



UNICAMP



Estudos de aspectos funcionais e analíticos dos polióis xilitol e arabitol

Palavras-Chave: Álcoois de açúcar; Bioprocessos; Compostos funcionais; Cromatografia.

Autores(as):

Rafaela Aparecida Rodrigues Cabral, FEA - UNICAMP

Msc. Gabriel Bevilaqua, FEA - UNICAMP

Prof. Marcus Bruno Soares Forte, FEA- UNICAMP

INTRODUÇÃO

Dentre os compositores da biomassa vegetal, massa que pode ser obtida a partir de resíduos agroindustriais, estão os açúcares xilose e arabinose, que podem ser extraídos e convertidos nos isômeros xilitol e L-arabitol a partir de processos biotecnológicos (MEDEIROS, 2019). Por serem gerados em processos fermentativos, gerando caldos fermentados compostos de açúcares, etanol, xilitol e arabitol, as estruturas e propriedades semelhantes criam o desafio de estudá-los e quantificá-los de forma simultânea (BELAVIQUA, 2023). Desta forma, este projeto foi produzido objetivando a otimização de métodos de estudo simultâneo de xilitol e L-arabitol em meios fermentativos através de delineamentos experimentais e investigar potenciais aplicações desses poliálcoois, com estudos de efeitos prebiótico.

METODOLOGIA E RESULTADOS

I. Otimização da determinação analítica de xilitol e arabitol

Ao iniciar o estudo, utilizou-se o método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - Thermo Fisher Scientific Inc., Accela, United States) equipado com detector de índice

de refração (Thermo Fisher Scientific Inc., Accela, United States) e utilizando água Milli-Q como fase móvel, que demonstra a separação de um componente do restante da amostra com um pico, sendo esta separação estimulada pelo nível de afinidade do componente com a coluna utilizada no aparelho. O método utilizado para quantificação dos polióis xilitol e arabitol indicado pela literatura é com a coluna Agilent Hi-Plex Ca, porém, foi evidenciado um segundo desafio, uma vez que, nesse método L-arabitol e etanol, produto que também é gerado em bioprocessos de produção de xilitol e arabitol, coeluem, ou seja, os picos de separação são sobrepostos. Nesse contexto, foi realizado um delineamento experimental composto central rotacional com 8 ensaios e 3 pontos centrais ($n = 11$) para avaliar os efeitos das variáveis independentes fluxo (x_1) e temperatura (x_2) nas respostas tempo total do processo analítico (y_1) e fator de separação (delta).

A partir disso, foram obtidos os resultados observados na Tabela 1.

Ensaio	Variáveis		Respostas	
	Temperatura - x_1 ($^{\circ}\text{C}$)	Fluxo - x_2 ($\mu\text{L}/\text{min}$)	Tempo total - y_1 (min)	Delta - y_2 (min)
1	58	430	39.8	1.61
2	72	430	36.9	0
3	58	580	29.6	1.40
4	72	580	24.5	0
5	55	505	34.2	1.84
6	75	505	31.3	0
7	65	399	41.6	1.11
8	65	611	27.4	0.77
9	65	505	29.8	1.17
10	65	505	32.4	0.80
11	65	505	32.8	0.74

Tabela 1. Variáveis e respostas do delineamento experimental para avaliação do tempo total de análise e separação entre os compostos arabitol e etanol por cromatografia.

Percebeu-se que nos testes 2, 4, 6 e 10, os picos do etanol e do arabitol coeluíram totalmente, sendo um resultado negativo, uma vez que é esperado que tais compostos tenham uma separação clara para permitir a quantificação. Observando novamente a Tabela 1, pôde-se concluir que o fator em comum dos testes em que ocorreu a coeluição é a alta temperatura, condição, portanto, não favorável para a separação eficaz dos compostos.

Foram obtidas maiores resoluções (razão da diferença entre os tempos de retenção do etanol e arabitol pela média entre a abertura de ambos picos), e os 3 picos separados de forma clara e não coincidentes, além de um tempo total de análise menor, nos testes 1 e 3. Esses testes tiveram temperaturas baixas (58°C) e fluxo de, respectivamente, $430 \mu\text{L}/\text{min}$ e $580 \mu\text{L}/\text{min}$, respectivamente. Podendo-se concluir que menores temperaturas e maiores fluxos favorecem melhores resultados, logo, uma melhor separação.

Além disso, dentre estes dois testes, foi analisado que o teste 3 possuiu um menor tempo total de análise (29,6 minutos, cerca de 10 minutos a menos que o teste 1) e uma melhor separação dos compostos, uma vez que sua resolução também é maior, sendo de 0,65 enquanto a do teste 1 é de 0,58.

Analisando os resultados estatisticamente pela plataforma “protimiza”, foi possível obter os efeitos padronizados para as variáveis fluxo (x_2) e temperatura (x_1) apresentados na Figura 1.

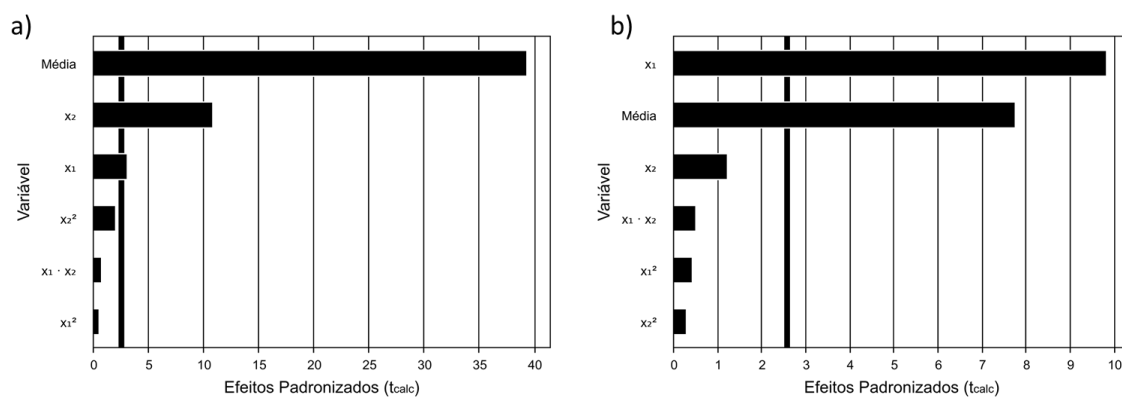


Figura 1. Efeitos padronizados das variáveis no tempo total do processo (a) e no delta de separação (b). A linha vertical espessa indica o valor correspondente ao p-valor de 0,05.

Com este resultado experimental, pôde-se concluir que o fluxo possui uma maior influência no tempo total levado para a análise da amostra. Além disso, no delta de separação, percebeu-se maior impacto da temperatura, com efeitos não significativos estatisticamente do fluxo. Os termos quadráticos e combinados (x_1^2 , x_2^2 , x_1x_2) não apresentaram efeitos estatisticamente significativos (p -valor < 0,05) para nenhuma das respostas.

Pelo estudo realizado, portanto, percebeu-se que o melhor método a ser aplicado no HPLC para a separação concomitante de xilitol, arabitol e etanol foi utilizado o fluxo de 580 $\mu\text{L}/\text{min}$ e temperatura de 58 $^\circ\text{C}$, pois permitiu a melhor separação em um menor tempo de processamento.

II. Avaliação do crescimento utilizando a metodologia desenvolvida:

Nesta fase, foi realizado um crescimento em meio sintético para ratificar a metodologia analítica desenvolvida. Para isso, o microrganismo *Rhodospiridium toruloides* foi inicialmente inoculado em um meio de ativação (extrato de levedura-10 g/L, peptona-20 g/L, xilose-10 g/L e glicose-20 g/L) e após 24h no meio de fermentação (extrato de levedura-10 g/L, peptona-20 g/L, xilose-55 g/L, glicose-8 g/L, KH_2PO_4 -2,7 g/L e MgSO_4 -0,3 g/L) a 200 rpm e 28 $^\circ\text{C}$, este que foi feito em triplicata(A, B e C) por 96 h.

Das triplicatas, foram retiradas 9 amostras, que posteriormente foram submetidas a testes no HPLC no meio otimizado para melhor avaliação do crescimento em meio sintético.

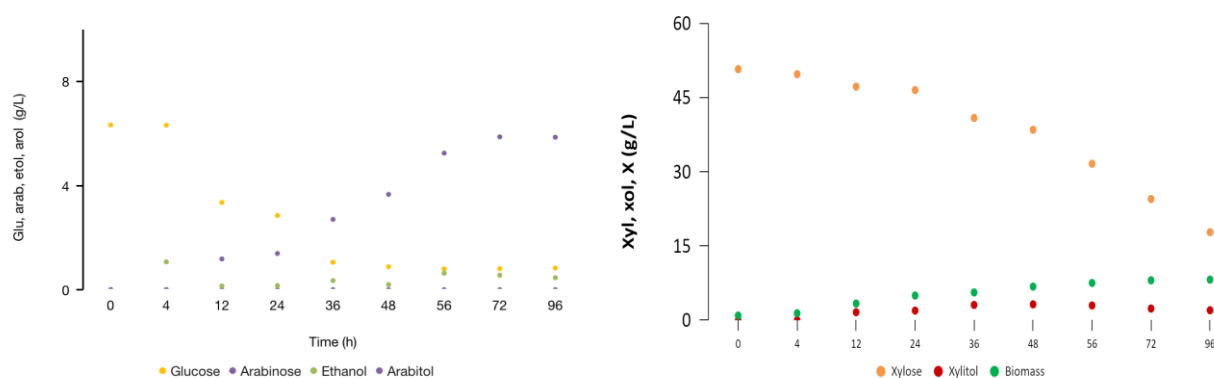


Figura 2. Processo fermentativo com produção dos polióis observado em meio fermentado

Ao observar os resultados obtidos, pode-se constatar que o microrganismo consome xilose mais intensamente com a queda da concentração de glicose, produzindo xilitol e

arabitol. Pelas vias convencionais de conversão de xilose em bioprodutos por leveduras assimiladoras de pentoses (Farias et al., 2022; Bevilaqua et al., 2023), esperava-se que a xilose fosse majoritariamente convertida a xilitol. No entanto, percebeu-se um direcionamento maior para a produção de arabitol a partir da xilose, devido às interconexões entre as rotas metabólicas e à priorização específica da levedura para a produção de arabitol(6g/L) em comparação com o xilitol (2g/L)

Quanto aos parâmetros obtidos, possuímos o Yps, sendo a razão entre a quantidade de produto produzido e a quantidade de substrato consumido. O Yps arabitol(quantidade de arabitol produzida por quantidade de xilose consumida) somado ao Yps xilitol no tempo 48 horas, resulta em um valor aproximado de 0,7, aproximado do valor resultante da produção de xilitol e arabitol a partir da fermentação de *Candida tropicalis*, que é 0,78 (BEVILAQUA, 2023).

III. Efeito Prebiótico:

Para a avaliação do efeito prebiótico, preparou-se meio MRS (deMan, Rogosa e Sharpe) com glicose(10g/L), inoculando-o com *Lactobacillus acidophilus*.

Em seguida, foram realizados crescimentos em placas de 96 poços, com fermentação em estufa a 37 °C e leitura de densidade óptica em leitor de microplacas Tecan Infinite (Männedorf, Suíça) com o meio MRS adicionado de glicose, xilitol e/ou arabitol, nas proporções apresentadas na Tabela 2.

Identificação do Meio	Glicose (g/L)	Xilitol (g/L)	Arabitol (g/L)
Branco	0	0	0
Água	0	0	0
G-5	5	0	0
G-10	10	0	0
X-5	0	5	0
X-10	0	10	0
A-10	0	0	10
X:A 25:75	0	2,5	7,5
X:A 50:50	0	5	5
X:A 75:25	0	7,5	2,5
G:X 50:50	5	5	0
G:A 50:50	5	0	5

Tabela 2. Meios avaliados no crescimento em microplacas.

A tiragem de dados ocorreu nos tempos 0, 3, 6, 26, 48, 72 e 96 horas, sendo possível obter os resultados expostos na Figura 5 para o crescimento de *L. acidophilus*.

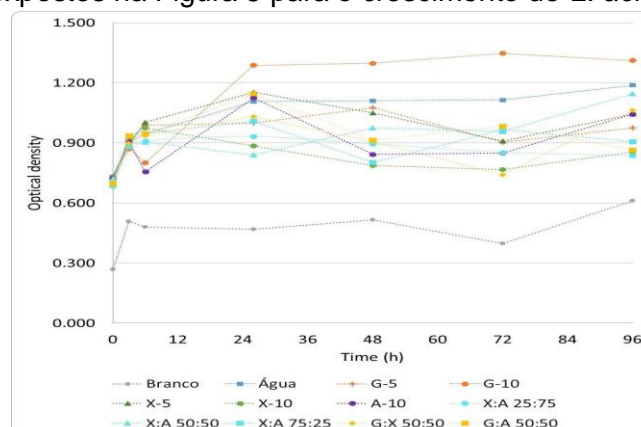


Figura 5. Crescimento de *L. acidophilus* nos meios avaliados

Ao analisar o gráfico, pode-se identificar que o maior crescimento de *Lactobacillus* foi presente no meio formado apenas por glicose, o que já era esperado considerando o potencial já conhecido da glicose para promover o crescimento da cepa. Quanto aos outros meios avaliados, a densidade óptica não foi significativa para ser possível considerar um efeito prebiótico, pois o crescimento em meios com xilitol e arabitol foi equivalente ao crescimento no meio com água. Apesar disso, esse fato não define estes compostos como não prebióticos, uma vez que diversas cepas de *Lactobacillus* possuem a capacidade de assimilar ao menos o xilito (Almståhl, A., Lingström, P., Eliasson, L. et al., 2013). Desta forma, a possibilidade de um potencial prebiótico do xilitol e arabitol em meios inoculados por *Lactobacillus* não pode ser descartada, uma vez que novos testes podem ser feitos com diferentes cepas e avaliando diferentes parâmetros além da densidade óptica.

CONCLUSÃO

Após a pesquisa realizada, pode-se concluir que as condições otimizadas para a análise simultânea do xilitol e arabitol são em maior fluxo e temperaturas amenas, como 580 uL/min e 58°C. Além disso, na avaliação do crescimento utilizando esta metodologia otimizada, foi observado um crescimento potencial da produção de xilitol e arabitol quando em meio fermentado por *Rhodospiridium toruloides*, atingindo uma soma de Yps aproximada de 0.7, sendo um resultado significativo uma vez que se aproxima de 1.

Além disso, no teste do efeito prebiótico do xilitol e arabitol em meio fermentado por *Lactobacillus acidophilus* foi obtido um efeito dispensável, o que pode ter ocorrido uma vez que a cepa de *Lactobacillus* utilizada não possuía grande capacidade de assimilar os polióis, sendo necessários novos testes com diferentes cepas.

BIBLIOGRAFIA

BRANCO, R. **Produção enzimática de xilitol utilizando sistema de regeneração de coenzima como alternativa às vias química e microbiológica de obtenção**. Disponível em: [..](#). Acesso em: 28 julho. 2024.

de Medeiros, L. L., da Silva, F. L. H., da Conceição, M. M. (2019). **Processo biotecnológico de produção de edulcorantes a partir do hidrolisado do sisal (Agave sisalana)** https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/19305?locale=pt_BR

Bevilaqua, G. C., Filho, F. M., & Forte, M. B. S. (2023). **Simultaneous production of xylitol and arabitol by *Candida tropicalis* fermentation improving agro-industrial wastes valorization**. Food and Bioproducts Processing. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2023.04.006>

Almståhl, A., Lingström, P., Eliasson, L. et al. **Fermentation of sugars and sugar alcohols by plaque *Lactobacillus* strains**. *Clin Oral Invest* **17**, 1465–1470 (2013). <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0832-z>