

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA (EEL)

LARISSA CANILHA

Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo

Lorena - SP

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

LARISSA CANILHA

Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo

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

Área de concentração: Conversão de Biomassa

Orientador: Dr. João Batista de Almeida e Silva

Co-orientador: Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe

Lorena - SP

2006

FOLHA DE APROVAÇÃO

Larissa Canilha

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

Área de concentração: Conversão de Biomassa

Orientador: Dr. João Batista de Almeida e Silva

Co-orientador: Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe

Aprovado em: 02/06/2006.

Banca examinadora:

Dr. João Batista de Almeida e Silva - Presidente da Banca / EEL

Dr. Marco Giulietti / IPT e UFSCar

Dr. Urgel de Almeida Lima / ESALQ

Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata / EEL

Dr. Ismael Maciel de Mancilha / EEL

Lorena - SP

2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA (EEL)

LARISSA CANILHA

Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo

Este exemplar corresponde a versão final da Tese de
Doutorado aprovada pela Banca Examinadora.

Dr. João Batista de Almeida e Silva
Presidente da Banca Examinadora

Lorena - SP
2006

Dedico este trabalho:

a minha vó, *Joca*;

aos meus pais, *Gustavo e Jussara*;

aos meus irmãos, *Melissa e Gustavo*;

a minha sobrinha, *Julia*;

ao meu noivo, *Walter*;

pelo carinho e presença constante.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Professor Dr. João Batista de Almeida e Silva, pela orientação, amizade e confiança.

A Escola de Engenharia de Lorena/USP (nossa sempre querida FAENQUIL) pela oportunidade da realização do Doutorado.

Ao laboratório de Tecnologia de Partículas da Divisão de Química do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) do Estado de São Paulo pela oportunidade da realização desse trabalho.

Aos Professores do Departamento de Biotecnologia, em especial, Arnaldo Márcio, George, Graça, Inês Roberto, Ismael, Silvio Silvério, pelos ensinamentos, sugestões e amizade.

Aos Professores do laboratório de Tecnologia de Partículas, em especial, Marco Giulietti, Marisa Zuccolo e Silas Derenzo.

Ao “chegado” Paulo Roberto e a Ritinha, amigos inseparáveis nas horas mais difíceis.

Aos amigos, Adriana, Aline, André, Baby, Daniel, Débora, Denise(X), Eliana, Ernesto, Fernanda, Giovani, Giuliano, Júlio, Lili, Mário, Martha (compita), Priscilas, Regininha, Sandrinha, Solange, Soninha, Taís e a todos os colegas pela amizade, carinho e ajuda nos momentos precisos.

Aos funcionários da Escola de Engenharia de Lorena, “Azulzinhos”, Ana Lúcia, André Silva, Cris, Ismael, Isnaldi, Júlio, Ludmila, LÍlian, Nicamor, Patrícia, Regina Horta, Sandrinha, Selminha, Silvinho, Valkíria, Zé Cobrinha e Zé Moreira e todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao Instituto Agrônomo de Campinas pela doação da palha de trigo.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

A todas aquelas pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Pela amizade e carinho, enfim, muito obrigada.

BIOGRAFIA

Larissa Canilha, filha de Gustavo Ferreira Canilha e Jussara Salet da Silva, nasceu em Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, em 26 de abril de 1976.

Em fevereiro de 1994, ingressou no curso de Engenharia Química da Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, SP.

Em dezembro de 1998, graduou-se em Engenharia Química pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, SP.

Em setembro de 1999, ingressou no curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, em nível de Mestrado, no Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, SP, onde obteve o título de Mestre em Biotecnologia Industrial em fevereiro de 2002.

Em maio de 2002, ingressou no curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, em nível de Doutorado, no Departamento de Biotecnologia da ex-Faculdade de Engenharia Química de Lorena, hoje Escola de Engenharia de Lorena/USP, Lorena, SP.

RESUMO

CANILHA, L. **Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo**. 2006. 153f. Tese de Doutorado (Biotecnologia Industrial), Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo.

Materiais lignocelulósicos, como a palha de trigo, são fontes abundantes e de baixo custo, com potenciais aplicações em diversos processos biotecnológicos. A fração hemicelulósica desses resíduos lignocelulósicos pode ser hidrolisada usando-se ácidos minerais, liberando a xilose, substrato primordial para a produção de xilitol por via microbiana. Este trabalho tem como objetivo principal estudar e definir as melhores condições de cultivo da levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 a fim de converter a xilose, presente no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo, em xilitol. Também foram realizados ensaios de clarificação do caldo fermentado obtido e ensaios de cristalização do xilitol.

Um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} em face centrada foi utilizado para verificar a influência das concentrações de sulfato de amônio, cloreto de cálcio e farelo de arroz, da concentração do hidrolisado e do pH inicial do meio de fermentação sobre a concentração final de xilitol, produtividade volumétrica em xilitol e o fator de conversão de xilose em xilitol. Os ensaios fermentativos foram realizados em frascos agitados a 200 rpm, 30 °C por 72 h. De acordo com os resultados, a concentração de farelo de arroz, a concentração do hidrolisado e o pH inicial influenciaram significativamente a bioconversão de xilose em xilitol. A análise geral dos resultados levou à conclusão de que 1,0 g/L de sulfato de amônio, sem adição de cloreto de cálcio, 5,0 g/L de farelo de arroz, concentração do hidrolisado igual a três e pH inicial 6,0, representam a composição do meio mais adequada para a produção de xilitol no hidrolisado de palha de trigo. Neste estudo também foi avaliada a percentagem de carvão ativo usada no tratamento do hidrolisado e a composição do meio para o crescimento da levedura. Como resultado final, foram obtidos 30,5 g/L de xilitol, 0,42 g/L.h de produtividade volumétrica e 0,59 g/g de fator de conversão em xilitol. Após a obtenção das melhores condições de cultivo em frascos agitados, foi realizado um ensaio em fermentador de bancada de 2 L com 1,3 L de meio de fermentação a 30 °C, sob agitação de 300 rpm e aeração de 0,4 vvm ($k_{La} = 15 \text{ h}^{-1}$). Visando a cristalização do xilitol, ampliou-se sua produção em um fermentador de 16 L com 12 L de meio, utilizando-se o mesmo k_{La} . Os valores encontrados de concentração final de xilitol (30,68 g/L), produtividade volumétrica (0,37 g/L.h) e de fator de conversão em xilitol (0,65 g/g) foram semelhantes aos valores encontrados em frascos agitados.

Para a clarificação do caldo fermentado foram realizados estudos com as resinas de troca iônica A-860S, A-500PS e C-150. Os melhores resultados em termos de redução da coloração (99,5%) e remoção de fenóis totais (93%), ácido acético (97%) e sólidos totais (67%) foram obtidos quando as resinas aniônicas A-860S e A-500PS, regeneradas com solução de NaOH a 10%, foram utilizadas em sequência. O caldo clarificado foi concentrado, resultando num licor com 726,50 g/L de xilitol, 4,30 g/L de xilose, 3,20 g/L de arabinose e 12,18 g/L de fenóis totais.

Os ensaios de cristalização foram realizados utilizando-se água-etanol como solvente, temperatura de saturação de 50 °C e velocidades de resfriamento linear de 0,2 e 0,4 °C/min. Cristais de xilitol com 99,87%, 95,89% e 95,33% de pureza foram obtidos com solução de xilitol pura, com mistura de 30% de caldo clarificado com 70% de solução de xilitol e com mistura de 50% de caldo clarificado com 50% de solução de xilitol, respectivamente.

Palavras-chave: hidrolisado de palha de trigo, fermentação, *Candida guilliermondii*, xilitol, clarificação, cristalização.

ABSTRACT

CANILHA, L. **Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate**. 2006. 153f. Doctorate Thesis (Industrial Biotechnology), Engineering School of Lorena, São Paulo University, Lorena, São Paulo.

Lignocellulosic materials, like wheat straw, are abundant and cheap sources, with potential applications in different biotechnological processes. The hemicellulosic fraction of these lignocellulosic residues can be hydrolyzed using mineral acids, liberating xylose, primordial substrate for the xylitol production by microbial path. This work has as main objective to study and define the adequate conditions of *Candida guilliermondii* FTI 20037 cultivation to convert xylose, present in a wheat straw hydrolysate, into xylitol. Assays of fermented broth clarification and xylitol crystallization were also performed.

A 2^{5-1} factorial design at centered face was used to verify the influence of ammonium sulphate, calcium chloride and rice bran concentrations, the hydrolysate concentration and initial pH of fermentation medium on xylitol final concentration, volumetric productivity and xylose-to-xylitol bioconversion yield. The fermentative assays were carried out in stirred flasks at 200 rpm stirring rate, 30 °C for 72 hours. According to the results, rice bran concentration, hydrolysate concentration and initial pH significantly influenced the xylose-to-xylitol bioconversion. The general analysis of the results considered that 1.0 g/L ammonium sulphate, without addition of calcium chloride, 5.0 g/L rice bran, 3.0 hydrolysate concentration and 6.0 initial pH, represent the medium composition more adequate for xylitol production from wheat straw hydrolysate. Besides, the active charcoal percentage used in a hydrolysate treatment and the medium composition for yeast growth were also analyzed. As final result, 30.5 g/L xylitol concentration, 0.42 g/L.h volumetric productivity and 0.59 g/g bioconversion yield were obtained. After the attainment of the best cultivation conditions in stirred flasks, an assay in 2-L bench fermentator with 1.3 L of fermentation medium was conducted at 30 °C, 300 rpm stirring and 0.4 vvm aeration rates ($k_{La} = 15 \text{ h}^{-1}$). Aiming the xylitol crystallization, its production was amplified in a 16-L fermentator with 12 L of medium, using the same k_{La} . The values obtained for xylitol final concentration (30.68 g/L), volumetric productivity (0.37 g/L.h) and bioconversion yield (0.65 g/g) were similar to the results obtained in stirred flasks.

For the fermented broth clarification, a study with ion exchange resins A-860S, A-500PS and C-150 were carried out. The best results in relation coloration reduction (99.5%) and removal of phenols (93%), acetic acid (97%) and total solids (67%) were obtained when the A-860S and A-500PS resins, regenerated with 10% NaOH solution, were used in sequence. The clarified broth was concentrated, resulting in liquor with 726.50 g/L xylitol, 4.30 g/L xylose, 3.20 g/L arabinose and 12.18 g/L phenols.

The crystallization assays were carried out using water-ethanol as solvent, 50 °C saturation temperature and 0.2 and 0.4 °C/min linear cooling rates. Xylitol crystals with 99.87%, 95.89% and 95.33% purity were obtained from a pure xylitol solution, from a mixture of 30% clarified broth with 70% xylitol solution and from a mixture of 50% clarified broth with 50% xylitol solution, respectively.

Key-words: wheat straw hydrolysate, fermentation, *Candida guilliermondii*, xylitol, clarification, crystallization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Fórmula estrutural dos açúcares e ácidos presentes nas hemiceluloses (FENGEL; WEGENER, 1989).	4
Figura 2 Exemplos de produtos que contém xilitol.	10
Figura 3 Principais vias metabólicas utilizadas na fermentação de xilose por leveduras (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994).	12
Figura 4 Principais inibidores (em negrito) formados durante a hidrólise, baseado em Lohmeier-Vogel, Sopher e Lee (1998), Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000).	20
Figura 5 Curvas típicas de solubilidade (van ROSMALEN et al., 2004).	30
Figura 6 Fermentador de bancada de 2 L de capacidade total.	45
Figura 7 Fermentador de 16 L de capacidade total.	46
Figura 8 Cristalizador de 300 mL de capacidade total.	50
Figura 9 Composição percentual da palha de trigo.	58
Figura 11 Valores preditos para a concentração final de xilitol (a), produtividade volumétrica (b) e fator de conversão em xilitol (c) em função da concentração de farelo de arroz e do pH inicial de fermentação.	68
Figura 12 Valores preditos para a concentração final de xilitol (a), produtividade volumétrica (b) e fator de conversão em xilitol (c) em função da concentração de farelo de arroz e do fator de concentração do hidrolisado.	69
Figura 13 Valores preditos para a concentração final de xilitol (a), produtividade (b) e fator de conversão (c) em função do fator de concentração do hidrolisado e do pH inicial de fermentação.	70
Figura 14 Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona o fator de concentração do hidrolisado com o pH inicial de fermentação, representando a concentração de xilitol no sistema em estudo.	76
Figura 15 Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona o fator de concentração do hidrolisado com o pH inicial de fermentação, representando a produtividade volumétrica em xilitol no sistema em estudo.	77
Figura 16 Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona o fator de concentração do hidrolisado com o pH inicial de fermentação, representando o fator de conversão de xilose em xilitol no sistema em estudo.	77

Figura 17 Consumo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, produção de xilitol e células, durante a fermentação do hidrolisado de palha de trigo por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037, para comprovação dos modelos empíricos elaborados.....	79
Figura 18 Consumo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, produção de xilitol e células, observados durante a fermentação do hidrolisado de palha de trigo por <i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037 em fermentador de bancada 2 L.....	86
Figura 19 Consumo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, produção de xilitol e células, observados durante a fermentação do hidrolisado de palha de trigo por <i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037 em fermentador de 16 L.....	91
Figura 20 Ensaios de clarificação do caldo fermentado com resinas de troca iônica. Da esquerda para direita: caldo e ensaios de 01 a 08.	95
Figura 21 Etapas de clarificação do caldo fermentado com resinas de troca iônica. (a) ensaios 01 e 05 (25 mL resina + 25 mL caldo); (b) ensaios 02 e 06 (25 mL resina + 50 mL caldo). Da esquerda para direita: A-860S, A-500PS e C-150 para cada ensaio.	97
Figura 22 Etapas de clarificação do caldo fermentado com resinas de troca iônica. Da esquerda para direita: ensaios 02 e 06; sequência: A-860S com A-500PS, A-860S com C-150 e A-500PS com C-150.	100
Figura 23 Análise termogravimétrica (TGA) para o ensaio 01 (solução de xilitol pura).....	105
Figura 24 Análise termogravimétrica (TGA) para o ensaio 02 (30% caldo fermentado + 70% solução de xilitol).	106
Figura 25 Análise termogravimétrica (TGA) para o ensaio 03 (50% caldo fermentado + 50% solução de xilitol).	106
Figura 26 Análise termogravimétrica (TGA) para os ensaios 01 (em azul), 02 (em vermelho) e 03 (em preto).	108
Figura 27 Análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC) para o ensaio 01 (solução de xilitol pura).	109
Figura 28 Análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC) para o ensaio 02 (30% caldo fermentado + 70% solução de xilitol).	109
Figura 29 Análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC) para o ensaio 03 (50% caldo fermentado + 50% solução de xilitol).	110
Figura 30 Análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC) para os ensaios 01 (em azul), 02 (em vermelho) e 03 (em preto).	110
Figura 31 Distribuições granulométricas ($M(L)$) em função do tamanho dos cristais (L) para os ensaios 01 (solução de xilitol pura) e 02 (30% caldo + 70% solução de xilitol).	113

Figura 32 Valores de z em função do tamanho dos cristais (L) para os ensaios 01 (solução de xilitol pura) e 02 (30% caldo + 70% solução de xilitol).....	113
Figura 33 Cristais de xilitol obtidos da solução de xilitol pura (a), de 30% caldo fermentado com 70% de solução de xilitol (b) e de 50% caldo fermentado com 50% de solução de xilitol (c).	116
Figura 34 Cristais de xilitol obtidos da solução de xilitol pura a temperatura de saturação de 40 °C e velocidade de resfriamento de 0,2 °C/min. MO: (a) 40x e (b)100x; MEV: (c) 100x e (d) 200x.	117
Figura 35 Cristais de xilitol obtidos de 30% do caldo com 70% da solução de xilitol a temperatura de saturação de 40 °C e velocidade de resfriamento de 0,2 °C/min. MO: (a) 40x e (b) 100x; MEV: (c) 100x e (d) 200x.	117
Figura 36 Cristais de xilitol obtidos de 50% do caldo com 50% da solução de xilitol a temperatura de saturação de 50 °C e velocidade de resfriamento de 0,4 °C/min. MO: (a) 40x; MEV: (c) 50x e (d) 100x.	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição percentual dos materiais lignocelulósicos (%) (HON, 1996).	6
Tabela 2 Propriedades físico-químicas do xilitol (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982; BAR, 1986).	7
Tabela 3 Classificação das resinas de troca iônica em função do grupo funcional e da força iônica.	25
Tabela 4 Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} em face centrada com três repetições do ponto central.	43
Tabela 5 Esquema da matriz de planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} em face centrada com três repetições do ponto central.	44
Tabela 6 Regenerantes e proporção entre resina e o caldo fermentado utilizados na etapa de clarificação.	47
Tabela 7 Características das peneiras série ABNT P-EB22.	51
Tabela 8 Comparação da composição da palha de trigo empregada no presente trabalho com as descritas na literatura.	58
Tabela 9 Composição do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo.	59
Tabela 10 Composição dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de trigo após concentração a vácuo.	61
Tabela 11 Composição dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de trigo após concentração e destoxificação.	62
Tabela 12 Parâmetros fermentativos determinados em 72 horas de fermentação.	65
Tabela 13 Análise de variância para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais e interações sobre a concentração de xilitol.	66
Tabela 14 Análise de variância para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais e interações sobre a produtividade volumétrica em xilitol.	67
Tabela 15 Análise de variância para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais e interações sobre o fator de conversão de xilose em xilitol.	67
Tabela 16 Análise de variância para verificar as significâncias estatísticas do modelo linear em prever os valores da concentração de xilitol.	73
Tabela 17 Análise de variância para verificar as significâncias estatísticas do modelo linear em prever os valores da produtividade volumétrica em xilitol.	73
Tabela 18 Análise de variância para verificar as significâncias estatísticas do modelo linear em prever os valores do fator de conversão de xilose em xilitol.	73

Tabela 19 Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da concentração de xilitol, bem como seus respectivos níveis de significância.....	74
Tabela 20 Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da produtividade volumétrica em xilitol, bem como seus respectivos níveis de significância.....	74
Tabela 21 Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição do fator de conversão, bem como seus respectivos níveis de significância.	74
Tabela 22 Valores de concentração de xilitol (P), produtividade volumétrica (Q_P) e fator de conversão em xilitol ($Y_{P/S}$) obtidos em hidrolisados de palha de trigo tratados com 2,5 e com 10% de carvão ativo.	81
Tabela 23 Valores de concentração de xilitol (P), produtividade volumétrica (Q_P) e fator de conversão em xilitol ($Y_{P/S}$) obtidos nas fermentações utilizando inóculos obtidos de células cultivadas em glicose e xilose ou somente em glicose como fonte de carbono.	82
Tabela 24 Resultados obtidos no presente trabalho e dados da literatura sobre a produção de xilitol em frascos agitados empregando-se diferentes hidrolisados hemicelulósicos com <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037.	84
Tabela 25 Resultados obtidos no presente trabalho e dados da literatura sobre a produção de xilitol em fermentadores de bancada empregando-se diferentes hidrolisados hemicelulósicos com <i>Candida guilliermondii</i> FTI 20037.....	89
Tabela 26 Características do caldo fermentado com 82 horas de fermentação (A), e após centrifugação (B).	93
Tabela 27 Resultados dos oito ensaios iniciais de clarificação do caldo fermentado a partir de palha de trigo (1ª etapa).	94
Tabela 28 Resultados dos quatro ensaios de clarificação do caldo fermentado a partir de palha de trigo (2ª etapa).	96
Tabela 29 Resultados dos seis experimentos de clarificação.	99
Tabela 30 Composição do caldo fermentado durante cada etapa de clarificação e após concentração.	101
Tabela 31 Temperaturas de saturação (T), cristalização (T_c) e final (T_F), velocidade de resfriamento linear (V_R), massa cristalizada (M_c) e rendimento da cristalização (R) utilizando-se solução de xilitol pura, misturas do caldo fermentado com a solução de xilitol e o caldo fermentado puro.	104

Tabela 32 Distribuição granulométrica acumulada ($M(L)$) e valores de z dos ensaios de cristalização de xilitol a partir de uma solução de xilitol pura e do caldo obtido da fermentação do hidrolisado de palha de trigo.....	112
Tabela 33 Tempos de cristalização (t_c), as massas de xilitol cristalizada por massa de solvente (M), velocidades específicas de crescimento (G) e velocidades específicas de nucleação (dN/dT) dos ensaios realizados.....	115

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
2	Revisão Bibliográfica	3
2.1	Materiais Lignocelulósicos.....	3
2.2	Palha de Trigo.....	5
2.3	Xilitol.....	7
2.4	Produção de Xilitol em Escala Comercial.....	9
2.5	Produção de Xilitol por Via Biotecnológica	10
2.6	Fatores que Interferem na Bioconversão de Xilose em Xilitol	13
2.6.1	Presença de glicose.....	13
2.6.2	Concentração inicial de xilose.....	14
2.6.3	pH inicial	15
2.6.4	Oxigênio	16
2.6.5	Fonte de nitrogênio.....	18
2.6.6	Concentração celular inicial	19
2.6.7	Inibidores presentes nos hidrolisados.....	20
2.7	Métodos de Destoxificação do Hidrolisado	22
2.7.1	Carvão ativo.....	23
2.7.2	Alteração do pH.....	23
2.7.3	Resinas de troca iônica	24
2.8	Processo de Cristalização	28
2.8.1	Cristalização	28
2.8.2	Cristalização do xilitol.....	34
3	Objetivos.....	39
4	Material e Métodos.....	40
4.1	Palha de Trigo.....	40
4.2	Determinação da Composição da Palha de Trigo.....	40
4.3	Obtenção do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Trigo.....	41
4.4	Concentração do Hidrolisado	41
4.5	Destoxificação do Hidrolisado	42
4.6	Microrganismo e Preparo do Inóculo	42
4.7	Meio e Condições de Fermentação.....	43
4.7.1	Ensaio em frascos agitados	43

4.7.2	Ensaio em fermentadores	45
4.8	Clarificação do Caldo Fermentado	47
4.9	Concentração do Caldo Fermentado.....	49
4.10	Cristalização do Xilitol.....	49
4.11	Métodos Analíticos.....	51
4.11.1	Determinação do teor da lignina.....	52
4.11.2	Determinação do teor de celulose e hemicelulose.....	52
4.11.3	Determinação do teor de cinzas.....	53
4.11.4	Determinação da concentração celular	53
4.11.5	Determinação da concentração de açúcares, xilitol e de ácido acético	53
4.11.6	Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural	53
4.11.7	Determinação da concentração dos fenóis totais.....	54
4.11.8	Determinação da concentração de sólidos solúveis e pH.....	54
4.11.9	Determinação da cor do caldo fermentado	55
4.11.10	Determinação da concentração de sólidos totais	55
4.11.11	Determinação da pureza e formação dos cristais.....	56
4.12	Forma de Análise dos Resultados.....	56
4.12.1	Determinação dos parâmetros fermentativos	56
4.12.2	Determinação dos parâmetros da cristalização.....	57
4.12.3	Metodologia estatística	57
5	Resultados e Discussão.....	58
5.1	Composição da Palha de Trigo	58
5.2	Composição do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Trigo.....	59
5.2.1	Hidrolisado hemicelulósico original (não concentrado).....	59
5.2.2	Hidrolisados hemicelulósicos concentrados.....	61
5.2.3	Hidrolisados hemicelulósicos concentrados e destoxificados.....	62
5.3	Fermentação do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Trigo em Frascos Erlenmeyer (EF)	64
5.3.1	Identificação dos principais fatores que influenciam a produção de xilitol	64
5.3.2	Elaboração de modelos matemáticos para predição da produção de xilitol em frascos Erlenmeyer	72
5.3.3	Comprovação dos modelos propostos	78
5.3.3.1	Efeito da concentração de carvão ativo no tratamento do hidrolisado	81

5.3.3.2	Efeito da composição do meio para preparo do inóculo (glicose e xilose ou somente glicose)	82
5.3.4	Comparação dos resultados obtidos com dados da literatura.....	84
5.4	Fermentação do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Trigo em Fermentadores de Bancada.....	85
5.4.1	Produção de xilitol em fermentador de bancada de 2 L	85
5.4.1.1	Comparação dos resultados obtidos com dados da literatura.....	89
5.4.2	Produção de xilitol em fermentador de 16 L	90
5.5	Clarificação do Caldo Fermentado	92
5.6	Cristalização do Xilitol.....	103
6	Conclusões.....	120
7	Sugestões para Trabalhos Futuros	122
8	Referências Bibliográficas.....	123
9	Anexo	135
10	Apêndices	136

1 INTRODUÇÃO

O presente trabalho se insere nas linhas de pesquisa “*Desenvolvimento de processos fermentativos*” e “*Aproveitamento de resíduos agroindustriais*”, em desenvolvimento nos laboratórios do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia (DEBIQ) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP), ex-Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL).

Especificamente, foi dada continuidade aos estudos iniciados no GMBio, os quais visavam a utilização da xilose, presente na fração hemicelulósica da palha de trigo, como substrato para a obtenção de xilitol por via microbiana (CANILHA, 2002). Canilha (2002) tornou conhecido que a palha de trigo apresenta alta proporção de hemicelulose (portanto de xilose), semelhantemente a outros resíduos lignocelulósicos utilizados como matéria-prima nas pesquisas do GMBio para a produção de xilitol. Após a definição das condições ótimas para a obtenção de um hidrolisado com baixos teores de compostos tóxicos para a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 e após a fermentação desse hidrolisado, foi determinado o fator de conversão e a produtividade volumétrica em xilitol que se mostraram superiores aos encontrados em hidrolisados de eucalipto, palha de arroz e bagaço de cana-de-açúcar. Apesar dos bons resultados obtidos anteriormente no hidrolisado de palha de trigo, as condições adequadas de fermentação não haviam sido estabelecidas para a melhoria deste bioprocessos.

Daí ter sido decidido dar continuidade aos estudos utilizando o hidrolisado de palha de trigo a fim de avaliar: a necessidade de sua suplementação com nutrientes, o fator de concentração do hidrolisado (concentração inicial de xilose), o pH inicial de fermentação, o aumento da escala de produção de xilitol e a utilização de resinas de troca iônica e de soluções regenerante na etapa de clarificação do caldo fermentado, para iniciar estudos visando a cristalização do xilitol.

De uma maneira geral, os principais objetivos do presente trabalho foram: estudar e definir as melhores condições de cultivo da levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 a fim de converter a xilose em xilitol, clarificar o caldo fermentado obtido e cristalizar o xilitol presente no caldo fermentado. Desta forma, este trabalho foi dividido em cinco fases, das quais a primeira foi a hidrólise ácida da palha de trigo sob condições previamente definidas. Na segunda fase foi avaliada a suplementação do hidrolisado com sulfato de amônio, farelo de arroz e cloreto de cálcio, bem como os valores adequados do fator de concentração do hidrolisado e do pH de fermentação, de acordo com metodologias estatísticas (planejamento de experimentos e metodologia de superfície de resposta), de forma a propiciar o favorecimento da bioconversão de xilose em xilitol pela levedura. As primeiras fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer incubados em estufa com movimento circular e forneceram subsídios para a realização da terceira fase do projeto em biorreator de bancada de 2 L, sob condições controladas e definidas de agitação e vazão de ar. Após a obtenção de bons resultados quanto à concentração final de xilitol, produtividade volumétrica em xilitol e fator de conversão de xilose em xilitol, ampliou-se a produção em um fermentador de 16 L, visando a quarta fase do projeto. Nesta fase, foram realizados ensaios de clarificação do caldo fermentado, em frascos agitados, que forneceram subsídios para a realização da quinta e última fase do projeto, a cristalização do xilitol.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

Os materiais lignocelulósicos representam a maior fonte de compostos orgânicos da biosfera, compreendendo os resíduos florestais e agrícolas, os subprodutos da indústria alimentícia e as forragens (MONTEIRO, 1986). Estes resíduos, gerados em grandes quantidades todos os anos, podem ser utilizados como fonte de carboidratos em bioprocessos (CARVALHEIRO et al., 2005; MOSIER et al., 2005). Além disso, estes materiais apresentam baixo custo e são renováveis. Para se ter uma idéia da produção anual destes resíduos, cita-se o trabalho de Singh e Mishra (1995), que estimam uma produção de biomassa seca de 155 bilhões de toneladas.

Os materiais lignocelulósicos são constituídos por uma mistura de carboidratos polimerizados (celulose e hemicelulose) e lignina. A composição exata varia de espécie para espécie com relação aos constituintes e às proporções entre eles (KUHAD; SINGH, 1993; MOSIER et al., 2005).

A celulose, principal componente da parede celular da fibra vegetal, é um polissacarídeo linear composto de unidades anidroglicosídicas interligadas por ligações β -glicosídicas (1,4), formando a celobiose que se repete várias vezes em sua cadeia (GOLDSTEIN et al., 1978). Esta fração celulósica pode ser convertida em glicose por hidrólise enzimática, utilizando as celulasas, ou por via química, utilizando ácidos como o sulfúrico (MOSIER et al., 2005).

A hemicelulose difere substancialmente da celulose por ser amorfa, o que a torna mais fácil de ser hidrolisada do que a celulose (SINGH; MISHRA, 1995). A fração hemicelulósica chega até 40% do material da parede celular da fibra vegetal e age como substância de reserva

e de sustentação. Apresenta estrutura ramificada e composta por pentoses (xilose e arabinose), hexoses (galactose, manose e glicose) e pequenas quantidades dos ácidos acético e urônico (Figura 1) (FENGEL; WEGENER, 1989; SAHA, 2003). As hemiceluloses são classificadas basicamente de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero: xilanas, glucomananas e galactanas (FENGEL; WEGENER, 1989; KUHAD; SINGH, 1993).

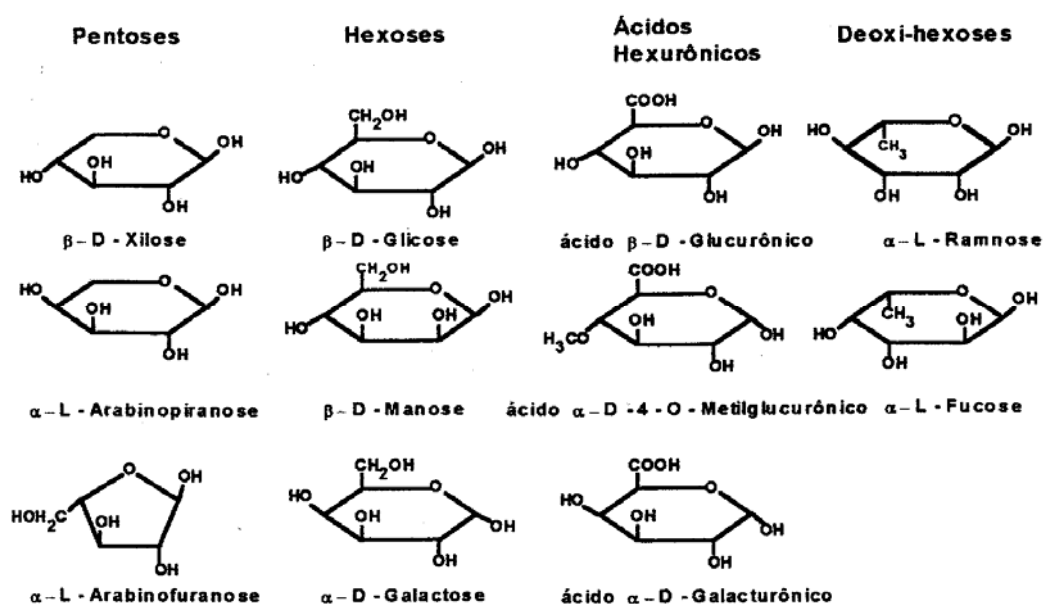


Figura 1 Fórmula estrutural dos açúcares e ácidos presentes nas hemiceluloses (FENGEL; WEGENER, 1989).

A lignina é um complexo estrutural cujo esqueleto é formado por quatro ou mais unidades de fenilpropano, sendo o terceiro maior componente dos materiais lignocelulósicos, compreendendo aproximadamente 25%. A lignina serve como um cimento entre as fibras de celulose e hemicelulose, constituindo a principal barreira para hidrólise enzimática (GOLDSTEIN et al., 1978; KUHAD; SINGH, 1993). Além desses três componentes principais, a biomassa lignocelulósica contém outros componentes em menores quantidades, como extrativos e carboidratos não estruturados (FENGEL; WEGENER, 1989).

Para a utilização destes diferentes constituintes dos materiais lignocelulósicos é necessária uma separação seletiva de cada uma das frações por técnicas de pré-tratamento,

hidrólise e deslignificação, implicando a ruptura do complexo lignina-hemicelulose-celulose (FENGEL; WEGENER, 1989).

A estrutura heterogênea e com baixo grau de polimerização da fração hemicelulósica faz com que esta seja a principal fração de interesse para os processos fermentativos, uma vez que a conformação tridimensional aberta favorece a difusão do catalisador na molécula, propiciando um melhor rendimento de hidrólise em condições amenas (MAGEE; KOSARIC, 1985; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

2.2 PALHA DE TRIGO

Dentre os materiais lignocelulósicos, a palha de trigo constitui um resíduo agrícola abundante. No Brasil, é utilizada como matéria orgânica, ração animal e como fonte de energia para combustão (SEAGRI, 2005). Em alguns países da Europa, a palha de trigo é usada para produção de polpa e papel (HAMILTON; LEOPOLD, 1987).

O trigo é o alimento básico predominante no Ocidente, como também na China e na Índia. É uma planta originária do Oriente Médio (Ásia), cultivada há mais de 500 anos na Síria e de grande importância para povos babilônicos e egípcios (era dos faraós). É um dos principais alimentos da humanidade e ocupa 20% da área cultivada no mundo. Sua produção está em torno de 500 milhões de toneladas/ano, tendo como principais produtores mundiais Rússia (Ucrânia), Estados Unidos, China, Índia e França (juntos ofertam 60% da produção) (SEAGRI, 2005).

No ano de 2003 a área cultivada com trigo no Brasil foi de 2.441.450 hectares e a produção atingiu cerca de 5,3 milhões de toneladas. Em 2004, a produção chegou a alcançar a marca de 6,0 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2005). De acordo com dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), a produção de trigo em 2005 foi de 5,0 milhões de toneladas, estimando-se manter esta mesma marca nas safras de 2006.

Comparando algumas matérias-primas em 2005, observa-se que a produção de trigo no Brasil foi maior do que a produção de cevada e aveia (aproximadamente 397 e 531 mil toneladas, respectivamente), porém inferior à produção de arroz e cana-de-açúcar (em torno de 13 e 405 milhões de toneladas, respectivamente).

De acordo com Tsao (1978), a palha de trigo é constituída de celulose, hemicelulose e lignina, nas proporções de 30%, 50% e 20%, respectivamente. Também segundo Hon (1996), a fração hemicelulósica da palha de trigo estaria em torno de 50% em massa seca, conforme pode ser observado na Tabela 1, a qual apresenta a composição percentual de diferentes materiais lignocelulósicos. Garde et al. (2002) também estudaram a composição lignocelulósica da palha de trigo e obtiveram 35-40% de celulose e 30-35% de hemicelulose. Estudos realizados por Canilha (2002) mostraram uma composição percentual de celulose, hemicelulose e lignina igual a 33%, 33% e 20%, respectivamente.

Tabela 1 Composição percentual dos materiais lignocelulósicos (%) (HON, 1996).

Fontes lignocelulósicas	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Extrato
Madeira dura	43-47	25-35	16-24	2-8
Madeira mole	40-44	25-29	25-31	1-5
Bagaço de cana	40	30	20	10
Palha de arroz	43,3	26,4	16,3	ND
Talo de milho	35	25	35	5
Espiga de milho	45	35	15	5
Algodão	95	2	0,9	0,4
Juta	71,5	13,6	13,1	1,8
Palha de trigo	30	50	15	5
Ramie	76,2	16,7	0,7	6,4
Sisal	73,1	14,2	11	1,7

ND: Não determinado

Devido à elevada proporção de hemicelulose em relação aos outros resíduos (Tabela 1), e à elevada concentração de xilose presente no hidrolisado hemicelulósico, conforme

relatado por Canilha (2002), é promissor avaliar este hidrolisado como meio de fermentação para obtenção biotecnológica de xilitol.

2.3 XILITOL

O xilitol ($C_5H_{12}O_5$), um álcool pentahidroxiado de massa molar 152,15 g/mol, é um produto intermediário do metabolismo de carboidratos no homem e em animais (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973). Algumas das suas propriedades físico-químicas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 Propriedades físico-químicas do xilitol (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982; BAR, 1986).

Fórmula Química	$C_5H_{12}O_5$
Massa Molar	152,15 g/mol
Cor	Branca
Sabor	Doce
Odor	Nenhum
Aparência	Pó cristalino
Ponto de fusão	92-96 °C
Ponto de ebulição	216 °C
pH (solução aquosa a 10%)	5-7
Viscosidade a 20 °C	a 10%: 1,23 cP ; a 60%: 20,63 cP
Solubilidade a 30 °C	68 g xilitol /100 g de solução, igual a da sacarose (abaixo desta temperatura o xilitol é menos solúvel, com o aumento da temperatura o xilitol se torna significativamente mais solúvel que a sacarose).
Densidade	a 10%: 1,03 g/mL; a 60%: 1,23 g/mL
Calor de dissolução	+34,8 cal/g (efeito “refrescante”)
Poder adoçante	Igual ao da sacarose, superior ao sorbitol e manitol.
Valor calórico	4,06 kcal/g
Índice de refração a 25 °C	a 10%: 1,3471 ; a 50%: 1,4132
Estabilidade	Estável a 120 °C (não carameliza)
Higroscopicidade	em umidade relativa alta, o xilitol é mais higroscópico que a sacarose, mas menos que o sorbitol.

A importância econômica do xilitol deve-se principalmente ao seu potencial como substituto de açúcares convencionais, apresentando poder adoçante superior ao do sorbitol e ao do manitol, e comparável ao da sacarose (BAR, 1986; GALES; NGUYEN, 2000). O xilitol também apresenta propriedade anticariogênica, uma vez que não é fermentado por microrganismos da flora bucal, evitando a formação de ácidos que atacam o esmalte dos dentes (LINGSTROM et al., 1997; GALES; NGUYEN, 2000). Além da redução de cáries dentárias, o xilitol induz a remineralização do esmalte dos dentes, revertendo lesões recém-formadas (MAKINEN, 1976; SHEN et al., 2001).

Devido à ausência de grupos aldeídicos e cetônicos em sua molécula, o xilitol não participa de reações de escurecimento do tipo “Maillard”, sendo apropriado para o processamento de alimentos em temperaturas elevadas nos quais estas reações são indesejáveis. Sua utilização no preparo de xaropes e refrescos é altamente vantajosa, podendo-se eliminar a necessidade de pasteurização do produto e da adição de conservantes para estoque (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973; LAM et al., 2000). Por ser bem tolerado pelo organismo humano (MAKINEN, 1976), o xilitol é empregado com segurança na área clínica. De fato, esse adoçante é indicado para pacientes com doenças biliares e renais, como também para pessoas obesas, já que contribui muito pouco para a formação de tecidos gordurosos quando comparado a outros açúcares (BAR, 1986). O xilitol pode ser também eficazmente empregado no tratamento de outras desordens metabólicas como a anemia hemolítica, causada em pacientes portadores de deficiência da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998), e na dieta de diabéticos, por não requerer insulina para o seu metabolismo (BAR, 1986; PARAJO; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998a; VALERO et al., 2001). Também tem sido relatado que este poliol previne a redução da densidade dos ossos, bem como seu conteúdo de minerais, cálcio e fósforo, podendo ser utilizado no tratamento de

doenças ósseas como a osteoporose (MATTILA et al., 2002; MATTILA; KANGASMAA; KNUUTTILA, 2005).

Vários estudos têm mostrado que o xilitol inibe efetivamente o crescimento das espécies bacterianas *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* que causam a otite média aguda, portanto, é recomendado como um tratamento alternativo promissor ao emprego de antibióticos para combater esta doença (UHARI; TAPIAINEN; KONTIOKARI, 2000; TAPIAINEN et al., 2002; BANDON et al., 2003). Recentemente foi demonstrado que o xilitol é capaz de intervir no passo inicial de infecções em pacientes com fibrose cística, além de prevenir a invasão de microrganismos oportunistas em pacientes transplantados de pulmão. O xilitol inibe o crescimento da bactéria *Burkholderia cepaciae*, uma das principais responsáveis por infecções e morte nestes pacientes (SAJJAN et al., 2004).

Essas características fazem do xilitol um insumo de grande importância nas indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica. Prova disso é o número crescente de produtos que vêm sendo lançados no mercado (Figura 2).

2.4 PRODUÇÃO DE XILITOL EM ESCALA COMERCIAL

O xilitol é produzido em escala comercial por processo químico através da hidrogenação catalítica de xilose pura, obtida por hidrólise de materiais lignocelulósicos (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982). De modo geral, são necessárias quatro etapas básicas: 1. desintegração (hidrólise ácida) de materiais naturais ricos em xilana; 2. separação da xilose do hidrolisado por cromatografia, resultando uma solução de xilose pura; 3. hidrogenação catalítica da xilose pura a xilitol na presença do catalisador níquel; 4. cristalização do xilitol na forma ortorrômbica (MELAJA; HÄMÄLÄINEN, 1977; HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982). O rendimento e a qualidade do xilitol obtido por esse processo estão intimamente relacionados com a pureza da solução inicial de

xilose, já que a presença de impurezas interfere no processo de catálise. Além disso, a produção de xilitol por via química requer várias etapas posteriores de purificação para remoção de resíduos tóxicos do catalisador níquel, o qual é um metal tóxico e prejudicial à saúde humana, e de subprodutos originados durante o processo de hidrogenação, o que ocasiona aumento do tempo de processo e encarecimento do produto (MELAJA; HÄMÄLÄINEN, 1977; PARAJO; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998a).



Figura 2 Exemplos de produtos que contém xilitol.

2.5 PRODUÇÃO DE XILITOL POR VIA BIOTECNOLÓGICA

O uso do xilitol como adoçante ainda é bastante limitado devido ao seu custo ser alto em relação a outros açúcares (cerca de 10 vezes o custo de produção da sacarose e do

sorbitol). Isto tem encorajado o desenvolvimento de tecnologias capazes de diminuir os custos de sua produção (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998a).

Vários trabalhos vêm sendo conduzidos na busca de uma via alternativa para a produção do xilitol, destacando-se o processo biotecnológico. Este se apresenta promissor, uma vez que não requer uma solução de xilose de alta pureza, pois a bioconversão da xilose em xilitol ocorre no próprio hidrolisado hemicelulósico (FELIPE et al., 1997a). Ademais, o processo biotecnológico opera em condições mais brandas de pressão e temperatura que o processo químico, e seu emprego pode reduzir os altos níveis de poluição ambiental bem como os gastos relacionados com o tratamento dos resíduos produzidos pela via química (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

Existem bactérias, fungos e leveduras capazes de assimilar e fermentar a xilose produzindo etanol, xilitol e outros compostos (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998a; SAHA, 2003). As leveduras têm sido apontadas como as melhores produtoras de xilitol, especialmente as do gênero *Candida* (SIRISANSANEEYAKUL; STANISZEWSKI; RIZZI, 1995; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998). Dentro deste gênero, *Candida guilliermondii* tem se mostrado uma espécie promissora para produzir xilitol, tanto quando cultivada em meio sintético (BARBOSA et al., 1988; SILVA et al., 1996; MUSSATO, 2002), quanto em hidrolisado de materiais lignocelulósicos (CANILHA; ALMEIDA E SILVA; SOLENZAL, 2004; SILVA; MUSSATO; ROBERTO, 2006).

O processo microbiológico tornou-se possível a partir da descoberta por Onishi e Suzuki (1966), de leveduras capazes de induzir, na presença de xilose, a enzima xilose redutase (E.C.1.1.1.21) que catalisa a redução de xilose a xilitol na presença dos cofatores NAD(P)H ou NADH, no início do metabolismo da xilose (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994). Em estudos realizados com a levedura *Candida guilliermondii* a xilose redutase mostrou ser dependente de NAD(P)H (SENE et al., 2001). Posteriormente, o xilitol é excretado da célula

ou é oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (E.C.1.1.1.9), cuja atividade requer NAD^+ ou NAD(P)^+ como cofatores. A xilulose é fosforilada a xilulose 5-fosfato, que, na via das fosfopentoses, é convertida em frutose 6-fosfato. A frutose 6-fosfato pode ser convertida em piruvato, pela conexão com a via Embden Meyerhof Parnas ou retornar à via das fosfopentoses (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994), conforme apresentado na Figura 3.

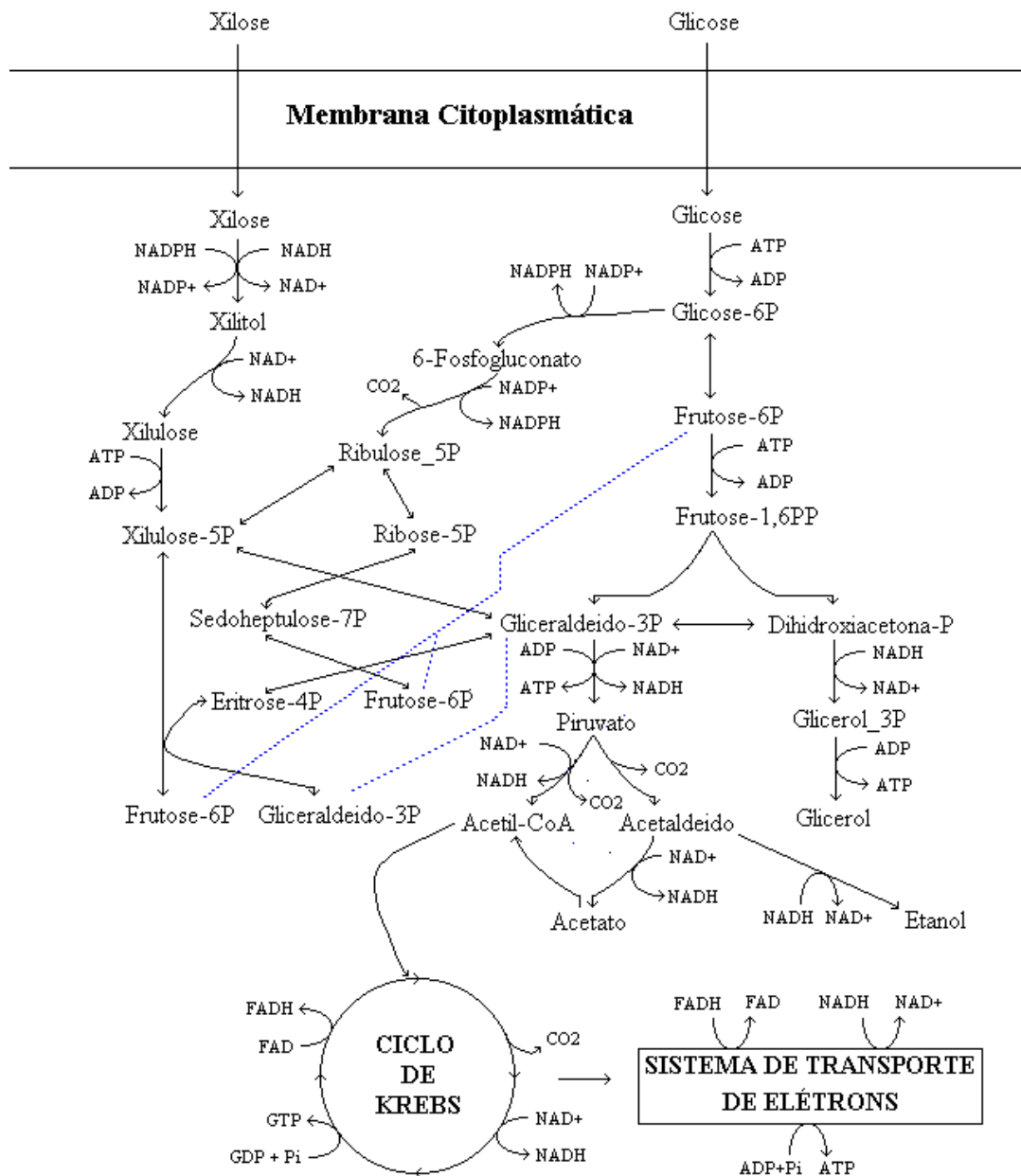


Figura 3 Principais vias metabólicas utilizadas na fermentação de xilose por leveduras (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994).

2.6 FATORES QUE INTERFEREM NA BIOCONVERSÃO DE XILOSE EM XILITOL

Diversos fatores influenciam a bioconversão da xilose, presente em hidrolisados hemicelulósicos, em xilitol. Com base na experiência até então adquirida pela equipe do GMBio/DEBIQ/EEL e nos dados divulgados na literatura, pode-se afirmar que a concentração de açúcares no meio, a temperatura, o pH, o fornecimento de oxigênio para o meio de fermentação, a fonte de nitrogênio, o tipo de substrato utilizado e a forma de condução do processo, são fatores primordiais e reguladores desta bioconversão. Como exemplo, já foi constatado a necessidade da adição de alguns nutrientes para a produção de xilitol em hidrolisado de cavacos de eucalipto (CANETTIERI; ALMEIDA E SILVA; FELIPE, 2002) e de bagaço de cana-de-açúcar (CARVALHO, 2004). Por outro lado, Silva e Roberto (1999) verificaram que a adição de nutrientes não favorece a produção de xilitol em hidrolisado de palha de arroz. Com relação ao hidrolisado de palha de trigo, não há relatos na literatura quanto às condições nutricionais e operacionais para a obtenção microbiológica de xilitol.

2.6.1 Presença de glicose

A presença de glicose no meio pode ser considerada um fator limitante para a bioconversão de xilose em xilitol, reduzindo o consumo de xilose e a produtividade em xilitol por repressão catabólica (BICHO et al., 1988; YAHASHI et al., 1996). Felipe et al. (1993), cultivando a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado de bagaço de cana, verificaram que o efeito da glicose estava relacionado à relação glicose/xilose presente no meio, sendo que quanto maior esta proporção maior a inibição causada pela glicose. Quando a concentração inicial de glicose foi inferior a 10% da concentração inicial de xilose, a produção de xilitol não foi afetada.

Segundo Girio et al. (2000), altas concentrações de glicose favorecem a repressão catabólica sobre as enzimas-chave da bioconversão de xilose em xilitol, xilose redutase e xilitol desidrogenase, causando a diminuição das atividades enzimáticas. Por outro lado, este comportamento é acompanhado do consumo mais rápido de glicose, precedente ao consumo de xilose, nas primeiras horas de fermentação. Lee et al. (2003) observaram que, em um processo fermentativo contendo estes dois substratos, a glicose é usada como fonte de energia para o crescimento celular e como um co-substrato para regeneração de cofatores; e a xilose é utilizada como substrato primordial para a conversão em xilitol.

Por outro lado, Silva (2004) observou que a presença de glicose favorece a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI20037 em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. O efeito da glicose neste metabolismo foi dependente da relação glicose/xilose no hidrolisado e da presença de glicose durante o cultivo da levedura.

2.6.2 Concentração inicial de xilose

A concentração inicial de xilose no meio de fermentação exerce grande influência sobre a produção de xilitol por leveduras, sendo que elevadas concentrações promovem o consumo desse açúcar e, conseqüentemente, intensificam a produção de xilitol. Entretanto, o aumento excessivo da concentração de xilose provoca um decréscimo na velocidade de crescimento do microrganismo, com conseqüente queda na produção de xilitol (SILVA; AFSCHAR, 1994; PARAJO; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998b).

Segundo Gong, Chen e Tsao (1981), a produção de xilitol por *Candida tropicalis* em meio YME (extrato de levedura, extrato de malte, peptona, xilose) foi favorecida quando se aumentou a concentração de xilose de 50 para 200 g/L. Entretanto, em concentrações de xilose superiores a 300 g/L, verificou-se interferência negativa na produção de xilitol. Vandeska et al. (1995) constataram que a produção de xilitol por *Candida boidinii* em meio sintético (sulfato de amônio, uréia, ácido casamino e xilose) aumentou significativamente

quando a concentração inicial de xilose foi aumentada de 20 para 150 g/L. Entretanto, concentrações iniciais de xilose de 200 g/L provocaram um decréscimo na concentração de xilitol. Felipe et al. (1997a) utilizando a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, observaram que o aumento da concentração inicial de xilose de 37,6 g/L para 54,5 g/L resultou em aumentos de 40%, 20% e 44%, na concentração de células, fator de conversão em xilitol e na produtividade volumétrica em xilitol, respectivamente. Porém, utilizando valores superiores de concentração inicial de xilose (74,2 g/L), ocorreu uma redução na concentração de células e na produtividade em xilitol. Silva e Roberto (2001), utilizando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para a produção de xilitol com a mesma levedura, determinaram uma máxima concentração inicial de xilose da ordem de 80 g/L, de forma a se evitar problemas de inibição com conseqüente queda nas taxas de bioconversão.

2.6.3 *pH inicial*

Outro fator importante na bioconversão de xilose em xilitol é o pH do meio de fermentação. De acordo com Winkelhausen e Kuzmanova (1998), as leveduras geralmente são cultivadas em meios com valores de pH entre 4,0 e 6,0, porém diferentes valores de pH têm sido relatados como melhores para a produção de xilitol com o mesmo microrganismo. O efeito do pH em fermentações de hidrolisados hemicelulósicos pode estar relacionado com a presença de compostos inibitórios, principalmente o ácido acético, considerado potente inibidor do crescimento de vários microrganismos (KUSUMEGI; YOSHIDA; TOMIYAMA, 1998).

Felipe et al. (1997b), estudando o efeito do pH sobre a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, constataram inibição do consumo de glicose, xilose e arabinose, bem como da produção de xilitol e células em pH inferior a 4,5. Porém, em valores de pH superiores ou igual a 5,5, a produção de xilitol pela levedura correspondeu a

um fator de conversão de 0,75 g de xilitol/g de xilose e uma produtividade volumétrica de 0,57 g/L.h. Roberto et al. (1996a) também estudaram diferentes valores de pH inicial para a fermentação do hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol, e constataram que em pH 5,3 foram alcançados os máximos valores de concentração de xilitol (36,92 g/L), fator de conversão (0,68 g de xilitol/g de xilose) e produtividade volumétrica em xilitol (0,51 g/L.h). Canettieri, Almeida e Silva e Felipe (2001) também estudaram o efeito do pH sobre a produção de xilitol, porém em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, e verificaram que os máximos valores de concentração de xilitol (10,0 g/L), fator de conversão de xilose em xilitol (0,2 g/g) e produtividade volumétrica em xilitol (0,1 g/L.h) foram obtidos com um pH inicial de fermentação igual a 8,0. Martinez et al. (2003) observaram a influência do pH do meio de fermentação para produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Segundo estes autores, os máximos valores de fator de conversão (0,69 g de xilitol/g de xilose) e produtividade (0,68 g/L.h), e uma concentração de xilitol de 18,0 g/L, foram obtidos com o uso de um pH de fermentação igual a 6,7. A levedura utilizada em todos os trabalhos citados foi a mesma: *C. guilliermondii* FTI 20037.

2.6.4 Oxigênio

A velocidade de transferência de oxigênio é o fator mais importante na bioconversão xilose em xilitol, uma vez que a variação acima ou abaixo de um valor ótimo leva a uma diminuição significativa do fator de conversão e/ou da produtividade em xilitol (SILVA et al., 1996).

De acordo com Delgenes, Moletta e Navarro (1989), o fator de conversão em xilitol depende da velocidade de transferência de oxigênio, estando esta influência relacionada com a regeneração de coenzimas e com a produção de ATP durante a fosforilação oxidativa (NOLLEAU et al., 1995). Em condições aeróbicas ocorre maior produção de massa celular, enquanto que em condições limitadas de oxigênio uma grande parte da xilose é convertida em

xilitol (BRUINENBERG et al., 1984). Um rigoroso controle da disponibilidade de oxigênio é fundamental para se obter elevada eficiência fermentativa, evitando-se o desvio do metabolismo para a formação de células. Por outro lado, a falta de oxigênio proporciona um desbalanço no potencial redox das células ocasionando a paralisação de crescimento celular, da assimilação da xilose e, conseqüentemente, da formação de xilitol (VANDESKA et al., 1995). Sob condições anaeróbias, ou em velocidades de transferência de oxigênio muito baixas, o sistema de transporte de elétrons não é capaz de oxidar todo o NADH_2 produzido. Como conseqüência, o nível de NADH_2 intracelular aumenta, reduzindo a velocidade de reação da enzima xilitol desidrogenase e determinando acúmulo de xilitol no meio de cultivo (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994; OH; KIM; KIM, 1998).

Silva et al. (1996), cultivando *Candida guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado de bagaço de cana com uma concentração inicial de xilose de 65,0 g/L, obtiveram máximos valores de produção de xilitol (22,2 g/L) e produtividade volumétrica (0,55 g/L.h) utilizando uma aeração de 0,46 vvm e uma agitação de 300 rpm ($k_{La} = 10,6 \text{ h}^{-1}$). Segundo estes autores, quando se aumentou o k_{La} para 41 h^{-1} , ocorreu uma diminuição de 71% na produtividade volumétrica em xilitol. Roberto, Mancilha e Sato (1999) estudaram o efeito do k_{La} em fermentação descontínua, cultivando *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado de palha de arroz, com uma concentração inicial de xilose de 62,0 g/L. Os máximos valores de produtividade volumétrica (0,52 g/L.h) e concentração de xilitol (36,8 g/L) foram obtidos com uma agitação de 300 rpm e aeração de 1,3 vvm ($k_{La} = 15 \text{ h}^{-1}$). Morita e Silva (2000) estudaram o efeito da aeração na produção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana cultivando *C. guilliermondii* FTI 20037, e observaram que os máximos valores de produtividade volumétrica (0,72 g/L.h) e concentração de xilitol (28,6 g/L) foram obtidos com uma aeração de 3,0 vvm e agitação de 300 rpm ($k_{La} = 22,5 \text{ h}^{-1}$). Martinez, Silva e Felipe (2000) estudaram a transferência de oxigênio na produção de xilitol, também utilizando

hidrolisado de bagaço de cana e cultivando a mesma levedura, e puderam observar máximos valores de produtividade volumétrica (0,70 g/L.h), fator de conversão (0,58 g de xilitol/g de xilose) e concentração de xilitol produzida (23,1 g/L) quando foi utilizado um k_La de 20 h⁻¹. Santos et al. (2005) estudaram a produção de xilitol por células imobilizadas de *C. guilliermondii* FTI 20037 em reator de leito fluidizado, também em hidrolisado de bagaço de cana. Estes autores observaram que maiores valores de k_La (0,093 h⁻¹) e de concentração inicial de xilose (125 g/L) proporcionaram menores valores de fator de conversão de xilose em xilitol (0,21 g/g) e de produtividade volumétrica em xilitol (0,18 g/L.h). Por outro lado, proporcionaram a maior concentração celular (23,9 g/L), indicando que o metabolismo celular foi preferencialmente dirigido para a produção de biomassa.

De uma forma geral, o fornecimento do oxigênio é um parâmetro chave que determina se ocorrerá maior produção do xilitol ou maior crescimento celular. Para se ter um processo eficiente, é muito importante determinar o fluxo de oxigênio que permitirá uma utilização balanceada do carbono tanto para o crescimento como para a produção de xilitol (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

2.6.5 Fonte de nitrogênio

A conversão de xilose em xilitol por leveduras também é influenciada pela fonte de nitrogênio, como foi constatado por Barbosa et al. (1988). Estes autores avaliaram o efeito do uso de sulfato de amônio (5,0 g/L) e uréia (5,0 g/L) em fermentações com *C. guilliermondii* em meio sintético, e observaram que a suplementação do meio com uréia resultou em maior favorecimento desta bioconversão, quando comparado com a suplementação com sulfato de amônio. Vandeska et al. (1995), em experimentos realizados com a levedura *Candida boidinii* em meio sintético, também observaram um favorecimento da produção de xilitol quando a uréia foi utilizada como fonte de nitrogênio. Por outro lado, Roberto et al. (1996a), em fermentações com *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico de palha de

arroz, constataram maiores valores de produtividade volumétrica em xilitol (0,51 g/L.h) e fator de conversão de xilose em xilitol (0,68 g/g) quando se utilizou sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

2.6.6 Concentração celular inicial

A bioconversão de xilose em xilitol por diferentes microrganismos também é influenciada pela concentração inicial de células, uma vez que a maioria dos trabalhos indica uma concentração ideal para a máxima produção de xilitol. Um aumento excessivo desta concentração provoca um decréscimo no fator de conversão de xilose em xilitol. Sreenath et al. (1986), citado por Roberto, Sato e Mancilha (1996b), observaram que o fator de conversão de xilose em xilitol para *Candida shehatae* diminuiu de 0,20 para 0,14 g/g quando a concentração celular foi aumentada de 0,42 para 3,6 g/L. Por outro lado, Vandeska et al. (1995), utilizando a levedura *Candida boidinii* em meio sintético, observaram que o fator de conversão em xilitol obtido com uma alta concentração celular inicial (5,1 g/L) foi o dobro daquele obtido quando da utilização da mais baixa concentração celular (1,3 g/L), aumentando de 0,12 para 0,24 g/g.

Segundo Roberto, Sato e Mancilha (1996b), o aumento na concentração celular afetou negativamente na produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037. Quando o meio, formado a base de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, apresentava uma concentração inicial de células de 0,67 g/L, o valor da concentração de xilitol foi de 39,46 g/L, decrescendo para 20,76 g/L ao se utilizar 2,41 g/L de células. Comportamento semelhante foi constatado por Felipe et al. (1997a), durante a fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, pela mesma levedura, para a produção de xilitol. Segundo estes autores, o aumento da concentração inicial de células de 0,1 para 3,0 g/L, diminuiu o fator de conversão em xilitol de 0,75 para 0,62 g/g.

2.6.7 Inibidores presentes nos hidrolisados

A bioconversão de xilose em xilitol é afetada pela presença de compostos inibitórios, resultantes da degradação da estrutura lignocelulósica, em função do tipo de composto e sua concentração, da concentração de oxigênio dissolvido, do pH do meio e da temperatura utilizada (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998b; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000).

Os inibidores podem ser divididos em três grandes grupos de acordo com sua origem: derivados da degradação das pentoses e hexoses (furfural e hidroximetilfurfural), derivado do grupo acetil da hemicelulose (ácido acético) e derivados da degradação da lignina (compostos fenólicos) (LOHMEIER-VOGEL; SOPHER; LEE, 1998). Parajó, Dominguez e Dominguez (1998b) também destacam os íons metálicos (cobre, cromo, ferro e níquel), provenientes da corrosão dos equipamentos, como inibidores do metabolismo microbiano. A Figura 4 destaca os principais inibidores formados durante a etapa de hidrólise.

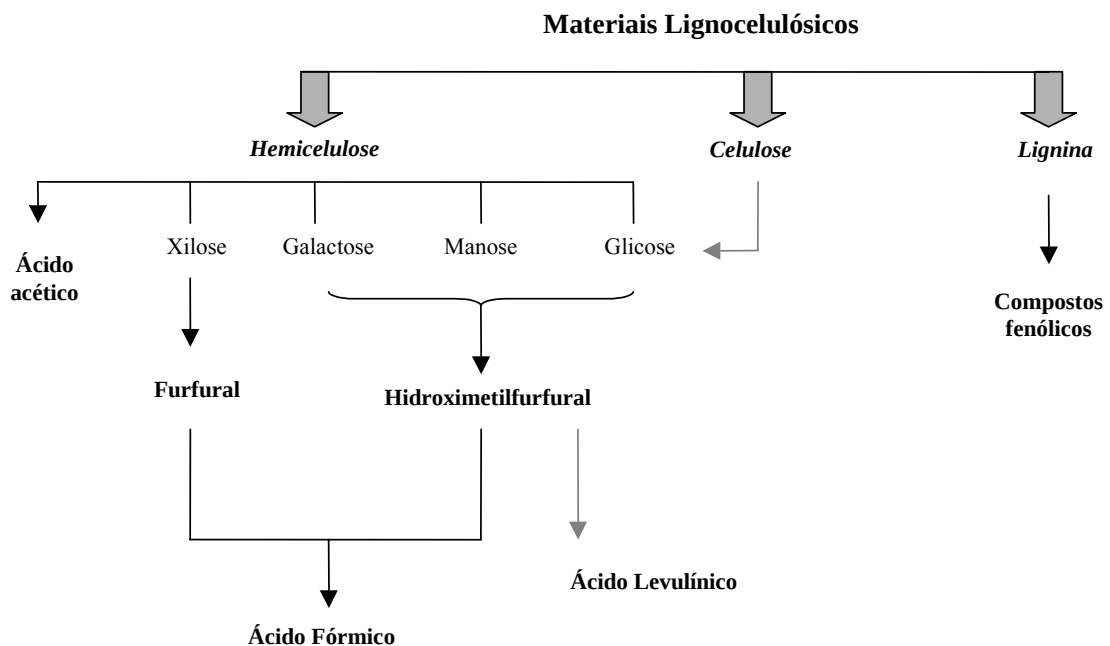


Figura 4 Principais inibidores (em negrito) formados durante a hidrólise, baseado em Lohmeier-Vogel, Sopher e Lee (1998), Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000).

Os produtos provenientes da degradação dos açúcares durante a hidrólise ácida são furfural e hidroximetilfurfural (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Fermentações realizadas com *C. guilliermondii* na presença de furfural e hidroximetilfurfural demonstraram que os referidos compostos inibem o crescimento celular em concentrações acima de 1,0 e 1,5 g/L, respectivamente (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988). Segundo Larsson et al. (1999a), o ácido fórmico, que é o produto proveniente da degradação do furfural e do hidroximetilfurfural sob temperaturas elevadas, possui um maior potencial inibidor sobre a atividade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* que o ácido acético e o levulínico.

Com relação ao ácido acético, este foi apontado como forte inibidor do metabolismo de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* FTI 20037, em meio sintético, quando em concentrações acima de 3,0 g/L (FELIPE et al., 1995). Sua ação inibitória tem sido atribuída à sua forma não dissociada, que depende do pH do meio. Sua toxicidade é aumentada em valores de pH inferiores ao seu pKa (4,75), pois neste caso a maioria das moléculas se encontram na sua forma não dissociada, podendo desta forma passar mais facilmente através da membrana citoplasmática. Ao entrar na célula e encontrar um pH interno de 7,4, este ácido se dissocia no plasma celular liberando próton H^+ , o pH intracelular vai se acidificando e inibindo a atividade da célula que pode chegar até a morte (LOHMEIER-VOGEL; SOPHER; LEE, 1998). O efeito do ácido acético sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037, em hidrolisado de bagaço de cana, foi avaliado por Silva (2001). Segundo o autor, o efeito inibitório do ácido acético não depende só da sua concentração, mas também da fase de crescimento da levedura, uma vez que, o maior efeito inibitório deste ácido ocorreu quando as células foram expostas a 5,0 g/L do ácido após 12 horas de cultivo, o que corresponde à fase de máxima atividade metabólica da levedura. Lima et al. (2004) avaliou o efeito do ácido acético, presente no hidrolisado de bagaço de cana, nas atividades das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase em *C. guilliermondii* FTI 20037, e concluíram que este

ácido não interfere na produção de xilitol desde que o aumento na atividade da enzima xilose redutase seja proporcional à atividade da enzima xilitol desidrogenase.

Segundo Clark e Mackie (1984), citados por Parajó, Dominguez e Dominguez (1998b), dentre os inibidores do metabolismo da xilose, os produtos da decomposição da lignina são mais tóxicos que o furfural e o hidroximetilfurfural. Rodrigues et al. (2001), estudando a remoção dos compostos inibitórios presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, identificaram alguns destes compostos fenólicos, tais como: ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido siríngico, vanilina, siringaldeído, ácido *p*-cumarílico e ácido ferúlico. Parajó, Dominguez e Dominguez (1998b) constataram que estes compostos presentes no meio de cultivo, mesmo em concentrações menores que 0,1 g/L, possuem uma elevada potencialidade inibitória. Segundo Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000), o mecanismo envolvido na toxicidade dos compostos fenólicos com as células está relacionado à perda da integridade da membrana celular, interferindo na sua capacidade de atuar como barreira seletiva, o que reduz o crescimento celular e a assimilação de açúcares.

2.7 MÉTODOS DE DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO

Existe uma variedade de métodos para minimizar o efeito inibitório dos compostos sobre a atividade microbiana. Entre eles, a adsorção por carvão ativo (GINORIS, 2001; MARTON, 2002) ou por terra diatomácea (RIBEIRO et al., 2001; CARVALHO, 2005), retenção em resinas de troca iônica (CANILHA; ALMEIDA E SILVA; SOLENZAL, 2004; CARVALHEIRO et al., 2005), ajuste do pH do hidrolisado com a adição de ácidos e bases (ALVES et al., 1998; MARTINEZ et al., 2001) e a utilização de células adaptadas ao hidrolisado (FELIPE et al., 1996; MATOS, 2004). Porém, algumas dessas técnicas são caras, sendo que dependendo do tipo do hidrolisado, seu uso pode se tornar economicamente inviável. Além disso, devido à presença nos hidrolisados de compostos inibitórios com

diferentes propriedades físico-químicas, a maioria desses tratamentos, quando usados separadamente, não é eficaz para remover ou reduzir as concentrações de todos esses compostos a níveis que permitam o desenvolvimento do processo de bioconversão (GINORIS, 2001).

2.7.1 Carvão ativo

O tratamento com carvão ativo constitui um dos métodos mais econômicos para a redução de compostos inibitórios presentes no hidrolisado (GINORIS, 2001). Este tratamento baseia-se na capacidade deste material poroso de origem natural, de adsorver sobre sua superfície diferentes tipos de moléculas, as quais são retidas por forças fracas denominadas de Van Der Waals. Estas forças são resultantes de uma atração intermolecular de tal modo que seu potencial é, basicamente, uma função da área superficial do material. Dentre os vários materiais comumente usados em processos de adsorção física, o carvão ativo apresenta a maior área superficial, podendo variar entre 600 e 1600 m²/g, dependendo da matéria-prima empregada para sua fabricação (CONSIDINE, 1974). Marton (2002) verificou uma redução das concentrações de ácido acético e de compostos aromáticos em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, obtendo uma maior produtividade e um maior fator de conversão em xilitol utilizando hidrolisado tratado com carvão ativo que o hidrolisado não tratado.

2.7.2 Alteração do pH

O tratamento baseado na alteração do pH com álcalis e ácidos consiste da elevação do pH inicial do hidrolisado com uso de um álcali seguido da redução deste pela adição de um ácido, até o pH ótimo de fermentação. O resultado da destoxificação depende da temperatura, do hidróxido usado, e de quando e quanto de sulfito é adicionado (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996). Este tratamento tem sido proposto como um método para a destoxificação dos hidrolisados devido à sua eficiência para remover compostos inibitórios.

Porém tem um marcado efeito benéfico devido à precipitação de compostos aromáticos de baixa massa molar e à conversão de furfural em álcool furfurílico (Strickland e Beck (1984), citados por ROBERTO et al., 1991). No entanto, este tratamento pode provocar degradação parcial dos açúcares (AMARTEY; JEFRIES, 1996).

2.7.3 Resinas de troca iônica

O tratamento de hidrolisados hemicelulósicos com resinas de troca iônica remove eficientemente não só a cor, mas também inibidores do processo fermentativo, tais como compostos fenólicos, ácidos orgânicos e inorgânicos, compostos furânicos e metais, além de não acarretar perda de xilose dos hidrolisados hemicelulósicos (NÁPOLES et al., 1998).

As resinas de troca iônica são compostos macromoleculares constituídos por um esqueleto tridimensional ao qual se fixam os grupos ativos. Estas permitem a troca de íons não desejáveis da solução a ser purificada por aqueles que se encontram saturando os grupos funcionais da resina. Este processo de equilíbrio pode ser representado da seguinte forma:



Em que RA e RB representam as resinas na forma A e B, respectivamente, e A e B representam os íons trocados.

As reações de troca iônica são estequiométricas, reversíveis e possíveis com qualquer composto ionizável. A natureza reversível da reação permite o repetido uso das resinas desde que estas não sofram mudanças substanciais da sua estrutura. A velocidade da reação depende da seletividade da resina (DECHOW, 1989).

Como características principais das resinas encontram-se: insolubilidade em água, em solventes orgânicos e inorgânicos mais comuns; possuem uma estrutura hidrófila; capacidade efetiva e controlada de troca iônica; rápida velocidade de troca e estabilidade física em termos de resistência mecânica e resistência à fricção (HARLAND, 1994).

As resinas são classificadas como trocadoras de cátions ou trocadoras de ânions, dependendo dos grupos trocadores que estão ligados à matriz. Os trocadores aniônicos apresentam grupamentos iônicos positivos ligados a matriz, e têm, portanto, afinidade pelos ânions presentes na solução. Ao contrário, os trocadores catiônicos têm grupamentos negativos e afinidade por cátions da solução. Os grupamentos aniônicos mais comuns são derivados de aminas como trimetilamina, dimetiletanolamina, amina quartenária e amônia. Os grupamentos catiônicos podem ser radicais carboximetil, fosfato, sulfoetil e sulfopropil (GURGEL, 1993; APPLEXTION, 2006).

Além da classificação por trocadores de íons, as resinas também são classificadas segundo seus grupos funcionais: catiônica ácido forte, catiônica ácido fraco, aniônica base forte e aniônica base fraca, conforme apresentado na Tabela 3. A definição de fraca ou forte não depende da resina mas da natureza do íon fixado na matriz polimérica. As resinas são comercializadas na forma iônica que também se mostra na Tabela 3 (HARLAND, 1994; APPLEXTION, 2006).

Tabela 3 Classificação das resinas de troca iônica em função do grupo funcional e da força iônica.

Classificação	Grupo funcional	Forma iônica
Catiônica ácida forte	$-\text{SO}_3^-$	$-\text{SO}_3^- \text{H}^+$, $-\text{SO}_3^- \text{Na}^+$
Catiônica ácida fraco	$-\text{COO}^-$	$-\text{COO}^- \text{H}^+$
Aniônica base forte Tipo 1	$-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	$-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Cl}^-$
Aniônica base forte Tipo 2	$-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_2\text{OH}$	$-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2(\text{CH}_2)_2\text{OHCl}^-$
Aniônica base fraca	$-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$	$-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$ $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2 \text{Cl}^-$

A capacidade de troca máxima das resinas é um parâmetro importante no processo de troca iônica e varia segundo as características das resinas, como o tamanho dos poros e da área superficial, e com as características das soluções a serem tratadas, devido a sua densidade e viscosidade. Esta capacidade também pode ser influenciada pelos canais preferenciais que

podem ser formados no leito das resinas, pelo fluxo de trabalho e pela eficiência da regeneração (NÁPOLES et al., 1998).

Em estudos realizados por Nápoles et al. (1998) foi possível constatar uma redução de ácido acético (em 15,2%) e fenóis totais (em 54,7%), presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, quando foi utilizado carvão ativo no tratamento deste hidrolisado. Por outro lado, quando o hidrolisado foi tratado com resinas de troca iônica, estes autores observaram uma maior redução destes inibidores (92,5% e 98,9%, respectivamente) além de constatarem aumentos na conversão de xilose em xilitol (de 36,5%) e na produtividade em xilitol (de 85,6%) em relação ao tratamento com carvão ativo.

Larsson et al. (1999b), comparando quatro diferentes métodos de destoxificação do hidrolisado de madeira (mudança de pH com NaOH ou Ca(OH)_2 , evaporação, resinas aniônicas e o uso de microrganismos), observaram que as resinas aniônicas apresentaram maiores remoções quanto aos fenóis totais (91%), ácido acético (96%), furfural (73%) e hidroximetilfurfural (70%).

Estudos realizados por Nilvebrant et al. (2001), usando resina de troca aniônica forte em ciclo OH^- , mostraram uma redução de 91% dos ácidos alifáticos (ácido fórmico, acético, láctico, oxálico e levulínico) em pH 5,5, sendo esta remoção muito eficiente neste pH devido a maioria destes ácidos encontraram-se na forma ionizada.

Com o objetivo de minimizar os compostos inibitórios presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, Viñals (2001) estudou o tratamento do hidrolisado utilizando carvão ativo ou resinas de troca iônica em diferentes combinações. Este autor observou que os melhores resultados foram obtidos ao destoxificar o hidrolisado com a seguinte sequência de resinas: A-860S, A-500, C-155S, A-39RAD, sendo possível a remoção de 100% de furfural, hidroximetilfurfural e ácido acético, 98,19% de fenóis totais e 99,08% da cor do hidrolisado. Outro fato observado foi que o hidrolisado destoxificado por qualquer uma das seqüências das

resinas de troca iônica estudadas, apresentou valores de remoção de inibidores superiores ao hidrolisado tratado com carvão ativo.

A destoxificação do hidrolisado de “corn stover”, utilizando-se resinas de troca iônica (A-103S, A-860S, A-500P, C-155S, CS-11GC, CS-13GC e CS-14GC), foi estudada por Mancilha e Karim (2003). As resinas foram estudadas uma a uma, separadamente. Estes autores observaram uma recuperação de aproximadamente 97% da xilose presente no hidrolisado utilizando-se as resinas aniônicas A-860S e A-500P. A maior redução da coloração foi observada com as resinas aniônicas A-103S (95%) e A-500P (74%) e catiônica C-155S (83%). Em relação aos inibidores, foi possível remover entre 53 e 99% de furfural, entre 37 e 100% de hidroximetilfurfural e 100% de ácido acético, onde a maior remoção de furfural foi observada nas resinas aniônicas (A-103S, A-860S e A-500P) e a maior remoção de hidroximetilfurfural e ácido acético em apenas uma das aniônicas (A-103S).

Estudos realizados por Carvalho et al. (2004a) mostraram que a sequência de resinas A-103S, A-860S, Applexion catiônica e Applexion aniônica, promoveu remoções dos inibidores furfural (82,1%), hidroximetilfurfural (66,5%) e lignina solúvel (61,9%), além de também remover metais como cromo (100%), zinco (46,1%), ferro (28,5%), sódio (14,7%) e níquel (3,5%), presentes no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar. Porém, estes autores não verificaram remoção de ácido acético utilizando esta sequência de resinas.

Canilha, Almeida e Silva e Solenzal (2004), utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, também estudaram o tratamento do hidrolisado obtido, usando carvão ativo ou resinas de troca iônica sequenciais (MN-150, A-860S, Applexion catiônica e aniônica). Estes autores verificaram perdas de 14% de xilose para o hidrolisado tratado com carvão ativo e um aumento nos parâmetros fermentativos nos hidrolisados tratados com resinas de troca iônica, quando estes foram fermentados com a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037. Para o hidrolisado tratado com carvão ativo obteve-se um fator de conversão de xilose em xilitol de

0,66 g/g e uma produtividade de 0,50 g/L.h, enquanto que para o hidrolisado tratado com resinas, obteve-se 0,76 g/g e 0,68 g/L.h, respectivamente.

Martinez (2005) clarificou um meio obtido por fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por *C. guilliermondii* FTI 20037. Este autor utilizou as resinas de troca iônica A-505 e C-505 e observou diminuições tanto na concentração de arabinose quanto na coloração do caldo fermentado. Também foi possível observar perdas em xilitol após esta etapa de purificação. Ressalta-se que o processo de purificação de licores, como o caldo fermentado, é abordado na literatura superficialmente, não havendo muitos detalhes técnicos disponíveis, seja a partir de soluções de xilitol pura ou em sistemas complexos.

2.8 PROCESSO DE CRISTALIZAÇÃO

2.8.1 Cristalização

A cristalização é um dos métodos de finalização de produtos mais utilizado em indústrias químicas e farmacêuticas. Em muitos casos, é utilizada como uma forma vantajosa de separação de espécies químicas de uma mistura de substâncias representada por matérias-primas ou subprodutos de reações (GIULIETTI et al., 2001; NÝVLT; HOSTOMSKÝ; GIULIETTI, 2001). A complexidade da cristalização consiste no surgimento e no crescimento de partículas sólidas no meio, provocados por uma instabilidade na solução, que pode ser devida a variações nas propriedades físicas da solução, tais como concentração e temperatura (DERENZO, 1994; BECKETT et al., 2003). Segundo Derenzo (1994), essas variações podem gerar partículas de diversos tamanhos e formas durante a cristalização, exigindo um tratamento complexo dos dados experimentais.

A cristalização provavelmente é a tecnologia de separação mais comum, com aplicações em todos os ramos da indústria química, como petroquímica (monômeros),

química fina (pigmentos), alimentos (açúcar, sucos e adoçantes), fármacos (antibióticos, enzimas), agricultura (fertilizantes), entre outros (IPT, 2004).

Como todo método, a cristalização tem as suas vantagens e desvantagens. Como vantagens destacam-se: processo altamente seletivo, baixo consumo energético, condições amenas de trabalho, dispensa uma fase auxiliar, obtenção de produto sólido. Processo lento, manuseio de suspensões, controle difícil do processo, conhecimento fundamental e processo específico para cada produto são apresentadas como as desvantagens da cristalização (IPT, 2004).

A predominância da cristalização como método de purificação seria devido: 1) aos cristais obtidos serem de pureza excepcional, 2) a produção de cristais uniformes facilitar os próximos passos da produção (filtração e secagem), 3) o processo melhorar a aparência do produto, aspecto importante para a aceitação pelo consumidor (BELTER; CUSSLER; HU, 1988).

Os tipos de cristalizadores podem ser classificados de acordo com as condições hidrodinâmicas no equipamento. Têm-se cristalizadores não agitados e agitados (com classificação de produto e com circulação externa ou interna). Os tipos básicos de cristalizadores incluem aqueles com resfriamento direto por ar ou por líquidos imiscíveis, com resfriamento indireto ou com vácuo, de evaporação por solvente, de leite fluidizado, secadores de nebulização (“spray dryers”), com reação química, a partir do estado fundido e cristalização fracionada (NÝVLT; HOSTOMSKÝ; GIULIETTI, 2001; van ROSMALEN et al., 2004). A escolha do tipo de cristalizador depende do material a ser cristalizado e do solvente utilizado, do método de cristalização, das especificações do produto e, sobretudo, da distribuição de tamanho dos cristais. Outro fator que deve ser levado em consideração é se o processo vai ser conduzido em forma descontínua, semicontínua ou contínua (dependente da quantidade de material a ser produzido) (van ROSMALEN et al., 2004).

Quando se estuda o equilíbrio de fases de um sistema sólido-líquido, geralmente consideram-se dois estados da solução: a saturada e a insaturada. Porém, é um outro estado da solução que permite a cristalização, a supersaturação. Uma solução supersaturada é aquela que contém um teor de soluto acima do equilíbrio, nas mesmas condições de temperatura e concentração dos outros componentes (NÝVLT et al., 1985; BELTER; CUSSLER; HU, 1988). A supersaturação pode ser criada por resfriamento, evaporação, anti-solvente ou por precipitação (NÝVLT; HOSTOMSKÝ; GIULIETTI, 2001; GIULIETTI et al., 2001; van ROSMALEN et al., 2004). Estes diferentes comportamentos da curva de solubilidade estão apresentados na Figura 5.

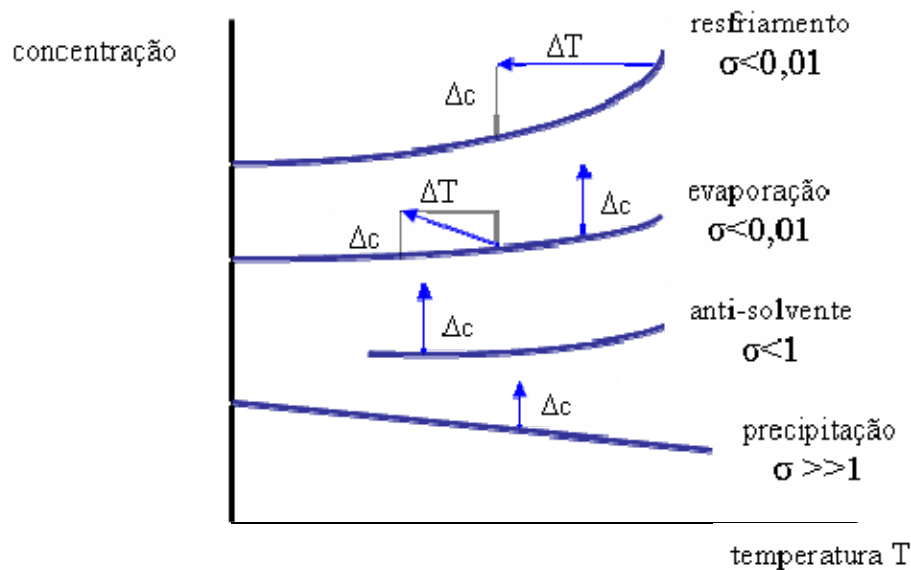


Figura 5 Curvas típicas de solubilidade (van ROSMALEN et al., 2004).

Pela supersaturação relativa sabe-se qual destes métodos será o mais adequado a ser utilizado na cristalização. A supersaturação relativa (σ) pode ser descrita pela seguinte fórmula:

$$\sigma = \frac{\Delta C}{c^*} = \frac{c - c^*}{c^*} = S - 1 \quad (\text{Eq.2})$$

Em que ΔC é a supersaturação do sistema em estudo (kg de soluto por kg de solvente), c é a concentração da solução supersaturada (kg de soluto por kg de solvente), c^* é a concentração de equilíbrio (kg de soluto por kg de solvente) e S é a supersaturação.

Uma curva de solubilidade íngreme que apresente $\sigma < 0,01$, indica que o resfriamento é o método mais apropriado, gerando cristais grandes e com ocorrência de nucleação secundária. Este método é o mais aplicado para compostos facilmente solúveis podendo ser por resfriamento indireto, direto ou por vácuo. Uma curva de solubilidade achatada com $\sigma < 0,01$, indica que o método a ser utilizado é a evaporação, também gerando cristais grandes e com ocorrência de nucleação secundária. Se a curva for achatada ou íngreme, mas com $\sigma < 1$, indica que o método de cristalização a ser utilizado é o anti-solvente, com a formação de cristais de tamanho médio e com ocorrência de nucleação primária ou secundária. Se a curva for achatada ou íngreme, mas com $\sigma \gg 1$, a precipitação é o método a ser utilizado, gerando cristais pequenos e com ocorrência de nucleação primária (van ROSMALEN et al., 2004).

Conforme descrito anteriormente, a nucleação e o crescimento dos cristais, que juntos com fenômenos secundários vão gerar a distribuição granulométrica dos cristais, estão relacionados com os métodos de cristalização (DERENZO, 2003; YU et al., 2004). A formação de núcleos e seu posterior crescimento em cristais ocorrem somente quando a supersaturação é criada, atuando como força motriz para a cristalização. A nucleação pode ser induzida por agitação, choque mecânico, fricção ou pressões externas, porém é necessária a presença de corpos sólidos (embriões ou núcleos) na solução, atuando como centros de cristalização (MULLIN, 2001). A formação de núcleos cristalinos pode ser considerada como o processo que determina o tamanho do cristal produzido e assim também desempenha um papel substancial na determinação de várias de suas propriedades físicas e sua pureza (YU et al., 2004). Os mecanismos de nucleação podem ser classificados em nucleação primária, homogênea ou heterogênea e nucleação secundária, originada por cristais, por camada

intermediária ou por colisão (MULLIN, 2001; NÝVLT; HOSTOMSKÝ; GIULIETTI, 2001; van ROSMALEN et al., 2004).

A nucleação primária ocorre na ausência de partículas sólidas da substância a ser cristalizada e se a solução for absolutamente pura, o mecanismo é de nucleação homogênea. Na presença de substâncias sólidas estranhas ao meio (pó, colóides e paredes do cristalizador), a nucleação ocorre de forma heterogênea (NÝVLT; HOSTOMSKÝ; GIULIETTI, 2001). A nucleação secundária é dependente da presença de cristais da substância a ser cristalizada, em soluções supersaturadas. Entre os mecanismos de nucleação secundária, dois são de particular importância na cristalização industrial: o mecanismo de camadas de superfície, no qual os núcleos são formados na camada líquida adjacente à superfície do cristal e o mecanismo de contato (por colisão), predominante em soluções concentradas, no qual novos cristais são formados por colisões dos cristais já existentes com a superfície sólida do cristalizador (paredes, agitador) ou pelas colisões entre os próprios cristais (NÝVLT; HOSTOMSKÝ; GIULIETTI, 2001).

Uma vez nucleados, seja por nucleação primária ou secundária, os cristais começam a crescer pela incorporação do soluto na sua estrutura. O mecanismo em geral, leva ao crescimento das faces do cristal em diferentes velocidades e podem sofrer da mesma maneira da nucleação, efeitos de impurezas e aditivos presentes na solução (DERENZO, 1994; van ROSMALEN et al., 2004). Segundo Nývlt, Hostomský e Giuletty (2001), é praticamente impossível assegurar idênticas condições de crescimento para os cristais no volume inteiro do cristalizador, pois há novos cristais se formando durante todo o processo de cristalização, resultando um produto que possuirá tamanhos diferentes de cristais.

A análise granulométrica em peneiras é o método mais utilizado na prática da cristalização para determinar a distribuição de tamanhos de cristais (DTC). O tamanho característico do cristal é dado pela abertura da peneira através da qual a partícula pode

passar. O peneiramento pode ser efetuado manualmente ou por equipamentos mecânicos que fornecem resultados mais reproduzíveis a uma série de medidas (NÝVLT; HOSTOMSKÝ; GIULIETTI, 2001).

A modelagem matemática desenvolvida por Nývlt et al. (1985) baseia-se nas equações cinéticas para distribuição granulométrica ($M(L)$), velocidades específicas de crescimento (G) e de nucleação (dN/dT). Cabe ressaltar que o modelo matemático já está bem documentado na literatura (DERENZO, 1994; NÝVLT; HOSTOMSKÝ; GIULIETTI, 2001) e que nesta revisão apenas serão apresentadas fórmulas que por ventura poderiam ser utilizadas no presente trabalho. A distribuição granulométrica dos cristais ($M(L)$) é considerada uma distribuição mássica acumulada (M) até o tamanho correspondente ao da abertura da peneira (L), conforme as equações 3 a 6:

$$M(L) = \left[\frac{100 \left(1 + z + \frac{z^2}{2} + \frac{z^3}{6} \right)}{f(z_n)} \right] \exp(-(z - z_n)) \quad (\text{Eq.3})$$

Onde:

$$z = \frac{L - L_n}{3L_D} = \frac{L}{Gt_1} \quad (\text{Eq.4})$$

$$f(z_n) = 1 + z_n + \frac{z_n^2}{2} + \frac{z_n^3}{6} \quad (\text{Eq.5})$$

$$z_n = \frac{L_n}{3L_D} \quad (\text{Eq.6})$$

Em que z é o tamanho adimensional do cristal, L_D é o tamanho dominante dos cristais (mm), L_n é o tamanho mínimo dos cristais na distribuição (mm), G é a velocidade específica de crescimento (m/s).

A velocidade específica de crescimento (G) está expressa na equação 7:

$$G = \frac{L_D}{3 t_C} \quad (\text{Eq.7})$$

Em que, L_D é o tamanho dominante dos cristais (mm) e t_C é o tempo de cristalização (min).

A velocidade específica de nucleação (dN/dT) está expressa na equação 8:

$$\frac{dN}{dT} = \left[\frac{27 M_c G}{2 \alpha \sigma (L_m - L_n)^4} \right] \quad (\text{Eq.8})$$

Em que, M_c é a massa cristalizada da substância (kg/m^3), α é o fator volumétrico do cristal, σ é a densidade da substância (kg/m^3) e $L_D = (L_m - L_n)$ é o tamanho dominante dos cristais (mm).

A partir da equação 8, pode-se estimar os valores de c , g/n e B_N aplicando-se logaritmo nos dois lados da equação e realizando uma regressão multilinear em uma série de dados experimentais (DERENZO, 2003):

$$Y = \log \frac{dN}{dT} = \left(\log k_N / k_g^{n/g} \right) + c \log m_c + \frac{n}{G} \log G = A + c \log m_c + \frac{n}{G} \log G \quad (\text{Eq.9})$$

$$B_N = \frac{4,5^{g/n} k_g}{(\alpha \rho_c k_N)^{g/n}} = \left(\frac{4,5 k_g^{n/g}}{\alpha \rho_c k_N} \right)^{g/n} = \left(\frac{4,5}{\exp(A) \alpha \rho_c} \right)^{g/n} \quad (\text{Eq.10})$$

Em que K_N é a constante cinética de nucleação; k_g é a constante cinética de crescimento; c é o expoente da concentração mássica dos cristais na cinética de nucleação; g é o expoente da supersaturação na cinética de crescimento; n é o expoente da supersaturação na nucleação; B_N é a constante do sistema; α é o fator de forma volumétrico e ρ é a densidade do sólido (kg/m^3).

Assim, segundo Derenzo (2003), podem-se obter os valores dos parâmetros cinéticos sem que o perfil da supersaturação tenha sido monitorado ao longo do ensaio.

2.8.2 Cristalização do xilitol

Os trabalhos descritos na literatura, com relação à produção de xilitol, enfatizam principalmente aspectos relacionados com o tratamento de hidrolisados a serem utilizados

como fonte de carbono, com a suplementação destes hidrolisados, com a redução de xilose a xilitol empregando-se catalisadores químicos e com os aspectos metabólicos da bioconversão, existindo poucas informações em relação à recuperação do produto. Estes estudos poderiam ser baseados em parte nos métodos gerais aplicados a açúcares diversos, devido à similaridade estrutural e físico-química entre estes compostos. No entanto, características específicas do sistema, tais como alta viscosidade, reologia complexa, instabilidade a altas temperaturas, semelhanças físico-químicas entre produtos e contaminantes, tais como pequenas diferenças de densidade, fazem da purificação de açúcares uma das etapas mais difíceis na produção de substâncias puras (WEATHERLEY, 1994).

Em geral, a cristalização de açúcares é bastante complexa, com muitas dificuldades no controle do tamanho e da forma dos cristais gerados. Normalmente, a solução a ser cristalizada deve conter por volta de 60% do total de açúcares e 40% de água. Os açúcares mais utilizados por indústrias no processo de cristalização são tipicamente: sacarose, glicose, frutose, trealose, lactose, sorbitol, manitol, eritritol, ou combinações entre estes (BECKETT et al., 2003).

A cristalização de xilitol a partir de solução aquosa tem sido estudada por alguns pesquisadores (HEIKKILÄ et al., 1992; GURGEL et al., 1995; De FAVERI et al., 2002; MARTINEZ et al., 2005; HAO et al., 2006), mas não há informações suficientes para se desenvolverem processos industriais. Segundo De FAVERI et al. (2002), a recuperação do xilitol é a etapa mais difícil do que o processo de fermentação em si, devido à baixa concentração do produto produzido após a fermentação e a composição complexa do caldo fermentado obtido.

Wolfrom e Kohn (1942) observaram a formação de cristais de xilitol obtidos a partir da hidrogenação da xilose de alta pureza, mantendo a solução de xilitol em baixas temperaturas durante algumas semanas. Os cristais foram caracterizados como anidros,

higroscópicos e com ponto de fusão igual a 61 °C, o que é significativamente menor que o ponto de fusão de xilitol puro, de 93,5 °C (LIDE; MILNE, 1996).

Vyglazov e Khol'kin (1984) estudaram a influência da temperatura e da composição da mistura de solvente água-etanol na solubilidade do xilitol. Ao diminuírem a temperatura de 60 para 5 °C, observaram que a solubilidade do xilitol em água pura diminuiu de 85 para 50 g/100 g de solução, em mistura com 90% de etanol. Estes autores também puderam observar que ao aumentarem a concentração de etanol até 95,3% na solução, a solubilidade do xilitol foi menor, diminuindo seus valores de 18 até próximo de 0 g/g com a mesma diminuição na temperatura. Portanto, a solubilidade do xilitol puro depende significativamente da temperatura e da composição da mistura de solvente utilizado.

A cristalização do xilitol a partir de meio de fermentação oriundo de materiais lignocelulósicos foi desenvolvida por Heikkilä et al. (1992). Estes autores utilizaram a separação cromatográfica para obter uma solução com 82,5% de xilitol. A solução foi então evaporada a 65 °C até obterem uma solução com 92% de xilitol. Após a evaporação, a solução foi semeada com cristais de xilitol, diminuindo-se a temperatura até 45 °C, em 55 h. Todo o processo foi realizado em um cristalizador vertical equipado com misturador. A separação dos cristais (com pureza de 99,4% e 0,37 mm de tamanho médio) foi realizada por centrifugação, utilizando-se água na lavagem.

Gurgel et al. (1995), a partir do caldo fermentado de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (anteriormente filtrado, concentrado e tratado), estudaram a formação de cristais de xilitol a -15 °C, durante uma semana, empregando como semente uma solução de 1 g/L de xilitol (grau comercial). Os cristais formados apresentaram forma de agulha e cor uniforme. Entretanto, quando não se adicionou semente durante um período de cinco semanas na mesma temperatura, não houve formação visível de cristais. Os cristais de xilitol, na sua forma estável, são rômnicos, enquanto que na sua forma metaestável são monoclinicos (Weast

e Astle (1980), citados por GURGEL et al. (1995)). Kim e Jeffrey (1969), citados por Gurgel et al. (1995), observaram a formação de cristais de xilitol em duas morfologias diferentes da forma ortorrômbica, uma na forma de agulhas alongadas e a outra na forma de prismas bem desenvolvidos.

De Faveri et al. (2002) estudaram a recuperação de xilitol por cristalização a partir de soluções sintéticas simulando a composição do hidrolisado hemicelulósico de madeira fermentado por *Debaryomyces hansenii*, contendo xilose (93-223 g/L) e xilitol (270-730 g/L). Os experimentos foram realizados em tubos de vidro de 25 mL submersos em um banho de etilenoglicol, sendo agitados suavemente, variando-se a temperatura de resfriamento. Foi adicionado 1,0 g/L de sementes de xilitol comercial para favorecer a nucleação dos cristais. Após a etapa de cristalização, as soluções foram centrifugadas (5000 rpm por 15 minutos) e filtradas a vácuo (filtros com 0,45 µm de diâmetro) para a separação dos cristais formados. Os melhores valores de rendimento de cristalização (56%) e grau de pureza (1,00) foram obtidos com soluções concentradas de xilitol (730 g/L) na temperatura de -5 °C.

Pela metodologia de superfície de resposta, De Faveri et al. (2004) estudaram a recuperação de xilitol a partir de soluções sintéticas, simulando a composição de hidrolisado de madeira fermentado, variando valores de supersaturação inicial do xilitol (X_{ts}) e da temperatura de resfriamento na cristalização (T_C). A metodologia de cristalização utilizada foi a mesma descrita em De Faveri et al. (2002), onde o licor contendo xilitol foi concentrado, cristalizado e centrifugado para separação dos cristais obtidos. O modelo estatístico operando nas condições ótimas definidas ($X_{ts} = 728$ g/L e $T_C = -6,0$ °C) apresentou valores de rendimento de cristalização de 54% e grau de pureza de 0,97. Segundo o modelo obtido por estes autores, também se pode concluir que o rendimento de cristalização pode ser aumentado com um aumento da supersaturação de xilitol ou com o decréscimo da temperatura de

resfriamento. Porém, o decréscimo da temperatura pode provocar uma redução da pureza dos cristais.

Martinez (2005) estudou o processo de cristalização de xilitol obtido por via fermentativa, tanto por caldo obtido a partir de solução sintética quanto por hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar fermentado. A cristalização dos caldos contendo xilitol utilizando etanol 99,7% como solvente, temperatura de 50 °C e velocidade de resfriamento de 0,5 °C/min, proporcionou cristais com 95 e 85% de pureza, respectivamente. Os produtos obtidos foram filtrados, lavados com etanol, secos e submetidos a uma recristalização a fim de aumentar a pureza dos cristais. Nesta segunda etapa de cristalização, os cristais obtidos por esse autor apresentaram entre 98 e 99%, e 92 e 94% de pureza, a partir de solução sintética e de hidrolisado fermentado, respectivamente.

Hao et al. (2006) avaliaram o efeito de diferentes solventes na cristalização de xilitol. Utilizando um sistema metanol-água, estes autores puderam determinar a solubilidade e a cinética de cristalização, observando que: 1) a solubilidade do xilitol aumenta quando a concentração do metanol aumenta, com aumento da temperatura; 2) a solubilidade do xilitol diminui quando a concentração de metanol diminui, em temperatura constante; 4) as velocidades de crescimento e de nucleação do xilitol diminuem quando a concentração de metanol aumenta, em temperatura constante.

3 OBJETIVOS

- Estudar e definir as condições de cultivo da levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo, de forma a favorecer a bioconversão de xilose em xilitol;
- Estudar a clarificação do caldo fermentado com resinas de troca iônica, quanto à redução da coloração e à remoção de compostos tóxicos;
- Estudar a cristalização do xilitol presente no caldo fermentado clarificado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PALHA DE TRIGO

A palha de trigo utilizada nos experimentos foi proveniente da estação experimental do Instituto Agronômico de Campinas localizado no município de Tatuí, SP. A palha foi moída e seca ao sol. Foi determinado o seu teor de umidade, e posteriormente, a palha foi ensacada e armazenada até a realização das hidrólises.

4.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA PALHA DE TRIGO

A análise da palha de trigo foi feita de acordo com a metodologia descrita por Dunning e Dallas (1949), que se fundamenta na sacarificação quantitativa dos polissacarídeos de diferentes matérias-primas vegetais. A palha de trigo foi moída e passada por peneira de diâmetro nominal do fio de 0,510 mm e abertura da peneira de 0,841 mm (20 “mesh”). Todo o material peneirado foi seco em estufa a 60 °C por 30 minutos. Após a redução da umidade do material até 10%, foi feita a pesagem da palha de trigo moída. Aproximadamente 2 g de palha foram pesadas e transferidas para um béquer com 10 mL de ácido sulfúrico 72% (p/p). A mistura foi agitada continuamente em banho de água a 50 °C por 7 minutos. Nessa etapa, denominada hidrólise principal, ocorreu o rompimento das fibras de celulose em oligômeros.

Ao completar o tempo da hidrólise, a reação foi interrompida com adição de 275 mL de água destilada e o conteúdo foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 500 mL. A suspensão foi autoclavada a 121 °C por 15 minutos. Esta etapa é denominada pós-hidrólise, onde oligômeros são transformados em monômeros. Após resfriamento, a suspensão foi

transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL. O volume foi completado com água destilada e, em seguida, homogeneizado e filtrado.

O resíduo (após várias lavagens) foi secado em estufa a 105 °C e pesado até massa constante. A relação entre a massa do resíduo e a massa inicial da amostra foi utilizada para determinar a percentagem de lignina presente na palha de trigo. A fração líquida obtida foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinações das concentrações de glicose, xilose e arabinose, utilizadas para o cálculo da percentagem de celulose e hemicelulose na palha de trigo.

Para determinação das cinzas, 1 g de palha de trigo foi submetida a um tratamento térmico em mufla elétrica a 600 °C, durante 4 horas, combustão total da matéria orgânica. Em seguida, foi pesada até se obter massa constante (SILVA; QUEIROZ, 2005).

4.3 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE TRIGO

A palha de trigo foi hidrolisada em um reator de aço inox de 350 L de capacidade útil, equipado com camisa de óleo térmico para aquecimento indireto por resistência elétrica. A hidrólise foi realizada nas seguintes condições: solução de ácido sulfúrico a 1,0%, relação sólido-líquido de 1,76 kg de palha para cada 20 L de solução ácida, temperatura de 121 °C e tempo de 20 minutos. O hidrolisado resultante foi centrifugado e, depois de resfriado, foi estocado em câmara fria para posterior concentração e tratamento.

4.4 CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO

O hidrolisado obtido foi concentrado três, quatro e cinco vezes, em evaporador a vácuo de 30 L de capacidade útil, operando a 70 °C, com a finalidade de aumentar o seu teor inicial de xilose.

4.5 DESTOXIFICAÇÃO DO HIDROLISADO

O meio de fermentação foi preparado com os hidrolisados concentrados e submetidos ao seguinte tratamento: elevação do pH inicial para 7,0 com óxido de cálcio comercial e posterior redução do pH para 5,5 com ácido fosfórico comercial (ALVES et al., 1998). Foi feita, ainda, a adição de carvão ativo (2,5% ou 10%) sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 1 h. Após cada etapa deste tratamento, o hidrolisado foi filtrado em papel de filtro qualitativo para a remoção do precipitado formado e depois autoclavado a 111 °C por 15 minutos.

4.6 MICRORGANISMO E PREPARO DO INÓCULO

Foi utilizada a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, da coleção de culturas do GMBio/DEBIQ/EEL, selecionada por Barbosa et al. (1988). O inóculo foi preparado a partir de células obtidas de uma cultura estoque, mantidas em ágar malte a 4 °C. O cultivo da levedura foi feito inoculando-se as células da cultura recém-repicada (1-2 dias) em meio semi-sintético contendo soluções de sulfato de amônio (2,0 g/L), cloreto de cálcio (0,1 g/L) e farelo de arroz (20,0 g/L) com duas diferentes fontes de carbono: ou com glicose (7,0 g/L) e xilose (30,0 g/L) ou somente com glicose (37,0 g/L). As soluções de xilose, glicose e farelo de arroz foram autoclavadas a 111 °C por 15 minutos enquanto que as soluções de sulfato de amônio e cloreto de cálcio foram esterilizadas a 121 °C por 20 minutos.

As células foram cultivadas em incubadora de movimento circular a 200 rpm, 30 °C por 24 horas. Em seguida, as células foram recolhidas por centrifugação a 2000 x g por 20 minutos, e lavadas com água esterilizada, para o preparo da suspensão, que foi utilizada como inóculo da fermentação.

4.7 MEIO E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

Os experimentos foram realizados em frascos agitados e em fermentadores, utilizando-se como meio o hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo suplementado com sulfato de amônio, cloreto de cálcio e farelo de arroz, em proporções adequadas ao consumo dos açúcares e à produção de xilitol.

4.7.1 Ensaios em frascos agitados

Nessa etapa de fermentação foi estudada a influência *das concentrações dos nutrientes (sulfato de amônio, cloreto de cálcio e farelo de arroz), do fator de concentração do hidrolisado (concentração inicial de xilose) e do pH inicial do meio de fermentação* (variáveis independentes), bem como os efeitos de possíveis interações entre estas, sobre a concentração final de xilitol, a produtividade volumétrica em xilitol e o fator de conversão de xilose em xilitol (variáveis dependentes). A análise foi baseada num esquema fatorial fracionário 2^{5-1} em face centrada com três repetições do ponto central (BOX; HUNTER; HUNTER, 1978). Os valores das variáveis independentes estão apresentados na Tabela 4, onde (-1), (0) e (+1) significam o menor nível, o ponto central e o maior nível, respectivamente. A Tabela 5 ilustra a matriz experimental do planejamento estudado.

Tabela 4 Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} em face centrada com três repetições do ponto central.

Fatores	Siglas	Níveis		
		(-1)	(0)	(+1)
Sulfato de Amônio (g/L)	A	1,0	2,0	3,0
Cloreto de Cálcio (g/L)	B	0	0,5	1,0
Farelo de Arroz (g/L)	C	5,0	12,5	20,0
pH	D	4,0	5,0	6,0
Fator de concentração do hidrolisado	E	3,0	4,0	5,0

Tabela 5 Esquema da matriz de planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} em face centrada com três repetições do ponto central.

Ensaio	A	B	C	D	E
01	-1	-1	-1	-1	+1
02	+1	-1	-1	-1	-1
03	-1	+1	-1	-1	-1
04	+1	+1	-1	-1	+1
05	-1	-1	+1	-1	-1
06	+1	-1	+1	-1	+1
07	-1	+1	+1	-1	+1
08	+1	+1	+1	-1	-1
09	-1	-1	-1	+1	-1
10	+1	-1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1
12	+1	+1	-1	+1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1
16	+1	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0
20	-1	0	0	0	0
21	+1	0	0	0	0
22	0	-1	0	0	0
23	0	+1	0	0	0
24	0	0	-1	0	0
25	0	0	+1	0	0
26	0	0	0	-1	0
27	0	0	0	+1	0
28	0	0	0	0	-1
29	0	0	0	0	+1

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio descrito no item 4.7, em incubadora de movimento circular (modelo: G25KC, New Brunswick) a 200 rpm, 30 °C por 72 horas. A concentração inicial de células nos frascos foi de 0,5 g/L.

4.7.2 Ensaaios em fermentadores

Após a obtenção dos resultados dos experimentos em frascos agitados, foi realizado um ensaio em fermentador de bancada (modelo: Bioflo III, New Brunswick) (Figura 6), com capacidade total de 2 L, contendo 1,3 L de meio. O fermentador é equipado com eletrodo de oxigênio dissolvido, termopar e agitador. A concentração inicial de células era de 0,5 g/L. A fermentação foi conduzida a 30 °C, sob agitação de 300 rpm e pelo tempo necessário para o consumo de mais de 80% da xilose inicial. O valor de k_La (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio) foi de 15 h⁻¹ (valor baseado em trabalhos conduzidos por Rodrigues, 2005). O meio de fermentação foi o correspondente à melhor condição definida em frascos agitados.

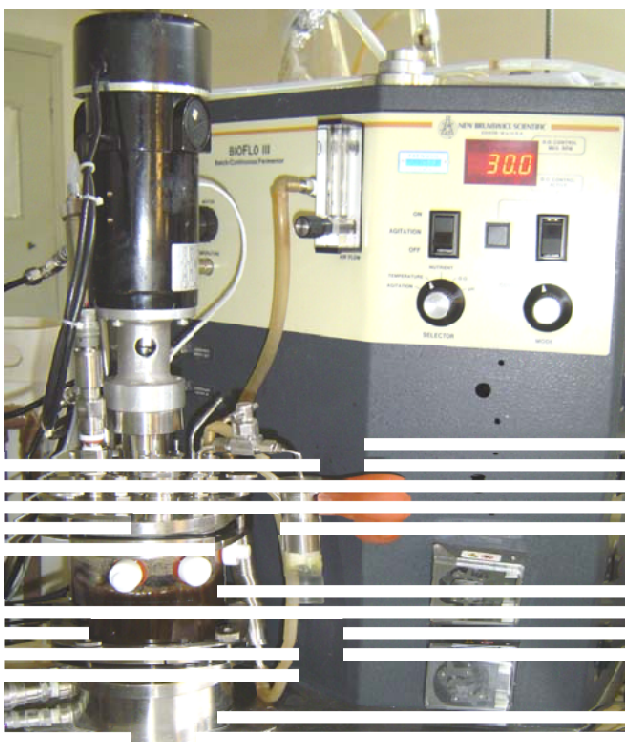


Figura 6 Fermentador de bancada de 2 L de capacidade total.

Após o experimento realizado em fermentador de bancada com capacidade total de 2 L, a produção de xilitol foi ampliada em fermentador com capacidade total de 16 L

(modelo: AG Tipo L 1523, Bioengineering) (Figura 7), contendo 12 L de meio, para posterior clarificação do caldo obtido e cristalização do xilitol. O fermentador utilizado nesta etapa é equipado com eletrodo de oxigênio dissolvido, termopar e agitador. A concentração inicial de células foi de 0,5 g/L e o meio de fermentação também foi o da melhor condição definida em frascos agitados. A fermentação foi conduzida a 30 °C, sob agitação de 300 rpm por 90 horas (tempo necessário para que fosse consumida toda a xilose). O valor de $k_L a$ também foi de 15 h^{-1} (RODRIGUES, 2005).

Nas fermentações realizadas em fermentadores foi adicionada benzilpenicilina potássica (Benzecilin 5,000,000 UI, Teuto Brasileiro Ltda.) ao meio de fermentação para o controle de possíveis contaminantes.

O caldo obtido na fermentação foi centrifugado a $2000 \times g$ por 20 minutos para retirada das células de levedura e congelado para posterior concentração e clarificação.



Figura 7 Fermentador de 16 L de capacidade total.

4.8 CLARIFICAÇÃO DO CALDO FERMENTADO

Os testes de clarificação do caldo fermentado foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL, com as seguintes resinas: resina acrílica de troca aniônica fortemente básica tipo 01 (A-860S), resina macroporosa de poliestireno de troca aniônica fortemente básica tipo 01 (A-500PS) e resina macroporosa de troca catiônica fortemente ácida (C-150). Estas resinas são recomendadas pelo próprio fabricante (PUROLITE) para a purificação de soluções de açúcares.

Primeiramente, foram realizados oito ensaios com as três resinas em série, a fim de avaliar diferentes soluções regenerantes para as resinas e a quantidade de caldo fermentado misturado à resina. Os regenerantes e a proporção entre a resina e o caldo para cada ensaio estão mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 Regenerantes e proporção entre resina e o caldo fermentado utilizados na etapa de clarificação.

Ensaio	Resinas	Regenerantes		Proporção
		Aniônicas	Catiônicas	Resina + caldo
01	A-860S, A-500PS e C-150	NaCl 10%	NaCl 5%	1+1
02	A-860S, A-500PS e C-150	NaCl 10%	NaCl 5%	1+2
03	A-860S, A-500PS e C-150	NaCl 10%	NaCl 5%	1+3
04	A-860S, A-500PS e C-150	NaCl 10%	NaCl 5%	1+4
05	A-860S, A-500PS e C-150	NaOH 10%	HCl 5%	1+1
06	A-860S, A-500PS e C-150	NaOH 10%	HCl 5%	1+2
07	A-860S, A-500PS e C-150	NaOH 10%	HCl 5%	1+3
08	A-860S, A-500PS e C-150	NaOH 10%	HCl 5%	1+4

Nos ensaios de 01 a 04, os regenerantes utilizados para as resinas aniônicas e catiônicas foram soluções salinas de NaCl a 10% e 5%, respectivamente), portanto as resinas aniônicas se apresentavam na forma Cl^- e as resinas catiônicas na forma Na^+ . Nos ensaios de

05 a 08, os regenerantes utilizados para as resinas aniônicas e catiônicas foram soluções alcalinas e ácidas, de NaOH a 10% e HCl a 5%, respectivamente), portanto as resinas aniônicas se apresentavam na forma OH^- e as resinas catiônicas na forma H^+ . Além disso, nos ensaios de 01 a 04, a quantidade de caldo misturado à resina aumentou a cada ensaio. O mesmo ocorre nos ensaios de 05 a 08.

Na segunda etapa, os quatro melhores ensaios da etapa anterior, quanto às maiores reduções da coloração, remoções de inibidores e menores perdas em xilitol (ensaios 01, 02, 05 e 06), foram novamente realizados, acrescentando a análise da composição do caldo fermentado ao final de cada uma das três resinas testadas em cada ensaio.

Na terceira etapa, os dois melhores ensaios da etapa anterior, quanto às maiores reduções da coloração, remoções de inibidores e menores perdas em xilitol (ensaios 02 e 06), foram novamente realizados, acrescentando a análise da composição do caldo fermentado ao final de apenas duas resinas testadas em cada ensaio.

Após a realização das três etapas, a melhor clarificação foi obtida (ensaio 06 com duas resinas aniônicas). O processo de troca iônica foi então realizado em frascos Erlenmeyer de 2000 mL, nas mesmas proporções selecionadas anteriormente.

O ciclo de operação das resinas de clarificação foi dividido em cinco fases: 1) As resinas foram mantidas em água desionizada por 24 horas; 2) Após, foi feita a regeneração das resinas com os regenerantes e proporções indicados na Tabela 6. Em seguida, as resinas foram lavadas com água desionizada a fim de eliminar o regenerante residual. O contato entre as resinas e os regenerantes e a lavagem com água desionizada foram realizados em frascos sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 90 minutos; 3) A terceira fase da clarificação correspondeu à saturação da resina com o xilitol. O volume de solução de xilitol utilizado foi aproximadamente igual à metade do volume de resina utilizada. A saturação também foi realizada em frascos sob agitação de 200 rpm a 30 °C por 60 minutos; 4) Após a saturação, o

caldo permaneceu em contato com as resinas por 60 minutos, agitação de 200 rpm a 30 °C; 5) Por último, as resinas foram novamente lavadas com a finalidade de remover qualquer material proveniente do caldo fermentado.

Amostras do início e do final das clarificações foram analisadas quanto à concentração de xilose, arabinose, xilitol, fenóis totais, ácido acético, sólidos totais, sólidos solúveis (°Brix), cor e pH.

4.9 CONCENTRAÇÃO DO CALDO FERMENTADO

O licor clarificado foi concentrado em evaporador a vácuo de 2 L de capacidade útil, operando a 60 °C, com a finalidade de aumentar o teor inicial de xilitol presente até a condição de saturação.

4.10 CRISTALIZAÇÃO DO XILITOL

Para a realização dos ensaios de cristalização, foram empregadas as condições obtidas por Martinez (2005). Este autor obteve a curva de solubilidade de xilitol em água-etanol (50-50%) além de realizar um estudo cinético da cristalização de xilitol, variando a temperatura de saturação (T) e a velocidade de resfriamento linear (V_R). A melhor condição encontrada em seus experimentos ($T = 50\text{ °C}$ e $V_R = 0,5\text{ °C/min}$) com caldo proveniente da fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, foi aqui testada com o caldo proveniente da fermentação de hidrolisado da palha de trigo. Também foram realizados novos ensaios de cristalização a fim de se obter a melhor condição para o caldo fermentado da palha. Esta parte do trabalho foi realizada no laboratório de Tecnologia de Partículas da Divisão de Química do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT) do Estado de São Paulo.

Primeiramente, o caldo fermentado contendo xilitol foi colocado em um cristalizador de 300 mL, encamisado, provido de bocais de alimentação e medição de temperatura (Figura 8), com agitador tipo hélice sob agitação de 450 rpm. Elevou-se a temperatura do caldo até 60 °C, permanecendo durante 20 minutos para completa homogeneização. O controle de temperatura foi feito por um banho termostático (modelo: RC6CP, Lauda) provido de refrigeração, operando na faixa de 10 a 60 °C. Posteriormente, a solução foi sendo resfriada e, ao atingir a temperatura de saturação (50 ou 40 °C, dependendo da cristalização em questão), adicionou-se etanol (99,7% na mesma temperatura do processo). Ajustou-se a velocidade de resfriamento linear (0,2 ou 0,4 °C/min, dependendo da cristalização em questão) e adicionou-se 200 mg de xilitol (sementes) ao sistema.



Figura 8 Cristalizador de 300 mL de capacidade total.

A temperatura de nucleação pôde ser detectada visualmente pelo surgimento de cristais e também pôde ser detectada empregando-se o “software Whintherm-plus” (version 1.01, Lauda), ao ocorrer um aumento na temperatura da solução no gráfico de temperatura em

função do tempo. O “software” utilizado registra os valores da temperatura da solução, do “set-point” e do banho termostatado, durante todo o ensaio.

Ao final de cada ensaio, a suspensão era imediatamente filtrada a vácuo, utilizando papel de filtro Whatman 42 para a retenção dos cristais. Os cristais foram lavados com etanol 99,7% e mantidos em dessecador a vácuo por 48 horas (até secagem completa) para posterior pesagem. Após a determinação da massa seca, os cristais foram caracterizados quanto à granulometria por peneiramento.

O peneiramento foi realizado em 07 peneiras de 12,6 cm (5 polegadas) de diâmetro (marca Granutest), colocadas em ordem decrescente de acordo com a diminuição da abertura da malha (Tabela 7). Os cristais ficaram 15 minutos vibrando nas peneiras. Pela diferença entre as peneiras vazias com as peneiras contendo os cristais de xilitol, determinou-se a massa retida em cada faixa de tamanho.

Tabela 7 Características das peneiras série ABNT P-EB22.

ABNT	Abertura (mm)	Tyler
25	0,71	24
30	0,59	28
40	0,42	40
50	0,297	48
60	0,25	60
80	0,177	80
140	0,106	150

4.11 MÉTODOS ANALÍTICOS

A caracterização da palha de trigo foi feita por análises químicas (teor de lignina, celulose, hemicelulose e cinzas). A caracterização dos hidrolisados (original, concentrado e tratado) foi feita pela determinação do pH e das concentrações de açúcares (xilose, glicose, arabinose) e inibidores (ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e produtos da degradação

da lignina). As fermentações foram acompanhadas por meio de retiradas periódicas de amostras para determinação das concentrações de xilose, glicose, arabinose, xilitol e ácido acético, de pH e concentração de células. A clarificação do caldo fermentado foi analisada quanto à concentração de xilose, arabinose, xilitol, fenóis totais, ácido acético, sólidos totais, sólidos solúveis (°Brix), cor e pH. A cristalização foi analisada quanto ao rendimento da cristalização e à pureza do xilitol obtido. Os resultados foram descritos na forma de gráficos e tabelas.

4.11.1 Determinação do teor da lignina

O teor de lignina foi calculado conforme metodologia descrita por Rocha (2000):

$$\% \text{ lignina} = \frac{\text{massa da lignina (g)} \times 10000}{\text{massa amostra (g)} \times \text{massa seca amostra (\%)}} \quad (\text{Eq. 11})$$

4.11.2 Determinação do teor de celulose e hemicelulose

Os teores de celulose e hemicelulose foram calculados conforme metodologia descrita por Irick et al. (1988):

$$\% \text{ celulose} = \frac{\text{glicose (g/L)} \times 50 \times 100 \times FC \times FP}{\text{massa amostra (g)} \times \text{massa seca amostra (\%)}} \quad (\text{Eq. 12})$$

Em que *FC*: fator de conversão para celulose (0,9) e *FP*: fator de perda por hidrólise para celulose (1,055).

$$\% \text{ hemicelulose} = \frac{[\text{xilose (g/L)} \times 50 + \text{arabinose (g/L)} \times 50] \times 100 \times FC \times FP}{\text{massa amostra (g)} \times \text{massa seca amostra (\%)}} \quad (\text{Eq. 13})$$

Em que *FC*: fator de conversão para hemicelulose (0,88) e *FP*: fator de perda por hidrólise para hemicelulose (1,155).

4.11.3 Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada de acordo com o método de Silva e Queiroz (2005):

$$\% \text{ cinzas} = \frac{\text{massa cinzas (g)} \times 100}{\text{massa seca amostra (\%)}} \quad (\text{Eq. 14})$$

4.11.4 Determinação da concentração celular

A avaliação do crescimento celular (células/mL) dos experimentos realizados em frascos agitados, foi feita por contagem de células em Câmara de Neubauer (1/400 mm² x 1/10 mm).

Para o preparo do inóculo e para os experimentos conduzidos em fermentadores, foi adotado o método de espectrofotometria. As concentrações celulares foram determinadas por turbidimetria em espectrofotômetro no comprimento de onda de 600 nm, correlacionando-se as absorbâncias com a massa de células (g/L) por meio de curvas de calibração correspondentes.

4.11.5 Determinação da concentração de açúcares, xilitol e de ácido acético

As concentrações dos açúcares, xilitol e do ácido acético foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), sob as seguintes condições: coluna “Bio-Rad Aminex” HPX-87H mantida a 45 °C, detector de índice de refração RID 6A; fase móvel de ácido sulfúrico 0,01 N; fluxo de 0,6 mL/min; volume da amostra injetada de 20 µL. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro “Sep Pack” C18 (Millipore).

4.11.6 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) foram determinadas por HPLC, sob as seguintes condições: coluna “Hewlett-Packard” RP18 mantida a 25 °C; detector

de ultra-violeta SPD-10A UV-VIS; fase móvel solução de acetronitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético; fluxo de 0,8 mL/min; volume da amostra injetada de 20 µL. As amostras foram previamente filtradas em membrana ME25 com 0,45 µm e D13 mm.

4.11.7 Determinação da concentração dos fenóis totais

A concentração de fenóis totais foi determinada pela quantificação da lignina Klason solúvel em meio ácido de acordo com a metodologia proposta por Rocha (2000).

Uma alíquota do hidrolisado foi alcalinizada até pH 12 pela adição de solução de hidróxido de sódio 6 M e diluída com água destilada de forma a se obter uma leitura inferior a 1 unidade de absorbância. A absorbância desta solução foi determinada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 280 nm, utilizando-se água destilada como referência. A concentração de lignina foi calculada por meio das equações 15 e 16:

$$C_{LIG} = 4,187 * 10^{-2} (A_{LIG280} - A_{PD280}) - 3,279 * 10^{-4} \quad (\text{Eq.15})$$

Em que C_{LIG} : concentração de lignina solúvel em meio ácido (g/L) e A_{LIG280} : absorbância de todos os compostos em 280 nm.

$$A_{PD280} = C_F \beta_F + C_{HMF} \beta_{HMF} \quad (\text{Eq.16})$$

Em que C_F e C_{HMF} : concentração de furfural e HMF determinadas por HPLC e β_F e β_{HMF} : coeficientes a 280 nm de furfural (146,85 L/g.cm) e HMF (114 L/g.cm).

4.11.8 Determinação da concentração de sólidos solúveis e pH

A concentração de sólidos solúveis (°Brix) foi determinada em refratômetro e o pH em pHmetro. Grau Brix é a % de sólidos solúveis em uma amostra, ou g de sólidos solúveis por 100 g de solução. O conteúdo de sólidos solúveis é o total de todas as substâncias dissolvidas em água (açúcares, sais, proteínas, ácidos, etc).

4.11.9 Determinação da cor do caldo fermentado

A determinação da cor do caldo fermentado foi realizada segundo método da Comissão Internacional para a Unificação dos Métodos de Análises Açucareiras (ICUMSA) ajustado para o caldo fermentado por Nápoles et al. (1998). Quanto mais baixo for o índice ICUMSA, mais claro ou mais branco é o produto. O pH das amostras foi ajustado para 5,0. As amostras foram filtradas em filtros Swennex, em membrana HA, em éster de celulose de 0,45 µm de poro e 13 mm de diâmetro (Millipore). Foram utilizadas as equações 17 e 18:

$$Cor\ ICUMSA = \frac{DO \times 1000}{\rho \times {}^{\circ}Brix_d / 100} \times diluição \quad (Eq.17)$$

$$\rho = 1 + \frac{{}^{\circ}Brix (200 + {}^{\circ}Brix)}{54000} \quad (Eq.18)$$

Em que ${}^{\circ}Brix$: % de sólidos solúveis na amostra original; ${}^{\circ}Brix_d$: % de sólidos solúveis na amostra diluída; DO : absorvância determinada em espectrofotômetro a 420 nm utilizando água desionizada como referência e ρ : densidade da amostra.

4.11.10 Determinação da concentração de sólidos totais

Primeiramente os cadinhos a serem utilizados foram secos em mufla elétrica a 800 °C durante 4 horas e, após resfriamento, foram pesados. Depois, 3 mL das amostras a serem analisadas foram colocados nos cadinhos. As amostras foram então submetidas à evaporação em estufa a 60 °C por dois dias e depois em estufa a 103 °C por 4 horas e pesadas até massa constante. A diferença entre a massa do cadinho e este valor encontrado correspondeu aos sólidos totais. Para o cálculo da concentração de sólidos totais, presentes nas amostras, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$ST = \frac{M_1 - M_0}{V} \times 1000 \quad (Eq.19)$$

Em que ST : sólidos totais (g/L); M_I : massa do cadinho + amostra após secagem (g); M_0 : massa do cadinho (g); V : volume da amostra (mL) e 1000: fator para expressar os resultados em g/L.

4.11.11 Determinação da pureza e formação dos cristais

A pureza dos cristais de xilitol foi determinada por calorimetria de varredura diferencial (DSC) (modelo: DSC 822, Mettler Toledo, “software Star”) e por termogravimetria (TGA) (modelo: SDTA 851, Mettler Toledo, “software Star”). Para a análise da imagem dos cristais foi utilizado um microscópio ótico (modelo: BX41, Olympus).

4.12 FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.12.1 Determinação dos parâmetros fermentativos

O fator de conversão de xilose em xilitol foi determinado pela equação 20:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_F - P_I}{S_F - S_I} \quad (\text{Eq.20})$$

Em que S_F e S_I correspondem às concentrações final e inicial de xilose; P_F e P_I correspondem às concentrações final e inicial de xilitol.

A produtividade volumétrica expressa a concentração de xilitol produzido (g/L) por tempo (h) e foi calculada pela equação 21:

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_F - P_I}{t_F - t_I} \quad (\text{Eq.21})$$

Em que, P_F e P_I correspondem às concentrações final e inicial de xilitol; t_I e t_F correspondem aos tempos inicial e final de fermentação.

A eficiência de conversão (η) expressa em %, representa a razão entre $Y_{P/S}$ calculado e o fator de conversão teórico de 0,917 g/g, calculado segundo Barbosa et al. (1988).

4.12.2 Determinação dos parâmetros da cristalização

A distribuição granulométrica ($M(L)$), o tamanho adimensional do cristal (z), o tamanho dominante dos cristais (L_D), a velocidade específica de crescimento (G) e a velocidade de nucleação (dN/dT) foram calculados segundo a modelagem matemática desenvolvida por Nývlt et al. (1985), descrita anteriormente (equações 3 a 10).

O rendimento da cristalização, expresso em %, representa a razão entre a massa cristalizada (M_c) e a massa de xilitol presente no caldo fermentado. Para o cálculo da massa de xilitol presente no caldo fermentado foi utilizada uma densidade de $1,2335 \text{ g/cm}^3$.

4.12.3 Metodologia estatística

Os dados experimentais da fermentação foram analisados estatisticamente, de acordo com planejamentos pré-estabelecidos, para verificar o nível dos efeitos dos fatores em estudo, conforme metodologia descrita por Box, Hunter e Hunter. (1978). A análise dos dados foi efetuada por meio dos programas “Statgraphics Plus” versão 4.1 e “Design-Expert” versão 5.0. Os resultados foram expressos em tabelas que mostraram a análise de variância com colunas de grau de liberdade (GL), soma quadrática (SQ), média quadrática (MQ), teste F e nível de significância (p) e por tabelas que mostraram valores de coeficientes de regressão, erro-padrão e teste t para o modelo. Também foram usadas figuras para expressar as curvas de nível do modelo matemático obtido pela utilização da metodologia estatística de superfície de resposta.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 COMPOSIÇÃO DA PALHA DE TRIGO

A Figura 9 apresenta a composição percentual da palha de trigo (com 6,67% de umidade) empregada no presente trabalho, enquanto que a Tabela 8 compara esta composição com diversas composições de palha de trigo descritas na literatura.

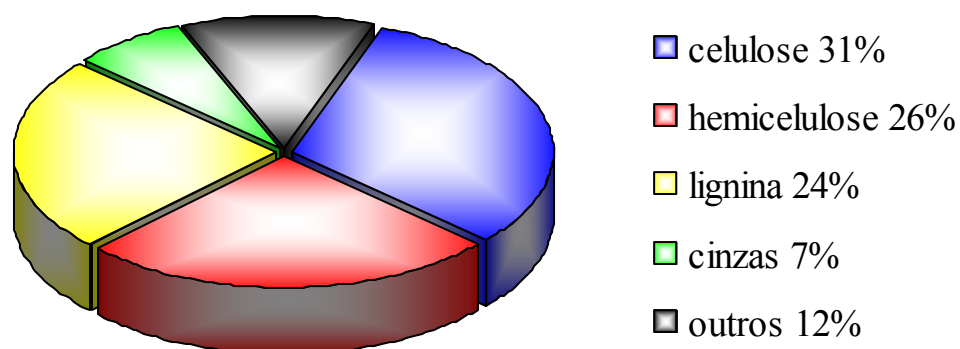


Figura 9 Composição percentual da palha de trigo.

Tabela 8 Comparação da composição da palha de trigo empregada no presente trabalho com as descritas na literatura.

Composição (% peso-seco)				Referência
Celulose	Hemicelulose	Lignina	Cinzas	
30	24	18	10	Kuhad e Singh (1993)
36	28	29	ND	Olsson e Hahn-Hägerdal (1996)
35-40	20-30	8-15	ND	Klinke et al. (2002)
35-40	25-30	10-15	ND	Thygesen et al. (2003)
31	26	24	7	presente trabalho

ND: Não determinado

Conforme pode ser observado na Tabela 8, a palha de trigo utilizada no presente trabalho apresentou composição semelhante às descritas na literatura, com 31% de celulose, 26% de hemicelulose, 24% de lignina e 7% de cinzas.

Com relação ao percentual de hemicelulose, fração de interesse no presente trabalho, o valor encontrado para a palha de trigo (26%) foi semelhante ao encontrado para o bagaço de cana (25%) (ICIDCA, 2000) e superior ao de palha de arroz (22%) (MUSSATO, 2002), e eucalipto (16%) (CANETTIERI, 2004). Observa-se que a palha de trigo apresenta um elevado teor de hemicelulose, o que a torna uma matéria-prima de interesse em processos de bioconversão.

5.2 COMPOSIÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE TRIGO

5.2.1 Hidrolisado hemicelulósico original (não concentrado)

A Tabela 9 apresenta a composição do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo obtido após hidrólise com ácido sulfúrico diluído.

Tabela 9 Composição do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo.

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	8,18
Xilose	19,50
Arabinose	3,01
Ácido acético	2,05
Furfural	0,26
Hidroximetilfurfural	0,18
Lignina Klason	1,49

Como pode ser observado na Tabela 9, a xilose foi o açúcar predominante, seguido de glicose e arabinose em quantidades decrescentes. Segundo Mussato (2002), a percentagem de

separação das pentosanas (xilose + arabinose) presentes na matéria-prima é calculada pela quantidade de palha seca e volume de solução ácida na hidrólise ácida e das concentrações de xilose e arabinose encontradas (APÊNDICE 01). Sabendo-se que a palha utilizada neste trabalho apresentou em sua constituição 26% de hemicelulose e que a hemicelulose corresponde à fração de pentosanas (xilose + arabinose) presente na matéria-prima, pode-se estimar que nas condições de hidrólise empregadas, foi alcançada uma recuperação de 86,6% das pentosanas presentes na palha de trigo.

A concentração de glicose (8,18 g/L) se mostrou bastante elevada quando comparada às de hidrolisados de palha de arroz (3,50 g/L) (MUSSATO, 2002) e bagaço de cana (1,40 g/L) (CARVALHO, 2004), obtidas em condições idênticas de hidrólise. Neste contexto, acredita-se que a elevada concentração de glicose no hidrolisado de palha de trigo se deva à presença de amido residual nesse material, fato também constatado em um outro resíduo, o bagaço de malte, com 14,9 g/L de xilose e 6,2 g/L de glicose (CARVALHEIRO et al., 2005).

Com relação aos compostos inibitórios do metabolismo microbiano, as pequenas concentrações de furfural (0,26 g/L) e HMF (0,18 g/L) indicam que as condições de hidrólise foram adequadas para extrair os açúcares contidos na fração hemicelulósica da palha de trigo, sem causar sua decomposição. Em condições idênticas de hidrólise, concentrações de furfural iguais a 0,15 g/L e 0,10 g/L e de HMF iguais a 0,03 g/L e 0,20 g/L foram obtidas em bagaço de cana (CARVALHO, 2004) e palha de arroz (MUSSATO, 2002), respectivamente.

A concentração de ácido acético resultante (2,05 g/L) é inferior à obtida após a hidrólise do bagaço de cana (2,60 g/L) (CARVALHO, 2004), porém superior à obtida após a hidrólise da palha de arroz (1,13 g/L) (MUSSATO, 2002). Com relação aos fenóis totais (1,49 g/L), o valor obtido também é inferior ao encontrado após a hidrólise do bagaço de cana (2,60 g/L) (CARVALHO, 2004).

5.2.2 Hidrolisados hemicelulósicos concentrados

O hidrolisado obtido por hidrólise ácida foi concentrado, para aumentar o teor inicial de xilose, utilizando-se fatores de concentração iguais a três, quatro e cinco vezes. A Tabela 10 apresenta a composição dos hidrolisados concentrados.

Tabela 10 Composição dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de trigo após concentração a vácuo.

Componente (g/L)	Fator de Concentração		
	3	4	5
Glicose	25,56	31,42	38,96
Xilose	61,22	78,61	96,91
Arabinose	9,51	12,33	14,74
Ac. Acético	3,06	3,18	3,37
Furfural	0,04	0,16	0,19
Hidroximetilfurfural	0,49	0,58	0,73
Lignina Klason	8,18	13,79	15,53

Comparando as Tabelas 9 e 10, observa-se que os teores dos açúcares presentes no hidrolisado original aumentaram de maneira proporcional aos fatores de concentração utilizados. Com relação aos teores dos inibidores quantificados, verificou-se um comportamento diferenciado dependendo do composto em questão. A concentração de ácido acético foi aumentada de maneira não proporcional ao fator de concentração. Segundo Rodrigues (1999), o baixo valor de pH do hidrolisado (menor que 1,0) favorece a volatilização parcial do ácido acético por esse se encontrar na sua forma não dissociada nesta condição. Portanto, pode ter ocorrido volatilização parcial deste composto nas condições empregadas. Já, a concentração de furfural foi reduzida. Esta remoção pode ter sido favorecida pelas condições de operação do processo de concentração (70 °C), uma vez que, segundo Perry (1997), o furfural apresenta ponto de ebulição de 54-55 °C. Para HMF e fenóis totais, verificaram-se aumentos progressivos nas suas concentrações após serem concentrados três, quatro e cinco vezes.

5.2.3 Hidrolisados hemicelulósicos concentrados e destoxificados

Os hidrolisados concentrados foram destoxificados, com a finalidade de reduzir a concentração dos compostos inibitórios ao metabolismo microbiano. A Tabela 11 apresenta a composição destes hidrolisados.

Tabela 11 Composição dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de trigo após concentração e destoxificação.

Componente (g/L)	Fator de Concentração		
	3	4	5
Glicose	21,20	30,70	38,11
Xilose	59,77	74,94	85,90
Arabinose	8,28	11,04	13,97
Ac. Acético	3,04	3,09	3,17
Furfural	0,004	0,005	0,04
Hidroximetilfurfural	0,009	0,02	0,04
Lignina Klason	0,83	1,40	3,45

Conforme pode ser observado na Tabela 11, o tratamento utilizado para destoxificação dos hidrolisados foi capaz de reduzir nitidamente as concentrações de inibidores presentes, exceto o ácido acético. O furfural e o HMF foram praticamente eliminados dos hidrolisados, independentemente do fator de concentração. Já os fenóis totais permaneceram em concentrações progressivamente crescentes nos hidrolisados concentrados três, quatro e cinco vezes, embora não se possa deixar de destacar uma grande redução destes compostos em relação às concentrações presentes nos hidrolisados concentrados (Tabela 10). Não foram verificadas reduções nos teores de ácido acético após a destoxificação dos hidrolisados, independentemente do fator de concentração.

Com relação à redução no teor de açúcares após a destoxificação (Tabela 11), observa-se que o hidrolisado concentrado três vezes apresentou as maiores perdas de glicose (17%) e de arabinose (13%). Em relação à xilose, a perda foi de apenas 2%, o que é favorável ao bioprocessamento porque a pentose é o substrato para a produção de xilitol. No hidrolisado

concentrado quatro vezes, foram observadas reduções nos teores de glicose, xilose e arabinose de 2%, 5% e 11%, respectivamente. Já, o hidrolisado concentrado cinco vezes apresentou reduções de 2%, 11% e 5%, respectivamente.

Tendo em vista o uso dos hidrolisados destoxificados em um processo de bioconversão de xilose em xilitol, faz-se oportuno mencionar que:

1) Concentrações de furfural e HMF entre 0,2 e 1,0 g/L não foram consideradas tóxicas para a levedura *Candida guilliermondii* (OJAMO; YLINEN; LINKO, 1988);

2) Concentrações de ácido acético menores ou iguais a 3,0 g/L não foram consideradas inibitórias para a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 (FELIPE et al., 1995);

3) Dentre os inibidores do metabolismo microbiano presentes em hidrolisados hemicelulósicos, os derivados da lignina foram considerados os de maior potencial inibitório (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998b). Existem diversos compostos diferentes entre estes derivados, cuja presença e concentração no hidrolisado dependem das condições de hidrólise e da matéria-prima utilizadas (MARTIN et al., 2002);

4) Xilose e glicose são fontes de carbono presentes nos hidrolisados hemicelulósicos. Segundo vários autores (YAHASHI et al., 1996; KIM; RYU; SEO, 1999; LEE et al., 2003), em um processo fermentativo cujo meio contém estes dois substratos, a glicose é usada como fonte de energia para o crescimento celular e como co-substrato para regeneração de cofatores enquanto que a xilose é utilizada como substrato primordial para a produção de xilitol. Porém, quanto maior for a relação glicose/xilose presente no meio, maior será a inibição causada pela glicose (FELIPE et al., 1993). Concentrações de glicose inferiores a 20 g/L em meios elaborados com xilose comercial (60 g/L) não prejudicaram os valores do fator de conversão de xilose em xilitol e produtividade em xilitol, ao final de cultivos da levedura *Candida tropicalis* (WALTHER; HENSIRISAK; AGBLEVOR, 2001). Silva (2004) relata que os melhores valores de fator de conversão e produtividade em xilitol, com a levedura *Candida*

guilliermondii, foram obtidos com a relação glicose/xilose de 1:5, em hidrolisado de bagaço de cana contendo 45 g/L de xilose.

Em relação ao hidrolisado obtido neste trabalho constata-se que as concentrações de furfural e HMF obtidas não são consideradas tóxicas para a *Candida guilliermondii* e que as concentrações de ácido acético são muito próximas da não inibitória para a levedura. Já, a concentração dos fenóis totais aumentou com o aumento do fator de concentração utilizado, destacando que o hidrolisado concentrado três vezes apresentou o menor teor destes inibidores do metabolismo microbiano. A relação glicose/xilose também aumentou com o aumento do fator de concentração utilizado, destacando que estas relações não são consideradas inibitórias na bioconversão xilose-xilitol.

5.3 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE TRIGO EM FRASCOS ERLLENMEYER (EF)

5.3.1 Identificação dos principais fatores que influenciam a produção de xilitol

Nesta etapa, a bioconversão de xilose em xilitol foi realizada em frascos Erlenmeyer (EF), variando-se as condições de cultivo: concentração de nutrientes (*sulfato de amônio, cloreto de cálcio e farelo de arroz*), *pH inicial do meio de fermentação* e *fator de concentração do hidrolisado* (ou concentração inicial de xilose). Foi realizado um planejamento fatorial 2^{5-1} em face centrada com três repetições do ponto central a fim de identificar os fatores que influenciam os parâmetros fermentativos concentração final de xilitol (P), produtividade volumétrica em xilitol (Q_p) e fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{p/s}$). Considerando-se que quanto maior foi o tempo de fermentação menor foi a produtividade e o fator de conversão em xilitol, que os dados obtidos em diferentes tempos de fermentação poderia afetar as conclusões dos experimentos e que as maiores concentrações de

xilitol foram obtidas em 72 horas de fermentação, decidiu-se por usar nas análises estatísticas apenas os dados obtidos nesse tempo. A Tabela 12 apresenta os valores dos parâmetros fermentativos obtidos em 72 horas de fermentação, utilizando-se as diferentes condições de cultivo correspondentes ao planejamento em questão.

Tabela 12 Parâmetros fermentativos determinados em 72 horas de fermentação.

Ensaio	P (g/L)	Q _P (g/L.h)	Y _{P/S} (%)
01	0,0	0,00	0,00
02	6,1	0,09	0,23
03	7,5	0,10	0,25
04	1,2	0,02	0,13
05	3,0	0,04	0,11
06	1,8	0,03	0,13
07	1,3	0,02	0,13
08	2,8	0,04	0,10
09	22,5	0,31	0,45
10	2,9	0,04	0,10
11	2,3	0,03	0,08
12	21,0	0,29	0,50
13	2,8	0,04	0,12
14	3,6	0,05	0,12
15	7,0	0,10	0,19
16	2,5	0,04	0,12
17	2,5	0,04	0,10
18	2,8	0,04	0,12
19	3,6	0,05	0,14
20	2,7	0,04	0,10
21	2,4	0,03	0,09
22	2,5	0,04	0,11
23	2,5	0,04	0,09
24	2,0	0,03	0,09
25	5,8	0,08	0,12
26	2,9	0,04	0,22
27	4,9	0,07	0,15
28	2,7	0,04	0,09
29	2,4	0,03	0,13

Conforme pode ser observado na Tabela 12, a combinação dos níveis de variáveis independentes (condições de cultivo) provocou grandes mudanças no comportamento da levedura *C. guilliermondii*. Os maiores valores de xilitol (22,5 e 21,0 g/L), produtividade volumétrica (0,31 e 0,29 g/L.h) e fator de conversão em xilitol (0,45 e 0,50 g/g), correspondentes à uma eficiência de conversão de 49,07% e 54,53%, foram encontrados nos ensaios 09 e 12, respectivamente, em que foram utilizados menores níveis de farelo de arroz (5,0 g/L) e concentração do hidrolisado (igual a 3) e maior nível de pH de fermentação (6,0).

Pela metodologia de planejamento de experimentos, foram quantificados os efeitos principais e de interações entre dois fatores que influenciam os parâmetros fermentativos P , Q_P e $Y_{P/S}$. As Tabelas 13, 14 e 15 apresentam as análises de variância utilizadas para verificar o nível de significância estatística dos efeitos determinados sobre a concentração de xilitol (P), a produtividade volumétrica em xilitol (Q_P) e o fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$), apenas com as variáveis independentes e interações significativas. Os efeitos que apresentaram níveis de significância desprovidos de significado estatístico ($p \geq 0,10$) foram excluídos previamente da análise de variância.

Tabela 13 Análise de variância para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais e interações sobre a concentração de xilitol.

Efeitos	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F_{calc}	Nível de significância (p)
Fator C	67,6672	01	67,6672	9,85	0,0048*
Fator D	102,245	01	102,245	14,88	0,0009*
Fator E	193,389	01	193,389	28,14	0,0000*
CD	45,2256	01	45,2256	6,58	0,0176*
CE	113,956	01	113,956	16,58	0,0005*
DE	50,7656	01	50,7656	7,39	0,0126*
Erro total	151,166	22	6,8712		
Total	724,414	28			

C - farelo de arroz, D - pH inicial, E - fator de concentração

$R^2 = 0,791326$

*Significativo ao nível de 10 % de probabilidade ($p \leq 0,10$)

Tabela 14 Análise de variância para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais e interações sobre a produtividade volumétrica em xilitol.

Efeitos	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calc}	Nível de significância (p)
Fator C	0,0122722	01	0,0122722	9,83	0,0048*
Fator D	0,0193389	01	0,0193389	15,49	0,0007*
Fator E	0,03645	01	0,03645	29,19	0,0000*
CD	0,0081	01	0,0081	6,49	0,0184*
CE	0,0225	01	0,0225	18,02	0,0003*
DE	0,01	01	0,01	8,01	0,0097*
Erro total	0,0274699	22	0,00124863		
Total	0,136131	28			

C - farelo de arroz, D - pH inicial, E - fator de concentração R²= 0,798210

*Significativo ao nível de 10 % de probabilidade ($p \leq 0,10$)

Tabela 15 Análise de variância para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais e interações sobre o fator de conversão de xilose em xilitol.

Efeitos	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calc}	Nível de significância (p)
Fator C	0,0168056	01	0,0168056	5,45	0,0292*
Fator D	0,0249389	01	0,0249389	8,08	0,0095*
Fator E	0,0854222	01	0,0854222	27,68	0,0000*
CD	0,0196	01	0,0196	6,35	0,0195*
CE	0,093025	01	0,093025	30,14	0,0000*
DE	0,011025	01	0,011025	3,57	0,0720*
Erro total	0,0679006	22	0,00308639		
Total	0,318717	28			

C - farelo de arroz, D - pH inicial, E - fator de concentração R²= 0,786957

*Significativo ao nível de 10 % de probabilidade ($p \leq 0,10$)

Verifica-se nas Tabelas 13, 14 e 15 que o farelo de arroz (C), o pH inicial de fermentação (D) e o fator de concentração do hidrolisado (E), bem como as interações entre farelo de arroz e pH (CD), farelo de arroz e concentração do hidrolisado (CE), pH e concentração do hidrolisado (DE), influenciaram significativamente os três parâmetros fermentativos do processo em estudo.

De uma maneira geral, pode-se constatar que as concentrações de sulfato de amônio (A) e cloreto de cálcio (B) não afetaram a concentração de xilitol, sua produtividade volumétrica e o fator de conversão de xilose em xilitol, tanto como efeito principal quanto as interações em que estas variáveis estavam envolvidas, diferentemente das variáveis C, D e E, cujo efeito principal tanto quanto suas interações são significativas (Tabelas 13, 14 e 15).

A Figura 11 apresenta os valores preditos para concentração de xilitol (a), produtividade volumétrica (b) e fator de conversão em xilitol (c) em função da concentração de farelo de arroz e do pH inicial do meio de fermentação.

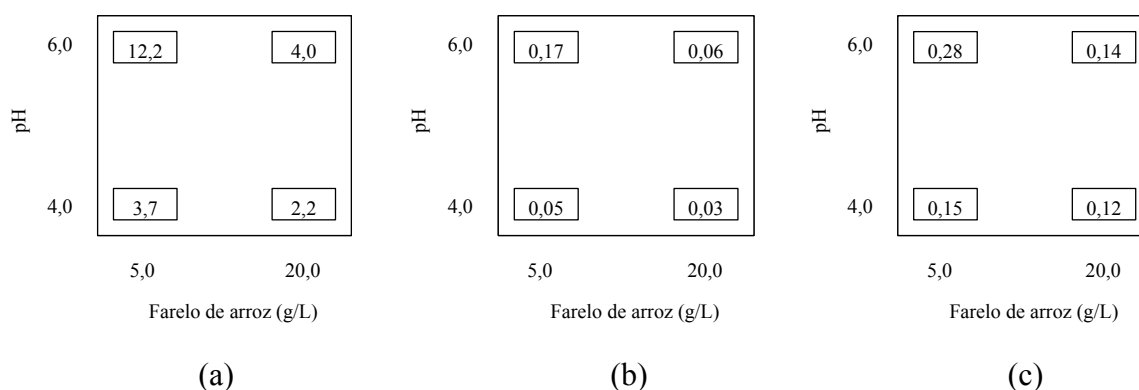


Figura 11 Valores preditos para a concentração final de xilitol (a), produtividade volumétrica (b) e fator de conversão em xilitol (c) em função da concentração de farelo de arroz e do pH inicial de fermentação.

Conforme pode ser observado na Figura 11, a maior concentração de xilitol (12,2 g/L), produtividade volumétrica (0,17 g/L.h) e o maior fator de conversão em xilitol (0,28 g/g) foram obtidos quando se utilizou o nível superior de pH (6,0) e inferior de concentração de farelo de arroz (5,0 g/L). Quando se utilizou concentração de farelo de arroz de 20,0 g/L, a mesma elevação no pH levou a um pequeno aumento nos três parâmetros fermentativos. Por outro lado, a concentração de farelo de arroz de 5,0 g/L e a elevação do pH de 4,0 para 6,0 favoreceram a formação de xilitol, resultando em aumentos de 230, 240 e 87% na

concentração de xilitol, na produtividade volumétrica e no fator de conversão em xilitol, respectivamente.

A Figura 12 apresenta valores preditos para concentração de xilitol (a), produtividade volumétrica (b) e fator de conversão em xilitol (c), em função da concentração de farelo de arroz e do fator de concentração do hidrolisado.

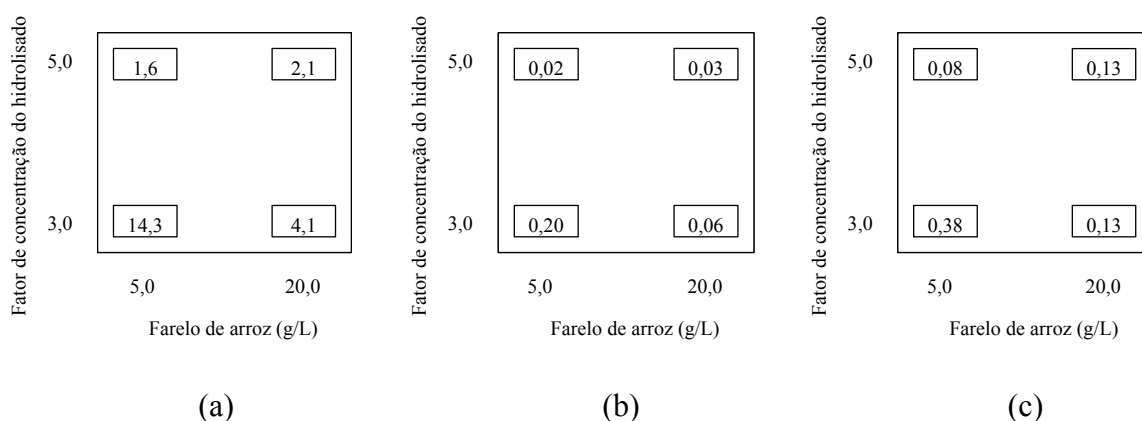


Figura 12 Valores preditos para a concentração final de xilitol (a), produtividade volumétrica (b) e fator de conversão em xilitol (c) em função da concentração de farelo de arroz e do fator de concentração do hidrolisado.

Conforme pode ser observado na Figura 12, a maior concentração de xilitol (14,3 g/L), produtividade volumétrica (0,20 g/L.h) e o maior fator de conversão em xilitol (0,38 g/g) foram obtidos quando se utilizou os níveis inferiores de fator de concentração do hidrolisado (3,0) e de concentração de farelo de arroz (5,0 g/L). Quando se utilizou concentração de farelo de arroz de 20,0 g/L, a elevação do fator de concentração do hidrolisado de 3,0 para 5,0 levou a um decréscimo na concentração de xilitol e na produtividade volumétrica, porém o fator de conversão em xilitol permaneceu constante. Por outro lado, a concentração de farelo de arroz de 5,0 g/L e a elevação do pH de 4,0 para 6,0 desfavoreceram a formação de xilitol em 89, 90 e 79% na sua concentração, na produtividade volumétrica e no fator de conversão, respectivamente.

A Figura 13 apresenta valores preditos para concentração de xilitol (a), produtividade volumétrica (b) e fator de conversão em xilitol (c), em função do fator de concentração do hidrolisado e do pH inicial do meio de fermentação.

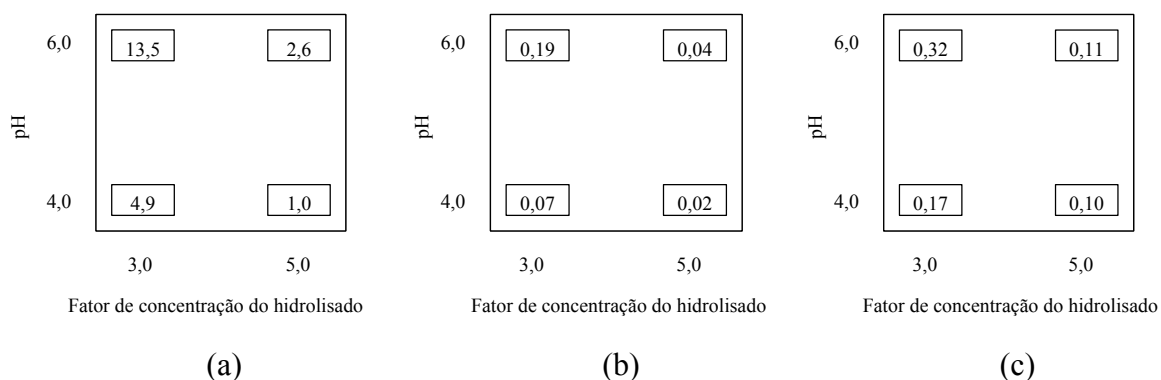


Figura 13 Valores preditos para a concentração final de xilitol (a), produtividade (b) e fator de conversão (c) em função do fator de concentração do hidrolisado e do pH inicial de fermentação.

Conforme pode ser observado na Figura 13, a maior concentração de xilitol (13,5 g/L), produtividade volumétrica (0,19 g/L.h) e o maior fator de conversão em xilitol (0,32 g/g) foram obtidos quando se utilizou o nível inferior de fator de concentração do hidrolisado (3,0) e superior de pH inicial de fermentação (6,0). Quando se utilizou fator de concentração de 5,0, a elevação do pH de 4,0 para 6,0 praticamente não influenciou nos parâmetros fermentativos. Por outro lado, o fator de concentração de 3,0 e a elevação do pH de 4,0 para 6,0 favoreceram a formação de xilitol, resultando em aumentos de 176, 171 e 88% na concentração de xilitol, na produtividade volumétrica e no fator de conversão em xilitol, respectivamente.

O aumento do pH inicial do meio de fermentação ajudou a reduzir os efeitos negativos causados pelos inibidores presentes nos hidrolisados concentrados. Os melhores resultados encontrados utilizando-se o maior valor de pH inicial de fermentação (6,0) (Figuras 11 e 13), podem ser explicados pela presença dos ácidos fracos no hidrolisado, como o ácido acético, concordando com o informado na literatura (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). O

efeito inibitório deste ácido é dependente do seu grau de dissociação. Em baixos valores de pH, as moléculas não dissociadas, que são maioria, difundem-se através da membrana citoplasmática, determinando decréscimos no pH intracelular além dos limites fisiológicos, inibindo a atividade da célula até sua morte (LOHMEIER-VOGEL; SOPHER; LEE, 1998). Em elevados valores de pH (6,0), o número de moléculas não dissociadas é reduzido, minimizando o efeito inibitório na bioconversão de xilose a xilitol. Efeito similar determinado pelo pH inicial de fermentação também foi observado ao se cultivar a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar (CARVALHO et al., 2004b).

Um outro fator a ser analisado e também de grande influência na produção de xilitol é a concentração do hidrolisado (Figuras 12 e 13). Os melhores resultados obtidos com a menor concentração do hidrolisado (3,0) podem ser explicados pela baixa concentração de compostos inibitórios presentes neste hidrolisado após a destoxificação. Como pôde ser observado na Tabela 10, o hidrolisado concentrado três vezes apresentou menor concentração de fenóis totais que o hidrolisado concentrado cinco vezes. Sabe-se que este grupo de compostos pode inibir fortemente a bioconversão, destruindo a integridade da membrana e afetando as suas propriedades, como a de barreira seletiva (HEIPIEPER et al., 1994). Também é preciso destacar a alta concentração de glicose no hidrolisado concentrado cinco vezes (38,11 g/L) (Tabela 10), que pode ter contribuído para as baixas bioconversões encontradas. Tal fato já foi observado por Walther, Hensirisak e Agblevor (2001), cultivando a levedura *Candida tropicalis* em meios sintéticos compostos de glicose e xilose e por Silva (2004), com a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado de bagaço de cana, que constatou que a relação glicose/xilose interfere neste bioprocessos.

A suplementação do hidrolisado com nutrientes para a elaboração do meio de fermentação, depende do tipo de matéria-prima da qual o hidrolisado é obtido. Como

exemplo, a suplementação com sulfato de amônio, cloreto de cálcio e farelo de arroz do hidrolisado de palha de arroz se mostrou, além de desnecessária, prejudicial à bioconversão de xilose em xilitol pela levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 (SILVA; ROBERTO, 1999). Entretanto, foi necessária a suplementação do hidrolisado de eucalipto com sulfato de amônio e farelo de arroz, para a bioconversão de xilose em xilitol pela mesma levedura (CANETTIERI; ALMEIDA E SILVA; FELIPE, 2002). Embora não essencial para a bioconversão de xilose em xilitol, a suplementação com estes mesmos nutrientes proporcionou melhor desempenho dessa levedura para bioconversão no hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (CARVALHO, 2004). No presente trabalho, os melhores resultados de concentração final de xilitol, produtividade volumétrica e fator de conversão de xilose em xilitol foram obtidos no hidrolisado de palha de trigo suplementado com a menor quantidade de farelo de arroz (5,0 g/L) (Figuras 11 e 12). Através das análises estatísticas também foi demonstrado que tanto o sulfato de amônio quanto o cloreto de cálcio não influenciaram a bioconversão de xilose em xilitol em seus menores níveis (1,0 e 0 g/L, respectivamente).

5.3.2 *Elaboração de modelos matemáticos para predição da produção de xilitol em frascos Erlenmeyer*

Os valores da concentração de xilitol, da produtividade volumétrica e do fator de conversão em xilitol obtidos (Tabela 12) foram ajustados a modelos lineares. As Tabelas 16, 17 e 18 correspondem às análises de variância utilizadas para determinar as significâncias estatísticas desses modelos em predizer os valores da concentração de xilitol, da produtividade e do fator de conversão no sistema em estudo.

Tabela 16 Análise de variância para verificar as significâncias estatísticas do modelo linear em prever os valores da concentração de xilitol.

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calc}	Nível de significância (p)
Modelo	573,248	06	95,5413	13,90	0,0000
Resíduo	151,166	22	6,8712		
Total	724,414	28			

$R^2 = 0,79$

Tabela 17 Análise de variância para verificar as significâncias estatísticas do modelo linear em prever os valores da produtividade volumétrica em xilitol.

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calc}	Nível de significância (p)
Modelo	0,108661	06	0,0181102	14,50	0,0000
Resíduo	0,0274699	22	0,00124863		
Total	0,136131	28			

$R^2 = 0,79$

Tabela 18 Análise de variância para verificar as significâncias estatísticas do modelo linear em prever os valores do fator de conversão de xilose em xilitol.

Fonte	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calc}	Nível de significância (p)
Modelo	0,250817	06	0,0418028	13,54	0,0000
Resíduo	0,0679006	22	0,00308639		
Total	0,318717	28			

$R^2 = 0,79$

Conforme pode ser observado nas Tabelas 16, 17 e 18, os modelos lineares apresentaram elevadas significâncias estatísticas ($p < 0,01$) e boas capacidades de predição (0,79), conseguindo explicar 79% da variação total. As Tabelas 19, 20 e 21 apresentam os valores dos coeficientes de regressão mantidos nos modelos, bem como seus respectivos níveis de significância (p).

Tabela 19 Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da concentração de xilitol, bem como seus respectivos níveis de significância.

Fator	Coefficiente	Erro-padrão	t_{calc}	p
Constante	4,41379	0,486763	9,06765	0,0000
Fator C	-1,93889	0,617846	-3,13814	0,0048
Fator D	2,38333	0,617846	3,85749	0,0009
Fator E	-3,27778	0,617846	-5,30517	0,0000
CD	-1,68125	0,655325	-2,56552	0,0176
CE	2,66875	0,655325	4,07241	0,0005
DE	-1,78125	0,655325	-2,71812	0,0126

C - farelo de arroz, D - pH inicial, E - fator de concentração

Tabela 20 Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da produtividade volumétrica em xilitol, bem como seus respectivos níveis de significância.

Fator	Coefficiente	Erro-padrão	t_{calc}	p
Constante	0,0624138	0,00656173	9,51179	0,0000
Fator C	-0,0261111	0,00832878	-3,13505	0,0048
Fator D	0,0327778	0,00832878	3,93549	0,0007
Fator E	-0,045	0,00832878	-5,40296	0,0000
CD	-0,0225	0,008834	-2,54698	0,0184
CE	0,0375	0,008834	4,24496	0,0003
DE	-0,025	0,008834	-2,82998	0,0097

C - farelo de arroz, D - pH inicial, E - fator de concentração

Tabela 21 Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição do fator de conversão, bem como seus respectivos níveis de significância.

Fator	Coefficiente	Erro-padrão	t_{calc}	P
Constante	0,144483	0,0103164	14,0052	0,0000
Fator C	-0,0305556	0,0130945	-2,33346	0,0292
Fator D	0,0372222	0,0130945	2,84258	0,0095
Fator E	-0,0688889	0,0130945	-5,2609	0,0000
CD	-0,035	0,0138888	-2,52001	0,0195
CE	0,07625	0,0138888	5,49003	0,0000
DE	-0,02625	0,0138888	-1,89001	0,0720

C - farelo de arroz, D - pH inicial, E - fator de concentração

De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 19, 20 e 21, os modelos propostos para as predições dos valores da concentração de xilitol, da produtividade e do fator de conversão no processo em estudo foram definidos de acordo com as equações abaixo:

$$P = 4,41379 - 1,93889 C + 2,38333 D - 3,27778 E - 1,68125 CD + 2,66875 CE - 1,78125 DE \quad (\text{Eq. 22})$$

$$Q_P = 0,0624138 - 0,0261111 C + 0,0327778 D - 0,045 E - 0,0225 CD + 0,0375 CE - 0,025 DE \quad (\text{Eq. 23})$$

$$Y_{P/S} = 0,144483 - 0,0305556 C + 0,0372222 D - 0,0688889 E - 0,035 CD + 0,07625 CE - 0,02625 DE \quad (\text{Eq. 24})$$

Em que, P representa a concentração de xilitol, Q_P a produtividade volumétrica e $Y_{P/S}$ o fator de conversão de xilose em xilitol, em função dos níveis codificados das variáveis independentes: concentração de farelo de arroz (C), pH inicial de fermentação (D) e fator de concentração do hidrolisado (E).

Para a elaboração das superfícies de respostas em função do pH inicial de fermentação (D) e do fator de concentração do hidrolisado (E), foi fixada a concentração de farelo de arroz (C) no seu nível inferior (-1) nas equações acima. As equações reduzidas dos modelos propostos para as predições dos valores da concentração de xilitol, produtividade e fator de conversão no sistema em estudo, foram as seguintes:

$$P = 6,35268 + 4,06458 D - 5,94653 E - 1,78125 DE \quad (\text{Eq. 25})$$

$$Q_P = 0,0885249 + 0,0552778 D - 0,0825 E - 0,025 DE \quad (\text{Eq. 26})$$

$$Y_{P/S} = 0,175039 + 0,0722222 D - 0,1451389 E - 0,02625 DE \quad (\text{Eq. 27})$$

Em que, P representa a concentração de xilitol, Q_P a produtividade volumétrica e $Y_{P/S}$ o fator de conversão de xilose em xilitol, em função dos níveis codificados das variáveis independentes: pH inicial de fermentação (D) e fator de concentração do hidrolisado (E).

As superfícies de respostas descritas por estas equações são apresentadas nas Figuras 14, 15 e 16, onde os melhores valores para os três parâmetros são obtidos na região experimental demarcada de marrom escuro.

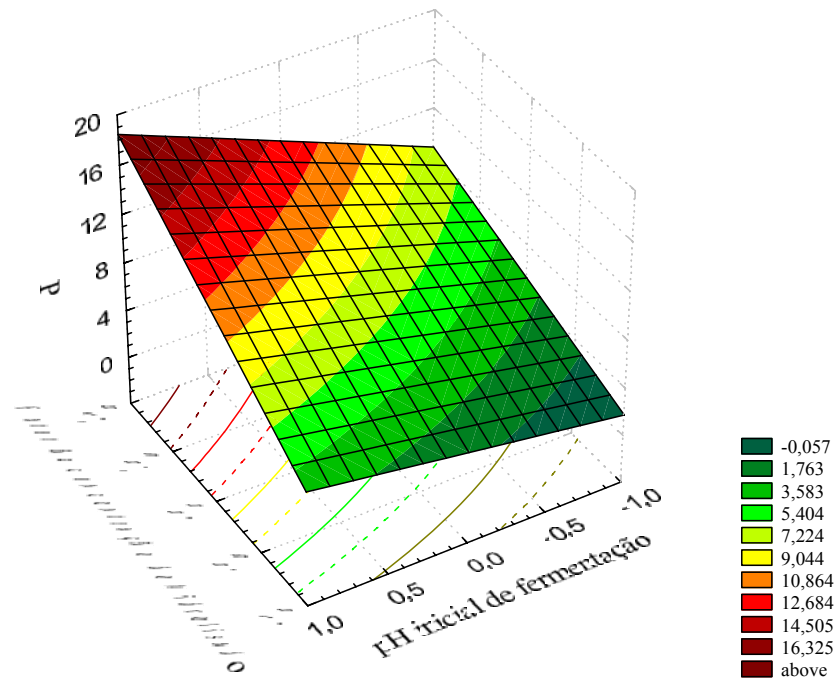


Figura 14 Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona o fator de concentração do hidrolisado com o pH inicial de fermentação, representando a concentração de xilitol no sistema em estudo.

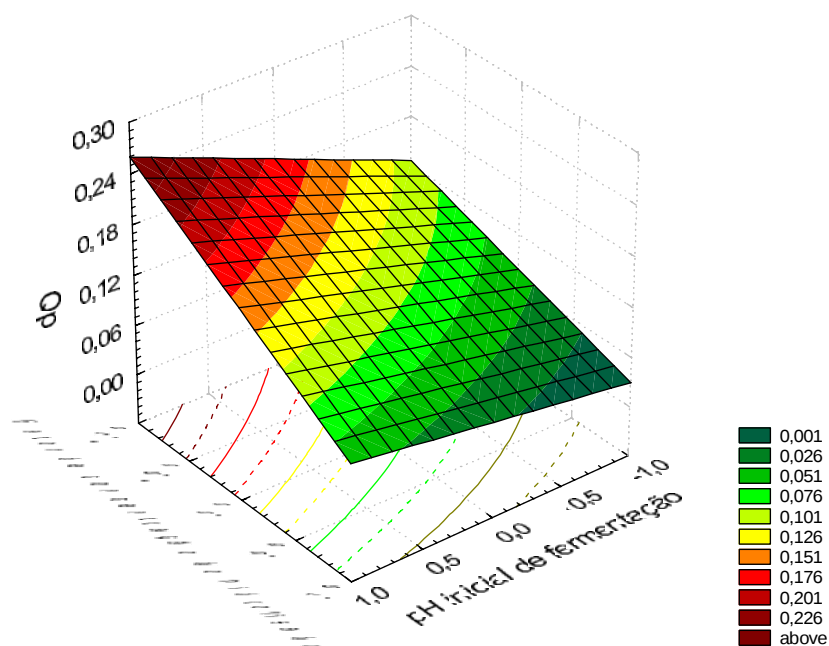


Figura 15 Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona o fator de concentração do hidrolisado com o pH inicial de fermentação, representando a produtividade volumétrica em xilitol no sistema em estudo.

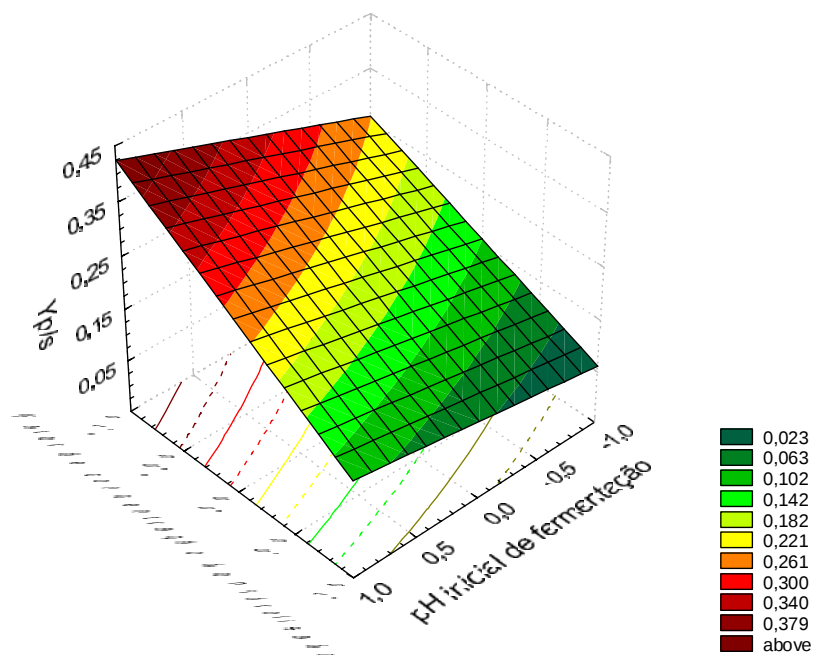


Figura 16 Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona o fator de concentração do hidrolisado com o pH inicial de fermentação, representando o fator de conversão de xilose em xilitol no sistema em estudo.

Conforme pode ser observado nas Figuras 14, 15 e 16, a concentração de xilitol, a produtividade e o fator de conversão podem ser aumentados à medida que se aumenta o valor do pH inicial da fermentação e diminui-se o valor do fator de concentração do hidrolisado. A máxima concentração de xilitol, produtividade volumétrica em xilitol e o máximo fator de conversão de xilose em xilitol foram obtidos quando o pH inicial da fermentação foi 6,0 (nível superior) e fator de concentração do hidrolisado foi 3,0 (nível inferior). A concentração de farelo de arroz já havia sido fixada em 5,0 g/L (nível inferior) e as variáveis concentração de sulfato de amônio e cloreto de cálcio, que não influenciaram a produção de xilitol com seus menores valores, também haviam sido fixadas em 1,0 g/L e 0 g/L, respectivamente (níveis inferiores).

5.3.3 *Comprovação dos modelos propostos*

Com a substituição dos valores codificados das variáveis independentes estudadas, fator de concentração do hidrolisado (-1) e pH inicial de fermentação (+1), nas equações 25, 26 e 27, valores de concentração de xilitol, produtividade e fator de conversão iguais a 18,15 g/L, 0,25 g/L.h e 0,42 g/g, respectivamente, foram preditos pelos modelos propostos, no tempo de 72 horas de fermentação. Os intervalos de confiança das predições foram valores entre 11,74 e 24,55 g/L para a concentração de xilitol, entre 0,16 e 0,34 g/L.h para a produtividade volumétrica e entre 0,28 e 0,55 g/g para o fator de conversão em xilitol.

Para validação dos modelos propostos e finalizar as análises estatísticas dos dados obtidos, foi realizado um ensaio fermentativo nas melhores condições de cultivo determinadas pelos modelos: 1,0 g/L de concentração de sulfato de amônio, sem adição de cloreto de cálcio, 5,0 g/L de concentração de farelo de arroz, fator de concentração do hidrolisado igual a 3 e pH inicial de fermentação igual a 6,0. A concentração inicial de células nos frascos foi de 0,5 g/L.

Em 72 horas de fermentação, foram obtidos 24,17 g/L de xilitol, com produtividade volumétrica de 0,34 g/L.h e fator de conversão de 0,48 g/g, resultados que se encontram dentro dos intervalos de confiança otimizados pelos valores estimados, indicando que os modelos podem representar matematicamente as variáveis dependentes estudadas. A Figura 17 mostra o consumo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, produção de xilitol e células, observados durante as 72 horas de fermentação.

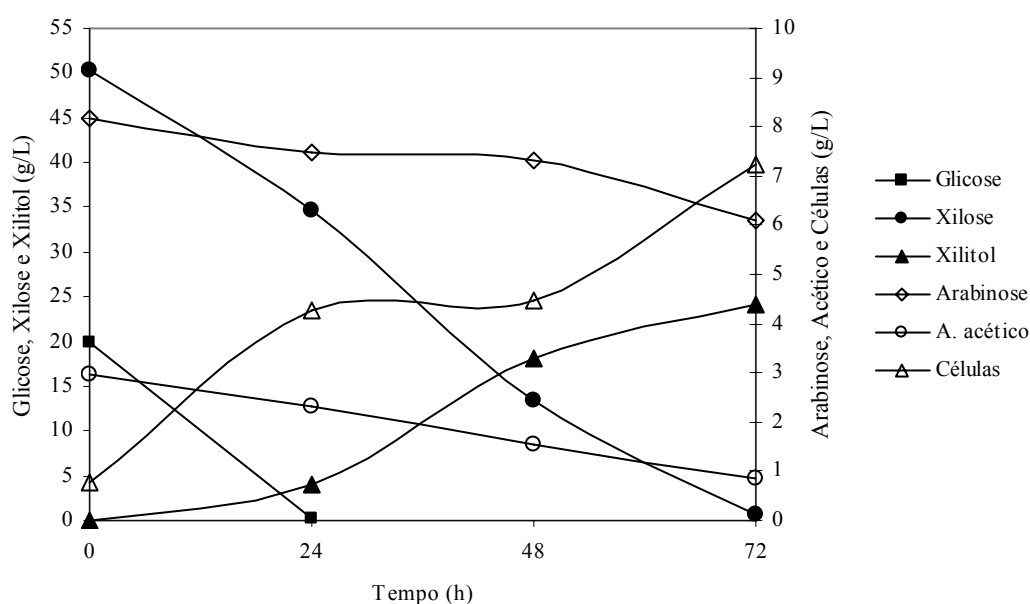


Figura 17 Consumo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, produção de xilitol e células, durante a fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *C. guilliermondii* FTI 20037, para comprovação dos modelos empíricos elaborados.

Observa-se na Figura 17 que a xilose foi continuamente assimilada pela levedura durante as 72 horas de fermentação. Já a glicose presente no hidrolisado foi consumida nas primeiras 24 horas. Comportamento semelhante foi constatado nas fermentações dos hidrolisados de bagaço de cana-de-açúcar (MARTINEZ; SILVA; FELIPE, 2000), de palha de arroz (MUSSATO, 2002), de eucalipto (FELIPE et al., 1996) e de palha de trigo (CANILHA, 2002), com a mesma levedura. Nestas primeiras 24 horas de fermentação, observa-se um consumo de 31% da xilose pela levedura, em relação a sua concentração inicial. Portanto,

pode ter ocorrido um consumo simultâneo destes dois açúcares neste período, fato já observado na fermentação do hidrolisado de bagaço de malte, utilizando *Debaryomyces hansenii* (CARVALHEIRO et al., 2005), do hidrolisado de madeira de álamo por *C. guilliermondii* (PREZIOSI-BELLOU; NOLLEAU; NAVARRO, 2000) e do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, também por *C. guilliermondii* (SILVA, 2004).

A arabinose e o ácido acético, presentes no meio, também foram assimilados pela levedura (25% e 72%, respectivamente). A assimilação do ácido acético pela levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 também foi observada por outros autores, em hidrolisados de bagaço de cana (ALVES et al., 1998; MARTON, 2002), eucalipto (GINORIS, 2001) e palha de trigo (CANILHA, 2002). Uma pequena assimilação de arabinose na presença de xilose também foi constatada em fermentações conduzidas com *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado de bagaço de cana (SILVA, 2001) e em palha de trigo (CANILHA, 2002). Segundo Walther, Hensirisak e Agblevor (2001) o consumo desta pentose induz a atividade da enzima xilose redutase e como consequência estimula o fator de conversão e a produtividade em xilitol. Carvalho et al. (2005), cultivando *Debaryomyces hansenii* em hidrolisado de bagaço de malte, também observaram o consumo de arabinose e de ácido acético em sua fermentação.

A levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 foi capaz de produzir xilitol a partir da xilose presente no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo observando-se a maior concentração celular (7,24 g/L) em 72 horas de fermentação. Observa-se ainda um rápido crescimento celular nas primeiras 24 horas, possivelmente pelo consumo inicial de glicose presente no hidrolisado. Já, entre 24 e 48 horas, observa-se uma fase em que parece não haver crescimento celular, simultaneamente, onde ocorre um aumento na produção de xilitol.

5.3.3.1 Efeito da concentração de carvão ativo no tratamento do hidrolisado

Conforme descrito na metodologia (item 4.5), o meio de fermentação utilizado nas fermentações em frascos Erlenmeyer para identificar os fatores que influenciam a produção de xilitol e na comprovação dos modelos matemáticos obtidos, foi preparado com hidrolisados concentrados e submetidos ao tratamento descrito por Alves et al. (1998). Os experimentos até então realizados utilizaram um hidrolisado tratado com a adição de 10% de carvão ativo. Foi então realizado um ensaio com a adição de 2,5% de carvão ativo, para comparação. Os resultados obtidos foram comparados com o ensaio anterior (item 5.3.3) em que o hidrolisado foi tratado com 10% de carvão ativo. A Tabela 22 apresenta os valores dos parâmetros fermentativos obtidos durante a fermentação, em hidrolisados tratados com 2,5 e com 10% de carvão ativo.

Tabela 22 Valores de concentração de xilitol (P), produtividade volumétrica (Q_P) e fator de conversão em xilitol ($Y_{P/S}$) obtidos em hidrolisados de palha de trigo tratados com 2,5 e com 10% de carvão ativo.

Variáveis dependentes	Quantidade de carvão adicionada	
	2,5%	10%
P (g/L)	28,60	24,17
Q_P (g/L.h)	0,40	0,34
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,54	0,48

Conforme pode ser observado na Tabela 22, a redução da concentração de carvão utilizado no tratamento do hidrolisado de palha de trigo resultou em pequenos aumentos nos valores de concentração de xilitol, produtividade volumétrica e fator de conversão de xilose em xilitol, e conseqüentemente, na eficiência da bioconversão (de 52,35% para 58,89%).

Os resultados do presente trabalho coincidem com a observação de Marton (2002), no tratamento do hidrolisado de bagaço de cana com carvão de diferentes marcas para a produção de xilitol com *C. guilliermondii* FTI 20037, que indicaram que a variação da concentração de carvão não apresentou efeito significativo em relação à produtividade

volumétrica em xilitol. Portanto, optou-se pelo tratamento com a adição de 2,5% de carvão, pela melhora nos resultados das fermentações e por ser mais econômico.

5.3.3.2 Efeito da composição do meio para preparo do inóculo (glicose e xilose ou somente glicose)

Até o presente momento, e conforme descrito na metodologia (item 4.6), a levedura foi cultivada em frascos Erlenmeyer com meio semi-sintético contendo (g/L): 30,0 de D-xilose, 7,0 de glicose, 2,0 de sulfato de amônio, 0,1 de cloreto de cálcio e 20,0 de farelo de arroz. Foi então realizado um ensaio com o inóculo obtido do cultivo da levedura em meio contendo apenas glicose (37 g/L) como fonte de carbono, ou seja, sem a presença de xilose, para comparação. Os resultados obtidos foram comparados com o ensaio anterior (item 5.3.3.1) em que o meio continha glicose e xilose. A Tabela 23 apresenta os valores dos parâmetros fermentativos obtidos durante a fermentação, com a levedura cultivada na presença de glicose e xilose ou apenas na presença de glicose.

Tabela 23 Valores de concentração de xilitol (P), produtividade volumétrica (Q_p) e fator de conversão em xilitol ($Y_{p/s}$) obtidos nas fermentações utilizando inóculos obtidos de células cultivadas em glicose e xilose ou somente em glicose como fonte de carbono.

Variáveis dependentes	Meio semi-sintético	
	Cultivo em glicose/xilose	Cultivo em glicose
P (g/L)	28,60	30,50
Q_p (g/L.h)	0,40	0,42
$Y_{p/s}$ (g/g)	0,54	0,59

Conforme pode ser observado na Tabela 23, maiores valores de concentração de xilitol, produtividade volumétrica e fator de conversão em xilitol (30,50 g/L, 0,42 g/L.h e 0,59 g/g, respectivamente), correspondente a uma eficiência de bioconversão de 64,34%,

foram obtidos quando se utilizou apenas glicose como fonte de carbono no meio de obtenção do inóculo.

Pfeifer et al. (1996), avaliando diferentes tipos de meio de cultura para o crescimento da levedura *C. guilliermondii* e obtenção do inóculo, verificaram que a formação de xilitol foi extremamente afetada pela fonte de carbono utilizada no cultivo das células. Estes autores puderam observar que a maior concentração de xilitol (16,40 g/L) e o maior fator de conversão (0,57 g de xilitol/g de xilose) foram obtidos utilizando-se um inóculo obtido de células cultivadas somente em glicose. Segundo estes autores, ao se utilizar apenas xilose como meio para o crescimento celular, ocorreu a utilização de xilitol para regeneração do cofator NADPH, que por sua vez, foi utilizado na primeira etapa do metabolismo da xilose. Já a maior produtividade volumétrica (0,53 g/L.h) foi encontrada quando a levedura cresceu no meio com xilose e glicose.

Silva (2004) também estudou a influência da relação glicose/xilose durante o cultivo do inóculo e observou que a máxima concentração de xilitol (27,8 g/L) foi obtida com o inóculo cultivado em meio contendo glicose como única fonte de carbono.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo e baseado nos resultados obtidos por Pfeifer et al. (1996) e Silva (2004), pode ser constatado que não é necessária a adição de xilose ao meio de cultivo, para a obtenção das células a serem empregadas como inóculo, ao utilizar hidrolisado de palha de trigo como fonte de xilose para a produção de xilitol. Em resumo, após a definição das condições adequadas de fermentação, do tratamento do hidrolisado e da fonte de carbono a ser utilizada no cultivo das células para a obtenção do inóculo, os resultados obtidos em frascos Erlenmeyer foram os seguintes: $P = 30,5$ g/L (concentração final de xilitol), $Q_P = 0,42$ g/L.h (produtividade volumétrica em xilitol), $Y_{P/S} = 0,59$ g/g (fator de conversão de xilose em xilitol) e $\eta = 64,34\%$ (eficiência da conversão de xilose em xilitol).

5.3.4 Comparação dos resultados obtidos com dados da literatura

A Tabela 24 apresenta os resultados obtidos no presente trabalho e resultados de fermentações também realizadas em frascos Erlenmeyer, utilizando diferentes hidrolisados hemicelulósicos com a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037. Foram citados resultados com diferentes matérias-primas para comparação por existirem poucos dados na literatura sobre a produção de xilitol no hidrolisado de palha de trigo com esta levedura.

Tabela 24 Resultados obtidos no presente trabalho e dados da literatura sobre a produção de xilitol em frascos agitados empregando-se diferentes hidrolisados hemicelulósicos com *C. guilliermondii* FTI 20037.

Matéria-prima	X (g/L)	t _f (h)	S ₀ (g/L)	P (g/L)	Q _P (g/L.h)	Y _{P/S} (g/g)	Referência
Palha de trigo	0,5	72	51,69	30,5	0,42	0,59	Presente trabalho
Palha de trigo	3,0	48	9,62	3,44	0,07	0,36	Canilha (2002)
Palha de trigo	0,5	80	61,0	19,04	0,24	0,32	Martinez et al. (2002)
Bagaço de cana	1,6*	48	43,4	21,0	0,44	0,54	Carvalho et al. (2003)
Bagaço de cana	3,0	72	54,5	34,4	0,75	0,74	Felipe et al. (1997a)
Eucalipto	3,0	72	60,0	10,0	0,10	0,20	Canettieri et al. (2001)
Palha de arroz	3,0	96	90,0	58,56	0,61	0,72	Mussato (2002)

X - concentração celular, t_f - tempo de fermentação, S₀ - concentração inicial de xilose, P - concentração de xilitol, Q_P - produtividade volumétrica em xilitol, Y_{P/S} - fator de conversão em xilitol, * células imobilizadas em alginato de cálcio.

Conforme pode ser observado na Tabela 24, mesmo utilizando o mesmo sistema de condução do processo (frascos Erlenmeyer) para todos os experimentos, grandes variações na concentração, produtividade volumétrica e fator de conversão em xilitol foram obtidas ao final das fermentações. De acordo com Parajó, Dominguez e Dominguez (1998b), grandes variações nos valores de concentração (0,62 - 94,7 g/L), produtividade (0,01 - 5,49 g/L.h) e fator de conversão (0,04 - 0,92 g/g) podem ser observadas para a produção de xilitol em diferentes hidrolisados hemicelulósicos dependendo das características do sistema empregado.

A maior produtividade (0,75 g/L.h) e o maior fator de conversão em xilitol (0,74 g/g) foram obtidos por Felipe et al. (1997a) quando a concentração do inóculo foi de 3,0 g/L de células, em hidrolisado de bagaço de cana. Ao compararmos os dados obtidos no presente estudo com aqueles apresentados na literatura, observa-se que a produtividade (0,42 g/L.h) e o fator de conversão (0,59 g/g) em xilitol encontrados para palha de trigo, foram superiores aos resultados encontrados utilizando-se eucalipto (0,10 g/L.h e 0,20 g/g, respectivamente), inferiores aos resultados encontrados utilizando-se bagaço de cana (0,75 g/L.h e 0,74 g/g) e palha de arroz (0,61 g/L.h e 0,72 g/g), porém, semelhante aos resultados encontrados utilizando-se bagaço de cana quando se utilizou células imobilizadas (0,44 g/L.h e 0,54 g/g).

Destaca-se que o máximo valor de produtividade e fator de conversão em xilitol obtidos ao final desta fermentação de palha de trigo foram superiores àqueles obtidos por Canilha (2002), utilizando-se a mesma matéria-prima, e com as vantagens adicionais de ter sido utilizada uma menor concentração de carvão ativo no tratamento do hidrolisado (2,5%), uma menor concentração de inóculo (0,5 g/L) e apenas glicose como fonte de carbono no cultivo das células para a obtenção do inóculo no presente estudo. Os valores de produtividade e fator de conversão em xilitol obtidos nesta fermentação também foram superiores àqueles obtidos por Martinez et al. (2002) utilizando a mesma matéria-prima, a mesma quantidade de inóculo em condições semelhantes de fermentação.

5.4 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE TRIGO EM FERMENTADORES DE BANCADA

5.4.1 Produção de xilitol em fermentador de bancada de 2 L

Após a obtenção das melhores condições de cultivo em frascos agitados, foi realizado um ensaio em fermentador de bancada, com capacidade total de 2 L com 1,3 L de meio de

fermentação, a fim de verificar o comportamento da levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, visando a produção de xilitol. O meio de fermentação utilizado foi o que correspondeu à melhor condição encontrada pelos modelos (1,0 g/L de sulfato de amônio, sem adição de cloreto de cálcio, 5,0 g/L de farelo de arroz, fator de concentração do hidrolisado igual a 3 e pH inicial de fermentação igual a 6,0), juntamente com o estabelecido no estudo do tratamento do hidrolisado (utilização de 2,5% de carvão ativo). A concentração inicial de células foi de 0,5 g/L, obtida do cultivo da levedura em meio contendo apenas glicose como fonte de carbono, conforme estabelecido nos ensaios anteriores. A fermentação foi conduzida a 30 °C, sob agitação de 300 rpm e aeração de 0,4 vvm ($k_{La} = 15 \text{ h}^{-1}$). A Figura 18 mostra o consumo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, produção de xilitol e células, observados durante 70 horas de fermentação.

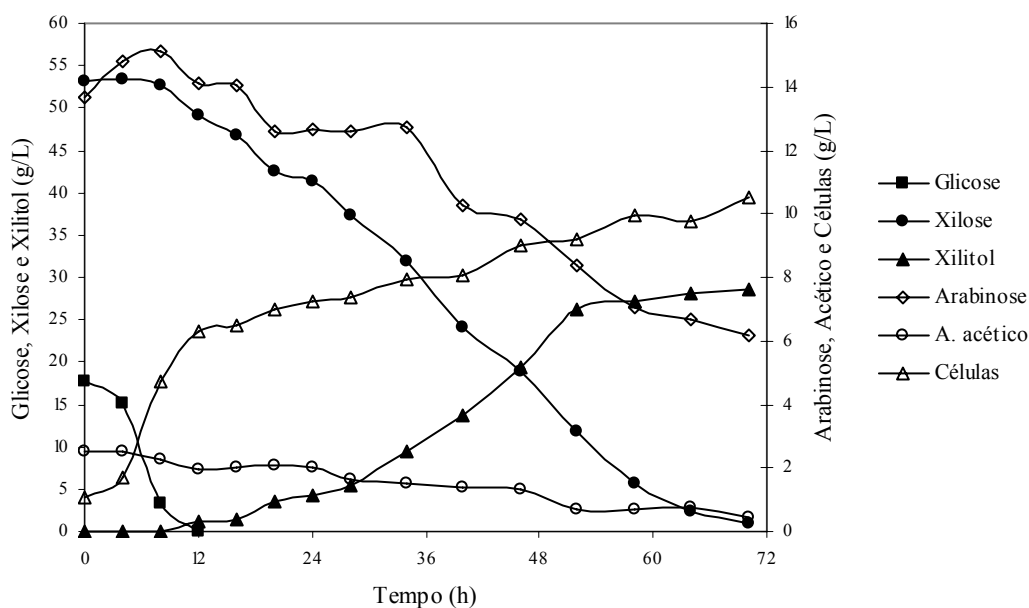


Figura 18 Consumo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, produção de xilitol e células, observados durante a fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii* FTI 20037 em fermentador de bancada 2 L.

Observa-se na Figura 18 que a glicose foi consumida pela levedura nas primeiras 12 horas de fermentação, semelhantemente ao observado nas fermentações dos hidrolisados de

bagaço de cana-de-açúcar (CARVALHO, 2004) e de palha de trigo (CANILHA et al., 2003), também realizadas em fermentadores de bancada com a mesma levedura. A glicose presente no hidrolisado pode atuar como uma fonte de energia adicional para o metabolismo microbiano (YAHASHI et al., 1996; LEE; RYU; SEO, 2000). Segundo Yahashi et al. (1996), a bioconversão de xilose em xilitol por células imobilizadas de *Candida tropicalis* foi mais eficiente na presença de glicose, a qual foi utilizada para o crescimento celular antes da utilização da xilose, permitindo a regeneração de NADPH pelo metabolismo através da via das fosfopentoses. Segundo Lee, Ryu e Seo (2000), em um processo fermentativo contendo glicose e xilose, a glicose é utilizada como fonte de energia para o crescimento celular e como co-substrato para regeneração de cofatores e a xilose é utilizada como substrato primordial para a conversão em xilitol.

Em relação à xilose (Figura 18), observa-se que esta pentose foi assimilada lentamente pela levedura nas primeiras 8 horas de fermentação, cerca de apenas 0,92% da sua concentração inicial, podendo ter ocorrido um consumo simultâneo da glicose e da xilose neste período (Figura 17). Também se observa que o perfil do consumo total da xilose em fermentador de bancada foi semelhante ao perfil do consumo total da xilose em frascos agitados (Figura 17). De acordo com Martinez, Silva e Felipe (2000), tanto a agitação quanto a aeração empregadas no processo podem influenciar na transferência de oxigênio, e conseqüentemente interferir no consumo da xilose. Portanto, podemos dizer que a aeração e a agitação utilizadas nesta fermentação foram adequadas, não interferindo no consumo total da xilose.

Semelhante à fermentação realizada em frascos agitados (Figura 17), a arabinose e o ácido acético presentes no meio foram assimilados por *C. guilliermondii* FTI 20037 durante a fermentação (55 e 83%, respectivamente). Tal fato também foi observado por Silva (2004) em hidrolisado de bagaço de cana, utilizando à mesma levedura. De acordo com Meyrial et al.

(1991), as leveduras pertencentes ao gênero *Candida* possuem a habilidade de converter a arabinose em arabitól. Para a produção de xilitol, o consumo desta pentose induz a atividade da enzima xilose redutase e, como consequência, favorece a conversão e a produtividade em xilitol, conforme já citado anteriormente (WALTHER; HENSIRISAK; AGBLEVOR, 2001).

Quanto à produção de xilitol (Figura 18), observa-se que a maior concentração obtida na fermentação realizada em fermentador de bancada (28,61 g/L) foi semelhante à concentração encontrada em frascos agitados (30,53 g/L), confirmando novamente que as condições de agitação e aeração utilizadas foram adequadas para a bioconversão de xilose em xilitol. Sabe-se da literatura que fermentadores proporcionam maior oxigenação do meio, favorecendo o crescimento celular, fato constatado no presente estudo em que foi possível obter uma maior concentração de células em fermentador (10,53 g/L) do que em frascos Erlenmeyer (7,10 g/L), porém este aumento na concentração celular não prejudicou a produção de xilitol. Observa-se ainda um rápido crescimento celular nas primeiras horas de fermentação, possivelmente pelo consumo inicial de glicose presente no hidrolisado.

Em relação aos parâmetros fermentativos, os resultados obtidos em fermentador de bancada foram os seguintes: $P = 28,6$ g/L (concentração final de xilitol), $Q_P = 0,41$ g/L.h (produtividade volumétrica em xilitol), $Y_{P/S} = 0,55$ g/g (fator de conversão de xilose em xilitol) e $\eta = 60\%$ (eficiência da conversão de xilose em xilitol). Considerando-se que os parâmetros fermentativos encontrados em fermentador de bancada foram semelhantes aos encontrados em frascos agitados (30,53 g/L, 0,42 g/L.h, 0,59 g/g), constatou-se que foi possível ampliar a escala dos frascos Erlenmeyer (125 mL) para o fermentador de bancada (2 L) trabalhando nas melhores condições definidas nos frascos agitados.

5.4.1.1 Comparação dos resultados obtidos com dados da literatura

A Tabela 25 apresenta os resultados obtidos no presente trabalho e resultados de fermentações também realizadas em fermentadores de bancada, utilizando diferentes hidrolisados hemicelulósicos com a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037. Foram citados resultados com diferentes matérias-primas para comparação por ter sido encontrado apenas um trabalho na literatura sobre a produção de xilitol no hidrolisado de palha de trigo com esta levedura.

Tabela 25 Resultados obtidos no presente trabalho e dados da literatura sobre a produção de xilitol em fermentadores de bancada empregando-se diferentes hidrolisados hemicelulósicos com *Candida guilliermondii* FTI 20037.

Matéria-prima	X (g/L)	S ₀ (g/L)	P (g/L)	Q _P (g/L.h)	Y _{P/S} (g/g)	Referência
Palha de trigo	0,5	53,2	28,6	0,41	0,55	Presente trabalho
Palha de trigo	0,5	30,5	27,5	0,50	0,90	Canilha et al. (2003)
Bagaço de cana	0,5	62,1	41,8	0,90	0,70	Silva et al. (1997)
Bagaço de cana	0,5	51,0	18,0	0,70	0,70	Martinez et al. (2003)
Bagaço de cana	1,4*	68,8	47,5	0,40	0,81	Carvalho (2004)
Eucalipto	1,5	60,0	25,4	0,35	0,36	Canettieri (1998)
Álamo	1,5	50,0	34,8	0,58	0,80	Preziosi-Belloy et al. (2000)
Palha de arroz	3,0	90,3	37,7	0,32	0,53	Mussato (2002)

X - concentração celular, S₀ - concentração inicial de xilose, P - concentração de xilitol, Q_P - produtividade volumétrica em xilitol, Y_{P/S} - fator de conversão em xilitol, * células imobilizadas em alginato de cálcio.

Como pode ser observado na Tabela 25, a maior produtividade (0,90 g/L.h) foi obtida por Silva et al. (1997), quando se utilizou como inóculo 0,5 g/L de células da levedura cultivada em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, e o maior fator de conversão (0,90 g/g) foi obtido por Canilha et al. (2003) utilizando-se a mesma concentração de inóculo em hidrolisado de palha de trigo. Ao se comparar os dados obtidos neste estudo com aqueles reportados na literatura, observa-se que a produtividade em xilitol (0,41 g/L.h) encontrada neste trabalho, foi superior as obtidas com hidrolisado de eucalipto (0,35 g/L.h) e palha de

arroz (0,32 g/L.h), inferior as obtidas com hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar (0,90 e 0,70 g/L.h), madeira de álamo (0,58 g/L.h) e palha de trigo (0,50 g/L.h) e semelhante a produzida com hidrolisado de bagaço de cana e células imobilizadas (0,40 g/L.h). Em relação ao fator de conversão obtido (0,55 g/g) podemos observar que foi superior ao encontrado com hidrolisado de eucalipto (0,36 g/L.h), semelhante ao encontrado com palha de arroz (0,53 g/L.h) e inferior aos encontrados utilizando-se hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com células livres (0,70 e 0,70 g/L.h) ou imobilizadas (0,81 g/L.h), madeira de álamo (0,80 g/L.h) e palha de trigo (0,90 g/L.h).

5.4.2 *Produção de xilitol em fermentador de 16 L*

Visando a obtenção do xilitol por cristalização, sua produção foi ampliada em um fermentador com capacidade total de 16 L com 12 L de meio de fermentação. O meio de fermentação utilizado foi o que correspondeu à melhor condição encontrada pelos modelos juntamente com o estabelecido no estudo do tratamento do hidrolisado. A concentração inicial de células foi de 0,5 g/L, obtida do cultivo da levedura em meio contendo apenas glicose como fonte de carbono, conforme estabelecido nos ensaios anteriores. A fermentação foi conduzida a 30 °C, sob agitação de 300 rpm e aeração de 0,2 vvm ($k_{La} = 15 \text{ h}^{-1}$).

A Figura 19 mostra o consumo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, produção de xilitol e células, observados durante 88 horas de fermentação.

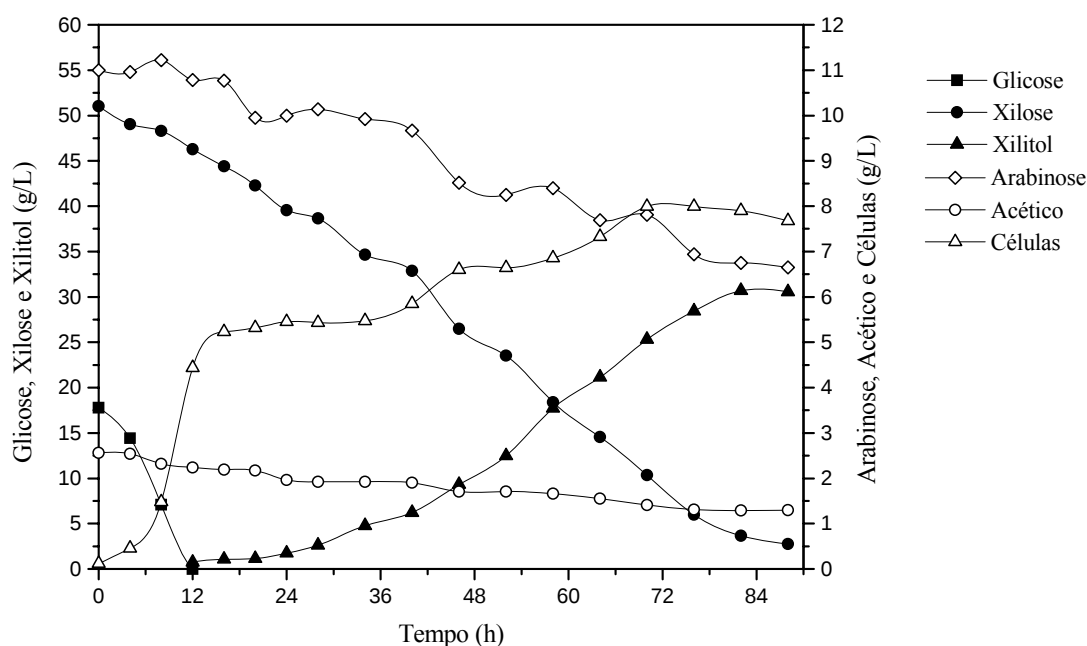


Figura 19 Consumo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, produção de xilitol e células, observados durante a fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii* FTI 20037 em fermentador de 16 L.

Comparando os resultados obtidos na fermentação em fermentador de 16 L (Figura 19) com os obtidos na fermentação em fermentador de 2 L (Figura 18), pode-se observar que o consumo dos açúcares e do ácido acético foram bastante semelhantes.

A concentração de xilitol e a produtividade volumétrica obtidas (30,68 g/L e 0,37 g/L.h, respectivamente) também foram semelhantes à concentração e à produtividade encontradas em fermentador de 2 L de capacidade útil (28,61 g/L e 0,41 g/L.h). Por outro lado, o fator de conversão encontrado nesta fermentação (0,65 g/g), e conseqüentemente a eficiência da conversão (70,88%), foram superiores aos encontrados na fermentação utilizando fermentador de 2 L (0,55 g/g e 60%, respectivamente). Segundo Winkelhausen e Kuzmanova (1998), a produção de xilitol é inversamente proporcional ao crescimento celular, fato constatado no presente trabalho, em que a fermentação realizada no fermentador de 16 L (Figura 19) apresentou a maior produção de xilitol (30,68 g/L) e o menor crescimento celular

(7,90 g/L) quando comparada com a fermentação realizada no fermentador de 2 L (Figura 18), que apresentou a menor produção de xilitol (28,61 g/L) e a maior concentração celular (10,53 g/L).

Por último, não se pode deixar de destacar que foi possível ampliarmos a escala de produção de xilitol de um fermentador de 2 L para um fermentador de 16 L, utilizando como critério de ampliação o k_{La} , uma vez que, os valores dos parâmetros fermentativos foram bastante semelhantes. Segundo Yantorno (2005), os critérios mais utilizados industrialmente para a ampliação de escala são: o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), a relação da potência de agitação por unidade de volume (P/V) e a velocidade de agitação (V), nas proporções de 30, 30 e 20%, respectivamente. Ao ampliar a escala de produção foi necessário aumentar o tempo de fermentação. Em fermentador de 2 L de capacidade útil a maior produção de xilitol foi obtida em 70 horas de fermentação, enquanto que em fermentador de 16 L foi necessário um tempo de 82 horas para alcançar a maior produção.

5.5 CLARIFICAÇÃO DO CALDO FERMENTADO

O xilitol é um produto a ser utilizado nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, devendo apresentar uma alta pureza antes de utilizado. Para alcançar este objetivo, foi realizado um estudo de clarificação do xilitol presente no caldo fermentado obtido. As características do caldo fermentado com 82 horas de fermentação (A) e após centrifugação (B) para a retirada das células, estão apresentadas na Tabela 26.

No processo de centrifugação foram verificadas perdas de xilose (16%) e de ácido acético (40%), além de um decréscimo no valor do pH. Em relação ao xilitol e a arabinose foram observados pequenos aumentos em suas concentrações (0,8 e 0,9%, respectivamente).

Tabela 26 Características do caldo fermentado com 82 horas de fermentação (A), e após centrifugação (B).

Componente	Etapas do processo	
	A	B
Xilitol (g/L)	30,68	30,92
Xilose (g/L)	3,65	3,07
Arabinose (g/L)	6,75	6,81
Ácido acético (g/L)	1,30	0,78
Fenóis totais (g/L)	ND	15,50
Sólidos totais (g/L)	ND	9,50
Células (g/L)	7,90	0,00
pH	6,49	5,74
°Brix	ND	9,0
Cor ICUMSA	ND	3315751,33

ND – não determinado

O caldo foi submetido a uma série de tratamentos, nos quais foram avaliados: (1°) soluções regenerantes para as resinas e a quantidade de caldo fermentado misturado à resina (primeira etapa); (2°) composição do caldo fermentado que sai de cada uma das três resinas testadas em série nos quatro melhores ensaios da primeira etapa (segunda etapa); (3°) composição do caldo fermentado que sai de apenas duas resinas testadas em série nos dois melhores ensaios da segunda etapa (terceira etapa). A Tabela 27 apresenta os resultados dos primeiros ensaios de clarificação (primeira etapa).

Nesta primeira etapa do estudo de clarificação, foram observadas diminuições nas concentrações de xilose e de arabinose em todos os ensaios, quando comparadas com a composição encontrada após a centrifugação (3,07 e 6,81 g/L, respectivamente). Fenóis totais, ácido acético e sólidos totais também foram removidos, em diferentes proporções. Por outro lado, também foi observada uma perda em xilitol, variando de 20,54 a 60,67%, da concentração encontrada após a centrifugação (30,92 g/L).

Tabela 27 Resultados dos oito ensaios iniciais de clarificação do caldo fermentado a partir de palha de trigo (1ª etapa).

	Proporção resina + caldo	Regenerantes	pH	Concentração (g/L)			% perda xilitol	% remoção			
				Xilose	Arabinose	Xilitol		Fenóis totais	Ácido acético	Sólidos totais	Cor
01	1+1	A: NaCl 10% C: NaCl 5%	5,04	0,39	1,07	14,14	54,27	98,32	100	72,63	99,93
02	1+2		5,09	0,99	2,55	19,69	36,32	95,74	78,21	85,26	99,80
03	1+3		5,19	1,32	3,39	22,23	28,11	92,07	65,39	77,90	99,69
04	1+4		5,27	1,62	4,07	24,57	20,54	83,00	53,85	77,90	96,68
05	1+1	A: NaOH 10% C: HCl 5%	2,41	0	0,20	12,16	60,67	98,97	100	88,74	99,88
06	1+2		2,39	0,27	0,76	19,93	35,54	98,32	100	87,68	99,85
07	1+3		2,33	0,67	1,67	20,37	34,12	97,10	100	87,05	99,73
08	1+4		1,85	1,44	3,34	24,41	21,05	82,65	76,92	81,79	96,71

1+1 = 25mL resina + 25mL caldo

1+2 = 25mL resina + 50mL caldo

1+3 = 25mL resina + 75mL caldo

1+4 = 25mL resina + 100mL caldo

A - resina aniônica; C - resina catiônica

Também foi possível observar reduções da coloração em todos os oito ensaios realizados (Tabela 27), destacando-se as maiores reduções nos ensaios 01, 02, 05 e 06, conforme pode ser observado na Figura 20.



Figura 20 Ensaios de clarificação do caldo fermentado com resinas de troca iônica. Da esquerda para direita: caldo e ensaios de 01 a 08.

Segundo a Tabela 27 e a Figura 20, em um volume constante de resina utilizado, tanto a redução de cor do caldo quanto à remoção dos fenóis totais, ácido acético e sólidos totais, são menores à medida que aumenta o volume do caldo em contato com a resina.

De acordo com os resultados obtidos, quanto às maiores reduções de cor e remoções de compostos tóxicos, e, levando em conta a escolha de dois ensaios com regenerantes sais e dois com regenerantes ácido e base, foi possível escolher quatro dos oito ensaios realizados para a próxima etapa dos estudos de clarificação: 01, 02, 05 e 06, destacando-se que estes foram os que apresentavam menores volumes do caldo fermentado em contato com as resinas.

Portanto, na segunda etapa, estes quatro ensaios foram novamente realizados, agora analisando a composição do caldo fermentado ao final de cada uma das três resinas testadas em série (Tabela 28).

Tabela 28 Resultados dos quatro ensaios de clarificação do caldo fermentado a partir de palha de trigo (2ª etapa).

		Regenerantes	pH	Concentração			% perda xilitol	% remoção			
				Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)		Fenóis totais	Ácido acético	Sólidos totais	Cor
01	A-860S	A: NaCl 10%	5,39	1,52	3,94	23,73	23,25	86,32	67,95	63,75	97,40
	A-500PS		5,43	0,85	2,26	18,04	41,66	95,03	88,00	84,34	99,77
	C-150		5,35	0,45	1,29	15,32	50,45	98,19	9,03	87,72	99,88
02	A-860S	C: NaCl 5%	5,22	2,12	4,19	28,51	7,79	76,13	15,39	58,82	96,40
	A-500PS		5,25	1,49	3,87	23,62	23,61	89,36	60,26	72,06	99,52
	C-150		5,33	1,12	2,83	20,45	33,86	95,23	70,51	83,60	99,68
05	A-860S	A: NaOH 10%	12,45	0,62	1,39	20,18	34,74	93,74	87,18	70,07	99,62
	A-500PS		12,41	0,10	0	12,88	58,34	98,97	100	83,31	99,90
	C-150		3,36	0,06	0,20	12,40	59,90	99,36	100	97,57	99,74
06	A-860S	C: HCl 5%	12,20	1,60	2,55	25,77	16,66	74,58	44,87	54,63	92,15
	A-500PS		12,43	0,54	1,27	23,03	25,51	93,36	100	75,53	99,45
	C-150		2,93	0,30	0,98	19,15	38,07	97,36	100	99,78	99,54

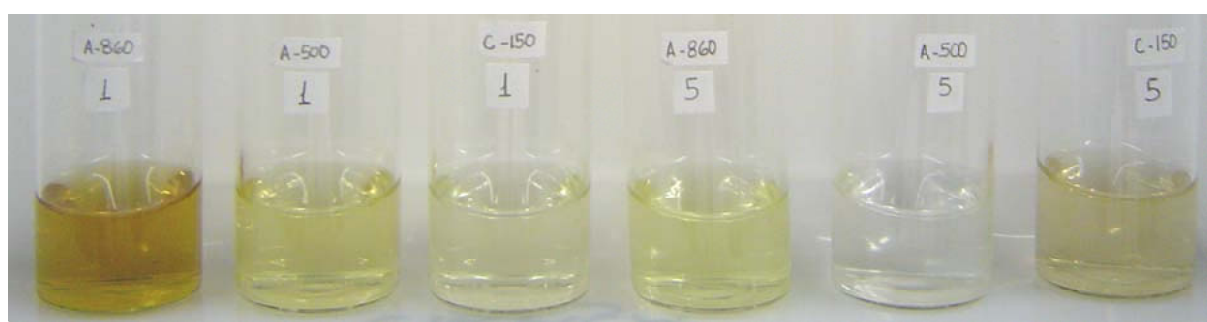
Ensaio 01 e 05 = 25mL resina + 25mL caldo

Ensaio 02 e 06 = 25mL resina + 50mL caldo

A - resina aniônica; C - resina catiônica

Conforme pode ser observado na Tabela 28, elevadas remoções dos fenóis totais, ácido acético e sólido totais foram observadas (variando entre 95-99%, 60-100% e 72-84%, respectivamente), a partir da segunda resina utilizada em série em todos os ensaios. Por outro lado, também foram observadas perdas de xilitol. Nos quatro ensaios realizados, a cada resina a mais utilizada na clarificação, maior era a perda deste produto de interesse. Após a segunda resina utilizada (A-500PS), as menores perdas em xilitol foram observadas nos ensaios 02 e 06 (23,61 e 25,51%, respectivamente).

A Figura 21 mostra o aspecto do caldo fermentado após os diferentes tratamentos com resinas de troca iônica, nas etapas de clarificação referentes aos ensaios 01, 02, 05 e 06. Pode-se observar nitidamente a diminuição da coloração do caldo em todos os ensaios a partir da segunda resina utilizada (A-500PS).



(a)



(b)

Figura 21 Etapas de clarificação do caldo fermentado com resinas de troca iônica. (a) ensaios 01 e 05 (25 mL resina + 25 mL caldo); (b) ensaios 02 e 06 (25 mL resina + 50 mL caldo). Da esquerda para direita: A-860S, A-500PS e C-150 para cada ensaio.

De acordo com os resultados obtidos, quanto às maiores reduções de cor, remoções de compostos tóxicos e menores perdas em xilitol, e, levando em conta a escolha de um ensaio com regenerantes sais e um com regenerantes ácido e base, foi possível escolher dois dos quatro ensaios realizados, para a próxima etapa dos estudos de clarificação: ensaios 02 e 06.

Na terceira etapa, esses dois ensaios foram novamente realizados, agora analisando apenas duas resinas em série, conforme sugerido na etapa anterior. Para cada ensaio foram realizados três experimentos diferentes, testando-se uma resina aniônica e uma catiônica em sequência (A-860S com C-150 e A-500PS com C-150) e duas resinas aniônicas em sequência (A-860 com A-500PS). A Tabela 29 apresenta as características do caldo ao final de cada um dos seis experimentos realizados.

Pela composição final encontrada para os seis experimentos realizados (Tabela 29), observar-se diminuições das concentrações de xilose e de arabinose, quando comparadas com as concentrações de xilose (3,07 g/L) e arabinose (6,81 g/L) presentes no caldo após a centrifugação (Tabela 26). Entre os seis experimentos, o que apresentou maior remoção desses açúcares foi o ensaio 06, com duas resinas aniônicas em sequência. Quanto aos fenóis totais, ácido acético e sólidos totais, também foram observadas elevadas remoções em todos os ensaios, variando entre 88-97%, 54-100% e 67-97%, respectivamente, destacando os experimentos realizados no ensaio 06 em que se obteve a maior remoção desses três compostos. Entretanto, houve perda de xilitol em todos os ensaios, variando entre 21-31%, sendo menores as perdas nos ensaios com duas resinas aniônicas em sequência.

A Figura 22 mostra o aspecto do caldo fermentado após os diferentes tratamentos com resinas de troca iônica, nas etapas de clarificação referentes aos experimentos realizados para os ensaios 02 e 06. Podem-se observar elevadas reduções na cor nos dois ensaios, destacando os que empregaram duas resinas aniônicas em sequência.

Tabela 29 Resultados dos seis experimentos de clarificação.

		Regenerantes	pH	Concentração			% perda xilitol	% remoção			
				Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)		Fenóis totais	Ácido acético	Sólidos totais	Cor
02	A-860S A-500PS	A: NaCl 10% C: NaCl 5%	5,25	1,49	3,87	23,62	23,61	89,36	60,26	72,06	99,52
02	A-860S C-150		5,41	1,39	3,50	22,40	27,56	90,39	53,85	66,72	99,19
02	A-500PS C-150		5,32	1,39	3,53	22,17	28,30	87,94	57,69	71,38	96,68
06	A-860S A-500PS	A: NaOH 10% C: HCl 5%	12,43	0,54	1,27	23,03	25,51	93,36	100	75,53	99,45
06	A-860S C-150		2,40	0,89	2,33	21,24	31,31	96,71	83,33	96,87	99,52
06	A-500PS C-150		2,27	1,42	3,50	24,31	21,38	94,19	78,21	96,87	99,25

Ensaio 02 e 06 = 25mL resina + 50mL caldo

A - resina aniônica; C - resina catiônica

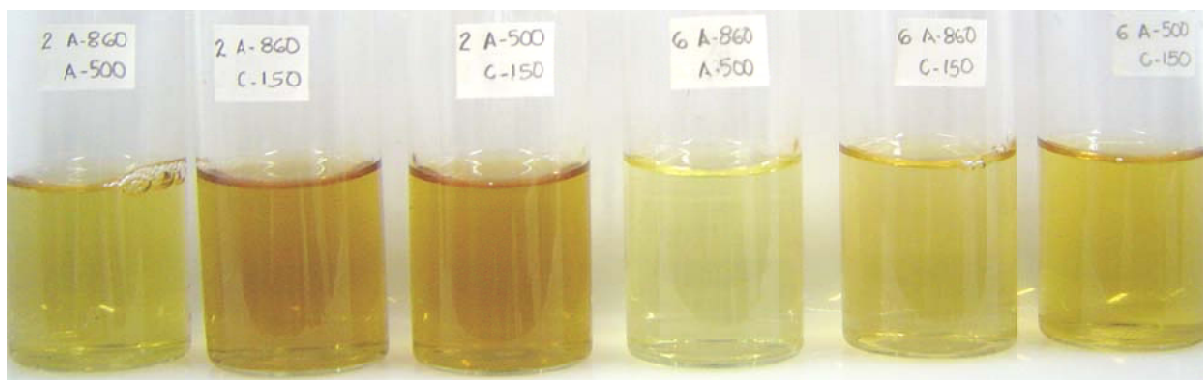


Figura 22 Etapas de clarificação do caldo fermentado com resinas de troca iônica. Da esquerda para direita: ensaios 02 e 06; seqüência: A-860S com A-500PS, A-860S com C-150 e A-500PS com C-150.

De acordo com os resultados apresentados foi possível definir a melhor seqüência a ser utilizada na clarificação de todo caldo fermentado. Definiu-se o ensaio 06 onde foram utilizadas duas resinas aniônicas em seqüência (A-860S e A-500PS), que apresentaram maiores remoções de fenóis totais, ácido acético, sólidos totais, xilose e arabinose, maior redução da coloração e menores perdas na concentração de xilitol. Carvalheiro et al. (2005), avaliando a destoxificação do hidrolisado de bagaço de malte para a produção de xilitol por *Debaryomyces hansenii*, também puderam observar que duas resinas aniônicas em seqüência apresentaram os melhores resultados quanto à retirada de inibidores e quanto à menores perdas de xilose.

O caldo foi então clarificado, primeiramente com a resina acrílica de troca aniônica fortemente básica tipo 1 (A-860S); em seguida foi centrifugado para retirada de precipitado formado e depois clarificado com a resina macroporosa de troca aniônica fortemente básica tipo 1 (A-500PS). O regenerante utilizado para as duas resinas aniônicas foi solução alcalina de NaOH a 10%. Após clarificação, o caldo foi concentrado para aumentar a concentração de xilitol presente.

A Tabela 30 apresenta a composição do caldo fermentado durante cada etapa de clarificação e após concentração.

Tabela 30 Composição do caldo fermentado durante cada etapa de clarificação e após concentração.

	pH	Concentração (g/L)						Cor ICUMSA
		Xilose	Arabinose	Xilitol	Fenóis totais	Ácido acético	Sólidos totais	
Caldo fermentado	5,74	3,07	6,81	30,92	15,50	0,78	9,50	3.315.751,33
Após clarificação com A-860S	11,84	0,77	0,95	20,08	5,31	0,21	6,83	ND
Centrifugado	11,79	0,79	1,09	19,13	2,12	0,20	5,13	ND
Após clarificação com A-500PS	12,21	0,24	0,51	17,60	1,11	0,02	3,17	ND
Concentrado	5,74	3,07	3,20	726,50	12,18	1,00	ND	175.535,71

ND – não determinado

Conforme pode ser observado na Tabela 30, houve uma redução das concentrações de xilose e de arabinose presentes no caldo fermentado quando se compara com o caldo obtido após a última etapa do processo de clarificação (92 e 93%, respectivamente). Também deve ser destacada a eficiência alcançada neste processo quanto à remoção de compostos tóxicos, resultando em remoções de 93, 97 e 67%, de fenóis totais, ácido acético e sólidos totais, respectivamente. Nilvebrant et al. (2001) trataram hidrolisado de madeira com resinas de troca iônica para a produção de etanol e também observaram que as resinas aniônicas foram as mais efetivas para a remoção de fenóis totais, furanos, aldeídos e ácidos alifáticos do hidrolisado estudado. Mancilha e Karim (2003), estudando a destoxificação do hidrolisado de “corn stover”, observaram uma remoção de 100% de ácido acético, utilizando-se resina aniônica (A-103S).

Por outro lado, foi observada uma perda em xilitol de 43% ao comparar o caldo fermentado com o caldo obtido após a última etapa de clarificação. Carvalho, Marton e Felipe (2005), avaliando o tratamento do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica, observaram perdas de 40% do seu açúcar de interesse (xilose) após o tratamento com carvão e com as resinas A-860S, A-500PS e C-150, em sequência. Martinez (2005) observou perdas em xilitol (de 8,12% e 15,23%) ao clarificar um meio obtido após fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por *C. guilliermondii* FTI 20037, com resinas de troca iônica A-505 e C-505.

Após a concentração, foi observado que os teores dos compostos tóxicos e dos açúcares aumentaram de maneira não proporcional ao fator de concentração utilizado (40 vezes). Para o xilitol, foi observado um aumento na sua concentração em 41 vezes em relação à sua concentração anterior, valor de fator de concentração observado muito próximo ao utilizado neste trabalho (40 vezes). As concentrações de xilose, arabinose e fenóis totais, aumentaram em 18, 6 e 11 vezes, respectivamente, valores de fator de concentração

observados inferiores ao utilizado neste trabalho. Já, a concentração do ácido acético praticamente não variou em relação ao fator de concentração utilizado neste trabalho.

5.6 CRISTALIZAÇÃO DO XILITOL

Após tratamento e concentração, o caldo fermentado obtido com (g/L): 4,30 de xilose, 3,20 de arabinose, 726,50 de xilitol, 1,00 de ácido acético e 12,18 de fenóis totais, foi submetido a cristalização por resfriamento linear, utilizando a melhor condição obtida por Martinez (2005) (temperatura de saturação de 50 °C e velocidade de resfriamento linear de 0,5 °C/min). Nesta condição, não houve cristalização. Isto pode ter ocorrido devido ao fato do hidrolisado utilizado neste trabalho (palha de trigo) ser diferente do hidrolisado utilizado por Martinez (2005) (bagaço de cana), ressaltando a diferença entre as composições dos caldos obtidos. Conforme descrito acima, o caldo obtido neste trabalho possui outros produtos em sua composição, xilose, arabinose, ácido acético e fenóis totais, enquanto que Martinez (2005) ressalta que o caldo obtido pela fermentação do bagaço de cana-de-açúcar possui apenas arabinose (13,20 g/L) além do xilitol obtido (935,3 g/L). Outro fator que também pode ter influenciado na cristalização é o pH do caldo fermentado. Martinez (2005) clarificou o caldo obtido com resinas de troca iônica A-505 e C-505, sendo a última uma resina catiônica, constatando-se um pH do caldo em torno de 5,0 ao final da etapa de clarificação. Neste trabalho, as resinas utilizadas para a clarificação do caldo, obtido pela fermentação do hidrolisado de palha de trigo, foram aniônicas, constatando-se um pH de 12,0 ao final da etapa de clarificação.

O próximo passo foi então definir a temperatura de saturação e a velocidade de resfriamento linear que fossem mais adequadas para a cristalização do xilitol presente no caldo da palha de trigo. Também foram realizados ensaios utilizando-se solução de xilitol pura (na mesma concentração do caldo fermentado) para comparações. Para esses ensaios foi

utilizado como solvente mistura água-etanol (50-50%) e diferentes temperatura de saturação (T) e velocidade de resfriamento linear (V_R). A Tabela 31 apresenta as diferentes condições de cristalização utilizadas e os seus respectivos resultados utilizando-se solução de xilitol pura, misturas do caldo fermentado com a solução de xilitol e o caldo fermentado puro.

Tabela 31 Temperaturas de saturação (T), cristalização (T_c) e final (T_F), velocidade de resfriamento linear (V_R), massa cristalizada (Mc) e rendimento da cristalização (R) utilizando-se solução de xilitol pura, misturas do caldo fermentado com a solução de xilitol e o caldo fermentado puro.

Ensaio	T (°C)	T_c (°C)	T_F (°C)	V_R (°C/min)	Mc (g)	R (%)
01	40	15	10	0,2	21,58	51,4
02	40	15	10	0,2	18,25	43,5
03	50	20	10	0,4	3,27	7,8
04	40 e 50	-	10	0,4 e 0,5	-	-
05	40 e 50	-	10	0,2 e 0,4	-	-

01- Solução xilitol pura; 02- 30% caldo + 70% solução xilitol; 03- 50% caldo + 50% solução de xilitol; 04- 70% caldo + 30% solução de xilitol; 05- Caldo fermentado obtido da palha de trigo.

Conforme apresentado na Tabela 31, foi possível cristalizar o xilitol presente nas condições dos ensaios 01, 02 e 03 (a partir de uma solução de xilitol pura, 30% de caldo com 70% de solução de xilitol e 50% de caldo com 50% de solução de xilitol, respectivamente), com rendimentos de 51,4%, 43,5% e 7,8%, respectivamente. Deve-se destacar que o tempo necessário para a cristalização de xilitol (entre 2-3 h), utilizando $V_R = 0,2$ ou $0,4$ °C/min e $\Delta T = T - T_F = 30$ ou 40 °C, é menor que o tempo necessário para cristalizar a sacarose (entre 13-14 h), utilizando $V_R = 4$ °C/h e $\Delta T = 53$ °C, em média (MATELATTO, 2005).

Nos ensaios 04 e 05, com 70% de caldo e caldo fermentado puro, respectivamente, não foi possível cristalizar o xilitol. A cristalização, nesses dois casos, pode ter sido prejudicada pela composição do caldo fermentado, que apresentava impurezas, outros açúcares e uma forte coloração, desenvolvida após a etapa de concentração. Além das mesmas temperaturas de saturação e velocidades de resfriamento utilizadas nos três primeiros ensaios,

outras condições de cristalização (Tabela 31) também foram testadas para estes dois ensaios, sem êxito ao final de cada experimento realizado.

As Figuras 23, 24 e 25 apresentam as análises termogravimétricas, ou seja, degradações térmicas das amostras de xilitol, para os ensaios 01, 02 e 03, respectivamente. As análises indicam degradações de 98,75%, 91,69% e 86,69% das amostras de solução de xilitol pura, 30% e 50% de caldo fermentado, respectivamente.

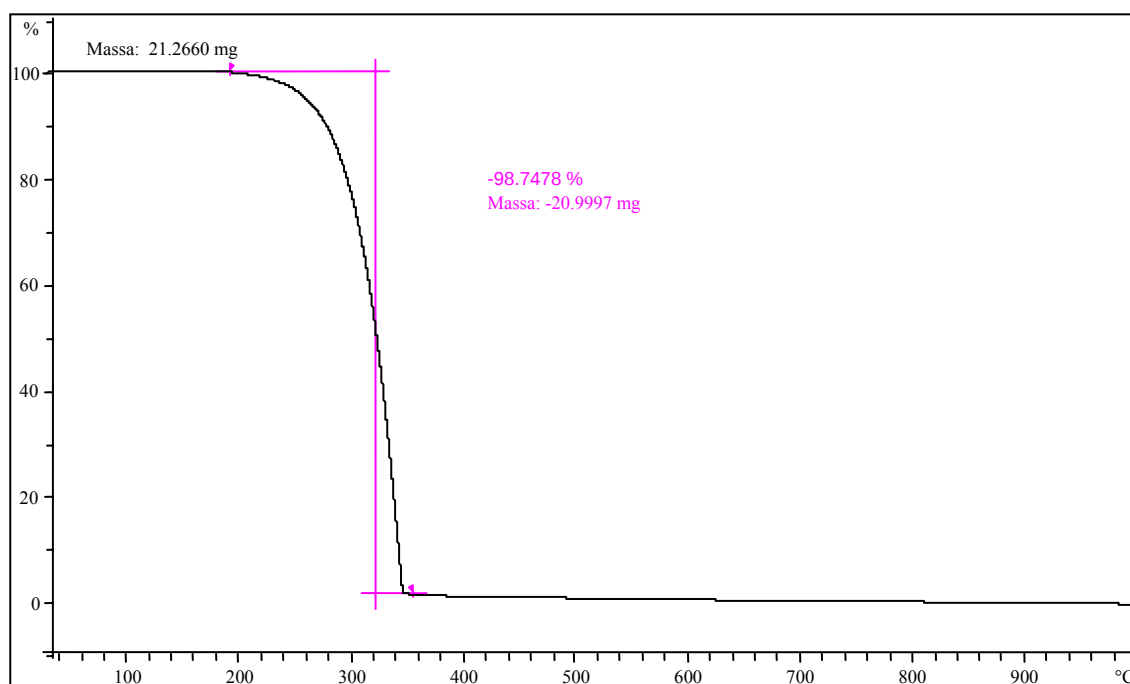


Figura 23 Análise termogravimétrica (TGA) para o ensaio 01 (solução de xilitol pura).

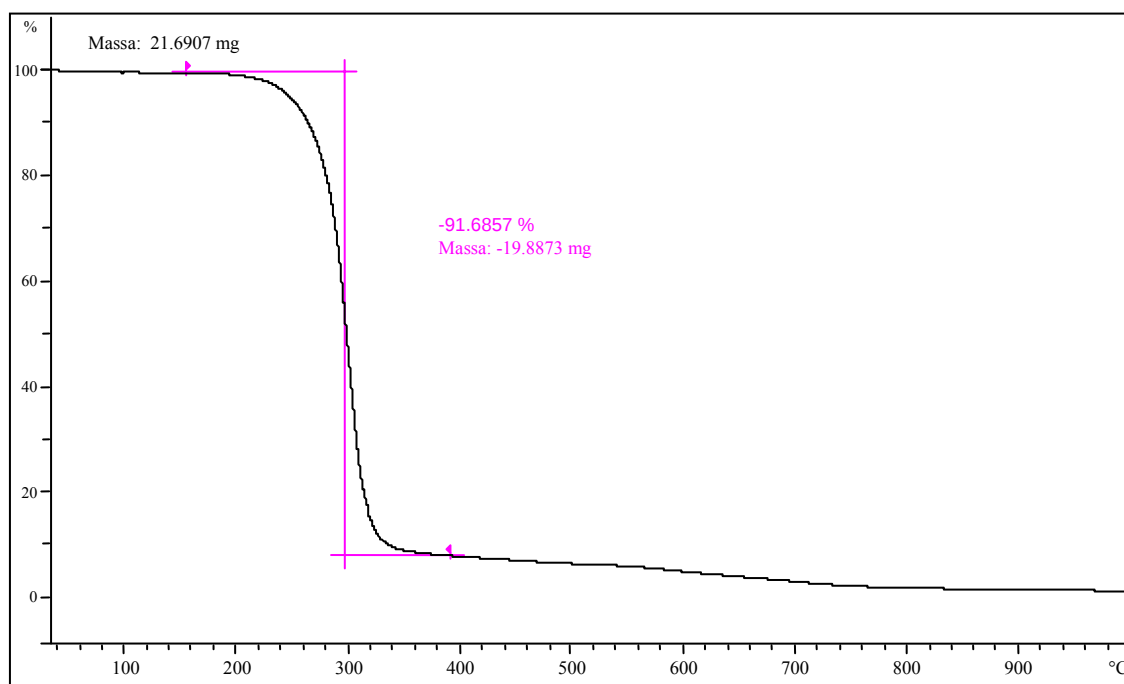


Figura 24 Análise termogravimétrica (TGA) para o ensaio 02 (30% caldo fermentado + 70% solução de xilitol).

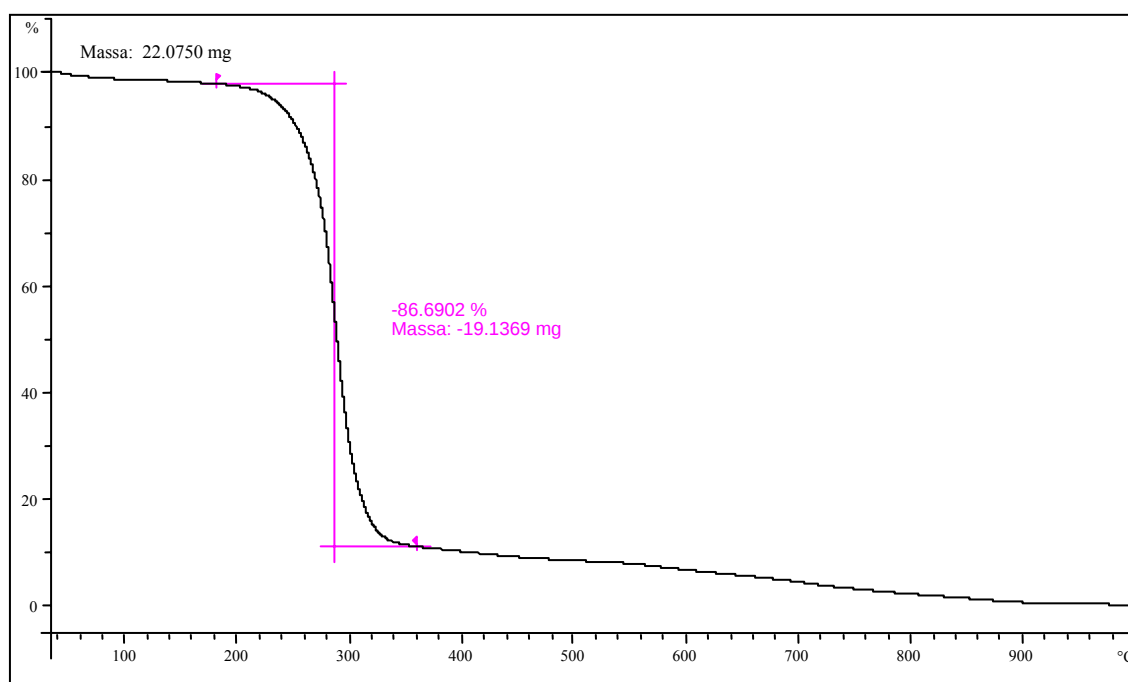


Figura 25 Análise termogravimétrica (TGA) para o ensaio 03 (50% caldo fermentado + 50% solução de xilitol).

Podemos observar que a análise termogravimétrica para a solução de xilitol pura (Figura 23) apresenta o início e o término da degradação da amostra bem mais definidos que ao compararmos com as análises termogravimétricas para as misturas com o caldo fermentado (Figuras 24 e 25). Também podemos verificar que no intervalo entre 200 °C e 350 °C, onde se observa degradação de 98,75% da amostra da solução de xilitol pura (Figura 23), foram observadas degradações de 91,69% e 86,69% das misturas com 30% e 50% de caldo fermentado, respectivamente (Figuras 24 e 25). Observa-se ainda que as amostras do caldo fermentado continuam degradando mesmo após o intervalo de temperatura citado. Isto pode ser devido ao fato destas amostras possuírem outros produtos em sua composição, tais como os íons metálicos, interferindo nas suas degradações.

A Figura 26 apresenta as três análises termogravimétricas (ensaios 01, 02 e 03). Pode-se observar a diferença da degradação da solução de xilitol pura (em azul) para a degradação ocorrida nos outros dois ensaios, com 30% e 50% de caldo fermentado da palha de trigo, (em vermelho para o ensaio 02 e em preto para o ensaio 03). Entre os dois últimos ensaios pode-se observar uma similaridade na degradação das amostras provavelmente devido à composição do caldo fermentado.

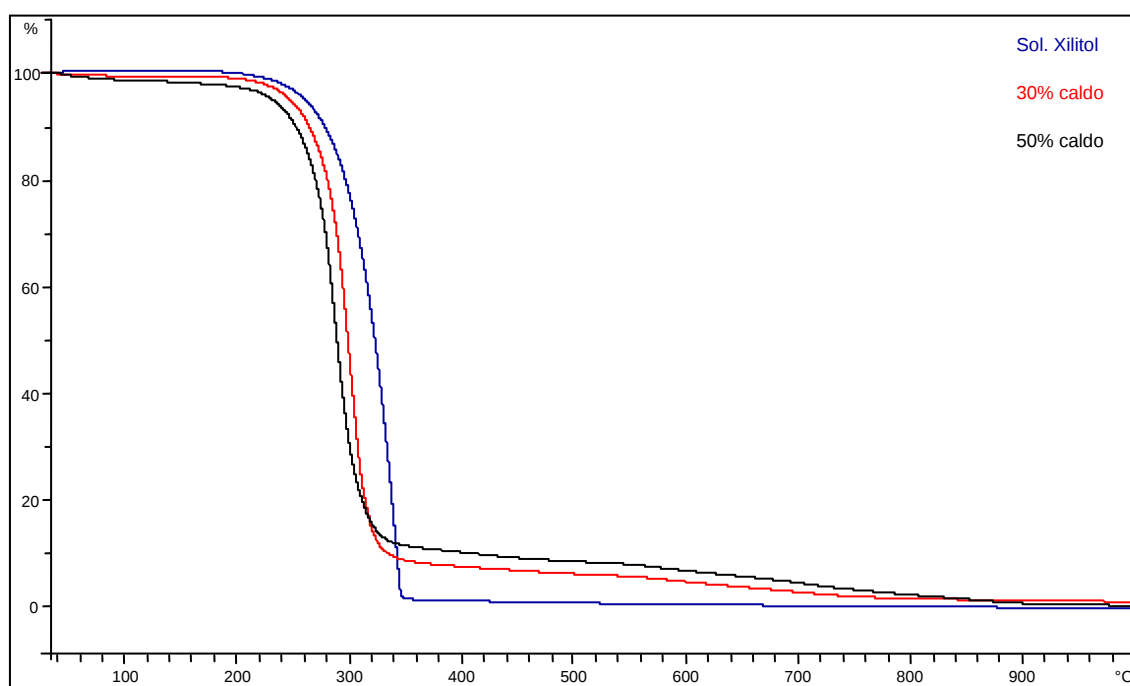


Figura 26 Análise termogravimétrica (TGA) para os ensaios 01 (em azul), 02 (em vermelho) e 03 (em preto).

As Figuras 27, 28 e 29 apresentam as análises de calorimetria de varredura diferencial para os ensaios 01, 02 e 03, respectivamente. As análises indicam pontos de fusão com pico em 94,34 °C, 92,87 °C e 91,56 °C e calor de fusão de 283,16 J/g, 244,79 J/g e 177,20 J/g para as amostras de solução de xilitol pura, 30% e 50% de caldo fermentado, respectivamente. A Figura 30 apresenta o ponto de fusão e calor de fusão dos três ensaios realizados. Verifica-se que o ponto de fusão para a solução de xilitol pura (em azul) é bastante definido por não apresentar impurezas na sua composição. Já a análise da mistura com 50% de caldo fermentado (em preto), onde se tem maior quantidade de impurezas presentes na amostra, não apresentou boa definição do seu ponto de fusão.

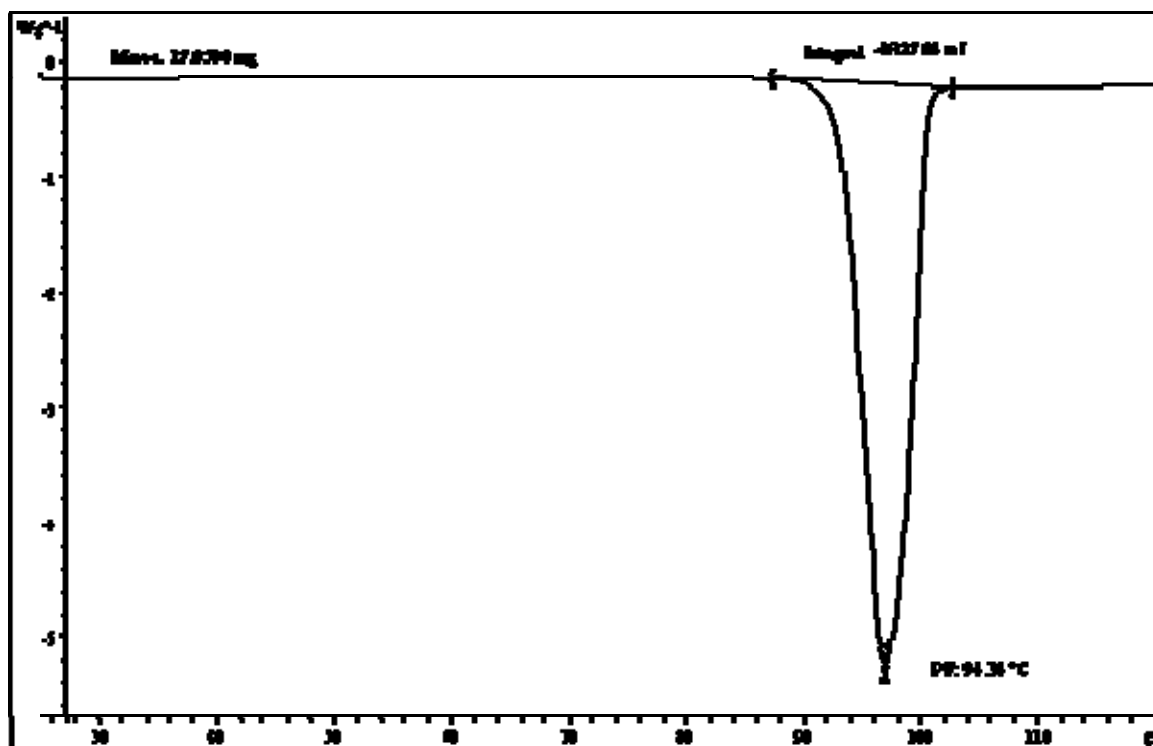


Figura 27 Análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC) para o ensaio 01 (solução de xilitol pura).

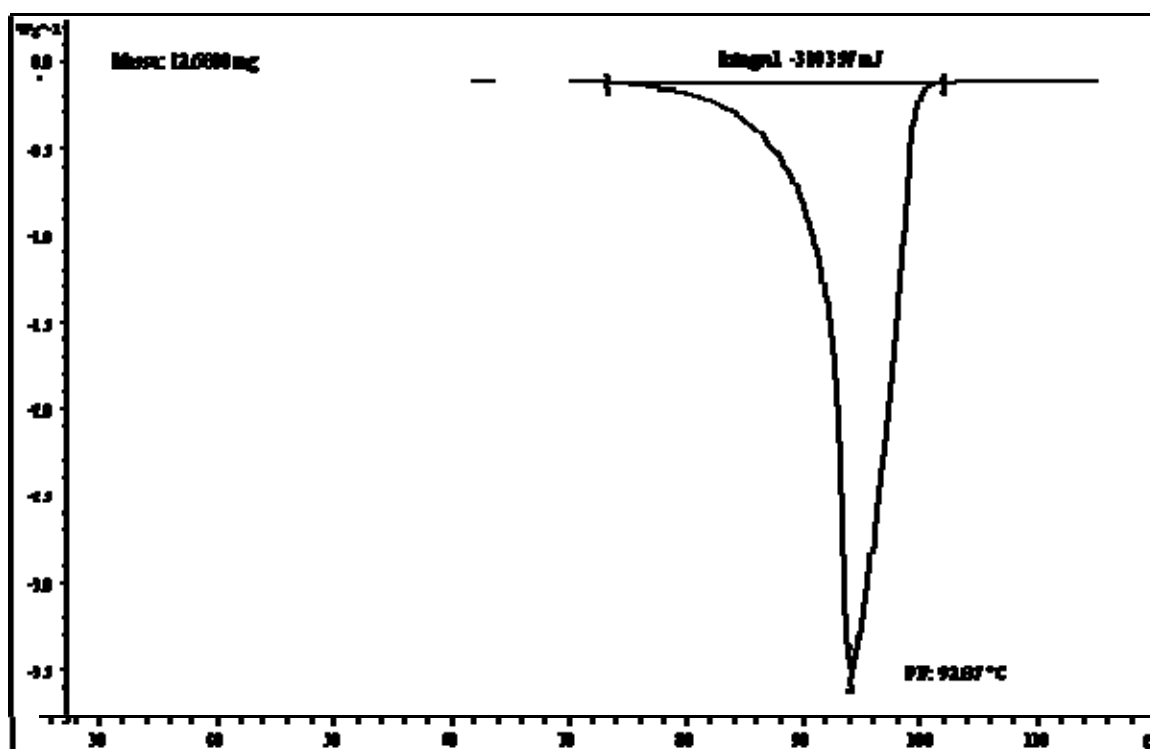


Figura 28 Análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC) para o ensaio 02 (30% caldo fermentado + 70% solução de xilitol).

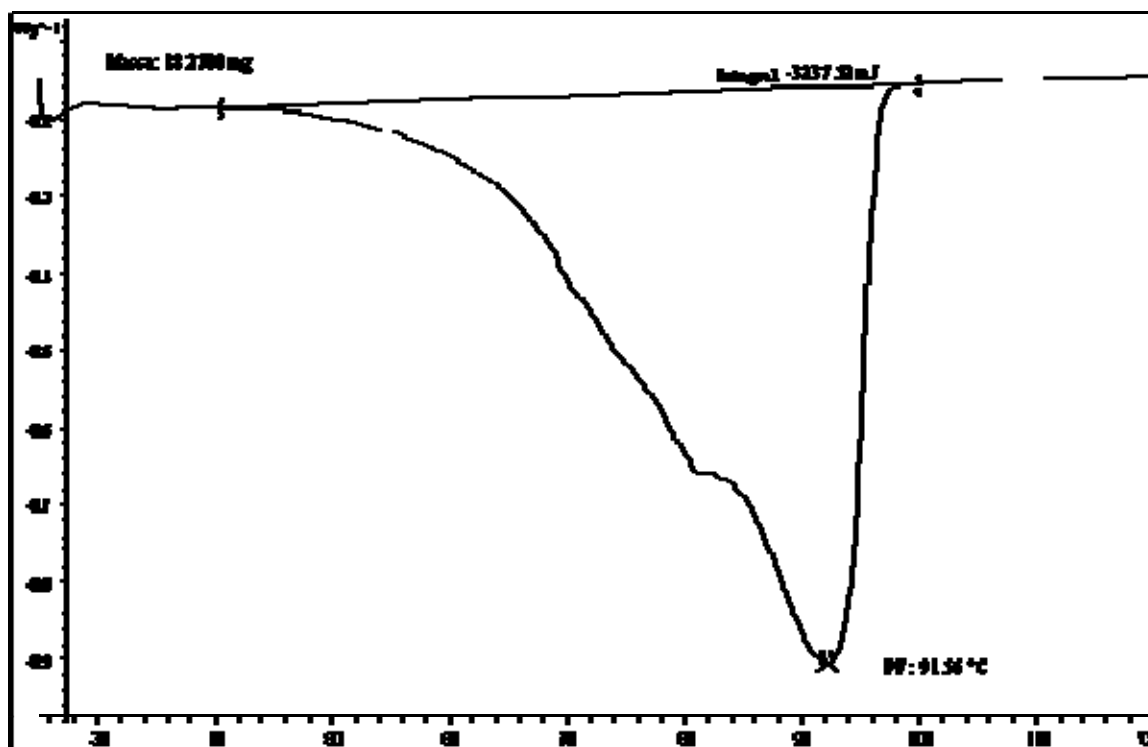


Figura 29 Análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC) para o ensaio 03 (50% caldo fermentado + 50% solução de xilitol).

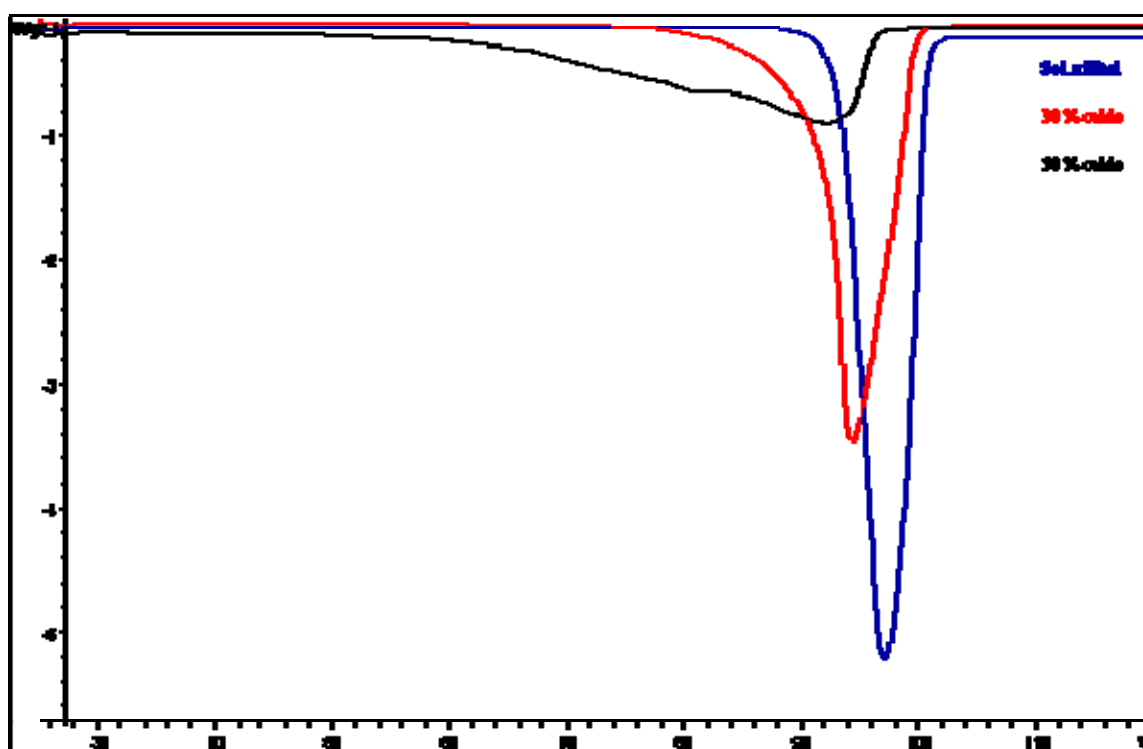


Figura 30 Análise de calorimetria de varredura diferencial (DSC) para os ensaios 01 (em azul), 02 (em vermelho) e 03 (em preto).

Os cristais obtidos a partir da solução de xilitol (ensaio 01) apresentaram 99,87% de pureza, ponto de fusão de 94,34 °C e calor de fusão de 283,16 J/g, valores muito próximos aos citados por Martinez (2005) para o xilitol com qualidade alimentícia (99,8%, 93,61 °C e 259,66 J/g, respectivamente). Os cristais obtidos nos ensaios 02 e 03, com caldo fermentado de palha de trigo e com solução de xilitol, apresentaram 95,89 e 95,33% de pureza, ponto de fusão de 92,87 e 91,56 °C e calor de fusão de 244,79 e 177,20 J/g, respectivamente, valores inferiores aos do xilitol com qualidade alimentícia.

Os produtos dos 02 primeiros ensaios, onde se obteve maior quantidade de cristais (Tabela 31), também foram caracterizados granulometricamente por peneiramento. Pela diferença de massa entre as peneiras vazias e as peneiras contendo os cristais de xilitol, determinou-se a massa retida em cada faixa de tamanho. A partir da distribuição mássica (%) e do programa “Vitac 49”, de acordo com a função gama modificada (equação 03), foi possível calcular a distribuição granulométrica acumulada ($M(L)$) e os valores de z para os dois primeiros ensaios de cristalização de xilitol, os quais estão apresentados na Tabela 32.

Tabela 32 Distribuição granulométrica acumulada ($M(L)$) e valores de z dos ensaios de cristalização de xilitol a partir de uma solução de xilitol pura e do caldo obtido da fermentação do hidrolisado de palha de trigo.

		L (mm)							
ensaios		0,05	0,106	0,177	0,25	0,297	0,42	0,59	0,71
01	$M(L)$	100	86,23767	71,25411	47,95679	35,74448	17,9427	8,642555	6,106153
	z	0,000000	1,970671	2,707033	3,770359	4,411512	5,706022	6,912806	7,451443
02	$M(L)$	100	58,63014	31,23288	9,808219	1,205479	0,931507	0,547945	0,164384
	z	0,000000	3,273039	4,683243	6,711801	9,789156	10,141752	10,855717	12,428626

01- Solução de xilitol pura; 02- 30% caldo + 70% solução xilitol

z - adimensional de tamanho

As Figuras 31 e 32 apresentam as distribuições granulométricas ($M(L)$) e os valores de z em função do tamanho dos cristais (L), respectivamente.

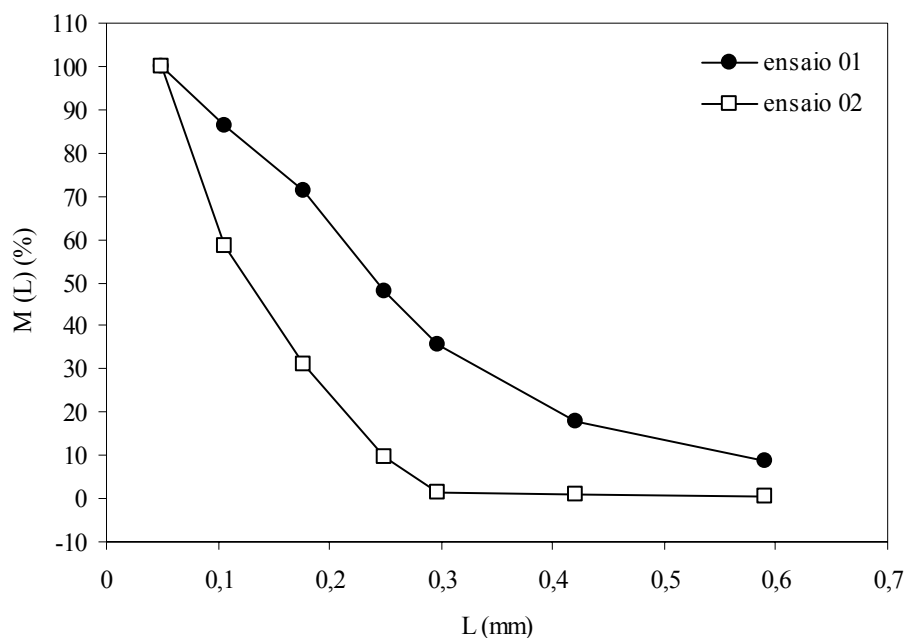


Figura 31 Distribuições granulométricas ($M(L)$) em função do tamanho dos cristais (L) para os ensaios 01 (solução de xilitol pura) e 02 (30% caldo + 70% solução de xilitol).

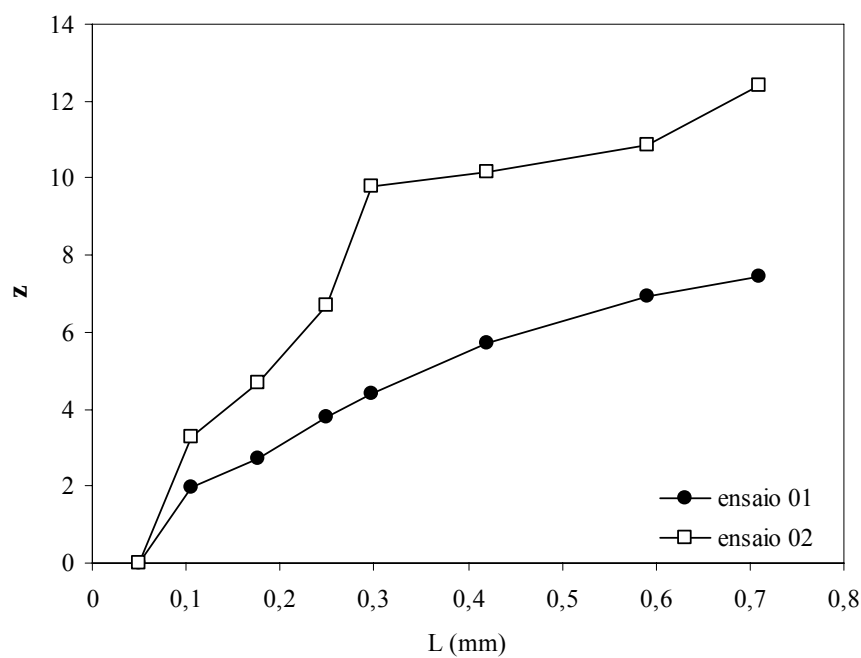


Figura 32 Valores de z em função do tamanho dos cristais (L) para os ensaios 01 (solução de xilitol pura) e 02 (30% caldo + 70% solução de xilitol).

Pela Figura 31 pode-se observar que a condição correspondente ao ensaio 02, mistura de 30% caldo com 70% de solução de xilitol, apresenta uma maior quantidade de cristais com tamanhos entre 0,05 e 0,25 mm enquanto que a condição correspondente ao ensaio 01, solução de xilitol pura, apresenta uma distribuição dos cristais ao longo do traçado. A Figura 32 apresenta valores de z em função do tamanho dos cristais (L). Para valores de $z = 3$, são observados valores de tamanhos médio (L_D) de 0,20 mm para o ensaio 01 (solução de xilitol) e de 0,10 mm para o ensaio 02 (mistura de 30% caldo com 70% de solução de xilitol). Também podemos observar na Figura 32 que existe linearidade para a distribuição granulométrica que representa os cristais formados a partir da solução de xilitol pura (ensaio 01) e que não existe linearidade para a distribuição realizada com caldo fermentado (ensaio 02), devido, principalmente, à aglomeração dos cristais de xilitol formados entre 0,05 e 0,25 mm. Devido a esta aglomeração, o tamanho médio dos cristais (L_D) observado no ensaio 02 foi menor que o tamanho médio observado no ensaio 01. Tal fato também foi observado por Martinez (2005), em que as distribuições granulométricas encontradas, utilizando-se caldo fermentado de bagaço de cana, também não apresentaram linearidade, produzindo aglomerações dos cristais em uma faixa de tamanho. Segundo Fernandes, Avelino e Farelo (1999), os cristais de xilitol obtidos possuem frações de aglomerados geralmente quando as cristalizações são realizadas a partir de soluções aquosas altamente concentradas.

Para a realização dos últimos cálculos de cristalização foi fixada a densidade do xilitol sólido em 1500 kg/m^3 e o fator de forma volumétrico dos cristais igual a 0,83, segundo Fernandes, Avelino e Farelo (1999). O tamanho dominante dos cristais (L_D), velocidade específica de crescimento (G) e velocidade específica de nucleação (dN/dT) foram calculados segundo a modelagem matemática desenvolvida por Nývlt et al. (1985), descrita anteriormente (equações 03 a 08). A densidade da mistura de solventes (água + etanol) foi considerada igual a 910 kg/m^3 (MARTINEZ, 2005). O tamanho dominante experimental (L_D)

foi calculado utilizando-se o critério proposto por Derenzo (2003): considera-se o L_N igual a zero pra z igual a zero e o tamanho médio L_D correspondente ao valor de z igual a três, definindo assim uma distribuição granulométrica hipotética para representar os experimentos.

Na Tabela 33 estão apresentados os tempos de cristalização (t_c), as massas de xilitol cristalizada por massa de solvente (M), velocidades específicas de crescimento (G) e velocidades específicas de nucleação (dN/dT) dos cristais de xilitol para os ensaios 02 e 03. Derenzo (2003) e Martinez (2005), em estudos do processo de cristalização de ácido adípico e xilitol, respectivamente, reportam valores de velocidade específica de crescimento e de nucleação da mesma ordem de grandeza que os obtidos neste trabalho.

Tabela 33 Tempos de cristalização (t_c), as massas de xilitol cristalizada por massa de solvente (M), velocidades específicas de crescimento (G) e velocidades específicas de nucleação (dN/dT) dos ensaios realizados.

Ensaio	t_c (min)	M (kg/m ³)	G (m/s)	dN/dT (#/m ³ S)
01	200	403,59	$54,70 \times 10^{-8}$	$1,59 \times 10^7$
02	150	266,18	$37,41 \times 10^{-8}$	$10,38 \times 10^7$

01- Solução xilitol pura; 02- 30% caldo + 70% solução xilitol

Para simples comparação, a Figura 33 apresenta os cristais formados nos três ensaios realizados, com solução de xilitol pura, mistura de 30% caldo fermentado com 70% de solução de xilitol e mistura de 50% caldo com 50% de solução de xilitol. Pode-se verificar a diferença na coloração dos cristais obtidos. À medida que aumenta a proporção de caldo na cristalização, aumenta a quantidade de impurezas presentes, aumentando a coloração da amostra.

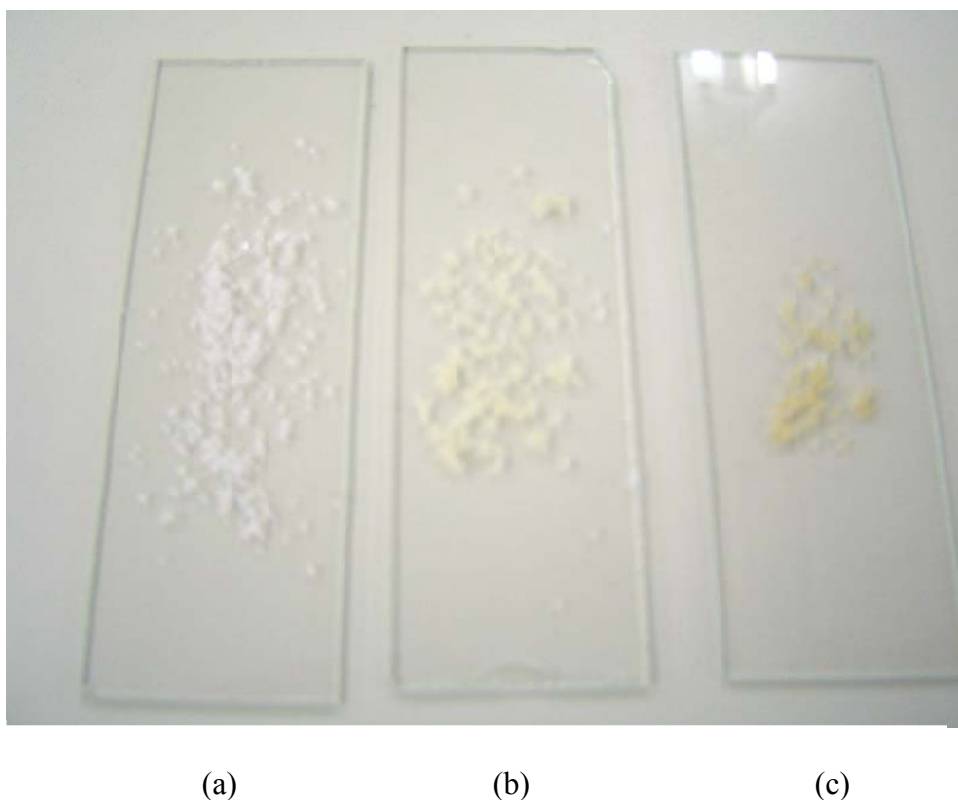
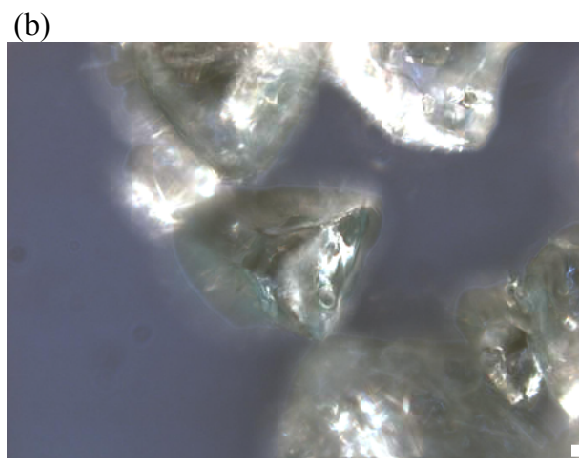
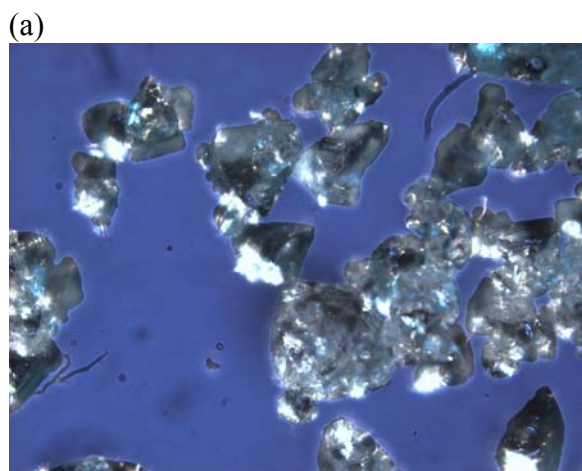


Figura 33 Cristais de xilitol obtidos da solução de xilitol pura (a), de 30% caldo fermentado com 70% de solução de xilitol (b) e de 50% caldo fermentado com 50% de solução de xilitol (c).

As Figuras 34, 35 e 36 apresentam fotografias em microscópio ótico (MO) e microscópio eletrônico de varredura (MEV) dos cristais de xilitol obtidos durante as cristalizações dos três primeiros ensaios.



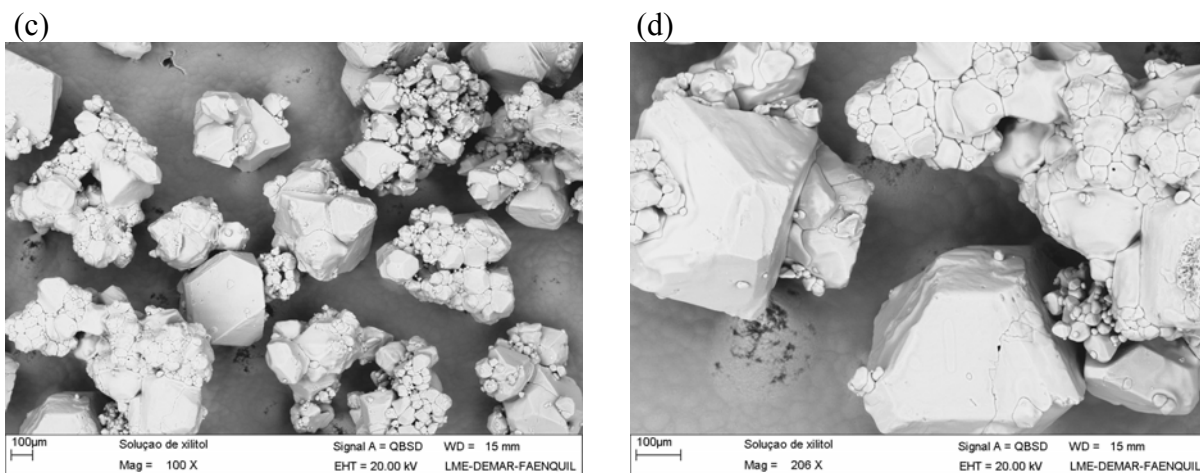


Figura 34 Cristais de xilitol obtidos da solução de xilitol pura a temperatura de saturação de 40 °C e velocidade de resfriamento de 0,2 °C/min. MO: (a) 40x e (b) 100x; MEV: (c) 100x e (d) 200x.

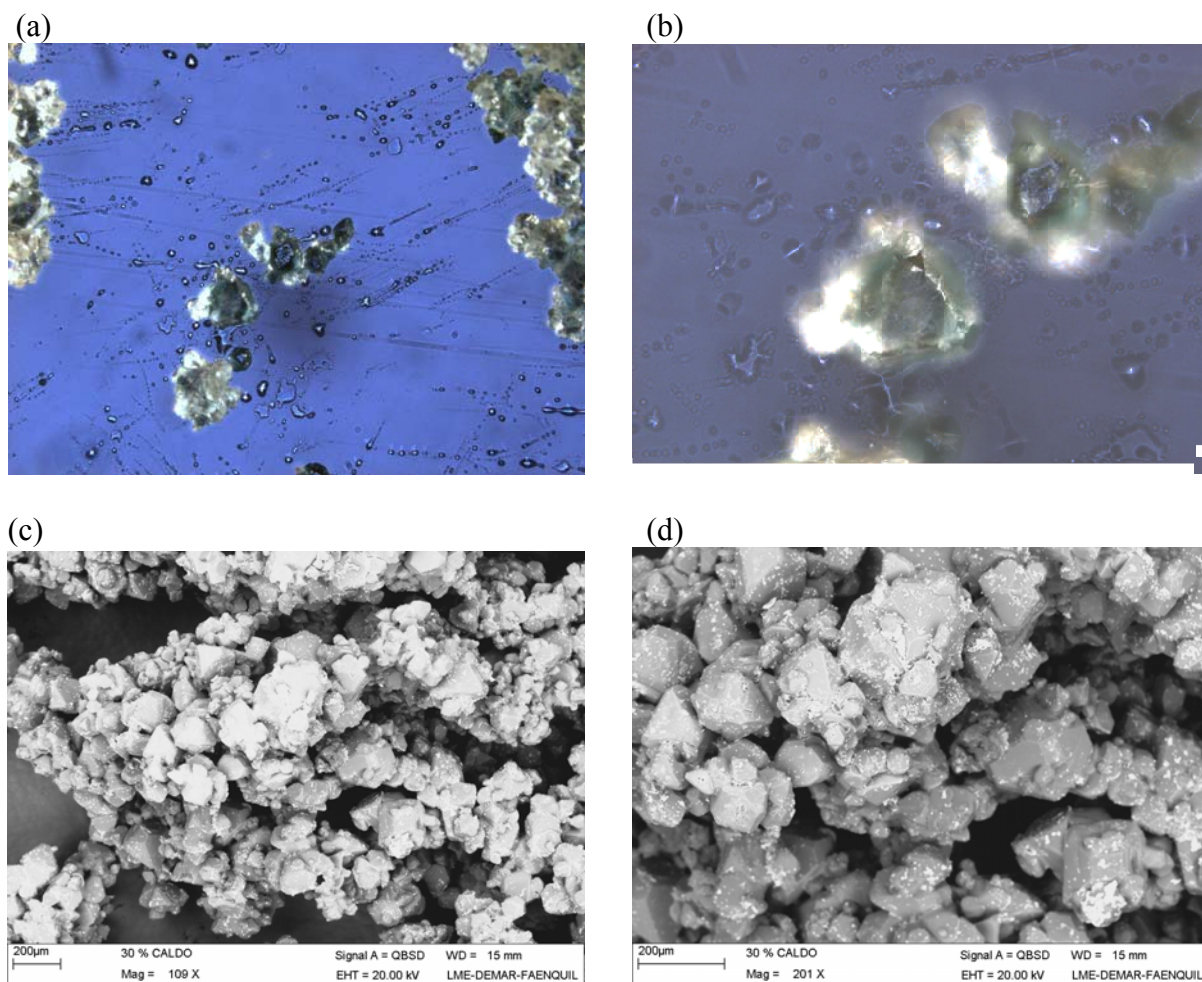


Figura 35 Cristais de xilitol obtidos de 30% do caldo com 70% da solução de xilitol a temperatura de saturação de 40 °C e velocidade de resfriamento de 0,2 °C/min. MO: (a) 40x e (b) 100x; MEV: (c) 100x e (d) 200x.

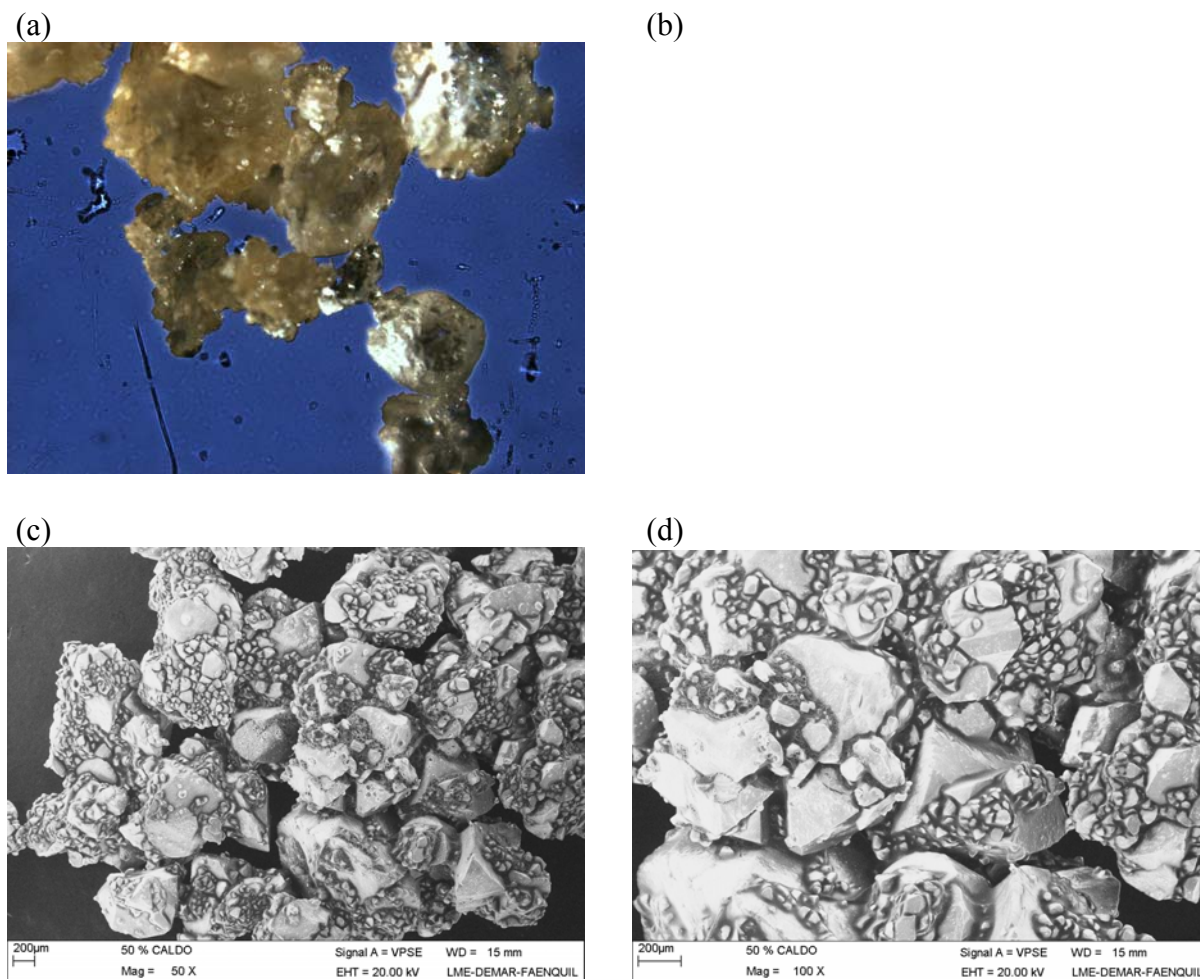


Figura 36 Cristais de xilitol obtidos de 50% do caldo com 50% da solução de xilitol a temperatura de saturação de 50 °C e velocidade de resfriamento de 0,4 °C/min. MO: (a) 40x; MEV: (c) 50x e (d) 100x.

Verifica-se que os cristais obtidos no ensaio 01 apresentam formas hexagonais. Fernandes, Avelino e Farelo (1999) observaram formas similares para cristais de xilitol obtidos a partir de soluções aquo-etanólicas contendo arabitól e adonitol. Tal comportamento também foi observado por Martinez (2005) para cristais de xilitol a partir da fermentação de meio sintético. Os ensaios 02 e 03 apresentaram aglomerados de cristais, resultados de cristalizações a partir de soluções altamente viscosas (FERNANDES; AVELINO; FARELO, 1999), conforme mencionado anteriormente. Fernandes, Avelino e Farelo (1999) também atribuem à aglomeração dos cristais à composição do liquor-mãe empregado. Esses aglomerados resultam do agrupamento aleatório dos cristais, que vão crescendo juntos,

criando assim formas irregulares. Resultados similares também foram reportados por Derenzo (1994), em estudos da cristalização de ácido adípico, e por Martinez (2005) na cristalização de xilitol a partir de caldo fermentado de bagaço de cana.

O último fato observado foi a diferença nos tamanhos dos cristais formados a partir do caldo fermentado. Quanto maior a porcentagem de caldo na composição do meio a ser cristalizado (de 30% para 50%), maiores foram os cristais formados. Com isso, não foi possível visualizar no microscópio ótico com aumento de 100 vezes os cristais formados no ensaio 03 (50% de caldo com 50% de solução).

Espera-se a partir dos resultados obtidos ter contribuído para o desenvolvimento de um processo de produção de xilitol, desde a etapa de hidrólise até a cristalização, tecnicamente e economicamente viável, a partir de hidrolisado de palha de trigo.

6 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- A produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo por *Candida guilliermondii* FTI 20037 é influenciada pela suplementação do hidrolisado com farelo de arroz, pelo fator de concentração do hidrolisado, pelo pH inicial de fermentação, pela concentração de carvão ativo empregada na destoxificação do hidrolisado e pela fonte de carbono utilizada para a obtenção do inóculo. Os maiores valores de concentração final ($P = 30,5$ g/L), produtividade volumétrica ($Q_P = 0,42$ g/L.h) e fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S} = 0,59$ g/g) foram obtidos utilizando-se: 5,0 g/L de farelo de arroz, fator de concentração do hidrolisado igual a 3,0, pH 6,0 no início da fermentação, 2,5% de carvão ativo para destoxificação do hidrolisado e glicose como fonte de carbono para obtenção do inóculo.
- O uso da metodologia de resposta permitiu obter modelos empíricos que correlacionam a produção de xilitol com pH inicial de fermentação (D) e fator de concentração do hidrolisado (E), dados pelas seguintes equações:

$$P = 6,35268 + 4,06458 D - 5,94653 E - 1,78125 DE$$

$$Q_P = 0,0885249 + 0,0552778 D - 0,0825 E - 0,025 DE$$

$$Y_{P/S} = 0,175039 + 0,0722222 D - 0,1451389 E - 0,02625 DE$$
- O uso de resinas de troca iônica permitiu clarificar o caldo fermentado. Os melhores resultados em termos de redução da coloração (99,5%) e remoção de fenóis totais (93%), ácido acético (97%) e sólidos totais (67%) foram obtidos quando as resinas aniônicas A-860S e A-500PS, regeneradas com solução de NaOH a 10%, foram utilizadas em sequência.

- Após concentração, o caldo clarificado foi submetido a cristalização por resfriamento linear, utilizando-se água-etanol como solvente. Esta metodologia, que permitiu obter cristais com 99,87% de pureza com solução de xilitol pura, propiciou cristais com 95,89% e 95,33% de pureza, com misturas de 30% de caldo clarificado com 70% de solução de xilitol e de 50% de caldo clarificado com 50% de solução de xilitol, respectivamente. Entretanto não foi possível obter cristais de xilitol com mistura de 70% de caldo clarificado com 30% de solução de xilitol e com caldo fermentado puro.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar detalhadamente a influência da agitação e da aeração em fermentadores de 2 L e 16 L ;
- Durante a clarificação do caldo fermentado, observou-se pouca remoção dos fenóis e sólidos totais, além de perdas em xilitol. Sugere-se para trabalhos futuros que sejam realizados novos estudos na etapa de clarificação, com os objetivos de eliminar estes compostos tóxicos, uma vez que, a presença deles pode ter influenciado na etapa da cristalização, e de não haver perdas em xilitol, o que é indesejável neste processo;
- Estudar o processo de cristalização do xilitol obtido a partir do caldo fermentado da palha de trigo, quanto à solubilidade, solventes, temperatura de saturação e velocidade de resfriamento linear;
- Realizar o estudo da influência da concentração de arabinose, arabitol e xilose na cristalização de xilitol em água-etanol;
- Realizar a análise da viabilidade econômica da produção de xilitol, desde a etapa de hidrólise até a etapa de cristalização.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, L.A.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; SILVA, S.S.; PRATA, A.M.R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70-72, p.89-98, 1998.
- AMARTEY, S.; JEFFRIES, T. An improvement in *Pichia stipitis* fermentation of acid-hydrolyzed hemicellulose achieved by overliming (calcium hydroxide treatment) and strain adaptation. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.12, p.281-283, 1996.
- APPLEXION (Groupe Novasep). Technologies, Íon-exchange: Adsorption, continuous process, equipment and products. Disponível em: www.novasep.com. Acessado em: fevereiro 2006.
- BANDON, D.; PRÉVOST, J.; NANCY, J.; SUSINI, G.; BONFIL, J.J. Complications rhinopharyngiennes chez l'enfant. Role de certains facteurs particuliers, dont la consommation de sucre. **Journal of Dental**, v.40, p.509-519, 2003.
- BAR, A. Xylitol. In: O'BRIEN NABORS, L.; GELARDI, R.C. **Alternative Sweeteners**. New York: Marcel Dekker, 1986. p.185-216.
- BARBOSA, M.F.S.; MEDEIROS, M.B.; MANCILHA, I.M.; SCHNEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, p.241-251, 1988.
- BECKETT, S.T.; MILLER, M.M.; GRIMES, S.; DONALDSON, J. **Crystallization of sugars**. United States Patent, US 6.579.375 B2, Pub 17.06.03.
- BELTER, P.; CUSSLER, E.L.; HU, W. **Bioseparation Downstream Process for Biotechnology**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1988, 368p.
- BICHO, P. A.; RUNNALS, P. L.; CUNNIGHAM, J. D.; LEE, H. Introduction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Pachysolen tannophilus* and *Pichia stipitis* on mixed sugars. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.1, p.50-54, 1988.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistic for experimenters: An introduction to design, data analysis and model building**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1978, 653p.
- BRUINENBERG, P.M.; de BOT, P.H.M.; van DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.19, p.256-260, 1984.
- CANETTIERI, E.V. **Aproveitamento do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto para produção de xilitol utilizando projeto de experimentos**. 1998. 97p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 1998.

- CANETTIERI, E.V.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A. Application of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.24, p.159-168, 2001.
- CANETTIERI, E.V.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, v.38, n.3, p.323-331, 2002.
- CANETTIERI, E.V. **Obtenção dos parâmetros e estudo cinético da hidrólise ácida dos resíduos florestais de eucalipto**. 2004. 79p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia, UNESP, Guaratinguetá, 2004.
- CANILHA, L. **Aproveitamento do hidrolisado de palha de trigo para a obtenção de xilitol por via microbiana**. 2002. 79p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2002.
- CANILHA, L.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A.; CARVALHO, W. Batch xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate using *Candida guilliermondii* in a stirred tank reactor. **Biotechnology Letters**, v.25, p.1811-1814, 2003.
- CANILHA, L.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; SOLENZAL, A.I.N. Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption and ion-exchange resins for xylitol production. **Process Biochemistry**, v.39, p.1909-1912, 2004.
- CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; LOPES, S.; PARAJO, J.C.; PEREIRA H.; GÍRIO, F.M. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM 941. **Process Biochemistry**, v.40, p.1215-1223, 2005.
- CARVALHO, G.B.M. **Utilização de carvão ativo, resinas e terra diatomácea para o tratamento do hidrolisado de eucalipto na produção biotecnológica de xilitol**. 2005. 110p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2005.
- CARVALHO, R.; MARTON, J.M.; FELIPE, M.G.A. Avaliação do sistema combinado de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica para sua utilização como meio de fermentação. **Revista Analytica**, n.18, p.48-55, 2005.
- CARVALHO, W.; SILVA, S.S.; SANTOS, J.C.; CONVERTI, A. Xylitol production by Calcium alginate entrapped cells: comparison of different fermentation system. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p.553-559, 2003.
- CARVALHO, W. **Estudo da obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana com células imobilizadas em gel de alginato de cálcio**. 2004. 110p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2004.
- CARVALHO, W.; CANILHA, L.; MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; MORALES, M.L.V.; SOLENZAL, A.I.N. Detoxification of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate with ion-exchange resins for xylitol production by calcium alginate-entrapped cells. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.79, p.863-868, 2004.
- CARVALHO, W.; SANTOS, J.C.; CANILHA, L.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S. A study on xylitol production from sugarcane

- bagasse hemicellulosic hydrolysate by Ca-alginate entrapped cells in a stirred tank reactor. **Process Biochemistry**, v.39, p.2135-2141, 2004.
- CONSIDINE, D.M. **Chemical and Process Technology Encyclopedia**. New York: MacGraw-Hill, 1974.
- De FAVERI, D.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; Del BORGHI, M. Xylitol recovery by crystallization from synthetic solutions and fermented hemicellulose hydrolysates. **Chemical Engineering Journal**, v.90, p.291-298, 2002.
- De FAVERI, D.; TORRE, P.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Optimization of xylitol recovery by crystallization from synthetic solutions using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v.61, p.407-412, 2004.
- DECOW, F.J. **Separation and Purification Techniques in Biotechnology**. New Jersey: Noyes Publications, 1989, 490p.
- DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Fermentation of D-xylose, D-glucose, L-arabinose mixture by *Pichia stipitis*. Effect of the oxygen transfer rate on fermentation performance. **Biotechnology and Bioengineering**, v.34, p.398-402, 1989.
- DERENZO, S. **Estudo da cristalização de ácido adípico em batelada, por resfriamento e em escala de laboratório**. 1994. 162p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), EPUSP, São Paulo, 1994.
- DERENZO, S. **Cristalização de ácido adípico em diferentes solventes**. 2003. 181p. Tese (Doutorado em Engenharia Química), UFSCar, São Carlos, 2003.
- DUNNING, J.W.; DALLAS, D.E. Analytical procedures for control of saccharification process. **Analytical Chemistry**, v.21, n.6, 727-729p, 1949.
- EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). Embrapa trigo. Estatísticas. Tabelas: área plantada de trigo no Brasil e Produção de trigo no Brasil. Disponível em: www.cnpt.embrapa.br. Acessado em: abril 2005.
- FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; VITOLO, M.; ROBERTO, I.C.; SILVA, S.S.; ROSA, S.A.M. Preparation of xylitol by fermentation of a hydrolysate of hemicellulose obtained from sugarcane bagasse. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.36, n.1, p.103-114, 1993.
- FELIPE, M.G.A.; VIEIRA, D.C.; VITOLO, M.; SILVA, S.S.; ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xilitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v.35, n.3, p.171-177, 1995.
- FELIPE, M.G.A.; ALVES, L.A.; SILVA, S.S.; ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M.; ALMEIDA e SILVA, J.B. Fermentation of Eucalyptus hemicellulosic hydrolysate to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Bioresource Technology**, v.56, p.281-283, 1996.
- FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.18, p.251-254, 1997a.

- FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: Effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, v.13, n.1/2, p.11-14, 1997b.
- FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989, 613p.
- FERNANDES, C.; AVELINO, A.; FARELO, F. Crystallization of xylitol from hydro-alcoholic solutions containing arabitol and adonitol. In: 14TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INDUSTRIAL CRYSTALLIZATION, University of Cambridge, 1999.
- GALES, M.A.; NGUYEN, T.M. Sorbitol compared with xylitol in prevention of dental caries. **Annals of Pharmacotherapy**, v.34, n.1, p.98-100, 2000.
- GARDE, A.; JONSSON, G.; SCHMIDT, A.S.; AHRING, B.K. Lactic acid production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology**, v.81, p.217-223, 2002.
- GINORIS, Y.P. **Avaliação de tratamentos do hidrolisado de eucalipto para a produção biotecnológica de xilitol**. 2001. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2001.
- GIRIO, F.M.; AMARO, C.; AZINHEIRAL, H.; PELICA, F.; AMARAL-COLLAÇO, M.T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v.71, n3, p.245-251, 2000.
- GIULIETTI, M.; SECCKLER, M.; DERENZO, S.; RÉ, M.I.; CEKINSKI, E. Industrial crystallization and precipitation from solutions: state of the technique. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.18, n.4, p.423-440, 2001.
- GOLDSTEIN, C.H.; GLAYPOOL, T.A.; Mc CRACKEN, L.D.; MAUN, C.M.; UENG, P.P.; TSAO, G.T. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v.5, p.85-102, 1978.
- GONG, C.; CHEN, L.F.; TSAO, G.T. Quantitative production of xylitol from D-xilose by a high xylitol producing yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2. **Biotechnology Letters**, v.3, n.3, p.125-130, 1981.
- GURGEL, P.V. **Avaliação de método de recuperação de xilitol obtido por via fermentativa**. 1993. 84p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), DTA, UFV, Viçosa, 1993.
- GURGEL, P.V.; MANCILHA, I.M.; PEÇANHA, R.P.; SIQUEIRA, J.F.M. Xylitol recovery from fermented sugarcane bagasse hydrolysate. **Bioresource Technology**, v.52, p.219-223, 1995.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, p.933-942, 1994.
- HAMILTON, F.; LEOPOLD, B. Pulp and paper manufacture, **Joint Textbook Committee of the Paper Industry**, v.3, p.82-84, 1987.

- HAO, H.; HOU, B.; WANG, J.K.; LIN, G. Effect of solvent on crystallization behavior of xylitol. **Journal of Crystal Growth**, v.290, p.192-196, 2006.
- HARLAND, C.E. **Ion Exchange: Theory and Practice**. 2nd ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994, 285p.
- HEIKKILÄ, H.; NURMI, J.; RAHKILA, L.; TOYRYLA, M. **Method for the production of xylitol**, WO 5.081.026, Pub 14.01.92.
- HEIPIEPER, H.J.; WEBER, F.J.; SIKKEMA, J.; KEWELO, H.; DE BONT, J.A.M. Mechanism of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends in Biotechnology**, v.12, p.409-415, 1994.
- HON, D.N.S. **Chemical modification of lignocellulosic materials**. New York: Marcel Dekker, 1996, 370p.
- HYVÖNEN, L.; KOIVISTOINEN, P.; VOIROL, F. Food technological evaluation of xylitol. **Advances in Food Research**, v.28, p.373-403, 1982.
- ICIDCA (Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar). Manual de los Derivados de la Caña de Azúcar, Tercera Edición, Habana, Imprenta MINAZ, 2000, 458p.
- IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas). Apostila: Tecnologia da Cristalização. São Paulo, Divisão de Química, Agrupamento de Processos Químicos, 2004.
- IRICK, T.J.; WEST, K.; BROWNELL, H.H.; SCHWALD, W.; SADDLER, J.N. Comparison of colorimetric and HPLC techniques for quantitating the carbohydrate components of steam-treated wood. Scientific note. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.17, p.137-149, 1988.
- KIM, H.S.; JEFFREY, G.A. The crystal structure of xylitol. **Acta Crystallografica**, B25, p.2607-13, 1969.
- KIM, J.H.; RYU, Y.W.; SEO, J.H. Analysis and optimization of a two-substrate fermentation for xylitol production using *Candida tropicalis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.181-186, 1999.
- KLINKE, H.B.; A.B.; AHRING, B.K; SCHMIDT, A.S.; THONSEN, A.B. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation wheat straw. **Bioresource Technology**, v.82, p.15-26, 2002.
- KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: Current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.13, n.2, p.151-172, 1993.
- KUSUMEGI, K.; YOSHIDA, H.; TOMIYAMA, S. Inhibitory effects of acetic acid on respiration and growth of *Zygosaccharomyces rouxii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.85, n.1, p.21-25, 1998.
- LAM, M.; RIEDY, C.A.; COLDWELL, S.E.; MILGROM, P.; CRAIG, R. Children's acceptance of xylitol based food. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v.28, p.97-101, 2000.

- LARSSON, S.; PALMQVIST, E.; HÄGERDAL, B.H.; TENGBORG, C.; STENBERG, K.; ZACCHI, G.; NILVEBRANT, N.O. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**, v.24, p.151-159, 1999a.
- LARSSON, S.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N.; JÖNSSON, L.J. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77-79, p.91-103, 1999b.
- LEE, W.J.; RYU, Y.W.; SEO, J.H. Characterization of two substrate fermentation processes for xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene. **Process Biochemistry**, v.35, p.1199-1203, 2000.
- LEE, W.J.; KIM, M.D.; YOO, M.S.; RYU, Y.W.; SEO, J.H. Effects of xylose reductase activity on xylitol production in two-substrate fermentation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, p.725-730, 2003.
- LIDE, D.R.; MILNE, G.W.A. Properties of organic compounds. CRC: Press, Boca Raton, 1996. (CD-ROM).
- LIMA, L.H.A.; FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; TORRES, F.A.G. Effect of acetic acid present in sugarcane bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v.65, p.734-738, 2004.
- LINGSTROM, P.; LUNDGREN, F.; BIRKHED, D.; TAKAZOE, I.; FROSTELL, G. Effects of frequent mouth rinses with palatinose and xylitol on dental plaque. **European Journal of Oral Sciences**, v.105, n.2, p.162-169, 1997.
- LOHMEIER-VOGEL, E.M.; SOPHER, C.R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.20, p.75-81, 1998.
- MAGEE, R.J.; KOSARIC, N. Bioconversion of hemicellulosics. **Advances in Biomechanical Engineering and Biotechnology**, v.32, p.60-93, 1985.
- MAKINEN, K.K. Xylitol: The sugar that prevents tooth decay. **The Futurist**, v.10, n.3, p.135-139, 1976.
- MAKINEN, K.K. Can the pentose-hexitol theory explain the clinical observation made with xylitol? **Medical Hypotheses**, v.54, n.4, p.603-613, 2000.
- MANCILHA, I.M.; KARIM, M.N. Evaluation of ion exchange resins for removal of inhibitory compounds from corn stover hydrolysate for xylitol fermentation. **Biotechnology Progress**, v.19, p.1837-1841, 2003.
- MANTELATTO, P.E. **Estudo do processo de cristalização de soluções impuras de sacarose de cana-de-açúcar por resfriamento**. 2005. 235p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFSCar, São Carlos, 2005.
- MANZ, U.; VANNINEN, E.; VOIROL, F. Xylitol - Its properties and use as a sugar substitute in foods. In: FOOD R. A. SYMP. SUGAR AND SUGAR REPLACEMENTS, London, 1973.

- MARTÍN, C.; GALBE, M.; NILVEBRANT, N.O.; JONSSON, L.J. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using different impregnating agents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.98/100, p.699-716, 2002.
- MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M.E.; WELLS, M.L.; YORK, S.W.; PRESTON, J.F.; INGRAM, L.O. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. **Biotechnology Progress**, v.17, p.287-293, 2001.
- MARTINEZ, E.A.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. Effect of the oxygen transfer coefficient on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by continuous stirred-tank reactor fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84-86, p. 1-9, 2000.
- MARTINEZ, E.A.; VILLARREAL, M.L.M.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; NÁPOLES, A.I.S.; CANILHA, L.; MUSSATO, S.I. Uso de diferentes materias primas para la producción biotecnológica de xilitol. **Ciencia y Tecnología de los Alimentos**, v.3, p.295-301, 2002.
- MARTINEZ, E.A.; SILVA, S.S.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; NÁPOLES, A.I.S.; FELIPE, M.G.A. The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v.38, p.1677-1683, 2003.
- MARTINEZ, E.A. **Estudo do processo de cristalização de xilitol obtido por via fermentativa**. 2005. 165p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2005.
- MARTINEZ, E.A.; GIULIETTI, M.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; NÁPOLES, A.I.S.; DERENZO, S. Estudio de la cinética de cristalización del xilitol. Efecto de la velocidad de enfriamiento. **Ingeniería Química**, n° 422, p.88-96, 2005.
- MARTON, J.M. **Avaliação de diferentes carvões ativados e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para a obtenção biotecnológica de xilitol**. 2002. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2002.
- MATOS, G.S. **Adaptação e reciclagem de células de *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar: efeito sobre as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase**. 2004. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2004.
- MATTILA P.T.; SVANBERG M.J.; JAMSA T.; KNUUTTILA M.L.E. Improved bone biomechanical properties in xylitol-fed aged rats. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v.51, n.1, p.92-96, 2002.
- MATTILA P.T.; KANGASMAA, H.; KNUUTTILA M.L.E. The effect of a simultaneous dietary administration of xylitol and ethanol on bone resorption. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v.55, p.548-551, 2005.
- MELAJA, A.J., HÄMÄLÄINEN, L. **Process for making xylitol**. U.S.4.008.285, Dep.18.06.75, Pub.15.02.77.
- MEYRIAL, V.; DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*: Fermentation behaviour. **Biotechnology Letters**, v.13, n.4, p.281-286, 1991.

- MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; LADISCH, M. Features of promising technologies for treatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.96, p.673-686, 2005.
- MONTEIRO, J.B.R. Crescimento de *Trichoderma reesei* e *Rhizopus oligosporus* em bagaço de cana-de-açúcar para produção de proteína. 1986. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), DTA, UFV, Viçosa, 1986.
- MORITA, T.A.; SILVA, S.S. Inhibition of microbial xylitol production by acetic acid and its relation with fermentative parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84-86, p.801-808, 2000.
- MULLIN, J.W. **Crystallization**. Fourth Edition. Oxford: Butterworth-Heinemann, 2001. 594p.
- MUSSATO, S.I. **Influência do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz na produção de xilitol por *Candida guilliermondii***. 2002. 173p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2002.
- NÁPOLES, I.; SILVA, S.S.; MANCILHA, I.M.; FELIPE, M.G.A.; ACOSTA, E.M.; VILLA, P.; CEPERO, I.; GONZÁLEZ, M.; MANGANELLY, E. Application of ion-exchange resins to upstream processing of sugarcane bagasse hydrolysate for its utilization in bioprocesses. In: 2ND EUROPEAN SYMPOSIUM ON BIOCHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, Porto, 1998.
- NILVEBRANT, N.O.; REIMANN, A.; LARSSON, S.; JONSSON, L.J. Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.91-93, n.1, p.35-49, 2001.
- NOLLEAU, V.; PREZIOSI-BELLOY, L.; NAVARRO, J.M. The reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*: incidence of oxygen and pH. **Biotechnology Letters**, v.17, n.4, p.417-422, 1995.
- NÝVLT, J.; SONHEL, O.; MATUCHOVA, M.; BROUL, M. **The Kinetics of Industrial Crystallization**. Praga, 1985, 35p.
- NÝVLT, J.; HOSTOMSKÝ, J.; GIULIETTI, M. **Cristalização**. São Carlos: Editora da UFSCar, 2001, 160p.
- OH, D.K.; KIM, S.Y.; KIM, J.H. Increase of xylitol production rate by controlling redox potential in *Candida parapsilosis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.58, n.4, p.440-444, 1998.
- OJAMO, H.; YLINEN, L.; LINKO, M. **Process for the preparation of xylitol from xylose by cultivation *Candida guilliermondii***. WO 88.05467, Dep.08.12.87, Publ.28.07.88.
- OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p. 312-331, 1996.
- ONISHI, H.; SUZUKI, T. The production of xylitol, L-arabinitol and ribitol by yeasts. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.30, n.11, p.1139-1144, 1966.

- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v.74, p.25-33, 2000.
- PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v.65, p.191-201, 1998a.
- PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulosic hydrolysates. **Bioresource Technology**, v.66, p.25-40, 1998b.
- PERRY, R.H; GREEN, D.W. **Perry's Chemical Engineering Handbook**. Seven Edition. Nova York: Mc Graw-Hill, 1997.
- PFEIFER, M.J.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M. Effect of culture conditions on xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI20037. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57/58, p. 423-430, 1996.
- PREZIOSI-BELLOY, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J.M. Xylitol production from aspenwood hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v.22, p.239-243, 2000.
- RIBEIRO, M.H.L.; LOURENÇO, P.A.S.; MONTEIRO, J.P.; FERREIRA-DIAS, S. Kinetics of selective adsorption of impurities from a crude vegetable oil in hexane to activated earth and carbons. **European Food Research and Technology**, v.213, n.2, p.132-138, 2001.
- ROBERTO, I.C.; FELIPE, M.G.A.; LACIS, L.S.; SILVA, S.S.; MANCILHA, I.M. Utilization of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource Technology**, v.36, p.271-275, 1991.
- ROBERTO, I.C.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate for the production of xylitol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57/58, p.339-347, 1996a.
- ROBERTO, I.C.; SATO, S.; MANCILHA, I.M. Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.16, p.348-350, 1996b.
- ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Influence of k_{La} on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. **Bioprocess Engineering**, v.21, p.505-508, 1999.
- ROCHA, G.J.M. **Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio**. 2000. 136p. Tese (Doutorado em Química), IQSC, USP, São Carlos, 2000.
- RODRIGUES, R.C.L.B. **Avaliação das condições de concentração a vácuo do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar para a produção de xilitol**. 1999. 112p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 1999.
- RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P.V. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.18, n.3, p.299-311, 2001.

- RODRIGUES, R.C.L.B. **Efeito da relação glicose:xilose na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**. 2005. 82p. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Faculdade Inter-unidades, USP/BUTANTÃ/IPT, São Paulo, 2005.
- SAHA, B.C. Hemicellulosic bioconversion. **Journal of Industrial Microbial Biotechnology**, v.30, p.279-291, 2003.
- SAJJAN, U.; MOREIRA, J.; LIU, M.; HUMAR, A.; CHAPARRO, C.; FRSTNER, J.; KESHAVJEE, S. A novel model to study bacterial adherence to the transplanted airway: inhibition of *Burkholderia cepacia* adherence to human airway by dextran and xylitol. **The Journal Heart and Lung Transplantation**, v.23, n.12, p.1382-1391, 2004.
- SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme Microbial and Technology**, v.10, p.315-318, 1988.
- SANTOS, J.C.; CONVERTI, A.; CARVALHO, W.; MUSSATO, S.I.; SILVA, S.S. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process Biochemistry**, v.40, p.113-118, 2005.
- SEAGRI (Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária). Cultura Trigo - Importância e uso do trigo. Disponível em: www.bahia.ba.gov.br/seagri/Trigo.htm. Acessado em: abril 2005.
- SENE, L.; FELIPE, M.G.A.; SILVA, S.S.; VITOLO, M. Preliminary kinetic characterization of xylose reductase and xylitol dehydrogenase extracted from *Candida guilliermondii* FTI20037 cultivated in sugarcane bagasse hydrolysate from xylitol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.91-93, p.671-681, 2001.
- SHEN, P.; CAI, F.; NOWICKI, A.; VINCENT, J.; REYNOLDS, E.C. Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. **Journal of Dental Research**, v.80, n.12, p.2066-2070, 2001.
- SILVA, C.J.S.M.; ROBERTO, I.C. Statistical screening method for selection of important variables on xylitol biosynthesis from rice straw hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Biotechnology Techniques**, v.13, p.743-747, 1999.
- SILVA, C.J.S.M.; ROBERTO, I.C. Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v.36, p.1119-1124, 2001.
- SILVA, C.J.S.M.; MUSSATO, S.I.; ROBERTO, I.C. Study of xylitol production by *Candida guilliermondii* on a bench bioreactor. **Journal of Food Engineering**, v.75, p.115-119, 2006.
- SILVA, D.D.V. **Efeito do ácido acético na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**. 2001. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2001.
- SILVA, D.D.V. **Efeito da relação glicose:xilose na bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**. 2004. 82p. Tese

- (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2004.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de Alimentos: Métodos Químicos e Biológicos**. 3ª ed. Viçosa: Editora UFV, 2005.
- SILVA, S.S.; AFSCHAR, A.S. Microbial production of xylitol from D-Xylose using *Candida tropicalis*. **Bioprocess Engineering**, v.11, p.129-134, 1994.
- SILVA, S.S.; ROBERTO, I.C.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M. Batch fermentation of xylose for xylitol production in stirred tank bioreactor. **Process Biochemistry**, v.31, n.6, p.549-553, 1996.
- SILVA, S.S.; RIBEIRO, J.D.; FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M. Maximizing the xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by controlling the aeration rate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.63/65, p.557-564, 1997.
- SINGH, A.; MISHRA, P. Microbial pentose utilization. **Current applications in Biotechnology Progress in Industrial Microbiology**, v.33, 1995.
- SIRISANSANEYAKUL, S.; STANISZEWSKI, M.; RIZZI, M. Screening of yeasts for production of xylitol from D-Xylose. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.80, n.6, p.565-570, 1995.
- TAPIAINEN, T.; LUOTONEN, L.; KONTIOKARI, T.; RENKO, M.; UHARI, M. Xylitol administered only during respiratory infections failed to prevent acute otitis media. **Pediatrics**, v.109, n.2, p.U1-U6, 2002.
- THYGESEN, A.; THOMSEN, A.B.; SCHMIDT, A.S.; JORGENSEN, H.; AHRING, B.K.; OLSSON, L. Production of cellulose and hemicellulose-degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet-oxidized wheat straw. **Enzyme and Microbial Technology**, v.6266, p.1-10, 2003.
- TSAO, G.T. Cellulosic material as a renewable resource. **Process Biochemistry**, v.10, p.12-14, 1978.
- UHARI, M.; TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, v.19, n.144-147, Suppl. 1, 2000.
- VALERO, M.A.; LEÓN-SANZ, M.; ESCOBAR, I.; GOMIS, P.; de la CÁMARA, A.; MORENO, J.M. Evaluation of nonglucose carbohydrates in parental nutrition for diabetic patients. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.55, n.12, p.1111-1116, 2001.
- Van ROSMALEN, G.M.; BERMINGHAM, S.; BRUINSMA, D.; KRAMER, H.; DERENZO, S.; SECKER, M.; RÉ, M.I.; CEKINSKI, E.; GIULIETTI, M. **Apostila: Industrial Crystallization and Precipitation**. São Paulo: IPT-Tu Delft, 2004.
- VANDESKA, E.; AMARTEY, S.; KUZMANOVA, S.; JEFFRIES, T. Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.11, p.213-218, 1995.
- VIÑALS, M.V. **Aplicação de resinas de troca iônica no tratamento de hidrolisado hemicelulósico para processos fermentativos**. 2001. 79p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2001.

- VYGLAZOV, V.V.; KHOL'KIN, Y.I. Solubility in the system xylitol-ethanol-water and certain properties of saturated solutions. **Zhurnal Prikladnoi Khimi**, v.57, n.7, p.1651-1654, 1984.
- WALTHER, T.; HENSIRISAK, P.; AGBLEVOR, F.A. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. **Bioresource Technology**, v.76, n.3, p.213-220, 2001.
- WEATHERLEY, L.R. **Engineering Process for Bioseparations**. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd., 1994.
- WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.86, n.1, p.1-14, 1998.
- WOLFROM, M. L.; KOHN, E. J. Crystalline xylitol. **Journal of the American Chemical Society**, v.64, n.19, p.1739, 1942.
- YAHASHI, Y.; HORITSU, H.; KAWAI, K.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, K. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-glucose feeding. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.81, n.2, p. 148-152, 1996.
- YANTORNO, O. Aspectos tecnológicos del cultivo de microorganismos y células eucariotas, curso oferecido pelo CBABio (Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia) e CNPq, 17-28 outubro, 2005.
- YU, L.X.; LIONBERGER, R.A.; RAW, A.S.; D'COSTA, R.D.; WU, H.; HUSSAIN, A.S. Applications of process analytical technology to crystallization processes. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.56, p.349-369, 2004.

9 ANEXO

ANEXO 01 – Equações utilizadas para determinação da percentagem de separação de pentosanas, após o processo de hidrólise da palha de trigo (MUSSATO, 2002):

$$MSP = \frac{QPA \times HPA}{FC \times 100 \times VSA}$$

$$SPO = \frac{Xil + Arab}{MSP} \times 100$$

Em que:

MSP = Máxima separação de pentosanas (g/L)

QPA = Quantidade de palha seca (g)

HPA = Percentagem de hemicelulose da palha de trigo (%)

FC = Fator de conversão de xilana em xilose (0,88)

VSA = Volume de solução ácida (L)

SPO = Separação de pentosanas obtidas (%)

Xil = Concentração de xilose (g/L)

Arab = Concentração de arabinose (g/L)

MUSSATO, S.I. **Influência do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz na produção de xilitol por *Candida guilliermondii***. 2002. 173p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2002.

10 APÊNDICES

APÊNDICE 01 – Resultados das fermentações em frascos Erlenmeyer.

Tabela A1.1 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 1 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	37,22	87,31	13,74	0	3,06
24	33,73	75,15	10,80	0	3,27
48	33,96	75,76	10,93	0	2,50
72	26,49	75,09	10,89	0	1,96
96	0	74,40	13,69	1,74	1,54
120	0	65,12	13,43	2,07	1,28
144	0	59,88	12,82	4,66	0,78

Tabela A1.2 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 2 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	20,62	50,86	8,19	0	3,06
24	0	41,86	7,29	0,45	1,83
48	0	35,92	7,40	0,53	1,42
72	0	24,00	7,32	6,12	0,87
96	0	9,03	7,06	14,27	0
120	0	1,79	3,83	12,50	0
144	0	1,33	1,20	8,97	0

Tabela A1.3 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 3 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	19,93	48,95	7,93	3,68	3,06
24	0	41,56	7,35	0,52	2,23
48	0	32,52	7,75	2,30	2,14
72	0	18,66	6,97	7,54	0,72
96	0	4,69	6,55	15,15	0
120	0	0,34	3,01	11,88	0
144	0	0,32	0,84	8,94	0

Tabela A1.4 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 4 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	33,89	80,07	12,73	0	2,72
24	30,80	69,88	9,97	0	2,26
48	30,51	72,28	10,27	0	2,33
72	0,51	70,70	12,69	1,23	1,71
96	0	65,93	13,80	2,17	1,23
120	0	60,63	13,26	2,30	1,09
144	0	52,26	12,19	6,23	0

Tabela A1.5 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 5 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	20,18	48,21	7,64	0	2,70
24	0	36,57	6,85	0,80	1,75
48	0	30,14	7,35	1,55	1,48
72	0	20,87	6,94	2,98	1,34
96	0	10,59	6,78	4,37	0,94
120	0	2,93	5,81	5,09	0
144	0	1,91	1,81	2,13	0

Tabela A1.6 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 6 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	32,64	76,32	11,75	0	2,66
24	29,34	68,26	9,58	0	2,12
48	29,60	67,51	9,78	0	2,25
72	0	62,61	12,60	1,78	1,28
96	0	53,10	12,30	3,10	0,95
120	0	41,63	10,94	8,41	0
144	0	24,02	11,16	19,27	0

Tabela A1.7 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 7 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	31,53	73,86	11,46	0	2,53
24	29,64	67,81	9,61	0	2,11
48	19,44	68,05	10,09	0	1,51
72	0	64,07	12,07	1,33	1,55
96	0	59,32	12,12	1,78	1,13
120	0	49,90	11,19	5,66	0,48
144	0	32,33	11,79	16,83	0,66

Tabela A1.8 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 8 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	18,41	45,67	7,04	0	2,47
24	0	33,96	6,41	0,65	1,79
48	0	27,70	6,85	1,24	1,69
72	0	18,59	6,81	2,79	1,23
96	0	7,85	6,42	3,87	0,72
120	0	1,56	5,39	3,66	0
144	0	1,09	0,62	4,64	0

Tabela A1.9 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 9 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	19,38	52,28	8,42	0	3,00
24	0	35,47	7,90	2,26	2,27
48	0	18,22	6,87	11,98	1,35
72	0	2,06	6,40	22,54	1,09
96	0	0,64	5,12	21,87	0,69
120	0	0,26	4,42	21,60	0,59
144	0	0,10	3,45	21,45	0,88

Tabela A1.10 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 10 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	33,35	85,72	13,34	0	3,03
24	0	66,57	12,17	0,87	2,46
48	0	64,60	13,18	1,60	2,85
72	0	55,09	13,37	2,85	2,76
96	0	43,27	13,40	4,91	2,56
120	0	32,29	12,26	9,51	2,52
144	0	18,89	11,80	12,89	2,24

Tabela A1.11 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 11 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	33,00	81,91	12,99	0	3,43
24	0	68,60	12,51	0,92	2,46
48	0	64,43	13,39	1,27	2,73
72	0	52,80	11,58	2,26	2,77
96	0	41,64	12,11	5,02	2,45
120	0	28,38	12,02	10,64	2,48
144	0	14,65	12,12	15,69	1,94

Tabela A1.12 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 12 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	18,49	47,40	7,61	0	2,74
24	0	34,22	7,41	2,08	2,12
48	0	20,07	7,65	13,17	1,63
72	0	5,16	7,28	20,96	1,05
96	0	2,10	5,81	19,71	0,72
120	0	1,26	4,91	18,73	0
144	0	0,60	4,25	17,94	0

Tabela A1.13 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 13 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	26,32	70,42	11,06	0	2,64
24	0	66,86	12,39	0,88	2,58
48	0	57,96	12,24	1,58	2,58
72	0	47,66	11,05	2,84	2,77
96	0	36,04	10,86	5,74	2,40
120	0	24,60	10,81	11,17	2,57
144	0	12,15	10,49	15,14	2,25

Tabela A1.14 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 14 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	16,76	41,77	6,29	0	2,54
24	0	34,17	7,20	0,71	2,44
48	0	22,94	7,50	1,98	2,53
72	0	10,96	6,41	3,61	2,31
96	0	3,84	6,11	4,21	2,44
120	0	1,62	5,53	4,16	2,37
144	0	0,81	5,17	4,14	1,91

Tabela A1.15 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 15 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	16,21	42,31	6,27	0	2,47
24	0	32,03	7,33	1,08	2,27
48	0	20,5	6,84	3,46	2,14
72	0	6,36	6,28	7,01	2,05
96	0	0,54	5,15	7,23	1,37
120	0	0,24	3,07	6,12	0,47
144	0	0	1,71	5,51	0,58

Tabela A1.16 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 16 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	26,97	67,33	10,91	0	2,55
24	0	66,50	12,54	0,95	2,67
48	0	59,19	12,65	1,21	3,11
72	0	47,08	11,04	2,45	2,82
96	0	33,08	10,00	4,17	2,51
120	0	23,86	10,46	7,20	2,50
144	0	12,29	10,00	11,69	2,50

Tabela A1.17 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 17 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	23,17	55,62	8,97	0	2,15
24	0	52,65	9,96	0,48	2,08
48	0	44,06	10,52	1,19	2,37
72	0	31,60	9,17	2,54	2,12
96	0	18,18	8,56	4,36	2,11
120	0	7,83	8,57	6,24	2,07
144	0	2,24	7,82	6,20	2,00

Tabela A1.18 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 18 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	23,15	54,55	8,45	0	3,15
24	0	53,18	10,19	0,55	2,43
48	0	44,51	10,65	10,40	2,34
72	0	30,79	9,02	2,84	2,48
96	0	18,04	8,60	4,81	2,26
120	0	7,36	8,38	6,59	2,29
144	0	2,12	7,67	6,64	2,24

Tabela A1.19 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 19 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	23,55	56,86	9,07	0	2,36
24	0	53,22	10,13	0,47	2,21
48	0	43,87	10,64	1,16	2,41
72	0	31,79	10,17	3,64	2,49
96	0	17,21	8,81	5,05	2,26
120	0	6,37	8,23	6,61	2,17
144	0	1,80	7,83	6,54	1,93

Tabela A1.20 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 20 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	24,14	56,15	9,13	0	2,35
24	0	54,84	10,31	0,62	2,24
48	0	44,00	10,72	1,14	2,24
72	0	30,02	8,99	2,71	2,29
96	0	17,59	8,78	4,87	2,15
120	0	6,64	8,57	6,71	2,11
144	0	1,64	8,18	6,82	2,12

Tabela A1.21 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 21 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	24,42	55,80	8,90	0	2,40
24	0	54,04	10,25	0,55	2,29
48	0	43,74	10,59	0,98	2,40
72	0	29,65	8,76	2,43	2,23
96	0	18,91	8,77	4,50	2,11
120	0	7,92	8,51	5,99	2,18
144	0	2,20	7,81	6,07	2,09

Tabela A1.22 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 22 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	19,16	55,4	8,09	0	2,22
24	0	54,97	10,5	0,7	2,52
48	0	45,37	10,3	1,03	2,45
72	0	31,93	9,19	2,53	2,44
96	0	18,32	8,65	4,46	2,08
120	0	7,76	8,59	6,28	2,27
144	0	2,15	8,12	6,36	2,16

Tabela A1.23 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 23 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	19,86	54,53	8,03	0	2,04
24	0	53,86	10,21	0,54	2,40
48	0	42,69	10,51	1,15	2,30
72	0	27,65	8,76	2,54	2,14
96	0	15,87	8,57	4,60	2,00
120	0	5,45	8,70	6,24	2,18
144	0	1,25	7,76	5,91	1,86

Tabela A1.24 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 24 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	25,48	55,91	9,15	0	2,23
24	0	56,42	10,92	0,74	2,52
48	0	45,15	10,83	1,22	2,36
72	0	33,76	11,03	2,04	2,16
96	0	21,93	9,40	4,17	2,16
120	0	9,79	8,91	5,76	2,05
144	0	2,23	8,35	6,19	1,72

Tabela A1.25 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 25 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	24,36	53,22	7,81	0	2,26
24	0	53,10	10,11	0,51	2,41
48	0	42,26	10,12	1,03	2,29
72	0	3,10	7,11	5,78	1,18
96	0	1,22	5,21	5,37	0
120	0	0,31	1,05	3,39	0
144	0	0	0,49	6,01	0

Tabela A1.26 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 26 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	24,61	54,03	8,53	0	1,86
24	0	56,74	10,03	0,53	1,87
48	0	44,15	9,23	1,47	1,50
72	0	40,54	9,60	2,89	1,50
96	0	30,53	9,41	4,20	1,19
120	0	16,97	8,85	8,24	0,67
144	0	3,74	6,88	13,27	0

Tabela A1.27 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 27 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	24,08	56,44	9,02	0	2,38
24	0	53,22	10,76	1,04	2,40
48	0	37,46	9,15	2,11	2,36
72	0	23,48	8,79	4,90	2,21
96	0	10,72	8,69	7,58	2,17
120	0	1,95	7,76	9,57	2,33
144	0	0,83	7,66	9,95	2,04

Tabela A1.28 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 28 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	18,28	43,80	6,24	0	2,47
24	0	39,62	8,17	0,75	2,50
48	0	27,26	7,23	1,55	2,44
72	0	14,64	7,01	2,76	2,02
96	0	4,69	6,54	3,58	2,07
120	0	1,37	6,23	3,51	1,91
144	0	0,45	6,00	3,47	1,57

Tabela A1.29 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*: Ensaio 29 da matriz de planejamento experimental.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)
0	32,42	75,70	11,79	0	2,63
24	0	73,41	13,57	0,99	2,77
48	0	66,12	13,89	0,99	3,51
72	0	57,39	14,01	2,37	2,57
96	0	41,55	11,41	3,94	2,21
120	0	31,47	11,81	6,86	2,10
144	0	19,83	11,93	12,04	1,91

APÊNDICE 02 – Análises de variância utilizadas para verificar o nível de significância estatística dos efeitos determinados pelas variáveis independentes e pelas interações entre estas, sobre os parâmetros fermentativos.

Tabela A2.1 Análise de variância utilizada para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais e interações sobre a concentração final de xilitol.

Efeitos	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calc}	Nível de significância (p)
Fator A	1,28	01	1,28	0,17	0,6921
Fator B	0,467222	01	0,467222	0,06	0,8103
Fator C	67,6672	01	67,6672	8,92	0,0174*
Fator D	102,245	01	102,245	13,47	0,0063*
Fator E	193,389	01	193,389	25,48	0,0010*
AA	0,00482004	01	0,00482004	0,00	0,9805
AB	33,9306	01	33,9306	43,47	0,0674**
AC	0,330625	01	0,330625	0,04	0,8399
AD	1,38063	01	1,38063	0,18	0,6810
AE	4,51563	01	4,51563	0,60	0,4627
BB	0,000078942	01	0,000078942	0,00	0,9975
BC	0,225625	01	0,225625	0,03	0,8674
BD	0,050625	01	0,050625	0,01	0,9369
BE	0,680625	01	0,680625	0,09	0,7722
CC	4,76914	01	4,76914	0,63	0,4508
CD	45,2256	01	45,2256	5,96	0,0405*
CE	113,956	01	113,956	15,02	0,0047*
DD	4,76914	01	4,76914	0,63	0,4508
DE	50,7656	01	50,7656	6,69	0,0323*
EE	0,00482004	01	0,00482004	0,00	0,9805
Erro total	60,7107	08	7,58884		
Total	683,465	28			

A - sulfato de amônio, B - cloreto de cálcio, C - farelo de arroz, D - pH, E - fator de concentração

*Significativo ao nível de 10 % de probabilidade ($p \leq 0,10$)

**A interação entre sulfato de amônio e cloreto de cálcio (AB) apresentou efeito significativo. Devido ao fato dos efeitos principais (A e B) não serem significativos, foi possível eliminar esta interação da análise.

Tabela A2.2 Análise de variância utilizada para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais e interações sobre a produtividade volumétrica em xilitol.

Efeitos	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calc}	Nível de significância (p)
Fator A	0,000138889	01	0,000138889	0,11	0,7521
Fator B	0,000088889	01	0,000088889	0,07	0,8003
Fator C	0,0122722	01	0,0122722	9,44	0,0153*
Fator D	0,0193389	01	0,0193389	14,88	0,0048*
Fator E	0,03645	01	0,03645	28,04	0,0007*
AA	0,000003382	01	0,000003382	0,00	0,9606
AB	0,0064	01	0,0064	4,92	0,0573**
AC	0,0001	01	0,0001	0,08	0,7885
AD	0,0004	01	0,0004	0,31	0,5942
AE	0,0009	01	0,0009	0,69	0,4295
BB	0,000035906	01	0,000035906	0,03	0,8721
BC	0,0001	01	0,0001	0,08	0,7885
BD	0,0	01	0,0	0,00	1,0000
BE	0,0001	01	0,0001	0,08	0,7885
CC	0,000869401	01	0,000869401	0,67	0,4371
CD	0,0081	01	0,0081	6,23	0,0372*
CE	0,0225	01	0,0225	17,31	0,0032*
DD	0,000869401	01	0,000869401	0,67	0,4371
DE	0,01	01	0,01	7,69	0,0242*
EE	0,000003382	01	0,000003382	0,00	0,9606
Erro total	0,0103982	08	0,00129977		
Total	0,136131	28			

A - sulfato de amônio, B - cloreto de cálcio, C - farelo de arroz, D - pH, E - fator de concentração

*Significativo ao nível de 10 % de probabilidade ($p \leq 0,10$)

**A interação entre sulfato de amônio e cloreto de cálcio (AB) apresentou efeito significativo. Devido ao fato dos efeitos principais (A e B) não serem significativos, foi possível eliminar esta interação da análise.

Tabela A2.3 Análise de variância utilizada para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais e interações sobre o fator de conversão em xilitol.

Efeitos	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calc}	Nível de significância (p)
Fator A	0,000138889	01	0,000138889	0,03	0,8646
Fator B	0,000555556	01	0,000555556	0,12	0,7339
Fator C	0,0168056	01	0,0168056	3,75	0,0888*
Fator D	0,0249389	01	0,0249389	5,56	0,0460*
Fator E	0,0854222	01	0,0854222	19,06	0,0024*
AA	0,00043985	01	0,00043985	0,10	0,7621
AB	0,0016	01	0,0016	0,36	0,5667
AC	0,001225	01	0,001225	0,27	0,6153
AD	0,000025	01	0,000025	0,01	0,9423
AE	0,0004	01	0,0004	0,09	0,7727
BB	0,000172698	01	0,000172698	0,04	0,8493
BC	0,000025	01	0,000025	0,01	0,9423
BD	0,000625	01	0,000625	0,14	0,7185
BE	0,0016	01	0,0016	0,36	0,5667
CC	0,000028199	01	0,000028199	0,01	0,9387
CD	0,0196	01	0,0196	4,37	0,0699*
CE	0,093025	01	0,093025	20,76	0,0019*
DD	0,0143971	01	0,0143971	3,21	0,1109
DE	0,011025	01	0,011025	2,46	0,1554***
EE	0,000006355	01	0,000006355	0,00	0,9709
Erro total	0,0358555	08	0,00448194		
Total	0,318717	28			

A - sulfato de amônio, B - cloreto de cálcio, C - farelo de arroz, D - pH, E - fator de concentração

*Significativo ao nível de 10 % de probabilidade ($p \leq 0,10$)

*** A interação entre pH e fator de concentração (DE) não apresentou efeito significativo. Devido ao fato dos efeitos principais (D e E) apresentarem significância, e ao nível de significância desta interação ter sido próximo ao limite de corte ($p \leq 0,10$), foi possível permanecer com esta interação na análise estatística.

APÊNDICE 03 – Resultados da fermentação em frasco Erlenmeyer sob condições ótimas de cultivo (1,0 g/L de concentração de sulfato de amônio, sem adição de cloreto de cálcio, 5,0 g/L de concentração de farelo de arroz, fator de concentração do hidrolisado igual a 3,0 e pH inicial de fermentação igual a 6,0).

Tabela A3.1 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii* em frasco Erlenmeyer sob condições ótimas de cultivo.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)	Células (g/L)
0	20,01	50,41	8,17	0	2,96	0,76
24	0,21	34,67	7,47	4,09	2,32	4,25
48	0	13,39	7,31	18,10	1,53	4,47
72	0	0,69	6,10	24,17	0,84	7,24

APÊNDICE 04 – Resultados da fermentação em frasco Erlenmeyer sob condições ótimas de cultivo (1,0 g/L de concentração de sulfato de amônio, sem adição de cloreto de cálcio, 5,0 g/L de concentração de farelo de arroz, fator de concentração do hidrolisado igual a 3,0 e pH inicial de fermentação igual a 6,0), no hidrolisado tratado com adição de 2,5% de carvão ativo.

Tabela A4.1 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii* em frasco Erlenmeyer sob condições ótimas de cultivo e adição de 2,5% de carvão ativo no tratamento do hidrolisado.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)	Células (g/L)
0	23,30	52,96	8,67	0	2,94	0,74
24	0,62	40,96	8,65	3,22	2,35	5,27
48	0	20,72	8,22	17,24	1,58	5,74
72	0	2,13	7,34	28,60	0,88	8,31

APÊNDICE 05 – Resultados da fermentação em frasco Erlenmeyer sob condições ótimas de cultivo (1,0 g/L de concentração de sulfato de amônio, sem adição de cloreto de cálcio, 5,0 g/L de concentração de farelo de arroz, fator de concentração do hidrolisado igual a 3,0 e pH inicial de fermentação igual a 6,0), com o cultivo da levedura em meio só com glicose.

Tabela A5.1 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii* em frasco Erlenmeyer com o cultivo da levedura em meio com glicose.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)	Células (g/L)
0	23,86	51,69	10,02	0	2,77	0,82
24	0	43,34	9,48	4,20	2,30	5,38
48	0	23,45	8,37	15,66	1,65	5,36
72	0	3,56	7,84	30,50	1,15	7,10

APÊNDICE 06 – Resultados da fermentação realizada em fermentador de bancada com capacidade total de 2 L sob condições ótimas de cultivo.

Tabela A6.1 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*.

Amostras	Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)	Células (g/L)
1	0	17,63	53,21	13,64	0	2,51	1,04
2	04	15,12	53,50	14,81	0	2,53	1,71
3	08	3,37	52,72	15,13	0	2,26	4,74
4	12	0	49,21	14,09	1,20	1,95	6,30
5	16	0	46,75	14,04	1,39	2,04	6,47
6	20	0	42,45	12,60	3,49	2,06	6,98
7	24	0	41,35	12,68	4,35	2,01	7,22
8	28	0	37,35	12,61	5,52	1,62	7,38
9	34	0	31,91	12,74	9,54	1,50	7,96
10	40	0	24,20	10,25	13,69	1,36	8,04
11	46	0	18,92	9,85	19,48	1,30	8,99
12	52	0	11,72	8,35	26,19	0,70	9,18
13	58	0	5,58	7,04	27,27	0,70	9,94
14	64	0	2,31	6,69	28,09	0,77	9,78
15	70	0	0,94	6,20	28,61	0,42	10,53

APÊNDICE 07 – Resultados da fermentação realizada em fermentador com capacidade total de 16 L sob condições ótimas de cultivo.

Tabela A7.1 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*.

Amostras	Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	A. acético (g/L)	Células (g/L)
1	0	17,79	51,03	11,00	0	2,56	0,12
2	04	14,42	49,03	10,96	0	2,54	0,46
3	08	7,10	48,29	11,22	0	2,32	1,48
4	12	0	46,27	10,78	0,74	2,24	4,44
5	16	0	44,39	10,77	1,08	2,19	5,23
6	20	0	42,29	9,95	1,14	2,17	5,32
7	24	0	39,57	10,00	1,74	1,96	5,45
8	28	0	38,64	10,14	2,63	1,92	5,43
9	34	0	34,66	9,92	4,76	1,92	5,47
10	40	0	32,87	9,67	6,21	1,90	5,85
11	46	0	26,48	8,52	9,31	1,71	6,60
12	52	0	23,53	8,25	12,46	1,71	6,64
13	58	0	18,37	8,40	17,70	1,66	6,86
14	64	0	14,56	7,69	21,13	1,55	7,33
15	70	0	10,36	7,81	25,31	1,41	7,99
16	76	0	6,00	6,94	28,44	1,31	7,99
17	82	0	3,65	6,75	30,68	1,29	7,90
18	88	0	2,76	6,65	30,56	1,30	7,68

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)