UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

PRISCILA VAZ DE ARRUDA

Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de
xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado
hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Lorena - SP
2011

PRISCILA VAZ DE ARRUDA

Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de
xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado
hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências do
Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Industrial na Área de
Concentração: Conversão de Biomassa

Orientador: Profa. Dra. Maria das Graças
de Almeida Felipe

Edição reimpressa e corrigida

Lorena - SP
Setembro, 2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Arruda, Priscila Vaz de

Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. / Priscila Vaz de Arruda. – ed. reimpr., corr.– 2011.
163 p. : il.

Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.
Orientadora: Maria das Graças de Almeida Felipe

1. Xilitol 2. Bagaço de cana-de-açúcar 3. Hidrolisado hemicelulósico
4. Destoxificação 5. *Candida guilliermondii* 6. Ampliação de escala. I.
Título

664.16 - CDU

Dedico esta tese a meus pais Maria Auxiliadora e Clóves, pelo apoio, encorajamento, amor e pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha história. A Maria Aparecida (Dudu) que sempre cuidou de mim como se fosse sua própria filha...

AGRADECIMENTOS

“A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso fraternal, nem a alegria da companhia; é, na verdade, a inspiração espiritual que surge quando se descobre que alguém acredita em seu potencial e está disposto a lhe confiar sua amizade.”

Ralph Waldo Emerson

A Deus pelo dom da vida e por ter colocado anjos no meu caminho em todos os momentos.

Aos meus pais e familiares que me deram todo suporte durante todo o doutoramento.

A Prof^a. Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe, minha orientadora, pela amizade, confiança, paciência, apoio e orientação não apenas durante o doutorado, mas desde 2004, quando iniciei meus trabalhos de pesquisa sob sua orientação e que hoje permitem a concretização deste sonho.

Aos queridos Humberto e Graça (aqui como minha grande amiga), Cláudia e Nê que sempre me acolheram com muito carinho nos deliciosos almoços e festinhas na Oswaldo Aranha, não tenho palavras para agradecer tamanha afeição, que vocês sabem que é recíproca.

A doce, adorável e experiente Rita de Cássia pela amizade e pelo grande auxílio e sugestões dadas durante a realização dos experimentos.

As amigas conselheiras e “quebradoras de galhos e árvores” em ordem alfabética para não privilegiar ninguém Débora, Elisângela e Luciana Chaud, que foram mais que colegas de laboratório, foram irmãs que pude contar sempre por estarem me escutando e dando sugestões no que fosse preciso.

Aos alunos de Iniciação científica que me ajudaram diretamente na realização dos experimentos: a dupla inseparável – Karina e Gustavo, aos tímidos, mas eficientes – Herbert e Willian, e por último não menos importante o querido, Tales, o qual me acompanhou na fase de ampliação de escala. Com todos eles pude contar nas horas mais inusitadas... Aprendemos e “sofremos” juntos...

A todos os amigos que estão ou já passaram pelo DEBIQ: Juanito, Dani Cortez, Patrícia Miléo, Kelly, Flávio, Bruno Guedes, João Paulo, Lívia, Dani Garcia, Boutros, Priscila Mazieiro, Rafael Cândido, Naila, Thais Suzane, Ricardo Branco, Dani Saraiva, Larissa Canilha e Ernesto pelo incentivo e agradável convívio dentro e fora dos laboratórios.

Aos amigos Rozelle, Mateus Ligabo, Raquel Almeida, Andressa Rabelo, Willian Barbosa e Vanessa Soares que acompanharam o doutorado e nunca deixaram de me incentivar e apoiar.

A Ester Junko Tomotani pela amizade, carinho e apoio durante a realização do doutorado, mesmo a “distância” ela nunca deixou de me aconselhar e ajudar no que fosse preciso, foram muitos e-mails.

Ao Lúcio Henrique pelo carinho, paciência e incentivo nessa fase final do doutorado.

Ao Prof. Dr. Hécio José Izário Filho e seu aluno Bruno Fernando Moreira pelas análises de metais realizadas no Departamento de Engenharia Química.

Ao Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha e a Carolzinha, que me auxiliaram muito na parte de caracterização química do bagaço.

Aos professores João Batista de Almeida e Silva pelo espaço e materiais emprestados; Ismael Mancilha e Arnaldo Márcio, pelos conselhos e dicas na realização dos experimentos.

Aos funcionários: Kléber, Nicamor, Paulinho, Zé Cobrinha, Birão (este que infelizmente já não está entre nós) e todos os “azulzinhos” que me auxiliaram nas diversas etapas da realização dos experimentos.

Ao pessoal da biblioteca e dependências: Regina Horta, Joel, Dora, Lilia, Regina, João, Nelson, Bruno Marton, Simone pelo valioso apoio e colaboração.

Ao pessoal da secretaria do departamento e pós-graduação: Walkiria, Nadir, André, Sandra, Cida e Ana Beatriz pelo constante apoio.

Ao Isnaldi e Lilian Marton pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

A Acquaquímica LTDA, pela doação do polímero vegetal empregado no presente trabalho e em especial ao Dr. Renato Konrath pelas brilhantes sugestões e colaborações.

A Engenheira Margareth Sawaguchi Kolososki da Purolite do Brasil Ltda. pelo suporte e colaboração nas informações sobre as resinas empregadas neste trabalho.

Ao Departamento de Biotecnologia e à Escola de Engenharia de Lorena.

A todos os professores e funcionários do DEBIQ, pela colaboração e amizade.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos concedida.

A todos aqueles que de forma direta ou indireta estiveram presentes nessa longa história de amor que tenho com a minha eterna “FAENQUIL”.

Muito obrigada...

"O mais importante para o homem é crer em si mesmo. Sem esta confiança em seus recursos, em sua inteligência, em sua energia, ninguém alcança o triunfo a que aspira."

(Thomas Wittlam Atkinson)

RESUMO

ARRUDA P.V. **Avaliação do processo biotecnológico de obtenção de xilitol em diferentes escalas a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.** 2011. 163p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo. Lorena. 2011.

A conversão de biomassa vegetal em produtos químicos e energia é essencial a fim de sustentar o nosso modo de vida atual. O bagaço de cana-de-açúcar, matéria-prima disponível em abundância no Brasil, poderá tanto ajudar a suprir a crescente demanda pelo etanol combustível como ser empregado para obtenção de produtos de valor agregado, tais como xilitol, além de trazer vantagens econômicas para o setor sucroalcooleiro. O xilitol, um poliol com poder adoçante semelhante ao da sacarose e com propriedades peculiares, como metabolismo independente de insulina, anticariogenicidade e aplicações na área clínica, no tratamento de osteoporose e de doenças respiratórias, é obtido em escala comercial por catálise química de materiais lignocelulósicos. A produção biotecnológica de xilitol como alternativa ao processo químico vem sendo pesquisada e os resultados revelam que a presença de compostos tóxicos nos hidrolisados hemicelulósicos resultantes do processo de hidrólise ácida contribui para sua baixa fermentabilidade. Isto se deve à inibição do metabolismo microbiano causada principalmente por compostos tais como ácidos orgânicos, fenólicos e íons metálicos. No presente trabalho foi avaliado o efeito de diferentes fontes de carbono (xilose, glicose e mistura de xilose e glicose) empregadas no preparo do inóculo de *Candida guilliermondii* FTI 20037 sobre a bioconversão de xilose em xilitol a partir de fermentações em frascos Erlenmeyer de hidrolisados hemicelulósicos submetidos a procedimentos de destoxificação. A condição de favorecimento deste bioprocessos foi empregada para a avaliação da ampliação de escala em fermentadores de 2,4L para 16L, utilizando como critério de ampliação o K_La (igual a $15h^{-1}$). De acordo com os resultados, os máximos valores dos parâmetros fermentativos como fator de conversão de xilose em xilitol e produtividade em xilitol foram alcançados com a utilização de inóculo obtido em xilose durante fermentação do hidrolisado destoxificado por resinas ($Y_{P/S} = 0,81 \text{ g g}^{-1}$ e $Q_P = 0,60 \text{ g L}^{-1} h^{-1}$, respectivamente), embora o emprego de carvão ativado tenha gerado valores de rendimento próximos para as diferentes fontes de carbono ($Y_{P/S}$ variando de 0,78 a 0,80 g g^{-1}). Considerando o valor de fator de conversão e que o procedimento de destoxificação com carvão ativado é o de menor custo e de mais fácil manipulação em comparação ao processo com resinas, os experimentos de ampliação de escala da produção de xilitol por *C. guilliermondii* foram realizados nesta condição de destoxificação e empregando-se xilose como fonte de carbono para o inóculo. Nesta etapa ficou evidente a viabilidade de ampliação de escala de produção de xilitol de fermentador de 2,4L para 16L, já que os valores dos parâmetros fermentativos avaliados foram semelhantes entre os fermentadores (valores médios: $Y_{P/S} \approx 0,68 \text{ g g}^{-1}$ e $Q_P \approx 0,28 \text{ g L}^{-1} h^{-1}$). No entanto, tais valores foram inferiores aos obtidos em frascos Erlenmeyer, possivelmente devido às condições de disponibilidade de oxigênio diferirem nos fermentadores de bancada, uma vez que o oxigênio é o parâmetro mais crítico neste bioprocessos.

Palavras-chave: Xilitol. Bagaço de cana-de-açúcar. Hidrolisado hemicelulósico. Destoxificação. *Candida guilliermondii*. Ampliação de escala.

ABSTRACT

ARRUDA P.V. **Evaluation of the biotechnological process for xylitol obtainment at different scales from the sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate.** 2011. 163p. Thesis (Doctoral in Sciences) – Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo. Lorena. 2011.

The conversion of vegetable biomass into chemicals and energy is essential to sustain our current style of life. Sugarcane bagasse, a raw material abundantly available in Brazil, greatly contributes to the supply of the evergrowing demand for ethanol. Furthermore, biomass can be employed for obtaining value-added products, such as xylitol, as well as bring economical advantages for the sugar-ethanol sector. Xylitol, a polyol with sweetener power similar to that of saccharose and peculiar properties such as insulin-independent metabolism, anticariogenic power, and applications in the clinical area, in the treatment of osteoporosis and respiratory diseases, is obtained on a commercial scale by chemical catalysis of lignocellulosic materials. The biotechnological production of xylitol as an alternative to the chemical process has been researched and the results reveal that the presence of toxic compounds in hemicellulosics hydrolysates resulting from acid hydrolysis process contributes to its low fermentability. Such toxicity could be due to the inhibition of microbial metabolism promoted mainly by compounds such as organic acids, phenols and metallic ions. In the present work, the effect of different carbon sources (xylose, glucose and a mixture of xylose and glucose) used in the inoculum preparation of *Candida guilliermondii* FTI 20037 for the xylose-to-xylitol bioconversion by fermentation of hemicellulosics hydrolysates submitted to detoxification procedures in Erlenmeyer flasks was evaluated. The best condition for this bioprocess was employed to evaluate the scale up from the 2.4L to 16L fermentors, using K_La (equal to $15h^{-1}$) as scale-up criteria. According to the results the highest values of fermentative parameters such as xylitol yield and productivity were achieved with the use of inoculum cultivated on xylose during the fermentation of hydrolysate detoxified with resins ($Y_{P/S} = 0.81 \text{ g g}^{-1}$ and $Q_P = 0.60 \text{ g L}^{-1} h^{-1}$, respectively), although with the use of charcoal the yield value was similar ($Y_{P/S}$ ranging for 0.78 to 0.80 g g^{-1}), regardless of the carbon source employed. Considering the value of xylitol yield and that detoxification with activated charcoal is less expensive and more easily manipulated when compared to detoxification procedure with resins, the experiments for scale up xylitol production by *C. guilliermondii* were performed in such detoxification condition with xylose as the carbon source for the inoculum. At this stage it was evident the scale up xylitol production from a fermenter of 2.4L to 16L was feasible, since the values of fermentative parameters evaluated were similar to those of the fermentors (medium values $Y_{P/S} \approx 0.68 \text{ g g}^{-1}$ e $Q_P \approx 0.28 \text{ g L}^{-1} h^{-1}$). However, these values were lower than those obtained in Erlenmeyer flasks, maybe due to conditions of oxygen availability for they differ from those in fermentors, since oxygen is the most critical parameter in this bioprocess.

Keywords: Xylitol. Sugarcane bagasse. Hemicellulosic hydrolysate. Detoxification. *Candida guilliermondii*. Scale-up.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
2.1 Materiais lignocelulósicos.....	15
2.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar.....	17
2.2 Xilitol.....	20
2.2.1 Propriedades e aplicações.....	20
2.2.2 Tolerância, toxicidade do xilitol.....	24
2.2.3 Mercado do xilitol.....	25
2.3 Ocorrência e obtenção do xilitol.....	26
2.3.1 Ocorrência.....	26
2.3.2 Obtenção.....	27
2.4 Bioconversão de xilose em xilitol.....	29
2.5 Toxicidade dos compostos presentes nos hidrolisados aos micro-organismos.....	34
2.6 Procedimentos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.....	38
2.6.1 Alteração do pH combinada à adsorção em carvão ativo.....	38
2.6.2 Adsorção em resinas de troca iônica.....	41
2.6.3 Floculação por polímero vegetal.....	44
2.7 Recuperação e viabilidade econômica do xilitol em processos biotecnológicos.....	47
2.8 Ampliação de escala.....	48
3. OBJETIVOS.....	53
3.1 Objetivo geral.....	53
3.2 Objetivos específicos.....	53
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	54
4.1 Bagaço de cana-de-açúcar.....	54
4.2 Obtenção, preparo e destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	55
4.2.1 Pré-hidrólise ácida do bagaço.....	55
4.2.2 Caracterização e concentração a vácuo do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	56
4.2.3 Procedimentos de destoxificação e autoclavagem do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.....	57
4.3 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.....	59
4.3.1 Micro-organismo.....	59
4.3.2 Fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em frascos Erlenmeyer.....	59
4.3.3 Fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em fermentadores de bancada.....	61
4.4 Métodos Analíticos.....	62
4.4.1 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar.....	62

4.4.2 Viabilidade e pureza da cultura	65
4.4.3 Determinação da concentração celular	65
4.4.4 Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, glicerol, etanol, xilitol, furfural e 5-hidroximetilfurfural	66
4.4.5 Determinação da concentração de fenóis	66
4.4.6 Determinação da concentração dos elementos metálicos	66
4.4.7 Determinação do pH	67
4.4.8 Determinação de sólidos solúveis dos hidrolisados	67
4.4.9 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($k_L a$)	67
4.4.10 Determinação do rendimento mássico da etapa de hidrólise	68
4.4.11 Determinação das solubilizações dos componentes macromoleculares (celulose, hemicelulose e lignina)	68
4.4.12 Determinação da remoção de açúcares e compostos tóxicos	68
4.4.13 Determinação dos parâmetros fermentativos	69
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
5.1 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar	71
5.2 Procedimentos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana	76
5.3 Fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em frascos Erlenmeyer	87
5.3.1 Consumo de açúcares, ácido acético e fenóis totais por <i>C. guilliermondii</i> em função das fontes de carbono empregadas no preparo do inóculo durante fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana submetido aos diferentes procedimentos de destoxificação	87
5.3.2 Crescimento de <i>C. guilliermondii</i> em função das fontes de carbono empregadas no preparo do inóculo durante fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana submetido aos diferentes procedimentos de destoxificação	96
5.3.3 Produção de xilitol por <i>C. guilliermondii</i> em função das fontes de carbono empregadas no preparo do inóculo durante fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana submetido aos diferentes procedimentos de destoxificação	102
5.3.4 Formação de etanol e glicerol por <i>C. guilliermondii</i> em função das fontes de carbono empregadas no preparo do inóculo durante fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana submetido aos diferentes procedimentos de destoxificação	107
5.4 Fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em fermentadores de bancada	110
6. CONCLUSÕES	121
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	123
REFERÊNCIAS	124
APÊNDICES	147

1. INTRODUÇÃO

A dinâmica dos tempos atuais impõe às pessoas costumes alimentares pouco saudáveis, além de hábitos sedentários. Com isso, agravam-se os problemas como obesidade, diabetes e cáries dentárias. Portanto, os estudos que buscam a obtenção de alimentos os quais possam amenizar tais problemas são importantes à medida que auxiliam na prevenção e manutenção da saúde humana. Neste contexto, encontra-se o xilitol, um açúcar-alcool que apresenta propriedades peculiares como poder adoçante semelhante à sacarose, não calórico, adequado à dieta de diabéticos e obesos e indicado no tratamento de doenças respiratórias e na prevenção de osteoporose.

O processo de catálise química de xilose, método pelo qual o xilitol é comercialmente produzido a partir de materiais com alto teor de xilana (polímero de xilose), é de elevado custo pelas extensivas etapas de purificação da solução de xilose requerida para a catálise, bem como para a remoção do catalisador e purificação do xilitol. Neste sentido, pesquisadores do grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) da Escola de Engenharia de Lorena (EEL - USP) vem desde 1985 concentrando esforços para o desenvolvimento de uma tecnologia de produção de xilitol por via biotecnológica a partir de materiais lignocelulósicos. Estas pesquisas são intensificadas principalmente pela abundância renovável destes materiais e aplicação do xilitol em vários segmentos industriais, em particular na área da saúde.

As pesquisas iniciais tiveram como objetivo a seleção de leveduras fermentadoras de xilose para a produção de xilitol em meio sintético, destacando-se a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 como promissora para essa bioconversão. As pesquisas foram intensificadas a partir do aproveitamento de materiais lignocelulósicos com o objetivo principal de se estabelecer a melhor condição de hidrólise destes materiais como bagaço de cana, de malte, palha de arroz, de trigo e de cevada, aparas de eucalipto e casca de aveia. Estes hidrolisados são avaliados principalmente quanto às condições dos processos fermentativos, além da avaliação de procedimentos de recuperação do xilitol do meio fermentado e recentemente do custo deste bioprocessos. Até o momento um dos principais gargalos para a bioconversão da xilose, presente nos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana, em xilitol é a presença nestes de compostos

tóxicos aos micro-organismos como fenólicos, ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural e íons metálicos, oriundos da hidrólise ácida deste material. Estes compostos se encontram presentes no meio mesmo após procedimentos de destoxificação do hidrolisado que vem sendo estudados pelo GMBio, como alteração de pH, adsorção em carvão ativo, utilização de resinas de troca iônica e polímeros vegetais quer como métodos isolados ou combinados. É primordial que a escolha da metodologia a ser empregada se baseie num conjunto de quesitos como eficácia e custo da técnica, ao mesmo tempo em que não leve à perda de açúcares durante o processo e também não cause impacto negativo ao ambiente. Até o momento alguns indicadores foram estabelecidos, entretanto, os experimentos foram realizados em hidrolisados provenientes de diferentes biomassas, muitas vezes em separado com uma ou várias combinações de métodos, cujas análises para avaliação da eficácia dos procedimentos empregados nem sempre foram feitas para todos os tóxicos já conhecidos.

Acrescenta-se a isto que a realização das fermentações para a avaliação dos hidrolisados destoxificados foram feitas em frascos Erlenmeyer (50mL de meio) e alguns para avaliação de parâmetros como oxigênio e imobilização celular em fermentador de 2,4L. A ampliação de escala com vistas ao aumento da produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana é uma etapa até então não avaliada e de fundamental importância para a obtenção de indicadores de viabilidade do processo. É importante considerar que a disponibilidade de oxigênio no meio é o principal parâmetro regulador da bioconversão de xilose em xilitol e que juntamente com quesitos como fonte de carbono empregada no preparo do inóculo, pH, temperatura, podem interferir na resposta celular frente aos hidrolisados destoxificados, uma vez que estes ainda podem conter tóxicos os quais poderão interferir no processo fermentativo quando da ampliação de escala. Além disso, não há relatos na literatura quanto à investigação conjunta da combinação dos procedimentos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana aliado ao efeito de diferentes fontes de carbono empregadas no cultivo do inóculo sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Materiais lignocelulósicos*

Os materiais lignocelulósicos são os mais abundantes materiais orgânicos presentes na biosfera e representam aproximadamente 50% da biomassa vegetal, dentre eles podemos citar resíduos florestais, agrícolas, plantas aquáticas, gramíneas e outros (CHANDEL et al., 2011), sendo a produção anual desta biomassa estimada em $10\text{-}50 \times 10^9$ toneladas (CHANDEL; SINGH; RAO, 2010).

A composição química dos materiais lignocelulósicos é complexa, sendo constituída principalmente por três frações distintas: celulose, hemicelulose e lignina, (FENGEL; WEGENER, 1989), sendo que a concentração destes componentes varia de acordo com o tipo de madeira ou resíduo da agroindústria (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Composição de alguns materiais lignocelulósicos.

Material	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Referência
<i>Aparas de eucalipto</i>	40,20	15,67	26,90	Canettieri; Almeida e Silva; Carvalho Júnior (2003)
<i>Bagaço de cana</i>	40,00	35,00	15,00	Rodrigues (2005)
<i>Casca de aveia</i>	29,26	28,35	22,22	Tamanini et al. (2004)
<i>Palha de arroz</i>	43,50	22,00	17,20	Mussatto e Roberto (2002)
<i>Palha de cana</i>	38,10	29,20	24,20	Silva (2009)
<i>Palha de cevada</i>	38,60	21,40	19,90	Moraes (2008)
<i>Palha de milho</i>	40,00	25,00	17,00	Saha (2003)
<i>Palha de sorgo</i>	34,00	44,00	20,00	Herrera et al. (2004)
<i>Palha de trigo</i>	33,81	31,83	20,12	Canilha, Carvalho, Almeida e Silva (2006)
<i>Sabugo de milho</i>	45,00	35,00	15,00	Saha (2003)

Além das substâncias macromoleculares que constituem os materiais lignocelulósicos (celulose, hemicelulose e lignina), encontram-se as de baixa massa molecular, como compostos aromáticos, ácidos alifáticos, sendo um deles o ácido acético que se encontra ligado a hemicelulose como um grupo éster (FENGEL; WEGENER, 1989). Estes compostos contribuem com uma pequena porcentagem na massa dos materiais lignocelulósicos e podem ter grande

influência nas propriedades destes (FENGEL; WEGENER, 1989). A celulose é um polímero linear constituído por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β -1 $\rightarrow$ 4, enquanto a hemicelulose é um heteropolímero composto predominantemente por hexoses e pentoses com curtas ramificações tais como D-xilose, D-glicose, L-arabinose e D-galactose. Já a lignina é uma macromolécula polifenólica, constituída por unidades básicas de 3-5-dimetoxi-4-hidroxi-fenilpropano, 3 metoxi-4-hidroxi-fenilpropano e 4-hidroxi-fenilpropano (FENGEL; WEGENER, 1989).

Vários grupos de pesquisa têm direcionado seus esforços para o desenvolvimento de estratégias para o processamento da biomassa com máxima eficiência na utilização do material “in natura”, proporcionando com isso impacto ambiental limitado e rentabilidade econômica. O processo de fracionamento é uma solução para este aproveitamento, permitindo com isso a separação da hemicelulose, celulose e lignina, uma vez que cada fração pode ser utilizada para obtenção de diferentes produtos (PARAJÓ; ALONSO; SANTOS, 1995). Os materiais lignocelulósicos, devido à sua natureza polissacarídica, não são diretamente metabolizados por micro-organismos de interesse industrial, sendo necessário proceder a hidrólise dos seus componentes para os respectivos monômeros (DEKKER, 1985), conforme ilustrado na Figura 2.1.

Figura 2.1. Esquema do fracionamento dos principais componentes dos materiais lignocelulósicos após procedimento de hidrólise (Baseado em KUMAR et al., 2009).

A hidrólise de materiais lignocelulósicos pode ser realizada por processos físicos, químicos, biológicos e pela combinação destes (SUN; CHENG, 2002). Dentre as técnicas de hidrólise destes materiais, pode-se destacar a explosão a

vapor, a hidrólise enzimática, os tratamentos hidrotérmico e AFEX, a utilização de hidrólise ácido diluído e mais recentemente a utilização de peróxido de hidrogênio à temperatura ambiente como métodos mais estudados e promissores no processo de obtenção de produtos de interesse industrial a partir da biomassa vegetal (MOSIER et al., 2005; SÁNCHEZ; CARDONA, 2008; ENGENHARIA..., 2010a).

Dentre estes métodos a hidrólise ácido diluído é a que tem sido frequentemente empregada, uma vez que esta metodologia alcança rendimentos elevados de açúcares a partir da hemicelulose (GALBE; ZACCHI, 2002; HAMELINCK; van HOOIJDONK; FAAIJ, 2005; SARROUH; BRANCO; SILVA, 2009; CANILHA et al., 2010), bem como em comparação a hidrólise ácido concentrada, é mais barata (HAMELINCK; van HOOIJDONK; FAAIJ, 2005), gera menor quantidade de produtos de degradação (5-hidroximetilfurfural e furfural), que são tóxicos aos micro-organismos, além de menores problemas de corrosão nos tanques de hidrólise e tubulações (McWILLIAMS; van WALSUM, 2002; van WALSUM, 2001; van WALSUM; SHI, 2004).

2.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia e China (BIOETANOL..., 2008). A produção de cana brasileira expandiu-se inicialmente concentrada na região Centro-Sul, principalmente no estado de São Paulo, devido, em grande parte, a fatores climáticos, já que a cana responde muito bem ao clima do estado paulista, sendo este responsável pela maior contribuição nesta produção (57,8% da produção nacional) (CANA..., 2010). Além disto, nesta região encontra-se grande parte da concentração populacional do país, bem como a maior frota veicular e a maior demanda pelo combustível proveniente desta matéria-prima. Assim, os fatores que direcionaram o desenvolvimento na cana na região Centro-Sul, foram tanto climáticos quanto econômicos.

Deste modo, a produção de cana-de-açúcar brasileira passou de 88 milhões de toneladas, produzidas em 1977, para mais de 600 milhões de toneladas, em 2010, representando um crescimento de, aproximadamente, 680% neste período. Segundo a CONAB, a safra de 2009/2010 no país produziu 604,51

milhões de toneladas e a previsão para a safra 2010/2011 é de 624,99 milhões de toneladas, um aumento de 3,40% na produção (CONAB, 2011). Tendo em vista que cada tonelada de cana-de-açúcar processada gera 140 Kg de bagaço de cana seco (CENBIO, 2010), pode-se estimar que somente na safra 2010/2011 serão gerados aproximadamente 87,5 milhões de toneladas de bagaço. Embora o bagaço gerado durante a produção de açúcar e álcool seja utilizado em grande parte pela própria indústria sucroalcooleira como fonte energética, na produção de vapor para a operação de todo o complexo industrial, existe ainda um excedente deste material (em torno de 10 a 20%) que pode ser utilizado em inúmeros processos industriais, conforme é apresentado na Tabela 2.2 (BIOETANOL..., 2008, ENGENHARIA..., 2010b).

A elevada concentração de xilose na fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar, o que corresponde em até 80% do total de açúcar nesta fração (RODRIGUES et al., 2001) e a capacidade de assimilação desta pentose por várias leveduras são os principais fatores que impulsionam o aproveitamento desta matéria-prima em diferentes processos de bioconversão como para a produção de xilitol (SAHA, 2003; FELIPE, 2004; SILVA et al., 2005; SARROUH; BRANCO; SILVA, 2009; PRAKASHAM; SREENIVAS RAO; HOBBS, 2009).

Tabela 2.2 Novos produtos da agroindústria da cana-de-açúcar (Baseado em BIOETANOL..., 2008).

Família	Matéria-prima	Produtos
Químicos: produtos resultantes de reações químicas efetuadas com ou sem a presença de um elemento catalisador	Melaço, bagaço e vinhaça	a) insumos industriais (dextrana técnica, gluconato de cálcio, manitol, sorbitol e tensoativos biodegradáveis) b) Furfural (licor de xilose, furfural, álcool furfurílico, compostos furano-epóxi, preservante de madeira, resinas de fundição) c) Plásticos (PHB e PHA) d) Insumos para a indústria de papel e celulose (meio para corrugar, pastas quimtermomecânicas, meios filtrantes) e) Vinhaça concentrada
Fármacos-veterinários: substâncias químicas, biológicas, biotecnológicas, ou de preparação manufatureira, diretamente misturada aos alimentos, destinadas a prevenir e tratar as enfermidades dos animais	Melaço e bagaço	a) Preparado antidiarréico b) Complexo ferro-dextrana c) Probiótico
Alimentos	Melaço, bagaço e vinhaça	a) Derivados da levedura, frutose e glicose b) Frutoologossacarídeos c) Xaropes invertidos por via enzimática d) Cogumelos comestíveis da espécie <i>Pleurotus ostreatus</i>
Biológicos	Bagaço	a) Composto fertilizante
Estruturais: materiais cujas propriedades os tomam utilizáveis em estruturas, máquinas ou produtos consumíveis	Bagaço	a) Aglomerados de bagaço/cimento b) Aglomerados MDF

Vários materiais lignocelulósicos são utilizados para obtenção de hidrolisados hemicelulósicos com o objetivo de produzir xilitol. Dentre eles podemos destacar: o bagaço de cana-de-açúcar (ALVES et al., 1998; SENE et al., 2001a e b; VERDE, 2001; MARTON, 2002; RODRIGUES et al., 2003a e b; MARTON et al., 2006; SARROUH; BRANCO; SILVA, 2009; ARRUDA et al., 2010), de malte (CARVALHEIRO et al., 2005; DRAGONE, 2007), de abacaxi (SILVA, 2011), as aparas de eucalipto (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1996a e b e 1998a; CANETTIERI; ALMEIDA E SILVA; CARVALHO JR, 2003), as palhas de arroz (ROBERTO et al., 1994 e 1995, MUSSATO; ROBERTO, 2005;

HUANG et al., 2011), de trigo (CANILHA; CARVALHO; ALMEIDA e SILVA, 2006; CANILHA et al., 2008), de cevada (CÂNDIDO et al., 2004), de centeio (FRANCESCHIN et al., 2011), de sorgo (HERRERA et al., 2004; SENE et al., 2011), a casca de aveia (TAMANINI et al., 2004) e mais recentemente os *debris* das podas de oliveiras (GARCÍA et al., 2011) e o colmo de *Sasa senanensis*, uma espécie de bambu comum no Japão e China (MIURA et al., 2011).

2.2 Xilitol

2.2.1 Propriedades e aplicações

O xilitol (Figura 2.2) é um açúcar natural com uma vasta gama de aplicações interessantes, sendo um dos fatores mais atraentes a possibilidade de sua obtenção a partir do bagaço de cana-de-açúcar, um co-produto abundante e disponível no Brasil, conforme apresentado no item 2.1.1. O xilitol é caracterizado quimicamente como um álcool pentahidroxiado ($C_5H_{12}O_5$) de massa molar 152,15 g/mol, com poder adoçante semelhante ao da sacarose e superior ao de polióis comuns, além de valor calórico reduzido (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973; HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982). As propriedades físico-químicas (Tabela 2.3) mais importantes do xilitol deixam em evidência a sua grande importância como insumo na indústria alimentícia, odontológica e farmacêutica (BAR, 1986).

Figura 2.2. Modelo molecular do xilitol – Software ACD/ChemSketch – vs. 4.55 (MARTON, 2002).

Outra propriedade do xilitol que merece destaque é a sua não cariogenicidade, uma vez que este não é utilizado pelos micro-organismos da microbiota bucal, principalmente pela bactéria *Streptococcus mutans*, pois impede a formação de ácidos que atacam o esmalte dos dentes, além de promover a

remineralização dos mesmos, revertendo lesões recém formadas (MÄKINEN, 1976; MÄKINEN, 1992; SHEN et al., 2001).

Tabela 2.3. 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%: 1,23cP; a 60%: 20,63cP
Solubilidade a 30°C	68g de xilitol /100g 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 ⁻¹ ; a 60%: 1,23 g mL ⁻¹
Calor de dissolução	+34,8cal/g (“efeito refrescante”)
Poder adoçante	Igual ao da sacarose, superior ao sorbitol e manitol
Valor calórico	4,06Kcal/g
Índice de refração a 25°C	a 10%:1,34; a 50%:1,41
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

O esquema da Figura 2.3 proposto por Wen, Browngardt e Burne (2001), representa o mecanismo de ação do xilitol na bactéria *S. mutans*. Neste esquema, o xilitol entra na célula pelo sistema fosfotransferase, e uma vez no interior da célula este é fosforilado pela frutose fosfotransferase formando então xilitol-5P. A bactéria não consegue metabolizar o xilitol-5P, pois este é tóxico a ela, o que resulta na expulsão do metabólito formado através do gasto de energia e seu acúmulo no citoplasma. Desta forma, o acúmulo de xilitol-5P inibe o consumo de outros açúcares e o crescimento bacteriano (WEN; BROWNGARDT; BURNE,

2001; GRILLAUD et al., 2005). Segundo Kandelman (2003) a diminuição do número de *S. mutans* na saliva e/ou na placa pode ser devida tanto à redução da quantidade de açúcar extracelular como pela perda da capacidade de adesão destas bactérias na cavidade bucal. Pesquisas clínicas com crianças em idade escolar, as quais utilizaram doces e gomas de mascar contendo xilitol, evidenciaram a capacidade deste poliol em prevenir a cárie dentária e manter a higiene-oral (ALANEN; ISOKANGAS; GUTMANN, 2000; MÄKINEN et al., 2001).

Embora o uso do xilitol seja clinicamente tão eficaz quanto o uso de selantes de fissuras, os custos do tratamento com xilitol podem exceder as intervenções alternativas, assim o uso do xilitol pode ser limitado à populações de alto risco, tais como deficientes ou idosos em situação vulnerável e aos pacientes com alta experiência anterior de cárie (RODRIGUES, J.A. et al., 2011).

Fru = Frutose; SFT = Sistema Fosfotransferase

Figura 2.3. Esquema do efeito do xilitol em *Streptococcus mutans* (Baseado em WEN; BROWNGARDT; BURNE, 2001).

O xilitol também não participa de reações do tipo Maillard por não apresentar grupos aldeídicos ou cetônicos em sua molécula, responsáveis por escurecimento e redução do valor nutricional de proteínas, o que possibilita seu uso na indústria alimentícia no processamento de produtos em que estas reações não são desejáveis (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973).

Outra característica importante do xilitol é o seu metabolismo independente de insulina, tornando-o um substituto de outros açúcares na dieta de diabéticos (PEPPER; OLINGER, 1988). Este adoçante também pode ser empregado no tratamento de outras desordens metabólicas como a deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase e na dieta de obesos, uma vez que este exerce

pequena contribuição para a formação de tecidos gordurosos quando comparado a outros açúcares (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973; van EYS et al., 1974). Em estudos realizados com ratos foi constatado que a ingestão de xilitol reduziu o ganho de peso e o consumo de alimento e também diminuiu os níveis plasmáticos de triglicerídeos e colesterol nestes animais (ELLWOOD et al., 1999).

A utilização do xilitol na área clínica também é relatada na prevenção de osteoporose, relatada por Mattila, Knuuttila e Svanberg (1998). Segundo esses autores, experimentos com ratos demonstraram que a administração oral de xilitol impediu a progressão da osteoporose proporcionando aumentos da massa óssea e das propriedades biomecânicas de ossos enfraquecidos naqueles ratos, apontando ainda que a utilização de xilitol torna-se uma nova alternativa que amplia os tratamentos clínicos na prevenção desta doença. Mattila, Kamgasmaa e Knuuttila (2005) demonstraram que a administração simultânea em ratos de 10% de xilitol aliada a 10% de etanol aumentou o volume ósseo e o conteúdo mineral destes animais em comparação aos efeitos induzidos pela única suplementação de 10% de xilitol.

Destaca-se também a propriedade do xilitol em inibir a aderência de células microbianas na região laringo-faríngea (UHARI; TAPIAINEN; KONTIÖKARI, 2001). De fato observou-se inibição do crescimento de *Streptococcus pneumoniae* em função do impedimento da adesão desta bactéria sobre as células nasofaríngeas na presença de xilitol, podendo assim este ser indicado no tratamento de pacientes com otite (UHARI; TAPIAINEN; KONTIÖKARI, 2001; TAPIAINEN et al., 2002). Esta propriedade foi observada em experimentos clínicos com crianças, onde o xilitol mostrou-se eficaz na prevenção do desenvolvimento de otite com a utilização de uma dose variando entre 8,4 a 10 g/dia dividida em cinco porções. Estes autores observaram ainda que o uso de xilitol na prevenção desta doença reduziu consideravelmente a utilização de antibióticos empregados no tratamento, contribuindo para a redução de um problema mundial, que é resistência de bactérias a agentes antimicrobianos causada justamente pelo uso descontrolado dos mesmos.

Zabner et al. (2000) verificaram que a utilização do xilitol teve efeito satisfatório também no tratamento da fibrose cística, uma doença que afeta principalmente os pulmões e o sistema digestivo. Esses autores constataram em testes com humanos, que o uso inalatório do xilitol em “spray” resultou na

diminuição da concentração salina da camada superficial da membrana respiratória, o que favoreceu a imunidade própria desta superfície e, como consequência, reduziu o número de bactérias do gênero *Staphylococcus* coagulase-negativa na cavidade nasal de voluntários, diminuindo o risco de infecções bacterianas pulmonares.

Sajjan et al. (2004) observaram inibição de 67% a 85% na adesão da bactéria *Burkholderia cepaciae* pelo xilitol, sendo esta uma das principais bactérias responsáveis por infecções e morte em pacientes com fibrose cística.

Estudos de toxicidade dérmica (em coelhos) e de fototoxicidade (em cobaias) indicaram que o uso de xilitol (5 e 10%, p/p) não apresentou irritação dérmica (não induziu o aparecimento de eritema, edema e escaras) embora tenha sido fototóxico em ambas as concentrações testadas, o que sugere que sua utilização em doenças de pele deve ser acompanhada de filtro solar (FERREIRA; BARBOSA; SILVA, 2009).

A combinação de xilitol com farnesol foi testada por Masako et al. (2005a e b) como forma de controlar o balanço da microbiota da pele, segundo estes autores constatou-se que a combinação destes inibiu a formação de biofilme da bactéria *Staphylococcus aureus* além de dissolver aquele já existente. De acordo com os mesmos autores, a formação de biofilme, constituído principalmente de glicocálix e fibras de fibrina, é impedida pela inibição da formação de glicocálix causada pelo xilitol e a dissolução das fibras de fibrina causada pelo farnesol. Entretanto, não se observou a inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus epidermidis*, a qual é a principal constituinte da microbiota ou microflora da epiderme de pessoas saudáveis protegendo-as contra o crescimento de bactérias patogênicas como no caso de *S. aureus*.

2.2.2 Tolerância, toxicidade do xilitol

O xilitol é bem tolerado pelo corpo humano podendo ser consumido até 20g por dose, ou 60g por dia se ingerido em várias refeições, por isso, a ingestão acima dessa porção pode apresentar efeito laxativo devido ao desbalanço osmótico causado no intestino grosso pela baixa taxa de assimilação (EMODI, 1978; CULBERT et al., 1986). No entanto, é conhecido que este pode causar risco de vida em cães, uma vez que pesquisas constataram que se estes animais

ingerirem quantidades acima de $0,1 \text{ g kg}^{-1}$ de xilitol, podem desenvolver hipoglicemia, bem como aqueles que ingerirem quantidades acima de $0,5 \text{ g kg}^{-1}$ podem desenvolver insuficiência hepática aguda (PISCITELLI; DUNAYER; AUMANN, 2010). Em humanos, ratos, macacos rhesus e cavalos o aumento do nível de insulina depois da injeção de xilitol é insignificante se comparado com o consumo de glicose (WILSON; MARTIN, 1970¹ and KUZUYA et al., 1971² *apud* PISCITELLI; DUNAYER; AUMANN, 2010). Em contraste, o consumo de xilitol por cães, coelhos, babuínos, vacas e gansos pode ser comparado com a ingestão de uma dose de glicose. Em cães a ingestão de xilitol pode levar a um aumento de 2,5 à 7,0 vezes o nível de insulina comparado com a mesma quantidade de glicose consumida. Esse aumento no nível de insulina depois da ingestão de xilitol pode levar a uma severa hipoglicemia, a elevação dos níveis das enzimas do fígado e até mesmo a necrose hepática em cães (DUNAYER; GWALTNEY-BRANT, 2006; TODD; POWELL, 2007).

Desde 1984 a *European Economic Community* (EEC) considera o xilitol seguro quanto à sua utilização por humanos, sendo que a partir de 1986 este foi classificado como “geralmente reconhecido como seguro” (*Generally Regarded as Safe* – GRAS) e em 1994 como “seguro para os dentes” (*Safe for Teeth*) pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos. Já A *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) desde 2008, o classifica como aceitável para consumo diário (*Acceptable Daily Intake* – ADI) (JOINT..., 2009).

2.2.3 Mercado do xilitol

Desde 1980, 28 países estão usando o xilitol em produtos comerciais, sendo que no início dos anos 90, uma produção anual na faixa de 5000 toneladas em todo mundo foi relatada. Além de um número de empresas nos Estados Unidos que estão interessadas na produção em grande escala de xilitol, interesses semelhantes são despertados em países como Suíça, Finlândia e Alemanha, entre outros. A União Européia é responsável pela metade da

¹ WILSON, R.B.; MARTIN, J.M. Plasma insulin concentration in dogs and monkeys after xylitol, glucose or tolbutamide infusion. *Diabetes*, v.19, p.18-22, 1970.

² KUZUYA, T.; KANAZAWA, Y.; HAYASHI, M. et al. Species different in plasma insulin response to intravenous xylitol in man and several mammals. *Endocrinol Jpn*, v.18, p.309-320, 1971.

produção mundial de xilitol, enquanto a Ásia e os Estados Unidos são responsáveis por 30 e 20%, respectivamente (JIN-SEO, 2007; SHIRBHATE, 2008). Até 2008 cerca de 95% da produção mundial de xilitol pertencia a duas empresas finlandesas, sendo e o restante dividido entre quatro empresas japonesas, uma chinesa e duas suíças (SHIRBHATE, 2008). Hoje a maior fabricante do mundo é a empresa dinamarquesa Danisco, seguida de outras empresas chinesas (FRANCESCHIN et al., 2011).

Na Ásia o xilitol é particularmente usado na fabricação de gomas de mascar, sendo que nesta região cerca de 80% a 90% das gomas vendidas tem o adoçante em suas formulações. A empresa chinesa Futaste produz atualmente 35 mil toneladas de xilitol por ano, bem como 20 mil toneladas de xilose e outros tipos de adoçantes e já fornece para empresas importantes, como Wrigleys, Kraft e Cadbury em todo o mundo. A China é atualmente, uma grande produtora de xilitol, e no ano passado, os analistas da Frost & Sullivan, alertaram que os produtores da região já estão promovendo competição acirrada com os seus homólogos ocidentais (ANNIES, 2011).

Segundo García (2005) e Jin-Seo (2007) o mercado do xilitol está aumentando, sendo este estimado em US\$ 639,5 milhões/ano, sendo que o preço deste açúcar-álcool está na faixa de US\$ 20-200 Kg⁻¹, de acordo com o seu grau de pureza.

2.3 Ocorrência e obtenção do xilitol

2.3.1 Ocorrência

Na natureza, o xilitol é encontrado, por exemplo, em frutas, legumes, verduras, líquens, algas e cogumelos (*Psalliota campestris*) e a sua extração diretamente dessas fontes não é economicamente viável pelas baixas quantidades presentes nestes materiais (900mg/100g), o que torna este processo de obtenção economicamente inviável (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982; PEPPER; OLINGER, 1988).

O xilitol também aparece como um produto intermediário durante o metabolismo de carboidratos em mamíferos, inclusive no homem (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973; YLIKAHRI, 1979). Um humano adulto produz, por exemplo, entre 5 e 15g de xilitol por dia durante o metabolismo normal (PEPPER;

OLINGER, 1988) e a sua concentração no sangue encontra-se na faixa de 0,03 a 0,06 mg/100mL (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973; YLIKAHRI, 1979).

Em organismos superiores o metabolismo do xilitol ocorre principalmente no fígado, onde pode ser transformado em glicose a uma taxa entre 20 e 80%, dependendo da necessidade. Sua absorção é lenta e, por isso, também pode ser metabolizado indiretamente pela microbiota intestinal (YLIKAHRI, 1979; MÄKINEN, 2000).

2.3.2 Obtenção

A produção de xilitol por processo químico iniciou-se na Finlândia pela Finnish Sugar Co. Ltda., Helsink, com capacidade para produzir acima de 3000 ton/ano, processo patenteado em 1977 (Patente # 4008285) (MELAJA; HÄMÄLÄINEN, 1977). Este processo consiste na hidrogenação catalítica da xilose pura obtida através da hidrólise de materiais lignocelulósicos. De modo geral, são necessárias quatro etapas básicas para a realização do processo químico: (1) desintegração de materiais lignocelulósicos ricos em xilana através de uma hidrólise ácida, (2) separação da xilose do hidrolisado, por cromatografia, para a obtenção de uma solução de xilose de elevada pureza, (3) hidrogenação catalítica da xilose pura em xilitol na presença de níquel como catalisador e (4) purificação e cristalização do xilitol (MELAJA; HÄMÄLÄINEN, 1977).

O rendimento do processo químico, bem como a qualidade do xilitol, são dependentes da pureza da solução inicial de xilose, uma vez que a presença de impurezas interfere no processo de catálise. Além disto, a produção de xilitol por via química exige várias etapas de purificação para remoção de resíduos do catalisador, o qual é um metal tóxico e prejudicial à saúde humana, e de subprodutos gerados durante o processo de hidrogenação (MELAJA; HÄMÄLÄINEN, 1977), resultando no aumento de tempo de processamento e encarecimento do produto (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998a).

Inúmeras patentes relacionadas à obtenção química de xilitol podem ser encontradas, como as americanas U.S. Patent # 3627636 (1971); U.S. Patent # 0003356 (2011); a alemã U.S. Patent # 3980719 (1976) e as finlandesas U.S. Patent # 4008285 (1977), U.S. Patent # 5081026 (1992), U.S. Patent # 5631150 (1997); sem contar os trabalhos que ainda não foram patenteados, como do

Instituto de Pesquisa de Açúcar em Taiwan e do Centro Asiático e Pacífico de transferência de tecnologia (APCTT) na China (SHIRBHATE, 2008).

Como alternativa ao processo químico, pesquisas têm sido conduzidas para o desenvolvimento de processos biotecnológicos utilizando micro-organismos para a conversão de xilose em xilitol sem a necessidade de uso de solução inicial de xilose pura (ONISHI; SUZUKI, 1966; FELIPE et al., 1997a; PARAJO; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998b; FELIPE, 2004). Mais recentemente, uma nova tecnologia de produção de xilitol foi proposta, a tecnologia enzimática. Nesse processo são empregadas a enzima xilose redutase (E.C. 1.1.1.2.1) e a coenzima NAD(P)H, as quais promovem a redução de xilose em xilitol (TOMOTANI et al., 2007; TOMOTANI et al., 2009; BRANCO, 2010). No entanto, por se tratar de uma tecnologia em início de estudo ainda há dúvidas sobre sua viabilidade econômica, principalmente associada aos custos das enzimas e da coenzima (BRANCO, 2010).

Em geral, entre os micro-organismos, as leveduras são consideradas as melhores produtoras de xilitol, sendo que as do gênero *Candida* têm se destacado, permitindo a obtenção dos melhores resultados (BARBOSA et al., 1988; SIRISANSANEEYAKUL; STANISZEWSKI; RIZZI, 1995; WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998; PARAJO; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998a; KWON et al., 2006). Há relatos também de pesquisas com fungos filamentosos e bactérias produtoras de xilitol, dentre os fungos destacam-se os dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Gliocladium*, *Byssoschlamys*, *Myrothecium* e *Neurospora* spp. (CHIANG; KNIGHT, 1961), *Petromyces albertensis* (DAHIYA, 1991), *Mucor* sp. e *Fusarium oxysporum* (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998a) e bactérias, como *Corynebacterium* sp., *Enterobacter liquefaciens* e *Mycobacterium smegmatis* (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998). Trabalhos sobre a produção de xilitol por micro-organismos recombinantes também são encontrados na literatura, como é o caso das leveduras *Candida tropicalis* (KO; RHEE; KIM, 2006), *Pichia stipitis* (RODRIGUES, R.C.L.B. et al., 2011) *Saccharomyces cerevisiae* (LEE et al., 2003) e das bactérias *Bacillus subtilis* (CHENG, H. et al., 2011) e *Escherichia coli* (SUZUKI et al., 1999).

Existem ainda micro-organismos, nos quais o xilitol é formado a partir de arabinose ou arabitol como é o caso do fungo filamentoso *Aspergillus niger*

(WITTEVEEN et al., 1994), da levedura *Pichia stipitis* (HALLBORN et al., 1995) e da bactéria *Gluconobacter oxydans* (SUZUKI et al., 2002).

Há pesquisas também da produção de xilitol a partir de D-glicose, sendo este processo baseado em três etapas distintas. Na primeira etapa, a D-glicose é convertida em D-arabitol empregando-se a levedura *Debaryomyces hansenii*, posteriormente o D-arabitol é convertido a D-xilose pela bactéria *Acetobacter suboxydans* e finalmente a D-xilose é oxidada a xilitol pela levedura *C. guilliermondii* (ONISHI; SUZUKI, 1969). De acordo com Granström, Izumori e Leisola (2007) o rendimento e a produtividade de xilitol a partir de glicose são baixos aos comparados à redução de D-xilose em xilitol em uma única etapa de reação devido principalmente à da formação de produtos secundários. No entanto, de acordo com estes autores esta abordagem dá mais possibilidades de conversão de hexoses a produtos de interesse industrial e amplia sua utilização como fonte de carbono.

2.4 Bioconversão de xilose em xilitol

O metabolismo da xilose inicia-se com o seu transporte através da membrana celular por diferentes mecanismos (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998) e uma vez no interior das células, esta é reduzida em xilitol, por uma reação catalisada pela enzima xilose redutase (E.C. 1.1.1.21) ligada à nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada ou não, em sua forma reduzida (NADPH/NADH). Em seguida ocorre a oxidação do xilitol em xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (E.C. 1.1.1.9) ligada a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfatada ou não em sua forma oxidada (NADP⁺/NAD⁺). A xilulose pode então ser fosforilada a xilulose-5-fosfato, molécula esta que pode ser convertida, através de reações não oxidativas da via das fosfopentoses, a gliceraldeído-3-fosfato e frutose-6-fosfato. Estes compostos intermediários podem ser metabolizados pela via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) que está conectada a outras vias como o ciclo de Krebs e às reações de fermentação alcoólica (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994; WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998).

As enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH) podem ter especificidades diferentes em relação aos cofatores oxidados e reduzidos dependendo da espécie da levedura. Para *Candida utilis*, por exemplo, a enzima

XR requer como cofator NADPH, enquanto a XDH é dependente da NAD^+ . Em *Pichia stipitis* e *Pachysolen tonnophilus* estas enzimas são específicas para ambos os cofatores reduzidos (NADH/NADPH) e oxidados ($\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$) (BRUINENBERG et al., 1984). Em *C. guilliermondii* FTI 20037 a enzima XR é NADPH-dependente e a enzima XDH é NAD^+ ou NADP^+ - dependente (SILVA et al., 1996). Yokoyama et al. (1995) sugerem que micro-organismos que apresentam a enzima XR dependente de NADH são melhores produtores de etanol e ao contrário, aqueles que apresentam xilose redutase dependente de NADPH, acumulam xilitol ao invés de produzir etanol. Além disso, a disponibilidade de oxigênio influencia fortemente o requerimento dos cofatores desta enzima. Condições de anaerobiose ou limitadas de oxigênio causam um desbalanço redox, o qual interfere na produção de xilitol e dos subprodutos deste metabolismo, etanol e/ou glicerol (FELIPE, 2004).

As atividades de xilose redutase e xilitol desidrogenase são também influenciadas por outros carboidratos como a arabinose e glicose, presentes juntamente à xilose nos hidrolisados hemicelulósicos como o de bagaço de cana-de-açúcar (SILVA; FELIPE, 2006).

Outros fatores devem ser também considerados como parâmetros interferentes na bioconversão de xilose em xilitol como o pH (LAWFORD; ROUSSEAU, 1993; FELIPE et al., 1997b; SENE et al., 2000; RODRIGUES et al., 2003c), a repressão catabólica exercida pela D-glicose (YAHASHI et al., 1996; BICHO et al., 1998; LEE; RYU; SEO, 2000), a idade e concentração do inóculo (PFEIFER et al., 1996; FELIPE et al., 1997a), a concentração inicial de xilose (SILVA; AFSCHAR, 1994; FELIPE et al., 1997a), a temperatura (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998b; SENE et al., 2000) e a relação glicose:xilose no meio de fermentação (SILVA; FELIPE, 2006). Porém, quando da utilização de hidrolisados hemicelulósicos é importante considerar além destes fatores acima mencionados a influência exercida por compostos tóxicos aos micro-organismos, como fenóis, ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural, presentes nos hidrolisados, os quais são provenientes do processo de hidrólise ácida de biomassa vegetal (FELIPE, 2004). Outros tóxicos em potencial e que estão presentes no hidrolisado são os íons metálicos que podem ser provenientes da degradação dos equipamentos de hidrólise (WATSON et al., 1984), bem como da da própria cana-de-açúcar (CAMILOTTI et al., 2007). Watson et al. (1984),

verificaram que o reator de aço inoxidável é uma fonte em potencial de liberação de cátions ferro, cromo e níquel durante o preparo de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em comparação ao reator de plástico resistente ao calor. Já Camilotti et al. (2007) encontraram que os íons metálicos encontrados no hidrolisado podem ser também provenientes da própria cana-de-açúcar, como o cromo detectado no colmo e no palmito, o níquel no palmito e nas folhas e o chumbo em todas as partes avaliadas da cana. Todos estes compostos tóxicos inibem o metabolismo microbiano não só em função do tipo e concentração em que se encontram no meio, mas também da atuação sinérgica entre eles (FELIPE et al., 1997a; ALVES et al., 1998; RODRIGUES et al., 2001; CONVERTI et al., 2000; LARSSON et al., 2000; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a; NILVEBRANT; REIMANN; LARSSON, 2001; SILVA et al., 2004a; FELIPE, 2004).

A Figura 2.4 apresenta um esquema proposto para a utilização dos açúcares encontrados em hidrolisados hemicelulósicos obtidos de materiais lignocelulósicos e a formação de xilitol por *C. guilliermondii*.

No processo biotecnológico de obtenção de xilitol a partir de *C. guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar já foram estabelecidos parâmetros como concentração (0,1 a 1,0 g L⁻¹) e idade do inóculo (24 h) (PFEIFER et al., 1996; FELIPE et al., 1997a), pH (5,5 a 6,5) (FELIPE et al., 1997b); temperatura (30 °C) (BARBOSA et al., 1988; FELIPE et al., 1997a; SENE et al., 2000), concentração de xilose (50 a 60 g L⁻¹) (FELIPE et al., 1997a), relação glicose:xilose (1:5) (SILVA; FELIPE, 2006), concentração de ácido acético (FELIPE et al., 1995; SILVA, 2001; SILVA et al., 2004b). Também a adaptação e reciclagem do inóculo ao próprio hidrolisado (FELIPE, 2004; MATOS, 2004; RODRIGUES et al., 2006), bem como o preparo do inóculo na presença de baixa concentração de glicose (SILVA; BANHE; FELIPE, 2003; SILVA, 2004; SILVA; FELIPE, 2006) ou arabinose (MATOS, 2004) junto à xilose foram condições de fermentação que propiciaram o favorecimento da produção de xilitol.

De acordo com Silva, Banhe e Felipe (2003), a fonte de carbono utilizada no cultivo do inóculo de *C. guilliermondii* (mistura de açúcares: xilose e glicose ou somente xilose) durante fermentações em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana influenciou não só o consumo de xilose, mas o de ácido acético, bem como o crescimento celular, enquanto para a formação de xilitol não foi observado diferenças marcantes ao final destas fermentações. Pfeifer et al. (1996) também

avaliaram diferentes tipos de fontes de carbono no cultivo da levedura *C. guilliermondii* (mistura de xilose e glicose, somente xilose ou glicose) e verificaram diferentemente ao observado por Silva, Banhe e Felipe (2003) que a formação de xilitol foi extremamente influenciada pela composição de meio do inóculo. Estes autores observaram que a maior concentração de xilitol ($16,40 \text{ g L}^{-1}$) e o maior rendimento da bioconversão ($0,57 \text{ g g}^{-1}$) foram obtidos utilizando-se o inóculo crescido apenas em glicose.

Dentre os vários parâmetros avaliados na bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, foi observado que o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio é um dos fatores mais importantes, uma vez que a variação acima ou abaixo de um valor ótimo leva a uma diminuição significativa do fator de conversão e/ou produtividade em xilitol (SILVA; FELIPE; MANCILHA, 1998; ROBERTO; MANCILHA; SATO, 1999; MARTÍNEZ; SILVA; FELIPE, 2000; BRANCO et al., 2009). Existem muitos artigos publicados nos últimos anos sobre a produção de xilitol por leveduras do gênero *Candida*, sendo que os dados sobre o $k_L a$ são ainda controversos, uma vez que alguns estudos relatam que os valores ótimos de $k_L a$ para produção deste poliol foram próximos de 100 h^{-1} (AGUIAR JR. et al., 2002), enquanto outros descrevem valores entre $47\text{-}50 \text{ h}^{-1}$ (WINKELHAUSEN; AMARTEY; KUZMANOVA, 2004; BRANCO et al., 2009) e ainda tem aqueles que citam valores de apenas $15 \text{ a } 20 \text{ h}^{-1}$ (ROBERTO; MANCILHA; SATO, 1999; MARTÍNEZ; SILVA; FELIPE, 2000; RODRIGUES, 2005; CANILHA, 2006; SILVA et al., 2007; MORAES, 2008, CHENG, K.K. et al., 2011).

Figura 2.4. Esquema do metabolismo de glicose, xilose e arabinose por *C. guilliermondii* (Adaptado de SILVA, 2004).

Segundo Náhlík et al. (2003) quando condições anaeróbicas são utilizadas no processo, ocorre um desequilíbrio no potencial redox da célula, devido à elevação na concentração de NADH, o que leva à paralisação do metabolismo celular, enquanto, condições de elevada aeração desviam o metabolismo microbiano para a produção de células, diminuindo a produção de xilitol. Desta forma, deve-se trabalhar sob condições de limitação de oxigênio, nas quais se observa acúmulo de xilitol, devido à limitação da quantidade de cofator oxidado necessário à atividade de xilitol desidrogenase. Para *C. guilliermondii* FTI 20037 a condição de transferência de oxigênio empregada para a produção de xilitol em frascos agitados (125mL contendo 50mL de meio) tem sido 200 rpm (FELIPE et al., 1997a; SENE et al., 2000; SILVA et al., 2004b; RODRIGUES et al., 2006; SARROUH; BRANCO; SILVA, 2009; ARRUDA et al., 2010), enquanto, em fermentadores de bancada a utilização de um coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) próximo de 20 h^{-1} é empregado (RIBEIRO, 1997; ROBERTO; MANCILHA; SATO, 1999; MARTÍNEZ SILVA; FELIPE, 2000; SENE et al., 2001a; RODRIGUES et al., 2003c; RODRIGUES, 2005; MORAES, 2008).

2.5 Toxicidade dos compostos presentes nos hidrolisados aos micro-organismos

A Figura 2.5 apresenta um esquema das reações que acontecem durante a hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos, na qual ocorre a liberação de açúcares e formação de compostos tóxicos à levedura, conforme já foi mencionado anteriormente (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

Figura 2.5. Esquema das reações que ocorrem durante a hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos (Baseado em PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a; FONSECA, 2009).

Com relação ao ácido acético foi evidenciado em pesquisas com *C. guilliermondii* que o aumento da concentração deste no meio a valores superiores a $3,0 \text{ g L}^{-1}$ interferiu negativamente na bioconversão de xilose em xilitol por esta levedura durante fermentações realizadas em meio sintético, enquanto a presença deste ácido em baixas concentrações ($1,0 \text{ g L}^{-1}$) favoreceu esta bioconversão sendo a levedura capaz de assimilar todo o ácido durante o processo (FELIPE et al., 1995). Nas fermentações em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, Lima et al. (2004), também verificaram a inibição dos parâmetros rendimento e produtividade de xilitol por *C. guilliermondii* só que em concentração acima de 5 g L^{-1} deste ácido. O favorecimento da fermentação

de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* na presença de baixa concentração de ácido acético ($1,0 \text{ g L}^{-1}$), está relacionada ao fato de parte deste ácido poder entrar diretamente no ciclo de Krebs via acetil-CoA, enquanto concentrações maiores poderiam ser utilizadas por outras vias metabólicas dependentes de energia como o ciclo do glioxilato (FELIPE et al., 1995). Quanto à inibição da atividade exercida por altas concentrações de ácido acético, Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000a), atribuem aos mecanismos de sua incorporação e ao acúmulo intracelular de ânion. Estes autores propõem algumas teorias para o efeito deste ácido como a diminuição do pH intracelular resultante do refluxo de ácidos fracos em função da neutralização por ação da ATPase da membrana plasmática, a qual bombeia prótons para fora da célula com gasto de ATP. Em condições de forte acidez a capacidade de bombear o próton da célula é esgotada resultando em exaustão de ATP, dissipação da força próton motora e acidificação do citoplasma em função do acúmulo de ânions intracelular. De acordo com essa teoria a forma aniônica do ácido é capturada na célula e o ácido não dissociado se difunde dentro da célula até que o equilíbrio seja alcançado (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

Quanto aos compostos fenólicos, Villa et al. (1998) avaliaram o efeito tóxico do fenol durante a fermentação em meio semi-sintético por *C. guilliermondii* e verificaram que a presença de baixa concentração ($0,1 \text{ g L}^{-1}$) deste composto foi suficiente para reduzir drasticamente a produtividade de xilitol. Segundo estes autores, isto se deve provavelmente à inibição da atividade da xilose redutase ou transporte de xilose através da membrana plasmática, já que a assimilação de xilose foi também drasticamente afetada. Segundo Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000a) os compostos fenólicos causam perda da integridade da membrana biológica, afetando sua habilidade de barreira seletiva e matrizes enzimáticas, observando-se a diminuição da inibição da fermentação quando monômeros de ácidos fenólicos são significativamente removidos do hidrolisado.

Em relação ao furfural e 5-hidroximetilfurfural foi constatado inibição do crescimento de *C. guilliermondii* pela presença de diferentes concentrações destes compostos durante o cultivo desta levedura em batelada e em condições aeróbias (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988). Segundo estes autores quando da utilização de concentrações de $1,0$; $1,5$ e $2,0 \text{ g L}^{-1}$ de furfural e 5-hidroximetilfurfural acarretaram em inibição do crescimento de $30,3$; $70,0$ e 100%

e de 7,7; 30,3 e 61,7%, respectivamente, sugerindo ser o furfural um inibidor do crescimento mais forte do que o 5-hidroximetilfurfural. Estes autores também observaram que a capacidade desta levedura em metabolizar estes componentes é diferente, em função da velocidade de assimilação, uma vez que o furfural é consumido mais rapidamente em relação ao 5-hidroximetilfurfural. Segundo os autores, isto sugere que as enzimas para o metabolismo de furfural possam ser constitutivas na levedura. Ainda de acordo com estes autores, o furfural e 5-hidroximetilfurfural atuam em enzimas como triose-fosfato desidrogenase e álcool-desidrogenase. Da mesma forma, Delgenes, Moletta e Navarro (1996) relataram que os crescimentos de *Pichia stipitis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meios sintéticos foram reduzidos em 100% quando a concentração de 5-hidroximetilfurfural adicionada no meio foi de 1,5 e 1,0 g L⁻¹, indicando que o efeito inibitório variou com o tipo de cepa.

Poucos estudos existem na literatura sobre o efeito dos cátions metálicos no metabolismo de leveduras, o que está bem elucidado são os mecanismos de transporte destes usando os recursos da biologia molecular (GABER, 1992). Os cátions metálicos são assimilados por várias razões, mas principalmente para regulação do pH e geração de força próton motora (no caso de transporte de íons H⁺); osmorregulação e balanço de carga (no caso de K⁺); funções de cofatores enzimáticos (no caso de Mg²⁺ e Mn²⁺) e de metaloenzimas estruturais (no caso de Fe²⁺, Zn²⁺ e Ni²⁺) e ainda sinal de mensageiro de transdução (no caso de Ca²⁺) (WALKER, 1998).

De acordo com Watson et al. (1984) em fermentações pela levedura *Pachysolen tannophilus* contendo 10 g L⁻¹ de xilose no meio, a presença de apenas 0,01 g L⁻¹ dos íons níquel e cromo inibiu fortemente o crescimento desta levedura e a produção de etanol, o que não foi observado para o íon cobre nesta mesma concentração devido ao seu efeito tóxico ter sido menos evidenciado em relação aos demais íons. Da mesma forma, em pesquisas realizadas por Dönmez e Aksu (2001) também foi constatado uma maior sensibilidade ao íon níquel em comparação ao cobre para *Candida* sp. cultivada em meio composto por 30 g L⁻¹ de glicose. Segundo Kleinzeller e Kotyka, (1967)³ apud Watson et al. (1984) os

³ KLEINZELLER, A.; KOTYK, A. **Transport of monosaccharides in yeast cells and its relationship to cell metabolism.** In: Aspects of Yeast Metabolism, pp. 33-45, 1967. Edited by A. K. Mills & H. Krebs. Philadelphia: F. A. Davis.

íons níquel podem inibir parcialmente o consumo de açúcares em leveduras por ligarem-se a superfície da célula.

Com relação ao íon ferro, Watson et al. (1984) verificaram que concentrações de $0,5 \text{ g L}^{-1}$ deste em meio contendo 10 g L^{-1} de xilose resultou em decréscimo de aproximadamente 45% da produção de etanol por *P. tannophilus*.

Pesquisas com *D. hansenii* revelaram forte inibição da enzima xilitol desidrogenase quando a concentração do íon zinco no meio foi de $0,75 \text{ mM}$ adicionado na forma de cloridrato de zinco (GÍRIO; PELICA; COLAÇO, 1996).

A identificação dos íons metálicos que interferem no metabolismo de leveduras é importante uma vez que estes interferem na regulação da assimilação de açúcares e outros compostos solúveis, bem como no crescimento celular (WALKER, 1998).

2.6 Procedimentos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana

Várias técnicas de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana vem sendo avaliadas com vistas a reduzir o teor dos compostos tóxicos aos micro-organismos e assim aumentar a fermentabilidade deste hidrolisado. Estes tratamentos podem ser classificados em função da forma de realização (individual ou combinado) e da natureza dos agentes empregados (biológico, físico e químico). Dentre estas técnicas, destacam-se o ajuste do pH pela adição de ácidos e bases (ALVES et al., 1998; MARTÍNEZ et al., 2001), a adsorção em carvão ativo (GINORIS, 2001; MARTON, 2002, VILLARREAL, 2005), a adsorção em resinas de troca iônica (CANILHA; ALMEIDA E SILVA; SOLENZAL, 2004; MARTON, 2005, VILLARREAL, 2005), floculação por polímero vegetal (SILVA, 2006; CHAUD et al., 2009; CHAUD, 2010) e mais recentemente a destoxificação biológica ou biodestoxificação (FONSECA, 2009).

2.6.1 Alteração do pH combinada à adsorção em carvão ativo

O carvão ativo é uma estrutura carbônica formada por associações de anéis aromáticos, heterociclos e outros grupos funcionais predominantemente formados por C, O e H (SWIATKOWSKI, 1998) podendo estar presentes também

N e S que, juntamente com os outros heteroátomos, perfazem 5 a 20% da massa final do carvão (GREENBANK; SPOTS, 1995). Pinus, eucaliptos, cascas de coco, palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, sementes, ossos, chifres de animais ou minerais como hulha e antracito podem ser utilizadas para sua obtenção (AHMEDNA; MARSHALL; RAO, 2000a; PAIVA; MENEZES, 2003). O carvão ativo apresenta diversas funções tais como: clareador, desodorizador, descolorizador e filtrador (SANTOS, 2009).

Para obtenção das propriedades de adsorção física no carvão (através de forças de Van der Waals) são necessárias duas etapas: a primeira consiste na carbonização, ou seja, aquecimento da matéria-prima em temperaturas em torno de 800-1000°C sob atmosfera inerte com o objetivo de eliminar os componentes voláteis e formar a estrutura porosa rudimentar e a segunda é a ativação, passagem de gases oxidantes, (ar, vapor de água ou CO₂) através do material carbonizado para formação da estrutura avançada, aumentando o volume e a largura dos poros originados durante a primeira etapa e criando novos poros. Estes processos são normalmente realizados em reatores de leito fluidizado ou em fornos (SWIATKOWSKI, 1998). De acordo com este autor os poros do carvão ativo são classificados segundo o tamanho em microporos (< 2nm); mesoporos (2-50 nm) e macroporos (>50 nm). O carvão ativado é normalmente 100 vezes mais poroso que o carvão comum (ACTIVBRAS..., 2011), sendo que os tamanhos variados dos poros são de grande importância, uma vez que poros pequenos não são capazes de adsorver moléculas grandes e vice-versa (AHMEDNA; MARSHALL; RAO, 2000b).

Uma característica do carvão é que sua superfície é considerada não polar ou ligeiramente polar, resultado da presença de grupos óxidos e impurezas inorgânicas. Devido a esta propriedade apresenta a vantagem de atuar como adsorvente: as cargas positivas e negativas estão muito próximas para exercer um significativo campo elétrico na superfície. Consequentemente, a retirada de moléculas adsorvidas é relativamente fácil, requerendo baixa energia para a regeneração do adsorvente (CARDOSO, 2006).

Apesar da estrutura porosa do carvão ativo ser fator determinante da sua capacidade de adsorção, esta também é influenciada pelo processo de ativação a que o carvão foi submetido, a sua granulometria, área superficial, densidade, teor de cinzas, estrutura interna dos poros e pela presença de grupos funcionais em

sua superfície tais como carboxílicos, fenólicos, carbonílicos e ainda lactonas, peróxidos e anidridos que, de acordo com suas características eletrostáticas, podem causar atração ou repulsão do adsorvato melhorando ou prejudicando o processo de adsorção, respectivamente (AHMEDNA; MARSHALL; RAO, 2000a; COUTINHO; BARBIERI; PAVAN, 2000).

O tratamento com carvão ativo baseia-se na capacidade deste material poroso, de origem natural, de adsorver sobre sua superfície diferentes tipos de moléculas através de forças fracas denominadas de van der Waals. (COSIDINE, 1974).

A eficiência do tratamento com carvão ativo depende também das condições sob as quais o processo de adsorção é realizado, principalmente quanto ao pH, tempo de contato entre o carvão e o adsorvato, temperatura e concentração de carvão ativo empregada (MARTON, 2002; MUSSATO, 2002; MUSSATTO; ROBERTO, 2004; VILLARREAL, 2005).

Mussatto (2002) avaliou o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz e verificou maior remoção de compostos fenólicos em pH 2,0 concluindo, através de análises estatísticas, que o pH é a variável de maior influência nos processos de adsorção em carvão ativo. Já Marton (2002) avaliou a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana a partir da utilização de quatro marcas nacionais de carvão ativo pulverizado (Synth, Brasilac, Carbomafr e Carvorite) e não encontrou diferenças significativas entre os carvões quanto à produtividade volumétrica de xitol embora o carvão ativo CDA da BRASILAC tenha sido selecionado para estudos de otimização do processo de adsorção por apresentar maior área superficial e menor custo. Entretanto, segundo este autor, as condições de adsorção influenciaram no tratamento e nos parâmetros fermentativos encontrando maior remoção de tóxicos (44,18% do ácido acético, 76,22% dos compostos fenólicos, 58,27% do furfural e 59,69% de 5-hidroximetilfurfural) e melhor clarificação do hidrolisado quando empregou temperatura de 60° C, tempo de contato de 30 minutos, agitação de 200 rpm, pH 2,5 e 1% de carvão ativo. Nestas condições *C. guilliermondii* consumiu 94,14% de xilose resultando em fator de conversão de 0,66 g g⁻¹ e produtividade de 0,51 g L⁻¹ h⁻¹ de xitol. Canilha et al. (2010), também trabalhando com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para produção de etanol por *Pichia stipitis* avaliaram a destoxificação deste hidrolisado pela

alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativo, com maior concentração (2,5% m/v) e tempo de contato (1h) do carvão com o hidrolisado em relação ao trabalho de Marton (2002). Segundo estes autores esta metodologia proporcionou remoções de 100% de 5-hidroximetilfurfural e furfural, 95% de fenóis, enquanto perdas de açúcares inferiores a 12% e nenhuma remoção de ácido acético foram verificadas.

A metodologia de adsorção por carvão ativo durante o tratamento de hidrolisados apesar de propiciar a remoção de compostos tóxicos e clarificação dos hidrolisados apresenta o inconveniente da perda de açúcares (MARTON, 2002; VILLARREAL, 2005).

2.6.2 Adsorção em resinas de troca iônica

As primeiras resinas trocadoras de íons foram desenvolvidas por volta de 1935 e obtidas por condensação de fenóis polihídricos com formaldeído. A partir de então se deu início a uma nova fase tecnológica de grande amplitude, possibilitando a produção de matrizes de vários graus de porosidade, trocadoras de cátions e ânions (SANTOS, 2009). Estas resinas de troca iônica são compostos macromoleculares constituídos de um esqueleto tridimensional no qual fixam-se grupos ativos que permitem trocar íons não desejáveis de uma solução problema por aqueles que se encontram saturando os grupos funcionais das mesmas. O processo de equilíbrio envolvido pode ser representado por: $RA + B \Rightarrow RB + A$, onde A e B representam os íons trocados e RA e RB a resina nas formas A e B, respectivamente. As reações de troca iônica são estequiométricas, reversíveis, possíveis com qualquer composto ionizável e a velocidade das mesmas depende da seletividade da resina (DECHOW, 1989). Como características essenciais para emprego em processos químicos as resinas trocadoras de íons devem apresentar: insolubilidade em água e em solventes orgânicos e inorgânicos, conter íons ativos capazes de troca reversível com outros íons em solução e não sofrer modificação física apreciável (MENDHAM et al., 2002).

De acordo com Harland (1994) a classificação das resinas de troca iônica é feita em função dos grupos ativos funcionais nas mesmas conforme pode ser observado na Tabela 2.4, onde estão apresentadas também a forma iônica na qual as resinas são comercializadas.

Tabela 2.4. Classificação das resinas de troca iônica (HARLAND, 1994).

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

Os grupos funcionais em contato com soluções aquosas ionizam-se gerando na rede um excesso de carga elétrica superficial negativa ou positiva (Figura 2.6).

Figura 2.6. Esquema ilustrativo de um trocador catiônico orgânico que intercambia íons H^+ por Na^+ em uma solução aquosa (PUC-Rio, 2011).

A máxima capacidade de troca das resinas é um parâmetro importante no processo de troca iônica e varia segundo as características das mesmas, relacionando o tamanho dos poros e a área superficial com as características das soluções a serem tratadas (densidade e viscosidade). Já a seletividade destes trocadores depende de fatores como a valência e tamanho do íon trocado, forma

iônica e entrecruzamento da resina, força iônica total da solução, tipo de grupo funcional e natureza dos íons não trocados (HARLAND, 1994).

A utilização de resinas de troca iônica permite remover impurezas ácidas presentes no hidrolisado, principalmente do ácido mineral empregado no processo de hidrólise, que geralmente são ácido sulfúrico ou clorídrico. Os ânions Cl^- e SO_4^- são trocados por íons OH^- utilizando-se resinas aniônicas fortemente básicas que promovem a neutralização da solução e ainda remoção de outros íons orgânicos de compostos como corantes, taninos, furanos, ácidos e compostos nitrogenados complexos e inorgânicos como silicatos e cinzas (PARAJÓ et al., 1998b; NÁPOLES et al., 1998, NILVEBRANT, REIMANN; LARSSON, 2001).

Verde (2001) avaliando o tratamento de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana com resinas de troca iônica na sequência A-860S, A-500 (aniônicas), C-150 (catiônica) e A-103S (aniônica fraca) obteve remoção de 100% de ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural, 86,44% dos compostos fenólicos e 97,48% da cor do hidrolisado resultando em um fator de conversão de xilose em xilitol de $0,75 \text{ g g}^{-1}$, produtividade volumétrica de $0,68 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e 81,60% de eficiência na fermentação por *C. guilliermondii*. Morita, Silva e Maugeri (2003) também avaliaram a destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana e as mesmas resinas empregadas por Verde (2001), porém, alterando a sequência para A-103S, A-860S, A500 e C-150, constataram valores de remoção dos tóxicos inferiores, com exceção dos fenóis que foi de 90,14%. Segundo estes autores a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* a partir do hidrolisado destoxificado com resinas em sequência diferente à empregada por Verde (2001) não foi influenciada, uma vez que valores semelhantes dos parâmetros fermentativos foram obtidos.

Carvalho Júnior, Marton e Felipe (2005) utilizando a combinação de resinas e carvão para a destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana constataram a eficácia deste procedimento na remoção de 95% de fenóis com consequente melhoria da fermentabilidade do hidrolisado, porém, encontraram perda de 40% de D-xilose, o que é indesejável, além do fato das resinas serem caras e exigirem extensivas etapas de regeneração. Segundo os mesmos autores, tratamento com resinas e carvão é mais eficaz para a remoção de fenóis

do hidrolisado de bagaço de cana em comparação à utilização de metodologia de alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado.

Resultados de trabalho recente de Canilha et al. (2010) indicam remoções significativas de compostos fenólicos (95%) e de ácido acético (88%) presentes em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por metodologia de destoxificação por adsorção em resinas de troca iônica para produção de etanol por *Pichia stipitis*. De acordo com estes autores, esta remoção resultou na melhoria dos parâmetros fermentativos em comparação à metodologia de alteração de pH combinada com carvão ativo também avaliada.

2.6.3 Floculação por polímero vegetal

A utilização de polímeros vegetais à base de tanino vegetal pode ser empregada como um tratamento alternativo aos procedimentos que já vêm sendo tradicionalmente estudados para a remoção de compostos tóxicos dos hidrolisados hemicelulósicos (SILVA, 2006), uma vez que estes polímeros possuem capacidade de se ligarem a diferentes compostos, insolubilizando-os, além de formar complexos com metais e remover fenóis de efluentes e águas (ÁGUA ONLINE, 2010). Estes são biodegradáveis, apresentam baixo custo e facilidade de manipulação (ACQUAQUÍMICA, 2010).

Taninos são compostos polifenólicos de alto peso molecular (500-3000 g mol⁻¹), encontrados na casca, caule, folhas e frutos dos vegetais, compostos também por açúcares e gomas (MANGAN, 1988⁴ *apud* NOZELLA, 2001, p.18). Estes são classificados em dois grupos: 1) taninos hidrolisáveis, que após hidrólise, produzem carboidratos e ácidos fenólicos; e 2) taninos condensados ou não hidrolisáveis, que são resistentes à hidrólise. O tanino condensado é o mais utilizado como floculante por ser mais viscoso que o hidrolisável, apresenta ação antimicrobiana (fungicidas, algicidas e antibacteriano), por serem reguladores de crescimento e germinação de plantas e funções correlacionadas a estas (SILVA, 1999).

Alguns trabalhos apontam que taninos podem ser tóxicos às bactérias presentes no rúmen, como *Streptococcus bovis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminobacter amylophilus* (YOUNG; PATERSON,

⁴ MANGAN, J.L. Nutritional effects of tannis in animal feeds. **Nutrition Research Reviews**, v.1, p.209-231, 1988.

1980; CANNAS, 2011). Os mecanismos que causam essa toxicidade incluem: a) inibição de enzimas e de privação de substrato; b) ação nas membranas; c) de privação de íons metálicos (SCALBERT, 1991).

Os polímeros à base de tanino vegetal são derivados da modificação da molécula do tanino extraído da Acácia negra. Essa modificação consiste em agregar um grupo catiônico a essa molécula e aumentar seu peso molecular. Embora obtidos da mesma matéria-prima, os polímeros podem apresentar aplicações diferentes, devido aos diversos insumos utilizados no seu preparo, ao tempo e temperatura de reação e porcentagem final de taninos (KONRATH, 2010, informação pessoal)⁵.

A empresa Acquaquímica SA, é um dos grupos mais fortes no Brasil no desenvolvimento e comercialização de polímeros à base de tanino vegetal, os quais podem ser utilizados como agente sanitizante em moendas de indústrias açucareiras (polímero com concentrações de 6,5-7,3% de taninos) e como floculante em tratamentos de efluentes industriais (polímero com concentrações de 18% de taninos). Benefícios como a decantação de bactérias e consequentemente a diminuição da contagem bacteriológica do meio são também proporcionados pelo uso desses polímeros, uma vez que ocorre uma interação do tanino com as proteínas e os polissacarídeos que compõem a membrana celular das bactérias. Os polímeros comercializados pela Acquaquímica SA atuam em sistemas de partículas coloidais, neutralizando cargas e formando pontes entre elas, processo responsável pela formação dos flocos e consequentemente sua decantação. Por atração iônica e interação superficial as diversas impurezas presentes são eliminadas rapidamente por coagulação e rápida precipitação (Figura 2.7), sendo efetivos na faixa de pH de 4,4 a 8,0 (ACQUAQUÍMICA, 2010).

Os polímeros à base de tanino vegetal são de fácil aplicação e pronto para uso, não requerendo diluições e misturas, além disso, são de baixo custo e biodegradáveis, podendo ser compostados para uso como adubo orgânico (ACQUAQUÍMICA, 2010). A biodegradação dos polímeros é um processo no qual bactérias e fungos utilizam suas enzimas para consumir substâncias destes como fonte de alimento, modificando a forma original do material até seu desaparecimento (VINAGRE; ESPÓSITO, 2004).

⁵ KONRATH, R.A. Publicação eletrônica (mensagem pessoal). Mensagem recebida por <priscilavaz_eb@yahoo.com.br> em 01 mar., 2008.

Figura 2.7. Etapas do processo de floculação por polímero vegetal (Adaptado de KONRATH, 2010, informação pessoal)⁶.

Na busca de métodos mais eficientes e de baixo custo para a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, pesquisas se iniciaram com a utilização de polímeros vegetais, tendo sido constatada a capacidade destes em removerem valores superiores a 80% de compostos fenólicos e íons metálicos, sem perda significativa de xilose quando do emprego de hidrolisado obtido da moagem artesanal durante preparo de caldo de cana (SILVA, 2006). De acordo com Pivetta, Arruda e Felipe (2008) a utilização de polímeros vegetais na destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana visando à obtenção de xilitol por *C. guilliermondii* resultou em produtividade volumétrica de $0,41 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Trabalhos recentes indicam a influência destes polímeros na remoção de íons metálicos, bem como nas atividades das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, chaves na bioconversão de xilose em xilitol (CHAUD, 2010). De acordo com o autor a utilização de polímero levou a maior perda dos íons cromo e ferro (superior a 90%), além de níquel. Já para as atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XD),

⁶ KONRATH, R.A. Publicação eletrônica (mensagem pessoal). Mensagem recebida por <priscilavaz_eb@yahoo.com.br> em 12 abr., 2010.

constatou-se que não houve uma correlação entre as suas máximas atividades e a condição de maior remoção de tóxicos e máximos parâmetros fermentativos.

Uma vez que o procedimento de destoxificação aumenta o custo do processo (von SIVERS et al., 1994), é importante contornar as etapas de destoxificação, bem como o desenvolvimento de métodos baratos e eficientes. Contudo, as necessidades para destoxificação devem ser avaliadas em cada caso, uma vez que dependem da composição química do hidrolisado e da cepa específica (CARVALHEIRO et al., 2005).

2.7 Recuperação e viabilidade econômica do xilitol em processos biotecnológicos

A recuperação do xilitol é o passo mais complexo de todo o processo fermentativo devido à sua baixa concentração e complexa composição do caldo fermentado (polipeptídeos, açúcares, sais inorgânicos, álcoois) (DE FAVERI et al., 2004).

A utilização de técnicas de separação do xilitol por diferentes tipos de membranas permitiu cristalizar mais de 87% deste produto proveniente da fermentação, por *Candida tropicalis*, de hidrolisado hemicelulósico de palha de milho (AFFLECK, 2000). A máxima pureza obtida neste trabalho foi de 90,3% utilizando-se membrana polisulfônica HG19.

Santos (2004) realizou pesquisas com diferentes zeólitas, na tentativa de recuperar xilitol da fermentação por *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados dessa pesquisa revelaram a eficácia desta técnica, sendo a maior eficiência de recuperação do xilitol (94,5%) encontrada com a utilização de um sistema composto por coluna de leito fixo empacotada com a zeólita BaWE.

Martínez (2005) recuperou o xilitol por cristalização tanto do caldo fermentado obtido a partir de solução sintética quanto deste obtido da fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, obtendo-se cristais com 98-99% e 92-94% de pureza, respectivamente. Resultados de recuperação do xilitol por cristalização, semelhantes aos obtidos por Martínez (2005) foram encontrados a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo (CANILHA, 2006).

Trabalhos recentes relatam a viabilidade econômica do processo biotecnológico de produção de xilitol a partir dos hidrolisados hemicelulósicos de palhas de cevada (MORAES, 2008), de centeio (FRANCESCHIN et al., 2011) e de bagaço de cana (SARROUH, 2009). Moraes (2008) realizou a análise econômico-financeira dos parâmetros que mais influenciaram na produção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada como equipamentos, consumo de matérias-primas, produtos químicos e custos fixos e variáveis anuais para a produção do xarope de xilitol e chegou ao valor de custo desta produção de R\$1389,05 Kg⁻¹. Franceschin et al. (2011) avaliaram um processo completo da produção simultânea de etanol e xilitol a partir de palhas de centeio, desde a matéria-prima ao produto final, simulando todas as principais operações: pré-tratamento, fermentação da glicose em etanol, fermentação de xilose em xilitol, separação e purificação de ambos os produtos. Segundo estes autores a implementação de uma unidade produtora de xilitol e etanol a partir desta matéria-prima é cerca de 29.115,200 €, considerando que a palha de centeio necessária para alimentar o processo deve ser colhida num raio de cerca de 80Km, para não encarecer ainda mais o processo e que o retorno financeiro é de curto prazo, 5 anos.

2.8 Ampliação de escala

A ampliação de escala pode ser definida como um procedimento em que os resultados experimentais com equipamento de menor escala são empregados para projetar e construir um sistema de maior escala, sendo considerado um importante passo no desenvolvimento de processos (OKONKOWSKI et al., 2005).

De acordo com Mavituna (1996) e Sakato (1997) o aumento de escala está condicionado a ensaios iniciais em bancadas de laboratório, para que estes sejam, em seguida, testados em escala semi-piloto e piloto. Depois destes estudos, dá-se início a produção em escala industrial. De acordo com Stanbury, Whitaker e Hall (1995) e Okonkowski et al. (2005) há vários fatores que devem ser considerados ao analisar-se o aumento de escala até chegar ao nível industrial, dentre eles podemos citar:

- ✓ Preparação do inóculo - Um aumento de escala pode significar que estágios extras possam ser incorporados no preparo do inóculo. O inóculo

tem um importante impacto na estabilidade do processo e na sua performance em termos de produtividade, bem como na qualidade do produto e controle do processo;

- ✓ Esterilização - A esterilização é um fator de escala dependente, pois o número de micro-organismos contaminantes em um fermentador deve ser reduzido para o mesmo número absoluto, independentemente da escala. Assim, quando a escala de um processo é aumentada, o regime de esterilização deve ser ajustado, o que pode resultar em uma mudança na qualidade do meio após a esterilização;
- ✓ Parâmetros ambientais - O aumento da escala pode resultar em um ambiente diferente para o micro-organismo. Esses parâmetros ambientais podem ser resumidos em:
 - (1) disponibilidade de nutrientes,
 - (2) pH,
 - (3) temperatura,
 - (4) teor de oxigênio dissolvido,
 - (5) condições de cisalhamento,
 - (6) concentração de dióxido de carbono dissolvido,
 - (7) formação de espuma.

Todos os parâmetros acima são afetados pela agitação e aeração, seja em termos de volume de mistura ou disponibilidade de oxigênio. Os parâmetros ambientais 1, 2 e 3 estão relacionadas ao volume de mistura, enquanto que os parâmetros 4, 5, 6 e 7 ao fluxo de ar e de transferência de oxigênio. Assim, agitação e aeração são parâmetros muito importantes no aumento de escala. No entanto, deve-se sempre ter em mente que o preparo do inóculo e as dificuldades de esterilização podem ser a razão para a diminuição no rendimento quando um processo é ampliado e que a realização da aeração/agitação correta não são os únicos reponsáveis por esta diminuição (STANBURY, WHITAKER, HALL, 1995).

No desenvolvimento de um processo de interesse industrial, quando são encontradas condições econômicas adequadas de operação em escala de bancada (as quais com frequência correspondem à obtenção de elevados valores de produtividade e rendimento do produto de interesse sob o ponto de vista

econômico) há a necessidade de se ampliar a escala de produção até uma escala industrial (EINSELE, 1978⁷ *apud* SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

Os biorreatores, que são primordiais à ampliação de escala de diferentes bioprocessos, são equipamentos nos quais ocorre uma série de reações químicas catalisadas por “biocatalisadores”. Esses biocatalizadores podem ser enzimas ou células vivas (microbianas, animais ou vegetais) (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001). Os biorreatores que utilizam meio de cultura líquido, permitem a renovação do ar durante o cultivo, bem como o monitoramento de alguns parâmetros essenciais ao crescimento, tais como pH, oxigênio dissolvido, temperatura, etc. (TEIXEIRA, 2002). No entanto, segundo Mavituna (1996) estes parâmetros devem ser estabelecidos em menor escala, uma vez que os fenômenos de transporte são um dos principais fenômenos que influenciam o aumento de escala. De acordo Hubbard, Ledger e Hoffman (1994) o fenômeno de transporte de massa gás-líquido é o fator mais significativo.

O critério de ampliação de escala a ser fixado varia de processo para processo, pois depende das especificidades de cada um. De acordo com Schmidell e Facciotti (2001), os parâmetros mais utilizados para a ampliação de escala são:

- ✓ Constância da potência no sistema não aerado por unidade de volume de meio (P/V);
- ✓ Constância do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La);
- ✓ Constância da velocidade na extremidade do impelidor (v_{Tip});
- ✓ Constância do tempo de mistura (t_m);
- ✓ Constância da capacidade de bombeamento do impelidor (F_L/V);
- ✓ Constância do número de Reynolds (N_{Re});
- ✓ Constância da pressão parcial ou concentração de oxigênio dissolvido no meio (C).

De acordo com Einsele (1978)⁸ *apud* Schmidell e Facciotti (2001) os critérios mais utilizados pelas indústrias de fermentação na Europa são o k_La e o P/V . De acordo com Galaction et al. (2004) o k_La é dependente de vários fatores como as características geométricas e operacionais do biorreator, composição do

⁷ Einsele, A. Scaling-up bioreactors. **Process Biochem.**, vol. 13, p. 13-14, 1978.

meio, viscosidade, tensão superficial, concentração e morfologia do micro-organismo e principalmente da área superficial das bolhas de ar, sendo desta forma um critério importante no aumento de escala e na análise de custo do processo. O k_La em sistemas agitados pode ser estimado por um grande número de equações, a maioria obtidas de forma empírica (CALDERBANK, MOOYOUNG, 1961; PEREZ, SANDALL, 1974; GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009) e outras com base teórica (KAWASE, HALARD, MOOYOUNG, 1992; ZHANG, Z.; THOMAS, 1996; GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009).

Vários trabalhos relatam a utilização de k_La como critério para a ampliação de escala em processos de interesse industrial, dentre eles podemos citar:

- ✓ Produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-73, empregando-se fermentadores de capacidade volumétrica de 14L e 1100L (FLORES, PÉREZ, TORRE, 1997);
- ✓ Produção de ácido láctico por *Rhizopus* sp. MK-96-1196, empregando-se fermentadores de capacidade volumétrica de 3L e 100L (MIURA et al., 2003);
- ✓ Produção de ácido láctico por *Rhizopus* sp. MK-96-1196, empregando-se fermentadores de capacidade volumétrica de 3L, 100L e 5000L (LIU et al., 2006);
- ✓ Produção de biopolímeros por *Enterobacter cloacae* WD7, empregando-se fermentadores de capacidade volumétrica de 5L e 72L (BANDAIPHET, PRASERTSAN, 2006);
- ✓ Produção de endoxilanas por *Streptomyces malaysiensis* ATM-3, empregando-se fermentadores de capacidade volumétrica de 2L e 16L (NASCIMENTO, 2006);
- ✓ Produção de vacinas contra meningite meningocócica por *Neisseria meningitidis* HP16215-2, empregando-se fermentadores de capacidade volumétrica de 5L, 600L e 8000L (BAART et al., 2007).

Os relatos na literatura são escassos quanto ao aumento de escala da produção biotecnológica de xilitol. Segundo Canilha (2006) foi possível a ampliação de escala da produção de xilitol por *C. guilliermondii* a partir da fermentação de hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo, de fermentador de 2,4L para 16L, utilizando-se como critério de ampliação de escala o k_La . No

entanto, segundo este autor para se alcançar concentrações semelhantes de xilitol foi necessário aumentar o tempo de fermentação no fermentador de maior capacidade em comparação ao de menor. Moraes (2008) estudou a viabilidade econômica da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada, sendo constatado nestes estudos que a ampliação de escala deste processo resultou em parâmetros fermentativos similares quando da utilização de k_La como critério de ampliação. Segundo este autor, os parâmetros fermentativos no fermentador de maior escala (16L), como fator de conversão de xilose em xilitol, produtividade de xilitol e eficiência de conversão chegaram a valores de $0,91 \text{ g g}^{-1}$; $0,77 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ e 99,23%, respectivamente.

De acordo com Baart et al. (2007) outros fatores como rendimento global de produção, custo, eficiência, tempo, conhecimento, experiência, disponibilidade de equipamentos e o cumprimento de boas práticas de fabricação também desempenham um papel importante na ampliação de escala. Adicionalmente, o processo de *downstream* deve ser levado em consideração na ampliação de escala, uma vez que grande volume e/ou concentração de produtos podem interferir em sua estratégia.

Nascimento (2006) relata que o sucesso dos processos de aumento de escala é usualmente confirmado por resultados experimentais que mostram que não houve diferença entre a fermentação conduzida em escala reduzida e em escala ampliada, sob a mesma taxa de transferência de oxigênio.

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo geral*

✓ Contribuir para o desenvolvimento de obtenção biotecnológica de xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar.

3.2 *Objetivos específicos*

✓ Avaliar diferentes métodos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço: a) alteração do pH do hidrolisado combinada à adsorção em carvão vegetal ativado; b) adsorção em resinas de troca iônica e c) floculação por polímero vegetal;

✓ Caracterizar os hidrolisados submetidos aos diferentes procedimentos de destoxificação quanto à remoção dos compostos tóxicos à levedura como os fenólicos, ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural e íons metálicos, bem como quanto à perda dos açúcares xilose, glicose e arabinose e também quanto à clarificação do hidrolisado;

✓ Avaliar o efeito de diferentes fontes de carbono: a) xilose; b) glicose e c) mistura de xilose e glicose empregadas no preparo do inóculo de *Candida guilliermondii* FTI 20037 sobre a bioconversão de xilose em xilitol a partir de fermentações em frascos Erlenmeyer de hidrolisados hemicelulósicos submetidos aos procedimentos de destoxificação;

✓ Realizar fermentações em fermentadores de 2,4L e 16L empregando-se condição de preparo do inóculo e destoxificação do hidrolisado que propiciou favorecimento do bioprocessamento em frascos Erlenmeyer, visando à ampliação de escala.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 4.1 é uma representação esquemática do presente trabalho, sendo que os experimentos foram realizados nos laboratórios do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos do Departamento de Biotecnologia, bem como no Laboratório de Absorção Atômica do Departamento de Engenharia Química, ambos da Escola de Engenharia de Lorena – USP.

Figura 4.1. Etapas envolvidas no presente trabalho.

4.1 Bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana utilizado nos experimentos, cedido pela Usina São José, localizada na cidade de Rio das Pedras/SP, foi primeiramente submetido à secagem à temperatura ambiente, ao ar livre, até atingir aproximadamente 10% de umidade, sendo esta medida obtida através de secagem em estufa a 100°C, até peso constante. Este procedimento foi realizado para poder manter as

características do material durante a estocagem, uma vez que o bagaço de cana proveniente da usina apresentou um teor de umidade próximo a 60%, o que favorece a sua deterioração. A secagem da matéria-prima é também importante em termos de redução de volume e diminuição dos custos de armazenamento.

4.2 Obtenção, preparo e destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

4.2.1 Pré-hidrólise ácida do bagaço

O bagaço de cana previamente seco, foi submetido à hidrólise ácida em reator de aço inoxidável 316, com capacidade total de 100L, alimentado com vapor fluente proveniente de uma caldeira da marca Conservit com pressão de trabalho de 50kgf/cm^2 e munido com camisa de resfriamento por recirculação de água (Figura 4.2). Inicialmente o reator foi carregado com água e com bagaço de cana seco e aquecido até atingir 90°C . Após atingir esta temperatura foi adicionada uma solução de ácido sulfúrico, 100 mg de ácido sulfúrico (98%) por 1g de matéria seca para uma relação sólido-líquido de 1,75 Kg de bagaço para cada 10L de solução ácida. O reator foi fechado hermeticamente e o bagaço permaneceu nesta solução, sob agitação, até atingir 150°C . O descarregamento do reator sob pressão foi realizado após permanecer 30 minutos na temperatura reacional (150°C). A temperatura do aquecimento por vapor direto foi controlada manualmente a partir da abertura e fechamento da válvula de controle de injeção de vapor, para que durante o período da hidrólise a temperatura do meio reacional não ultrapassasse 150°C e permanecesse pelo tempo de 30 minutos. Esta condição é utilizada atualmente no Departamento de Engenharia Química do Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), onde se encontra um reator com dimensões e geometria similares àquelas do reator montado na EEL-USP. Para a obtenção do volume total de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana necessário para a realização dos experimentos foram realizadas 24 bateladas, resultando em um volume final de hidrolisado de aproximadamente 480 litros.

Figura 4.2. Reator de aço inoxidável de 100L, alimentado com vapor fluente proveniente de uma caldeira Conservit utilizado na hidrólise ácida do bagaço de cana.

O hidrolisado obtido foi primeiramente filtrado, em sacos de pano (poliéster), para remoção da massa residual de sólidos (celulignina) e em seguida foi armazenado em câmara fria a 4°C para posterior utilização e fermentação. A massa residual de sólidos, bem como o bagaço “in natura” também foram armazenados para posterior determinação de suas composições químicas.

4.2.2 Caracterização e concentração a vácuo do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

Após a hidrólise, o hidrolisado foi caracterizado quanto ao pH, à concentração dos açúcares xilose, glicose e arabinose e à concentração dos compostos tóxicos furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético e compostos fenólicos. Em seguida este foi concentrado à vácuo, a um fator de concentração correspondente a 5 (FC=5), ou seja, 5 vezes o seu teor inicial de açúcares com a finalidade de aumentar a concentração inicial de xilose e reduzir o teor de compostos tóxicos voláteis. A metodologia consistiu da utilização de um concentrador à vácuo, de aço inox, com capacidade útil de 30L, dotado de aquecimento por fluido térmico e um sistema de condensação e coleta de frações (Figura 4.3), empregando-se temperatura de 70 ± 5 °C. Após este procedimento o hidrolisado foi então submetido aos diferentes métodos de destoxificação.

Figura 4.3. Concentrador a vácuo utilizado na etapa de concentração do hidrolisado.

4.2.3 Procedimentos de destoxificação e autoclavagem do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar

O hidrolisado hemicelulósico concentrado (FC=5) foi destoxificado com vistas a estudos comparativos com os métodos convencionais utilizados (combinados ou não), conforme os procedimentos descritos a seguir:

Alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado

O pH inicial (0,70) do hidrolisado foi elevado para 7,0 com adição de CaO e reduzido para 2,5 com H_3PO_4 . O hidrolisado foi então submetido à adsorção em carvão vegetal ativado em pó da marca Synth (1,0% m/v), mantendo-se a mistura sob agitação de 200rpm a 60°C por 30 minutos. A cada alteração de pH e adição de carvão o precipitado formado foi removido por centrifugação (MARTON, 2002).

Adsorção em sistema de resinas de troca iônica

Foram utilizadas as seguintes resinas em série: 1) resina de troca aniônica A-860S (macroporosa fortemente básica, Tipo I), 2) resina de troca aniônica A-500PS (macroporosa fortemente básica, Tipo I) e 3) resina macroporosa de troca catiônica C-150 (fortemente ácida), sendo as propriedades físico-químicas destas resinas relatadas pelo fabricante (PUROLITE, 1998).

Antes da utilização das resinas, estas foram submetidas a um processo de inchamento com água destilada, o qual consistiu em mantê-las submersas por 24 horas. Após seu inchamento, as mesmas foram ativadas utilizando-se solução de NaOH 10% para as aniônicas (A-860S e A-500PS) enquanto, para a catiônica (C-150) foi empregado solução de HCl 5%, conforme recomendado pelo fabricante. Este procedimento foi feito três vezes em frascos Erlenmeyer, mantendo-se as soluções regenerantes em contato com as resinas a 30°C, 200 rpm por 30 minutos. Após esta ativação as resinas foram lavadas com água deionizada, da mesma forma que ficou em contato com as soluções de ativação. Após esta etapa, as resinas foram saturadas com solução de xilose (80 g L⁻¹, concentração esta próxima ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana concentrado 5 vezes e empregado no presente trabalho) nas mesmas condições que ocorreram a ativação e lavagem das mesmas, com exceção do tempo, o qual foi de 60 minutos. Este procedimento é denominado pelo fabricante de “adoçamento”, o qual é recomendado para minimização de perda do açúcar que se deseja purificar. Finalmente a destoxificação do hidrolisado foi realizada em frascos Erlenmeyer mantendo-se o hidrolisado em contato com as resinas a 30°C, 200 rpm por 60 min. Utilizou-se uma proporção de 1:2 entre volumes de resinas e volume de hidrolisado (CANILHA et al., 2010). As resinas foram separadas do hidrolisado por filtração em peineiras. Após a destoxificação do hidrolisado as resinas foram regeneradas e lavadas com água deionizada, conforme descrito anteriormente.

Floculação por polímero vegetal

O hidrolisado teve seu pH inicial ajustado para pH 8,0 com CaO e após filtração em papel de filtro qualitativo, foi deixado em contato com polímero Bioclin (15% v/v), comercializado pela Acquaquímica (ACQUAQUÍMICA, 2010), em frascos Erlenmeyer, sob agitação de 100 rpm a 45°C por 45 minutos (SILVA, 2006). Para a remoção do precipitado formado o hidrolisado foi centrifugado a 4000 rpm por 10 min.

Foi estabelecido um controle, no qual o hidrolisado hemicelulósico de bagaço foi submetido apenas ao ajuste de pH para 5,5 com NaOH, e após atingir este valor, o hidrolisado foi centrifugado a 2000 x g (Cu-500 – Damon/IEC Division) por 20 minutos para remoção do precipitado formado.

Os hidrolisados destoxificados e aquele que teve somente seu pH ajustado para 5,5 (controle), foram autoclavados a 0,5 atm por 15 min e caracterizados quanto ao pH, à concentração dos açúcares (xilose, glicose e arabinose), ácido acético, compostos fenólicos e furanos (furfural e 5-hidroximetilfurfural).

4.3 Avaliação da fermentabilidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana

4.3.1 Micro-organismo

Os ensaios foram realizados com a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, selecionada por Barbosa et al. (1988) para produção de xilitol, mantida a 4 °C em tubos inclinados com ágar extrato de malte. Um repique com cerca de 24 horas foi utilizado para as preparações dos inóculos.

4.3.2 Fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em frascos Erlenmeyer

4.3.2.1 Preparo do inóculo

Para o preparo do inóculo foram empregados meios semi-sintéticos, contendo 50mL do meio, composto por diferentes fontes de carbono: apenas xilose (30 g L⁻¹); apenas glicose (30 g L⁻¹) ou mistura de xilose (30 g L⁻¹) e glicose (2 g L⁻¹) e suplementados com sulfato de amônio (2 g L⁻¹), cloreto de cálcio dihidratado (0,1 g L⁻¹) e extrato de farelo de arroz (20 g L⁻¹). As soluções estoques de sulfato de amônio e cloreto de cálcio dihidratado foram preparadas separadamente nas concentrações de 250 e 50 g L⁻¹, respectivamente, e esterilizadas a 1 atm por 20 minutos. Para a utilização do extrato de farelo de arroz como nutriente, foi empregado 200 g de farelo para um volume de 1 L de água destilada, o qual foi autoclavado por 15 minutos a 0,5 atm. Após o resfriamento dessa suspensão, esta foi centrifugada por 30 minutos em condições assépticas a 2000 x g (Cu-500 – Damon/IEC Division). A fração líquida (extrato de farelo de arroz) foi transferida para um frasco previamente esterilizado e conservada em geladeira até a sua utilização, num prazo máximo de uma semana após o seu preparo, conforme metodologia empregada por Felipe et al. (1997a); Alves et al. (1998) e Rodrigues (1999).

Os inóculos foram feitos em frascos Erlenmeyer (125mL) em incubadora de movimento rotatório (New Brunswick, Scientific Co.) com agitação de 200 rpm, a 30 °C por 24 horas. Após este período as leveduras foram recuperadas por centrifugação a 2000 x g (Cu-500 – Damon/IEC Division), lavadas com água destilada esterilizada, sob nova centrifugação para o descarte do sobrenadante e utilização das células para o preparo de uma suspensão com água esterilizada, a qual foi empregada como inóculo. A concentração inicial de células nas fermentações foi de 1,0 g L⁻¹ (FELIPE et al., 1997a).

4.3.2.2 Preparo de meios e condições de fermentação

Os ensaios realizados para avaliação do efeito da fonte de carbono empregada no preparo do inóculo, bem como da utilização dos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar destoxificados ou não (obtido conforme item 4.2.3) como meio de fermentação na produção de xilitol por *C. guilliermondii* estão ilustrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Experimentos realizados para se verificar a necessidade de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana e a preparação do inóculo com diferentes fontes de carbono para a produção de xilitol por *C. guilliermondii* FT120037.

Ensaio	Método de destoxificação	Fontes de carbono do inóculo (g L ⁻¹)
1	Controle	xilose (30)
2	Controle	glicose (30)
3	Controle	glicose (2,0) e xilose (30)
4	A	xilose (30)
5	A	glicose (30)
6	A	glicose (2,0) e xilose (30)
7	B	xilose (30)
8	B	glicose (30)
9	B	glicose (2,0) e xilose (30)
10	C	xilose (30)
11	C	glicose (30)
12	C	glicose (2,0) e xilose (30)

Ensaio: - Controle; A: Alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado; B: Adsorção em resinas de troca iônica; C: Floculação por polímero vegetal

Para todas as condições avaliadas o pH inicial de fermentação foi 5,5 e quando necessário este foi corrigido com solução de NaOH-3N durante o preparo do meio. As fermentações foram realizadas em frascos Erlenmeyer (125mL) em

triplicata, com 50mL dos meios conforme ilustra a Tabela 4.1 e suplementados com os mesmos nutrientes empregados para o preparo do inóculo exceto a xilose. As fermentações ocorreram por 120 horas, a 30°C, sob agitação de 200 rpm em incubadora de movimento rotatório (New Brunswick, Scientific Co.). Amostras correspondentes ao volume de cada Erlenmeyer (50mL) foram retiradas no início de cada fermentação e após 24, 48, 72, 96 e 120 horas de incubação para serem imediatamente avaliadas quanto à concentração celular, viabilidade e pureza da cultura. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 2000 x g (Cu-500 – Damon/IEC Division) por 15 minutos e utilizado para determinação do pH, das concentrações dos açúcares (xilose, arabinose e glicose), ácido acético, glicerol, etanol e xilitol.

4.3.3 Fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em fermentadores de bancada

Nesta etapa o inóculo foi feito em frascos Erlenmeyer de maior capacidade (2000; 4000 e 6000 mL), mantendo-se a mesma proporção de volume de meio por volume de frasco de 1:2,5 e condições de cultivo apresentadas no item 4.3.2.1.

Os ensaios foram realizados nos fermentadores com capacidade total de 2,4L (Bioengineering AG KLF 2000, Figura 4.4A) e 16L (Bioengineering AG L1523, Figura 4.4B) em replicata, após a definição da melhor condição de fermentação em frascos agitados, conforme item 4.3.2.2.

Figura 4.4. Ilustração dos fermentadores de bancada de capacidade total de 2,4L (A) e 16L (B).

Ambos fermentadores são equipados com controlador de pH, temperatura e oxigênio dissolvido (Bioengineering), termopar e agitador, conforme está apresentado no Anexo 3. O volume de meio empregado para o fermentador de 2,4L foi de 1,5L, agitação de 450 rpm e aeração de 0,70 vvm, enquanto para o fermentador de 16L, empregou-se 11L de meio, 300 rpm e 0,36 vvm e quando necessário adicionou-se a estes 3 gotas de anti-espumante, sendo que o pH dos meios não foram controlados. A concentração inicial de células foi de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ e as fermentações foram realizadas a 30°C , por 144h e k_La (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio) foi de 15 h^{-1} (valor baseado em trabalho realizado por RODRIGUES, 2005).

Amostras foram coletadas nos tempos 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132 e 144 horas para a determinação das concentrações de xilose, glicose, arabinose, xilitol, ácido acético, etanol e glicerol, crescimento celular, viabilidade e pureza da cultura e pH.

4.4 Métodos Analíticos

4.4.1 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

O bagaço de cana (10% de umidade) foi caracterizado quanto aos teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas, baseando-se nas metodologias desenvolvidas por Rocha et al. (1997) e validada por Gouveia et al. (2009).

4.4.1.1 Determinação dos teores de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas

Em béqueres foram colocados aproximadamente 2 gramas do material moído, passados por peneira de 20 “mesh” e adicionado 10mL de H_2SO_4 72% v/v, sob vigorosa agitação, em um banho termostatizado (Fisatom) a $45 \pm 5^\circ\text{C}$ por 7 min, sendo os experimentos realizados em triplicata. Após este tempo a reação foi interrompida pela adição de 50mL de água destilada e todo o conteúdo do béquer foi transferido quantitativamente para Erlenmeyer de 500mL, onde o volume total de água foi elevado para 275mL. Os frascos Erlenmeyer foram fechados com papel alumínio e autoclavados por 30 min a 121°C . Após a descompressão da autoclave, o frasco foi retirado e resfriado à temperatura ambiente, sendo a fração sólida separada da fração líquida por filtração em papel de filtro qualitativo. A

fração líquida foi transferida para balão volumétrico de 500mL, o qual teve o seu volume posteriormente completado com água destilada e armazenada para análises posteriores dos açúcares (xilose, glicose e arabinose), ácidos orgânicos, furfural, 5-hidroximetilfurfural e lignina solúvel.

4.4.1.2 Determinação de lignina insolúvel em meio ácido

A lignina insolúvel foi determinada de acordo com o método Klason modificado por Rocha et al. (1997). O material retido no papel de filtro foi lavado com 1500mL de água destilada, para remoção de ácido residual (até pH próximo de 7,0) e transferido para pesa-filtros para secagem em estufa a 105 °C até massa constante. A relação entre o peso do resíduo, descontando-se a massa de cinzas presente na lignina e o peso inicial da amostra foi utilizada para a determinação da porcentagem de lignina insolúvel presente no bagaço de cana (Equação 1).

$$\% \text{ Lignina insolúvel} = \frac{MK-MC}{MA} * 100 \quad (1)$$

Onde:

- ✓ MK – massa de lignina insolúvel seca;
- ✓ MC – massa de cinzas;
- ✓ MA – massa da amostra seca

4.4.1.3 Determinação de lignina solúvel

A quantidade de lignina solúvel foi determinada pela medida de absorbância a 280 nm em espectrofotômetro (Beckman modelo DU 800). Desta forma, alíquotas de 5,0mL provenientes da fração líquida do material armazenado foram diluídas em balões volumétricos e alcalinizadas com solução de NaOH 6M até atingirem pH 12,0, e analisadas em espectroscopia de UV. O cálculo da lignina solúvel foi determinado conforme as Equações 2 e 3, conforme descrito por Gouveia et al. (2009).

$$\text{Conc. de Lignina solúvel} = (4,187 \times 10^{-2} * (A_{t280} - A_{pd280}) - 3,279 \times 10^{-4}) \quad (2)$$

$$A_{pd280} = (C_{Furf} * \epsilon_{Furf}) + (C_{HMF} * \epsilon_{HMF}) \quad (3)$$

Onde:

- ✓ Conc. de lignina solúvel: concentração de lignina solúvel ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$);
- ✓ A_{280} : absorvância da solução de lignina junto com os produtos de degradação em 280 nm;
- ✓ $A_{\text{pd}280}$: absorvância, em 280 nm, dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e 5-hidroximetilfurfural), cujas concentrações C_{Furf} e C_{HMF} foram determinadas previamente por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) e ϵ_{Furf} e ϵ_{HMF} - são as absorvâncias e valem, respectivamente, 146,85 e 114,00 $\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, conforme determinado experimentalmente por Rocha et al. (1997).

4.4.1.4 Determinação de carboidratos, ácidos orgânicos, furfural e 5-hidroximetilfurfural

Para a determinação das porcentagens de celulose e hemicelulose presentes na fração líquida do material armazenado, as amostras foram previamente aplicadas em cartuchos de extração em fase sólida Sep-Pak C18 (Waters) para análise em HPLC e as concentrações de glicose, xilose, arabinose e ácido acético foram empregadas para tais determinações.

As concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural também foram determinadas por HPLC, nas seguintes condições: coluna Hewlett-Packard RP18 mantida a 25 °C; detector de ultravioleta SPD-10A UV-VIS; eluente, solução de acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético; fluxo de 0,8 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$; volume da amostra injetada 20 μL . As amostras foram previamente filtradas em membrana Minisart 0,22 μm (MILLIPORE).

Curvas padrões de açúcares, ácidos orgânicos, bem como de furfural e 5-hidroximetilfurfural foram previamente estabelecidas segundo metodologias empregadas pelo Grupo GMBio (RODRIGUES et al., 2001).

4.4.1.5 Determinação do teor de cinzas da lignina

Os materiais resultantes da etapa de determinação de lignina insolúvel foram colocados em cadinhos de porcelana previamente calcinados e tarados. Posteriormente, estes materiais foram inicialmente pré-calcinados à temperatura de 400°C, por aproximadamente 1h, com os cadinhos tampados, e em seguida, removeu-se a tampa e calcinou-se o material por 2h a 800°C. Após a calcinação, o cadinho foi resfriado em dessecador e a massa de cinzas determinada. A

massa obtida foi utilizada para subtrair do teor de lignina descrito no item 4.2.1.1 e então se obter a massa real de lignina insolúvel.

4.4.1.6 Determinação do teor de cinzas totais

Para a determinação do teor de cinzas do bagaço, cerca de 1,0 grama da amostra (pesada em balança analítica) foi colocada em um cadinho de porcelana previamente tarado e aquecido em mufla elétrica a 800 °C por 2h. As cinzas foram determinadas pela diferença de peso das amostras, antes e após a incineração (Equação 4). Antes de serem pesadas as amostras foram colocadas em dessecador por 50 min.

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{MC \cdot 100}{MA} \quad (4)$$

Onde:

- ✓ MC: massa de cinzas (g);
- ✓ MA: massa da amostra seca (g).

4.4.2 Viabilidade e pureza da cultura

A viabilidade da cultura de *C. guilliermondii* foi verificada a partir de visualizações microscópicas de lâminas preparadas a fresco, nas quais as células foram coradas pela adição de igual volume de uma solução 0,01% (p/v) de azul de metileno dissolvido em citrato de sódio 2% (p/v) (ODUMERO et al., 1992), enquanto a pureza foi verificada a partir de lâminas fixadas e coradas com fucsina. As observações foram realizadas em microscópio óptico digital binocular (LABO) equipado com câmera digital de forma a fornecer dados referentes a morfologia celular.

4.4.3 Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por espectrofotometria a 600 nm, onde a concentração de células em g L⁻¹ foi calculada por meio de uma curva padrão que correlaciona a absorbância a 600 nm e o peso seco das células obtidas do cultivo por 24 horas em meio semi-sintético empregado no preparo do inóculo.

4.4.4 Determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, glicerol, etanol, xilitol, furfural e 5-hidroximetilfurfural

As concentrações dos açúcares (D-xilose, D-glicose e L-arabinose), bem como de ácido acético, glicerol, etanol e xilitol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), nas seguintes condições: coluna “Bio-Rad Aminex” HPX-87H mantida a 45 °C; detector de índice de refração RID 6A; eluente ácido sulfúrico 0,05M, fluxo de 0,6 mL/min.; volume da amostra injetada, 20 µL. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro “Sep Pack” C18 (MILLIPORE).

Com relação aos compostos furfural e 5-hidroximetilfurfural, estes foram determinados conforme item 4.4.1.4.

4.4.5 Determinação da concentração de fenóis

Alíquotas de 5,0mL de amostras dos hidrolisados foram devidamente diluídas e tiveram seus pH ajustados para 12 com NaOH 6N e a concentração de fenólicos totais foi determinada por espectrofotometria à 280 nm como descrito no item 4.4.1.3.

4.4.6 Determinação da concentração dos elementos metálicos

As concentrações dos elementos metálicos de interesse (sódio, potássio, magnésio, cálcio, cromo, manganês, ferro, níquel e zinco) foram determinadas por espectrometria de absorção atômica com atomização por chama, em um equipamento PerkinElmer modelo AAnalyst 800. Para a determinação das concentrações (mg L⁻¹) foi utilizado 2,0mL de cada amostra, sendo este volume medido com micropipeta. Previamente, a amostra foi digerida em um sistema aberto, sob aquecimento elétrico (placa de aquecimento), utilizando-se aproximadamente 5,0mL de água deionizada (18,2 MΩ cm⁻¹) e 1,0mL de mistura ácida na proporção de volume de 40 HNO₃ : 40 HCl. O procedimento de digestão foi realizado por 4 horas, tempo suficiente para verificação visual da alteração da coloração inicial das amostras (principalmente, decomposição dos açúcares). Após a decomposição, as amostras foram diluídas com água deionizada em balão volumétrico de 100mL e submetidas à análise.

4.4.7 Determinação do pH

Os valores de pH das amostras foram determinados por potenciometria, por meio de um aparelho da marca Micronal modelo B 474, com correção de temperatura.

4.4.8 Determinação de sólidos solúveis dos hidrolisados

As concentrações de sólidos solúveis nas amostras de hidrolisados foram determinadas em refratômetro de bancada da marca Schmidt-Haensch.

4.4.9 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La)

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio foi determinado pela metodologia de “gassing-out”, segundo Pirt (1975). Inicialmente o meio de cultivo isento de células foi aerado com nitrogênio, com o objetivo de redução à zero do oxigênio dissolvido no meio. O meio foi então agitado e aerado de acordo com a vazão desejada, monitorando-se o aumento da concentração do oxigênio dissolvido em função do tempo. Por integração da equação de balanço de oxigênio no meio líquido (Equação 5) foi possível obter a relação apresentada na Equação 6:

$$\frac{dC}{dt} = K_La (C^* - C) \quad (5)$$

Assim teremos:

$$\ln \left(1 - \frac{C}{C^*} \right) = -K_La * t \quad (6)$$

Onde:

- ✓ $\frac{C}{C^*}$: corresponde à leitura do eletrodo (fração da concentração de oxigênio dissolvido em relação à concentração de saturação).
- ✓ O gráfico do logaritmo de $\left(1 - \frac{C}{C^*} \right)$ em função do tempo permite a determinação do valor de k_La em h^{-1} .

4.4.10 Determinação do rendimento mássico da etapa de hidrólise

O rendimento mássico da etapa de hidrólise deste trabalho foi calculado utilizando a Equação 7 a seguir:

$$R = \frac{m_{\text{Final}}}{m_{\text{Inicial}}} \times 100 \quad (7)$$

Onde:

- ✓ m_{Final} : Massa final seca de bagaço de cana (g);
- ✓ m_{Inicial} : Massa inicial seca de bagaço de cana (g);
- ✓ R : rendimento mássico de hidrólise.

Após a reação de hidrólise do material, a celulignina (massa residual da hidrólise) foi lavada até pH neutro para a remoção de resíduos de ácido sulfúrico, bem como da hemicelulose remanescente e em seguida esta foi seca e pesada.

4.4.11 Determinação das solubilizações dos componentes macromoleculares (celulose, hemicelulose e lignina)

O cálculo de solubilização (ou remoção) de qualquer componente (celulose, hemicelulose ou lignina) foi efetuado tendo-se como base a composição química do material lignocelulósico antes da hidrólise e depois da hidrólise, levando-se em conta também o rendimento da hidrólise. Isto foi feito pela seguinte fórmula (Equação 8):

$$S = 100 \times \left(1 - R \frac{Y_f}{Y_i} \right) \quad (8)$$

Onde:

- ✓ S: solubilização do componente macromolecular (%);
- ✓ Y_i : teor do componente macromolecular no material lignocelulósico “in natura”;
- ✓ Y_f : teor do componente macromolecular no material lignocelulósico hidrolisado;
- ✓ R: rendimento mássico da etapa de hidrólise.

4.4.12 Determinação da remoção de açúcares e compostos tóxicos

A remoção, em porcentagem, dos açúcares (D-glicose, D-xilose e L-arabinose) e compostos tóxicos (ácido acético, fenóis, furfural, 5-

hidroximetilfurfural e íons metálicos), foi calculada pela relação entre os valores iniciais e finais destes, de acordo com as seguintes equações:

- **Porcentagem de remoção de açúcar**

$$\%R_A = \left[\frac{(C_{AI} - C_{AF})}{C_{AI}} \right] \times 100 \quad (9)$$

Onde:

- ✓ $\%R_A$: porcentagem de redução da concentração do açúcar;
- ✓ C_{AI} e C_{AF} : concentrações inicial e final do açúcar.

- **Porcentagem de remoção de compostos tóxicos**

$$\%R_{CT} = \left[\frac{(C_{CTI} - C_{CTF})}{C_{CTI}} \right] \times 100 \quad (10)$$

Onde:

- ✓ $\%R_{CT}$: porcentagem de redução da concentração de tóxicos;
- ✓ C_{CTI} e C_{CTF} : concentrações inicial e final de compostos tóxicos.

4.4.13 Determinação dos parâmetros fermentativos

- **Fator de Conversão de D-xilose em Xilitol ($Y_{P/S}$)**

O fator de conversão ou fator de rendimento é aquele que expressa a massa de xilitol produzida pela massa de xilose consumida, em gramas. Foi calculado pela Equação 11:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P_F - P_I}{S_F - S_I} \quad (11)$$

Onde:

- ✓ S_I e S_F correspondem às concentrações inicial e final de xilose (g L^{-1});
- ✓ P_I e P_F correspondem às concentrações inicial e final de xilitol (g L^{-1}).

- **Produtividade Volumétrica de Xilitol (Q_P)**

A produtividade volumétrica de xilitol expressa a concentração de xilitol produzido (g L^{-1}) por tempo (h). Foi calculada de acordo com a Equação 12:

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta T} = \frac{P_F - P_I}{T_F - T_I} \quad (12)$$

Onde:

- ✓ P_I e P_F correspondem às concentrações inicial e final de xilitol (g L^{-1});
- ✓ T_I e T_F correspondem aos tempos inicial e final de fermentação (h).

- **Eficiência de Conversão**

Este parâmetro é expresso em porcentagem e representa a razão entre o fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$) calculado experimentalmente e o fator de conversão teórico de $0,917 \text{ g}_{\text{xilitol}} \text{ g}_{\text{xilose}}^{-1}$, calculado segundo Barbosa et al. (1988).

- **Velocidades Instantâneas e Específicas**

Para o estudo cinético do processo fermentativo, as velocidades instantâneas de crescimento celular (dx/dt), consumo de substrato ($-ds/dt$), e formação de xilitol (dp/dt), foram calculadas pelo método proposto por LE DUY e ZAJIC (1973). Ao se dividir estas velocidades instantâneas pela concentração celular nos pontos em que se calcularam as derivadas, obtêm-se as velocidades específicas de crescimento (μ_X), de consumo de D-xilose (μ_S) e de produção de xilitol (μ_P).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química do bagaço de cana-de-açúcar

A Tabela 5.1 apresenta os resultados referentes à caracterização do bagaço de cana-de-açúcar “in natura” e sua caracterização após a etapa de hidrólise ácida. De acordo com os resultados o bagaço de cana “in natura”, apresentou 43,1% de celulose, 28,6% de hemicelulose, 20,8% de lignina, 2,9% de cinzas, 4,6% de extrativos e um rendimento em massa de hidrólise de 51,35%.

Tabela 5.1. Composição química percentual (em massa) do bagaço de cana-de-açúcar “in natura” e após hidrólise ácida, juntamente com o balanço de material após etapa de processamento da biomassa.

Componentes da Biomassa	Bagaço de cana “in natura” (%)	Bagaço de cana após hidrólise ácida (%)	Bagaço de cana após hidrólise ácida corrigido pelo rendimento da hidrólise (%)
Rendimento	-	-	51,35%
Celulose	43,1 ± 0,5	59,1 ± 0,9	30,4 ± 0,5
Hemicelulose	28,6 ± 0,4	5,8 ± 0,1	3,0 ± 0,4
Lignina	20,8 ± 0,2	32,9 ± 0,6	16,9 ± 0,2
Cinzas	2,9 ± 0,1	2,7 ± 0,4	1,4 ± 0,1
Extrativos	4,6 ± 0,1	-	-
Total	100,0 ± 0,2	100,5 ± 0,3	-

Observa-se também na Tabela 5.1 que a quantidade de celulose e lignina do bagaço de cana após hidrólise ácida aumentou em relação ao bagaço “in natura”, indicando um aumento proporcional destas frações devido à elevada solubilização dos açúcares constituintes da hemicelulose (89,6%, cálculo baseado na equação 8, item 4.4.11). Isto indica que as condições de hidrólise empregadas foram apropriadas para extrair os açúcares contidos na fração hemicelulósica. Por outro lado, constatou-se também uma perda de 29,6% de celulose que provavelmente foi solubilizada na forma de glicose e 5-hidroximetilfurfural, bem como 18,8% de lignina foi fragmentada em unidades de baixa massa molar (cálculos baseados na equação 8, item 4.4.11).

Observou-se também que a celulignina, resultante do procedimento de hidrólise ácida do bagaço apresentou um escurecimento da cor em relação ao material “in natura” (Figura 5.1). Comportamento semelhante foi notado por Silva (2009), trabalhando com o mesmo tipo de material, porém obtido por hidrólise hidrotérmica, nas quais as temperaturas empregadas foram superiores a do

presente trabalho. Segundo Curreli et al. (2002), o escurecimento da celulignina pode ser resultante da catálise ácida das ligações do complexo lignina-carboidrato, bem como da formação de produtos da degradação de carboidratos.

Figura 5.1. Amostras de bagaço de cana “in natura” (A) e obtidas após hidrólise ácida do bagaço (celulignina) (B).

Na Tabela 5.2. pode-se verificar a composição de diferentes matérias-primas encontradas na literatura e constatar que os valores encontrados para as três principais frações componentes do bagaço de cana no presente trabalho, são semelhantes às obtidas por Rodrigues e Guirardello (2008), enquanto pequena diferença é observada no caso dos resultados encontrados por Sun et al. (2004). Características da matéria-prima, como variedade, idade, tempo de estocagem e condições de cultivo podem ser fatores responsáveis pelas diferenças encontradas (BOBLETER, 1994). No caso do percentual de hemicelulose do bagaço de cana quando comparado às outras biomassas, observa-se nesta Tabela que o do presente trabalho (28,6%) foi semelhante ao do bagaço de malte (28,4%) e casca de aveia (28,4%) e superior às palhas de arroz (22%) e de cevada (21,4%), as quais são também empregadas em bioprocessos, como para a produção biotecnológica de xilitol (CANILHA, 2006; MUSSATTO; ROBERTO, 2002; MORAES, 2008).

Tabela 5.2. Composição química percentual do bagaço de cana-de-açúcar e de diferentes matérias-primas.

Matéria-prima	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Referência
Bagaço de cana	43,1	28,6	20,8	2,9	Presente trabalho
Bagaço de cana	43,0	25,0	23,0	nd	Rodrigues e Guirardello (2008)
Bagaço de cana	43,6	33,5	18,1	2,3	Sun et al. (2004)
Bagaço de malte	16,8	28,4	27,8	4,6	Dragone (2007)
Casca de aveia	29,3	28,4	22,2	4,5	Tamanini et al. (2004)
Palha de arroz	43,5	22,0	17,2	11,4	Mussatto e Roberto (2002)
Palha de cana	38,1	29,2	24,2	2,4	Silva (2009)
Palha de cevada	38,6	21,4	19,9	9,5	Moraes (2008)
Palha de sorgo	34,0	44,0	20,0	nd	Herrera et al. (2004)
Palha de trigo	33,8	31,8	20,1	7,0	Canilha (2006)

Após a etapa de caracterização química do bagaço de cana “in natura” e aquele obtido após procedimento de hidrólise ácida (celulignina), realizou-se a caracterização do hidrolisado hemicelulósico anterior (original) e posterior à etapa de concentração à vácuo, necessária para aumentar o teor de xilose no hidrolisado e favorecer a produção de xilitol, conforme é apresentado na Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Caracterização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar original e concentrado (FC = 5).

Características	Original	Concentrado (FC=5)
<i>Propriedades físicas</i>		
pH	1,52	0,94
°Brix	3°	15°
<i>Açúcares (g L⁻¹)</i>		
Xilose	15,73	77,26
Glicose	1,82	8,89
Arabinose	1,45	6,52
<i>Ácido carboxílico (g L⁻¹)</i>		
Ácido acético	2,31	5,28
<i>Furanos (g L⁻¹)</i>		
Furfural	0,188	0,082
5-Hidroxitilfurfural	0,024	0,073
Fenóis totais (g L ⁻¹)	5,48	12,74
<i>Inorgânicos (mg L⁻¹)</i>		
Mn	nd	50,44
Fe	161,85	2580,00
Mg	51,05	230,05
Ni	38,98	281,00
Ca	34,85	66,93
Zn	nd	nd
Na	24,85	78,30
K	100,50	566,50
Cr	6,13	248,35

nd = não detectado

A predominância da xilose no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana entre os monossacarídeos em relação aos demais açúcares constatada na Tabela 5.3, favorece a utilização deste para pesquisas com micro-organismos fermentadores de xilose. Esta predominância de xilose foi também relatada por outros pesquisadores (MARTON et al., 2006; SARROUH; BRANCO; SILVA, 2009; CHAUD, 2010). Quanto às concentrações de arabinose e glicose verifica-se nesta Tabela que são aproximadamente 11 e 9 vezes inferiores à de xilose, respectivamente.

Pelos dados apresentados na Tabela 5.3 verifica-se que a relação glicose:xilose é de 1:8,7; relação esta inferior à encontrada como ótima para o favorecimento da produção de xilitol por *C. guilliermondii*, já que Silva et al. (2007) verificaram favorecimento desta produção por esta levedura cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana quando esta relação foi 1:5.

Verifica-se ainda na Tabela 5.3, que além dos açúcares estão também presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, compostos tóxicos aos micro-organismos como ácido acético ($2,31 \text{ g L}^{-1}$), proveniente da quebra dos grupos acetil presentes na hemicelulose, furfural ($0,188 \text{ g L}^{-1}$) e 5-hidroximetilfurfural ($0,024 \text{ g L}^{-1}$), formados a partir da desidratação de pentoses como a xilose e de hexoses como a glicose, respectivamente (FENGEL; WEGENER, 1989). Além destes, estão também presentes compostos fenólicos ($5,48 \text{ g L}^{-1}$), que são cromóforos e produtos de degradação da lignina presentes no hidrolisado (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a). As baixas concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural encontradas indicam que as condições de hidrólise empregadas foram favoráveis para solubilizar os açúcares contidos na fração hemicelulósica do bagaço de cana, sem causar a decomposição destes. Valores semelhantes de furfural ($0,15 \text{ g L}^{-1}$), 5-hidroximetilfurfural ($0,03 \text{ g L}^{-1}$) e ácido acético ($2,60 \text{ g L}^{-1}$) foram encontrados por Carvalho (2004), trabalhando com condição de hidrólise do bagaço de cana na qual se utilizou temperatura (121°C) e tempo de reação (20 minutos) inferiores à do presente trabalho.

Na Tabela 5.3, pode-se ainda constatar que a concentração à vácuo do hidrolisado aumentou proporcionalmente as concentrações dos açúcares, enquanto para os demais compostos esta proporcionalidade não foi observada. No caso do furfural, verifica-se redução de 56,4% deste, o que pode ser justificado pela sua volatilidade à altas temperaturas (PERRY; GREEN, 1977). Rodrigues et al. (2001) também observaram aumento proporcional das concentrações de açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em função do fator de concentração deste, porém estes autores observaram 98% de remoção de furfural, valor este superior ao encontrado no presente trabalho após o procedimento de concentração à vácuo. A capacidade de perda da concentração de tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana pela concentração à vácuo também foi constatada por Mussatto e Roberto (2004), que encontraram mais de 90% de remoção de compostos, como ácido acético, furfural e vanilina. Segundo Prakasham, Sreenivas Rao e Hobbs (2009) a concentração a vácuo pode ser considerada como um dos mais simples e melhores métodos físicos de destoxificação.

Como consequência do processo de concentração à vácuo, verificou-se ainda a redução do pH do hidrolisado, tal fato é resultado do aumento da concentração de íons H^+ provenientes do ácido sulfúrico utilizado na etapa de hidrólise (CORREA et al., 1995). Esta redução foi também constatada por Sarrouh (2009) que encontrou uma proporcionalidade entre a diminuição do pH e fator de concentração.

Os íons metálicos Mn, Fe, Mg, Ni, Ca, Na, K e Cr também tiveram suas concentrações aumentadas após o procedimento de concentração à vácuo do hidrolisado (Tabela 5.3), sendo constatada maior concentração do íon Fe (2508 mg L^{-1}) em comparação aos demais. Nota-se também que o íon Zn não foi detectado em ambos hidrolisados (Tabela 5.3). Estes íons foram liberados possivelmente pelo reator de aço inox durante a hidrólise ácida e pelo concentrador metálico, empregado na etapa de concentração a vácuo do hidrolisado, conforme já constatado por Marton (2005), Silva (2006), Villarreal et al. (2006) e Chaud (2010). Segundo Watson et al. (1984) o reator de aço inoxidável é uma fonte em potencial de liberação de cátions ferro, cromo e níquel durante o preparo de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em comparação ao reator de plástico resistente ao calor. No entanto, Camilotti et al. (2007) encontraram que os íons metálicos presentes no hidrolisado podem ser provenientes da própria cana-de-açúcar, como o cromo detectado no colmo e no palmito, o níquel no palmito e nas folhas.

5.2 Procedimentos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana

Nesta etapa do trabalho a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana foi avaliada a partir dos procedimentos de alteração de pH combinado à adsorção em carvão vegetal ativado (pHCA); floculação por polímero vegetal (POL) e adsorção em resinas de troca iônica (RTI), conforme descrito no item 4.2.3. Também foi realizado experimento controle, no qual o hidrolisado não foi submetido à destoxificação, mas sim ao ajuste de pH (pH de fermentação). As concentrações dos açúcares, íons metálicos e tóxicos, bem como as relações xilose:glucose e os valores referentes às perdas de volume do

hidrolisado hemicelulósico submetido aos diferentes procedimentos estão apresentadas na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Composição dos hidrolisados após os procedimentos de concentração (C), destoxificação por alteração de pH combinado à adsorção em carvão vegetal ativado (pHCA); floculação por polímero vegetal (POL); adsorção em resinas de troca iônica (RTI) e submetido ao simples ajuste de pH (Controle).

Características	Procedimentos				
	C	pHCA	POL	RTI	Controle
<i>Açúcares ($g L^{-1}$)</i>					
Xilose	77,26	65,56	60,04	74,99	65,22
Glicose	8,89	7,89	8,52	4,88	7,20
Arabinose	6,52	6,30	5,56	4,36	6,38
<i>Ácido carboxílico ($g L^{-1}$)</i>					
Ácido acético	5,28	4,45	4,09	1,85	5,05
<i>Furanos ($g L^{-1}$)</i>					
Furfural	0,082	0,028	0,046	0,028	0,063
5-HMF	0,073	0,024	0,047	0,019	0,031
Fenóis totais ($g L^{-1}$)	12,74	2,56	2,91	0,97	14,66
<i>Inorgânicos ($mg L^{-1}$)</i>					
Mn	50,44	nd	18,93	nd	55,50
Fe	2370,00	18,63	55,70	6,43	2234,50
Mg	230,05	241,25	357,65	1,63	254,60
Ni	281,00	90,50	128,85	nd	242,25
Ca	66,93	111,60	3147,50	10,90	308,25
Zn	nd	nd	nd	nd	nd
Na	78,30	7980,00	2860,00	3247,50	21867,50
K	566,50	609,00	801,50	12,25	824,00
Cr	248,35	nd	nd	nd	495,25
Perda de volume do hidrolisado (%)	-	26,22	43,17	-	20,14
Relação glicose: xilose	-	1:8,3	1:7,1	1:15,4	1:9,1

nd = não detectado

De acordo com a Tabela 5.4 verifica-se que todos os métodos de destoxificação utilizados proporcionaram além da diminuição das concentrações de compostos tóxicos, também a de açúcares. O maior efeito destes procedimentos foi sobre os fenóis, conforme apresentado na Figura 5.2A, uma vez que se observou remoção superior a 77% para todos os procedimentos empregados, encontrando-se máxima remoção (92%), quando se utilizou resinas

de troca iônica. Esta metodologia de destoxificação, segundo Canilha et al. (2010) propiciou elevada remoção de fenóis (95%), valor este superior em apenas 3,25% em relação ao presente trabalho. Com relação à metodologia de alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal, Carvalho Júnior, Marton e Felipe (2005) verificaram que esta propiciou 79,9% de remoção de fenóis, valor este análogo ao presente trabalho. O emprego de polímero vegetal segundo Silva (2006), resultou em 75,5% de remoção, enquanto no presente trabalho esta remoção foi 77,3%.

As resinas aniônicas e catiônicas, como as empregadas neste trabalho, segundo Frazer e McCaskey (1989), são mais efetivas na remoção de compostos fenólicos em comparação a outros métodos de destoxificação do hidrolisado, já que estas diferentemente dos demais métodos, removem impurezas orgânicas e inorgânicas de forma seletiva. Tal fato deve-se ao enlace iônico dos compostos aos grupos químicos carregados ou à adsorção física às regiões não-polares das resinas (FRAZER; MCCASKEY, 1989), enquanto a destoxificação por carvão ativo baseia-se apenas na capacidade de adsorção deste material poroso (CONSIDINE, 1974) e a floculação por polímero na complexação de taninos presentes em sua constituição com compostos do hidrolisado (SILVA, 2006).

A remoção dos compostos fenólicos é importante, uma vez que estes estão presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em maior concentração em relação aos demais compostos tóxicos, além do fato destes serem considerados como um dos mais relevantes inibidores do metabolismo de açúcares por leveduras empregadas em bioprocessos como para a produção biotecnológica de xilitol (VILLA et al., 1998). Verificando-se a Figura 5.2A e a Tabela 5.4, percebe-se pelos valores de remoção que mesmo com a utilização de resinas que propiciou 92% de remoção de fenóis, este composto ainda se encontra em concentração inibitória, já que segundo Villa et al. (1998), apenas 0,1 g L⁻¹ deste foi suficiente para inibir o crescimento de *C. guilliermondii*, durante cultivo desta em meio semi-sintético contendo xilose como fonte de carbono. De acordo com estes autores, uma possível explicação se deve à inibição da atividade da xilose redutase, enzima chave no passo inicial de assimilação de xilose, ou ainda do transporte de xilose através da membrana plasmática, já que a assimilação desta pentose foi também drasticamente afetada.

Figura 5.2. Remoção dos açúcares, compostos tóxicos (A) e íons metálicos (B) presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana submetido aos diferentes procedimentos de destoxificação por alteração de pH combinado à adsorção em carvão vegetal ativado (■); floculação por polímero vegetal (■); adsorção em resinas de troca iônica (■) e submetido ao simples ajuste de pH - controle (■).

Semelhante ao observado para a remoção de fenóis, a utilização de resinas de troca iônica também propiciou maior remoção de ácido acético (64,8%), cuja concentração no hidrolisado era de $5,28 \text{ g L}^{-1}$, composto considerado como um dos principais inibidores da atividade microbiana (FELIPE et al., 1995). Villarreal et al. (2006) trabalhando com hidrolisado hemicelulósico de eucalipto e metodologia de destoxificação por adsorção em resinas de troca iônica observaram que este ácido foi totalmente removido. Já Chandel et al. (2007) e Canilha et al. (2010), empregando esta mesma metodologia de

destoxificação, porém para o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, observaram 83% e 88%, respectivamente, de remoção de ácido acético, valores estes também superiores ao encontrado no presente trabalho (64,8%). No caso da utilização dos métodos de alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado e de polímero vegetal, estes permitiram apenas remoções de 15,66% e 22,42% de ácido acético, respectivamente. Em função da baixa remoção deste ácido apresentada pela metodologia de alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal, pode-se dizer que a atuação do carvão ativo não retratou o resultado previsto por Marton (2002), no qual constatou-se 44,2% de remoção. Tal comportamento pode ser atribuído à diferença entre os lotes de carvão ativo empregados no presente trabalho em comparação ao de Marton (2002), uma vez que a estrutura porosa do carvão ativo é influenciada pelo processo de ativação a que o carvão foi submetido e como consequência este é fator determinante da sua capacidade de adsorção (SWIATKOWSKI, 1998).

Segundo Nilvebrant, Reimann e Larsson (2001), em pH baixo o grupo funcional amônio quartenário das resinas aniônicas capturam mais facilmente os ácidos alifáticos pelo fato de estarem na forma ionizada em pH ácido. No presente trabalho, tanto a resina aniônica A-860S, como a A-500PS são constituídas do grupo funcional denominado amônio quartenário e possivelmente por este motivo as remoções de ácido acético observadas com o emprego de resinas superam as encontradas pelos demais procedimentos de destoxificação.

Quanto aos procedimentos de destoxificação empregados no caso dos compostos furfural e 5-hidroximetilfurfural, presentes em baixas concentrações no hidrolisado ($0,082 \text{ g L}^{-1}$ e $0,073 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente), a maior eficácia na remoção foi alcançada também com o emprego de resinas encontrando-se que os máximos valores foram de 66,1% e 74,6%, respectivamente. As metodologias de alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado e de polímero vegetal propiciaram remoções de 65,1% e 44,0% de furfural e de 67,6% e 35,6% de 5-hidroximetilfurfural, respectivamente. Valor superior (92%) ao encontrado para remoção de furfural no presente trabalho foi verificado por Carvalheiro et al. (2005), enquanto remoção semelhante de 5-hidroximetilfurfural foi verificada por estes autores com a utilização de carvão (68%). Remoção total destes compostos (5-hidroximetilfurfural e furfural) foi constatada por Carvalho Júnior, Marton e

Felipe, (2005) empregando-se combinação de métodos de destoxificação como sistema de carvão ativo com resinas de troca iônica, bem como alteração de pH com adsorção em carvão vegetal ativado.

É importante destacar ainda na Figura 5.2A que o simples ajuste de pH do hidrolisado no experimento controle também contribuiu para reduzir a concentração de tóxicos do hidrolisado, com exceção de fenóis, encontrando-se decréscimos de 58,3%, 22,9% e 4,2% nas concentrações de 5-hidroximetilfurfural, furfural e ácido acético, respectivamente, semelhante ao relatado por Chaud (2010). Segundo Sreenivas Rao et al. (2006) avaliando procedimentos de destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana e de sabugo de milho verificaram que o emprego de mais de uma metodologia de destoxificação do hidrolisado é mais eficiente quando comparada à um simples processo de tratamento.

Na Figura 5.2A verifica-se que os procedimentos empregados para o hidrolisado hemicelulósico também resultaram em perda de açúcares, encontrando-se que para glicose e arabinose a utilização de resinas de troca iônica proporcionou maiores perdas (45,2% e 33,2%, respectivamente), enquanto para a xilose esta perda foi de 2,9%. Recentemente Canilha et al. (2010) também constataram valores elevados de remoção dos açúcares arabinose (39%) e glicose (37%) com a utilização de resinas de troca iônica. No caso do procedimento de alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativado verifica-se menor perda de xilose (16,4%), quando comparada à mesma metodologia empregada por Carvalho Júnior, Marton e Felipe (2005), que constataram perda de 20% desta pentose. Perda de glicose semelhante à do presente trabalho (11,3%) pela metodologia de alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativo foi verificada por Canilha et al. (2010). Segundo estes autores perdas de 11% desta hexose foram encontradas, enquanto para arabinose foi constatada perda superior a do presente trabalho (7%).

Com relação à destoxificação do hidrolisado hemicelulósico por polímero vegetal verificou-se que esta metodologia resultou em máxima perda de xilose, 22,3%, valor este muito superior ao constatado nas pesquisas realizadas por Silva (2006), a qual permitiu remoção de 7% desta pentose para hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana obtido de diferente condição de procedimento de hidrólise ácida e origem do bagaço.

A maior remoção observada dos açúcares glicose e arabinose pelo emprego de resinas em comparação aos demais procedimentos deve-se possivelmente à constituição das matrizes das mesmas, já que as utilizadas neste trabalho A-860S e A-500PS, apresentam o grupo funcional amônio quartenário, o qual de acordo com Larsson et al. (1999) proporciona a remoção de açúcares devido à ionização e captura de monossacarídeos neutros. Já a menor perda de xilose por esta metodologia em comparação às demais avaliadas, deve-se ao procedimento denominado pelo fabricante (Purolite) de “adoçamento das resinas”, o qual foi realizado conforme descrito no item 4.2.3.

O simples ajuste de pH do hidrolisado também proporcionou diminuição da concentração tanto do açúcar glicose (19,1%), quanto da xilose (15,6%) e da arabinose (2,17%), semelhante aos procedimentos de destoxificação empregados.

Quanto ao efeito dos procedimentos de destoxificação sobre a remoção dos íons metálicos nota-se na Figura 5.2B que semelhante ao já observado para remoção dos demais tóxicos, a utilização de resinas propiciou maiores remoções em relação aos demais procedimentos empregados, encontrando-se remoções superiores a 83% para todos os íons analisados, com exceção do Na, o qual teve sua concentração aumentada, conforme pode ser observado na Tabela 5.4. Observa-se nesta Tabela que a concentração do íon Na aumentou não só no hidrolisado destoxificado por resinas, mas sim independentemente do procedimento avaliado. Tal fato deve-se possivelmente ao NaOH utilizado para o ajuste de pH de fermentação do hidrolisado em todas as condições. Destaca-se também na Figura 5.2B que todos os procedimentos de destoxificação resultaram em remoções superiores a 97% dos íons Fe e Cr. No entanto, para os procedimentos de destoxificação por alteração de pH combinado à adsorção em carvão vegetal e floculação por polímero vegetal, bem como no hidrolisado que teve o simples ajuste de pH (controle) observou-se aumento dos íons Mg, Ca e K (Tabela 5.4). O aumento na concentração destes íons foi previamente constatada por Rodrigues (2005), durante destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por alteração de pH combinada com carvão ativo.

A maior remoção dos íons metálicos pela destoxificação por resinas deve-se mais uma vez às características específicas destas, neste caso segundo o fabricante, a resina catiônica ácida-forte, C-150, como a empregada neste

trabalho, é capaz de remover a maioria dos cátions, incluindo metais pesados e aminas, assim como substâncias orgânicas de massa molar elevada carregada positivamente presentes nos xaropes de açúcares (PUROLITE, 1998).

De acordo com os resultados as concentrações observadas para o íon níquel de 0,09 e 0,13 g L⁻¹, mesmo após o emprego dos procedimentos de destoxificação por alteração de pH combinada com carvão e por floculação por polímero, respectivamente, ainda podem ser consideradas tóxicas à levedura, uma vez que segundo Watson et al. (1984) apenas 0,01 g L⁻¹ deste íon foi capaz de inibir fortemente o crescimento e a produção de etanol por *Pachysolen tannophilus*. A remoção dos íons níquel observada para todos os procedimentos empregados foi importante uma vez que estes podem inibir parcialmente o consumo de açúcares em leveduras por ligarem-se à superfície da célula (KLEINZELLER; KOTYKA, 1967⁸ *apud* WATSON et al., 1984). Por outro lado, a remoção de íons metálicos pode causar uma deficiência de micronutrientes no hidrolisado que pode acarretar no favorecimento ou não da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* dependendo da concentração inicial destes. Assim, a identificação destes íons no hidrolisado empregado no presente trabalho é importante uma vez que estes interferem no metabolismo de leveduras, como na regulação da assimilação de açúcares e outros compostos solúveis, bem como no crescimento celular (WALKER, 1998).

É importante destacar ainda na Tabela 5.4 a perda de volume do hidrolisado durante os procedimentos de destoxificação empregados, exceto para metodologia de adsorção em resinas, a qual foi mais eficaz para destoxificação do hidrolisado. Estes valores foram de 43,17%, 26,22% e 20,14% para a utilização de polímero vegetal, alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativo e experimento controle, respectivamente, o que é indesejado. Chaud (2010) também encontrou perda de volume do hidrolisado semelhante ao do presente trabalho com a utilização de polímero vegetal, enquanto perda superior a encontrada no presente trabalho (40%) foi constatada por Sarrouh (2009), porém empregando alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativo.

⁸ KLEINZELLER, A.; KOTYKA, A. **Transport of monosaccharides in yeast cells and its relationship to cell metabolism.** In: Aspects of Yeast Metabolism, pp. 33-45, 1967. Edited by A. K. Mills & H. Krebs. Philadelphia: F. A. Davis.

Uma vez que no presente trabalho a remoção dos tóxicos do hidrolisado foi favorecida com o emprego de resinas de troca iônica, ao mesmo tempo em que proporcionou menor perda de xilose sem perda de volume do hidrolisado, esta é considerada promissora para destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos. No entanto, considerando a ampla utilização destas em processos industriais ser limitada, devido a fatores como elevados custos como as empregadas neste trabalho (C-150, A500PS e A860S) que são importadas no Brasil pela Purolite® (US\$ 4,78 à US\$ 9,20 o litro) (informação pessoal)⁹. Considerando que para cada litro de hidrolisado tratado, são empregados 500mL de cada resina, bem como aproximadamente 120g de xilose, para saturação das mesmas e ainda 1,2 Kg de NaOH micropérola PA e 500mL de HCl PA, para se preparar as soluções regenerantes para estas, estima-se que neste procedimento são gastos em média R\$ 123,15 por litro de hidrolisado tratado (levando em consideração a cotação do dólar no dia da consulta)¹⁰. Além do alto custo, outra desvantagem do emprego das resinas refere-se à rápida inativação das mesmas (em média permitem apenas três regenerações após seu uso)¹¹, pois alguns compostos cromóforos contidos no hidrolisado ligam-se quimicamente a elas não permitindo sua reutilização.

Ao se fazer uma comparação do custo e da praticidade da destoxificação de hidrolisados por resinas de troca iônica com os outros procedimentos como alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativo e a floculação por polímero vegetal, verifica-se maior facilidade de operação destes dois outros devido ao menor tempo (5 a 8 horas) de operação no caso da destoxificação de 1L de hidrolisado 5 vezes concentrado, enquanto o emprego de resinas demanda de 30 a 36 horas de trabalho. Além disto, os reagentes empregados nas metodologias de alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativo e a floculação por polímero vegetal são bem mais baratos em relação aos das resinas. Considerando as metodologias de destoxificação empregadas no presente trabalho para a destoxificação de 1L de hidrolisado concentrado 5 vezes,

⁹ Informação fornecida pela Eng. Margareth Sawaguchi Kolososki. Purolite do Brasil Ltda. Publicação eletrônica (mensagem pessoal). Mensagem recebida por <priscilavaz_eb@yahoo.com.br> em 08 fev., 2011.

¹⁰ Cotação do dólar no dia 15/02/2011 – R\$1,6682 (BANCO CENTRAL DO BRASIL, 2011).

¹¹ Informação verbal fornecida pelo Prof. Dr. George Jackson de Moraes Rocha durante realização do Exame de Qualificação de Doutorado em 17 maio, 2010.

estima-se um custo aproximado de R\$ 2,70¹² quando da utilização de polímero vegetal, valor este superior quando comparado com o procedimento de alteração de pH combinada à adsorção em carvão (R\$ 1,45)¹³. No entanto, deve ser considerado que no presente trabalho a utilização da metodologia de alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativo, bem como da floculação por polímero vegetal resultaram em perda de volume do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, o que não aconteceu com a utilização de resinas de troca iônica. Por outro lado, Ribeiro et al. (2001) e Sreenivas Rao et al. (2006) relatam vantagens do procedimento de alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativo devido ao seu baixo custo e alta capacidade do carvão em adsorver pigmentos, ácidos graxos livres, n-hexano e outros produtos de oxidação.

Outra característica constatada durante os procedimentos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço foi a perda de cor deste, conforme é apresentado na Figura 5.3.

Figura 5.3. Coloração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana: Original (A); Concentrado (B); Destoxificado por alteração de pH combinado à adsorção em carvão vegetal ativado (C); floculação por polímero vegetal (D); adsorção em resinas de troca iônica (E) e submetido ao simples ajuste de pH - controle (F).

¹² Cotação do polímero vegetal fornecido por Diogo Carlos Leuck, gerente de Mercado e Relações Institucionais da Acquaquímica. Publicação eletrônica (mensagem pessoal). Mensagem recebida por <priscilavaz_eb@yahoo.com.br> em 14 fev., 2011.

¹³ Cotação dos reagentes empregados neste tratamento fornecida por Ana Paula Melo Peixoto. Synth Produtos para Laboratório Ltda. Publicação eletrônica (mensagem pessoal). Mensagem recebida por <priscilavaz_eb@yahoo.com.br> em 07 fev., 2011.

Verifica-se na Figura 5.3 que todos os procedimentos de destoxificação empregados neste trabalho resultaram na clarificação do hidrolisado submetido à etapa de concentração à vácuo, diferentemente ao observado no controle, no qual após a concentração observou-se uma acentuação na coloração do mesmo. Observa-se ainda que nestas condições a coloração do hidrolisado submetido aos procedimentos de destoxificação foram semelhantes àquela obtida ao hidrolisado original, ou seja, anterior à etapa de concentração à vácuo. Verifica-se ainda que a condição que resultou em maior clarificação, a utilização de resinas, coincidiu com àquela que proporcionou maior remoção de fenóis totais, conforme apresentado anteriormente (Figura 5.2A). Possivelmente a maior clarificação constatada por esta metodologia deve-se à alta capacidade da resina aniônica forte A-860S na remoção de compostos coloridos de alta massa molar, conforme já constatado na clarificação de xaropes de açúcar (PUROLITE, 1998).

A clarificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço pela metodologia de alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado foi previamente constatada por Marton (2002) e por Carvalho Júnior; Marton e Felipe (2005) quando estes autores empregaram combinação de resinas de troca iônica e carvão ativado.

Verifica-se ainda nessa figura que o procedimento de concentração do hidrolisado de bagaço de cana proporcionou um escurecimento na coloração do hidrolisado original, fato já constatado por Marton (2002) que utilizou mesmo tipo de hidrolisado e por Canilha (2006), que empregou hidrolisado de palha de trigo. Segundo Marton (2002), a coloração do hidrolisado está relacionada à presença de fenólicos, assim o escurecimento observado no hidrolisado concentrado 5 vezes está diretamente relacionado à presença de fenóis, o que é confirmado no presente trabalho pelo aumento da concentração deste composto observado na Tabela 5.3.

O fato de se ter alcançado a clarificação do hidrolisado com os procedimentos de destoxificação, além da redução na concentração de compostos tóxicos aos micro-organismos avaliados, é uma característica importante para bioprocessos. Segundo Martínez (2005), a clarificação do hidrolisado hemicelulósico para obtenção de xilitol é fundamental para o processo de cristalização deste produto, uma vez que esta etapa é uma das mais difíceis

do processo fermentativo em si, devido à baixa concentração do produto formado e à composição complexa do caldo fermentado obtido.

5.3 Fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em frascos Erlenmeyer

Considerando que mesmo após os procedimentos de destoxificação empregados o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana ainda contém compostos tóxicos aos micro-organismos, outras estratégias podem ser realizadas para melhorar a fermentabilidade deste como a condução das fermentações empregando-se fontes de carbono adequadas durante preparo do inóculo como as avaliadas no presente trabalho.

5.3.1 Consumo de açúcares, ácido acético e fenóis totais por *C. guilliermondii* em função das fontes de carbono empregadas no preparo do inóculo durante fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana submetido aos diferentes procedimentos de destoxificação

O efeito das diferentes fontes de carbono empregadas no preparo do inóculo de *C. guilliermondii* sobre o consumo de xilose durante fermentação dos hidrolisados destoxificados pode ser verificado na Figura 5.4.

Os dados referentes à fermentação do hidrolisado destoxificado por floculação por polímero vegetal não estão apresentados nessa figura em função da morte celular observada por este procedimento, que será discutido a seguir quando da apresentação do efeito dos procedimentos de destoxificação sobre o crescimento celular (item 5.3.2).

Figura 5.4. Efeito das diferentes fontes de carbono (A – xilose; B - glicose e C – mistura de xilose e glicose) empregadas no preparo do inóculo de *C. guilliermondii* durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (■); adsorção em resinas de troca iônica (▼) e submetido ao simples ajuste de pH - controle (●) sobre o consumo de xilose.

Com relação ao efeito dos procedimentos de destoxificação verifica-se na Figura 5.4 que o consumo de xilose pela levedura foi dependente da fonte de carbono empregada no inóculo, bem como destes procedimentos. Não se constata uma correlação entre o favorecimento do consumo de xilose em função de uma única fonte de carbono frente a um único procedimento de destoxificação, já que quando se empregou resinas de troca iônica o consumo de xilose foi favorecido tanto pelo inóculo em xilose quanto em glicose. Nestas condições a máxima velocidade de consumo desta pentose foi observada, alcançando valores de aproximadamente $0,80 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, enquanto que a mistura de xilose e glicose no preparo do inóculo resultou em apenas $0,61 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Figura 5.4). Este fato pode ser atribuído à mistura dos açúcares ter proporcionado uma inibição ou mesmo um atraso na utilização da xilose, uma vez que tal fato foi previamente constatado por Tavares et al. (2000) durante cultivo de *Debaryomyces hansenii*.

Os valores de velocidade de consumo de xilose foram obtidos por meio da regressão linear do gráfico apresentado na Figura 5.4 utilizando o intervalo de maior linearidade (0-72 horas). Nota-se que os valores dos coeficientes lineares das equações se aproximam da concentração inicial de xilose, enquanto os coeficientes angulares representam a velocidade de consumo desta pentose.

Já com a utilização do procedimento de destoxificação por alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativo nota-se o favorecimento da assimilação da xilose com a utilização de xilose ou mistura de xilose e glicose, sendo os valores de velocidade $0,69$ e $0,66 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente (Figura 5.4). O favorecimento deste consumo quando do cultivo de *C. guilliermondii* em hidrolisado destoxificado por esta mesma metodologia e inóculo contendo somente xilose ou mistura desta com glicose em comparação ao inóculo com glicose também foi constatado por Silva e Felipe (2006). O fato da utilização desta pentose estar sujeita à regulação por indução e repressão catabólica, já que esta pentose induz a atividade da enzima xilose redutase, responsável pela conversão de xilose em xilitol, enquanto a glicose reprime esta indução, o que pode ser uma explicação para tal comportamento (LEE; SOPHER; YAU, 1996). No caso de fermentações em meio sintético foi constatado para *C. tropicalis* o favorecimento da velocidade de consumo de xilose quando realizou-se o pré-cultivo desta levedura em meio contendo apenas xilose (KASTNER; EITEMAN; LEE, 2001).

Apesar de se constatar diferenças entre as necessidades das fontes de carbono para o preparo do inóculo de *C. guilliermondii* para as fermentações nos hidrolisados destoxificados por diferentes procedimentos, verificou-se que o consumo de xilose foi superior a 97% ao final da fermentação, sendo este de apenas 72% quando o hidrolisado foi submetido ao simples ajuste de pH de fermentação (controle).

A influência do tipo da fonte de carbono empregada no preparo do inóculo de *C. guilliermondii* nas fermentações em hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana submetidos aos diferentes procedimentos de destoxificação foi observada não somente para o consumo de xilose, mas também para os demais açúcares glicose e arabinose presentes em baixas concentrações no hidrolisado (Figura 5.5).

Nota-se na Figura 5.5 que independentemente do tipo de fonte de carbono empregada no preparo do inóculo, bem como do procedimento de destoxificação, a glicose foi totalmente consumida nas primeiras 24h de fermentação. Este rápido consumo deve-se ao fato desta hexose ser fonte de carbono preferencial para as leveduras no início do seu crescimento, conforme constatado por Yahashi et al., (1996) durante ensaios com *C. tropicalis*. Segundo Kim, Ryu e Seo (1999), o consumo inicial de glicose pelas leveduras e consequente aumento da massa celular favorecem a utilização de xilose para a produção de xilitol. O rápido consumo de glicose em relação ao de xilose nas primeiras horas de fermentação verificado no presente trabalho, também foi constatado em outras pesquisas com *C. guilliermondii* nas fermentações em diferentes hidrolisados hemicelulósicos como de palhas de arroz (ROBERTO et al., 1994), de trigo (CANILHA et al., 2008), casca de aveia (TAMANINI et al., 2004), aparas de eucalipto (CANETTIERI, 2004) e bagaço de cana-de-açúcar (SILVA; FELIPE, 2006; SARROUH; BRANCO; SILVA, 2009).

No caso do simples ajuste de pH do hidrolisado (controle) observa-se na Figura 5.5 que nas primeiras 24h de fermentação o consumo de glicose foi parcial sendo de 82%, 57,8% e 12,5% quando as fontes de carbono foram glicose, xilose e mistura de xilose e glicose, respectivamente. O consumo parcial desta hexose nesta condição se deve às características do hidrolisado já que se verificou maior concentração de compostos tóxicos presente no hidrolisado em comparação aos hidrolisados destoxificados (Tabela 5.4).

Figura 5.5. Efeito das diferentes fontes de carbono (A – xilose; B - glicose e C - mistura de xilose e glicose) empregadas no preparo do inóculo de *C. guilliermondii* durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por alteração de pH combinado à adsorção em carvão vegetal ativado (■); adsorção em resinas de troca iônica (▼) e submetido ao simples ajuste de pH - controle (●) sobre o consumo de glicose (símbolos sólidos) e arabinose (símbolos abertos).

Quanto à assimilação de arabinose (Figura 5.5), observa-se que esta foi consumida lentamente sendo que o máximo consumo (73%) foi verificado nos meios em que se empregou hidrolisado destoxificado por resinas de troca iônica e para os inóculos em xilose ou mistura de xilose e glicose, fato que coincidiu com o favorecimento de consumo de xilose nestas condições (Figura 5.4). Por outro lado, verifica-se que a utilização de glicose no preparo do inóculo inibiu o consumo de arabinose quando da utilização de hidrolisados destoxificados, o mesmo não foi notado na fermentação do hidrolisado que teve o simples ajuste de pH (controle). No caso do hidrolisado destoxificado por alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativado, a utilização de mistura de xilose e glicose para o preparo do inóculo proporcionou maior consumo de arabinose (50,2%) em comparação às demais fermentações.

Nota-se também na Figura 5.5 um aumento na velocidade de consumo de arabinose após 48h, independente da fonte de carbono empregada no preparo do inóculo de *C. guilliermondii* e dos procedimentos de destoxificação avaliados. Este fato deve-se possivelmente ao esgotamento inicial de glicose e à diminuição da concentração de xilose (Figuras 5.5 e 5.4, respectivamente), levando a levedura a recorrer de outras fontes de carbono para a sua manutenção. O lento consumo de arabinose no início da fermentação seguido do aumento da velocidade desta ao final do processo já foi observado em fermentações em outros hidrolisados por esta mesma levedura, como no de casca de aveia (TAMANINI et al., 2004), aparas de eucalipto (CANETTIERI, 2004), palhas de arroz (ROBERTO et al., 1994) e de trigo (CANILHA et al., 2008), assim como em hidrolisado de bagaço de cana (SILVA; FELIPE, 2006). Segundo Shi et al. (2000), este fato é decorrente da similaridade das vias metabólicas de utilização da xilose e arabinose, que tem o xilitol como intermediário comum.

No presente trabalho foi também verificado que a levedura *C. guilliermondii* foi capaz de assimilar o ácido acético (Figura 5.6) presente no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana mesmo após os procedimentos de destoxificação empregados.

Figura 5.6. Efeito das diferentes fontes de carbono (A – xilose; B - glicose e C - mistura de xilose e glicose) empregadas no preparo do inóculo de *C. guilliermondii* durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (■); adsorção em resinas de troca iônica (▼) e submetido ao simples ajuste de pH - controle (●) sobre o consumo de ácido acético (símbolos sólidos) e variação de pH (símbolos abertos).

Verifica-se que a utilização de resinas de troca iônica proporcionou consumo total deste ácido independentemente da fonte de carbono empregada no preparo do inóculo. É importante considerar que nesta condição de destoxificação a concentração de ácido acético no hidrolisado era inferior ($\approx 1,85 \text{ g L}^{-1}$) em relação aos demais procedimentos. No caso das fermentações em hidrolisado destoxificado por alteração de pH combinada à adsorção em carvão nota-se que o consumo foi parcial sendo de 94,3%, 84,5% e 77,7% quando as fontes de carbono foram glicose, mistura de xilose e glicose e apenas xilose, respectivamente. Já no hidrolisado que teve o simples ajuste de pH (controle) observou-se uma menor assimilação deste ácido, possivelmente devido a maior concentração de compostos tóxicos neste meio. É importante lembrar que a toxicidade dos compostos aos micro-organismos se deve não apenas à ação individual, mas também à ação combinada com vários outros compostos presentes no hidrolisado (FELIPE, 2004). Explicação para o efeito inibitório do metabolismo microbiano observada pelo ácido acético é apresentada por Palmqvist e Hanh-Hägerdal, (2000b). Segundo estes autores, a difusão deste ácido no citoplasma celular reduz o pH intracelular, resultando na desestabilização do equilíbrio fisiológico da célula, proporcionando maiores gastos de energia (ATP) em detrimento dos processos essenciais de manutenção e crescimento.

Destaca-se ainda que para todas as fermentações realizadas a assimilação do ácido acético foi lenta, visto que baixos valores de velocidade de consumo foram encontrados, uma vez que os coeficientes angulares, obtidos pela regressão linear dos dados (0-72h), se aproximam de $0,02 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ a $0,03 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ (Figura 5.6).

A capacidade da levedura em assimilar o ácido acético deve-se ao fato de que em pH ácido, como o pH de fermentação do presente trabalho ($\text{pH} = 5,5$), este ácido não se dissocia e pode entrar diretamente no ciclo de Krebs via acetil-CoA (FELIPE et al., 1995; PALMQVIST; HANH-HÄGERDAL, 2000b), sendo utilizado assim como fonte de carbono durante o processo fermentativo. Tal comportamento foi previamente constatado por Felipe et al. (1995); Lima et al. (2004); Rodrigues (2005) e Chaud (2010).

Observa-se também na Figura 5.6 a variação do pH durante as fermentações, sendo esta variação em função da concentração de ácido acético

no meio, pois na maioria dos ensaios em que foi observada diminuição a concentração deste ácido, houve a elevação do pH e quando o ácido se esgotou (no caso das fermentações dos hidrolisados destoxificados por adsorção em resinas, após 72h) o pH diminuiu, independentemente da fonte de carbono empregada no inóculo.

Outras pesquisas empregando esta mesma levedura cultivada em hidrolisado de bagaço de cana destoxificados por procedimentos semelhantes a do presente trabalho, também constataram o aumento do pH em função do consumo do ácido acético (MARTON, 2002; LIMA et al., 2004; RODRIGUES, 2005; CHAUD, 2010).

É importante destacar a capacidade da levedura em assimilar fenóis (Figura 5.7), durante as fermentações dos hidrolisados submetidos ou não aos diferentes procedimentos de destoxificação. Verifica-se na Figura 5.7 que a maior assimilação de fenóis ($2,1 \text{ g L}^{-1}$) por *C. guilliermondii* ocorreu no hidrolisado que teve o simples ajuste de pH (controle), ou seja, naquele que continha maior concentração de fenóis no meio ($14,7 \text{ g L}^{-1}$), sendo esta capacidade superior à considerada como tóxica à *C. guilliermondii* (VILLA et al., 1998). Segundo estes autores a presença de apenas $0,1 \text{ g L}^{-1}$ deste composto foi suficiente para reduzir drasticamente a assimilação de xilose por esta mesma levedura durante fermentação de meio sintético. Estes autores atribuíram este comportamento à inibição da atividade da xilose redutase ou transporte de xilose através da membrana plasmática. De acordo com Palmqvist e Hahn-Hägerdal (2000a) os compostos fenólicos causam perda da integridade da membrana biológica, afetando sua habilidade de barreira seletiva e matrizes enzimáticas. Ainda segundo estes autores a inibição da fermentação é diminuída quando monômeros de ácidos fenólicos são significativamente removidos do hidrolisado.

De acordo com Harayama, Kok e Neidle (1992) a degradação aeróbia de um composto fenólico é iniciada através de sua hidroxilação para formar catecol, sendo este passo catalisado pela enzima fenol hidroxilase (fenol 2-monooxigenase, E.C. 1.14.13.7), o qual é considerado um passo limitante na via degradativa. O catecol formado é decomposto à simples ácidos e aldeídos os quais são usados na síntese de células e energia (HARWOOD; PARALES, 1996).

Figura 5.7. Efeito das diferentes fontes de carbono (A – xilose; B - glicose e C - mistura de xilose e glicose) empregadas no preparo do inóculo de *C. guilliermondii* durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (■); adsorção em resinas de troca iônica (■) e submetido ao simples ajuste de pH - controle (■) sobre o consumo de fenóis após 120h de fermentação.

5.3.2 Crescimento de *C. guilliermondii* em função das fontes de carbono empregadas no preparo do inóculo durante fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana submetido aos diferentes procedimentos de destoxificação

Nesta etapa do trabalho avaliou-se o crescimento de *C. guilliermondii* em função das fontes de carbono empregadas no preparo do inóculo durante fermentações dos hidrolisados destoxificados, bem como daquele que foi submetido ao simples ajuste de pH (controle) (Figura 5.8). Observou-se que a utilização de polímero vegetal como metodologia de destoxificação acarretou na morte da levedura (Figura 5.8B). Este fato não foi observado para os demais procedimentos avaliados, nos quais a viabilidade das células se manteve constante (Figuras 5.8A, 5.8C e 5.8D).

Figura 5.8. Visualizações microscópicas das células de *C. guilliermondii* FTI 20037 cultivadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (A); floculação por polímero vegetal (B); adsorção em resinas de troca iônica (C) e submetido ao simples ajuste de pH - controle (D).

Verifica-se ainda na Figura 5.8A e 5.8C, correspondentes aos ensaios realizados nos hidrolisados destoxificados por alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado e por adsorção em resinas de troca iônica a formação de gêmulas características de *Candida sp.* No entanto, no hidrolisado que teve o simples ajuste de pH (controle) observa-se alterações morfológicas da levedura, caracterizadas pela formação de pseudo-hifas (Figura 5.8D). É conhecido que vários fatores como mudanças do meio de cultivo, temperatura, pH, presença de tóxicos, tempo de cultivo, falta de nutrientes (N_2 e C), presença ou ausência de oxigênio e biodisponibilidade de íons (Mg^{2+}), podem induzir a alteração morfológica (WALKER, 1998). No caso do hidrolisado que teve o simples ajuste de pH (controle), possivelmente as alterações morfológicas da levedura observadas e caracterizadas pela presença de pseudo-hifas típicas foram formadas em resposta às condições ambientais que no caso se deve à presença de elevada concentração de compostos tóxicos como fenólicos e ácidos orgânicos, conforme apresentado na Tabela 5.4, o que acarretou também em baixo consumo dos açúcares (Figuras 5.4, 5.5), de ácido acético (Figura 5.6) e dos compostos fenólicos (Figura 5.7) constatados nesta condição. Segundo Walker (1998) nas fermentações industriais, a morfologia de leveduras pode ter importante influência nas propriedades reológicas do meio de cultivo, na transferência de oxigênio e no consumo de nutrientes e este por sua vez pode alterar o resultado das reações metabólicas.

Com relação à morte das células observada durante cultivo em hidrolisado destoxificado por polímero vegetal (Figura 5.8B), esta pode ser atribuída à reação de complexação de metais, como por exemplo, íons ferro, presentes no hidrolisado (Tabela 5.4) e o tanino do polímero. Esta complexação pode ser caracterizada pela formação de uma película de tanato de ferro facilmente perceptível pela coloração enegrecida conferida às superfícies, conforme constatado nos experimentos (Figura 5.9). A formação desta película verificada no presente trabalho (Figura 5.9) é característica do polímero vegetal empregado (Bioclin), uma vez que de acordo com a ficha técnica do mesmo, este atua como agente sanitizante de moenda, não permitindo a aderência de colônias de bactérias produtoras de gomas e ácidos orgânicos, através da formação da película nas superfícies metálicas das moendas. Outra possível explicação para a morte celular observada pode ser devida à complexação de algum outro metal presente no hidrolisado (Tabela 5.4) com o tanino do polímero, formando tanatos metálicos, o que pode causar a morte por depleção do metal, que poderia estar agindo como cofator essencial da levedura *C. guilliermondii*. Uma outra possibilidade de morte da levedura pela presença de taninos no meio é devido à ação destes sobre as proteínas (ou glicoproteínas) da membrana, neste caso normalmente ocorre inativação do micro-organismo que pode resultar em morte e no caso dos taninos modificados, como o Bioclin, pode ainda haver coagulação do micro-organismo junto com outras impurezas.

Figura 5.9. Formação de película enegrecida observada durante ensaios com *C. guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por floculação por polímero vegetal.

O emprego desse polímero como agente de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana já foi relatado na literatura sem ter sido

constatado morte celular, porém o hidrolisado foi obtido de bagaço proveniente de moagem artesal (SILVA, 2006), enquanto do presente trabalho foi de moagem industrial. Uma das diferenças verificadas entre estes dois hidrolisados refere-se ao teor de metais como os íons ferro, que no caso do hidrolisado obtido do bagaço industrial (presente trabalho) é quase duas vezes superior à encontrada nos hidrolisados obtidos da moagem artesanal do bagaço.

A Figura 5.10 ilustra o efeito das fontes de carbono empregadas no preparo do inóculo de *C. guilliermondii* sobre o crescimento celular durante fermentações dos hidrolisados destoxificados pelos diferentes procedimentos. A utilização de glicose como fonte de carbono no preparo do inóculo e metodologia de destoxificação do hidrolisado por adsorção em resinas propiciou máxima concentração celular, $10,63 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 5.10B), concentração esta que foi 51,5% maior em relação ao inóculo feito com esta mesma fonte de carbono, só que empregando-se hidrolisado destoxificado por alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativo. Nota-se ainda que independente das fontes de carbono empregadas, a utilização de resinas propiciou crescimento celular de *C. guilliermondii* superior aos demais procedimentos estudados no presente trabalho, o que provavelmente ocorreu devido à maior remoção de compostos tóxicos à levedura alcançados por esta metodologia, conforme apresentado na Figura 5.2.

Figura 5.10. Efeito das diferentes fontes de carbono (A – xilose; B - glicose e C - mistura de xilose e glicose) empregadas no preparo do inóculo de *C. guilliermondii* durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (■); adsorção em resinas de troca iônica (▼) e submetido ao simples ajuste de pH - controle (●) sobre o crescimento celular.

O favorecimento da formação de biomassa de *C. guilliermondii* pelo uso de resinas na destoxificação do hidrolisado em comparação ao hidrolisado destoxificado por alteração de pH combinada à adsorção em carvão já foi previamente constatado por Canilha et al. (2010) quando do cultivo de *Pichia stipitis*. Segundo estes autores a formação de biomassa na condição em que o hidrolisado foi destoxificado por resinas foi em média 33,5% superior às demais metodologias avaliadas.

Diferente ao observado nas fermentações dos hidrolisados destoxificados por resinas, nas fermentações em que se empregou da alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal foram encontrados os menores valores de concentrações celulares em comparação aos demais procedimentos avaliados, nestas condições também não foi possível verificar diferenças marcantes neste crescimento em função das fontes de carbono empregadas, uma vez que concentrações próximas a $5,35 \text{ g L}^{-1}$ foram alcançadas (Figura 5.10). Silva et al. (2005) diferentemente ao observado no presente trabalho verificaram que a mistura de glicose e xilose favoreceu o crescimento celular de *C. guilliermondii* quando da utilização de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por alteração do pH combinada com adsorção em carvão ativo em relação aos meios cujos inóculos continham somente glicose ou xilose. O favorecimento do crescimento celular de *C. guilliermondii* pré-cultivada em meio contendo mistura de glicose e xilose como fonte de carbono do inóculo também já foi observado por Canilha et al. (2008) durante pesquisas com hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo destoxificado por alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativo.

No caso do simples ajuste de pH do hidrolisado (controle), verifica-se que semelhante à destoxificação do hidrolisado por resinas, o máximo crescimento celular verificado nesta condição ($6,72 \text{ g L}^{-1}$) ocorreu na presença de glicose como fonte de carbono para o inóculo (Figura 5.10A).

5.3.3 Produção de xilitol por *C. guilliermondii* em função das fontes de carbono empregadas no preparo do inóculo durante fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana submetido aos diferentes procedimentos de destoxificação

A produção de xilitol por *C. guilliermondii* foi também influenciada pela fonte de carbono empregada no preparo do inóculo em função dos procedimentos de destoxificação empregados (Figura 5.11 e Tabela 5.5), conforme também constatado para o consumo dos açúcares, ácido acético e crescimento desta levedura. Verifica-se maior produção de xilitol ($50,92 \text{ g L}^{-1}$) quando se empregou glicose como fonte de carbono do inóculo na fermentação em hidrolisado destoxificado por alteração de pH combinada à adsorção em carvão (Figura 5.11B). Condição esta que também propiciou maior velocidade de consumo de ácido acético (Figura 5.6), bem como menor crescimento celular (Figura 5.10). Contudo, nota-se que o uso de xilose como fonte de carbono no preparo do inóculo (Figura 5.11A), tanto nos hidrolisados destoxificados por alteração de pH combinada à adsorção em carvão quanto nos destoxificados por adsorção em resinas de troca iônica resultaram em valores de concentrações de xilitol próximos ao máximo encontrado quando se empregou glicose.

Verifica-se ainda na Figura 5.11 o consumo de xilitol logo após 96h de fermentação quando da utilização de resinas de troca iônica independentemente da fonte de carbono empregada no preparo do inóculo. Este fato deve-se principalmente ao esgotamento da xilose observada nesta condição (Figura 5.4), o qual também foi previamente constatado por Matos (2004) e Rodrigues et al. (2006). A assimilação de xilitol pela levedura nestas condições levou a formações de maiores concentrações celulares, conforme observado na Figura 5.10, apesar do xilitol ser uma fonte de carbono pobre para crescimento celular devido à sua baixa permeabilidade nas células de leveduras (SINGH; MISHRA, 1995).

Ao se avaliar a condição de fermentação na qual o hidrolisado foi submetido ao simples ajuste de pH (Figura 5.11) não se constata influência da fonte de carbono empregada no inóculo sobre a produção de xilitol, uma vez que concentrações ao redor de $23,4 \text{ g L}^{-1}$ foram alcançadas nas três condições de fonte de carbono avaliadas para o inóculo, o que acarretou em velocidades de formação deste álcool também próximas, de $0,20$ a $0,22 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Este

comportamento foi semelhante ao observado para o consumo de xilose (Figura 5.4) e de ácido acético (Figura 5.6) encontrados nesta condição, uma vez que não se constatarem diferenças marcantes entre estes valores de consumo em função da fonte de carbono empregada no inóculo. Observa-se ainda na Figura 5.11 que os valores das concentrações de xilitol alcançados nesta condição foram sempre inferiores aos obtidos nos hidrolisados destoxificados.

Com relação aos parâmetros fermentativos (Tabela 5.5) verifica-se que os máximos valores de fator de conversão de xilose em xiliol, produtividade volumétrica de xilitol e eficiência de conversão foram alcançados com a utilização de inóculo obtido em xilose durante fermentação do hidrolisado destoxificado por resinas ($Y_{P/S} = 0,81 \text{ g g}^{-1}$; $Q_P = 0,60 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $\eta = 87,92\%$, respectivamente), embora com o emprego de metodologia de alteração de pH combinada à adsorção em carvão os valores de fator e eficiência de conversão foram próximos ao observado para resinas, independentemente da fonte de carbono empregada no preparo do inóculo ($Y_{P/S}$ variando de 0,78 a 0,80 g g^{-1} e η variando de 84,5 a 87,5%). Destaca-se que os máximos valores dos parâmetros fermentativos foram obtidos em tempos diferentes durante o processo fermentativo, já que o fator e eficiência de conversão de xilose em xilitol foram obtidos em 48h, enquanto a produtividade em 72h.

O elevado valor de produtividade volumétrica de xilitol observado na fermentação do hidrolisado destoxificado por resinas e inóculo cultivado em xilose, deve-se principalmente à eficácia deste procedimento de destoxificação, uma vez que de modo geral tal metodologia resultou em máxima remoção dos tóxicos avaliados (ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural, fenóis e íons metálicos) (Figura 5.2) e ao mesmo tempo à menor remoção de xilose (Figura 5.2), o que acarretou numa melhoria da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*. Semelhante ao constatado no presente trabalho, Villarreal et al. (2006) empregando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, observaram um favorecimento da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* quando do emprego de destoxificação do hidrolisado por resinas em comparação à alteração de pH combinada ao carvão. Segundo estes autores a utilização de resinas de troca iônica na destoxificação do hidrolisado aumentou em mais de duas vezes o fator de conversão de xilose em xilitol por esta levedura quando comparado com metodologia de alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativo.

Figura 5.11. Efeito das diferentes fontes de carbono (A – xilose; B - glicose e C - mistura de xilose e glicose) empregadas no preparo do inóculo de *C. guilliermondii* durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (■); adsorção em resinas de troca iônica (▼) e submetido ao simples ajuste de pH - controle (●) sobre a formação de xilitol.

Tabela 5.5. Efeito das diferentes fontes de carbono (A – xilose; B - glicose e C - mistura de xilose e glicose) empregadas no preparo do inóculo de *C. guilliermondii* durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (pHCA), por adsorção em resinas de troca iônica (RTI) e submetido ao simples ajuste de pH - controle sobre os parâmetros fermentativos: fator de conversão de xilose em xitol ($Y_{P/S}$), produtividade de xitol (Q_P) e eficiência de conversão (η).

A						
Parâmetro	Hidrolisado	Tempo (h)				
		24	48	72	96	120
$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	pHCA	0,488	0,610	0,663	0,749	0,783
	RTI	0,490	0,806	0,731	0,714	0,637
	Controle	0,000	0,499	0,717	0,568	0,570
Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	pHCA	0,327	0,443	0,453	0,481	0,416
	RTI	0,391	0,580	0,597	0,526	0,385
	Controle	0,000	0,091	0,136	0,164	0,199
η (%)	pHCA	53,21	66,52	72,30	81,69	85,43
	RTI	53,39	87,92	79,71	77,85	69,49
	Controle	0,00	54,47	78,15	61,90	62,16

B						
Parâmetro	Hidrolisado	Tempo (h)				
		24	48	72	96	120
$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	pHCA	0,473	0,725	0,675	0,768	0,802
	RTI	0,381	0,613	0,656	0,675	0,620
	Controle	0,000	0,676	0,720	0,568	0,568
Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	pHCA	0,219	0,336	0,367	0,420	0,424
	RTI	0,336	0,484	0,535	0,498	0,371
	Controle	0,000	0,094	0,152	0,164	0,202
η (%)	pHCA	53,53	79,06	73,59	83,71	87,45
	RTI	41,58	66,87	71,56	73,57	67,58
	Controle	0,00	73,67	78,49	61,89	61,92

C						
Parâmetro	Hidrolisado	Tempo (h)				
		24	48	72	96	120
$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	pHCA	0,593	0,619	0,666	0,757	0,775
	RTI	0,517	0,640	0,712	0,631	0,563
	Controle	0,000	0,342	0,436	0,495	0,537
Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	pHCA	0,339	0,406	0,434	0,483	0,411
	RTI	0,346	0,382	0,444	0,425	0,320
	Controle	0,000	0,057	0,103	0,152	0,184
η (%)	pHCA	64,72	67,49	72,67	82,60	84,47
	RTI	56,42	69,74	77,65	68,86	61,44
	Controle	0,00	37,33	47,53	53,97	58,59

Constata-se ainda na Tabela 5.5A que os valores de fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S} = 0,783 \text{ g g}^{-1}$), bem como o de produtividade de xilitol ($Q_P = 0,481 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$), obtidos na fermentação realizada em inóculo contendo xilose como fonte de carbono e hidrolisado destoxificado por alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal, foram semelhantes aos obtidos nas pesquisas realizadas por Alves et al. (1998) empregando a mesma levedura, metodologia de destoxificação do hidrolisado e fonte de carbono do inóculo. Segundo estes autores valores de $Y_{P/S} = 0,79 \text{ g g}^{-1}$ e de $Q_P = 0,47 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ foram alcançados, os quais revelaram o efeito positivo deste procedimento e da fonte de carbono empregada no inóculo para a produção de xilitol. Silva et al. (2005) também avaliaram o efeito da fonte de carbono no preparo do inóculo em pesquisas com a mesma levedura, tipo de hidrolisado e metodologia de destoxificação que a do presente trabalho encontrando que semelhante a este houve o favorecimento da produtividade de xilitol e do fator de conversão de xilose em xilitol quando xilose foi empregada no preparo do inóculo.

Com relação ao hidrolisado que teve o simples ajuste de pH (controle), verifica-se na Tabela 5.5 que os valores de produtividade de xilitol não sofreram muita variação (Q_P variando de 0,184 a 0,202 $\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) independentemente da fonte de carbono empregada no preparo do inóculo, diferentemente ao observado para destoxificação por resinas, na qual a fonte de carbono foi determinante no alcance de elevada produtividade.

Verifica-se ainda na Tabela 5.5 que após 96h de fermentação dos hidrolisados destoxificados por adsorção em resinas houve uma diminuição dos parâmetros fermentativos independentemente da fonte de carbono empregada no inóculo, possivelmente devido ao esgotamento da xilose do meio (Figura 5.4), bem como pela falta de nutrientes.

Uma vez que a metodologia de alteração de pH combinada à adsorção em carvão proporcionou valores de fator de conversão próximos aos encontrados pelo procedimento de destoxificação do hidrolisado por adsorção em resinas, aliado ao fato daquela metodologia ser barata e de fácil manipulação em comparação à resina, conforme discutido anteriormente, os demais experimentos de ampliação de escala para obtenção de xilitol por *C. guilliermondii* em fermentadores de bancada foram realizados pela metodologia de alteração de pH combinada à adsorção em carvão e inóculo em xilose. A escolha do inóculo

preparado em xilose foi baseada em função do favorecimento da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* observada pelos máximos valores de velocidade de assimilação de xilose ($0,69 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e maior capacidade de assimilação de fenóis (24,2%) e maior produtividade volumétrica de xilitol ($0,48 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em comparação às demais fontes de carbono.

5.3.4 Formação de etanol e glicerol por *C. guilliermondii* em função das fontes de carbono empregadas no preparo do inóculo durante fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana submetido aos diferentes procedimentos de destoxificação

Os compostos glicerol e etanol foram encontrados como subprodutos do metabolismo de açúcares por *C. guilliermondii* nas fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana submetido aos diferentes procedimentos de destoxificação independentemente do tipo de fonte de carbono empregada no preparo do inóculo (Figura 5.12). Observa-se nesta figura que para todas as condições avaliadas ocorreu rápida formação de glicerol e etanol nas primeiras 24h de fermentação, coincidente com o esgotamento da glicose do meio nestas condições (Figura 5.5). Porém, a formação destes compostos por *C. guilliermondii* pode não estar relacionada apenas ao consumo de glicose já que segundo Arruda e Felipe (2009), a formação destes foi observada em meio semi-sintético contendo apenas xilose como fonte de carbono. Rodrigues et al. (2003c) verificaram que no caso da bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* a formação destes subprodutos além de desviar a fonte de carbono (xilose), pode levar a formação de glicerol com concentração de até 12% da concentração final de xilitol. Adicionalmente a formação destes subprodutos reduz a disponibilidade de NADH, coenzima essencial para xilose redutase (E.C. 1.1.1.2.1), a qual participa dos passos iniciais deste bioprocessos (SILVA et al., 2007).

Verifica-se ainda na Figura 5.12 que a máxima formação de glicerol ($1,93 \text{ g L}^{-1}$) foi encontrada durante fermentação de hidrolisado que teve o simples ajuste de pH (controle) e inóculo cultivado em glicose, ou seja, no hidrolisado que continha maior teor de tóxicos em relação àqueles nos quais foram empregados os procedimentos de destoxificação. Segundo Nevoigt e Stahl (1997) o glicerol desempenha papel de soluto compatível em diferentes situações de stress em

leveduras. Arruda e Felipe (2009) também atribuíram a produção de glicerol por *C. guilliermondii* como um provável mecanismo de defesa da levedura em condições de estresse celular, uma vez que as fermentações foram realizadas em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana.

Semelhante ao observado para o glicerol, a maior produção de etanol ($6,22 \text{ g L}^{-1}$) também ocorreu no hidrolisado que teve o simples ajuste de pH (controle), mas quando empregou-se xilose como fonte de carbono para inóculo. Este valor foi 48,2% e 129,4% superior às máximas concentrações de etanol observadas quando se empregou inóculo em xilose e hidrolisados destoxificados por alteração de pH combinada à adsorção em carvão ativado e pela adsorção em resinas de troca iônica, respectivamente. Verifica-se ainda no presente trabalho que a máxima concentração de etanol correspondeu a 26,2% da máxima concentração de xilitol encontrada no hidrolisado que teve o simples ajuste de pH (controle). Valor semelhante é notado nas pesquisas realizadas por Rodrigues et al. (2003c), uma vez que a formação de etanol alcançou 22,2% da máxima concentração de xilitol, por isso os procedimentos de destoxificação dos hidrolisados são muito importantes para se diminuir a formação destes subprodutos para obtenção de elevados valores de parâmetros fermentativos.

Figura 5.12. Efeito das diferentes fontes de carbono (A – xilose; B - glicose e C - mistura de xilose e glicose) empregadas no preparo do inóculo de *C. guilliermondii* durante fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por alteração de pH combinado à adsorção em carvão vegetal ativado (■); adsorção em resinas de troca iônica (▼) e hidrolisado que teve o simples ajuste de pH - controle (●) sobre a formação de etanol (símbolos sólidos) e glicerol (símbolos abertos).

5.4 Fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em fermentadores de bancada

Nesta etapa as fermentações foram realizadas em fermentadores de bancada para se avaliar a ampliação de escala do processo empregando-se as condições previamente estabelecidas em frascos Erlenmeyer relativas à fonte de carbono utilizada no preparo do inóculo em função dos procedimentos de destoxificação do hidrolisado.

A Figura 5.13 apresenta o comportamento da levedura sobre o consumo de xilose, glicose, arabinose, formação de biomassa e produção de xilitol na condição escolhida em frascos Erlenmeyer para ampliação de escala (inóculo – xilose [30 g L⁻¹] e destoxificação – alteração de pH combinada à adsorção em carvão) e os resultados obtidos nas fermentações em fermentadores de bancada. Está claro nesta figura que a realização das fermentações em frascos Erlenmeyer em comparação às em fermentadores de bancada influenciou a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, uma vez que mais de 96% de xilose já havia sido consumida em 96h (Figura 5.13A) quando os experimentos foram realizados em frascos, enquanto neste mesmo tempo apenas 65,3% e 72,9% foram constatadas para os ensaios nos fermentadores de 2,4L e 16L, respectivamente. Essa diminuição no consumo de xilose observada com o aumento de escala para fermentadores de 2,4L e 16L é confirmada pelos valores de velocidade específica de consumo de substrato ($\mu_{SM\acute{a}x}$), os quais foram de apenas 0,201 e 0,250 g_{Xilose} g_{Cél}⁻¹ h⁻¹, respectivamente, enquanto o valor deste parâmetro foi de 0,623 g_{Xilose} g_{Cél}⁻¹ h⁻¹ para frascos Erlenmeyer (Tabela 5.6). Este fato pode estar associado às condições de disponibilidade de oxigênio em frascos Erlenmeyer em relação aos fermentadores de bancada terem sido diferentes, uma vez que o oxigênio é o parâmetro mais crítico neste bioprocessos, aliado ao fato das condições de cultivo obtidas em frascos terem sido padronizadas e mantidas nos fermentadores. Segundo Martínez, Silva e Felipe (2000) a agitação e a aeração empregadas num processo fermentativo influenciam a transferência de oxigênio e consequentemente, no consumo de xilose e formação do produto.

Nos frascos Erlenmeyer observou-se também maior produção de xilitol (Figura 5.13D) com máxima concentração de 49,87 g L⁻¹, a qual foi 26,6% e 21,8% superior às máximas concentrações encontradas nos fermentadores de

2,4L e 16L, respectivamente. Tal favorecimento ainda é reforçado ao se observar os dados da Tabela 5.6, na qual nota-se que a máxima velocidade específica de formação de produto ($\mu_{PMáx}$) em frascos Erlenmeyer foi de $0,260 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, enquanto nos fermentadores de 2,4L e 16L este valor foi de apenas $\mu_{PMáx} = 0,077 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e $\mu_{PMáx} = 0,050 \text{ g g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectivamente. Nota-se diferença entre os valores de velocidade específica de formação de xilitol entre os fermentadores, o que pode ser atribuído a algum fenômeno de transporte, pois segundo Mavituna (1996), este é o principal fenômeno que influencia o aumento de escala. Assim, a transferência de massa gás-líquido no fermentador de 16L pode ter sido diferente em relação ao fermentador de 2,4L, uma vez que segundo Van't Riet e Tramper (1991) aumento de escala altera o tempo de mistura, que por sua vez altera a concentração de oxigênio dissolvido, o que possivelmente proporcionou as diferenças nos $\mu_{PMáx}$ observados nos meios.

Destaca-se na Tabela 5.6 que o máximo valor de produtividade de xilitol ($Q_P = 0,481 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) foi alcançado às 96h de fermentação em frascos Erlenmeyer e que este foi em média 41,1% superior se comparado com os valores obtidos nos fermentadores. Além disto, ressalta-se que para se atingir o máximo valor deste parâmetro nos fermentadores ($Q_P = 0,277$ e $0,290 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para 2,4L e 16L, respectivamente) foram necessárias 132h de fermentação, tempo esse superior em 36h em relação ao tempo da fermentação realizada em frascos Erlenmeyer. Com relação ao fator de conversão de xilose em xilitol, não se observou diferenças tão marcantes quanto ao máximo valor encontrado nas fermentações realizadas em frascos Erlenmeyer em comparação aos fermentadores, uma vez que apenas 13,7% (em média) de diferença foi constatada, além do fato destes valores terem sido obtidos no final das fermentações com 120h e 132h para frascos e fermentadores, respectivamente. Da mesma forma que para o fator de conversão ($Y_{P/S}$), para a eficiência de conversão (η) não foram observadas diferenças marcantes nos valores deste parâmetro, ao se comparar frascos com fermentadores, uma vez que η é calculado em função de $Y_{P/S}$.

Figura 5.13. Consumo de xilose (A), glicose e arabinose (B), crescimento celular (C) e produção de xilitol (D) por *C. guilliermondii* durante fermentações em frascos Erlenmeyer (■) e em fermentadores de bancada de 2,4L (●) e 16L (▼) de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana destoxificados.

Tabela 5.6. Parâmetros fermentativos obtidos durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em frascos Erlenmeyer na condição escolhida para ampliação e em fermentadores de bancada de 2,4L e 16L por *C. guilliermondii*.

Y _{P/S} (g _{xilitol} g _{xilose} ⁻¹)												
Tempo	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	
Frascos Erlenmeyer	0,488	-	0,610	-	0,663	-	0,749	-	0,783	-	-	
Fermentador	2,4L	0,441	0,508	0,593	0,558	0,587	0,638	0,632	0,620	0,634	0,686	0,628
	16L	0,000	0,321	0,397	0,377	0,468	0,571	0,627	0,613	0,629	0,665	0,646

Q _P (g _{xilitol} L ⁻¹ h ⁻¹)												
Tempo	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	
Frascos Erlenmeyer	0,327	-	0,443	-	0,453	-	0,481	-	0,416	-	-	
Fermentador	2,4L	0,135	0,172	0,188	0,198	0,215	0,234	0,248	0,258	0,265	0,277	0,248
	16L	0,000	0,110	0,143	0,157	0,181	0,216	0,249	0,255	0,272	0,290	0,271

η (%)												
Tempo	24	36	48	60	72	84	96	108	120	132	144	
Frascos Erlenmeyer	53,210	-	66,523	-	72,296	-	81,692	-	85,431	-	-	
Fermentador	2,4L	48,107	55,385	64,660	60,851	64,019	69,587	68,882	67,650	69,141	74,774	68,523
	16L	0,000	35,033	43,261	41,108	51,066	62,271	68,322	66,896	68,566	72,554	70,400

Velocidades específicas			
	$\mu_{XMáx} (h^{-1})$	$\mu_{PMáx} (g_{xilitol} g_{cel}^{-1} h^{-1})$	$\mu_{SMáx} (g_{xilose} g_{cel}^{-1} h^{-1})$
Frascos Erlenmeyer	0,078	0,260	0,623
Fermentador	2,4L	0,130	0,201
	16L	0,176	0,250

Quanto ao crescimento, o perfil deste é apresentado na Figura 5.13C e os dados de velocidade específica deste (μ_x) na Tabela 5.6. Constata-se nesta Tabela o favorecimento da formação de biomassa nas fermentações em fermentadores em comparação à realizada em frascos Erlenmeyer, mostrando assim uma preferência do metabolismo da levedura para formação de células ao invés do xilitol. Este fato indica que provavelmente a disponibilidade de oxigênio dissolvido nos fermentadores não foi adequada, dando assim preferência ao processo respiratório ao invés do fermentativo. De acordo com Vandeska et al. (1995), o nível de oxigênio que favorece a produção de xilitol está na faixa de limitação de oxigênio, o qual difere do nível que favorece o crescimento celular. Uma possível explicação para esse fato é que o suprimento de oxigênio nos fermentadores estava acima da considerada ideal para produção de xilitol, uma vez que este é responsável pela ativação do sistema de transporte de xilose, bem como determina a partição do fluxo de carbono da xilose entre crescimento celular e formação de produtos. O excesso de oxigênio leva a oxidação de NADH à NAD^+ e alta relação NAD^+/NADH resulta na oxidação de xilitol à xilulose. Como resultado, menos xilitol e mais células são formadas (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994; BRANCO, 2010). Hahn-Hägerdal et. al. (1994) observaram que sob baixa velocidade específica de consumo de oxigênio, o sistema de transferência de elétrons não é capaz de reoxidar o NADH produzido por respiração e/ou fermentação. Como consequência, a concentração intracelular de NADH aumenta, resultando na redução da taxa de reação de xilitol desidrogenase NAD^+ -dependente, com consequente acúmulo de xilitol.

De acordo com resultados apresentados nas Figuras 5.13C e 5.13D, observa-se que o aumento de escala do processo resultou no aumento proporcional do crescimento celular diferente do observado para produção de xilitol, a qual foi favorecida em frascos Erlenmeyer, conforme discutido anteriormente. A máxima concentração celular observada foi $13,66 \text{ g L}^{-1}$ para fermentador de 16L, seguida da concentração de $9,75 \text{ g L}^{-1}$ e de $5,53 \text{ g L}^{-1}$ para fermentador de 2,4L e frascos Erlenmeyer, respectivamente. Estes dados corroboram com os obtidos por Canilha (2006) durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo por *C. guilliermondii*, cujas concentrações celulares obtidas em fermentadores foram sempre superiores às aquelas observadas quando comparadas ao cultivo em frascos Erlenmeyer.

Assim, o fator disponibilidade de oxigênio nas fermentações influenciou também o crescimento celular. Nota-se ainda na Tabela 5.6 que os valores de velocidade específica de crescimento celular nos fermentadores de 2,4L ($\mu_{XMáx} = 0,130 \text{ h}^{-1}$) e 16L ($\mu_{XMáx} = 0,176 \text{ h}^{-1}$) foram 40,0% e 55,7%, respectivamente superiores ao encontrado em frascos Erlenmeyer ($\mu_{XMáx} = 0,078 \text{ h}^{-1}$), mostrando mais uma vez que o metabolismo de xilose nestes casos estavam mais direcionados para a produção de células do que para a produção de xilitol, possivelmente devido à maior disponibilidade de oxigênio nos fermentadores.

Análises microscópicas ao final das fermentações revelaram que a viabilidade das células se manteve constante (100%) para todas as condições avaliadas.

Semelhante ao já constatado durante cultivo em frascos Erlenmeyer a glicose foi rapidamente assimilada nas primeiras horas de fermentação e a arabinose foi lentamente consumida nas fermentações em fermentadores de bancada (Figura 5.13B). Conforme observado para o crescimento de biomassa, verificou-se que a ampliação de escala de 2,4L para 16L resultou em favorecimento de assimilação de arabinose, uma vez que ao final da fermentação valores de 65,6% e 78,5% foram encontrados respectivamente, enquanto apenas 42,2% foi observado quando da realização dos experimentos em frascos Erlenmeyer (Figura 5.13B).

Com relação ao ácido acético, semelhante ao constatado em frascos, observou-se a capacidade de assimilação deste pela levedura com consequente aumento dos valores de pH (Figura 5.14). O maior consumo deste ácido por *C. guilliermondii* (93,4%), ocorreu em fermentador de maior capacidade (16L), comportamento semelhante à assimilação de arabinose, com consequente aumento na concentração celular em comparação às fermentações em frascos (Figura 5.13C). Possivelmente a disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio interferiu também na assimilação de ácido acético, uma vez que o aumento do consumo deste ácido é característica de maior quantidade de oxigênio no meio (MARTÍNEZ; SILVA; FELIPE, 2000), determinando o direcionamento do fluxo de carbono para crescimento, conforme observado nos fermentadores ou para formação de produto como observado nos frascos Erlenmeyer. A característica da levedura em assimilar o ácido acético é importante pelo fato de propiciar a

destoxificação do meio. Segundo Martínez, Silva e Felipe (2000) a alta disponibilidade de oxigênio no meio proporciona aumento no consumo não só de ácido acético, mas também de arabinose, o que poderia explicar então os favorecimentos dos consumos destes quando comparamos os resultados de fermentadores com frascos Erlenmeyer do presente trabalho. Possivelmente, a alta disponibilidade de oxigênio nos fermentadores levou a conversão de ácido acético a acetil-CoA, o qual é o principal intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico, usado para formação de coenzimas redutoras, que são oxidadas na cadeia respiratória.

Figura 5.14. Consumo de ácido acético (linha sólida) e variação do pH (linha tracejada) por *C. guilliermondii* durante fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em frascos Erlenmeyer (■) e em fermentadores de bancada de 2,4L (●) e 16L (▼).

Uma avaliação comparativa entre dados obtidos no presente trabalho com resultados de outras pesquisas empregando diferentes biomassas e mesma levedura é apresentada na Tabela 5.7. Verifica-se que quando da utilização de fermentador de 2,4L, o fator de conversão de xilose em xilitol observado na presente pesquisa ($Y_{P/S} = 0,69 \text{ g g}^{-1}$) foi semelhante ao obtido nas pesquisas de Rodrigues (2005), a qual empregou mesmo tipo de hidrolisado, levedura e valor de k_La . No entanto, este valor foi superior aos demais dados observados na literatura em comparação com os fermentadores de menor capacidade (entre 1,0L e 2,4L), independentemente do valor de k_La empregado, com exceção do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada, cujo valor foi 21,6% superior. Já quando do emprego de fermentador de maior capacidade (16L) este parâmetro mostrou-se semelhante quando da utilização de mesmo valor de k_La em

hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo ($Y_{P/S} = 0,65 \text{ g g}^{-1}$), sendo o valor encontrado no presente trabalho ($Y_{P/S} = 0,67 \text{ g g}^{-1}$) inferior aos reportados na literatura para os hidrolisados de bagaço de cana (MARTÍNEZ, 2005) e palha de cevada (MORAES, 2008), nos quais se empregaram k_La de 30 h^{-1} e 18 h^{-1} , respectivamente.

Tabela 5.7. Resultados obtidos no presente trabalho e dados da literatura sobre a produção de xilitol por *C. guilliermondii* cultivada em diferentes hidrolisados hemicelulósicos durante fermentação em fermentadores de bancada.

Hidrolisado Hemicelulósico	Capacidade volumétrica do Fermentador (L)	X_F (g L^{-1})	S_0 (g L^{-1})	$P_{M\acute{a}x}$ (g L^{-1})	$Y_{P/SM\acute{a}x}$ (g g^{-1})	$Q_{PM\acute{a}x}$ ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	k_La (h^{-1})	Referência
Bagaço de cana	1,5	7,5	82,5	49,1	0,71	0,45	14,7	Rodrigues (2005)
	1,5	13,9	65,0	28,7	0,49	0,24	10	Cunha (2006)
	2,4	9,2	57,6	36,6	0,69	0,28	15	Presente trabalho
	2,4	17,5	47,1	24,0	0,51	0,43	17	Silva (2004)
	16,0	13,3	61,0	39,0	0,67	0,29	15	Presente trabalho
	16,0	6,2	82,1	63,1	0,86	0,60	30	Martínez (2005)
Palha de arroz	1,0	12,0	82,5	52,4	0,65	0,54	18	Silva, Mussatto e Roberto (2006)
Palha de cevada	1,0	9,9	60,0	51,3	0,88	0,71	18	Moraes (2008)
	16,0	8,2	61,3	55,6	0,91	0,77	18	Moraes (2008)
Palha de trigo	2,4	10,5	53,2	28,6	0,55	0,41	15	Canilha (2006)
	16,0	7,7	51,0	30,7	0,65	0,37	15	Canilha (2006)

X_F - Concentração final de células; S_0 - Concentração inicial de xilose; $P_{M\acute{a}x}$ - Concentração final de xilitol; $Y_{P/SM\acute{a}x}$ - Fator de conversão de xilose em xilitol; $Q_{PM\acute{a}x}$ - Produtividade volumétrica de xilitol; k_La - coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio.

Com relação à produtividade volumétrica de xilitol, como pode ser observado na Tabela 5.7, ao se comparar os dados da presente pesquisa com aqueles reportados na literatura, nota-se que os valores deste parâmetro tanto para fermentador de 2,4L e 16L foram de forma geral inferiores independentemente do hidrolisado e valor de k_La empregados. Tal comportamento pode ser devido às características das diferentes matérias-primas empregadas para obtenção dos diferentes hidrolisados, os quais são de

constituição complexa, provavelmente a presença de algum componente no hidrolisado empregado pode ter levado aos baixos valores de produtividade alcançados, uma vez que o valor do coeficiente de transferência de oxigênio empregado no presente trabalho ($k_{La} = 15 \text{ h}^{-1}$) já vem sendo usado, conforme pesquisas anteriores. Roberto, Mancilha e Sato (1999) estudaram o efeito do k_{La} na bioconversão de xilose a xilitol por *C. guilliermondii* em processo de batelada e obtiveram produtividade máxima de $0,52 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ($36,8 \text{ g L}^{-1}$ de xilitol) com k_{La} de 15 h^{-1} em 70h de fermentação, utilizado hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz contendo 62 g L^{-1} de xilose inicial. Ribeiro (1997) também constatou que em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana o k_{La} de 15 h^{-1} proporcionou melhor bioconversão de xilose em xilitol com valor de $Y_{P/S} = 0,71 \text{ g g}^{-1}$, valor este semelhante ao encontrado no presente trabalho para ambos fermentadores.

A formação dos subprodutos etanol e glicerol também foi constatada nos fermentadores de bancada, conforme apresentado na Figura 5.15. Observa-se nesta figura, que para todas as condições houve uma rápida formação destes compostos nas primeiras 24h de fermentação, coincidente com o esgotamento da glicose do meio nestas condições (Figura 5.13B).

Verifica-se que para o caso do etanol, sua máxima formação ($5,12 \text{ g L}^{-1}$) ocorreu na fermentação em fermentador de 2,4L, sendo esta 18,0% e 21,0% superior às máximas observadas nos experimentos em frascos Erlenmeyer e fermentador de 16L, respectivamente. Semelhante ao observado no crescimento celular (Figura 5.13C) nota-se aumento na formação de glicerol em função do aumento de escala. Constatou-se que a máxima formação de glicerol ($3,51 \text{ g L}^{-1}$) ocorreu em fermentador de maior capacidade (16L), sendo esta superior em 1,2 vezes à encontrada no de 2,4L e quase 4 vezes à observada nos frascos agitados. Segundo Nevoigt e Stahl (1997), a formação de glicerol é um mecanismo no qual o micro-organismo evita a perda de água para o meio extracelular, enquanto que, no meio intracelular, tanto a sua formação quanto a do etanol permitem a manutenção do equilíbrio redox, principalmente na ausência de oxigênio. Desta forma, constatou-se mais uma vez que a disponibilidade de oxigênio afetou não somente o consumo de xilose, arabinose, ácido acético e a produção de xilitol, mas também a formação de subprodutos do metabolismo de *C. guilliermondii*.

A formação desses subprodutos durante o metabolismo de xilose por *C. guilliermondii* foi observada nos diferentes hidrolisados, como de bagaço de cana-de-açúcar (RODRIGUES et al., 2003c, MATOS, 2004; CHAUD, 2010) e de casca de aveia (FELIPE et al., 2003). De acordo com Rodrigues et al. (2003c) a formação de glicerol e etanol por *C. guilliermondii* cultivada em bagaço de cana, está associada ao pH, sendo a formação de glicerol favorecida em pH 7,5, e a de etanol em pH 3,5; diferente ao observado para o xilitol, que é favorecido em pH 5,5.

Cunha (2006), não observou a formação de glicerol e etanol durante fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em fermentador de menor capacidade (1,5L). De acordo com este autor, tal fato pode estar relacionado à baixa concentração de glicose no meio, a qual foi rapidamente assimilada pela levedura e provavelmente utilizada para a formação de biomassa, sem que houvesse a biossíntese de etanol, em função de uma maior disponibilidade de oxigênio no início do processo. Com relação à ausência de glicerol o autor sugeriu que uma possível proteção das células foi oferecida pela imobilização das mesmas em matriz de hidrogel empregada nesta pesquisa, as quais proporcionaram uma proteção destas no início da fermentação, principalmente quando estas não estavam adaptadas ao meio de cultivo (hidrolisado), o qual continha compostos tóxicos às células.

Figura 5.15. Formação de etanol (A) e glicerol (B) por *C. guilliermondii* durante fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em frascos Erlenmeyer (■) e em fermentadores de bancada de 2,4L (●) e 16L (▼).

6. CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- ✓ Os procedimentos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana proporcionaram a diminuição das concentrações dos compostos tóxicos, perda de cor e de açúcares;
- ✓ Independentemente do procedimento de destoxificação empregado a maior eficácia destes ocorreu quanto à remoção de fenóis em relação aos demais tóxicos avaliados (ácido acético, furfural, 5-hidroximetilfurfural e íons metálicos);
- ✓ A utilização de resinas de troca iônica foi a metodologia mais eficaz na remoção de todos os tóxicos, bem como proporcionou maior perda de cor e menor de xilose em comparação aos demais procedimentos avaliados;
- ✓ A constituição do polímero vegetal a ser empregado na destoxificação de hidrolisados deve ser levada em consideração, uma vez que a propriedade de destoxificação deste está relacionada ao teor de taninos, a qual no presente trabalho levou a morte celular, que pode ser atribuída a complexação dos taninos com íons metálicos presentes nos hidrolisados;
- ✓ A influência da fonte de carbono empregada no preparo do inóculo foi constatada em função do procedimento de destoxificação empregado em relação ao fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{P/S}$), tendo em vista que com a utilização de resinas este valor foi máximo quando se empregou xilose, enquanto no caso do carvão este valor foi semelhante independentemente da fonte de carbono empregada;
- ✓ Ficou evidente a necessidade de destoxificação do hidrolisado em função dos baixos valores dos parâmetros fermentativos obtidos durante as fermentações do hidrolisado que teve o simples ajuste de pH (controle) e ao mesmo tempo em que se constatou nesta condição maior concentração do subproduto glicerol em resposta ao stress celular, relacionada a maior

concentração de compostos tóxicos presentes neste hidrolisado, semelhante ao observado para o etanol;

✓ A escolha do procedimento de destoxificação a ser avaliado deve ser baseada não somente nos parâmetros fermentativos do processo, mas também em função de características como custo e facilidade de manipulação, as quais foram empregadas na etapa de ampliação de escala do processo utilizando-se fermentadores de 2,4L e 16L. Nesta etapa a escolha da fonte de carbono xilose para o preparo do inóculo foi feita em função de que nestas condições observou-se maior capacidade da levedura como agente destoxificante, como maior assimilação de compostos fenólicos;

✓ A realização das fermentações em frascos Erlenmeyer em comparação às em fermentadores de bancada influenciou a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*, já que a realização dos experimentos em frascos levou aos máximos valores dos fermentativos parâmetros fermentativos avaliados, possivelmente pelas diferenças na disponibilidade de oxigênio, entre frascos e fermentadores, uma vez que este é o parâmetro mais crítico neste bioprocessos;

✓ A ampliação de escala de produção de xilitol em fermentador de 2,4L para 16L foi possível utilizando como critério o k_{La} , uma vez que os valores dos parâmetros fermentativos avaliados ($Y_{P/S\ 2,4L} = 0,69\ g\ g^{-1}$; $\eta_{2,4L} = 74,8\%$ e $Q_{P\ 2,4L} = 0,28\ g\ L^{-1}\ h^{-1}$; $Y_{P/S\ 16L} = 0,67\ g\ g^{-1}$; $\eta_{16L} = 72,6\%$ e $Q_{P\ 16L} = 0,29\ g\ L^{-1}\ h^{-1}$) foram semelhantes.

✓ A continuidade das pesquisas com vistas ao alcance de uma tecnologia alternativa à produção de xilitol por via química, ou seja, o processo biotecnológico deve ser baseada em pesquisas que contemplem a avaliação do efeito do oxigênio sobre este bioprocessos quando da utilização de reatores de maior escala, levando-se em consideração as particularidades do processo como características da matéria-prima, condição de hidrólise e suplementação nutricional.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho e dando continuidade aos estudos de ampliação de escala da produção biotecnológica de xilitol por *Candida guilliermondii* FTI 20037, sugere-se:

- ✓ Estudar outros métodos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico (destoxificação biológica ou por membrana), buscando diminuir as perdas quanto ao teor de xilose e no volume final do hidrolisado, ocasionadas pela utilização dos métodos convencionais, como a alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado e no caso das resinas de troca iônica quanto ao custo desta metodologia;
- ✓ Estudar detalhadamente a influência da agitação e da aeração em fermentador de menor capacidade e estabelecer condição otimizada;
- ✓ Prosseguir os estudos em fermentadores de maior escala;
- ✓ Avaliar a produção de xilitol por *C. guilliermondii* geneticamente modificada, com o intuito de aumentar o valor de produtividade volumétrica de xilitol.

REFERÊNCIAS

ACQUAQUÍMICA. **Produtos**, Disponível em: <http://www.seta-sa.com.br/site/aquaquimica/produtos.php> Acesso em: 2 fev. 2010.

ACTIVBRAS INDUSTRIAL LTDA. **Generalidades do carvão ativado**. Disponível em: <http://www.activbras.com.br/generalidades.html> Acesso em: 13 fev. 2011.

AFFLECK, R.P. **Recovery of xylitol from fermentation of model hemicellulose hydrolysates using membrane technology**. 2000. Dissertação - Faculty of the Virginia, Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 2000.

ÁGUA ONLINE. **Cresce o uso de derivados do tanino**, Disponível em: <http://www.aguaonline.com.br/materias.php?id=2851&cid=2&edicao=438> Acesso em: 12 mar. 2010.

AGUIAR JR, W.B. et al. Growth model and prediction of oxygen transfer rate for xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v.12, p.49-59, 2002.

AHMEDNA, M.; MARSHALL, W. E.; RAO, R. M. Production of granular activated carbons from agricultural by-products and evaluation of their physical, chemical and adsorption properties. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 113-123, 2000a.

AHMEDNA, M.; MARSHALL, W. E.; RAO, R. M. Surface properties of granular activated carbons from agricultural by-products and their effects on raw sugar decolorization. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 103-112, 2000b.

ALANEN, P.; ISOKANGAS, P.; GUTMANN, K. Xylitol candies in caries prevention: results of a field study in Estonian children. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v.28, p.218-224, 2000.

ALVES, L.A. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70-72, p.89-98, 1998.

ANNIES. **Annies Malborough Ltd. Xylitol demand**. Disponível em: <http://www.annies.co.nz/xylitoldemand.html> Acesso em: 07 mar. 2011.

ARRUDA, P.V. et al. Evaluation of hexose and pentose in pre-cultivation of *Candida guilliermondii* on the key enzymes for xylitol production in sugarcane hemicellulosic hydrolysate. **Biodegradation**, 2010. DOI 10.1007/s10532-010-9397-1

ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. Role of glycerol addition on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Current Microbiology**, v.58, p.274-278, 2009.

BANCO CENTRAL DO BRASIL. Disponível em: <http://www4.bcb.gov.br/pec/taxas/batch/taxas.asp?id=txdolar> Acesso em: 16 fev. 2011.

BAART, G.J.E. et al. Scale-up for bulk production of vaccine against meningococcal disease. **Vaccine**, v.25, p.6399-6408, 2007.

BANDAIPHET, C.; PRASERTSAN, P. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, kLa in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae*. **Carbohydrate Polymers**, v.66, p.216-228, 2006.

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. et al. Screening of yeast 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.

BICHO, P.A. et al. Introduction of xilose 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, 1998.

BIOETANOL de cana-de-acúcar: energia para o desenvolvimento sustentável / organização BNDES e CGEE. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. 316 p. Disponível em: <http://www.bioetanoldecana.org> Acesso em: 12 fev. 2011.

BOBLETER, O. Hydrothermal degradation of polymers derived from plants. **Prog. Polym. Sci.**, v.19, p.797–841, 1994.

BRANCO, R.F. **Produção enzimática de xilitol utilizando sistema de regeneração de coenzima como alternativa às vias química e microbiológica de obtenção**. 2010. 133f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2010.

BRANCO, R.F. et al. Profiles of xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylitol production under different oxygen transfer volumetric coefficient values. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 84, p. 326–330, 2009.

BRUINENBERG, P.M. et al. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.19, n.4, p.256-260, 1984.

CALDERBANK, P.H.; MOOYOUNG, M.B. The power characteristic of agitators for the mixing of Newtonian and nonNewtonian fluids. **Trans. Inst. Chem. Eng.**, v.39, p.337–347, 1961.

CAMILOTTI, F. et al. Acúmulo de metais pesados em cana-de-açúcar mediante a aplicação de lodo de esgoto e vinhaça. **Engenharia Agrícola**, v.27, n.1, p.284-293, 2007.

CANA-de-açúcar: altos impactos socioambientais – 26/02/2010. Portal Mercado Ético. Disponível em: <http://mercadoetico.terra.com.br/arquivo/cana-de-acucar-altos-impactos-socioambientais/> Acesso em: 8 abr. 2010.

CÂNDIDO, E.J. et al. Aproveitamento da palha de cevada para obtenção biotecnológica de xilitol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA TECNOLOGIA EM RESÍDUO E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL, 2004, Florianópolis. **Libro de Resumos ICTR**. 2004, Florianópolis, p.30.

CANNAS, A. Tannins: Fascinating but sometimes dangerous molecules. Cornell University Department of Animal Science. Disponível em: <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/tannin.html> Acesso em: 23 mar. 2011.

CANETTIERI, E.V.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; CARVALHO JÚNIOR, J.A. Tratamento químico de resíduos de *Eucalyptus grandis* com ácido diluído. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14, 2003, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis, 2003. CD-ROM.

CANETTIERI, E.V. **Obtenção dos parâmetros e estudo cinético da hidrólise ácida dos resíduos florestais de eucalipto**. 2004. 103f. Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Guaratinguetá, 2004.

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.

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

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA e SILVA, J.B. Xylitol bioproduction from wheat straw: hemicellulose hydrolysis and hydrolyzate fermentation. **J. Sci. Food Agric.**, v.86, p.1371–1376, 2006.

CANILHA, L. et al. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.333-336, 2008.

CANILHA, L. et al. Ethanol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using *Pichia stipiti*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.161, p.84-92, 2010.

CARDOSO, M.G. **Produção de aguardente de cana**. 2ª ed. Lavras, MG, UFLA, 2006.

CARVALHEIRO, F. et al. Evaluation of detoxification methods on brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. **Process Biochemistry**, v.40, p.1215-1223, 2005.

CARVALHO JUNIOR, 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. **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), Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2004.

CENBIO - Centro Nacional de Referência em Biomassa. 2010. Disponível em: www.cenbio.org.br. Acesso em: mar. 2010.

CHANDEL, A.K. et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v.98, p.1947-1950, 2007.

CHANDEL, A.K.; SINGH, O.V.; RAO, L.V. Biotechnological applications of hemicellulosic derived sugars: State-of-the-art. In: O.V. Singh and S.P. Harvey (eds.) **Sustainable Biotechnology: Renewable Resources and New Perspectives**. Netherland: Springer Verlag, 2010, pp. 63-81.

CHANDEL, A.K. et al. Bioconversion of pentose sugars into ethanol: A review and future directions. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v.6, n.1, p.8-20, 2011.

CHAUD, L. C. S. et al. Comportamento das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado com polímero vegetal. In: SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 9, 2009, Maringá. **Programa e Resumos**. 2009. p. 96-96.

CHAUD, L. C. S. **Avaliação do carvão vegetal ativado e polímero vegetal na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para a produção biotecnológica de xilitol**. 2010. 97p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, 2010.

CHENG, H. et al. Xylitol production from xylose mother liquor: a novel strategy that combines the use of recombinant *Bacillus subtilis* and *Candida maltose*. **Microbial Cell Factories**, v.10, n.5, p.1-12, 2011. DOI: 10.1186/1475-2859-10-5.

CHENG, K.K. et al. Strain isolation and study on process parameters for xylose-to-xylitol bioconversion. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 24, n.1, p.1606-1611, 2011. DOI: 10.2478/v10133-010-0013-7

CHIANG, C.; KNIGHT, S.S. Metabolism of D-xylose by moulds. **Nature**, v.188, n.4744, p.78-81, 1961.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **3º Levantamento cana-de-açúcar - Safra 2010/2011** - Disponível em:

http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_09_14_50_boletim_cana_3o_lev_safr_2010_2011..pdf Acesso em: 12 fev. 2011.

CONVERTI, A. et al. Wood hydrolysis and hydrolysate detoxification for subsequent xylitol production. **Chemical Engineering and Technology**, v.23, n.11, p.1013-1020, 2000.

CORREA, P.E.O. et al. Avaliação do fator de concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar no crescimento e consumo de açúcares por *C. guilliermondii*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA – INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1995. São Carlos, **Anais...** São Carlos: Associação Brasileira de Engenharia Química (ABEQ), p.26-29, 1995.

COSIDINE, D. M. **Chemical and process technology**. Encyclopedia New York: McGraw-Hill, 1974.

COUTINHO, A. R.; BARBIERI, F. C.; PAVANI, P.A. Preparação de carvões ativados a partir de fibras de celulose. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE ADSORÇÃO, Florianópolis, 2, 2000. **Anais...** p. 139-144, 2000.

CULBERT, S.J. et al. Oral xylitol in American adults. **Nutrition Research**, v.6, n.8, p.913-922, 1986.

CUNHA, M.A.A. **Bioprodução de xilitol a partir de bagaço de cana-de-açúcar em sistemas com células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico**. 2006. 105f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Universidade de São Paulo. Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2006.

CURRELI, N. et al. Complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw. **Process Biochemistry**, v.37, p.937-941, 2002.

DAHIYA, J.S. Xylitol production by *Petromyces albertensis* grown medium containing D-xylose. Canadian. **Journal of Microbiology**, v.37 p.14-18, 1991.

DE FAVERI, D. et al. Optimization of xylitol recovery by crystallization from synthetic solutions using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v.61, p.407-412, 2004.

DECHOW, F. J. **Separation and Purification Techniques in Biotechnology**. New Jersey: Noyes Publications, 1989, 490p.

DEKKER, R.F.H. The enzymatic hydrolysis of biomass. In: SEMINÁRIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 2, 1985. Maringá, Universidade Estadual de Maringá, **Anais**. 1985, p.11-13.

DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces uromonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p.220–225, 1996.

DÖNMEZ, G., AKSU, Z. Bioaccumulation of copper (II) and níquel (II) by the non-adapted and adapted growing *Candida guilliermondii*. **Water Research**, v.35, n.6, p.1425-1432, 2001.

DRAGONE, S.I.M. **Aproveitamento integral de subproduto da indústria cervejeira em processos químicos e biotecnológicos**. 2007. 173p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, 2007.

DUNAYER, E.K.; GWALTNEY-BRANT, S.M. Acute hepatic failure and coagulopathy associated with xylitol ingestion in eight dogs. **JAVMA**, v.229, n.7, p.1113-1117, 2006.

ELLWOOD, K.C. et al. Biomarkers used to access the effect of dietary xylitol or sorbitol in the rat. **Nutrition Research**, v.19, n.11, p.1637-1648, 1999.

EMODI, A. Xylitol: It's properties and food applications. **Food Technology**, p.28-32, 1978.

ENGENHARIA QUÍMICA: Rota Enzimática. **Pesquisa Fapesp online**. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/index.php?art=4079&bd=1&pg=1&lq=> Acesso em: 20 mar. 2010a.

ENGENHARIA QUÍMICA: Rota Enzimática. **Pesquisa Fapesp online**. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/index.php?art=4079&bd=1&pg=2&lq=> Acesso em: 20 mar. 2010b.

FELIPE, M.G.A. et al. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v.35, n.3, p.171-177, 1995.

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

FELIPE, M.G.A. et al. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, v.13, p.11-14, 1997b.

FELIPE, M.G.A. Biotechnological Production of Xylitol from Lignocellulosic Materials. In: **Lignocellulose Biodegradation**. New York: American Chemical Society, 2004. p.300-315.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, ultraestrutura, reactions**. Berlim: Walter de Gruyter, 1989.

FERREIRA, A.S.; BARBOSA, N.R.; SILVA, S.S. In vivo xylitol primary dermal irritation and phototoxicity evaluation. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 28, n.2, p.192-195, 2009.

FLORES, E.R.; PÉREZ, F.; TORRE, M. Scale-up of *Bacillus thuringiensis* fermentation based on oxygen transfer. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.83, n.6, p.561-564, 1997.

FONSECA, B.G. **Destoxificação biológica de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar empregando as leveduras *Issatchenkia occidentalis* e *Issatchenkia orientalis***. 2009. 110p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, 2009.

FRANCESCHIN, G. et al. Conversion of rye straw into fuel and xylitol: a technical and economical assessment based on experimental data. **Chemical Engineering Research and Design**, 2011. In press. DOI:10.1016/j.cherd.2010.11.001.

FRAZER, F.R.; McCASKEY, T.A. Wood hydrolysate treatments for improved fermentation of wood sugars to 2,3 butanodiol. **Biomass**, v.18, p.31-42, 1989.

GABER, R.F. Molecular genetics of yeast ion transport. **International Review of Cytology**, v.137, p.299-353, 1992.

GALACTION, A.I. et al. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeast and fungus broths. **Biochem. Eng. J.**, v.20, p.85-94, 2004.

GALBE, M.; ZACCHI G. A review of the production of ethanol from softwood, **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 59, p.618- 628, 2002.

GARCÍA, J.F. et al. Xylitol production from olive-pruning debris by sulphuric acid hydrolysis and fermentation with *Candida tropicalis*. **Holzforschung**, v. 65, p. 59–65, 2011. DOI 10.1515/HF.2010.113

GARCÍA, N. **Xilitol: Saborea el éxito que este prometedor endulcorante representa, y satisface um continente completo**. 2005. Disponível em: <http://www.entrepreneurespanol.com/pagina.hts?N=14614> Acesso em: 13 jan. 2011.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial process: An overview. **Biotech. Adv.**, v.27, p.153-176, 2009.

GINORIS, Y.P. **Avaliação de tratamentos do hidrolisado de eucalipto para a produção biotecnológica de xilitol**. 2001. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnología Industrial), Departamento de Biotecnología, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2001.

GÍRIO, F.; PELICA, F.; COLAÇO, M.T. Characterization of xylitol dehydrogenase from *Debaryomyces hansenii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.56, p.79-87, 1996.

GOUVEIA, E.R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n.6, p.1500-1503, 2009.

GRANSTRÖM, T.; IZUMORI, K.; LEISOLA, M. A rare sugar xylitol. Part II: Biotechnological production and future applications of xylitol. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.74, p.273–276, 2007. DOI 10.1007/s00253-006-0760-4

GREENBANK, M.; SPOTS, S. Effect of starting material on activated carbon characteristics and performance. **Industrial Water Treatment**, jan/feb, p. 19-27, 1995.

GRILLAUD, M. et al. Les polyols en odontologie pédiatrique: intérêt du xylitol. **Archives de Pédiatrie**, v.12, n.7, p.1180-1186, 2005.

HAHN-HÄGERDAL, B. et al. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, p.933-943, 1994.

HALLBORN, J. et al. A short-chain dehydrogenase gene from *Pichia stipitis* having D-arabitol dehydrogenase activity. **Yeast**, v.11, p.839-847, 1995.

HAMELINCK, C.N.; van HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-middle- and long-term, **Biomass Bioenergy**, v.28, p.384-410, 2005.

HARAYAMA, S.; KOK, M.; NEIDLE, E.L. Functional and evolutionary relationships among diverse oxygenases. **Annual Review of Microbiology**, v.46, p.565-601, 1992.

HARLAND, C.E. **Ion Exchange**: theory and practice. 2nd Edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1994, 285 p.

HARWOOD, C.S; PARALES, R.E. The β -ketoadipate pathway and the biology of self-identity. **Annu. Ver. Microbiol.**, v.50, p.553-590, 1996.

HERRERA, A. et al. Effect of the hydrochloric acid concentration on the hydrolysis of sorghum straw at atmospheric pressure. **Journal of Food Engineering**, v.63, n.1, p.103-109, 2004.

HUANG, C.F. et al. Development of a yeast strain for xylitol production without hydrolysate detoxification as part of the integration of co-product generation within the lignocellulosic ethanol process. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 3322–3329, 2011.

HUBBARD, D.W.; LEDGER, S.E.; HOFFMAN, J.A. Scaling-up aerobic fermentation which produce non-newtonian, viscoelastic broths. In: **Advances in Bioprocess Engineering**. GALINDO, E. & RAMIREZ O. T. (eds) pp. 95-101, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 1994.

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

JOINT expert committee on food additives. **Chapter 9: Special considerations.** Disponível em: http://www.who.int/ipcs/food/special_considerations.pdf. Acesso em: 21 ago. 2009.

JIN-SEO, C. **Xylitol sweetener to be mass-produced via microbe process.** Korea: The Korea Times, 2007. Disponível em: http://www.koreatimes.co.kr/www/news/tech/2010/04/129_9089.html Acesso em: 21 abr. 2010.

KANDELMAN, D. Role of xylitol other polyols in dental preventive programs targeted for high caries risk populations. **Journal Odonto. Stomatol.**, v.10, n.2, p.93-102, 2003.

KASTNER, J.R.; EITEMAN, M.A.; LEE, S.A. Glucose repression of xylitol production in *Candida tropicalis* mixed-sugar fermentations. **Biotechnology Letters**, v.23, p.1663-1667, 2001.

KAWASE, Y.; HALARD, B.; MOOYOUNG, M. Liquid phase mass transfer coefficients in bioreactors. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 39, p.1133–1140, 1992.

KIM, J.H.; RYU, Y.W.; SEO, J.H. Analysis and optimization of a two-substrate fermentation for xilitol production using *Candida tropicalis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.22, p.181-186, 1999.

KO, S.B.; RHEE, C.H.; KIM, J.H. Enhancement of xilitol productivity and yield using a xylitol dehydrogenase gene-disrupted mutant of *Candida tropicalis* under fully aerobic conditions. **Biotechnology Letters**, v.28, n.15, p.1159-1162, 2006.

KWON, S.G. et al. Increase of xylitol productivity by cell-recycle fermentation of *Candida tropicalis* using submerged membrane bioreactor. **J. Biosci. Bioeng.**, v.101, p.13–18, 2006.

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v.48, p. 3713–3729, 2009.

LARSSON, S. et al. Comparison of different methods for detoxification of lignocellulosic hydrolysates os spruce. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.77-79, p.91-103, 1999.

LARSSON, S. et al. Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Sacharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84-86, p.617-631, 2000.

LAWFORD, H.D.; ROUSSEAU, J.D. Effects of pH acetic acid on glucose and xylose metabolism by a genitically engineered ethanologeni *Escherichia coli*. **Applied Biochesmistry and Biotechnology**, v.39/40, p. 301-322, 1993.

LE DUY, A.; ZAJIC, J.E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.15, p.805-810, 1973.

LEE, H.; SOPHER, C.R.; YAU, K.Y.F. Induction of xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities on mixed sugars in *Candida guilliermondii*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.66, p.375-379, 1996.

LEE, W.J.; RYU, Y.W.; SEO, J.H. Characterization of two substrate fermentation process for xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xilose reductase gene. **Process Biochemistry**, v.35, p.1199-1203, 2000.

LEE, W.J. et al. Effects of xylose reductase activity on xylitol production in two-substrate fermentation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.13, n.5, p.725-730, 2003.

LIMA, L.H. et al. Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 65, n.6, p. 734-738, 2004.

LIU, T. et al. Scale-up of L-lactic acid production by mutant strain *Rhizopus sp.* MK-96-1196 from 0,003 m³ to 5 m³ in airlift bioreactors. **J. Bioscience Bioeng.**, v.101, p.9-12, 2006.

MÄKINEN, K.K. Xylitol: The sugar that prevents tooth decay. **The Futurist**, v.10, n.3, p.135-139, 1976.

MÄKINEN, K.K. Dietary prevention of dental caries by xylitol - clinical effectiveness and safety. **Journal of Applied Nutrition**, v.44, n.1, p.6-28, 1992.

MÄKINEN, K.K. Can the pentitol-hexitol theory explains the clinical observations made with xylitol? **Medical Hypotheses**, v.54, n.4, p.603-613, 2000.

MÄKINEN, K.K. et al. Comparison of erythritol and xylitol saliva stimulants in the control of dental plaque and *Mutans streptococci*. **Caries Research**, v.35, n.2, p.129-135, 2001.

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**. 1973, London.

MAPA – Ministério Da Agricultura, Pecuária E Abastecimento. AGE – Assessoria de Gestão Estratégica. **Projeções do agronegócio: Brasil 2008/09 a 2018/19**. Brasília, 2009. 17 p. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/portal/page?_pageid=33,1299841&_dad=portal&_sc_hema=PORTAL Acesso em: 12 fev. 2011.

MARTÍNEZ, E.A. **Estudo do processo de cristalização de xilitol obtido por via fermentativa**. 2005. 165p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial),

Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

MARTÍNEZ, E.A. et al. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. **Biotechnology Progress**, v.17, p.287-293, 2001.

MARTÍNEZ, E.A.; SILVA, S.S; FELIPE, M.G.A. Effect of oxygen volumetric transfer coefficient on xylitol production from sugarcane hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 633-641, 2000.

MARTON, J.M. **Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para obtenção biotecnológica de xilitol**. 2002. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2002.

MARTON, J.M. **Avaliação da performance de carvão ativo e resinas de troca iônica no desenvolvimento de um sistema de tratamento que minimize a toxicidade do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana à obtenção de xilitol**. 2005. 131p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 2005.

MARTON, J.M. et al. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.23, n.1, p.9-21, 2006.

MASAKO, K. et al. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. **Dermatological Science**, v.38, p.197-205, 2005a.

MASAKO, K. et al. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 2. A study to assess the effect of a cream containing farnesol and xylitol on atopic dry skin. **Dermatological Science**, v.38, p.207-213, 2005b.

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) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2004.

MATTILA, P.T.; KNUUTTILA, M.L.E.; SVANBERG, M.J. Dietary xylitol supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin-diabetic rats. **Metabolism Clinical and Experimental**, v.47, p.578-583, 1998.

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.54, p.548-551, 2005.

MAVITUNA, F. Strategies for bioreactor scale-up. In: Moreira, A.R.; Wallace, K.K. editors. **Computer and information science application in bioprocess engineering**. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1996.

McWILLIAMS, R.C.; van WALSUM, G.P. Comparison of aspen wood hydrolysates produced by pretreatment with liquid hot water and carbonic acid, **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 98-100, n.1-9, p.109-121, 2002.

MELAJA, J.; HÄMÄLÄINEN, L. **Process for Making Xylitol**. US n.4008285. 15 fev. 1977.

MENDHAM, J. et al. **Vogel análise química quantitativa**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2002, p. 139.

MIURA, M. et al. Hydrolysis of *Sasa senanensis* culm with dilute sulfuric acid for production of a fermentable substrate. **J. Mater. Cycles Waste Manag.**, v.13, n.1, p.80-83, 2011. DOI 10.1007/s10163-010-0310-0.

MIURA, S. et al. Optimization and scale-up of L-lactic acid and fermentation by mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 in airlift bioreactors. **J. Bioscience Bioeng.**, v.96, p.65-69, 2003.

MORAES, E.J.C. **Estudo da viabilidade econômica da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada**. 2008. 157p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2008.

MORITA, T.A.; SILVA, S.S.; MAUGERI, F. Estudo do processo integrado de produção de xilitol por fermentação. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14, **Anais...**, 2003. CDRom.

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.96, p.673–686, 2005.

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

MUSSATO, I.S.; ROBERTO, I.C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v.93, p.1-10, 2004.

MUSSATO, I.S.; ROBERTO, I.C. Evaluation of nutrient supplementation to charcoal-treated and untreated rice straw hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 3, p. 493-498, 2005.

MUSSATO, I.S.; ROBERTO, I.C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 28, p.34-39, set/out 2002.

NÁHLÍK, J. et al. Model identification and physiological control of xylitol production using *Debaryomyces hansenii*. **Process Biochemistry**, v.38, n.12, p.1695-1705, 2003.

NÁPOLES, I. et al. Application of ion-exchange resins to upstream processing of sugar cane bagasse hidrolisate for its utilization in bioprocesses. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON BIOTCHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, 2, **Abstrcats**, 1998, Porto.

NASCIMENTO, R.P. **Estudo da produção de endoxilanases por *Streptomyces malaysiensis* AMT-3 utilizando resíduos agro-industriais**. 2006. 164p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2006.

NEIVOGT, E.; STAHL, U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 21, p.231-241, 1997.

NILVEBRANT, N.; REIMANN, A.; LARSSON, L.J. Detoxification on lignocellulose hydrolysates with ion exchange resins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.91-93, p.35-49, 2001.

NOZELLA, E.F. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes**. 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

ODUMERO, J.A. et al. Effect of heat and ethanol stress on the viability of a *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis) brewing yeast strain during fermentation of hight gravity wort. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.10, p.111-116. 1992.

OKONKOWSKI, J. et al. Development of a robust, versatile and scalable inoculums train for the production of a DNA vaccine. **Biotechnol. Prog.**, v.21, n.4, p.1038-1047, 2005.

ONISHI, H.; SUZUKI, T. The production of xylitol, L-arabitol and ribitol by yeasts. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.30, n.11, p.1139-1144, 1966.

ONISHI, H.; SUZUKI, T. Microbial production of xylitol from glucose. **Applied Microbiology**, v.18, n.6, p. 1031-1035, 1969.

PAIVA, K.B.S.; MENEZES, M.L. Avaliação do emprego dos adsorventes: carvão ativo, chromosorb w e membranas C₁₈ na preparação de amostras de ar para determinação de D-aletrina em ambientes fechados. **Eclética Química**, v.28, n.1, p. 97-103, Araraquara, 2003.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: Inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, 74, p.17-24, 2000a.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 25-33, 2000b.

PARAJÓ, J.C.; ALONSO, J.L.; SANTOS, V. Kinetics of eucalyptus wood fraction in acetic acid-HCl-water media. **Bioresource Technology**, v.51, p.153-162, 1995.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v.65, p.191-201, 1998a.

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

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Charcoal adsorption of wood hydrolysate for improving their fermentability: Influence of the operational conditions. **Bioresource Technology**, v.57, p.179-185, 1996a.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Study of charcoal adsorption for improving the production of xylitol from wood hydrolysates. **Bioresource Technology**, v.16, p.39-43, 1996b.

PEPPER, T.; OLINGER, P.M. Xylitol in sugar-free confections. **Food Technology**, v.42, n.10, 1988.

PEREZ, J.F.; SANDALL, O.C. Gas absorption by nonNewtonian fluids in agitated vessels, **AIChE J.**, v.20, p.770-775, 1974.

PERRY, R.H.; GREEN, D.W. **Perry's Chemical Engineering Handbook**. 7th ed. New York: McGraw-Hill, 1977. 2460p.

PESSOA JÚNIOR, A.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Acid hidrólisis of hemicellulose from sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.14, n.03, p. 291-297, 1997.

PFEIFER, M.J. et al. Effect of culture conditions on xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57/58, p.423-430, 1996.

PIRT, S.J. **Principles of microbe and cell cultivation**. New York: Blackwell Scientific, 1975, p.260-268.

PISCITELLI, C.M.; DUNAYER, E.K.; AUMANN, M. **Xylitol toxicity in dogs**. Compendium: Continuing Education for Veterinarians. 2010. Disponível em: www.vettechjournal.com/Portals/0/PV0210_piscitelli_CE.pdf Acesso em: 02 de fev. 2011.

PIVETTA, L.R.; ARRUDA, P.V.; FELIPE, M.G.A. Effect of detoxification procedures of the sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate to the xylitol

production by *Candida guilliermondii*. In: BRAZILIAN MEETING ON CHEMISTRY OF FOOD AND BEVERAGES, 7, 2008, Lorena. **Book of Abstracts**, p. 287, Lorena, 2008.

PRAKASHAM, R.S.; SREENIVAS RAO, R.; HOBBS, P.J. Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy**, v.3, n.1, p.8-36, 2009.

PUC-Rio - Certificação Digital Nº 0412778/CA. **Eletroquímica na nanoescala** (Figuras). Disponível em: www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0412778_08_cap_02.pdf Acesso em: 13 fev. 2011.

PUROLITE. **Corn Sweetener refining with ion exchanger resins**. Documento publicado, 1998. Disponível em: http://www.purolite.com/customized/uploads/pdfs/purolite_corn_sweetener_guide_011807.pdf Acesso em: 15 ago. 2010.

RIBEIRO, J.D. **Otimização da taxa de transferência de oxigênio na produção de xilitol por *Candida guilleirmondii* FTI20037**. 1997. 73f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 1997.

RIBEIRO, M.H.L. et al. Kinetics of selective adsorption of impurities from a crude vegetable oil in hexane to activated earths and carbons. **Eur. Food Res. Technol.**, v.213, p.132–138, 2001.

ROBERTO, I.C. et al. Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*, **Biotechnology Letters**, v.16, n.11, p.1211-1216, 1994.

ROBERTO, I.C. et al. Influence of media composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. **Biotechnological Letters**, v.17, p.1223-1228, 1995.

ROBERTO, I.C. et al. Utilization of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource Technology**, v.36, n.3, p.271-275, 1991.

ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M. e SATO, S.: Influence of k_La on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. **Bioprocess Eng.**, v.21, p.505–508, 1999.

ROCHA, G. J. M. et al. A fast and accurate method for determination of cellulose and polyoses by HPLC. In: PROCEEDINGS OF THE FIFTH BRAZILIAN SYMPOSIUM ON THE CHEMISTRY OF LIGNINS AND OTHER WOOD COMPONENTS, v. 6, p. 3-8, 1997.

RODRIGUES, F.A.; GUIRARDELLO, R. Evaluation of a sugarcane bagasse acid hydrolysis technology. **Chem. Eng. Technol.**, v.31, n.6, p.883-892, 2008.

RODRIGUES, J.A. et al. Prevention of crown and root caries in adults. **Periodontology** **2000**, v.55, p.231–249, 2011.

RODRIGUES, R.C.L.B. **Avaliação das condições de concentração a vácuo do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana para a produção do xilitol**. 1999. 109p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, 1999.

RODRIGUES, R.C.L.B. et al. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and non-volatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate 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. et al. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using controlled vacuum evaporation process variables. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1231-1237, 2003a.

RODRIGUES, R.C.L.B. et al. Crescimento de *Candida guilliermondii* durante cultivo descontínuo em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana: efeito do O₂. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14, 2003, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis, 2003b. CD-ROM.

RODRIGUES, R.C.L.B. et al. Batch xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate at controlled pH values. **Bioprocess Biosystem. Eng.**, v.26, p.103-107, 2003c.

RODRIGUES, R.C.L.B. **Influência da disponibilidade de oxigênio no processo descontínuo de obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana**. 2005. 246p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Faculdade Inter-Unidades, USP/BUTANTÁ/IPT, São Paulo, 2005.

RODRIGUES, R.C.L.B. et al. Enhanced xylitol production by precultivation of *Candida guilliermondii* cells in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Current Microbiology**, v.53, p.53-59, 2006.

RODRIGUES, R.C.L.B. et al. Scale-up of diluted sulfuric acid hydrolysis for producing sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate (SBHH). **Bioresource Technology**, v.101, p.1247-1253, 2010.

RODRIGUES, R.C.L.B. et al. Fermentation kinetics for xylitol production by a *Pichia stipitis* D-xylulokinase mutant previously grown in spent sulfite liquor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.148, n.1-3, p.199-209, 2011.

ROKEM, J.F.; ZOMER, E. Scale up of the production of xylitol dehydrogenase and alcohol dehydrogenase from *Pachysolen tannophilus* grown on xylose. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.26, p.231-233, 1987.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003. DOI 10.1007/s10295-003-0049-x.

SAJJAN, U. et al. A novel model to study bacterial adherence to the transplanted airway: inhibition of *Burkholderia cepacia* adherence to human airway by dextran and xylitol. **Journal of Heart and Lung Transplantation**, v.23, n.12, p.1382-1391, 2004.

SAKATO, N. **Fermentation and biochemical engineering handbook**: principles, process design, and equipment. 2nd ed. New York: Noyes publications, 1997, cap. 1, p.2, 1997.

SANCHEZ, L.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbiol Technology**, v.10, p.315-318, 1988.

SÁNCHEZ, O.J.; CARDONA, C.A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v.99, p.5270–5295, 2008.

SANTOS, M.C.R. **Quantificação e remoção de íons de cobre em aguardente de cana-de-açúcar**. 2009. 65p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto de Tecnologia, São Caetano do Sul, 2009.

SANTOS, T.M.A. **Estudo da recuperação do xilitol produzido por fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando zeólitas**. 2004. 99p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2004.

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

SARROUH, B.F.; BRANCO, R.F.; SILVA, S.S. Biotechnological production of xylitol: Enhancement of monosaccharide production by post-hydrolysis of dilute acid sugarcane hydrolysate. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.153, p. 163-170, 2009.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannis. **Phytochemistry**, v.30, p.3875-3883, 1991.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e processos fermentativos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biотecnologia Industrial**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001, v.2, p.179-192.

SENE, L. et al. Effect of environmental conditions on xylose reductase and xylitol dehydrogenase production in *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84-86, p.371-380, 2000.

SENE, L. et al. Metabolic Study of the Adaptation of the Yeast *Candida guilliermondii* to Sugarcane Bagasse Hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57, p.738-743, 2001a.

SENE, L. et al. Preliminary kinetic characterization of xylose reductase and xylitol dehydrogenase extracted from *Candida guilliermondii* FTI 20037 cultivated in sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.91-93, p.671-680, 2001b.

SENE, L. et al. Evaluation of sorghum straw hemicellulosic hydrolysate for biotechnological production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2011. In press.

SHEN, P. et al. 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.

SHI, N.Q. et al. Characterization and complementation of a *Pichia stipitis* mutant unable to grow on D-xylose or L-arabinose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.48-86, p.201-216, 2000.

SHIRBHATE, D.V. **Xylitol Technology**, p.1-20. Out. 2008 Disponível em: www.scribd.com/doc/7314491/Xylitol-Technology. Acesso em: 10 mar., 2010.

SILVA, C.J.S.M.; MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Study of xylitol production by *Candida guilliermondii* on a bench bioreactor. **Journal of Food Engineering**, v.75, n.1, p. 115-119, 2006.

SILVA, D.D.V. **Efeito do ácido acético no metabolismo de xilose de *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar**. 2001. 73p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2001.

SILVA, D.D.V.; BANHE, A. A.; FELIPE, M.G.A. . Efeito da fonte de carbono no cultivo do inóculo de *Candida guilliermondii* para a obtenção de xilitol. In: III Encontro de Pós Graduação da Universidade do Vale do Paraíba, 3, 2003, São José dos Campos/SP. **Anais...** 1 CD-Rom., 2003.

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) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2004.

SILVA, D.D.V. et al. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic materials. **Bioforum Europe**, v.8, n.3, p.56-57, 2004a.

SILVA, D.D.V. et al. Inhibitory effect of acetic acid on bioconversion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.248-254, 2004b.

SILVA, D. D. V. et al. Evaluation of inoculum of *Candida guilliermondii* grown in presence of glucose on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities and xylitol production during batch fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121, n.12, p.427-437, 2005.

SILVA, D.D.V.; FELIPE, M.G.A. Effect of glucose:xylose ratio on xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities from *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.81, p.1294-1300, 2006.

SILVA, D. D. V. et al. Improvement of biotechnological xylitol production by glucose during cultivate of *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, p. 207-215, 2007.

SILVA, O.O. **Produção de xilitol a partir de bagaço de abacaxi (*Ananas comosus* L. merril)**. 2011. 137p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, 2011.

SILVA, S.S. et al. Use of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate for lactic acid production. In: EUROPEAN CONFERENCE BIOMASS FOR ENERGY AND INDUSTRY, 5, 1990, **Abstracts**, v.12, p.1005-1009, 1990.

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. et al. Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of D-xylose-xylitol-fermenting *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v.36, n.3, p.187-191, 1996.

SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M. Factors that affect the biosynthesis of xylitol by xilose-fermentation yeasts – A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70/72, p.331- 339, 1998.

SILVA, T.F.M. **Avaliação de polímeros de origem vegetal no tratamento de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de xilitol**. 2006. 73p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, 2006.

SILVA, T.S.S. da. **Estudo de tratabilidade físico-química com uso de taninos vegetais em água de abastecimento e esgoto**. 1999. Dissertação (Mestrado em Saúde pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 1999.

SILVA, V.F.N. **Estudos de pré-tratamento e sacarificação enzimática de resíduos agroindustriais como etapas no processo de obtenção de etanol**

celulósico. 2009. 116p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Escola de Engenharia de Lorena, 2009.

SINGH, A.; MISHRA, P. Microbial pentose utilization: current applications in biotechnology. In: **Progress Industrial Microbiology**. Amsterdam, 1995, v.33, 401p.

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.

SREENIVAS RAO, R.S. et al. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. **Bioresource Technology**, v.97, p.1974-1978, 2006.

STANBURY, P.F.; WHITAKER, A.; HALL, S.J. **Principles of fermentation Technology**. Butter Worth Heinemann, 1995, 2ª edição, p.269-272.

SUN, J.X. et al. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v.56, p.195-204, 2004.

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

SUZUKI, S. et al. Novel enzymatic method for the production of xylitol from D-arabitol by *Gluconobacter oxydans*. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v.66, n.12, p.2614-2620, 2002.

SUZUKI, T. et al. Expression of *xyrA* gene encoding for D-xylose reductase of *Candida tropicalis* and production of xylitol in *Escherichia coli*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, p.280-284, 1999.

SWIATKOWSKI, A. Industrial carbon adsorbents. In: DABROWSKI, A. **Adsorption and its Applications in Industry and Environmental Protection: Studies in Surface Science and Catalysis**. Poland, 1998. p. 69–93.

TAMANINI et al. Avaliação da casca de aveia para a produção biotecnológica de xilitol. **Acta Scientiarum Technology**, v.26, n.2, p.117-125, 2004.

TAPIAINEN, T. et al. Xylitol administered only during respiratory infections failed to prevent acute otitis media. **Pediatrics**, v.109, n.2, p.19, 2002.

TAHERZADEH, M.J.; ADLER, L.; LIDÉN, G. Strategies for enhancing fermentative production of glycerol – a review. **Enzyme Microbial Technology**, v. 31, p. 53-66, 2002.

TEIXEIRA, J.B. Biorreatores. **Revista Biotecnologia & Desenvolvimento**, v.24, janeiro/fevereiro, p.36-41, 2002.

TODD, J.M.; POWELL, L.L. Xylitol intoxication associated with fulminant hepatic failure in a dog. **Vet. Emerg. Crit. Care**, v.17, n.3, p.286-289, 2007.

TOMOTANI, E.J. et al. Partial purification of xylose reductase from *Candida guilliermondii* for the use of the conversion of xylose into xylitol. **Current Research Topics in Applied Microbial Biotechnology** - BioMicroWorld2007 Conference Proceedings Book, 2007.

TOMOTANI, E.J. et al. Obtaining partial purified xylose reductase from *Candida guilliermondii*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.631-635, 2009.

UHARI, M.; TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, v. 9, p.S144-S147, 2001.

VANDESKA, E. et al. Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.11, p.213-218, 1995.

VAN EYES, J. et al. Xylitol as a therapeutic agent on glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: **SUGAR IN NUTRITION**, H.L. Sipple, K.W. McNutt, eds. Academic Press, 1974, p.613.

VAN WALSUM, G.P. Severity function describing the hydrolysis of xylan using carbonic acid. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.91-93, n.1-9, p. 317-329, 2001.

VAN WALSUM, G.P.; SHI, H. Carbonic acid enhancement of hydrolysis in aqueous pretreatment of corn stover, **Biores. Technol.**, v.93, n.3, p.217-226, 2004.

VAN'T RIET, K.; TRAMPER, J. **Basic bioreactor design**. New York, USA: Marcel Dekker Inc., 1991.

VERDE, M.V. **Aplicação de resinas de troca iônica no tratamento de hidrolisado hemicelulósico para processos fermentativos**. 2001. 80p. Dissertação (Mestrado em biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2001.

VILLA, P. et al. Influence of phenolic compounds on the bioprocess of xylitol production by *Candida guilliermondii*. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON BIOCHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, 2. 1998, Porto-Portugal.

VILLARREAL, M.L.M. **Avaliação do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de resíduos de eucalipto, com carvão ativo e resinas de troca iônica, para a produção de xilitol**. 2005. 132p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 2005.

VILLARREAL, M.L.M. et al. Detoxification procedures of eucalyptus hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p.17-24, 2006.

VINAGRE, A.P.; ESPÓSITO, E. Estudo da biodegradação de polímeros naturais. In: IUA – SIMPÓSIO INTERNACIONAL DA UNICAMP, 2004. Campinas. **Anais**. Campinas, Brasil, 2004.

VON SIVERS, M. Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Progress**, v.10, n.5, p.555-560, 1994.

WALKER, G.M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. England: John Wiley, 1998, cap.3, p. 83-91 e cap.4, p.163.

WATSON, N. E. et al. Factors in acid treated bagasse inhibiting ethanol production from D-xylose by *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.6, p.451-456, 1984.

WEN, Z.T.; BROWNGARDT, C.; BURNE, R.A. Characterization of two operons that encode components of fructose-specific enzyme II of the sugar: phosphotransferase system of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, v.205, p.337-342, 2001.

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

WINKELHAUSEN, E.; AMARTEY, S.A.; KUZMANOVA, S. Xylitol production from D-xylose at different oxygen transfer coefficients in a batch bioreactor. **Eng. Life Sci.**, v.4, p.150–154, 2004.

WITTEVEEN, C.F.B. et al. Isolation and characterization of two xylitol dehydrogenases from *Aspergillus niger*. **Microbiology**, v.140, n.7, p.1679-1675, 1994.

YAHASHI, Y. et al. 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.

YLIKAHRI, R. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. **Advances in Food Research**, v.25, p.159-180, 1979.

YOKOYAMA, S. et al. Purification, characterization and structure analysis of NADPH-dependent D-xylose reductases from *Candida tropicalis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.79, p.217-223, 1995.

YOUNG, H.; PETERSON, V.J. Condensed tannis from white clover seed diffusate. **Phytochemistry**, v.19, p.159-160, 1980.

ZABNER, J. et al. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.97, n.21, p.11614-11619, 2000.

ZHANG, Z.; THOMAS, C.R. Eddy number distribution in isotropic turbulence and its application for estimating mass transfer coefficients. **Chem. Eng. Commun.**, v.140, p.207–217, 1996.

APÊNDICES

Apêndice 1. Tabelas dos resultados de fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em frascos Erlenmeyer.

Nesta seção, encontram-se representados por tabelas, os valores de concentrações de açúcares, ácido acético, xilitol, etanol e glicerol, bem como variação de pH e crescimento celular obtidos do cultivo de *C. guilliermondii* em diferentes fontes de carbono (xilose, glicose ou mistura de xilose e glicose) durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana submetido a procedimentos de destoxificação ou ao simples ajuste de pH.

Tabela A.1.1. Concentrações de xilose (g L^{-1}) obtidas do cultivo de *C. guilliermondii* em diferentes fontes de carbono (A-xilose; B-glicose e C-mistura de xilose e glicose) durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por: alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (pHCA); adsorção em resinas de troca iônica (RTI) e submetido ao simples ajuste de pH (Controle).

Xilose (g L^{-1})									
Tempo (h)	A			B			C		
	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle
0	63,965	72,605	56,378	64,862	71,850	59,038	64,004	69,683	59,294
24	47,862	53,430	54,501	53,725	50,687	56,866	50,287	53,623	52,123
48	29,077	38,075	47,616	42,623	33,981	52,393	32,518	40,980	50,501
72	14,718	13,839	42,758	25,698	13,197	43,830	17,134	24,773	41,612
96	2,313	1,808	28,683	12,294	1,053	31,230	2,768	5,116	29,222
120	0,310	0,159	14,542	1,367	0,000	16,432	0,393	1,453	17,787

Tabela A.1.2. Concentrações de glicose (g L^{-1}) obtidas do cultivo de *C. guilliermondii* em diferentes fontes de carbono (A-xilose; B-glicose e C-mistura de xilose e glicose) durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por: alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (pHCA); adsorção em resinas de troca iônica (RTI) e submetido ao simples ajuste de pH (Controle).

Glicose (g L^{-1})									
Tempo (h)	A			B			C		
	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle
0	7,865	4,717	6,933	7,558	4,429	7,442	7,424	4,114	7,120
24	0,000	0,000	2,923	0,000	0,000	1,342	0,000	0,000	6,231
48	0,000	0,000	0,368	0,000	0,000	0,286	0,000	0,000	1,060
72	0,000	0,000	0,293	0,000	0,000	0,213	0,000	0,000	0,205
96	0,000	0,000	0,276	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,181
120	0,000	0,000	0,228	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,150

Tabela A.1.3. Concentrações de arabinose (g L^{-1}) obtidas do cultivo de *C. guilliermondii* em diferentes fontes de carbono (A-xilose; B-glicose e C-mistura de xilose e glicose) durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por: alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (pHCA); adsorção em resinas de troca iônica (RTI) e submetido ao simples ajuste de pH (Controle).

Arabinose (g L^{-1})									
Tempo (h)	A			B			C		
	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle
0	5,629	3,495	5,050	5,630	3,888	5,774	5,632	3,799	5,019
24	5,232	2,978	6,257	5,177	2,938	6,277	5,264	3,716	5,744
48	5,096	2,699	5,325	5,389	2,275	5,239	5,182	3,318	5,079
72	4,913	2,594	5,169	4,755	1,752	5,266	3,849	2,452	4,809
96	4,242	1,990	5,086	4,807	1,603	5,031	3,054	1,854	4,779
120	3,254	0,927	5,155	4,597	1,592	4,796	2,806	0,984	4,702

Tabela A.1.4. Concentrações de ácido acético (g L^{-1}) obtidas do cultivo de *C. guilliermondii* em diferentes fontes de carbono (A-xilose; B-glicose e C-mistura de xilose e glicose) durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por: alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (pHCA); adsorção em resinas de troca iônica (RTI) e submetido ao simples ajuste de pH (Controle).

Ácido acético (g L^{-1})									
Tempo (h)	A			B			C		
	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle
0	4,374	1,790	4,578	4,492	1,673	5,098	4,461	1,632	4,672
24	3,768	1,014	4,486	3,625	0,846	4,750	3,679	0,976	4,666
48	3,365	0,293	3,926	3,113	0,306	3,902	3,357	0,307	3,434
72	2,755	0,000	3,125	2,055	0,000	3,402	2,483	0,000	3,147
96	1,828	0,000	2,192	1,089	0,000	2,644	1,977	0,000	2,367
120	0,976	0,000	1,942	0,257	0,000	1,895	0,693	0,000	1,667

Tabela A.1.5. Concentrações de xilitol (g L^{-1}) obtidas do cultivo de *C. guilliermondii* em diferentes fontes de carbono (A-xilose; B-glicose e C-mistura de xilose e glicose) durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por: alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (pHCA); adsorção em resinas de troca iônica (RTI) e submetido ao simples ajuste de pH (Controle).

Xilitol (g L^{-1})									
Tempo (h)	A			B			C		
	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24	7,857	9,387	0,000	5,263	8,070	0,000	8,141	8,308	0,000
48	21,282	27,837	4,377	16,123	23,223	4,490	19,486	18,356	2,753
72	32,648	42,953	9,761	26,429	38,489	10,947	31,234	31,976	7,450
96	46,184	50,540	15,722	40,353	47,765	15,781	46,380	40,771	14,626
120	49,868	46,163	23,848	50,923	44,525	24,191	49,270	38,441	22,044

Tabela A.1.6. Concentrações de etanol (g L^{-1}) obtidas do cultivo de *C. guilliermondii* em diferentes fontes de carbono (A-xilose; B-glicose e C-mistura de xilose e glicose) durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por: alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (pHCA); adsorção em resinas de troca iônica (RTI) e submetido ao simples ajuste de pH (Controle).

Etanol (g L^{-1})									
Tempo (h)	A			B			C		
	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24	4,096	2,712	2,464	3,495	2,086	2,879	3,893	2,926	2,443
48	4,712	2,524	4,845	3,505	2,060	4,455	4,105	3,198	2,850
72	4,199	2,283	5,326	3,052	2,326	4,450	3,714	2,582	3,233
96	3,819	1,940	6,229	2,490	1,543	4,887	4,365	2,230	5,327
120	3,599	1,131	5,837	2,433	0,694	5,094	3,040	1,802	5,866

Tabela A.1.7. Concentrações de glicerol (g L^{-1}) obtidas do cultivo de *C. guilliermondii* em diferentes fontes de carbono (A-xilose; B-glicose e C-mistura de xilose e glicose) durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por: alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (pHCA); adsorção em resinas de troca iônica (RTI) e submetido ao simples ajuste de pH (Controle).

Glicerol (g L^{-1})									
Tempo (h)	A			B			C		
	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
24	0,903	0,660	1,221	0,291	0,541	1,090	0,905	0,742	0,919
48	0,813	0,654	1,494	0,261	0,677	1,890	0,720	0,852	1,451
72	0,769	0,892	1,485	0,151	0,680	1,852	0,507	0,950	1,513
96	0,877	1,096	1,591	0,200	0,797	1,769	0,391	1,272	1,546
120	0,882	0,835	1,736	0,532	0,746	1,929	0,574	1,323	1,679

Tabela A.1.8. Variações do pH obtidas do cultivo de *C. guilliermondii* em diferentes fontes de carbono (A-xilose; B-glicose e C-mistura de xilose e glicose) durante fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por: alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (pHCA); adsorção em resinas de troca iônica (RTI) e submetido ao simples ajuste de pH (Controle).

pH									
Tempo (h)	A			B			C		
	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle
0	5,61	5,66	5,52	5,6	5,62	5,53	5,61	5,65	5,53
24	5,56	5,42	5,33	5,63	5,71	5,37	5,56	5,64	5,22
48	5,59	6,07	5,44	5,79	6,53	5,47	5,62	6,45	5,41
72	5,84	6,52	5,57	6,18	6,34	5,57	5,93	6,66	5,54
96	6,24	5,82	5,64	6,55	5,78	5,64	6,35	6,09	5,64
120	6,47	5,38	5,67	6,68	5,44	5,68	6,51	5,64	5,68

Tabela A.1.9. Concentrações celulares (g L^{-1}) obtidas do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado por: alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado (pHCA); adsorção em resinas de troca iônica (RTI) e submetido ao simples ajuste de pH (Controle) durante a fermentações por *C. guilliermondii* cultivada em diferentes fontes de carbono (A – xilose; B - glicose e C - mistura de xilose e glicose).

Concentração celular (g L^{-1})									
Tempo (h)	A			B			C		
	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle	pHCA	RTI	Controle
0	0,880	0,774	0,974	0,871	0,995	0,962	0,816	0,781	0,930
24	2,141	3,272	2,880	2,133	3,503	2,974	1,974	3,122	3,019
48	2,666	4,733	3,891	2,833	4,7889	4,528	2,687	4,278	4,277
72	3,150	5,624	4,714	3,421	5,807	5,030	3,456	5,573	4,888
96	4,256	7,196	5,185	4,363	7,552	6,003	4,001	6,575	5,598
120	5,534	9,833	5,869	5,159	10,626	6,724	5,505	8,496	6,119

Apêndice 2. Tabelas dos resultados de fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em fermentadores de bancada.

Nesta seção, encontram-se representados por tabelas, os valores de concentrações de açúcares, ácido acético, xilitol, etanol e glicerol, bem como variação de pH e crescimento celular obtidos do cultivo de *C. guilliermondii* durante fermentações em fermentadores de bancada de 2,4L e 16L do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado.

Tabela A.2.1. Concentrações de açúcares (g L^{-1}) durante fermentações em fermentadores de bancada de 2,4L e 16L de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana por *C. guilliermondii*.

Fermentador (L)	Açúcares (g L^{-1})							
	Xilose		Glicose		Arabinose		Xilitol	
	2,4	16	2,4	16	2,4	16	2,4	16
Tempo (h)								
0	57,580	60,971	7,928	7,808	7,032	7,801	0,000	0,000
6	56,639	55,089	1,415	0,645	7,193	7,810	0,000	0,000
12	54,842	54,001	0,000	0,000	8,160	8,601	0,000	0,000
24	50,226	51,970	0,000	0,000	6,899	8,272	3,244	0,000
36	45,385	48,610	0,000	0,000	6,224	6,781	6,194	3,972
48	42,335	43,710	0,000	0,000	5,634	6,448	9,040	6,846
60	36,294	35,970	0,000	0,000	5,322	6,012	11,878	9,425
72	31,256	33,200	0,000	0,000	5,050	5,509	15,454	13,012
84	26,712	29,300	0,000	0,000	5,030	5,314	19,698	18,106
96	19,960	22,800	0,000	0,000	4,598	4,904	23,763	23,949
108	12,736	16,100	0,000	0,000	4,444	4,393	27,819	27,539
120	7,500	9,100	0,000	0,000	3,469	3,039	31,752	32,620
132	4,173	3,430	0,000	0,000	3,117	2,944	36,620	38,285
144	0,816	0,590	0,000	0,000	2,004	1,716	35,668	38,980

Tabela A.2.2. Concentrações de ácido acético, etanol, glicerol e concentração celular (g L^{-1}) durante fermentações em fermentadores de bancada de 2,4L e 16L de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana por *C. guilliermondii*.

	Ácido acético		Etanol		Glicerol		Concentração Celular	
Fermentador (L)	2,4	16	2,4	16	2,4	16	2,4	16
Tempo (h)								
0	4,622	4,768	0,000	0,000	0,000	0,000	0,824	0,931
6	4,651	4,566	4,485	3,457	1,150	0,857	2,044	2,364
12	4,267	4,542	5,127	3,934	1,084	1,045	3,163	3,249
24	4,371	4,070	5,068	3,372	1,297	1,039	3,566	4,041
36	4,257	3,769	3,898	3,698	1,153	1,234	4,517	4,815
48	3,742	3,398	3,266	4,051	1,411	1,185	4,766	5,469
60	3,276	2,831	3,882	3,228	1,544	1,290	5,447	6,585
72	2,942	2,309	2,369	2,938	1,414	1,650	5,911	7,543
84	2,595	1,963	2,274	2,627	1,936	2,096	6,330	8,262
96	2,235	1,472	1,711	2,996	2,210	2,475	7,140	9,065
108	1,985	0,979	1,448	1,652	1,894	2,817	7,692	10,032
120	1,885	0,719	1,124	1,765	2,786	3,270	8,954	10,731
132	1,412	0,515	1,873	0,666	2,631	3,512	9,544	12,365
144	1,204	0,315	1,844	0,836	2,964	2,875	9,169	13,298

Tabela A.2.3. Variações de pH durante fermentações em fermentadores de bancada de 2,4L e 16L de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana por *C. guilliermondii*.

Fermentador (L)	pH	
	2,4	16
Tempo (h)		
0	5,59	5,59
6	5,49	5,54
12	5,51	5,52
24	5,54	5,63
36	5,61	5,69
48	5,72	5,72
60	5,8	5,82
72	5,88	5,91
84	5,97	6,03
96	6,07	6,09
108	6,16	6,19
120	6,25	6,24
132	6,28	6,32
144	6,34	6,43

Apêndice 3. Ilustrações e dimensões dos fermentadores de bancada de 2,4L e 16L.

Nesta seção, encontram-se representados por ilustrações e tabelas (contendo as dimensões) dos fermentadores de bancada de 2,4L e 16L empregados no cultivo de *C. guilliermondii* durante fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana destoxificado.

Figura A.3.1. Esquema do sistema do fermentador de 2,4L empregado nas fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por *C. guilliermondii*.

Tabela A.3.1. Dimensões do fermentador de 2,4L empregado nas fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por *C. guilliermondii*.

Tag no.	Qty.	Description	Nominal size/type	Remarks	Art. no.	
Vessel						
101	1	Small laboratory fermenter, glass vessel	2.4 L KLF 2000	NW 115	20700	
102	1	Lid	NW100		30267	
103	1	Bearing assembly top and bottom drive	12 - 1D		30328	
104	1	Bottom	NW100		30269	
105	1	Safety jacket	KLF		30352	
111	1	Mecanical seal carbon/ceramic	Ø 12		50921	
120	1	Shaft	Ø 12		30208	
122	1	Baffle cage	NW100		30207.1	
125	2	Disk turbine	Ø 12 x 40		30209	
130	1	Aeration tube with ring sparger	NW100			
160	1	Immersion tube	DN 12 Øi 3 x 305		41069	
177.1	8	Blind plug	DN 12		41042	
177.2	1	Blind plug	DN 19		40604	
180	1	Rack	KLF			
Temp. circuit						
215	1	Heating finger	800 W		30355	
250	1	Cooling finger			30215	
253	1	Solenoid valve	R 1/8" brass 230 V/ 50 Hz		50177	
Air in						
301	1	Pressure reducing valve	R 1/4" 0,2-1.5 bar	In control cabinet	50133.1	
302	1	Flow meter with valve	R 1/8"	In control cabinet	51162	
303	1	Pressure gauge, rectangular	0 -2.5 bar G 1/8"	In control cabinet	52032	
305	1	Solenoid valve	R 1/8" brass 230 V/ 50 Hz	In control cabinet	50177	
360	1	Filter housing complete with cartridge, needle, non return valve, hose	6/1 6/1		32835	
361	1	Filter cartridge (part of pos. 360)	L = 57 mm		50010	
368	1	Non return valve			50012
Bioengineering AG Sagenrainstrasse 7 8636 Wald Switzerland		Faeniquil, Lorena SP, Brazil KLF 2000, 2.4 L		Datum 13.07.01	Name MB	Blatt-Nr. 1/3
				Geändert MB/rh	W-Nr. 15876a	
				Stückliste Ausgabe 1 27.09.01 zu R&I-Schema Nr. 46153		

Tag no.	Qty.	Description	Nominal size/type	Remarks	Art. no.
---------	------	-------------	-------------------	---------	----------

Air out

417	1	Diaphragm valve with man. actuator (part of pos. 450)	DN 08 1/2"		51049
450	1	Filter housing complete with cartridge, diaphragm valve, connection pieces	8/1 8/1		30342
451	1	Filter cartridge (part of pos. 360)	L = 57 mm		50010

Vessel accessories

500	1	Harvesting valve with manual actuator	DN 12		20706.1
501	1	Diaphragm valve with man. actuator	DN 08 1/2"		51049
522	1	Safety valve sterile	DN 12 1.5 barg		41075.1

Probes

602	1	Temperature probe PT100 without amplifier	DN 12 L = 103 mm		21498.1
661	1	Motor	1380 rpm 180 W		
665	1	Speed controller			
675	1	pH probe, refillable	DN 12		21473
680	1	pO ₂ -probe without protection cap	DN 12 L = 220 mm		21682.2

Measurement and Control

700	1	Control cabinet	12HE		
701	1	Interface to Biologics			
702	1	Cable for Interface Biologics	5 m		52168
703	1	Quatech Inverter plug			
710	1	SCADA-Software to BioLogics			
718	1	Plug board	6x P/N/G 250V 10A		52205

Transfer

820	1	Spring clip, stainless steel	Ø 5-14mm		50306
821	1	Hypodermic needle with cup	DN 12 Ø 3		41037
824	1	Silicone hose for Ø 3	Ø 2 x 5.5		51808

Maintenance accessories

900	1	Set of Silicone diaphragms			50001
<div><div><div></div><div></div><div></div></div><div>BIOENGINEERING</div><div>Bioengineering AG Sagenrainstrasse 7 8636 Wald Switzerland</div></div>		Faeniquil, Lorena SP, Brazil KLF 2000, 2.4 L	Datum 13.07.01	Name MB	Blatt-Nr. 2/3
			Geändert MB/rh	W-Nr. 15876a	
			Stückliste Ausgabe 1 27.09.01 zu R&E-Schema Nr. 46153		

Tag no.	Qty.	Description	Nominal size/type	Remarks	Art. no.
901	1	Silicone Lubricant			51849
902	1	Set of fuses and lamps			
903	1	Set of tools			
904	1	Operation manual			

<div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div><div>■</div></div>

Figura A.3.2. Ilustração do sistema do fermentador de 2,4L empregado nas fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por *C. guilliermondii*.

Figura A.3.3. Esquema do sistema do fermentador de 16L empregado nas fermentações em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por *C. guilliermondii*.

Tabela A.3.2. Dimensões do fermentador de 16L empregado nas fermentações do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana por *C. guilliermondii*.

Tag no.	Qty.	Description	Nominal size/type	Remarks	Art. no.
---------	------	-------------	-------------------	---------	----------

Vessel

100	1	Vessel, glass	16L L1523	NW 200x500	50164
101	1	Lid	NW200		20013
102	1	Bottom, dished, double wall	NW200		20010
103	1	table-rack	600 x 1250 TZ, L1523		20017
104	1	Safety jacket	16L / 19L L1523		10626.2
130	1	Clutch assembly with couplings			41115 40185
136	1	Bearing assembly bottom drive	24 - 1D		20154
137	1	Mecanical seal carbon/ceramic	Ø 24		50897
140	1	Shaft 24 1-D	Ø 19 L 630		30141
142	2	Disk turbine	Ø 19 D 80		41116
145	1	Baffle cage	Ø 200		10010
148	1	Immersion tube for sampling	Ø 8 L 468		41107.3
150	1	Aeration tube	Ø 8		41109.3

Temp. circuit

200	1	Inline pump for temperature circuit	DN 20 220 V		50425
210	1	Safety valve unit	DN 15, 6.0 barg R 1/2", 3/4"		50200.3
211	1	Flow limiter	5L/min		51840
215	1	Electrical Heating, flow through	R 1/2" 4.5 kW		11759
220	1	Set of flexible stainless steel braided hoses	DN 20 220 V		50191
221	1	Part of Pos. 220			
253	1	Solenoid valve	R 1/2" brass 230 V/ 50 Hz		50976

Air in

301	1	Pressure reducing valve	G 1/4" 0.2-1.5 bar		50133.1
302	1	Flow meter	R 1/4"		50206
303	1	Pressure gauge connection at bottom	R 1/8" 0-2.5 barg	In control cabinet	50146.1
304	1	Valve, manual		Part of position 302
Bioengineering AG Sagenrainstrasse 7 8636 Wald Switzerland			FAPESP, Sao Paulo, Brazil		
			L1523, 16 L		
			Datum 14.05.01	Name MB/rh	Blatt-Nr.
			Geändert MB/rh	W-Nr. 15727	1/3
			Stückliste Ausgabe 1 25.06.01 zu R&I-Schema Nr. 46110a		

Tag no.	Qty.	Description	Nominal size/type	Remarks	Art. no.
307	1	Silicone hose for Ø 6	Ø 5 x 10		50223
308	1	Hypodermic needle with cup	DN 19 Ø 8	(air inlet)	41090
309	1	Silicone hose for Ø 6	Ø 5 x 10		50223
310	1	Silicone hose for Ø 6	Ø 5 x 10		50223
360	1	Filter housing	DN 06/06		30369.1
361	1	Ceramic filter cartridge	Ø 30/15x150		50158
368	1	Non return valve			50012

Air out

417	1	Diaphragm valve with man. actuator	DN 08 3/4"		51050
450	1	Filter housing for ceramic candle 150mm	DN 19 /DN10		30369.11
451	1	Ceramic filter cartridge	Ø 30/15x150		50158

Vessel accessories

518	1	Sterile pressure gauge	DN 19 -1 ÷ 3 barg		42991.1
520	1	Spring clip, stainless steel	Ø 5-14mm		50306
527	1	Silicone hose for Ø 6	Ø 5 x 10		50223
528	1	Hypodermic needle with cup	DN 19 Ø 8		41090
532	1	Safety valve sterile	DN 19 1.5 barg		41112.1
537	10	Blind plug	DN 19		40604

Probes

602	1	Temperature probe PT100	DN 19 L = 470 mm		21504.5
603	1	Thermostat	G 1/2" Typ. A		51020
661	1	AC-Motor	1390 rpm 750W	3x230/400V 50 Hz IP54	
665	1	Speed control			
675	1	pH probe, refillable	DN 19 L = 275 mm		21478
680	1	pO2-probe	DN 19 L = 320 mm		21683.2

Measurement and Control

700	1	Control cabinet	8HE
Bioengineering AG Sagenrainstrasse 7 8636 Wald Switzerland		FAPESP, Sao Paolo, Brazil L1523, 16 L	Datum 14.05.01	Name MB/rh	Blatt-Nr. 2/3
			Geändert MB/rh	W-Nr. 15727	
			Stückliste Ausgabe 1 25.06.01 zu R&T-Schema Nr. 46110a		

Tag no.	Qty.	Description	Nominal size/type	Remarks	Art. no.
---------	------	-------------	-------------------	---------	----------

Transfer

847	1	Silicone hose for Ø 8	Ø 7 x 10		50224
848	1	Hypodermic needle with cup	DN 19 Ø 8		41090

Maintenance accessories

900	1	Set of silicone diaphragm for hypodermic needles	DN19		50145
901	1	Silicone Lubricant			51849
902	1	Set of fuses and lamps			
903	1	Set of tools			
904	1	Operation manual

Bioengineering AG Sagenrainstrasse 7 8636 Wald Switzerland	FAPESP, Sao Paulo, Brazil L1523, 16 L	Datum 14.05.01	Name MB/rh	Blatt-Nr.
		Geändert MB/rh	W-Nr. 15727	3/3
		Stückliste Ausgabe 1 25.06.01 zu R&I-Schema Nr. 46110a		