R. D.; KADLA, J. F. Polysaccharides - Cellulose. **Biopolymers from Renewable Resources**, Berlin, p. 47-95, 1998.

GONDIM, G. R. *et al.* Use of cashew apple bagasse as support for *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilization for ethanol production. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 8, n. 1, p. 108-114, 2014.

HOOG, G. S. D.; GUARRO, J. **Atlas of clinical fungi**. 2. ed. Baarn: Centraalbureau voor Schimmelcultures, 1995.

HYVÖNEN, L.; KOIVISTOINEN, P.; VOIROL, F. Food Technological Evaluation of Xylitol. **Advances in Food Research**, v. 28, p. 373-403, 1982.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Agrícola Municipal**, 2009. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: Setembro 2018.

JIA, X. *et al.* Rheological properties of an amorphous cellulose suspension. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 27-33, 2014.

JÚSTIZ-SMITH, N. G.; VIRGO, G. J.; BUCHANAN, V. E. Potential of Jamaican banana, coconut coir and bagasse fibres as composite materials. **Materials Characterization**, v. 59, p. 1273-1278, 2008.

KATAM, K.; BHATTACHARYYA, D. Simultaneous treatment of domestic wastewater and biolipid synthesis using immobilized and suspended cultures of microalgae and activated sludge. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 69, p. 295-303, 2019.

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

KLEMM, D. *et al.* **Comprehensive Cellulose Chemistry**. Weinheim: Wiley-VHC, 1998.

KLEMM, D. *et al.* Cellulose: Fascinating biopolymer and Sustainable raw material. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.

KOVALESKI, G. **Estudo da imobilização celular de *Saccharomyces cerevisiae* em alginato de cálcio**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, p. 79. 2019.

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, p. 449-467, 2012.

- LOURENÇO, M. V. D. M. **Seleção de leveduras para a bioconversão de D-xilose em xilitol**. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola) - Universidade de São Paulo. Piracicaba, p. 1-79. 2009.
- MARTON, J. M. **Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições da adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção biotecnológica de xilitol**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - EEL. Lorena. 2002.
- MASLOVA, O. *et al.* Production of various organic acids from different renewable sources by immobilized cells in the regimes of separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharification and fermentation (SFF). **Bioresource Technology**, v. 272, p. 1-9, 2019.
- MATOS, L. J. B. **Imobilização da lipase tipo B de *Candida antarctica* em sílica macroporosa e polimetilmetacrilato visando a síntese do oleato de etila**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2014.
- MATTIASSON, B.; HAHN-HAGERDAL, B. Microenvironmental Effects on Metabolic Behaviour of Immobilized Cells. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 16, p. 52-55, 1982.
- MILESSI, T. S. D. S. **Imobilização de *Scheffersomyces stipitis* para obtenção de etanol de segunda geração em biorreator STR tipo cesta**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena. Lorena, p. 148. 2012.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicilic Acid Reagent for determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- MOON, R. J. *et al.* Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p. 3941-3994, 2011.
- MORITA, T. A.; SILVA, S. S. Inhibition of microbial xylitol production by acetic acid and its relation with fermentative parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 801-808, 2000.
- MOSIER, N. *et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 673-686, 2005.
- MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1681-1684, 2001.
- MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 4, p. 401-413, 2002.
- NEGRI, M.; SILVA, S.; OLIVEIRA, R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, p. 1399-1412, 2012.

NOLLEAU, V. *et al.* Xylitol production from xylose by two yeast strains: Sugar tolerance. **Current Microbiology**, v. 27, p. 191-197, 1993.

ODUMERU, J. A. *et al.* Effects of heat shock and ethanol stress on the viability of a *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis) brewing yeast strain during fermentation of high gravity wort. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 111-116, 1992.

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.

OLIVEIRA, A.; BASTOS, R.; DE LA TORRE, L. *Bacillus subtilis* immobilization in alginate microfluidic-based microparticles aiming to improve lipase productivity. **Biochemical Engineering Journal**, v. 143, p. 110-120, 2019.

OLIVEIRA, J. S. **Sensibilidade a antifúngicos, atividade exoenzimática e produção de biofilme por cepas de *Candida tropicalis* de origem animal.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) - UFC. Fortaleza. 2013.

ONISHI, H.; SUZUKI, T. Microbial Production of Xylitol from Glucose. **Applied Microbiology**, v. 18, p. 1031-1035, 1969.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25-33, 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, 1998.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. **Bioresource Technology**, v. 65, n. 3, p. 203-212, 1998b.

PEPPER, T.; OLINGER, P. M. Xylitol in sugar-free confections. **Food Technology**, v. 42, n. 10, p. 98-106, 1989.

PEREIRA, M. B. **Imobilização de biocatalisadores para hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Goiás. Goiânia, p. 74. 2019.

PRODUÇÃO de celulose. **Veracel**. Disponível em:  
<<http://www.veracel.com.br/nossas-operacoes/industrial/producao-de-celulose/>>.  
Acesso em: Setembro 2019.

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

RAMESH, S.; MUTHUVELAYUDHAM, R.; VIRUTHAGIRI, T. Application of factorial design to the study of xylitol production from corncob hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 4, p. 518-523, 2010.

RAO, R. S. *et al.* Xylitol production by *Candida* sp.: parameter optimization using Taguchi approach. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 8, p. 951-956, 2004.

ROBERTO, I. C. C. *et al.* Bioconversion of Rice Straw Hemicellulose Hydrolysate for the Production of Xylitol. **Seventeenth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**, p. 339-347, 1996.

ROBERTO, I. C. *et al.* Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource Technology**, v. 36, p. 271-275, 1991.

ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Influence of KLa on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. **Bioprocess Engineering**, v. 21, p. 505-508, 1999.

ROSA, M. F. *et al.* Cellulose nanowhiskers from coconut husk fibers: Effect of preparation conditions on their thermal and morphological behavior. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, p. 83-92, 2010.

SANTOS, A. M. **Fermentação alcoólica com levedura imobilizada em colmos de bambu e em fibra de coco**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alagoas. Maceió. 2008.

SANTOS, D.; MARTINEZ, F.; JUIZ, P. A fibra de coco como matéria-prima para o desenvolvimento de produtos: uma prospecção tecnológica em bancos de patentes. **Cadernos de Prospecção**, v. 12, n. 1, p. 12, 2019.

SANTOS, J. C. *et al.* Immobilized cells cultivated in semi-continuous mode in a fluidized bed reactor for xylitol production from sugarcane bagasse. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 531-535, 2005.

SANTOS, J. D. *et al.* Efeito dos tratamentos físicos e químicos no resíduo de lixadeira do algodão. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 28, n. 4, p. 919-923, 2004.

SARROUH, B. F. **Estudo da produção biotecnológica de xilitol em reator de leite fluidizado utilizando bagaço de cana-de-açúcar e células imobilizadas: Avaliação de parâmetros operacionais e viabilidade econômica**. Tese (Doutorado em Biotecnologia industrial) - Escola de Engenharia de Lorena. Lorena, p. 1-185. 2009.

SENDELIUS, J. **Steam Pretreatment Optimisation for Sugarcane Bagasse in Bioethanol Production**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Lund University. Lund. 2005.

SILVA, C. J. S. M.; ROBERTO, I. C. Statistical screening method for selection of important variables on xylitol biosynthesis from rice straw hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 743-747, 1999.

SILVA, D. D. V. *et al.* Improvement of Biotechnological Xylitol Production by Glucose During Cultive of *Candida guilliermondii* in Sugarcane Bagasse Hydrolysate. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 50, n. 2, p. 207-215, 2007.

SILVA, N. C. G. **Estudo da biotransformação de fenol por *Candida tropicalis* ATCC 750 livre e imobilizada em bagaço de caju**. Dissertação (Mestrado em engenharia Química) - Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2017.

SILVA, S. S. *et al.* Xylitol Formation by *Candida guilliermondii* in Media Containing Different Nitrogen Sources. **Journal of Basic Microbiology**, v. 34, p. 205-508, 1994.

SILVA, S. S. *et al.* Maximizing the Xylitol Production from Sugar Cane Bagasse Hydrolysate by Controlling the Aeration Rate. **Biotechnology for Fuels and Chemicals. Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 64, p. 557-564, 1997.

SILVA, S. S.; CHANDEL, A. K. (Eds.). **D-Xylitol - Fermentative Production, Application and Commercialization**. [S.l.]: [s.n.], 2012.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry Fundamentals and Applications**. 2. ed. Londres: Academic Press, 1993.

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

TANAKA, A.; NAKAJIMA, H. Application of Immobilized Growing Cells. **Bioprocesses and Applied Enzymology. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Berlin, v. 42, p. 97-131, 1990.

TEMPEL, V. D. T.; JAKOBSEN, M. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 263-270, 2000.

TIZAZU, B. Z.; ROY, K.; VIJAYANAND, M. Ultrasonic enhancement of xylitol production from sugarcane bagasse using immobilized *Candida tropicalis* MTC 184. **Bioresource Technology**, n. 268, p. 247-258, 2018.

TOCHAMPA, W. *et al.* A model of xylitol production by the yeast *Candida mogii*. **Bioprocess Biosystems Engineering**, v. 28, n. 3, p. 175-183, 2005.

TRABELSI, I. *et al.* Effects of *Lactobacillus plantarum* immobilization in alginate coated with chitosan and gelatin on antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 84-89, 2014.

VAN DAM, J. E. G. *et al.* Process for production of high density/high performance binderless boards from whole coconut husk: Part 1: Lignin as intrinsic thermosetting binder resin. **Industrial Crops and Products**, v. 19, p. 207-216, 2004.

VERACEL. Produção de celulose , 2019. Disponível em: <<http://www.veracel.com.br/nossas-operacoes/industrial/producao-de-celulose/>>. Acesso em: Setembro 2019.

VERBELEN, P. J. *et al.* Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation. **Biotechnol Letters**, n. 28, p. 1515-1525, 2006.

VIGNOLI, J. A.; CELLIGOI, M. A. P. C.; SILVA, R. 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. B9-B16, 2005.

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

WENDHAUSEN, R. J. **Estudo sobre utilização de crisotila como suporte de células de *Saccharomyces cerevisiae* para uso em processo contínuo de fermentação alcoólica e biorreduções**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, p. 5. 1998.

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

YLIKAHRI, R. Metabolic and Nutritional Aspects of Xylitol. **Advances in Food Research**, v. 25, p. 159-180, 1979.

ZANGIROLAMI, T. C. **Otimização da produção de xilitol a partir de xilose por *Candida parapsilosis* através de análise por superfície de resposta**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas. 1992.

ZHAO, J.; XIA, L. Ethanol production from corn stover hemicellulosic hydrolysate using. **Biochemical Engineering Journal**, n. 49, p. 28-32, 2010.