

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

IMPORTÂNCIA DO XILITOL NO METABOLISMO E SUA

OBTENÇÃO A PARTIR DE RESÍDUOS AGRÍCOLAS

Carim Abdalla

Engenheiro Agrônomo

Orientador:

Dr. Valdemiro C. Sgarbieri, Ph.D.

Professor da F.T.A., UNICAMP

Tese apresentada à Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

1973

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho à minha esposa Maria e a meus filhos Eduardo e Victor, meus companheiros em Campinas-SP.

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor André Tosello, Diretor da Faculdade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Criador da Tecnologia de Alimentos no Brasil; pela oportunidade concedida.

- Ao Professor Valdemiro C. Sgarbieri, Ph.D. em Nutrição e Bioquímica pela Universidade de Davis-California; por sua dedicada orientação.

- Ao Professor Metry Bacila, Bioquímico de renome mundial; pela indicação de pesquisadores na Europa.

- À Doublekay Research Group, centro de pesquisa na Suíça, pelo farto material bibliográfico, posto à disposição para o trabalho.

- À Professora Suzana Gonçalves, coordenadora do M.E.C.; pela amizade e confiança.

- Aos Professores Anis Rassi, Joffre Marcondes de Rezende e Heitor Rosa, do Departamento de Clínica Médica da U.F.Co.; pelo especial interesse no trabalho.

- À Professora Edith Blau, do Instituto de Ciências Biológicas da U.F.Co., pela tradução de textos em alemão.

- A todos que direta ou indiretamente auxiliaram para o bom êxito deste trabalho.

RESUMO

O xilitol é um penta-álcool derivado do xilano, é um adoçante calórico destinado a substituir o açúcar refinado na dieta normal. Porém, enquanto seu preço não se tornar competitivo, será restrito a tratamento de distúrbios metabólicos como o diabetes, pelo fato de seu consumo não depender da presença de insulina.

Entre os diversos processos experimentados para sua obtenção, encontrou-se que o mais aprovado atualmente é o químico a partir de resíduos como o bagaço de cana, pelo tratamento com ácido sulfúrico a 1,9%, na temperatura de 121°C; em que se obtém a hidrólise a xilose de 95,4% do xilano no tempo de 50 min. e relação sólido/líquido de 36:100. Opcionalmente pode-se utilizar temperatura de 100°C., perdendo-se parte do rendimento e com uma relação sólido/líquido desvantajosa, 6:100. A xilose resultante é então reduzida cataliticamente com níquel metálico, em autoclave a 1.700 p.s.i. na temperatura de 150°C. por 5 horas, conseguindo-se a conversão a xilitol de 85% da xilose processada e produzindo-se considerável quantidade de sub-produtos. Num estudo que objetivou a produção de 15.000 t/ano de xilitol, verificou-se que seu preço de venda seria de Cr\$ 1.300,00/t. gerando-se paralelamente 4.000 t. de furfural, 18.000 t. de dextrose, 5.000 t. de levedura industrial e 25.000 t. de lignina.

Encontrou-se que além do processo químico existem dois métodos microbiológicos bastante diversos entre si. Um que tem como ponto de partida o xilano, pela sua hidrólise a xilose, por ação da enzima xilanase elaborada por diversos microrganismos, em que se sobressaem Chaetomium trilaterale, Trichoderma viride, Aspergillus oryzae, Aspergillus batatae e especialmente, Streptomyces xylophagus, que se mostrou apto a hidrolisar completamente o xilano, com produção de 7,32 mg. de xilose, em tempo de 15 min. e em condições de pH muito vantajosa, de 7 a 8,6. A conversão da xilose em xilitol é realizada também enzimaticamente pela atividade de vários microrganismos, dos quais se ressaltam Pichia miao, Picrothecium verrucaria, Penicillium chrysogenum e Candida utilis.

O segundo método microbiológico utiliza como matéria prima a glico

se, proveniente da celulose ou do amido hidrolisado, melaço de cana, etc. Primeiramente, por ação de Debaryomyces hansenii a glicose é convertida em D-arabitol. Este poli-alcool é então oxidado por Acetobacter suboxidans, produzindo-se a D-xilulose, que é reduzida por Candida guilliermondii var. soya, resultando o xilitol como produto final.

SUMMARY

Xylitol is a polyol derived from xylan; it is a caloric sweetening agent which may substitute sucrose in common diet. However as long as its price is not competitive, its use will be restricted to the treatment of metabolic disorders, such as diabetes mellitus, as its utilization does not seem to depend on insulin.

Several methods have been tried for the obtention of xylitol. The most widespread nowadays is a chemical one. By treating crushed sugar cane with 1.9% sulfuric acid at 121°C, 05.4% of xylose is produced by hydrolysis of xylan within 50 minutes, the solid/liquid ratio being 36:100. When a temperature of 100°C is used, the efficiency decreases and solid/liquid ratio is disadvantageous - 6:100. By catalytic reduction of xylose in the presence of metallic nickel in autoclave at a temperature of 150°C for 5 hours, 85% of this compound is converted to xylitol and a variety of by-products are produced. In a study aiming the production of 15,000 t of xylitol in one year, it was estimated that the price of one ton would be G\$ 1,300.00; at the same time, 4,000 t of furfural, 18,000 t of dextrose, 5,000 t of industrial yeast and 25,000 t of lignin were produced.

Furthermore two microbiological methods for obtention of xylitol have gained acceptance: one uses xylan as starting material, upon its enzymatic hydrolysis xylose is formed. The enzyme is xylanase produced by several microorganisms, such as Chaetomium trilaterale, Trichoderma viride, Aspergillus oryzae, Aspergillus batatae and chiefly Streptomyces xylophagus, capable of hydrolysing all xylan with the production of 7.32 mg of xylose within 15 minutes at a pH ranging from 7 to 8.6. Conversion of xylose to xylitol is also due to enzymatic activity of a number of microorganisms, such as Pichia mico, Myrothecium verrucaria, Penicillium chrisogenum and Candida utilis.

The second microbiological method uses glucose as starting material, which may be obtained by hydrolysis of cellulose, starch, etc. First, through the action of Debaryomyces hansenii, glucose is converted to D-arabitol. This polyol is then oxidized by Acetobacter suboxidans, producing D-xylulose which on reduction by Candida guilliermondii var. soya, forms xylitol as end-product.

ÍNDICE GERAL

Resumo

Summary

I - Introdução	1
II - Metabolismo intermediário dos carboidratos e diabete	1
1 - Glicogênese	2
2 - Glicogenólise e glicólise	3
3 - Via pentose fosfato, "shunt" ou via hexose monofosfato	5
4 - Lipogênese	7
5 - Hormônios que regulam o metabolismo dos carboidratos	7
6 - <u>Diabetes mellitus</u>	11
7 - Causas do diabete	14
8 - Consequências do diabete	15
III - Metabolismo do xilitol e sua aplicação no diabete	19
IV - Tentativas de produção do xilitol a partir do xilano	26
1 - Fontes de xilano	26
a. Quantidade de material disponível	26
b. Natureza química das diversas matérias primas	28
2 - Métodos químicos de extração e hidrólise do xilano	31
3 - Métodos químicos de conversão da xilose em xilitol	36
4 - Métodos microbiológicos de produção de xilose	38
5 - Métodos microbiológicos de conversão de xilose em xilitol	45
V - Obtenção do xilitol a partir de glicose	51
VI - Considerações econômicas	57
VII - Discussão e conclusões	64
- Bibliografia	68

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>Nº</u>	<u>TÍTULO</u>	<u>PÁGINA</u>
1 -	Formação de glicogênio pelas hexoses comuns	3
2 -	Via glicolítica de Embden-Meyerhof	4
3 -	Via pentose fosfato e sua conexão com a via Embden Meyerhof	6
4 -	Esquema e Equação da síntese do ácido palmítico	8
5 -	Reações estimuladas pela insulina	9
6 -	Resumo de reações envolvendo a ativação de fosforilase no fígado	11
7 -	Vias metabólicas ativadas na gliconeogênese	16
8 -	Defeito da lipogênese no diabetes	18
9 -	Metabolismo do xilitol pelo ciclo do D-glicuronato/xilulose	21
10 -	Comparação de configuração dos D-acúcares	32
11 -	Hidrólise do xilano em estágio simples	41
12 -	Via metabólica dos carboidratos em <u>Candida</u>	49
13 -	Reações metabólicas conduzindo à síntese do xilitol a partir da glicose	52

ÍNDICES DE QUADROS

<u>Nº</u>	<u>TÍTULO</u>	<u>PÁGINA</u>
1 -	Alterações metabólicas introduzidas pela infusão de xilitol em observações a curto prazo	22
2 -	Alterações metabólicas introduzidas pela infusão de xilitol em observações de uma semana	23
3 -	Potencial brasileiro de produção de xilitol	27
4 -	Os cinco maiores produtores de algodão, arroz, cana e madeira . Safra 1971/72	27
5 -	Efeitos da concentração de ácidos, temperatura e tempo sobre a separação de pentosanos e hexosanos	33
6 -	Efeitos da concentração ácida sobre o tempo e rendimento da hidrólise	34
7 -	Produtos finais da hidrólise do xilano e sua quantidade	37
8 -	Produtos finais da hidrólise de xilo-oligosacarídeos	40
9 -	Produção de xilanase por vários fungos	43
10 -	Características gerais dos microrganismos envolvidos na hidrólise do xilano	44
11 -	Atividades de certos fungos em meio contendo D-xilose	47
12 -	Produção de xilitol por diversas leveduras	50
13 -	Tipo de pentitol produzido por leveduras tendo D-xilulose <u>co</u> mo substrato	54
14 -	Produção de xilitol a partir de glicose em tres fases	57
15 -	Produtos e valores obtidos de 1 tonelada de sabugos de milho	59
16 -	Fases de produção do xilitol	60
17 -	Despesas de produção de 15.000 t de xilitol	61
18 -	Custo industrial de produção de 15.000 t de xilitol	62
19 -	Custo relativo na produção de xilitol	63

I - INTRODUÇÃO

Na natureza, o açúcar se forma pela condensação de água e gás carbônico, participando a luz solar como um catalisador, no processo denominado fotossíntese. Na sua formação há portanto o armazenamento da energia solar, princípio que comanda a vida.

Na alimentação humana o açúcar desempenha um importante papel como nutriente energético e uma não menos destacada função no metabolismo, pois, é através de sua ingestão que o organismo inicia a síntese de outras substâncias importantes.

Pela dificuldade de sua absorção nos casos anormais, manifesta-se um bloqueio quase geral nas funções orgânicas e um estado de debilitação física sem igual. Por esse motivo e devido a problemas de ordem circulatória, o ser humano tem encontrado dificuldades funcionais no uso do açúcar tradicionalmente consumido, que é a sacarose.

A sacarose, após ingerida é imediatamente convertida nos açúcares simples para ser metabolizada, sendo que no caso do diabete, a sua utilização se faz de forma lenta ou nula, ocasionando excesso de glicose no sangue e carência de consumo.

São principalmente estes, os motivos que tem levado a ciência a pesquisar e descobrir um substituto para o açúcar mais usual, que é a sacarose, que além da sua doçura característica, proporcione o valor calórico da aquele carboidrato, e também, semelhantemente, se responsabilise pelo desencadeamento das reações químicas que se processam durante o metabolismo, em todo ou em parte.

II - METABOLISMO INTERMEDIÁRIO DOS CARBOIDRATOS E DIABETE

Absorvidos pelo sistema porta, todas as "oses" são levadas ao fígado, onde os açúcares simples assimiláveis são convertidos em glicose. Parte destes açúcares são enviados à circulação geral, após ultrapassar a barreira hepática. No fígado a glicose é consumida no metabolismo local ou é po

limerizada e armazenada sob a forma de glicogênio. Porém, antes de ser utilizada pelo fígado e tecidos, a glicose precisa penetrar na célula, isto é, atravessar a membrana celular, o que constitui a primeira e fundamental etapa de sua metabolização. Após esta, um segundo processo ocorre, a fosforilação da glicose, com formação da glicose-6-fosfato. Em ambas as fases a insulina desempenha um papel de suma importância (8).

Os principais destinos da glicose no fígado e tecidos são: transformação em glicogênio, oxidação (glicólise) e conversão em gorduras.

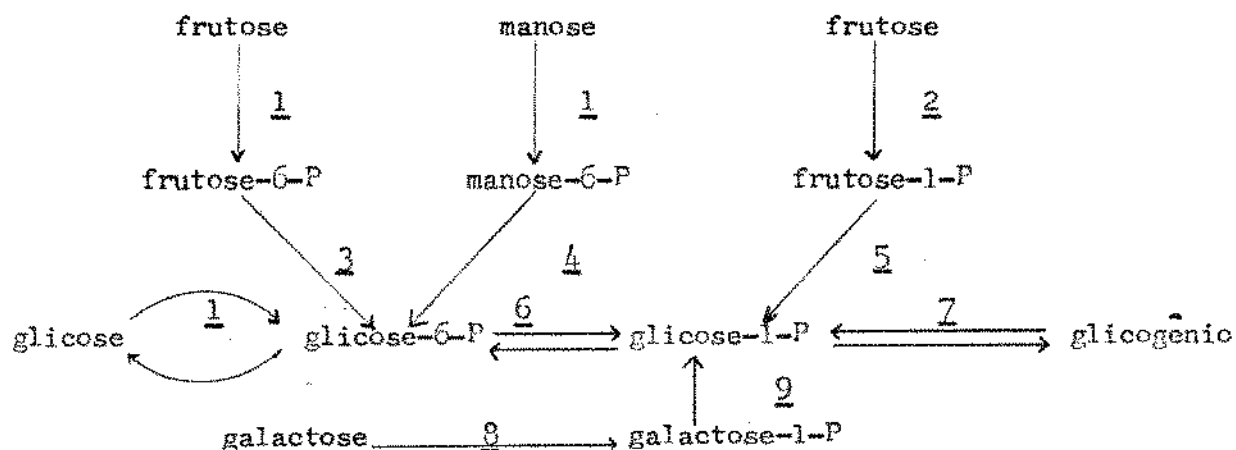
1 - Glicogênese

É a síntese do glicogênio a partir da glicose. Ocorre em praticamente todos os tecidos do corpo e representa uma forma de armazenamento da glicose. No músculo, seu desdobramento fornece energia para a contração e, no fígado libera glicose, que é utilizada no metabolismo local e de outros tecidos. O fígado é o órgão mais rico em glicogênio, com cerca de 5%. Embora o teor desta substância nos músculos seja inferior ao do fígado, o glicogênio muscular representa mais do dobro do glicogênio hepático, devido à grande massa daquele tecido.

A glicose que transpõe a membrana celular, é fosforilada, formando a glicose-6-fosfato, pela ação da hexoquinase, sendo o fósforo cedido pelo ATP (trifosfato de adenosina). Pela ação de outra enzima, a fosfoglicomutase, a glicose-6-fosfato é transformada em glicose-1-fosfato, a qual entra na formação do glicogênio, com liberação de fósforo. A liberação da glicose de seu éster, exige a ação da enzima fosfatase, ausente nos músculos, razão esta, que limita a utilização do glicogênio muscular apenas pelo músculo e somente o glicogênio do fígado pode suprir a corrente sanguínea.

A glicogênese e a glicogenólise são influenciadas por uma série de fatores, como sejam o suprimento de glicose, a atividade de vários hormônios (insulina, glucagon, adrenalina, glicocorticóides, etc.) e a presença de enzimas específicas. A figura 1, representa esquematicamente a formação de glicogênio pelas hexoses comuns.

Figura 1 - FORMAÇÃO DE GLICOGÊNIO PELAS HEXOSES COMUNS



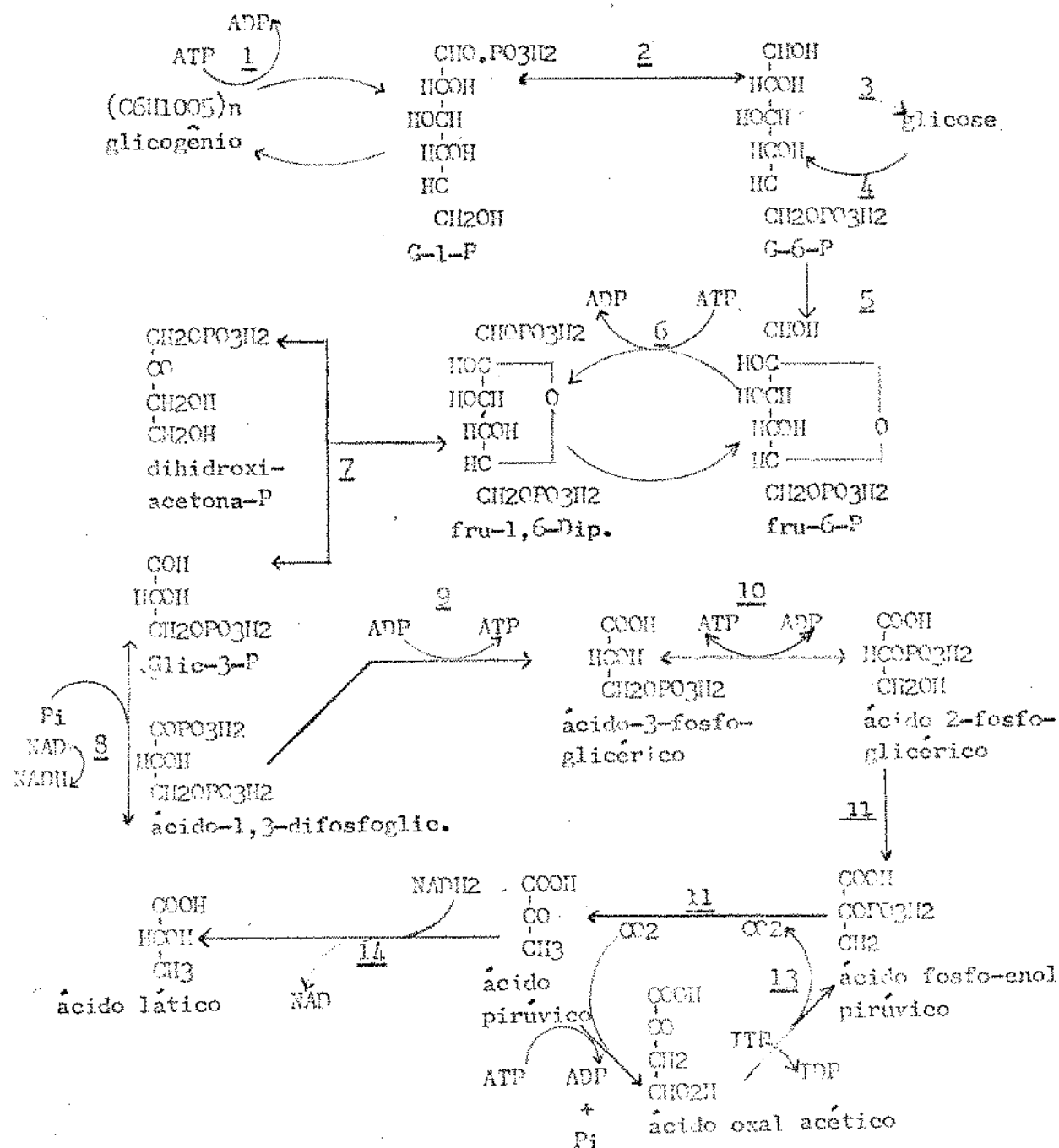
Enzimas envolvidas no processo: 1-hexoquinase; 2-frutoquinase; 3-frutoisomerase; 4-manoseisomerase; 5-isomerase; 6-fosfoglicomutase; 7-fosforilase; 8-galactokinase; 9-UDP-galactose-4-epimerase.

Reproduzido de DOULOFFU, V.; A.D.MARENZI: Química biológica. Rio. Ed. Koogan 1955, 434-442.

2 - Glicogenólise e Glicólise

A principal via de degradação do glicogênio é a glicogenólise seguida da glicólise que consiste na oxidação da glicose proveniente do glicogênio, a lactato e piruvato, através da transformação da glicose-6-fosfato em frutose-6-fosfato e, em seguida em frutose-1,6-difosfato, que dá origem a uma série de produtos intermediários com 3 átomos de carbono, iniciando-se pelo gliceraldeído-3-fosfato e atingindo a fase de ácido pirúvico. A cada molécula que se converte em ácido pirúvico são liberadas uma molécula de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) e duas de ATP (trifosfato de adenosina). Várias enzimas participam do processo, sendo que algumas reações são francamente reversíveis. A conversão de piruvato em glicogênio envolve enzimas diferentes das que atuam na glicólise, conforme mostra o esquema da figura 2. Como se verifica, a glicose-6-fosfato é composto de grande importância, representando um ponto de junção de diversas vias metabólicas como a

Figura 2 - VIA GLICOLÍTICA DE EMBDEN-MEYERHOF



Enzimas envolvidas: 1-fosforilase. 2- fosfoglicomutase. 3-fosfatase. 4-hexoquinase. 5-fosfohexoisomerase. 6-fosfofrutoquinase. 7-aldolase. 8-gliceral deido-3-fosfo desidrogenase. 9-fosfogliceroquinase. 10-fosfogliceromutase. 11-enolase. 12-carboxilase pirúvica. 13-carboxiquinasefosfoenolpirúvica. 14-desidrogenase láctica.

Modificado de HARPER, H.A. Review of Physiological Chemistry. Calif. - U.S.A. Lange Medical Pub. 1969, 244-277.

glicólise, via pentose fosfato, glicogênese e glicogenólise. (47).

O processo de oxidação da glicose tem duas fases diferenciadas: a primeira é a glicólise, que corresponde à fase anaeróbica da contração muscular, que termina na formação de ácido pirúvico, o qual pode reduzir-se a ácido láctico. A segunda que corresponde à fase aeróbica da contração muscular, é aquela em que se realiza a oxidação do ácido pirúvico. O ácido láctico formado em anaerobiose, quando se oxida, deve passar primeiro pela forma de ácido pirúvico. Este converte-se assim, no centro do metabolismo oxidativo dos glicídios, enquanto que o ácido láctico é um produto de redução do ácido pirúvico, originado pela ação deste como aceitador de hidrogênio. Em anaerobiose, praticamente todo o ácido pirúvico é conduzido a ácido láctico.

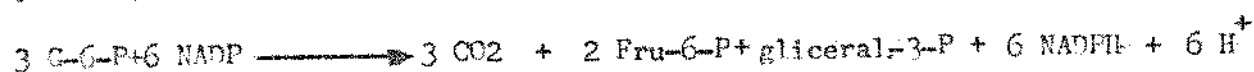
A glicogenólise hepática como a muscular é acelerada pela adrenalina e inibida pela insulina. A reação de hidrólise da glicose-6-fosfato a glicose e fosfato, de grande importância no caso do fígado, não se processa no músculo. Explica-se assim porque o glicogênio muscular não permite manter a glicemia, pois o glicogênio muscular não produz primordialmente glicose.

3 - Via pentose-fosfato, "Shunt" ou Via Hexose-Monofosfato (3)

É uma variante importante de degradação de glicose, constituindo-se num desvio da Via Embden-Meyerhof, com liberação de metabólitos que de novo penetram nesta via metabólica. É uma alternativa que ocorre principalmente no fígado, tecido adiposo e glândulas mamárias. A diferença principal entre as duas vias é que na Embden-Meyerhof o co-fator é o NAD ao passo que no ciclo das pentoses é utilizado o NADP.

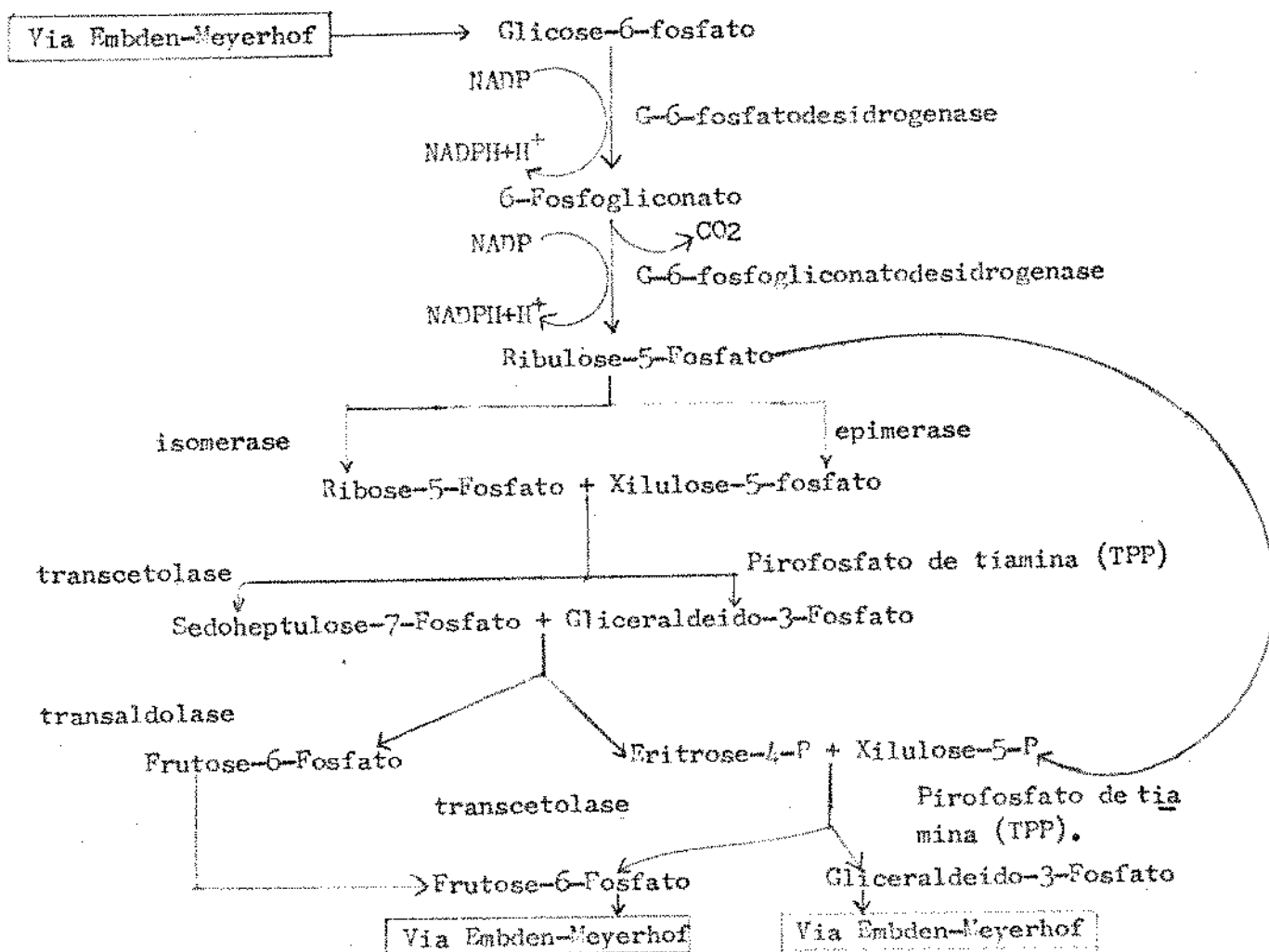
A sequência de reações (fig. 3) consta sumariamente do seguinte: Através da formação de intermediários, 3 moléculas de glicose-6-fosfato dão origem a 3 moléculas de ribulose-5-fosfato e 3 moléculas de CO₂. Das 3 moléculas de ribulose-5-fosfato, duas se transformam em xilulose-3-fosfato e uma em ribose-5-fosfato. Os 10 átomos de Carbono de uma molécula de xilulose-5-fosfato e uma de ribose-5-fosfato, sofrem um novo arranjo, com formação de uma molécula de sedoheptulose-7-fosfato e uma molécula de gliceraldeído-3-

fosfato. Os 10 átomos das duas moléculas voltam a se arranjar formando a eritrose-4-fosfato e a frutose-6-fosfato. Esta última volta a penetrar na Via Embden-Meyerhof. Finalmente, os átomos de carbono da eritrose-4-fosfato e os da molécula restante de xilulose-5-fosfato se combinam, formando uma molécula de frutose-6-fosfato e uma de gliceraldeído-3-fosfato, que também voltam a integrar a Via Embden-Meyerhof. Portanto, partindo de 3 moléculas de glicose-6-fosfato, o resultado final da Via Hexose Monofosfato é a formação de duas moléculas de frutose-6-fosfato e uma de gliceraldeído-3-fosfato, com liberação de 3 moléculas de CO₂.



Estima-se que 10 a 50% da degradação da glicose seja realizada por esta via.

Figura 3 - ESQUEMA DA VIA PENTOSE FOSFATO E SUA CONEXÃO COM A VIA DE EMBDEN-MEYERHOF



Modificado de ARDUINO, F. Diabetes Mellitus e suas complicações. Rio Liv. Atheneu - 1962. 1-16.

4 - Lipogênese

A transformação da glicose em gorduras é o principal meio de que dispõe o organismo para armazenar as calorias fornecidas pelos carboidratos. Vários tecidos podem realizar esta síntese. Cabendo ao fígado encarregar-se de 5% do total da lipogênese, sendo que no tecido adiposo é onde se realiza a maior parte do processo (4).

A síntese das gorduras se inicia pela condensação de uma molécula de acetil - CoA com uma molécula de malonil - CoA, resultando após a formação dos compostos intermediários, a produção dos ácidos graxos de cadeias longas; como se observa na figura 4.

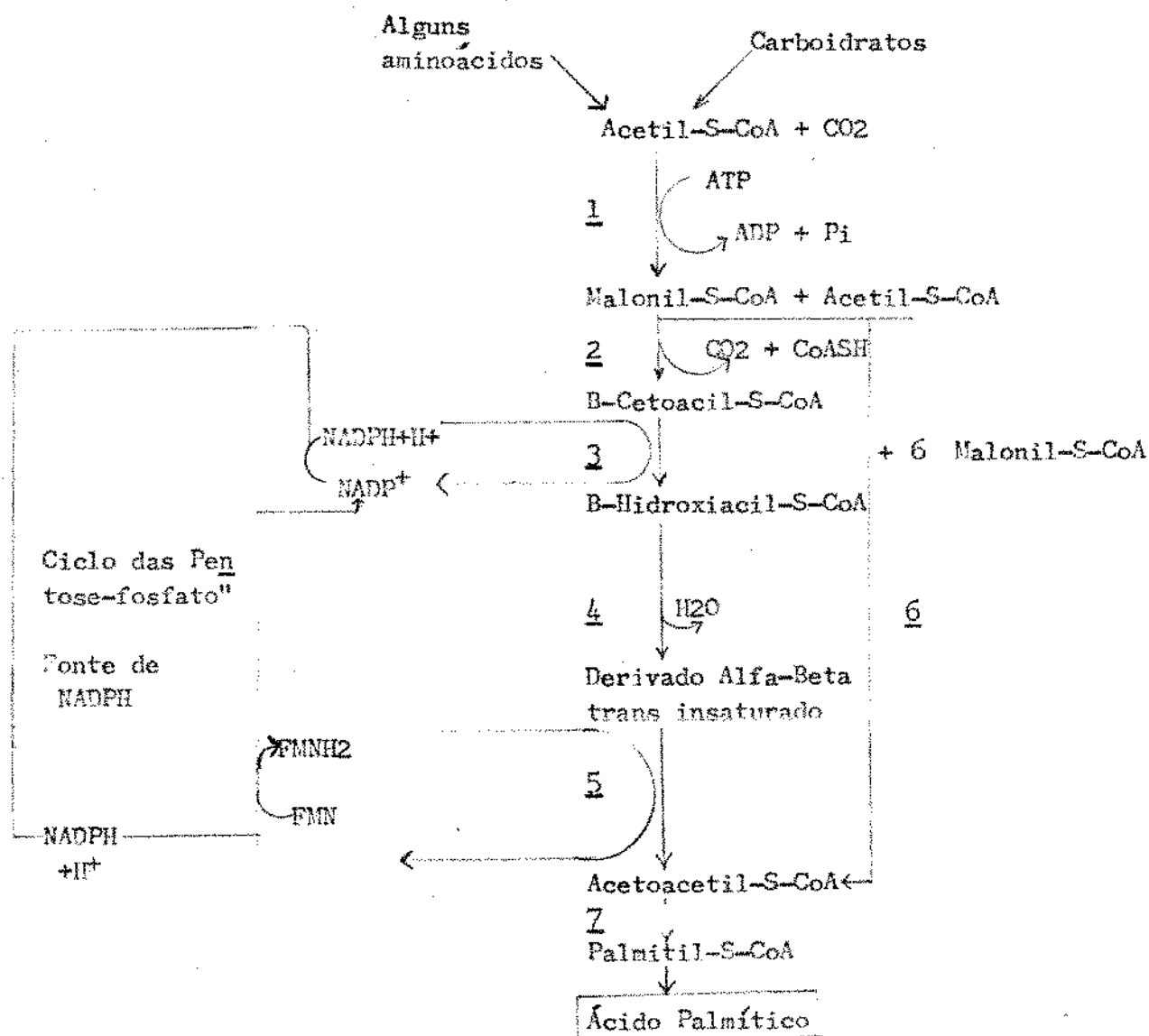
Esta síntese é estimulada pela glicólise, permitindo-se deduzir que a via pentose-fosfato é a que mais auxilia o fenômeno. Pois há evidência de ser o NADPH gerado neste ciclo, o fator indispensável à síntese das gorduras. A interrupção deste processo aliado à deficiência de insulina durante o diabetes seria a causa de inibição da lipogênese.

5 - Hormônios que regulam o metabolismo dos carboidratos

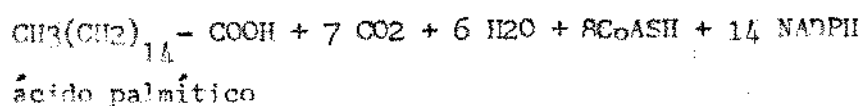
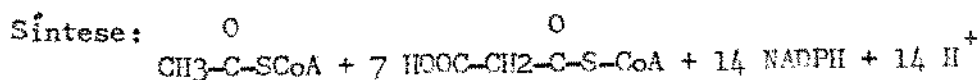
O controle do metabolismo dos carboidratos é exercido pela ação de diversos hormônios, cujo excesso ou falta provocam desvios metabólicos de sérias consequências.

A insulina é um hormônio protéico constituído de duas cadeias, A e B. A primeira é formada de 21 resíduos de aminoácidos e a segunda de 30. A sua produção é realizada nas células beta do pâncreas podendo aí ser armazenada nos grânulos citoplasmáticos, ou, ser liberada na circulação como solicitação da hiperglicemia. A glicose é comprovadamente a substância que melhor estimula a secreção da insulina. A administração deste hormônio provoca uma imediata hipoglicemia. A sua ação é portanto de regulação do nível, mantendo nas condições normais uma taxa de 80 a 100 mg glicose/100 ml. de sangue.

Figura 4 - ESQUEMA E EQUAÇÃO DE SÍNTESE DO ÁCIDO PALMÍTICO



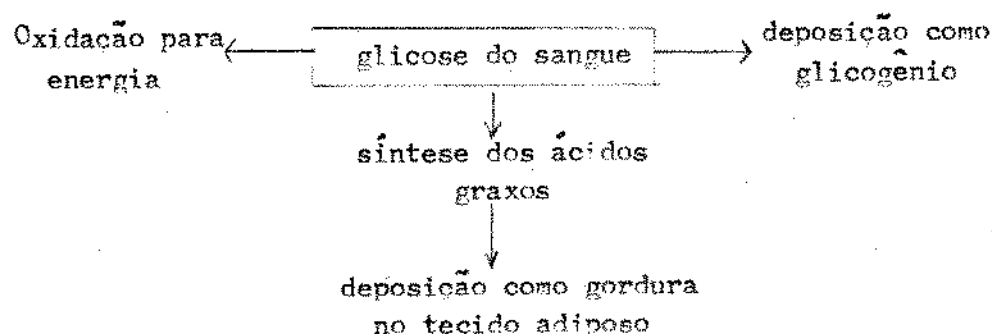
1-Acetil-S-CoA carboxilase. 2-Enzima de condensação. 3-B-cetoacil redutase. 4-Hidrase. 5-Redutase. 6-Acil transferase. 7-Palmitil desacilase.



Modificado de CONN, E.R.; STUMPT, P.K. Manual de Bioquímica. S. Paulo Ed. Edgard Blucher. 1972. 251-252.

A atividade metabólica da insulina tem os seguintes efeitos:
a) aumento da conversão de glicose em glicogênio. b) aumento da oxidação periférica da glicose; c) inibição da gliconeogênese hepática a partir das proteínas e das gorduras; d) facilitação da lipogênese e da proteogênese. (fig.5).

Figura 5 - REAÇÕES ESTIMULADAS PELA INSULINA



Reproduzido de BENDER, A.E. "Dietetic Foods". New York - U.S.A. Chemical Publication Company Incorporation - 1967. 20-27.

Porém, a sua maior importância é a de permitir à glicose a transposição da membrana celular; e, é mediante este processo que a glicose sofrerá sua metabolização, conforme os esquemas já estudados nas figuras 2 e 3. A posterior fosforilação da glicose em glicose-6-fosfato é um passo importante na metabolização deste carboidrato, na dependência da insulina mas, não da forma realmente comprovada.

Intervêm também no metabolismo dos glicídios, os hormônios do lobo anterior da hipófise, que tem tendência de elevar os níveis de glicose e antagonizar portanto, a ação da insulina. São os hormônios, ACTH (adrenocorticotropina), hormônio do crescimento e hormônio diabetogênico. Pelas simples extirpação desta glândula, observa-se aumento no consumo de glicídios, hipoglicemia, diminuição do glicogênio e da gliconeogênese. Enquanto que, pela administração de seu extrato há aumento de glicemia e da gliconeogênese e deposição de glicogênio. Por essas razões, a extirpação da hipófise atenua no animal muitos dos transtornos do diabetes pancreático. (4).

A tiroxina, hormônio produzido pela tireóide pode ser considerado como interferente da glicose sanguínea, pela sua ação diabetogênica, comprovada pelo fato de que, a tireoidectomia inibe o desenvolvimento do diabetes. (4).

A cortex suprarenal secreta os hormônios esteróides, dos quais, os glicocorticóides são os mais importantes. Cortisona, hidrocortisona, corticosterona e a deidro cortisona, que exercem ação antagônica à insulina, pela elevação do nível de glicose no sangue que, conseqüentemente, provoca maior demanda deste último hormônio, também pelo aumento do catabolismo protéico e pela inibição do consumo de glicose muscular.

A epinefrina, secretada pela medula da suprarenal, estimula a glicogenólise, isto é, a transformação do glicogênio em glicose, provocando, como no caso anterior, uma elevação no nível de glicose e maior demanda de insulina. (4).

O glucagon é hormônio produzido pelas células alfa das ilhotas de Langerhans, do pâncreas. Sua secreção é estimulada pela hipoglicemia e funciona portanto, como um fator hiperglicemiante, pela ativação da fosforilase que provoca uma glicogenólise. A sua atividade é portanto semelhante aos demais hormônios que tem ação antagônica à insulina, se bem que seus mecanismos sejam diversos.

A epinefrina e o glucagon tem um ponto de atuação específica no estímulo da produção do ácido adenílico cíclico (AMP). Este composto é exigido na transformação da fosfofosforilase inativa em fosfofosforilase ativa, dando como conseqüência um aumento na produção de glicose a partir do glicogênio do fígado, devido à maior fosforilação pelo ATP. Conforme se mostra na figura 6, a fosfofosforilase inativada pela ação da enzima fosfofosforilase fosfatase, transforma-se em defosfo-fosforilase. Segue-se a reativação pelo ATP e ação de outra enzima, a defosfo-fosforilase quinase, a qual é ativada pelo ácido 3,5-adenílico, um derivado cíclico do AMP (monofosfato de adenosina). A função do glucagon e da epinefrina é no sentido de estimular o sistema enzimático adenil ciclase, que realiza a transformação de ATP em AMP cíclico. Inversamente verifica-se que, a insulina tem efeito depressor sobre este sistema enzimático. (13).

O diabetes é uma doença tão antiga quanto o homem, sua incidência é universal embora menos frequente na Índia, China e Japão, provavelmente por influência climática, alimentar e racial, afetando principalmente os indivíduos de meia idade e os velhos. Por esta razão, o aumento da média de vida tem provocado o aparecimento de maior número de casos.

Na sùmula histórica, diversos marcos destacaram o progresso dos trabalhos clínicos e realçaram a pesquisa em torno de seu comportamento.(2).

O papiro Ebers, documento médico egípcio escrito há aproximadamente 1.500 anos A.C., faz referência a uma doença caracterizada pela emissão frequente de urina.

Celsus, médico romano, 30 anos A.C., fez descrições da doença como uma poliúria indolor.

Aretaeus, médico romano 30 anos D.C., criou o termo diabetes (que significa: passar através) , pelo fato do sintoma mais aparente ser semelhante a drenagem d'água.

Galeno (131-201 da era Cristã) considerou o mal como proveniente de mal funcionamento dos rins.

Os hindús (séc. VI) descreveram alguns sintomas.

Avicena (980-1027), médico árabe forneceu um quadro de evolução da doença, observando a perda das funções sexuais como um de seus sintomas.

Paracelsus (1493-1541), obteve um resíduo branco, por evaporação de urina de diabéticos e o qualificou como sal.

Brunner (1682) verificou que a extirpação do pâncreas provoca poliúria, mas não correlacionou o fato ao diabetes.

Dobson (1776) observou que o sangue dos diabéticos contém um açúcar fermentável.

Cawley (1788) correlacionou a ocorrência do diabetes a distúrbios do pâncreas.

Rollo (1796) assinalou o hálito cetônico em paciente de diabetes e propôs a primeira dieta restritiva.

Chevreu (1815) estabeleceu a identidade entre o açúcar da urina do

diabético e o açúcar de uvas, ao qual Peligot em 1838 deu o nome de glicose.

Fehling (1848) introduziu o reagente que tomou o seu nome para pesquisa de glicose.

Bouchardat (1850) utilizou-se dos métodos de fermentação e de redução do cobre para a pesquisa da glicose da urina.

Petters (1857) identificou a cetona na urina num caso de coma diábetico.

Claude Bernard (1860) atribuiu o diabete a um excesso de produção de açúcar pelo fígado, descobrindo sua função glicogênica.

Langerhans (1869) descobriu as ilhotas celulares no pâncreas.

Meringe e Minowski (1889) verificaram que a extirpação do pâncreas no cão, provoca o surgimento de sintomas semelhantes aos do diabete humano.

Ssobolev e Schulze (1902), trabalhando independentemente, vislun-braram a possibilidade da obtenção de um extrato de ilhotas, para o tratamento do diabete.

Massiglia (1912) demonstrou que a glicosúria do diabete resulta da destruição das ilhotas e não do tecido acinoso do pâncreas.

Banting e Best (1922) produziram a primeira injeção de insulina, cabendo ao primeiro, por essa razão o Prêmio Nobel de Medicina.

Houssay (1929) e seus colaboradores na Argentina demonstraram a relação existente entre a hipófise e o pâncreas. Merecendo por essa razão o Prêmio Nobel de Fisiologia.

Hagedorn (1936) conseguiu prolongar o efeito da insulina pela adi-ção de protamina.

Young (1937) provocou diabete permanente em animais, mediante a injeção de extratos de lobo anterior da hipófise.

Krayebuhl e Rosenberg (1949) obtiveram a insulina NPH, que veio a-crescentar facilidades no tratamento da doença.

Hallas-Moller (1951) obtiveram a insulina lenta, de ação retardada, sem protamina.

Staub (1953) obteve o glucagon sob forma cristalina.

7 - Causas do Diabete

a. Deficiência de insulina

No diabete a hiperglicemia ocorre como resultado da diminuição do transporte e aumento da glicose nos músculos e tecido adiposo. A falta de in sulina diminui o consumo de glicose, assim como a formação de glicogênio he pático, e a formação de ácidos graxos a partir de glicose, provocando a hiperglicemia. Este quadro é agravado pela maior intensidade de ação das gliconeogênese hepática, formando-se glicose a partir de aminoácidos, glicerol, ácido láctico e outras substâncias, a qual passa à circulação. Verifica-se si multaneamente uma mobilização das gorduras e maior oxidação dos ácidos graxos no fígado. (28).

Em geral, a deficiência de insulina resulta em um desequilíbrio de controle inter-hormonal ocorrendo uma situação que favorece a ação dos cor ticoesteróides, hormônio do crescimento e glucagon; além do estímulo da gliconeogênese, da lipólise e à diminuição do metabolismo intracelular de gli cose.

b. Falta de hexoquinase

A enzima hexoquinase, que cataliza a reação de fosforilação, trans formando glicose em glicose-6-fosfato, foi descoberta em levedura por Meyer hof em 1927. Esta enzima apresenta pouca especificidade visto catalisar a transferência do fosfato do ATP não somente para a glicose, como também para a frutose, manose e glicosamina. A velocidade relativa da reação depende da concentração dos carboidratos na solução, sendo a frutose fosforilada com mais rapidez quando em maior concentração (28).

O primeiro passo indispensável à metabolização da glicose é a sua fosforilação pelo ATP, isto é, sua esterificação a glicose-6-fosfato. Parece não haver dúvidas de que este processo seja regulado pela insulina, en quanto que o isomerismo da frutose-6-fosfato em glicose-6-fosfato não re quer este hormônio. A falta de fosforilação da glicose sugere um bloqueio na

síntese da hexoquinase. A inalteração do nível de fósforo no sangue de pacientes diabéticos após a injeção de glicose é também interpretada como consequência da falta de fosforilação da glicose.

A ação da insulina sobre a hexoquinase pode ser inibida por extratos do lobo anterior da hipófise e do córtex suprarenal. Por outro lado, a ação inibidora desses hormônios pode ser neutralizada pela insulina.

O fator limitante da utilização de glicose pela célula é a sua fosforilação. Admite-se porém, ser este fato também decorrente do bloqueio do transporte de glicose da membrana celular, o qual não se realiza na ausência da insulina, na maioria dos tecidos. (2)

8 - Consequências do diabetes

a. Incapacidade de metabolizar glicose ao nível celular

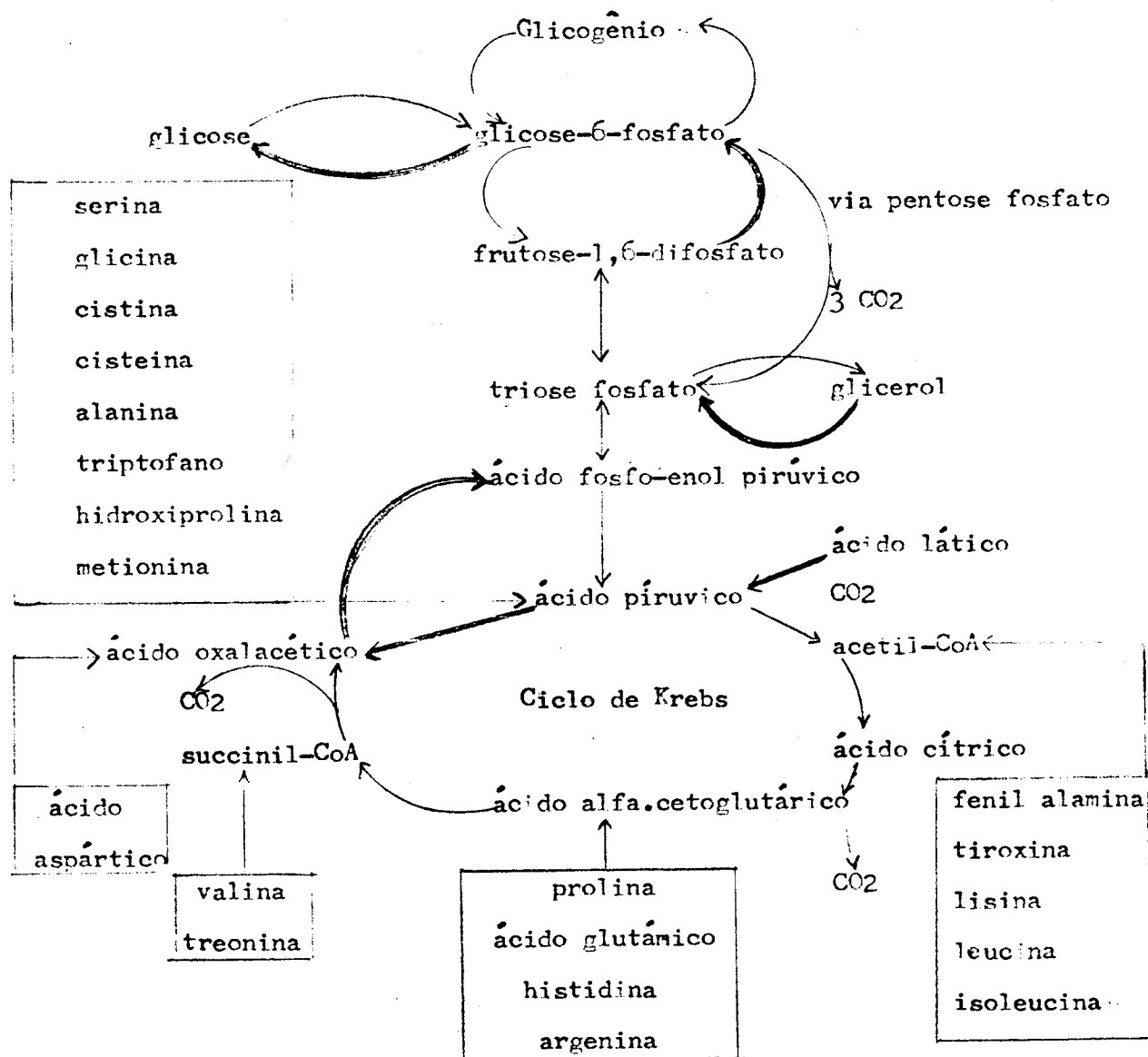
Havendo esta incapacidade de transporte através da membrana celular e conseqüentemente, da metabolização normal da glicose devido à falta de insulina, haverá um acúmulo de glicose no sangue resultando uma hiperglicemia. Se o valor da glicemia ultrapassa a capacidade de reabsorção tubular dos rins (160 a 180 mg./100 ml. de sangue) produz-se uma glicosúria, que durará enquanto a hiperglicemia se mantiver.

b. Ativação da gliconeogênese. Ativação da lipólise, cetose e acidose.

A insulina além de facilitar e tornar possível a síntese das proteínas, exerce também ação inibitória da gliconeogênese, isto é da formação de glicose a partir de substâncias não glicídicas, como proteínas e gorduras. A figura 7 ilustra como se processa a entrada dos aminoácidos no metabolismo dos carboidratos e as rotas principais, que sofrem maior afluxo.

No diabetes está acelerada a velocidade do catabolismo dos aminoácidos a CO_2 e H_2O , bem como, a conversão em glicose no fígado. Calcula-se que a quantidade de carbono protéico equivalente a 1 g. de nitrogênio urinário é suficiente para formar 8,3 g. de glicose. Conseqüentemente, a relação dextrose/nitrogênio

Figura 7 - VIAS METABÓLICAS ATIVADAS NA GLICONEOGÊNESE



Modificado de HARPER H.A., Review of physiological chemistry. California U.S.A. Lange Medical Publication. 1969. 244-277.

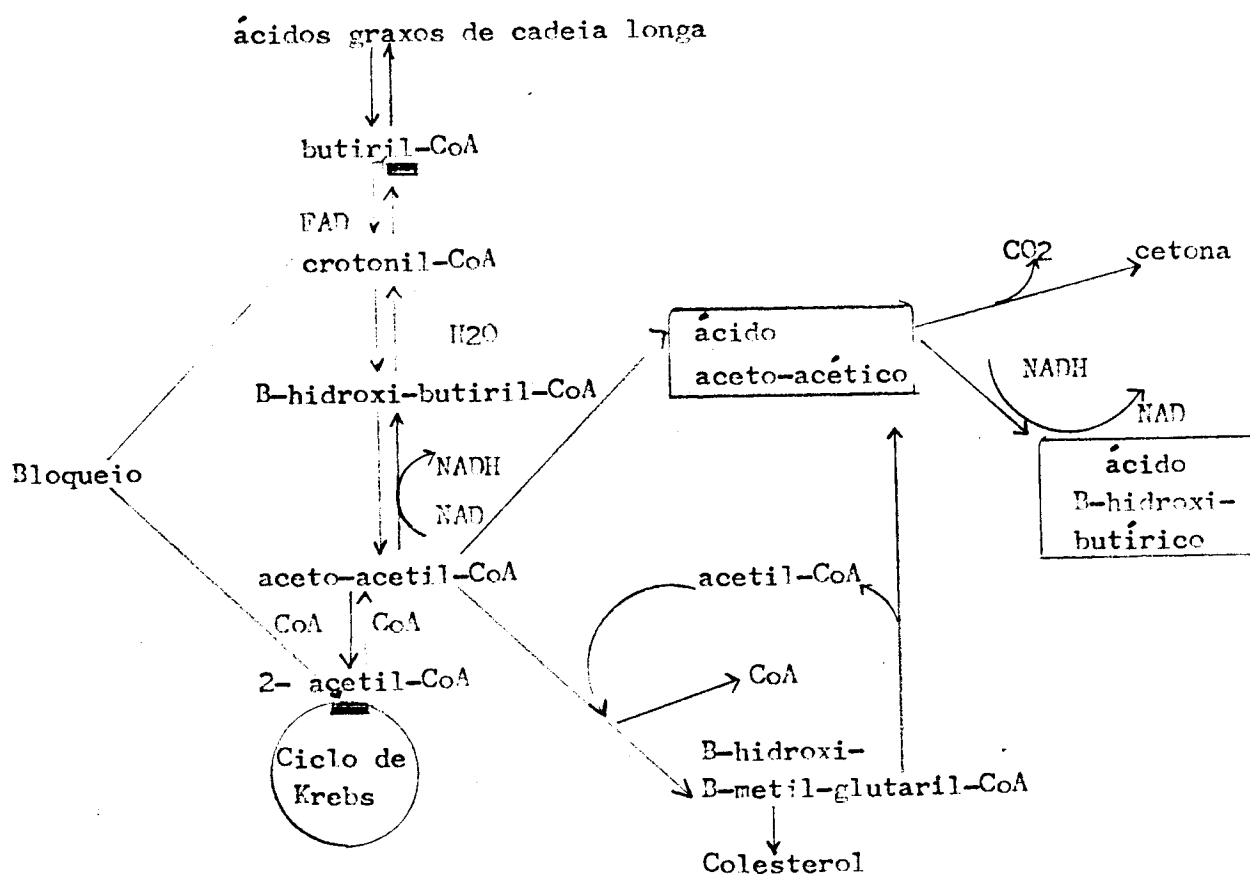
que no diabético é aproximadamente 3, indica a conversão a glicose de cerca de 33% do carbono protéico metabolizado. Embora a depleção de glicogênio acelere as reações de desaminação e transaminação hepática esta parece não ser a única explicação para a aceleração da gliconeogênese no diabete. No fígado dos diabéticos, está aumentada a atividade dos trasaminases que catalizam a transformação dos aminoácidos glicogênicos em compostos intermediários do catabolismo dos carboidratos. Há também, aumento da atividade da frutose-1,6-fosfatase e da glicose-6-fosfatase; ambas as enzimas facilitam a formação de glicose à custa de ácido pirúvico. Aparentemente está também aumentada a atividade da enzima que catalisa a conversão do ácido oxalacético em fosfo-enol pirúvico. Todas essas alterações aceleram a gliconeogênese hepática.

Na ausência de insulina, não somente acelera-se o catabolismo protéico, como também diminui a síntese protéica, posto que esta é estimulada pela insulina. Em parte explica-se esse efeito anabólico da insulina pela sua ação economizadora de proteínas, na presença de suprimento adequado de glicose intracelular. Assim, na presença de insulina, diminui a gliconeogênese e aumenta a glicólise, dessa maneira os aminoácidos que estavam sendo catabolisados ou transformados em glicose, tornam-se disponíveis para a síntese protéica. A insulina também aumenta a incorporação dos aminoácidos nas proteínas, por uma ação, aparentemente, independente do seu efeito no metabolismo da glicose. Além de aumentar o transporte de aminoácidos para as células, nas quais a síntese protéica foi bloqueada.

Como resultado da ativação do catabolismo protéico, acentua-se o ritmo da ureogênese uma das causas da elevação da uréia sanguínea durante a acidose diabética. No entanto, a degradação das gorduras no processo diabético prossegue normalmente, visto não haver ausência de co-fator exigido para o processo de oxidação das gorduras. Contrariamente, verifica-se uma inibição da lipogênese, síntese das gorduras, descritas na página 7 e explicada com a formação do ácido palmítico na figura 4. Na falta de insulina, ou na sua produção insuficiente, ou ainda na sua possível elaboração de forma

qualitativamente inferior, ocorre uma menor recuperação da NADPH na via pentose fosfato, resultando em bloqueio da síntese dos ácidos graxos (fig. 8), havendo então, um acúmulo de crotonil-CoA, beta-hidroxi-butiliril e acetil-CoA. Não sendo possível a síntese dos ácidos graxos de cadeia longa, devido à interrupção do processo, a opção para o acetoacetil-CoA será a transformação em ácido acetoacético, o qual originará cetona por perda de CO₂ (cetose) ou então, sofrerá redução produzindo ácido hidroxi-butírico (acidose).

Figura 8. - DEFEITO NA LIPOGÊNESE NO DIABETE



Modificado de ARDUINO, F. Diabetes Mellitus e suas complicações. Rio Liv. Atheneu - 1962. 1-16.

A produção dos ácidos acetoacéticos e beta-hidroxi-butírico em excesso, ultrapassa a capacidade de consumo pelos tecidos e a sua excreção pelos

rins. Em consequência, estes ácidos vem a invadir os líquidos orgânicos originando a acidose metabólica. Segue-se uma queda do bicarbonato devido à reação do sódio com os ácidos mencionados, provocando o abaixamento do pH dos líquidos orgânicos. Os rins, através de um mecanismo de compensação, secretam íons hidrogênio para trocá-los por bases fixas, que são reabsorvidas; e também, secretando amônia que se destina a substituir as bases. Semelhantemente, os ossos podem ceder cerca de 15% de seu conteúdo em sódio. Se o processo continuar e o fornecimento de corpos cetônicos vier a esgotar a capacidade do organismo em recuperar o bicarbonato, haverá acentuação da acidez do plasma, vindo o paciente a expirar, quando o pH cair abaixo de seus valores normais (7,38 a 7,42) para 6,8.

III - METABOLISMO DO XILITOL E SUA APLICAÇÃO NO CONTROLE DO DIABETE

Vários trabalhos tem sido realizados, visando esclarecer muitos pontos ainda obscuros com relação ao metabolismo da insulina e sua associação com os estados de morbidez. Importantes informes foram acrescentados sobre a relação entre os diversos hormônios e o diabete, os distúrbios com os eletrólitos no curso da acidose diabética, o metabolismo intermediário dos carboidratos, proteínas e gorduras, o destino e o mecanismo de ação da insulina, o desenvolvimento de técnicas para sua dosagem.

Dentre várias hipóteses levantadas, a maioria dos estudiosos tem atribuído dois papéis importantes de ação deste hormônio: O transporte da glicose através da parede celular e sua fosforilação, no interior da célula.

Inicialmente se acreditou que a função do xilitol bem como de certas pentoses no metabolismo fosse a de estimular a secreção insulínica pelo pâncreas o que definitivamente não se confirmou, apesar da insistência com que se tentou elucidar este aspecto.

Montague e Taylor (29) experimentaram o efeito da xilose, glicose e xilitol em animais portadores de diabete, encontrando que a xilose e o xilitol são excelentes estimuladores da secreção de insulina, porém, em inten-

tidade muito inferior à glicose. Perceberam entretanto, efeito positivo no metabolismo deste polialcool, vislumbrando uma possibilidade de sua ação independente da presença de insulina.

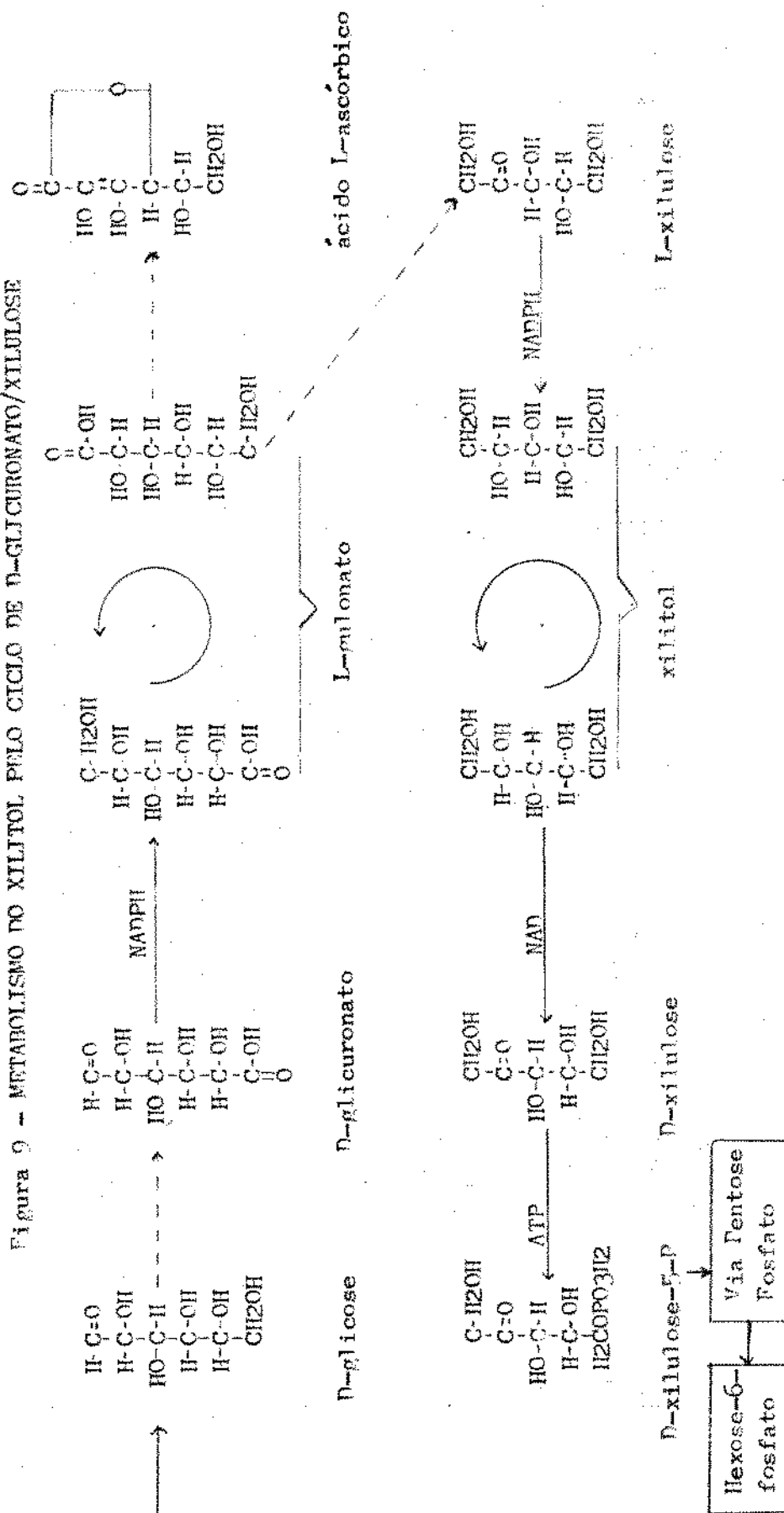
McCormick e Touster (23) realizaram ensaios bioquímicos em animais submetidos à administração de xilitol e verificaram que realmente este polialcool é independente de insulina para transpor a membrana celular, visto que sua metabolização se verifica através do ciclo D-glicuronato/xilulose, seguindo pela Via Pentose Fosfato (fig. 9), não requerendo a presença de insulina como ocorre na Via Embden-Meyerhof.

Restaria determinar-se o significado fisiológico desta descoberta já que a Via pentose fosfato é responsável por uma parcela menor no metabolismo dos carboidratos, variando de 10 a 50% dos carboidratos totais metabolizados. Seria necessário também, verificar o efeito nos níveis de glicose, cetose, ácidos láctico, pirúvico, etc. Além dos possíveis efeitos colaterais, indesejáveis ou não, que serão citados no transcorrer deste trabalho.

Coube a Yamagata (49) realizar uma observação de curta duração, (3 horas) em 11 pacientes portadores de diabete e em 6 não portadores, administrando 300 ml. de solução a 10% de xilitol, através da veia cúbica. Notaram que o nível de glicose sanguínea nos diabéticos, elevou-se ligeiramente e após 180 minutos, retornou ao nível original. Da mesma forma o nível de ácido pirúvico, láctico e dos demais metabólitos não alterou de forma anormal. (Quadro 1).

Em seguida, o mesmo investigador (49) observou o efeito do tratamento mais prolongado, isto é, de uma semana (Quadro 2), em 12 pacientes diabéticos que, semelhantemente receberam todos os dias 300 ml. de solução a 10% de xilitol. Destes, 3 pacientes tiveram o processo diabético de hiperglicemia interrompido pela aplicação de insulina, antes de iniciarem a prova. Os 9 pacientes restantes, com o mesmo propósito foram submetidos a uma dieta de restrição de carboidratos. Em ambos os grupos, no transcorrer da prova, ocorreu uma normalização dos níveis de glicose sanguínea e urinária; não se observando anormalidades nos demais processos. A mesma dosagem foi apli-

Figura 9 - METABOLISMO DO XILITOL PELO CICLO DE D-GLICURONATO/XILULOSE



Reproduzido de MCCORMICK, N.B.; O. TOUSTER, - The conversion in vivo of xylitol to glycogen via the pentose phosphate pathway J. Biol. Chem. 229, 451-461, 1957.

cada a 3 pacientes com cetose diabética, juntamente com 60 unidades de insulina regular. No prazo de 24 horas presenciou-se a ausência dos sintomas gerais de cetonemia.

Em um paciente em semicoma diabética e que havia estado há seis meses em estado de coma, ocorreu uma sensível baixa no teor de corpos cetônicos no sangue, de 6,6 mg para 0,2 mg/100 ml., com a administração de 500 ml da solução, o citado investigador (49), teve a oportunidade de comprovar o efeito benéfico do xilitol, quando num caso de coma diabética, tratou o paciente com 500 ml. da solução de xilitol a 10% juntamente com insulina e solução fisiológica salina, verificando que após 48 horas, o teor de corpos cetônicos decrescia de 9,5 para 0,57/100 ml.

Quadro 2 - ALTERAÇÕES METABÓLICAS INTRODUZIDAS PELA INFUSÃO DE XILITOL EM OBSERVAÇÃO DE 1 SEMANA.

Paciente	Idade (anos)	sexo	Tratamento	açúcar no sangue mg/100 ml			açúcar urinário (g/dia)		
				antes	durante	após	antes	durante	após
1	47	M	dieta	114	118	111	0	0	0
2	52	M	dieta	118	112	133	t(*)	1,3	t
3	50	M	dieta	118	112	109	0	0	0
4	31	M	insulina	147	158	167	t	8	t
5	55	M	dieta	127	140	160	40	15	10
6	58	M	insulina	205	229	181	0	0	4
7	66	F	dieta	139	135	149	0	0	0
8	20	F	insulina	187	193	187	30	0	31
9	56	F	dieta	172	193	177	39	2	33
10	43	M	dieta	130	120	118	14	2	10
11	70	M	dieta	137	127	121	43	3	12
12	50	M	dieta	177	177	161	16	0	2

(*) t = trace.

Reproduzido de YAMAGATA, S. Clinical effect of xylitol on carbohydrate and lipid metabolism. The Lancet 2, 918-921. 1965

Foglia e col. (11) executaram ensaios semelhantes, porém mais longos, 30 dias em ratos pancreatectomizados, em cuja cirurgia se extirpou 95% do pâncreas. Como é sabido, nestes animais se desenvolve um processo diabético em tres estágios sucessivos: O primeiro denominado pré-diabético, dura dois a tres meses, sem surgimento de sintomas, o segundo período, de um mes, aparecem sintomas com certa sequência, o último chamado de diabetes confirmado, é quando o processo se instala e se exterioriza. Nestas duas ultimas fases foi quando se iniciou o experimento. Aplicando-se uma dosagem diária de 840 mg de xilitol oralmente, considerada pelos autores como excessiva, e fornecendo uma dieta alimentar balanceada em relação a todos os nutrientes. Enquanto que a outro grupo nas mesmas condições de diabetes cirúrgica, foi administrada a mesma dieta além de glicose, não se fornecendo porém o xilitol. Verificou-se que a curva glicêmica não se modificou anormalmente no grupo que recebeu xilitol, o mesmo acontecendo com a curva de tolerância ensaiada com a ingestão da glicose, e ainda, com a glicemia de jejum. Simultaneamente, não se notou nenhuma alteração histológica no resto do pâncreas. Este experimento mostra que, a administração maciça de xilitol no indivíduo diabético, não agrava o seu estado.

Se o xilitol ganha o metabolismo celular através de um mecanismo que não depende de ação insulínica, significa que qualitativamente o mesmo vem a suprir a falta de utilização de carboidratos. Do ponto de vista quantitativo restavam explicações. Os trabalhos de Jakob e col. (20) foram orientados no sentido de elucidar como o xilitol supriria quantitativamente a demanda energética requerida pelo organismo, sabendo-se que o mesmo produz 4 Cal./grama. Baseando-se em estudos com ratos, estes investigadores concluíram que: 1) há um máximo de estímulo à produção de glicose pelo aumento do nível de triose-fosfato nos tecidos. 2) diminuição da elaboração de corpos cetônicos, possivelmente, devido à maior esterificação de ácidos graxos pelo alfa-glicerofosfato. 3) diminuição da relação ATP/ADP, possivelmente, pelo decréscimo do fluxo do ciclo de Krebs.

Desta forma se justifica o atendimento metabólico quantitativo pe

lo xilitol, devido à ativação da Via Pentose Fosfato, a qual, nos casos normais representa apenas de 10 a 50% do metabolismo.

Devido a esta ativação, surgiu uma preocupação sobre os efeitos colaterais que viessem a aparecer no transcorrer de 30 ou mais anos, prazo no qual o diabete pode acompanhar o paciente. Com este propósito, Donahoe e Powers (7) observaram o efeito de altas dosagens de xilitol em soluções aquosas de 5 a 10%, em adultos humanos normais, e acharam que quantidades de 1,22 a 3,13 g. por quilograma de peso corporal, produziu excesso de ácido úrico no sangue (hiperuricemia) de até duas vezes o limite máximo. Num segundo estudo, os investigadores encontraram que o xilitol aplicado parenteralmente, de 2,34 a 2,90 g/kg. de peso produzia hiperuricemia com hiperuricosúria, isto é, passagem do ácido úrico para a urina, em níveis de até duas vezes o mais alto limite. Ocorria ainda hiperbilirrubinemia (icterícia) de duas a tres vezes o limite máximo, estando a bilirrubinemia na forma não conjugada, em sua maior parte. Dessa forma, pretendiam os mencionados autores, alertar sobre as consequências de dosagens muito elevadas e despertar o problema de se esclarecer a dosagem ideal em cada caso.

Constitui esta, a única objeção ao emprego do xilitol, se bem que não total, pois os autores não condenaram o uso do produto mas sim sua dosagem.

O bom senso e a prudência realmente devem fazer-se presente no julgamento de um novo produto, em qualquer ramo da atividade, principalmente naquelas que dizem respeito à saúde pública. De qualquer forma, porém, este ensaio observado em pessoas normais resultou bastante diverso dos demais relatados em que a dosagem aplicada era muito inferior. Por exemplo, a dose mais alta utilizada por Yamagata (49), foi de 50 g, no caso do coma diabético, porém com administração conjunta de insulina e solução fisiológica. Enquanto que a menor dose empregada por Donahoe, 1,22g/kg de peso corresponde a 85,4g em uma pessoa pesando 70 kg.

IV - TENTATIVAS DE PRODUÇÃO DE XILITOL A PARTIR DO XILANO

1. Fontes de xilano

a. Quantidade de material disponível

A quantidade de resíduos liberados pelas agro-indústrias atinge volumes altíssimos, representando um elevado desperdício de material e, na situação mais generalizada, um volumoso lixo que se acumula e onera o custo operacional com a necessidade de sua remoção.

A tentativa de incineração com o aproveitamento da fonte de calor, como no caso do bagaço de cana, nem sempre resulta satisfatória, uma vez que a utilização correta pode reverter favoravelmente em maiores lucros para a empresa.

O bagaço de cana tem sido destinado a geração de calor conjuntamente com a lenha, devido seu fraco poder calorífico. Porém, em algumas usinas brasileiras parte deste resíduo já está sendo enviado para indústrias de papel. Enquanto que nas usinas americanas, se pratica há longo tempo a combustão de óleo, para a produção de energia nas condições brasileiras, certamente, a tendência será no sentido de se aplicar energia hidroelétrica por ser mais abundante.

Da mesma forma que na indústria canavieira, nas demais agro-indústrias se resente um melhor aproveitamento de resíduos. É o caso do algodão, arroz, da cana e da madeira, que representam o grande volume da produção agrícola brasileira, para não se mencionar a reserva de babaçu e outras palmeáceas em situação ainda marginal de aproveitamento

No tocante às agro-indústrias canavieiras, algodoeira, arrozeira, etc., o país produziu na safra 1971/72 (*) as quantidades transcritas no quadro seguinte, com a estimativa do potencial de xilitol que a mesma representa.

(*) Dados coletados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística I. B.G.E.

Quadro 3 - POTENCIAL BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DO XILITOL

	Produção	Estimativa de resíduos	xilitol (%)	Potencial de xilitol
Algodão em caroço	2.118.775 ton	565.000 ton	30	160.500 ton
Arroz em casca	6.394.285 ton	960.000 ton	30	288.000 ton
Cana-de-açúcar	75.247.000 ton	7.524.000 ton	20	1.500.000 ton
Madeiras	129.397.000 m ³	75.000.000 ton	10	7.500.000 ton

O quadro nº 4 montado em função dos maiores produtores de cada produto agrícola, revela uma situação ligeiramente dispersa em relação aos estados e concentrada em torno das regiões. Apenas São Paulo e Minas Gerais apresentam produção acumulada de tres dos quatro produtos, situando-se simultaneamente entre os cinco maiores produtores do Brasil, de cada produto.

Quadro 4 - OS CINCO MAIORES PRODUTORES BRASILEIROS DE ALGODÃO, ARROZ, CANA E MADEIRA - SAFRA 1971/72.

	Algodão (ton)	Arroz (ton)	Cana (ton)	Madeira (m ³)
Alagoas	-	-	5.497.026	-
Bahia	-	-	-	14.012.000
Ceará	1.201.000	-	-	-
Goiás	-	915.003	-	-
Maranhão	-	607.634	-	-
Minas Gerais	-	1.014.993	8.332.004	24.911.000
Paraíba	447.062	-	-	-
Paraná	418.982	-	-	15.001.000
Pernambuco	-	-	5.497.026	-
Rio Grande do Norte	518.687	-	-	-
Rio Grande do Sul	-	1.353.673	-	13.342.000
Rio de Janeiro	-	-	5.971.945	-
Santa Catarina	-	-	-	12.287.000
São Paulo	469.767	774.037	25.887.374	-

Existem outras fontes de xilitol, não mencionadas devido sua quantidade secundária, como os resíduos de grão de milho, sabugos de milho, cas-

ca de amendoim, palha de arroz, etc. Além do aproveitamento de melaços mediante ação microbiana, que acena de forma promissora na produção de xilitol, sendo considerada por técnicos japoneses como a mais viável economicamente. No transcorrer deste trabalho se dará maiores detalhes a respeito.

b. Natureza Química das Diversas Matérias Primas

A idéia geralmente aceita é de que o esqueleto de todo vegetal consiste de alfa-celulose, disposta em camadas, nas quais os grupos hidroxílicos livres de 1,4-B-glicopirranose se arranjam formando estruturas organizadas (15).

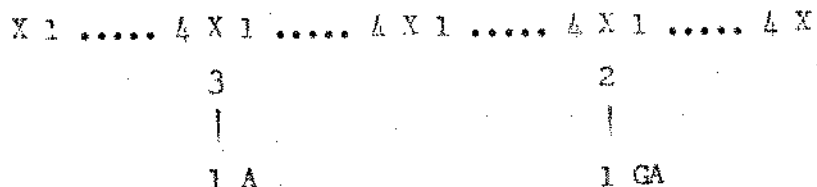
Na grande maioria dos casos, as camadas de celulose estão ligadas a uma massa amorfa de lignina e polissacarídios, formando uma rígida estrutura.

No tratamento com cloro ou cloreto de sódio, há retirada de lignina e separação da chamada holocelulose, da qual se extraem os constituintes não celulósicos usando-se soluções alcalinas. Separando-se a seguir o material denominado hemicelulose e que é constituído de um número variado de polissacarídios e diversos tipos de açúcares como D-xilose, L-arabinose, L-ramnose, D-manose, ácido D-glicurônico, ácido 4-O-metil-D-glicurônico e possivelmente ácido D-galacturônico (15).

Nenhuma classificação racional das hemiceluloses foi conseguida até o presente devido à dificuldade em purificar a mistura de macromoléculas que as formam. A hidrólise ácida seguida de análise cromatográfica quantitativa e qualitativa fornece a natureza e a proporção dos açúcares presentes na macromolécula. O mais frequente e abundante é a D-xilose.

O xilano normalmente obtido produzirá por hidrólise a D-xilose e algum resíduo de L-arabinose. O polissacarídio é formado de uma série de ligações B... 4 X 1. A estrutura é bastante semelhante à celulose, sendo possível representá-la em forma do diagrama seguinte, que identifica o xilano do esparto.

O xilano da palha de aveia e da palha de cevada são semelhantes em constituição ao da palha de trigo. No caso de material proveniente do fracionamento da palha de cevada, a quantidade de arabinose é insignificante. Frações de palha de trigo contendo arabinose e ácido urônico, dão a impressão que a estrutura geral sugerida para a palha de trigo pode ser estendida ao presente caso.



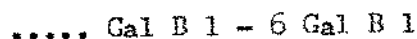
Xilano da palha de aveia

A = L-arabofuranose

X = B-D-xilopiranoose

GA = Ácido D-glicurônico

Não se pode pretender que plantas botanicamente diferentes tenham hemiceluloses semelhantes. As Monocotiledôneas sempre possuem características diversas das Dicotiledôneas. Ao se mencionar o resíduo de madeira como fonte de xilano, haverá uma grande generalização do ponto de vista químico, se bem que a extração pode ser generalizada sem complicação. Na madeira de Larix europeae, ocorre um polissacarídeo presente em sua hemicelulose, denominado galactano, o qual quando hidrolizado produz D-galactose e L-arabinose, em proporção de 6:1, sendo possível separar-se uma porção que produz apenas derivados de D-galactose. A arabinose remanescente produz seus derivados e uma mistura de galactoses. O tipo da estrutura que ocorre está representado assim:



1 B Cal 6

Gal = galactopirranose

Hemicelulose de Larix europaeae

O xilano encontra-se presente geralmente em todas as plantas superiores e também em algumas algas, sendo sua abundância superada apenas pela celulose e amido (15). É mais frequente em plantas de ciclo curto e particularmente em resíduos agrícolas como bagaço de cana, sabugo de milho, casca de semente de algodão, etc. É encontrada como um constituinte da parede celular embora alguns investigadores (14) tenham confirmado sua presença no espaço intercelular. A cadeia estrutural do xilano é similar à da celulose, exceto pela falta de um grupo carbinol em cada anel da cadeia. Por esta razão o xilano oferece certa dificuldade em ser isolado da celulose por meio de solventes orgânicos. Outra razão para explicar este fato, é a possibilidade das moléculas do xilano estarem protegidas por uma camada de moléculas de celulose.

A função assim como a origem do xilano na parede celular não estão esclarecidas. Aventa-se a possibilidade de ser uma reserva nutritiva ou de possuir função plástica (45). Sua origem pela descarboxilação de um ácido poliglicurônico intermediário não é muito aceita. No entanto, há evidências de sua deposição juntamente com a celulose durante a formação da parede celular.

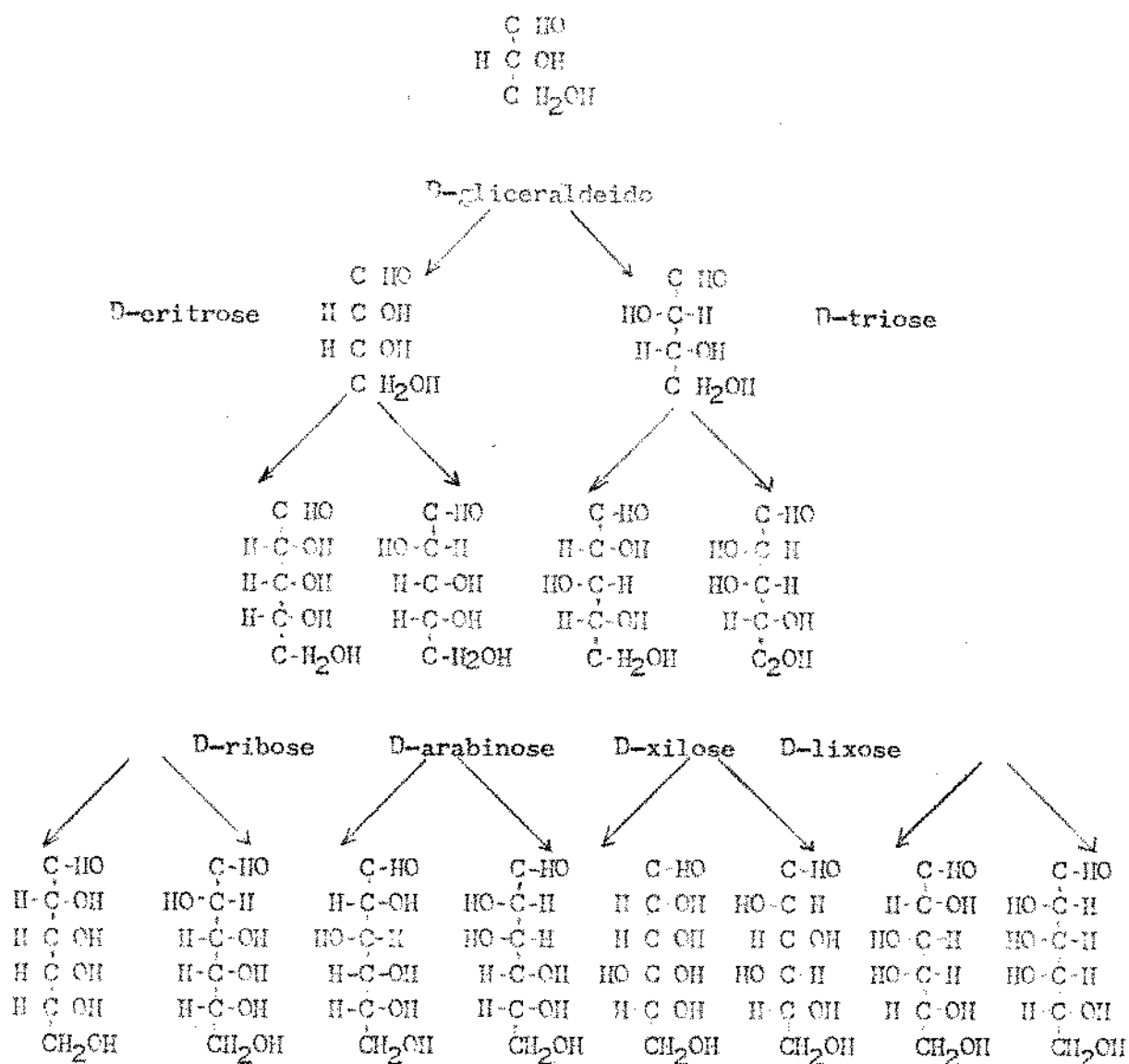
O xilano possui a propriedade geral de insolubilidade em água, sendo solúvel em soluções alcalinas, possuindo também grande afinidade por ácidos. Possui rotação ótica negativa, não apresentando poder redutor. A sua hidrólise conduz à D-xilose, um pentassacarídeo cuja configuração está relacionada com os principais açúcares na figura 10.

2 - Métodos químicos de extração e hidrólise do xilano

Basicamente existem dois métodos químicos para extração e hidrólise do xilano: a hidrólise ácida e a alcalina.

O método que utiliza ácidos é o que obtém mais altos rendimentos com menor formação de hexoses. Vários ácidos podem ser empregados, como o

Figura 10 - COMPARAÇÃO DAS CONFIGURAÇÕES DOS D-AÇÚCARES.



D-alose; D-altrose; D-glucose; D-manose; D-gulose; D-idose; D-galactose;
D-talose.

Reproduzido de WHISTLER, R.L.; E. MASAK JR. Advances in Carbohydrate. Dep.
Agric. Chem. University 5, 269-290. 1950.

clorídrico, oxálico e acético, porém, o que reúne maior número de vantagens do ponto de vista de economia e técnica é o ácido sulfúrico.

Os diversos resíduos agrícolas aproveitados como matéria prima na indústria do xilitol, não oferecem nenhuma consequência no processamento em virtude de diferenças químicas, que são de pequena monta. Desta forma, a obtenção da xilose obedece a uma metodologia geral, que se efetua por hidrólise direta, da matéria prima sem prévia separação do xilano.

O aproveitamento operacional é da ordem de 95%, pela digestão durante 50 minutos com ácido sulfúrico em solução a 4,4% e a 100°C e com uma relação sólido/líquido de 6:100. O mesmo rendimento pode ser conseguido a 121°C, durante 50 minutos na mesma relação de 6:100 porém, com solução de ácido sulfúrico de apenas 0,98% (9). Quando se aumenta a relação sólido/líquido para 30%, a concentração do ácido também deve ser elevada, para 1,9% para se manter o rendimento de 95%. O quadro 5 ilustra o efeito da concentração ácida associada a temperaturas e tempos sobre a hidrólise do xilano.

Quadro 5 - EFEITOS DA CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDO, TEMPERATURA E TEMPO SOBRE A SEPARAÇÃO DE PENTOSANOS E HEXOSANOS.

Conc. ácido sulfúrico (%)	1,9	4,4	4,4
Temperatura - °C	121	100	100
Tempo - minutos	50	55	50
Relação Sol./liq. g/100 ml	36:100	6:100	6:100
1. rend. xilose %	86,1	84,1	86,9
2. rend. furfural (em xilose) %	9,3	10,9	1,4
3. soma de 1 e 2	95,4	95,00	95,3
4. rend. de glucose - %	0,78	3,2	8,4

Reproduzido de DUNNING, J.W.; E.C. LATHROP. Ind. Eng. Chem. 37, 25-29. 1945.

A mesma metodologia foi observada em escala de laboratório para se estudar o efeito de soluções mais concentradas, concluindo-se que o aumento da concentração provoca uma abreviação no tempo de hidrólise, desta forma, a 5,8% de ácido sulfúrico se requerem 129 minutos e a 8,8% este tempo se reduz a 105 minutos. (Quadro 6).

Quadro 6 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO ÁCIDA SOBRE O TEMPO E RENDIMENTO DA HIDRÓLISE.

Concentração de ácido - %	8.8	7.3	5.8
Temperatura - °C	98.0	98.0	98.0
Tempo de extração - minutos	105.0	125.0	129.0
1. xilose no hidrolizado - %	33.8	30.0	36.8
2. furfural (com xilose) no hidrolizado - %	8.8	9.1	7.9
3. soma de 1 e 2	92.6	89.1	94.7
4. xilose no hidrolizado - %	11.6	4.2	0.0
5. dextrose no resíduo - %	3.4	5.6	5.6
6. dextrose no resíduo - %	85.1	88.0	94.5
7. total de xilose, 3 + 5	96.0	94.7	100.3
8. dextrose total, 4 + 6	96.8	92.2	94.5
9. açúcares redutores no hidrolizado	22.9	18.5	14.2

Reproduzido de DUNNING, J.W.; E.C. LATHROP. Ind. Chem. 37, 24, 1945.

A hidrólise do xilano se realiza nas condições normais de pressão se bem que a atmosfera seja substituída por vapor, a fim de se preservar o produto de oxidação. O xilano assim obtido produzirá uma mistura de xilose e furfural nas porcentagens vistas acima. A separação da xilose e furfural, que se apresenta em mistura azeotrópica com a água, se realiza por destilação e vácuo. Em seguida a solução de xilose é neutralizada com leite de cal, formando-se sais de CaSO_4 , que são separados por filtração. Resulta desta

forma a xilose em xarope, que se destina à produção de xilitol como se verá adiante. Alternativamente a xilose pode ser cristalizada por evaporação a vácuo. Porém no método patenteado por Paabo e Uesson (35) a solução de xilose é dissolvida em álcool etílico a 95% e a seguir evaporada.

Schreiber e col. (39) preconizaram um pré-tratamento inicial da matéria prima, justificando a necessidade desta fase preparatória como forma de melhor hidrolizar o xilano, evitando-se que certas substâncias, como gomas e cinzas venham a se incorporar no extrato. As operações fundamentais do método aplicado em escala de planta semi-industrial incluem 3 fases: pré-tratamento, extração e processamento:

O pré-tratamento tem por objetivo o de eliminar gomas, cinzas e demais impurezas, pela lavagem do material com água quente sob pressão e a seguir, água fria com soda, lavando-se em seguida para retirar o excesso de soda e impurezas.

A extração consiste na hidrólise do xilano com ácido sulfúrico em circulação, em que o material permanece no digestor durante seis operações consecutivas, mantendo-se uma pressão de vapor de 10 libras.

A terceira etapa consiste no processamento do extrato inicialmente adicionando-se leite de cal para provocar a formação de CaSO_4 cujos sais são separados por filtração sob pressão, seguindo-se uma concentração até a densidade específica de 1,23, nova filtração e concentração até a densidade específica de 1,35. Esta operação é explicada como uma forma de evitar-se a cristalização parcial dos açúcares, que se realizaria sob densidade específica maior.

Uma variante de pré-tratamento é sugerida por Schultze e Moudry (40) em operação mais rápida e efetiva pela lavagem da matéria prima com ácido sulfúrico a 0,02 - 0,10% de concentração por meia hora, retirando-se as impurezas. Em seguida o material é hidrolizado por incubação durante um período de 4 a 14 horas a 90-140°C, usando-se ácido sulfúrico em solução variável de 0,3-5%.

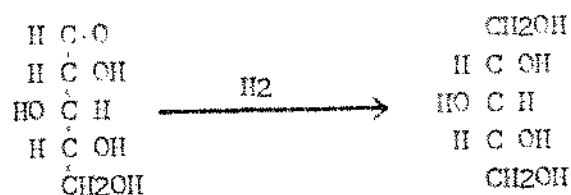
As pesquisas iniciais feitas com a xilose, tinham como objetivo

principal a produção de furfural, como forma de baixar o custo operacional na indústria de celulose. Todo o pessoal técnico envolvido nesses estudos tinham, direta ou indiretamente ligação com estudos da celulose. Por essas razões, predominou uma idéia comum de aproveitar o equipamento de indústrias celulósicas no processamento da xilose, com um mínimo de modificações.

A hidrólise alcalina do xilano é considerado um método secundário para o caso em especial. Os álcalis, ainda que apresentem as vantagens de não permitir a hidrólise de partículas celulósicas aderidas ao xilano, apresentam todavia, o inconveniente de facilmente degradar o produto da hidrólise; exigindo por este motivo que o processo se realize em uma temperatura máxima de 40°C, o que, inquestionavelmente vem retardar a operação, visto que toda reação é facilitada pelo calor. Além do mais, torna-se preciso efetuar processamento em atmosfera de nitrogênio pois a presença de álcali facilita a oxidação do produto. A concentração alcalina inferior a 1% apresenta um potencial hidrolizante baixo. Aumentando-se esta concentração até o limite de 7% haverá maior capacidade de hidrólise enquanto que, acima deste valor já não ocorre melhoria sensível, tornando-se indiferente permitir mais alta concentração. O nível mais usual porém é de 4% (26), sendo esta concentração conveniente por não provocar oxidação de forma tão facilitada como em porcentagens mais altas. A variação da temperatura durante o processamento, no intervalo de 40 a 60°C permite observar que a temperatura de 40°C é mais segura e que na temperatura de 60°C, há ganho de tempo no processamento e perda de xilano por decomposição.

3 - Métodos químicos de conversão da xilose em xilitol.

A conversão da xilose em xilitol, resulta da redução desta, segundo a equação:



Há tres métodos básicos que conduzem a esta síntese:

- a - O método de Emil Fischer, usando amálgama sódica
- b - O método de redução com níquel, de Kohn
- c - A redução com boridreto de sódio, de Abdel Akher.

O método de Emil Fischer foi o primeiro utilizado para redução da xilose, no ano de 1894 (10). Consta essencialmente do seguinte: a uma solução aquosa de 10% de xilose, se adicionam 100g de amálgama sódica a 2,5%, agitando-se e mantendo a solução na temperatura de 10°C. Após consumo da amálgama, nova quantidade é colocada até que 1 ml. seja capaz de reduzir 0,1 ml. de reagente de Fehling. A solução é então neutralizada com H₂SO₄, evaporando-se até a deposição dos sais de CaSO₄. Dilui-se em álcool absoluto, cinco vezes o volume, evapora-se novamente. Obtem-se assim a solução de xilitol na forma de um xarope incolor, com rendimento da ordem de 98%.

O método que utiliza catalisação com níquel foi empregado por Melfrom e Kohn (48) em 1942, quando pela primeira vez se obteve xilitol na forma de cristais. Trezentas gramas de D-xilose foi dissolvida em 750 ml. d'água onde se colocaram juntamente, 60g de níquel metálico, e se fez a redução em autoclave à pressão de hidrogênio de 1.700 p.s.i. (113 atmosferas) a 30°C. A temperatura máxima de 150°C. na pressão de 2.400 p.s.i. (160 atmosferas) foi mantida por cinco horas. Após resfriar-se a solução e retirar-se o catalisador, a solução foi mantida em repouso por várias semanas, produzido-se 255g de xilitol em cristais. (85% de rendimento).

O método que utiliza boridreto de sódio foi experimentado pela primeira vez por Abdel-Akher e col. (1) e baseia-se no seguinte: 66g de D-xilose é dissolvida em 400 ml. de água, adicionando-se 16,5g de boridreto de sódio dissolvido em 100 ml de água, mantendo-se as soluções a frio, não permitindo que a temperatura ultrapasse 45°C. Observa-se que o pH gradualmente vai se tornando alcalino até alcançar pH 9,0. Após cessar a reação, adiciona-se ácido acético 6N até reduzir o pH para 6,0. A solução é então passada em coluna de troca iônica e depois concentrada a baixa pressão para se retirar o metil-borato. Dissolve-se em álcool etílico (500 ml) e 20 ml. d'água e clarifica-se com carvão ativo. O produto é cristalizado por deposição, permitindo um rendimento de 41,3g (61%).

Diversas inovações tem sido sugeridas no sentido de aperfeiçoar a metodologia. Atualmente somente o processo de hidrogenação catalítica é acei

to, em nível de planta industrial. Dentre várias sugestões modificando o processo de hidrogenação de forma parcial e principalmente no referente a cristalização, seu ponto mais vulnerável, são citadas as seguintes:

Soboleva e Meshkova (41) preconizam a adoção de cristalizadores com sistema de refrigeração a água e dotados de dispositivo de agitação. O processo é realizado em dois estágios, havendo uma recirculação das partículas que não cristalizaram e que são juntadas à massa que é admitida no aparelho. Sendo portanto uma variante do sistema de cristalização da sacarose.

Pavlovskia e col. (36) experimentaram a hidrogenação em condições de temperatura ambiente, sem pressão, substituindo a solução aquosa de xilose por uma solução de NaOH e obtendo rendimentos da ordem de 80-90%, num processo extensivo a todas as aldoses.

4 - Métodos microbiológicos de produção de xilose

A hidrólise do xilano pode também ser realizada enzimaticamente, pois um grupo relativamente numeroso de microrganismos é capaz de produzir a enzima que hidrolisa o xilano, convertendo-o em xilose. Esta variante microbiológica tem sido objeto de estudos por várias equipes de pesquisadores que chegaram a resultados alentadores do ponto de vista bioquímico.

Nessa modalidade de hidrólise, o que se pretende é o isolamento da enzima específica para o fim pretendido. Sabe-se que um mesmo microrganismo é passível de produzir diversos tipos de enzimas, conforme substrato fornecido ou a fase do seu metabolismo. Assim, por exemplo, Coniophora cerebella, o fungo mais dispersamente encontrado na Inglaterra, considerado como destruidor de madeiras devido à facilidade que possui de penetrar vasos e células fibrosas, foi por este motivo estudado em seu mecanismo enzimático (24). Verificou-se que era capaz de elaborar enzimas diferentes, que atuam sobre o malte, amido, pectina e celobiose separadamente. É também produtor de xilanase, que hidrolisa o xilano. Porém, sua capacidade é mínima nesse substrato. Esta enzima tem excelente atuação sobre o 4-O-metilglicuronoxilano (25), um composto de xilano, cuja produção como derivado deste último seria inviável

por complicar o processo.

Outros microrganismos, como Aspergillus oryzae tem faculdade de degradar o xilano produzindo no entanto, oligossacarídeos como xilobiose, xilotriose ao invés de xilose, com rendimento da ordem de 90%. Um estudo comparativo desta espécie com Aspergillus batatae (12) concluiu pela recomendação do uso conjunto desses dois microrganismos, visto que Aspergillus batatae era capaz de concluir a hidrólise a xilose dos oligossacarídeos produzidos por Aspergillus oryzae, com rendimento de 90%. Enquanto que sobre o xilano diretamente o aproveitamento se reduzia a 70%. Assim, seguindo-se aquela recomendação, o rendimento mantém-se em 90%, ocorrendo o processo em duas etapas. Enquanto Aspergillus oryzae transforma 90% do xilano em xilo-oligosacarídeos, Aspergillus batatae, converte-os em xilose também na ordem de 90%.

Quadro 7 - PRODUTOS FINAIS DA HIDRÓLISE DO XILANO E SUA QUANTIDADE ug/ml.

Sistema enzimático	PRODUTOS						
	X	Ar	X2	X-Ar	X3	X4	X5
<u>Aspergillus oryzae</u>	20	20	200	-	368	240	40
Sistema bacteriano	20	50	98	-	146	42	160
<u>Aspergillus batatae</u>	532	15	15	-	5	18	47
xilanase A			162	89	343	206	92
xilanase B	473	35	10	0	7	20	48
xilanase A + B	542	T	T	0	T	T	38

- Sistema bacteriano isolado do tubo digestivo de ovelha;
- Xilanase A e B foram preparadas de Aspergillus batatae na forma cristalina e em estado purificado, respectivamente: X-xilose; Ar, arabinose; X2, xilobiose; X-Ar, xilo-arabinosídeo; X3, xilotriose; X4, xilotetrose X5, xilopentose.

Reproduzido de FUKUI, S. Degradation of xylan by the xylanase System of Aspergillus oryzae. J. Gen. Appl. Microbiol. 4, 39-50. 1958

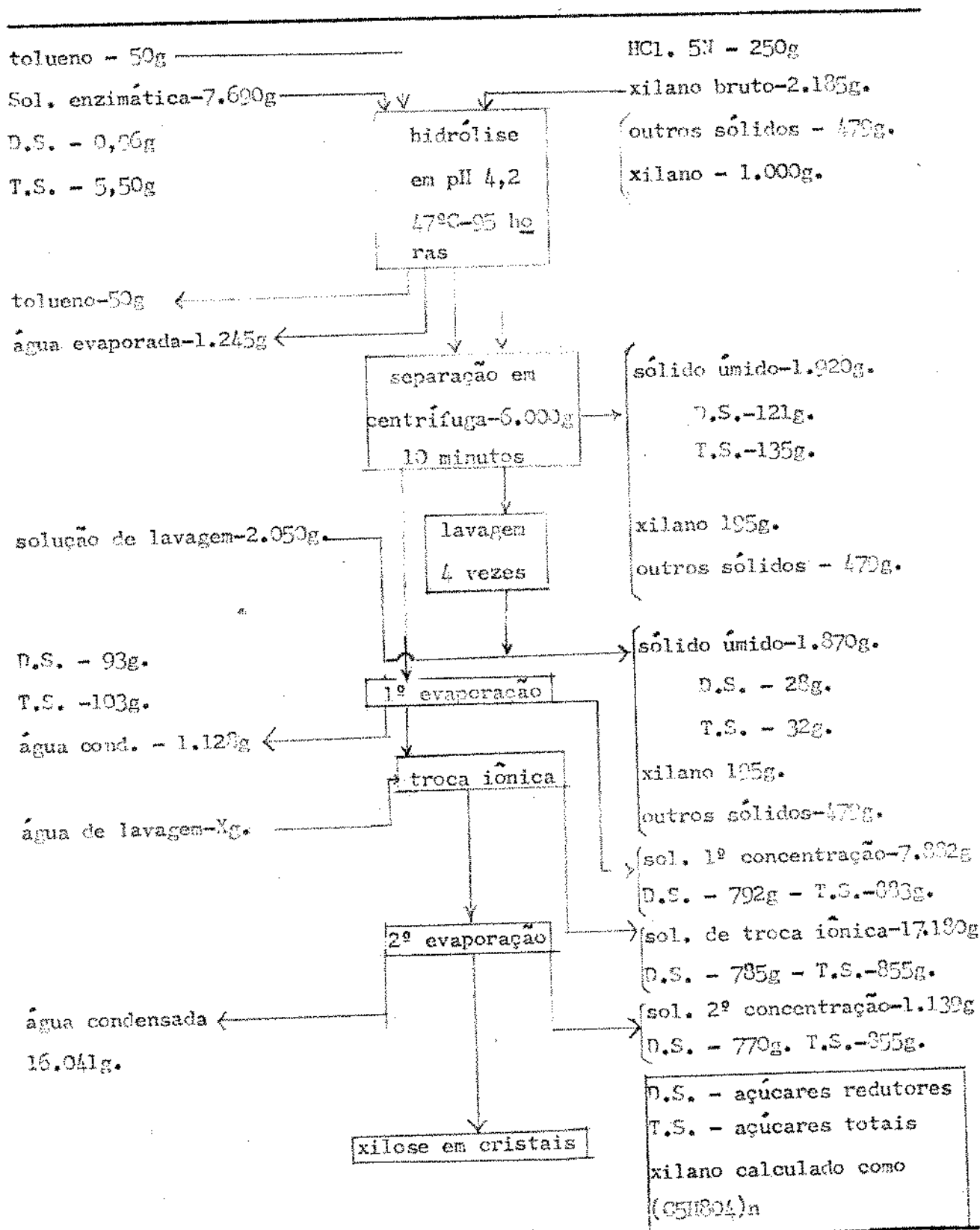
Quadro 8 - PRODUTOS FINAIS DA HIDRÓLISE DE XILO-OLIGOSSACARÍDIOS

xilanase	S U B S T R A T O				
	xilo- biose	xilo - triose	xilo- tetrose	xilo- pentose	xilo hexose
<i>Aspergillus oryzae</i>			X2, X3, X	X2, X3	X2, X3, X4
Sist. bacteriano			X2		
Xilanase A			X2	X2, X3	X2, X3, X4
Xilanase B	X	X	X	X	X
Xilanase B - esta do progressivo	X, X3	X, X2, X4	X, X2, X3	X, X2, X3 X4	X, X2, X3 X4, X5

Reproduzido de FUKUI, S. Degradation of xylan by the xylanase System of *Aspergillus oryzae*. J. Gen. Appl. Microbiol. 4, 39-50. 1958

Comprovou-se que *Trichoderma viride* (30, 31) possui capacidade de elaborar xilanase e efetuar a hidrólise do xilano, embora as pesquisas com este microrganismo tenham sido conduzidas mais com respeito à produção de celulose e, sob este aspecto apresentou capacidade bem definida, podendo transformar celulose cristalina, amorfa ou derivada em glicose (18, 27, 32). O grande empecilho na sua utilização para hidrólise do xilano é com respeito à inibição oferecida pela xilose formada no processamento. Quando esta atinge concentração da ordem de 15%, a atividade enzimática se anula e a reação cessa. Por esse motivo os pesquisadores preconizaram uma hidrólise em dois estágios, no qual uma nova solução de xilanase é adicionada ao sobrenadante da primeira hidrólise. Este processo poderia reduzir o tempo de reação à metade do tempo requerido num estágio simples, o rendimento porém não se alterou com a adoção desse sistema. As diversas operações aplicadas no estágio simples estão ilustradas na figura 11.

Figura 11 - HIDRÓLISE DO XILANO EM ESTÁGIO SIMPLES



Reproduzido de NOMURA, K ; T. YASUI; S. KIYOOKA.; T. KOBAYASHI, Xylanases of *Trichoderma viride*. J. Ferment. Technol. 47, 313-317. 1969.

Uma espécie de fungo isolada do esterco foi recentemente classificada como Streptomyces xylophagus, (17) possuindo características que a incluem nesse gênero (xylon: madeira; phagus: devorador). Revelou acentuada aptidão para hidrolizar o xilano por meio de uma xilanase de elevada ação em pH alcalino, preferencialmente de 8,6 e, nessa condição nenhuma outra enzima era produzida. Sob esse aspecto a aptidão para elaborar xilanase foi considerada estritamente específica. Nesta faixa de alcalinidade em que há maior atividade de produção enzimática, dificilmente haverá interferência de outro fungo ou levedura. A atividade medida pelo método de Somogyi foi de 7,32 mg. de xilose, produzidas após 4 dias de desenvolvimento a 30°C em um meio contendo 1% de xilano; 0,35% de glutamato de sódio; 0,20% de asparagina; 0,1% de KH_2PO_4 ; 0,05% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,01% de KCl ; 0,001% de FeSO_4 . Verificando-se ainda que a adição de extrato de levedura não alterou o rendimento, assim como, a presença de Mg^{++} , Ba^{++} , Mn^{++} e Fe^{++} . Enquanto que a adição de Ca^{++} ao meio, demonstrou favorecer o crescimento celular e inibir o rendimento enzimático.

Estudos posteriores realizados por Kawaminami e Iizuka (22) com Chaetomium trilaterale, em competição com 18 outros (quadro 9) revelou que este fungo possui uma considerável atividade enzimática de 6,08mg. Inferior portanto a St. xylophagus, apresentando no entanto, características que o tornam um precioso material para estudos bioquímicos. Conforme se verificou, esta espécie elabora duas enzimas de ação consecutiva. Uma endoxilanase que é responsável pela degradação inicial da cadeia do xilano e pela formação de oligossacarídeos. A outra enzima é uma Beta-xilosidase que causa a fragmentação dos oligossacarídeos com formação de xilose como produto final. A produção das enzimas resultou da inoculação do citado microrganismo em um meio contendo 7g. de xilano de farelo de trigo com 73,6% de pureza, 0,1g. de extrato de levedura, 1g. de carbonato de cálcio e 100 ml. de água destilada à temperatura de 28°C sob agitação. A atividade de xilanase foi determinada numa reação formada por 2,5 ml. de solução de xilano a 1%; 2,5 ml. de tampão acetato M/15 (pH 4,0) e 1 ml. de solução enzimática. Após incubação por 15 mi

nutos a 50°C, a mistura foi adicionada de 10 ml. de reagente A de Somogyi. Des ta forma estimou-se a atividade enzimática em termos de quantidade de açúcar produzida.

Quadro 9 - PRODUÇÃO DE XILANASE POR VÁRIOS FUNGOS

E s p é c i e s	Ativ.enzimática (mg de xilose)	espécie	Ativ.enzimática (mg de xilose)
Chaetomium atrobrunneum 2101	1,35	Alternaria kikuchiana 5005	0,33
Chaetomium aureum 2103	1,24	Cephalosporium acremonium	1,40
Chaetomium aureum 2107	1,35	Cercospora melonis 5046	1,40
Chaetomium brasilienses 2114	1,21	Gibberella sabinetti 8049	1,37
Chaetomium elatum 2126	0,90	Glomerella cingulata 8050	1,43
Chaetomium indicum 2222	0,81	Macrosporium bataticola 5014	1,67
Chaetomium tolulosum 2260	0,86	Echinodontium tsugicola 9010	1,37
Chaetomium trilaterale 2261	1,75	Schizophyllum commune 9006	3,96
Chaetomium trilaterale 2264	6,08	Trametes pini 9007	2,07

Reproduzido da KAWAMINAMI, T.; H. IIZUKA, Action of xylanase of Chaetomium trilaterale Strain nº 2267 upon xylan. J. Ferment. Technol. 48, 161 - 168. 1970.

Segundo pesquisas conduzidas por Whistler e Masak Jr. (46) com Aspergillus foetidus, este microrganismo elabora dois tipos de enzimas, a primeira que inicialmente produz xilobiase a partir de xilano e a segunda que conduz a reação até a produção de xilose. As duas enzimas foram separadas na forma de cristais. Isto inquestionavelmente constitui um avanço importante como pesquisa, embora a capacidade de hidrólise seja apenas de 20%.

Um mecanismo semelhante foi encontrado em Bacillus sp. (18) cultivado em meio contendo xilano, peptona e extrato de carne, durante sete dias. Durante este período elaborou uma enzima capaz de degradar o xilano a xilobi

Quadro 10 - CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS MICROORGANISMOS ENVOLVIDOS NA HIDRÓLISE DO XILANO

Microorg.	substrato	produto intermediário	produto final	grau de hidrólise	condições	rendimento	tempo
C.cerebella	4-O-metil glicurano- -xilano	—	xilose	66%	pH 5,0-40°C	130 ug.	1 hora
A.oryzae	xilano	oligosac.	oligosac.	90%	pH 5,0-30°C	6,58 mg.	3 minutos
A.batatae	xilano	—	xilose	70%	idem	5,12 mg.	3 minutos
A.batatae	oligosac.	—	xilose	90%	idem	6,58 mg.	3 minutos
S.xylophagus	xilano	—	xilose	100%	pH 7 a 8,6-30°C	7,32 mg.	15 minutos
C.trilateralale	xilano	oligosac.	xilose	83%	pH 4,0-50°C	6,08 mg.	15 minutos
T.viride	xilano	—	xilose	77%	pH 5,4-47°C	5,80 mg.	120 horas
A.foetidus	xilano	xilobiase	xilose	20%	pH 3,6-45°C	1,46 mg.	5 horas
Bacillus s.p	xilano	xilobiase	xilobiase	nd.	nd.	nd.	168 horas
		xilobiase	xilotriose				

C= Coniophora

A= Aspergillus

S= Streptomyces

Ch= Chaetomium

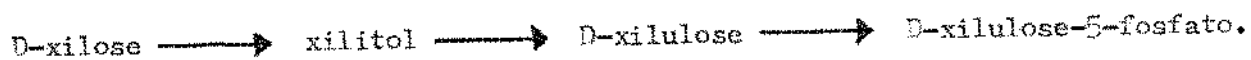
ose e xilotriose, não conseguindo no entanto realizar a hidrólise até xilose. A sua capacidade de hidrolisar xilano é então apenas parcial.

As principais características dos microrganismos já estudados para a hidrólise do xilano estão resumidas no quadro 10.

5 - Métodos microbiológicos de conversão da xilose em xilitol.

O metabolismo de aldopentose em microrganismos, geralmente é precedida pela correspondente cetopentose. Assim, a D-xilose é convertida em D-xilulose pela isomerase específica como acontece em Pseudomonas hydrophilla, Pasteurella pestis e Lactobacillus plantarum. Estas últimas produzem também uma isomerase específica que cataliza a conversão de L-arabinose e L-ribulose. No metabolismo de D-arabinose em Escherichia coli, a primeira fase consiste na conversão a D-ribulose. (38).

Em alguns organismos a conversão de aldose a cetose é catalisada por pares de desidrogenases que catalisam a redução de aldopentose a pentitol, o qual é então oxidado à cetopentose correspondente. Enzimas deste tipo foram encontradas na vesícula seminal da ovelha, rato e vitelo. Um sistema enzimático semelhante foi observado em fígado de porco. Nos microrganismos é geralmente encontrado nos filamentos de fungos, como é o caso da Candida utilis, (38) que em seu crescimento em meio contendo D-xilose produz as seguintes transformações:



O extrato de Candida utilis, desenvolvida em meio contendo D-xilose, possui uma desidrogenase de poliol específica para NADP, que cataliza a reação reversível desta aldose a seu respectivo poliol. Esta enzima é bastante ativa em meio contendo D-xilose, sendo indiferente à presença de D-glicose não mostrando nenhuma atividade em meio contendo essa substância. Por outro lado, é capaz de ser induzida por outros açúcares, precisamente, pelos que possuem o grupo hidroxilo no carbono 2 de configuração D-glicérica. Em geral, a atividade sobre aldoses diminui com o comprimento da cadeia, ocor-

rendo o contrário quando a reação se realiza no sentido inverso, isto é, a atividade então aumenta com o maior comprimento da cadeia de poliol (3^a).

Um mecanismo similar ocorre em Penicillium chrysogenum (5) em que a primeira fase no metabolismo da pentose é a redução a pentitol. As enzimas envolvidas são portanto semelhantes, em propriedades gerais, às encontradas nos tecidos de mamíferos. O mesmo processo ocorre quando o substrato disponível é L-arabinose, que é reduzida a L-arabitol e em seguida a L-ribulose e L-xilulose, o que, é de grande importância, constituindo uma variante que será objeto de menção no capítulo seguinte.

Os mesmos autores acima mencionados, Chiang e Knight, (6) realizaram posteriormente estudo comparativo entre Penicillium chrysogenum e 13 outros microrganismos para verificar sua capacidade de desenvolvimento em D-xilose. As culturas foram transferidas de um meio contendo D-xilose, sais minerais e ágar inclinado, por duas vezes, e seus esporos foram inoculados no mesmo meio exceto ágar. Este não demonstrou ser o melhor meio, embora, fosse observado suficiente crescimento em 72 horas sob agitação. A enzima foi preparada após ruptura do material celular. No quadro nº 11 pode se observar a atividade dos microrganismos estudados, nas seguintes condições: Para redutase de xilose, a mistura reativa continha 30 u moles de xilose e 10 mg. de proteína em tampão de fosfato 0,05 M pH 7,2 que foi incubado a 30°C. durante 40 min. Para desidrogenase de xilitol empregou-se meio contendo 40 u moles de xilitol e 10 mg. de proteína em tampão tris 0,1 M. pH 8,5; que foi incubado a 30°C. durante 1 hora. No mesmo quadro pode-se concluir da existência de dois tipos de desidrogenase de xilitol: Uma que produz D-xilulose e a outra, L-xilulose. As atividades específicas dessa enzima aparecem no quadro, para conversão da D-xilulose e da L-xilulose em xilitol, expressas em u moles $\times 10^2$ NADH oxidado/min./mg. proteína. Os produtos da atividade microbiana foram analisados por cromatografia de papel.

Observou-se que a atividade específica não está associada com o volume de crescimento. Todas as espécies de Aspergillus cresceram intensamente em substrato contendo D-xilose e demonstraram baixa atividade específica para xilose redutase, enquanto que, Myrothecium verrucaria cresceu relativamente menos tendo a mais alta atividade específica de redutase. Isto se deve ao fato de que a glicose-6-fosfato seria susceptível à fosfatase, e portanto, o sistema de redução do NADP seria destruído. Comprovou-se com Neurospora crassa o mesmo fenômeno, quando uma grande quantidade de glicose livre foi vista nos cromatogramas utilizados para separar xilose e xilitol. Com exceção de Neurospora crassa e Myrothecium verrucaria, em todos os demais, a taxa de oxidação de NADP numa mistura de D e L-xilulose, foi igual à soma das taxas de cada isômero separadamente indicando a estereoespecificidade das duas enzimas.

Quadro 11 - ATIVIDADE ESPECÍFICA DE CERTOS FUNGOS EM MEIO CONTENDO D-XILOSE

Espécie	redutase de xilose (Ativ. em u moles de xilose reduzi- da/mg. proteína)	desidrogenase de xi- litol. Ativ. em u mo- les de D-xilulose formada/mg. proteína	"oxidação do NADH: u moles x 10 ² NADH oxi- dado/min./mg. proteína".	
			D-xilulose	L-xilulose
<i>Penicillium chrysogenum</i>	2,32	0,217	1,61	1,61
<i>Penicillium citrinum</i>	2,33	0,261	4,58	2,68
<i>Penicillium expansum</i>	2,34	0,136	5,68	2,84
<i>Aspergillus niger</i>	0,65	0,100	1,08	2,05
<i>Aspergillus oryzae</i>	0,33	1,41	2,61	2,13
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0,32	0,084	2,99	1,21
<i>Rhizopus ochraceus</i>	0,23	0,065	0,82	0,61
<i>Rhizopus nigricans</i>	1,53	0,088	3,08	1,63
<i>Gliocladium roseum</i>	1,71	0,108	3,39	1,61
<i>Byssoschlamys fulva</i>	1,01	0,081	7,75	15,80
<i>Myrothecium verrucaria</i>	2,89	0,256	11,30	7,10
<i>Neurospora crassa</i>	0,40	0,079	21,60	7,26
<i>Rhodotorula glutinis</i>	1,02	0,071	13,70	7,43
<i>Torulopsis utilis</i>	1,39	0,112	22,10	18,55
				3,23
				7,20
				8,50
				3,98
				4,65
				4,20
				1,39
				4,61
				5,16
				26,00
				14,15
				22,60
				20,93
				40,15

Reproduzido de CHIANG. C.; S.G. KNIGHT. Metabolism of D-xvlose by moulds. Nature, 193, 79-81. 1960,

Os quatorze microrganismos relacionados no quadro 11 completavam uma relação de vinte estudados, aptos a desenvolverem em D-xilose. Escherichia coli, Aerobacter aerogenes, Bacillus subtilis, Bacillus cereus e Pseudomonas aeruginosa, tiveram bom desenvolvimento em D-xilose como única fonte de carbono, porém foram destituídos de redutase. O que vem corroborar que este caminho metabólico das aldopentoses está limitado a leveduras e fungos filamentosos.

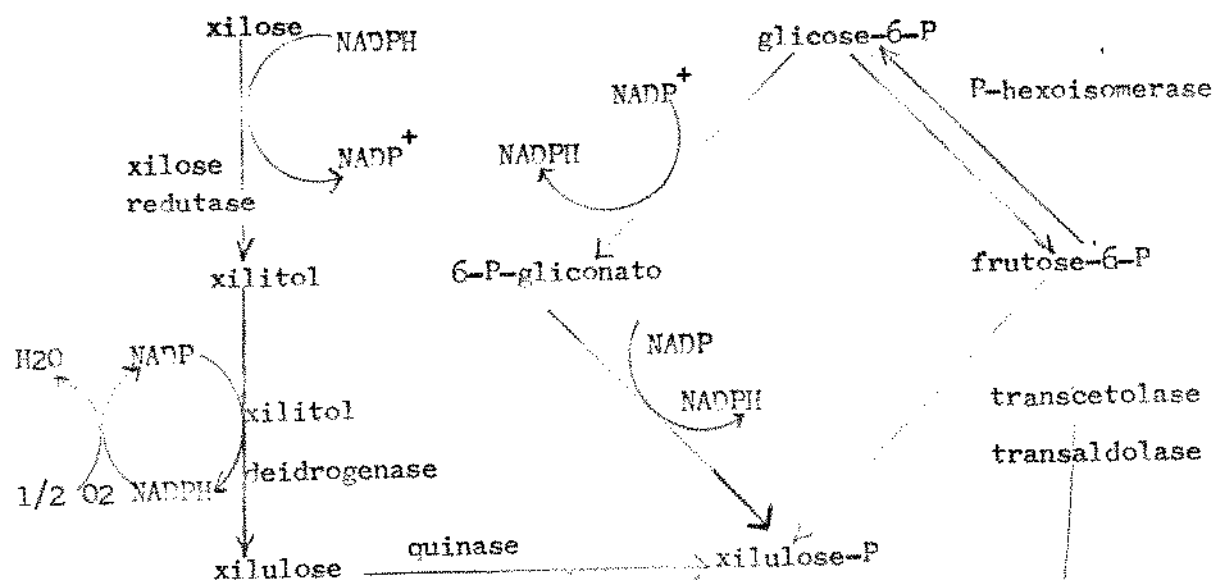
Os estudos de Horitsu e col. (16) confirmaram os estudos de Scher e Horecker, (38) introduzindo ainda uma observação do efeito de adição de cá tions divalentes: Mn, Mg, Co, que estimulam a capacidade de aproveitamento da D-xilose, permitindo reduzir-se até 100% da quantidade inicial a xilitol.

Os dois grupos de pesquisadores confirmaram que Candida utilis facilmente se adaptou ao desenvolvimento em substrato contendo D-xilose produzindo xilitol. Similarmente, em meio contendo L-arabinose havia produção de L-arabitol. Enquanto que Candida albicans também estudada para essa função, era capaz de utilizar D-xilose em processo oxidativo, mas incapaz de fermenta-la (Bacilla, M; observações não publicadas).

As vias metabólicas de carboidratos em Candida estão esquematizadas na figura 12, sendo a fase inicial do metabolismo da xilose, sua redução a xilitol. Esta reação requer NADPH e as células devem possuir uma fonte de produção de coenzima reduzida de origem endógena. Esta possivelmente se apresenta na forma de um carboidrato de reserva que produz NADPH pela oxidação de glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato. Quando a xilose é o substrato disponível, haverá necessidade apenas de NADPH para iniciar o processo. A pentose-fosfato formada, se converterá em frutose-6-fosfato e glicose-6-fosfato, pela ação de transcetolase e transaldolase, e, uma vez iniciado o ciclo, haverá sustento por si próprio.

Onishi e Suzuki (33) isolaram a levedura osmofílica Pichia miso do alimento oriental, miso, que se revelou produtora de xilitol, por fermentação aeróbica de D-xilose. Comparou seu comportamento com 58 leveduras e deg

Figura 12 - VIA METABÓLICA DOS CARBOIDRATOS EM CANDIDA



Reproduzido de HORECKER, B.L. Pentose metabolism in bacteria. New Jersey - U.S.A. Ciba Lectures. 1962. 20.

tas, selecionou 27 mais aptas relacionadas no quadro 12. Entre estas Candida polymorpha, C. tropicalis, C. guilliermondii, Pichia miso, Hansenula subpelliculosa, H. anomala, Torulopsis famata e Monilia sitophila produziram poliálcool à taxa de 53-45% da D-xilose consumida. Por outro lado Trichosporon behrendii, Trich. cutaneum, Cryptococcus neoformans, Hansenula suaveolens, Debarymyces fabryi e Deb. gruetzii produziram pouca ou nenhuma quantidade do poliálcool, apesar do alto consumo de D-xilose. Conforme resultados de um ensaio de competição realizado em iguais condições, em que o extrato de cultura foi inoculado em tubos contendo 8 ml. de meio esterilizado composto de 10% de xilose, 0,1% de glicose, aminoácidos e sais minerais; mantidos sob agitação a 300 r.p.m. por 9 dias a 30°C. Conclui-se do exposto que todas as leveduras apresentadas no quadro 12 tem capacidade inferior de produção quando comparadas com Penicillium chrysogenum, e Candida utilis, que alcançaram aproveitamento da xilose com produção de xilitol, na ordem de 70% do açúcar consumido.

Quadro 12 - PRODUÇÃO DE XYLITOL POR DIVERSAS LEVEDURAS

Levedura	% de xibose consumida	% de xilitol Produzida	Rendimento (%)
<i>Debaryomyces miso</i>	5,72	2,09	36,1
<i>Debaryomyces huderai</i>	6,75	2,01	30,2
<i>Debaryomyces klöckeri</i>	5,93	2,63	44,3
<i>Debaryomyces mandschurica</i>	6,86	2,76	40,2
<i>Debaryomyces membranifaciens</i>	5,00	2,25	45,0
<i>Debaryomyces sake</i>	5,43	2,23	41,1
<i>Debaryomyces tyrocola</i>	6,08	1,65	27,1
<i>Debaryomyces fabryi</i>	5,79	0,08	1,3
<i>Debaryomyces gruetzii</i>	6,08	0,03	0,4
<i>Hansenula anomala</i>	7,97	3,35	42,0
<i>Hansenula subpelliculosa</i>	7,70	3,34	43,3
<i>Hansenula suaveolens</i>	7,40	0	0
<i>Pichia miso</i>	8,50	3,77	44,3
<i>Pichia belgica</i>	9,47	3,18	33,5
<i>Pichia membranifaciens</i>	9,83	2,47	25,1
<i>Pichia farinosa</i>	8,61	1,35	15,6
<i>Pichia quercibus</i>	3,22	1,07	33,2
<i>Pichia mandschurica</i>	3,04	1,00	32,8
<i>Candida polymorpha</i>	9,55	3,92	41,0
<i>Candida tropicalis</i>	10,72	4,02	37,5
<i>Candida arborea</i>	10,29	2,84	27,5
<i>Candida guilliermondii</i>	10,76	4,34	40,3
<i>Torulopsis fanata</i>	8,10	3,22	39,7
<i>Cryptococcus neofarmans</i>	10,79	0,38	3,5
<i>Trichosporon behrendi</i>	10,40	0,20	1,9
<i>Trichosporon cutaneum</i>	7,61	0	0
<i>Monilia vini</i>	10,72	3,02	28,1
<i>Monilia sitophila</i>	10,76	3,60	34,3

Reproduzido de ONISHI, H; T., SUZUKI The production of xylitol, L - arabinitol and ribitol by yeasts., Agr. Biol. Chem. 30, 1133-1144. 1966.

V - OBTENÇÃO DO XILITOL A PARTIR DE GLICOSE

Tem-se pensado, de forma habitual que o xilitol deve ser obtido a partir do xilano, tendo a D-xilose como intermediário no processo, possivelmente por se tratar de compostos com cadeias estruturais semelhantes.

Recentemente porém diversos autores (42, 44) tem intentado para uma forma totalmente diversa desta via aparentemente mais natural, pretendendo esta obtenção através de compostos como glicose e sacarose.

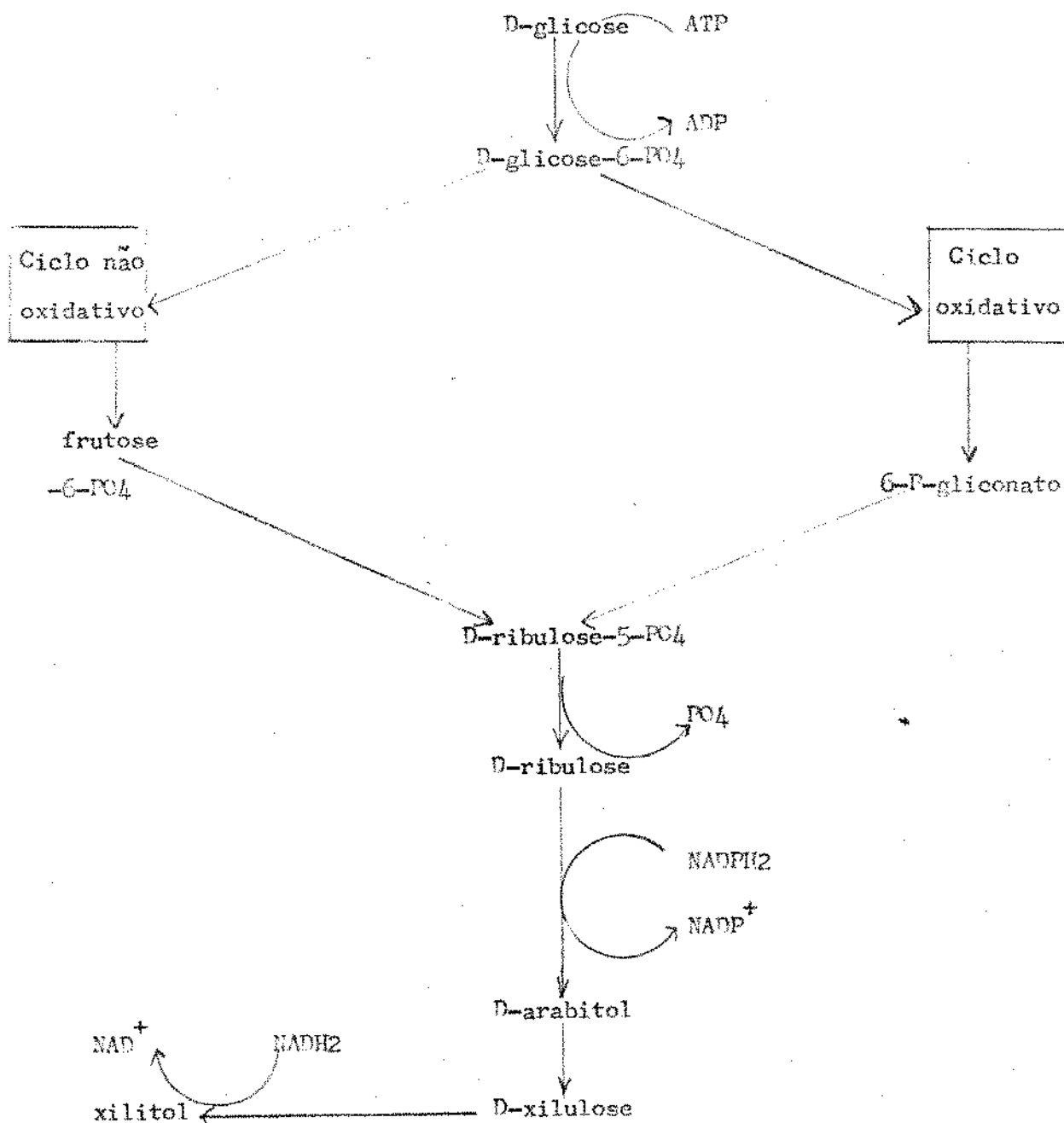
As pesquisas que conduziram à produção de D-arabitol e à elucidação de seu mecanismo bioquímico são devidas a Spencer e Sallans (42) esclarecendo que na fermentação de glicose por Zigosaccharomyces acidifaciens havia formação de D-arabitol e outros poli-álcoois, cuja síntese não era alterada com a adição de levedura e uréia ao meio. Por esse motivo, num ensaio posterior estudou-se a substituição destes pelo caldo de maceração de milho, resultando em melhoria das condições gerais de crescimento quando, juntamente com esta providência se mantinha a temperatura de 37°C durante o processo.

Spencer e Sallans (43) foram os primeiros a estudar a via de formação do D-arabitol em leveduras, fazendo uso de glicose marcada e afirmando que além da Via Embden-Meyerhof, se fazia presente outro esquema. Essas pesquisas tiveram prosseguimento com os trabalhos de Ingram e Wood (19) que demonstraram (fig. 13) definitivamente como ocorre a metabolização pelas duas vias indicadas por Spencer e Sallans.

Segundo o esquema, o D-arabitol se forma a partir da glicose por uma rota oxidativa e outra não oxidativa. Na ausência da rota não oxidativa somente metade de NADPH produzido pela rota oxidativa pode ser regenerado. O aumento da síntese de glicerol devido a aeração em excesso, talvez seja consequência de uma oxidação da glicose pela via pentose fosfato, com um consequente aumento de NADPH. Por um mecanismo semelhante à fermentação alcoólica, a formação de polióis regeneraria NAD.

Posteriormente, Spencer e Shu (44) estudaram o efeito da oxigenação do meio concluindo que, à medida que se aumentava o arejamento o rendi-

Figura 13 - REAÇÕES METABÓLICAS CONDUZINDO À SÍNTESE DO XILITOL A PARTIR DE GLICOSE.



Modificado de INGRAM J.M.; W.A. WOOD. Enzymatic basis for D-arabitol production by Saccharomyces rouxii. J. Bacteriol. 80. 1186-1193. 1965.

mento melhorava e a restrição do oxigênio provocava a formação de álcool etílico. Da mesma forma, ocorria aumento de álcool etílico à medida que se aumentava a concentração de fosfato.

As experiências conduzidas com Zigosaccharomyces barkeri, Z. mel-lis, e Z. wyosceana (37) demonstraram a aptidão dessas leveduras para elaboração de D-arabitol a partir de glicose. Sendo seu crescimento regulado pela dosagem do extrato de levedura adicionado ao meio que deve ser de 1% para um crescimento satisfatório e rápido. Porcentagens inferiores a 1% têm tendência de prolongar a fermentação. Por outro lado, a adição de aminoácidos, vitaminas e minerais, em nada afetam o rendimento. Este foi aumentado pela aeração como no caso de Z. acidifaciens. Pois a aeração moderada permite restringir a oxidação do NADPH que então se torna dispensável para reduções que estimulam a produção de D-arabitol e simultaneamente limitam a de álcool etílico.

Visto que haviam trabalhos anteriores, mediante os quais se conseguia fermentar glicose até à produção de D-xilulose, tendo D-arabitol como intermediário, restava obter-se um meio de prosseguir a sequência desde D-xilulose até xilitol, como produto final. Para isso se efetuou longo estudo em que se pesquisou a capacidade de produção de 128 linhagens de levedura, das quais as mais importantes estão representadas no quadro 13. Estas foram divididas em tres grupos de acordo com suas características de produção. No grupo I estão reunidas as leveduras que apresentaram capacidade de transformar D-xilulose em xilitol, das quais, Candida guilliermondii var. soja ATCC 20216 é a mais representativa. Daí ter sido escolhida para figurar no ensaio trifásico (quadro 14). No grupo II figuram os microrganismos que com o mesmo substrato produziram D-arabitol, isto é, conduziram o processo no sentido inverso ao desejado. No grupo III, finalmente, as que produziram com o mesmo substrato, xilitol, porém juntamente com grandes quantidades de D-arabitol.

A última pesquisa sobre esta variante é atribuída a Onishi e Suzuki (34) que esquematizaram um ensaio trifásico, representando o acúmulo de

Quadro 13 - TIPO DE PENTITOL PRODUZIDO POR LEVEDURAS TEMPO D-XILULOSE COMO SUBSTRATO

Linagem de levedura	Tempo de Fermentação (dias)	D-xilulose g/100 ml. inicial - final	Pentitol produzido g/100 ml.	% pentitol formado na base de consumo de D-xilulose.
I - Produtores de xilitol				
Saccharomyces rouxii N28	5	6,4	5,5	0,3
S. rouxii E7	5	6,4	3,6	0,8
" " 3281	5	6,4	2,3	1,1
" " 3292	5	6,4	2,1	0,1
" " 3215	7	6,4	3,0	0,4
" " 3217	5	6,4	5,8	0,2
" " 3219	6	6,4	4,4	0,9
" " 3221	7	6,4	3,9	0,7
" " 3222	5	6,4	4,0	1,2
" " 3224	5	6,4	5,6	0,2
" " Var. hal. A31	5	6,4	1,2	0,5
" " acidifaciens 50	5	6,4	2,8	1,4
" " Var. hal. B3	5	6,4	5,1	0,6
" " mellis 3220	7	6,4	0,2	0,6
Derbaryomyces hansenii ATCC 20220	4	5,9	2,3	1,5
Pichia farinosa ATCC 20210	3	5,9	0,1	0,6
Pichia farinosa ATCC 20218	6	5,0	0,2	0,8
Hansenula anomala	4	5,9	1,8	0,3
Hansenula suaveolens	3	5,6	1,6	0,5
Endomycopsis chodatii	3	5,9	0,3	0,3
Candida tropicalis ATCC 20215	4	5,0	0,4	0,8
Candida tropicalis 3540	3	4,7		1,1
Candida guilliermondii				
var. soya ATCC 20216	3	5,0	1,0	1,0
				25,0

(continuação - Quadro 13)

Linhagem de levedura	Tempo de fermentação (dias)	D-xilulose g/100 ml.		Pentitol produzido g/100 ml.	% pentitol formado na base de consumo de D-xilulose.
		inicial	final		
<i>Candida melibiosi</i> IFO 961	3	6,4	1,9	0,7	15,5
" sp. 3547	3	5,0	0,3	0,7	14,8
" sp. 3548	4	5,0	0,3	0,7	14,8
<i>Cryptococcus neoformans</i>	4	5,2		0,2	3,3
II - Produtores de D-arabitol					
<i>S. rouxii</i> 3218	5	6,4		0,2	15,3
<i>D. hansenii</i> ATCC 20212	5	5,9		2,8	47,4
" " 3170	4	5,9		0,8	13,2
" " 3176	5	5,9		2,9	54,7
" " 3114	4	5,9		2,9	49,1
" " 3179	4	5,9		0,5	12,5
<i>Hansenula subpelliculosa</i>	4	5,9		0,9	15,2
<i>Torulopsis famata</i> ATCC 20214	4	5,9		1,5	37,5
" <i>halophila</i>	5	5,9		1,5	65,2
" <i>versatilis</i> CBS 1752	6	5,9		2,3	79,3
<i>Candida polymorpha</i> ATCC 20213	4	5,9		1,5	31,2
" <i>parapsilosis</i> IFO 708	3	6,4		0,8	14,8
II - Produtores de D-arabitol					
<i>Candida parapsilosis</i> var intermediária IFO 1021	3	6,4		1,1	29,7
<i>Trigonopsis variabilis</i>	7	5,0		1,9	39,7
III - Produtores de xilitol e arabitol					
<i>Candida guilliermondii</i> 3529	6	5,7		1,8	51,4

Reproduzido de ONISHI, H; T. CIRIACI. Microbial production of xylitol from glucose Appl. Microbiol. 18, 1021-1035. 1969.

seus próprios conhecimentos com o resultado de outras investigações, seguindo a sequência: glicose $\longrightarrow$ D-arabitol $\longrightarrow$ xilulose $\longrightarrow$ xilitol. Esta sequência foi estabelecida por uma lógica no fato de anteriormente ter-se verificado a produção de D-arabitol por meio de levedura, sendo este polialcool convertido a D-xilulose por Acetobacter. Portanto, bastaria a transformação deste último produto em xilitol, trabalho do qual os autores acima mencionados se encarregaram. Após comprovada esta última fase, puderam esboçar um ensaio em 3 fases, utilizando em cada fase intermediária um microrganismo diferente e dispensando purificação durante a sequência de operações.

Na etapa inicial empregou-se Debaryomyces hansenii ATCC 202212 num meio contendo 15,5g de glicose e 4% de minerais, caldo de maceração de milho, extrato de leveduras em pH 5,0. Incubou-se por 4 dias a 30°C, durante os quais, consumiu-se 13,8g de glicose por 100 ml do meio e produziu-se 5,9g de D-arabitol por 100 ml do caldo. O rendimento de D-arabitol foi então de 34,2% da glicose consumida.

Quando se esgotou todo o conteúdo de glicose, o meio nutritivo foi ajustado para pH 6,0 por meio de NaOH, sem se remover as células de leveduras e autoclavando-se a 120°C por 15 minutos. O caldo foi desta forma, enriquecido com nutrientes, favorecendo durante a segunda fase o desenvolvimento de Acetobacter suboxidans, o qual oxidou D-arabitol quantitativamente a D-xilulose, em dois dias a 30°C em frascos agitadores. Na terceira fase em que ocorre a redução de D-xilulose a xilitol por Candida guilliermondii var. soya, adicionou-se 4% de caldo de maceração de milho, sendo o meio ajustado para o pH 6,0 com NaOH e autoclavando-se a 10 libras de pressão por cinco minutos para se prevenir contra reações de escurecimento. Em 54 horas foi consumida 1,8 gramas de D-xilulose por 100 ml do meio (41,3%), (quadro 14).

Desta forma a partir de 77,5g de glicose, produziram-se 9g de xilitol, com um rendimento final de 11,6%. O xilitol assim obtido, foi isolado em cristais puros e indentificado pelo ponto de fusão, análise elementar e espectro no infravermelho.

Quadro 14 - PRODUÇÃO DE XILITOL A PARTIR DE GLICOSE EM TRES FASES

Fases de fermentação	Quantidade de açúcar ou poliol g/100 ml	Rendimento em cada fase	Rendimento da glicose inicial
Glucose	15,5		
I. Debaryomyces hansenii fermentação em 22 hrs.	(77,5g/500ml.)		
↓			
D-arabitol	5,3	34,2	34,2
II. Acetobacter suboxidans fermentação em 44 hrs.			
↓			
D-xilulose	5,0	94,3	32,3
III. Candida guilliermondii var. soya fermentação por 64 hrs.			
↓			
Xilitol	1,8 (9,0g/500ml.)	41,8	11,6
↓			
D-xilulose residual	0,7		

Reproduzido de ONISHI, H; T. SUZUKI. Microbial production of xylitol from glucose Appl. Microbiol. 12, 1031-1035. 1969.

VI - CONSIDERAÇÕES ECONÔMICAS

Os estudos objetivando a produção de xilitol a partir da glicose, poderão permitir uma opção industrial e, apesar de não ter sido possível elevar o fator de conversão propiciando maior rendimento, o fato é que alguns autores japoneses (34) são defensores dessa variante, proclamando ser este processo mais econômico que o método que tem o xilano como ponto de partida. Pelo menos nas condições daquele País, onde a glicose representa uma maté-

ria prima mais abundante que os resíduos hemicelulósicos, esta forma de raciocínio é válida.

É ainda duvidosa a exequibilidade econômica de um ou outro dos processos. Será mais fácil julgar entre os dois processos enzimáticos qual o mais viável; se o que inicia com a glicose ou, se o que tem no xilano o ponto de partida. Ambos utilizam mais de uma fase fermentativa. A glicose porém necessita menos purificação e é um produto mais estudado do ponto de vista analítico. Tem muito mais difusão de métodos de laboratório de que o xilano, e a pesquisa microbiológica com a glicose é mais tradicional de que com o xilano. Visto sob este aspecto, um imenso campo se abre para os países produtores de açúcar, onde o melaço, sub-produto dessa indústria é aproveitado na fermentação de outro álcool: o etílico. Não se conhece porém nenhum estudo de custo industrial envolvendo a produção de xilitol por via enzimática. A argumentação dos autores japoneses está firmada numa pré-análise e não numa experiência de planta industrial.

Na obtenção por via química há no entanto dois estudos de profundidade. O primeiro, realizado nos Estados Unidos por iniciativa do "Bureau of Standards", autorizado pelo Congresso Americano (9), visando unicamente o custo para a xilose. Embora tivesse sido executado em 1945, este trabalho ainda pode ser confrontado com o estudo mais recente. O quadro 15 ilustra os diversos valores encontrados numa experiência com sabugos de milho em uma planta semi-industrial.

O estudo mais recente porém, é o realizado por Keller (23) com bagaço de cana, prevendo o custo de instalação e funcionamento de uma planta com capacidade de 15.000 ton. de xilitol por ano, com jornada diária de 24 horas e 300 dias de trabalho por ano.

O processo adotado para hidrólise do xilano é o químico com ácido sulfúrico. A conversão da xilose em xilitol é por hidrogenação catalítica com níquel metálico. A sacarificação da celulose se realizou pelo processo Scholler.

A previsão é de total aproveitamento da matéria prima com grandes rendimentos de furfural, lignina e levedura seca. As fases da produção de xi-

litol por este processo estão mencionadas no quadro 16. Os custos da produção de 15.000 toneladas de xilitol a partir do bagaço de cana-de-açúcar es tão estimados nos quadros 17, 18 e 19.

Quadro 15 - PRODUTOS E VALORES OBTIDOS DE 1 TONELADA DE SABUGOS DE MILHO

	25% de xilose em cristais		50% de xilose em cristais	
	quantidade	valor para re venda (Cr\$)	quantidade	valor para re venda (Cr\$)
xilose - kg	61	44,00	122	88,00
furfural - kg	97	125,00	64	83,00
etanol - l.	167	63,00	166	63,00
lignina - kg	103	0,26	103	3,00
Totais		232,26		237,00
custo de conversão				
xilose - kg	61	4,00	122	9,00
furfural - kg	97	14,00	64	9,00
etanol - l.	167	14,00	166	14,00
reagentes		33,00		33,00
sabugos		39,00		39,00
fixos		33,00		33,00
Custo Total..		137,00		137,00
Valores de venda		232,26		237,00
Diferença		90,26		100,00

Reproduzido de DUNNING, J.W; E.C. LATIROP, The Saccharification of agricultural residues. Ind. Eng. Chem. 17, 25-29. 1945.

Quadro 16 - FASES DE PRODUÇÃO DE XILITOL

F A S E S	Produtos Obtidos
<u>Fase I - Hidrólise e evaporação</u>	
100.000 toneladas de bagaço de cana seco	25.000 t xilose em solução de 60-70%
	27.000 t dextrose em solução de 50-60%
	25.000 t lignina com 20% de celulose
<u>Fase II - Cristalização</u>	
25.000 t xilose em solução	16.500 t xilose cristalizado
	8.500 t xilose em solução nascente
<u>Fase III - Hidrogenação e cristalização</u>	
	15.000 t xilitol cristalizado
	1.500 t xilitol em xarope
<u>Fase IV - Hidrólise e retificação</u>	
	4.000 t furfural
<u>Fase V - Cristalização</u>	
27.000 t dextrose em solução de 50-60%	18.000 t dextrose cristalizada
	9.000 t açúcares em solução nascente
<u>Fase VI - Produção de proteínas</u>	
9.000 t de açúcares em solução	5.000 t de levedura industrial com 10% de umidade.

Reproduzido de KELLER, H.A. Xylit, preliminary input calculation for a 15.000 t/y Plant. 7.156, 4-11. 1971.

Quadro 17 - DESPESAS PARA A PRODUÇÃO DE 15.000 t DE XILITOL (FASES I; II; III; IV)

POSICÕES	Preço (cr\$)	Unidade	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Custo Anual
Investimento		1.000,00	4.975	3.250	3.250	11.375	
Construção civil		1.000,00	27.625	7.150	9.100	43.875	
Equipamentos		1.000,00				3.250	
Capital de Giro		1.000,00	32.500	1.600	12.350	58.500	
T o t a l							
Custo de Capital							6.000
Amortização 12,5% p.a.							4.420
interesse sobre o capital investido 8% p.a.							260
interesse sobre o capital operativo 8% p.a.							11.580
T o t a l							
Materiais diversos							
bagaco de cana	32,50/t	1.000 t	100			3.250	
ácido sulfúrico	0,20/t	1.000 t	700			204,75	
CaCO ₃ a 90%	0,00/t	1.000 t	700			62,25	
Soda cáustica	130,00/t	1.000 t	750			97,5	
água	0,26/t	1.000 m ³				65	
resina iônica	9,75/l.			30		292,5	
meio de adsorção	10/t			0,25		227,5	
níquel	71,50/t				15	1.072,5	
diversos						247	
T o t a l							5.510

--continua--

continuação do Quadro 17

POSICÕES	Preço (¢\$)	Unidade	Fase I	Fase II	Fase III	Fase IV	Custo Anual
Energia							
Vapor 14 atm	19,50/t	1.000 t	100			2.145	
Vapor 1 atm	19,50/t	1.000 t	240	15	4,5	5.063,50	
eletricidade	0,13/KWH	1.000 MWH	12	2,4	13,6	3.640	
T o t a l							10.848
Salários							
chefias (4 períodos)	26,00/h	1.000 h	16	8	8	1.032	
operários (7 períodos)	19,50/h	1.000 h	32	16	8	1.092	
salários						1.076	
T o t a l							4.100
Reparos e manutenção							
5% do custo de equipamento						2.100,50	
2% de custo de obras civis						227,50	
T o t a l							2.418
Diversos							
Administração, seguros, taxas, licenças, etc.							4.719
T o t a l							39.193

Reproduzido de KELLER, H.A. - Xvltit, preliminary input calculation for a 15.000 t/v Plant. 7.156, 4-11. 1971.

Quadro 18 - CUSTO INDUSTRIAL DE PRODUÇÃO DE 15.000 t DE XILITOL (FASES I A VI)

POSICÕES	Preço (Cr\$)	Unidade	Fases I a III	Fase IV	Fase V	Fase VI	Total	Custo Anual
Investimentos	(Cr\$ 1.000,00)			975	2.025	1.300	16.575	
Obras civis			11.375					
Equipamentos			43.875	43.875	3.250	7.800	50.475	
Capital de Giro			3.250				3.250	
T o t a l			58.500	4.125	10.725	5.850	79.300	79.300
Custo de Capital								
amortização	(Cr\$ 1.000,00)		6.900,5			0.501,5		
ICI 8% p.a.	(Cr\$ 1.000,00)		4.420			6.084		
ICO 9% p.a.	(Cr\$ 1.000,00)		260			2.600		
T o t a l	(Cr\$ 1.000,00)		11.580,5			15.853,5		15.853,5
Materiais diversos								
Meio de adsorção	0,91/t	t	250		540		718,0	
Sulf. amônio	270,5 /t	1.000 t				2,07	578,5	
apatita	188,5 /t	t				1,26	237,5	
kainita	0,19/t	t				225	42,3	
silvita	0,19/t	t				225	42,3	
outros		1.000 t	812				5.278	
Diversos							247	
T o t a l	Cr\$ 1.000,00		5.525				7.144	7.144
Energia								
Vapor 14 atm/g	10,5 /t	1.000 t	110				2.145	
Vapor 10 atm/g	10,5 /t	1.000 t		52			1.014	
Vapor 1 atm/g	10,5 /t	1.000 t	250,5		10	20	5.821,7	
eletricidade	0,13/kWh	1.000 MWh	28	0,16	2,6	3	4.387,5	
T o t a l	Cr\$ 1.000,00		10.848,5				13.368,2	13.368,2

-continua-

continuação do Quadro 18

POSICÕES	Preço (Cr\$)	Unidade	Fases I a III	Fase IV	Fase V	Fase VI	Total	Custo Anual
Salários								
Chefias (4 períodos)	26/h	1.000 h	32	8	8	8	1.456	
operários	19,5 /h	1.000 h	56		16	16	1.716	
salários	(Cr\$ 1.000,00)		1.976				2.678	
T o t a l	Cr\$ 1.000,00		3.900				5.850	5.860
Reparos e Manutenção								
5% do custo do equipamento	(Cr\$ 1.000,00)		2.100				2.977	
2% do custo das obras civis	(Cr\$ 1.000,00)		227,5				331,5	
T o t a l	Cr\$ 1.000,00		2.418				3.308,5	3.308,5
Diversos								
Administração, segu- ros, taxas, licenças, etc.							6.467,5	6.467,5
TOTAL GERAL	Cr\$ 1.000,00		39.193					52.000

Reproduzido de KELLER, H.A. - Xylit, preliminary input calculation for a 15.000 t/y Plant. 7.156, 4-11. 1971.

Quadro 19 - CUSTO RELATIVO NA PRODUÇÃO 15.000 TONELADAS DE XILITOL

	Fases I a III		Fases I a VI	
	Cr\$ 1.000,00	%	Cr\$ 1.000,00	%
Custo de capital	11532	30	15853,5	31
Materiais diversos	5519	14	71440	14
Energia	10348	28	13368	26
Salários	4100	10	5850	11
Reparos e manutenção	2418	6	3308,5	6
Diversos	4719	12	6477,5	12
T o t a l	39193	100	52001,7	100

Reproduzido de KELLER, H.A. Xylit, preliminary input calculation for a 15,000 t/y Plant. 7156, 4-11. 1971.

Como se observa, as fases I, II e III são indispensáveis e suficientes para produção do xilitol, os produtos gerados nestas fases, inicialmente lignina, xilose em solução nascente e dextrose a 50-60% são posteriormente aproveitados na obtenção de vários produtos, isto é, os descritos nas fases IV, V e VI, os produtos destas fases são o furfural, dextrose cristalizada e levedura industrial, que podem permitir uma substancial economia na produção de xilitol em larga escala, porque há uma maior aceitação de mercado para estes do que para os resíduos que servem para sua obtenção.

É necessário dar-se ênfase a que a planta operacional permita custos tão baixos como é o exigido pela moderna tecnologia. O grau de liberdade da indústria de resíduos praticada atualmente não é ainda aperfeiçoada, pelo fato de não adotar plantas de rendimento total. As experiências modestas por sua vez, podem em alguns casos mostrarem-se abstratas e inconclusivas, na escala em que foram visualizadas, tornando-se difíceis de serem transferidas para

ra a prática.

O melhor mercado será o indicado por um estudo local e regional situando de forma real e precisa o preço, volume e tempo que envolver os diversos produtos; levando-se em consideração que a comercialização dos produtos secundários pode permitir um alívio significativo no custo de xilitol. Apenas a produção e comercialização das 1.500 t de xilitol em xarope e 15.000 t de xilitol em cristais situará o custo de obtenção deste em Cr\$ 2.326,00/t. Enquanto que o aproveitamento dos resíduos e a comercialização de 4.000 t de gliceral, 10.000 t de dextrase, 5.000 t de levedura industrial e 25.000 t de lignina, provocaria um decréscimo no custo, situando-o em Cr\$ 1.300,00/t de xilitol.

Deve-se observar que um processo está deflagrado, pelo estabelecimento de um novo campo industrial, no qual terão êxito aqueles que conseguirem aliar a abundância de resíduos hemicelulósicos, a racionalização dos métodos. De forma indiscutível, o Brasil se inclui entre os grandes potenciais desses resíduos, devendo portanto dar início a este programa, com a criação de equipes e grupos de trabalho com o fim de ditar as normas de racionalização, os estudos das áreas prioritárias, a viabilidade comercial em termos locais ou mundiais. Deve-se não apenas planejar em função de se abastecer o mercado interno e economizar divisas, mas sim como exportador de grande envergadura, como permite o seu extenso potencial.

VII - DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Na produção de xilitol devem ser consideradas duas vias de grande importância e de características bastante diversas no que tange à sistematização de cada processamento. Em cada uma destas vias são oferecidas variantes que permitem diferentes opções.

A fonte de xilitol mais natural é a que tem como origem as hemiceluloses, e que por este motivo é o mais experimentado. Por essa trilha há duas ramificações importantes: o método químico e o enzimático.

O método químico permite aproveitamentos na ordem de 95% tanto na

fase de separação e hidrólise do xilano como na conversão da xilose a xilitol. Primordialmente este processamento previa separação e purificação do produto em cada fase e devido à morosidade do método não se recomenda proceder desta forma, mas numa sequência contínua, realizando no final as operações de purificação.

Há desta maneira uma sensível simplificação do processo com reflexos na economia de calor, energia, geração de vapor, etc. Além de não sujeitar o produto a resfriamento e a fases estacionárias.

A sequência direta foi inicialmente aplicada no processamento enzimático, sendo neste caso ainda mais significativa pois a atividade microbiana numa fase enriquece o substrato para a fase seguinte.

Na degradação enzimática do xilano, por ação da enzima xilanase, obtêm-se rendimentos da mesma ordem, 95% conseguidos no processo químico. Uma grande relação de microrganismos tem sido estudada com esta finalidade. Destes, Coniophora cerebella, demonstrou certa aptidão de elaborar xilanase, sendo inconveniente do ponto de vista de atuar melhor em derivados do que no xilano propriamente dito, o que redundaria inevitavelmente em acrescentar mais uma operação ao método.

Da mesma forma, a combinação das atividades de Aspergillus oryzae e Aspergillus batatae recomendada por Fukui (12) tem o mesmo inconveniente de prolongar esse trabalho, se bem que, a capacidade de atuação destes microrganismos sobre xilo-oligossacarídeos conduza a um melhor aproveitamento da matéria prima.

Desde que nos ensaios de Iizuka e Kawaminami (17) se demonstrou a superioridade da nova espécie Streptomyces xylophagus, classificada pelo referido autor, não há contestação sobre ser esta uma das mais importantes fontes de xilanase. Enquanto que a espécie Trichoderma viride, se bem que inferior oferece adicionalmente a vantagem de ser aplicada na elaboração de celulose.

Na conversão enzimática de xilose a xilitol, Candida utilis se constitui no microrganismo mais estudado e também o mais efetivo. Além de possuir qualidades que o tornam mais aplicável noutros campos de Biotecnologia. Da

mesma forma, Pichia miso e Penicillium chrysogenum, permitem até 100% de rendimento sobre a xilose consumida, o mesmo não acontecendo com 27 leveduras selecionadas de um grupo de 58 que foram observadas competitivamente com P. miso, transformando em xilitol apenas 35-45% da xilose consumida.

Desta forma, a obtenção do xilitol pelo processo microbiológico, tendo como substrato o xilano é considerado como bastante promissor, levando-se em conta que, um notável progresso já se conseguiu em curto prazo e muito mais ainda será possível devido ao avanço da enzimologia. Naturalmente que vários detalhes também deverão ser introduzidos; entre estes, sugere-se um esquema de circulação do material submetido à fermentação, com o propósito de se efetuar a imediata retirada do hidrolisado (xilose) à medida de sua produção; com o fim de se evitar a ação inibidora que este muitas vezes exerce sobre o microorganismo produtor da xilanase. Esta circulação seria realizada, possivelmente pela associação de reatores enzimáticos e ultra-filtração. Separando-se assim, a xilose do meio de fermentação e efetuando-se várias circulações até a completa hidrólise do substrato e evitando-se simultaneamente a exposição da xilose às condições de degradação. Igualmente, pode-se sugerir a intercalação de métodos, mediante a qual, um processo iniciado por via microbiológica poderia ser acabado por um processo químico. Desta forma, a xilose obtida por ação microbiológica poderia ser reduzida quimicamente a xilitol. Permitindo-se uma flexibilidade de adaptação a cada situação em particular.

A possibilidade de produção de xilitol a partir da glicose resulta de uma descoberta de grande alcance. O campo nesta modalidade é bastante vasto, abrangendo resíduos celulósicos previamente sacarificados, amido hidrolisado e sacarose invertida. Conforme este esquema, o resíduo agrícola seria inicialmente esgotado em seu conteúdo de xilano, e em seguida se procederia a hidrólise a glicose, quando então ter-se-iam condições para se iniciar o processo trifásico. Entretanto, o rendimento porcentual deixa bastante a desejar, ainda que os autores acreditem mais na economia deste sistema. Se ainda estes sistemas não ofereceram vantagens sobre o processo químico, ao menos são superiores ao método que tem como ponto de partida o xilano. Por esta razão, este não foi preferido no Ocidente. Assim, o campo industrial do xilitol baseia-se até o presente no processo enzimático em tres fases a partir de glicose, defendido pelos japoneses, e no processo químico com ácido sulfúrico, e

redução catalítica da xilose seguido pelos europeus, russos e americanos. Aos países em situação como a do Brasil cabem duas opções, devendo-se inicialmente estimular-se o aproveitamento das hemiceluloses da casca de arroz, madeira e bagaço de cana pelo método químico, utilizando ácido sulfúrico e catalisação com hidrogênio.

Nas condições atuais, em que apenas o método químico a partir do xilano é o experimentado e aprovado, cabe aos países produtores de resíduos hemicelulósicos, como é o caso do Brasil, estudar as bases em que se estabelecerá o novo campo industrial, e a sua viabilidade financeira. Um estudo desta ordem, deverá inicialmente definir se o País optará pela produção a nível interno, com o simples objetivo de suprir o seu consumo visando a economia de divisas ou, se pela industrialização em alto nível com o fim de se situar entre os grandes produtores. Numa situação em que o país procura se afirmar como industrial, o objetivo certamente será maior. Mesmo porque, existe uma previsão de que o custo do xilitol será futuramente, inferior ao açúcar refinado, razão esta que permitirá sua substituição, como adoçante, visto ser seu poder adoçante superior. Se esta previsão realmente vier a ocorrer, a indústria açucareira sofrerá um impacto para o qual o País deverá estar preparado.

As conclusões finais a que se pode chegar com este trabalho de investigação bibliográfica são as seguintes:

- 1) - O xilitol gradativamente, substituirá o açúcar refinado na dieta normal tanto quanto permita o seu custo. Pois a resistência do consumidor será unicamente de ordem econômica, já que em várias ocasiões tem-se tentado a utilização de adoçantes que não produzam complicações metabólicas.
- 2) - Em consequência se prevê que a futura atividade industrial das usinas de açúcar atuais seja desviada, no propósito de explorar o potencial de xilitol existente no bagaço de cana.
- 3) - A confirmação da experiência japonesa em escala de planta industrial poderia permitir um aproveitamento total de cana-de-açúcar. Pois além de se aplicar o método químico ao bagaço; o caldo da cana, por inversão de sua sacarose fornecerá a glicose necessária àquele processo microbiológico.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - ABDEL AKHER, M.; J.K. HAMILTON; F. SMITH. The reduction of sugars with sodium borohidride. J. Am. Chem. Soc. 73, 4691-4692, 1951.
- 2 - ARDUINO, F. Diabetes mellitus e suas complicações. Rio. Liv. Atheneu. 1962. 1-16.
- 3 - BENDER, A.E. Dietetic foods. New York - U.S.A. - Chem. Co. Inc. 1967. 20-27.
- 4 - BENNET, T.P.; E. FRIEDEN. Tópicos modernos de bioquímica S. Paulo. Ed. Edgard Blucher. 1971. 85-155.
- 5 - CHIANG, C.; S.G. KNIGHT. The conversion of xylose to xylitol by Pennicium chrisogenum. Biochem. Biophys. Acta 20, 664-665. 1958.
- 6 - -----; -----, Metabilism of D-xylose. Nature, 188, 79-81. 1960.
- 7 - DONAHOE, J.F.; R.J. POWERS. Biochemical abnormalities with xylitol. N. Engl. J. Med. 282, 690-691. 1970.
- 8 - DOULOFEU, V.; A.D. MARENZI. Química biológica Rio Ed. Koogan. 1955. 434
442.
- 9 - DUNNING, J. W.; E. C. LATHROP. The saccharification of agricultural residues. Ind. Eng. Chem. 17, 25-29. 1945.
- 10 - FISCHER, E. Über einige Osazone und Hidrazone der Zucker grupe. Ber. 27. 186-189. 1894.
- 11 - FOGLIA, V.G.; YABO; J.P. BERNALDEZ; L.M. AGUIRRE. Xylitol and pancreatic diabetic of the rat. Folia Endocrinol. 16, 240-245. 1963.
- 12 - FUKUI, S. Degradation of xylan by the xylanase system of Aspergillus oryzae. J. Gen. Appl. Microbiol. 4, 39-50. 1958.
- 13 - HARPER, H.A. Review of physiological chemistry. California. - U.S.A. Lange Medica Publication. 1963. 244-277.
- 14 - HAWLEY, L.E.; A.G. NORMAN. The differentiation of hemicelluloses. Ind. Eng. Chem., 24, 1190-1194. 1932.
- 15 - HIRST, E.L. Some problems in the chemistry of the hemicelluloses. Lecture delivered at the University of N. Wales. 1955. No published.

- 16 - HORITSU, H.; M. TOMOEDA; K. KUMAGAI. Pentose metabolism in Candida utilis. Agr. Biol. Chem. 32, 514-517. 1968.
- 17 - IIZUKA, H.; T. KAWAMINAMI. Production of xylanase by Streptomyces xilophanus nov. sp. Agr. Biol. Chem. 33, 1257-1263. 1969.
- 18 - INAOKA, M.; H. SODA. Crystalline xylanase. Nature 178, 202-203, 1956.
- 19 - INGRAM, J.M.; W.A. WOOD. Enzymatic basis for D-arabitol production by Saccharomyces rouxii. J. Bacteriol. 80, 1186-1193. 1965.
- 20 - JAKOB, A.; T. ASAKURA; J.R. WILLIAMSON. Effect of xylitol on hepatic gluconeogenesis and ketogenesis. Diabetes, 19, 357. 1970.
- 21 - KAWAMINAMI, T.; H. IIZUKA. Production of xylanase by Streptomyces xilophagus nov. sp. Agr. Biol. Chem. 33, 1787-1789. 1969.
- 22 - ———; ——— Action of xylanase of Chaetomium trilaterale Strain n^o 2267. upon xylan. J. Ferm Technol. 48, 161-168. 1970.
- 23 - KELLER, H.A. Xylit - preliminary input calculation for a 15,000 t/y plant. Doublekay 7156 4-11. 1971.
- 24 - KING, N.J. The extracellular enzymes of Coniophora cerebella. Biochem. J. 100, 784-792. 1966.
- 25 - KING, N.J.; D.B. FULLER. The xylanase system of Coniophora cerebella. Biochem. J. 108, 571-576. 1968
- 26 - KOBAYASHI, R.; Y. SAKAI; T. KOBAYASHI. Extraction of pentosan from hardwood with dilute sodium hydroxide. J. Ferm. Technol. 46, 753-760. 1968.
- 27 - LI, H.L.; R.M. FLORA; K.W. KING. Individual Roles of cellulase components derived from Trichoderma viride. Arch. Biochem. Biophys 111, 439-447. 1965.
- 28 - McCORMICK, D.B.; O. TOUSTER. The conversion in vivo of xylitol to glycogen via the pentose phosphate pathway. J. Biol. Chem. 229, 451-461. 1957.
- 29 - MONTAGUE, W.; K. TAYLOR. pentitol and insulin release by isolated rat islets of Langerhans. Biochem. J. 100, 333-339, 1968.
- 30 - NOMURA, K.; T. YASUI; S. KIYOOKA; T. KOBAYASHI. Xylanases of Trichoderma viride. J. Ferm. Technol. 46, 634-640. 1968

- 31 - -----; -----; -----; ----- Xylanases of Trichoderma viride.
J. Biochem. 63, 531-607. 1968.
- 32 - OKADA, G.; K. NISHIZAWA; H. SUZUKI. Cellulase component from Trichoderma viride. J. Biochem. 63, 591-607. 1968.
- 33 - ONISHI, H.; T. SUZUKI. The production of xylitol, L-arabinitol and ribitol by yeasts. Agr. Biol. Chem. 30, 1139-1144. 1966.
- 34 - -----; ----- Microbial production of xylitol. from glucose. Appl. Microbiol. 18, 1031-1035. 1969.
- 35 - PAABO, G.J.; A.M. UESSON. Isolation of D-xylose from sulphite waste. Food Sci. Technol. Abst. 4, 2L140. 1972.
- 36 - PAVLOVSKA, E.; J. KURNA; J. LUKAC; M. BOROVIČKA. Sugar Alcohols. Czech 132, 906. 1969. C.A. 66863. 1970.
- 37 - PETERSON, W.H.; W.F. HENDERSHOT; G.J. HAJNY. Production of Polyhydric alcohols. Appl. Microbiol. 6, 349-351. 1958.
- 38 - SCHER, D.M.; B.L. HORECKER. Pentose metabolism in Candida. Arch. Biochem. Biophys. 116, 117-128. 1966.
- 39 - SCHREIBER, W. T.; N.V. GEIB; B. WINGFIELD; F. ACREE. Semi-commercial production of xylose. Ind. Eng. Chem. 22, 497-501. 1930.
- 40 - SCHULTZE, H.J.; R. MOUDRY. Verfahren zur herstellung reiner xylose aus hemmicellulosehaltigen material. Food. Sci. Technol. Abst. 4, 8L600. 1972.
- 41 - SOBOLEVA, G.D.; V.Y. MESHKOVA. Preparation of crystalline xylitol from cottonseed hulls. Gid. Les. Prom. 23, 3. 1970.
- 42 - SPENCER, J.F.T.; H.R. SALLANS. Production of polyhydric alcohols by osmophilic yeasts. Can. J. Microbiol. 2, 72-79. 1956.
- 43 - -----; ----- Polyhydric alcohols production by osmophilic yeasts. Studies With C¹⁴ labelled glucose. Can. J. Biochem. Physiol. 34, 435-501. 1956.
- 44 - ----- P. SHU. Polyhydric alcohols production by osmophilic yeasts: Effect of oxygen tension and inorganic phosphate concentration. Can. J. Microbiol. 3, 559-567. 1957.

- 45 - WHISTLER, R.L. Advances in Carbohydrate. Dep. Agric. Chem. Purdue Univ.
5, 269-290. 1950.
- 46 - WHISTLER, R.L.; E. MASAK Jr. Enzymatic Hydrolysis of xylan. J. Am. Chem.
Soc. 77, 1241-1243. 1955.
- 47 - WHITE, A; P. HANDLER; D.W. SMITH. Principios de bioquímica. New York .
U.S.A. Mc Graw Hill. 1964. 30-37.
- 48 - WOLFROM, M.L.; E.J. KOHN. Crystalline xylitol. J. Am. Chem. Soc. 64 .
1739. 1942.
- 49 - YAMAGATA, S. Clinical effect of xylitol on carbohydrate and lipid meta-
bolism. The Lancet 2, 918-921. 1965.