UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ELISÂNGELA DE JESUS CÂNDIDO MORAES

**Estudo de Viabilidade Econômica da Produção de
Xilitol a partir de Hidrolisado Hemicelulósico
de Palha de Cevada**

LORENA
2008

ELISÂNGELA DE JESUS CÂNDIDO MORAES

**Estudo de Viabilidade Econômica da Produção de
Xilitol a partir de Hidrolisado Hemicelulósico
de Palha de Cevada**

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

Área de concentração: Conversão de Biomassa

Orientador: Dr. João Batista de Almeida e Silva

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

**LORENA
2008**

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 Universitária
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Moraes, Elisângela de Jesus Cândido

Estudo de viabilidade econômica da produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada/ Elisângela de Jesus Cândido Moraes; orientador João Batista de Almeida e Silva. – Lorena : 2008.

157 p. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

1. Xilitol 2. Palha de cevada 3. *Candida guilliermondii* 4. Planejamento de experimentos. 5. Viabilidade econômica. I. Título.

664.16 - CDU

*Ao meu marido Fábio de Moraes e ao meu filho
Vitor pela paciência, amor, dedicação, incentivo,
apoio, confiança e principalmente por não me
deixarem desanimar nunca.*

*À minha mãe Maria e à minha irmã Rosane pela
amizade e por sempre acreditarem em mim.*

*Ao meu pai Paulo que já não está mais entre nós,
pelo exemplo que deixou.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Prof. Dr. João Batista de Almeida e Silva pela amizade, confiança, paciência e orientação desde a iniciação científica.

À Prof. Dr. Maria das Graças de Almeida Felipe pela brilhante co-orientação, pelos ensinamentos, incentivo e principalmente pela amizade de sempre.

À Prof. Dr. Francislene Hasmann pela amizade e companheirismo.

À querida amiga Dr. Débora Danielle da qual sou admiradora pela competência, honestidade, caráter e acima de tudo pela valiosa amizade que firmamos nos anos em que convivemos juntas. Muito obrigada por tudo!

Às alunas de Iniciação Científica Cláudia, Alissa e Sara pelo grande apoio, amizade e companheirismo. Sempre me lembrarei de vocês com uma imensa gratidão e carinho.

Aos técnicos de laboratório Paulinho e Nicanor pela assistência técnica, mas acima de tudo pela amizade e companheirismo.

Às queridas e sempre tão atenciosas Sandra, Cida e Bia. Muito obrigada pela atenção de sempre, pelo carinho e por sempre estarem dispostas a ajudar.

Aos professores e demais funcionários do Debiq.

Às amigas conquistadas durante todo este tempo no Debiq, especialmente André “Piranguinho”, Rita, Larissa Canilha, Valdeir, Martica, Ernesto, Priscila Vaz e Taís.

Aos amigos de fora do Debiq Regina, Laís, Larissa Poppi e Adriano “Piranguinho”.

À Malteria do Vale de Taubaté pela doação da palha de cevada.

À Fapesp pelo auxílio financeiro concedido desde a iniciação científica.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

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

Materiais lignocelulósicos, como a palha de cevada, são fontes de baixo custo com potenciais aplicações em bioprocessos. A fração hemicelulósica destes materiais pode ser hidrolisada usando-se ácidos minerais, para a liberação de seu principal açúcar componente, a xilose que é substrato para a bioprodução de xilitol. Já a fração celulósica pode ser deslignificada fazendo uso de álcalis e posteriormente hidrolisada com ácidos minerais para a liberação da glicose. O principal objetivo desta pesquisa foi avaliar economicamente a bioprodução de xilitol a partir da fração hemicelulósica da palha de cevada. A caracterização química da palha de cevada revelou a presença de 38,55% de celulose, 21,41% de hemicelulose e 19,90% de lignina. Após a etapa de caracterização a palha foi hidrolisada utilizando-se ácido sulfúrico para extração da xilose, empregando-se um planejamento fatorial 2^{4-1} . As melhores condições de hidrólise foram a uma temperatura de 120°C, concentração ácida de 2,6%, tempo de reação de 20 minutos e relação sólido: líquido de 1:13,5. Nessas condições obteve-se um rendimento de extração de xilose da ordem de 84,38%. A celolignina resultante desse processo foi submetida a uma nova hidrólise de acordo com planejamento experimental 2^{4-1} sendo que as melhores condições de hidrólise para a máxima eficiência de extração de glicose de 67,96% foi a uma temperatura de 179°C, concentração ácida de 3%, tempo de reação de 30 minutos e relação sólido: líquido de 1:8. Após a realização das hidrólises, o hidrolisado hemicelulósico foi submetido à destoxificação para eliminação dos compostos inibitórios ao metabolismo microbiano e sua posterior fermentação com a levedura *Candida guilliermondii* enquanto o hidrolisado celulósico rico em glicose foi utilizado para suplementar o meio de fermentação constituído do hidrolisado hemicelulósico uma vez que a glicose foi um dos parâmetros nutricionais avaliados no planejamento fatorial 2^{6-2} utilizado para as fermentações realizadas em frascos Erlenmeyer. Estes experimentos foram realizados por 72 horas e as melhores condições de cultivo determinadas pelo modelo foram: 3,0 g/L de sulfato de amônio, 1,0 g/L de cloreto de cálcio, 20,0 g/L de solução de extrato farelo de arroz e hidrolisado hemicelulósico contendo o teor de 60 g/L de xilose sendo que a concentração inicial de células em cada frasco foi de 1,0 g/L. Nestas condições obteve-se um consumo de xilose e eficiência de conversão de 96,59 e 59,98%, respectivamente, sendo a produtividade volumétrica de xilitol de 0,48 g/L.h. A fim de avaliar o efeito da disponibilidade de oxigênio sobre a bioconversão de xilose em xilitol foram realizadas fermentações empregando-se as melhores condições de cultivo obtidas em frascos agitados em reator de 1L onde os parâmetros agitação e aeração foram estudados segundo um planejamento fatorial 2^2 . De acordo com os resultados os máximos valores de produção, produtividade volumétrica e fator de conversão de xilose em xilitol foram 51,28 g/L, 0,71 g/L.h e 0,88 g/g, respectivamente, quando a agitação foi de 200 rpm e aeração de 0,9 vvm ($K_L a \approx 18 h^{-1}$) em 72 horas de fermentação. As condições de fermentação estabelecidas durante a utilização de reator de 1 L foram então empregadas para avaliar o processo a partir de um reator de maior capacidade (16 L), utilizando como critério de ampliação o $K_L a$. Os valores de produção, produtividade volumétrica e fator de conversão de xilose em xilitol foram respectivamente 55,63 g/L, 0,77 g/L.h e 0,91 g/g, correspondendo a eficiência de conversão de 99,23%. O caldo fermentado resultante desta fermentação foi submetido à centrifugação e posterior clarificação. Por fim foi realizado um estudo econômico em cada etapa do processo considerando os equipamentos, os meios de cultivo empregados e reagentes, consumo de energia elétrica e água utilizados no processo, bem como a depreciação dos equipamentos. Após este estudo constatou-se que o valor para o xilitol produzido por via biotecnológica a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada é de R\$ 1.389,05.

PALAVRAS-CHAVE: Xilitol. Palha de Cevada. *Candida guilliermondii*. Hidrólise Ácida. Planejamento de Experimentos. Viabilidade Econômica.

ABSTRACT

MORAES, E. J. C. **Economic viability study of xylitol production from hemicellulosic hydrolysate from barley straw**. 2008. 157p. Thesis (Doctoral in Industrial Biotechnology) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 2008.

Lignocellulosic materials, such as barley straw, are sources of low cost and with potential applications in bioprocesses. The hemicellulosic fraction of these materials can be hydrolyzed using mineral acids to release xylose, its major sugar component, which is substrate to bioproduction of xylitol. The cellulosic fraction can be delignified using alkalis followed by treatment with mineral acids to release glucose. The main objective of this research was to evaluate the economic bioproduction of xylitol from hemicellulosic fraction of barley straw. Chemical characterization of barley straw revealed the presence of 38.55% cellulose, 21.41% hemicellulose and 19.90% lignin. After the characterization stage, the barley straw was hydrolyzed with sulphuric acid for the extraction of xylose using a 2^{4-1} factorial design. The optimum condition was temperature 120°C, acid concentration 2.6%, reaction time 20 min and solid:liquid ratio 1:13.5. Under this condition the xylose extraction yield was about 84.38%. The celolignin was then submitted to a new hydrolyze according to a 2^{4-1} factorial design and the best condition for maximum glucose extraction yield (67.96%) was temperature 179°C, acid concentration 3%, reaction time 30 min and solid:liquid ratio 1:8. After hydrolysis, the hemicellulosic hydrolysate was submitted to a detoxification step to eliminate the compounds inhibitory to the microbial metabolism and fermentation with the yeast *Candida guilliermondii* while the cellulosic hydrolysate, rich in glucose, was used to supplement the fermentation medium consisting of the hemicellulosic hydrolysate as glucose was one of the nutritional parameters evaluated in the factorial design 2^{6-2} employed to the fermentations carried out in Erlenmeyer flasks. These experiments were conducted for 72 h and the best culture conditions determined by the model were: 3.0 g/L ammonium sulfate, 1.0 g/L calcium chloride, 20.0 g/L solution of rice straw and hemicellulosic hydrolysate containing 60 g/L xylose. The initial cell concentration in each flask was 1.0 g/L. Under this condition the xylose consumption and conversion efficiency was 96.59 and 59.98%, respectively. The volumetric productivity of xylitol was 0.48 g/L.h. To evaluate the effect of oxygen availability on the bioconversion of xylose into xylitol It was realized fermentations employing the best culture conditions obtaining under agitation in 1L reaction where the parameters agitation and aeration were studied using a 2^2 factorial design. According to the results the maximum values of production, volumetric productivity and the factor of xylose concentration into xylitol were 51,28 g/L, 0.71 g/L.h and 0.88 g/g, respectively, when the agitation was 200 rpm and aeration 0.9 vvm ($K_La \approx 18h^{-1}$) in 72 h fermentation. The fermentation conditions established during the utilization of 1 L reactor were then employed to evaluate the process from a reactor of higher capacity (16 L), and K_La was use as criteria to scale up. Production, volumetric productivity and the factor of xylose conversion into xylitol were 55.63 g/L, 0.77 g/L.h and 0.91 g/g, respectively, corresponding to a conversion efficiency of 99.23%. The fermented broth obtained from this fermentation was centrifuged and clarified. An economic study was realized for each stage of the process, considering equipment, reagents of the culture media, electric energy consumption and water utilized in the process, as well as equipment. It was found that the value of biotechnological produced xylitol from hemicellulosic hydrolysate of barley straw is R\$ 1.389.05.

KEYWORDS: Xylitol. Barley straw. *Candida guilliermondii*. Acid hydrolysis. Design of experiments. Economic viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Obtenção de xilitol através da via química e biotecnológica (SILVA <i>et al.</i> , 2003).....	32
Figura 5.1. Distribuição dos resíduos do modelo proposto para obtenção do hidrolisado de palha de cevada.....	70
Figura 5.2. Superfície de resposta descrita pelo modelo quadrático para o fator rendimento de xilose em relação à palha de cevada da hidrólise hemicelulósica a palha de cevada.....	71
Figura 5.3. Interações entre os efeitos temperatura, relação sólido-líquido e concentração ácida a partir da hidrólise celulósica da palha de cevada.....	82
Figura 5.4. Superfície de resposta descrita pelo modelo quadrático para o fator eficiência de extração de glicose (%).....	88
Figura 5.5. Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona o fator de sulfato de amônio com a concentração inicial de xilose, representando a produtividade volumétrica de xilitol no sistema em estudo.....	101
Figura 5.6. Consumo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, produção de xilitol e células, durante a fermentação do hidrolisado de palha de cevada por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037, para a comprovação do modelo empírico elaborado.....	102
Figura 5.7. Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona o fator agitação com aeração, representando a produtividade volumétrica em xilitol no sistema em estudo.....	110
Figura 5.8. Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona o fator agitação com aeração, representando a concentração de xilitol no sistema em estudo.....	110
Figura 5.9. Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona o fator agitação com aeração, representando a concentração de xilitol no sistema em estudo.....	111
Figura 5.10. Consumo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, produção de xilitol e células, durante a fermentação do hidrolisado de palha de cevada por <i>C. guilliermondii</i> FTI 20037, para a comprovação dos modelos empíricos elaborados.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Composição (%) dos resíduos agrícolas e da madeira.....	20
Tabela 2.2. Propriedades físico-químicas do xilitol.....	28
Tabela 4.1. Matriz de planejamento referente aos fatores avaliados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com triplicata no ponto central.....	48
Tabela 4.2. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com ponto central.....	48
Tabela 4.3. Esquema da matriz de planejamento fatorial 2^{4-1} de face centrada.....	49
Tabela 4.4. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^{4-1} de face centrada.....	49
Tabela 4.5. Matriz de planejamento referente aos fatores avaliados para hidrólise da celulose na palha de cevada no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com triplicata no ponto central.....	52
Tabela 4.6. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com ponto central.....	52
Tabela 4.7. Matriz de planejamento referente aos fatores avaliados na bioprodução de xilitol em frascos agitados de acordo com planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} com ponto central.....	54
Tabela 4.8. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} com ponto central.....	54
Tabela 4.9. Matriz de planejamento referente aos fatores avaliados na bioprodução de xilitol em reator de bancada de acordo com planejamento fatorial fracionário 2^2 com ponto central.....	55
Tabela 4.10. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^2 com ponto central.....	55
Tabela 5.1. Composição química da palha de cevada e de diferentes matérias-primas.....	64
Tabela 5.2. Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} com ponto central e os valores de concentração de xilose a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada.....	65
Tabela 5.3. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para os parâmetros estudados na hidrólise ácida da palha de cevada para o planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central.....	65
Tabela 5.4. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para os parâmetros estudados na hidrólise ácida da palha de cevada para o planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central.....	66
Tabela 5.5. Análise de variância para o planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central para um possível modelo quadrático.....	67
Tabela 5.6. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com ponto central e face centrada e os valores do rendimento de xilose em relação à palha de cevada obtidos nas pré-hidrólises ácida do hidrolisado de palha de cevada.....	68
Tabela 5.7. Análise de variância para os efeitos estimados no planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central e face centrada.....	69

Tabela 5.8. Análise de variância da regressão do modelo que representa o processo de pré-hidrólise ácida da palha de cevada no planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central e face centrada.....	69
Tabela 5.9. Composição química do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada sob as condições ótimas de hidrólise.....	72
Tabela 5.10. Concentrações dos açúcares dos hidrolisados originais.....	73
Tabela 5.11. Concentração de compostos tóxicos e os valores de pH dos hidrolisados de palha de cevada.....	75
Tabela 5.12. Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central para a hidrólise celulósica da palha de cevada.....	76
Tabela 5.13. Eficiência de extração e concentração de glicose nos hidrolisados de acordo com o planejamento experimental 2^{4-1} com ponto central.....	77
Tabela 5.14. Eficiência de extração e concentração de glicose nos hidrolisados de acordo com o planejamento experimental 2^{4-1} com ponto central após o tratamento do resíduo com NaOH concentrado.....	79
Tabela 5.15. Análise da variância para o modelo estudado na hidrólise celulósica da palha de cevada para o planejamento fatorial 2^{4-1} com ponto central.....	79
Tabela 5.16. Análise da variância, estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para os parâmetros estudados na hidrólise celulósica da palha de cevada com planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central.....	80
Tabela 5.17. Matriz de planejamento referente aos fatores avaliados para hidrólise da celulose na palha de cevada no planejamento fatorial fracionário rotacional 2^{4-1} com triplicata no ponto central.....	83
Tabela 5.18. Níveis de fatores utilizados no planejamento fatorial fracionário rotacional 2^{4-1} com ponto central.....	83
Tabela 5.19. Eficiência de extração e concentração de glicose nos hidrolisados de acordo com o planejamento experimental rotacional 2^{4-1} com ponto central após o tratamento do resíduo com NaOH concentrado.....	84
Tabela 5.20. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para o planejamento fatorial rotacional 2^{4-1} com triplicata no ponto central que representa a eficiência de extração da glicose da cadeia celulósica da palha de cevada.....	85
Tabela 5.21. Análise de variância para os efeitos estimados no planejamento fatorial rotacional 2^{4-1} com triplicata no ponto central frente à eficiência de extração da glicose da cadeia celulósica da palha de cevada.....	86
Tabela 5.22. Análise de variância da regressão do modelo que representa o processo de hidrólise celulósica da palha de cevada no planejamento fatorial rotacional 2^{4-1} com triplicata no ponto central frente à eficiência de extração da glicose da cadeia celulósica da palha de cevada.....	86
Tabela 5.23. Composição do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada.....	89
Tabela 5.24. Composição dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de cevada após concentração à vácuo.....	91
Tabela 5.25. Composição dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de cevada após a destoxificação.....	92

Tabela 5.26. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} com triplicata no ponto central e os valores de produtividade volumétrica (Qp) no processo de bioconversão de xilose em xilitol.....	93
Tabela 5.27. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para o planejamento fatorial 2^{6-2} com triplicata no ponto central que representa o fator de produtividade volumétrica (Qp).....	94
Tabela 5.28. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para o planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central que representa o fator de produtividade volumétrica (Qp).....	95
Tabela 5.29. Matriz do planejamento fatorial 2^4 com face centrada e triplicata no ponto central e os valores de produtividade volumétrica (Qp) no processo de bioconversão de xilose em xilitol.....	96
Tabela 5.30. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para o planejamento fatorial 2^4 com face centrada e triplicata no ponto central que representa o fator de produtividade volumétrica (Qp).....	97
Tabela 5.31. Análise de variância para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais e interações sobre a produtividade volumétrica em xilitol.....	98
Tabela 5.32. Análise de variância para verificar as significâncias estatísticas do modelo quadrático em prever os valores da produtividade volumétrica em xilitol.....	99
Tabela 5.33. Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da produtividade volumétrica em xilitol.....	99
Tabela 5.34. Valores das medições do k_L para o planejamento fatorial fracionário 2^2 com triplicata no ponto central.....	104
Tabela 5.35. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^2 com triplicata no ponto central e os valores de produtividade volumétrica (Qp), concentração final do produto (P) e fator de conversão em xilitol ($Y_{P/S}$) no processo de bioconversão de xilose em xilitol.....	104
Tabela 5.36. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para o planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central que representa o fator de produtividade volumétrica (Qp).....	105
Tabela 5.37. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para o planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central que representa a concentração final de xilitol (P).....	105
Tabela 5.38. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para o planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central que representa o fator de conversão em xilitol ($Y_{P/S}$).....	105
Tabela 5.39. Análise de variância para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais sobre a produtividade volumétrica.....	106
Tabela 5.40. Análise de variância para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais sobre a concentração final do produto.....	106
Tabela 5.41. Análise de variância para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais sobre o fator de conversão em xilitol.....	106
Tabela 5.42. Análise de variância para verificar as significâncias estatísticas do modelo linear em prever os valores de produtividade volumétrica.....	108
Tabela 5.43. Análise de variância para verificar as significâncias estatísticas do modelo linear em prever os valores de concentração de xilitol.....	108

Tabela 5.44. Análise de variância para verificar as significâncias estatísticas do modelo linear em prever os valores o fator conversão de xilitol.....	108
Tabela 5.45. Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da produtividade volumétrica, bem como seus respectivos níveis de significância.....	108
Tabela 5.46. Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da concentração de xilitol, bem como seus respectivos níveis de significância.....	109
Tabela 5.47. Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição do fator de conversão, bem como seus respectivos níveis de significância.....	109
Tabela 5.48. Fermentação do hidrolisado de palha de cevada realizada em fermentador com capacidade de 1 L sob condições ótimas de cultivo.....	113
Tabela 5.49. Fermentação do hidrolisado de palha de cevada realizada em fermentador com capacidade de 16 L sob condições ótimas de cultivo.....	113
Tabela 5.50. Característica do caldo fermentado com 72 horas de fermentação (A) e após centrifugação (B).....	115
Tabela 5.51. Composição do caldo fermentado durante cada etapa de clarificação e após concentração.....	115
Tabela 5.52. Orçamento dos equipamentos utilizados na produção biotecnológica de xilitol.....	117
Tabela 5.53. Custo direto variável relacionado à produção mensal de xilitol por via biotecnológica.....	120
Tabela 5.54. Custo direto fixo: salários, encargos financeiros e depreciação.....	121
Tabela 5.55. Perspectiva para a produção de xilitol via biotecnológica em 5 anos.....	122

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1. MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	21
2.1.1. PALHA DE CEVADA: PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS.....	23
2.2. HIDRÓLISE DAS FRAÇÕES HEMICELULÓSICA E CELULÓSICA DE MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS.....	24
2.3. TOXICIDADE E TRATAMENTO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO.....	28
2.4. XILITOL	31
2.4.1. PROPRIEDADES E APLICAÇÕES.....	31
2.4.2. MÉTODOS DE OBTENÇÃO DO XILITOL.....	34
2.4.2.1. <i>Obtenção de Xilitol por Via Química.....</i>	<i>34</i>
2.4.2.2. <i>Obtenção de Xilitol por Via Biotecnológica.....</i>	<i>35</i>
2.5. FATORES QUE INTERFEREM NA BIOCONVERSÃO DE XILOSE EM XILITOL.....	38
2.5.1. PRESENÇA DE GLICOSE.....	38
2.5.2. CONCENTRAÇÃO INICIAL DA XILOSE.....	39
2.5.3. PH INICIAL.....	40
2.5.4. OXIGÊNIO.....	41
2.5.5. FONTE DE NITROGÊNIO.....	43
2.5.6. CONCENTRAÇÃO INICIAL CELULAR.....	44
2.6. PURIFICAÇÃO DO CALDO FERMENTADO.....	45
2.7. ESTUDO DE VIABILIDADE ECONÔMICA.....	47
2.7.1. TÉCNICAS DE ANÁLISE DE INVESTIMENTO.....	48
3. OBJETIVO GERAL.....	50
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	50
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE CEVADA.....	51
4.2. HIDRÓLISE HEMICELULÓSICA DE PALHA DE CEVADA.....	51
4.2.1. PLANEJAMENTO FATORIAL 2^{4-1} COM PONTO CENTRAL.....	52
4.2.2. PLANEJAMENTO FATORIAL COMPOSTO DE FACE CENTRADA.....	53
4.2.3. PREPARAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE CEVADA.....	54
4.2.3.1. <i>Concentração</i>	<i>54</i>
4.2.3.2. <i>Destoxificação do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Cevada</i>	<i>55</i>
4.3. HIDRÓLISE CELULÓSICA DE PALHA DE CEVADA.....	55
4.3.1. TRATAMENTO ALCALINO DA CELOLIGNINA.....	55

4.3.2. HIDRÓLISE CELULÓSICA DA PALHA DE CEVADA.....	55
4.4. MICRORGANISMO E PREPARO DO INÓCULO.....	57
4.5. MEIO E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO UTILIZADAS EM FRASCOS ERLLENMEYER.....	57
4.6. CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO UTILIZADAS EM REATOR DE 1L.....	58
4.7. PREPARO DO MEIO FERMENTADO.....	59
4.8. CLARIFICAÇÃO DO CALDO FERMENTADO.....	60
4.9. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	60
4.9.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIGNINA.....	61
4.9.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CELULOSE E HEMICELULOSE.....	61
4.9.3. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS.....	61
4.9.4. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES (XILOSE, GLICOSE E ARABINOSE, XILITOL) E ÁCIDO ACÉTICO.....	62
4.9.5. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE FURFURAL E HIDROXIMETILFURFURAL...	62
4.9.6. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE CLARIFICAÇÃO DO HIDROLISADO E DO CALDO FERMENTADO.....	62
4.9.7. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS.....	63
4.9.8. DETERMINAÇÃO DO PH.....	63
4.9.9. DETERMINAÇÃO DO K_LA INICIAL.....	64
4.9.10. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DA PALHA DE CEVADA.....	64
4.9.11. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR NO MEIO FERMENTATIVO.....	65
4.9.12. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS SOLÚVEIS.....	65
4.9.13. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SÓLIDOS TOTAIS.....	65
4.9.14. DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS.....	66
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
5.1. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE CEVADA.....	68
5.2. HIDRÓLISE HEMICELULÓSICA DA PALHA DE CEVADA.....	69
5.2.1. HIDROLISADO ORIGINAL.....	76
5.2.1.1 <i>Concentração dos Açúcares.....</i>	<i>76</i>
5.2.1.2 <i>Concentração de Compostos Tóxicos Presentes nos Hidrolisados de Palha de Cevada e Valores de Ph.....</i>	<i>78</i>
5.3. HIDRÓLISE CELULÓSICA DA PALHA DE CEVADA.....	80
5.3.1. PRÉ-TRATAMENTO DA PALHA DE CEVADA COM NAOH CONCENTRADO PARA REMOÇÃO DA LIGNINA.....	82
5.4. PROCESSO DE BIOCONVERSÃO PARA OBTENÇÃO DE XILITOL EMPREGANDO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE CEVADA EM FRASCOS ERLLENMEYER.....	92
5.4.1. O SUBSTRATO: HIDROLISADO HEMICELULÓSICO.....	92

5.4.2. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILITOL POR <i>C. GUILLIERMONDII</i> EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE CEVADA EMPREGANDO FRASCOS AGITADOS.....	97
5.5. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILITOL POR <i>C. GUILLIERMONDII</i> EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE CEVADA EMPREGANDO BIORREATOR DE 1L.....	107
5.6. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILITOL POR <i>C. GUILLIERMONDII</i> EM HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE PALHA DE CEVADA EM BIORREATOR DE 16 L.....	117
5.6.1. CLARIFICAÇÃO DO CALDO FERMENTADO.....	118
5.7. ANÁLISE DE VIABILIDADE ECONÔMICO-FINANCEIRA.....	120
5.7.1. BASE DE ESTUDO.....	120
5.7.2. CUSTO DE INVESTIMENTO INICIAL.....	121
5.7.3. CUSTO DE PRODUÇÃO.....	122
6. CONCLUSÕES.....	128
SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	130
REFERÊNCIAS.....	131
APÊNDICES.....	149

1. Introdução

Biomassa lignocelulósica, como os resíduos agroindustriais e florestais, constitui reservas naturais renováveis disponíveis em grandes quantidades e representam uma importante fonte de matéria-prima que pode ser utilizada em processos químicos e biotecnológicos para obtenção de diversos produtos sendo uma alternativa às necessidades eminentes de produção de energia e de alimentos.

Pesquisas relacionadas ao uso sustentável da biomassa vegetal aumentam a cada dia, possivelmente em decorrência do crescimento populacional, os problemas ambientais conseqüentes deste, e demandas crescentes por alimentos e espaço. A destinação incorreta de grande quantidade de resíduos florestais e agro-industriais no meio ambiente é um dos principais problemas a ser resolvido, pois embora biodegradáveis, tem-se observado o aumento nas dificuldades quanto à reciclagem destes materiais. Tais fatores têm contribuído para intensificar a busca do desenvolvimento de tecnologias capazes de evitar a destruição dos ecossistemas bem como de gerar produtos de alto valor agregado a partir destes materiais.

O desenvolvimento de uma tecnologia alternativa para a produção de xilitol, álcool pentahidroxilado de xilose, vem ao encontro da preocupação com o uso sustentável dos recursos naturais, adicionalmente este produto devido às suas características peculiares como poder adoçante semelhante ao da sacarose, anticariogenicidade, metabolismo independente de insulina, profilaxia em otites e fibrose cística como também prevenção de osteoporose, possui grande aplicação em vários segmentos industriais como farmacêutico, odontológico e alimentício.

Apesar do xilitol estar presente em fontes naturais como frutas e vegetais a baixa concentração em que se encontra dificulta a sua extração, devido a esse fator ele é produzido comercialmente por via química, a partir da redução catalítica de uma solução de xilose pura obtida por hidrólise ácida da fração hemicelulósica de resíduos lignocelulósicos ricos em xilana. Este processo é de custo elevado devido a necessidade do emprego de várias etapas de purificação inicial da solução de xilose, porém, uma alternativa a este processo é o emprego de rotas biotecnológicas, em que microrganismos são capazes de converter a xilose presente nos hidrolisados hemicelulósicos da biomassa vegetal em xilitol. Essa alternativa

biotecnológicas e apresenta bastante viável, tanto do ponto de vista econômico (uso de matéria-prima de baixo custo) quanto ambiental (destinação de resíduos).

A obtenção de xilitol por bioprocessos poderá contribuir para o fortalecimento de vários segmentos industriais como o farmacêutico, odontológico e alimentício. No entanto, para que possa o processo biotecnológico ser competitivo ao químico, pré-requisitos devem ser atendidos, destacando-se a seleção de linhagem microbiana fermentadora de xilose, o estabelecimento de condições ideais de hidrólise da fração hemicelulósica da biomassa, a destoxificação adequada do hidrolisado de forma a propiciar a maior remoção de inibidores do metabolismo microbiano. Além disso, a suplementação nutricional mínima do hidrolisado, de forma a não encarecer o meio de fermentação, definição de condições ideais de pH, temperatura, disponibilidade de oxigênio, o estabelecimento de técnicas eficazes de purificação do xilitol e finalmente, um estudo da viabilidade econômica do processo são imprescindíveis para o estabelecimento desta tecnologia.

Pesquisadores do Grupo de Microbiologia e Bioprocessos da Escola de Engenharia de Lorena têm se empenhado no desenvolvimento de pesquisas para atender esses pré-requisitos. Dentre os resultados mais importantes a seleção da levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 para esse bioprocessos; estabelecimento de parâmetros de hidrólise ácida para diferentes materiais lignocelulósicos como: os bagaços de cana-de-açúcar e malte, as palhas de arroz e trigo, resíduos de eucalipto e casca de aveia; bem como a determinação de condições ideais de condução do processo fermentativo e atendimento à exigências da suplementação nutricional do meio para o bioprocessos, visando o alcance da máxima produtividade de xilitol.

Os resultados dessas pesquisas evidenciam que a produtividade volumétrica de xilitol ainda é baixa em relação à observada em fermentações em meios sintéticos, principalmente devido à toxicidade dos hidrolisados à levedura. A purificação e cristalização do xilitol bem como a ampliação de escala do processo são também objetos de pesquisas recentes do grupo.

Quanto aos estudos de viabilidade econômica do processo biotecnológico de xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos não há pesquisas no grupo o que é justamente a proposta do presente projeto.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Materiais Lignocelulósicos

Materiais lignocelulósicos como os resíduos agrícolas e florestais, são acumulados no mundo, anualmente, em grandes quantidades, com conseqüente aumento da poluição ambiental. Os principais componentes orgânicos destes materiais são a celulose, a hemicelulose e a lignina, em proporções que variam de acordo com a espécie vegetal e outras variações biológicas como as diferenças genéticas dentro da própria espécie, tecidos especiais e condições de crescimento (FENGEL; WENEGER, 1989). Os constituintes destes materiais encontrados em menores proporções incluem os extrativos os quais consistem de gorduras, gomas, amidos, alcalóides, resinas e óleos essenciais, entre outros e os não extrativos como sílica, carbonatos e oxalatos. Estes últimos são responsáveis por características como cor, sabor, resistência ao apodrecimento e propriedades abrasivas (KHUAD; SINGH, 1993).

A celulose é um composto orgânico que representa de 40 a 60% dos resíduos sólidos urbanos e pode ser encontrada em abundância nos resíduos florestais e agrícolas, bem como nos resíduos das indústrias de processamento de frutas e vegetais (MANDELS; HONTZ; NYSTROM, 1974). A celulose é um polissacarídeo linear composto de unidades anidroglicosídicas interligadas por ligações β -glicosídicas de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$, em ligações glicosídicas 1, 4, formando a celobiose que se repete várias vezes na cadeia celulose (GOLDSTEIN *et al.*, 1978). A celulose é completamente insolúvel em água, devido à presença de grupos hidroxílicos em cada resíduo de glicose e às inúmeras ligações de pontes hidrogeniônicas. Porém soluções fortes de ácidos e álcalis conseguem dissolver a celulose. A transformação de polímeros como a celulose em glicose é uma etapa fundamental na produção de alimentos, de energia e de produtos químicos e farmacêuticos (FENGEL; WENEGER, 1989). A intenção de se utilizar a celulose para a produção de alimentos, seja por fermentação direta seja por prévia hidrólise ácida, é relativamente antiga. Segundo Dunlap (1975) a Alemanha, na década de 40, utilizava a celulose de madeira para a produção de açúcar.

As hemiceluloses são polímeros ramificados compostos de polissacarídeos de baixa massa molar, associados à parede celular das plantas com a celulose e a lignina (BAMBANESTE, 1995; PULS; SCHUSEIL, 1993). São heteroglicanos constituídos por relativamente poucos resíduos de açúcar, sendo os mais comuns: D-xilose, D-manose, D-galactose, D-glicose, L-arabinose, os quais conferem características aos diferentes tipos de hemicelulose como arabinogalactana, galactoglicomananos, glicomananos e arabinoxilanos (PULS; SCHUSEIL, 1993). O principal componente da fração hemicelulósica dos resíduos agro-industriais é a xilana, polímero constituído por unidades de xilose que pode ser hidrolisado usando ácidos minerais (COWLING, 1975; KHUAD; SINGH, 1993). A xilana possui uma estrutura linear constituída de xilopiranosil unidos por ligações $\beta(1\rightarrow4)$ que são encontradas em todas as plantas terrestres e compreendem a 30% do material da parede celular (VILKARI *et al.*, 1993).

A lignina é um complexo estrutural cujo esqueleto é formado por quatro ou mais unidades de fenilpropano sendo o terceiro maior componente da celulose compreendendo aproximadamente 25%. A lignina serve como um cimento entre as fibras de celulose e hemicelulose, constituindo a principal barreira para hidrólise. A lignina tem estrutura tridimensional e é um polímero de fenilpropano com diferentes ligações entre os monômeros e a estrutura conífera que é constituída por polímeros do álcool coniferil (3-metoxi 4-hidroximetil álcool), álcool sinapil (3, 5 dimetoxi 4-hidroxinamil álcool) e álcool cumarílico (álcool 4-hidroxicumarílico) (GOLDSTEIN, 1978). A lignina sendo insolúvel em água dificulta a degradação microbiana da celulose e da hemicelulose atuando como suporte para as fibras da celulose (FENGEL; WENEGER, 1989; KHUAD; SINGH, 1993).

Diferentes matérias-primas lignocelulósicas podem ser aproveitadas em diferentes bioprocessos como para a produção de xilitol. Segundo Khuad e Singh (1993), a matéria-prima vegetal de interesse econômico é aquela que pode ser utilizada como substrato em diversos processos (fermentativos ou químicos), é produzida em grande quantidade e está diretamente ligada à poluição ambiental. Com estas características se destacam os resíduos agrícolas e florestais como, palhas de cevada, trigo e arroz, resíduos de eucalipto, bagaços de cana-de-açúcar e malte.

2.1.1. Palha de Cevada: Principais características

A cevada é tradicionalmente plantada em países de clima temperado. No Brasil, é uma opção de cultura de inverno para os produtores de grãos da região sul, mas com registros de cultivo também nos estados de Goiás, de Minas Gerais e de São Paulo. Sendo mais precoce e tolerante ao frio que os demais cereais de inverno, a cevada pode ser semeada e colhida mais cedo que os demais grãos (CONAB, 2003).

O grão da cevada é utilizado na industrialização de bebidas (cerveja e destilados), na composição de farinhas para alimentação infantil, na produção de medicamentos e na formulação de produtos dietéticos. A cevada é ainda empregada em alimentação animal como forragem e na fabricação de ração em substituição ao milho, já que ambos são similares em termos de energia (EMBRAPA, 2008).

No caso da cevada brasileira, a malteação tem sido a principal aplicação dada ao grão. Nesse sentido, aproximadamente 85% da cevada produzida é empregada na industrialização de malte, 7% é reservada para semente e 8% na elaboração de rações, quando não alcançam o padrão de qualidade cervejeira. O consumo anual de malte pela indústria cervejeira brasileira está estimado em um milhão de toneladas, sendo que 70% desta demanda é suprida pela importação de malte Argentino, Uruguaio, Canadense ou Europeu (EMBRAPA, 2007).

A cultura de cevada no país está em expansão, apresentando competitividade para continuar crescendo de forma sustentável e atender a indústria do malte. Com isso há o aumento da palha de cevada, que semelhante a outros resíduos agroindustriais é constituída das frações celulósica, hemicelulósica e a lignina. Khuad e Singh (1993) apresentam uma comparação da composição química da palha de cevada e de outros resíduos florestais e agroindustriais (Tabela 2.1).

Tabela 2.1. Composição (%) dos resíduos agrícolas e da madeira

Resíduos	Hexosanas	Pentosanas	Lignina	Cinzas
Palha de Cevada	40	20	15	11
Palha de Arroz	32	24	13	12
Palha de aveia	41	16	11	12
Palha de Sorgo	33	18	15	10
Palha de Trigo	30	24	18	10
Bagaço de cana-de-açúcar	33	30	29	4
“Birch Wood”	40	33	21	4
Casca de Amendoim	38	36	16	5
Casca de Arroz	36	15	19	20
Pinus	41	10	27	8
Sabugo de Milho	42	39	14	2
Serragem	55	14	21	5
Talo de Milho	35	15	19	5

KHUAD e SINGH, 1993

A porcentagem de hemicelulose na palha de cevada é elevada (Tabela 2.1), o que possibilita o seu aproveitamento para obtenção de um hidrolisado com elevado teor de xilose.

Alguns autores relatam a palha de cevada apresenta características similares a outros materiais lignocelulósicos estudados para aproveitamento em bioprocessos. Desta forma, o hidrolisado hemicelulósico desta biomassa poderia ser utilizado como substrato para alguns microrganismos como as leveduras *Candida mogii* ATCC18364 (SIRISANSANEEYAKUL; REUSS, 1992) e *Hansenula polymorfa* (FELIU; GONZALES; MAS, 1990). Os resultados com estas leveduras revelaram a capacidade destes microrganismos em converter xilose em xilitol, o que torna promissor o aproveitamento biotecnológico desta matéria-prima.

2.2. Hidrólise das Frações Hemicelulósica e Celulósica de Materiais Lignocelulósicos

O aproveitamento integral e eficiente de materiais lignocelulósicos pode ser conseguido mediante a separação das suas principais frações componentes em moléculas mais simples (SUN *et al.*, 2004 a;b; 2005).

Processos como hidrólise ácida (CRUZ *et al.*, 2000; FUNK, 1975; IRANMAHBOOB; NADIM; MONEMI, 2002; LADISCH, 1979; MUSSATO; ROBERTO, 2004; NIMZ; CASTEN, 1986; PALMAROLA-ADRADOS *et al.*, 2005; PESSOA Jr. *et al.*, 1997; PURWADI; NIKLASSON; TAHERZADEH, 2004; SUN; CHEN, 2002),

hidrólise enzimática (BISARIA; GHOSE, 1981; PALMAROLA-ADRADOS *et al.*, 2005), explosão à vapor (SCHULTZ *et al.*, 1984; SUN *et al.*, 2004, 2005) e a extração por álcalis (du TOIT; OLIVIER; van BILTON, 1984) permitem a hidrólise da fração hemicelulósica em monossacarídeos. Em cada um destes a biomassa é tratada com o objetivo de reduzir seu tamanho e abrir sua estrutura, preservar as frações hemicelulósica e celulósica, minimizar a formação de produtos de degradação (inibitórios ao crescimento de microrganismos fermentativos) minimizar a demanda de energia e limitar custos (MOISER *et al.*, 2005; SAHA; BOTHAST, 1997).

Segundo Aguilar *et al.* (2002), Funk (1975), Jeffries (1985) e Moiser *et al.* (2005), a hidrólise ácida dos materiais lignocelulósicos permite extrair até 80 % das pentoses presentes na fração hemicelulósica em forma de xilose, o que torna vantajosa a utilização destes materiais como matéria-prima para processos de bioconversão.

O processo de hidrólise ácida pode ser realizado mediante o uso de altas concentrações de ácido mineral, à temperatura ambiente ou a baixas temperaturas, ou pelo emprego de ácido mineral diluído e altas temperaturas e pressões (FUNK, 1975). Entretanto, para a utilização da hemicelulose, uma hidrólise a baixa temperatura e curtos tempos de reação é mais conveniente, pois impede a degradação da xilose e conseqüente a formação de produtos que podem ser fortes inibidores do metabolismo microbiano (Kim; Lee, 1987 citados por DOMINGUEZ *et al.*, 1997; MUSSATO; ROBERTO, 2004; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

Com relação à celulose, alguns fatores podem afetar a sua hidrólise, como a porosidade do material (área superficial acessível), a cristalinidade da fibra celulósica e o conteúdo de hemicelulose e de lignina (McMILLAN, 1994). Segundo esse autor, a presença de hemicelulose e lignina dificulta o acesso a celulose reduzindo, portanto, a eficiência de hidrólise, sendo que a remoção de hemicelulose e lignina, a redução da cristalinidade da celulose e o aumento da porosidade, obtidos através de processos denominados de pré-tratamento, podem melhorar significativamente o processo de hidrólise. O pré-tratamento deve aumentar a liberação de açúcares, impedir ou diminuir a degradação de carboidratos, impedir a formação de subprodutos inibidores dos processos de hidrólise e fermentação subseqüentes e ser viável economicamente. Processos físicos, físico-químicos,

químicos e biológicos têm sido utilizados para o pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos (SUN; CHEN, 2002).

Dessa forma, o processo de fracionamento em dois estágios de materiais lignocelulósicos é o mais indicado para o aproveitamento total dessa biomassa, para o uso da fração celulósica como substrato é necessário separá-la das restrições causadas pelo invólucro hemicelulose-lignina, como também aumentar sua área superficial (DUFF; MURRAY, 1996). No primeiro estágio, ácido diluído pode ser utilizado como catalisador de uma hidrólise limitada, denominada pré-hidrólise, que consiste na hidrólise da fração hemicelulósica, da qual a celulose e a lignina permanecem quase inalteradas (AGUILAR *et al.*, 2002). Os ácidos clorídrico (SPRINGER, 1966), fluorídrico (FRANZ *et al.*, 1982), acético (CONNER; LORENZ, 1986) ou sulfúrico (NGUYEN *et al.*, 1999; NGUYEN *et al.*, 2000) são comumente empregados como catalisadores.

Os ácidos acima citados liberam prótons que quebram as ligações heterocíclicas entre os açúcares monoméricos das cadeias poliméricas formadas pela hemicelulose e celulose. A quebra dessas ligações libera vários compostos, principalmente açúcares como xilose, glicose e arabinose. Outros compostos liberados são oligômeros, furfural e ácido acético. A hidrólise quantitativa da hemicelulose pode ser realizada quase sem nenhum dano a celulose porque as ligações na hemicelulose são mais fracas do que na celulose. Portanto, um resíduo sólido formado por celulose e lignina é obtido na pré-hidrólise (AGUILAR *et al.*, 2002). Este resíduo pode ser utilizado na produção de soluções de glicose para obter etanol ou ácido láctico por fermentação ou para a produção de polpa de papel (DAVID *et al.*, 1985; GRETHLEIN; CONVERSE, 1991).

A hidrólise de materiais celulósicos com ácido diluído tem sido realizada principalmente com ácido sulfúrico. Esse processo tem a vantagem de facilitar a separação do ácido diluído do meio de hidrólise que contém açúcares e do custo da planta do processo ser relativamente baixo (baixo custo do ácido), suficiente para tornar desnecessária uma operação de reciclo (FAN; GHARPURAY; LEE, 1987). Entretanto, o principal inconveniente do uso de ácido sulfúrico é permitir a promoção por este da degradação da glicose em função das altas temperaturas, requeridas para a hidrólise da celulose (BIENKOWSKI *et al.*, 1987; SAEMAN, 1945). A degradação da glicose não apenas diminui o rendimento em açúcares

fermentecíveis provenientes da biomassa, mas forma produtos como hidroximetilfurfural e os ácidos levulínico e fórmico (MOSIER *et al.*, 2001), os quais constituem em impurezas que dificultam a obtenção de uma solução de glicose pura, como também são inibidores do metabolismo microbiano (DELGENES; MOLETTA; NAVARRO, 1996; JEFFRIES; SREENATH, 2000).

As reações de hidrólise de açúcares poliméricos em meio contendo ácido diluído são muito complexas, visto que o substrato está em uma fase sólida e o catalisador em uma fase líquida (AGUILAR *et al.*, 2002). De acordo com Fengel; Weneger (1989) e Carrasco (1991), o mecanismo da reação de hidrólise inclui a difusão dos prótons através da matriz lignocelulósica, a protonação do oxigênio das ligações heterocíclicas entre os açúcares monoméricos, a quebra dessas ligações, a geração de um carbocátion como intermediário, a solvatação desse carbocátion com água, a regeneração do próton com cogeração do açúcar monomérico, oligômero ou polímero, dependendo da posição das ligações e a difusão dos produtos de reação na fase líquida, se isso for permitido pela sua forma e tamanho. Portanto, devido à dificuldade de modelar o processo hidrolítico, modelos empíricos têm sido desenvolvidos (JACOBSEN; WIMAN, 2000).

Vários modelos cinéticos que descrevem a hidrólise da celulose foram analisados por Jacobsen, Wiman (2000). Segundo esses autores, esses modelos predizem que o rendimento em glicose aumenta com o aumento da concentração ácida e da temperatura, e estes fatores de reação levam a degradação da celulose a materiais não reativos e a perda da glicose em vários produtos de degradação. Além disso, nenhum deles prevê um rendimento superior a 70% do rendimento teórico.

A redução da granulometria da celulose também é considerada um tipo de pré-tratamento que pode aumentar a digestibilidade da biomassa. A fragmentação do material lignocelulósico pode ser obtida através de diminuição mecânica (picagem, moagem ou prensagem) o que pode reduzir a porção cristalina da celulose (SUN; CHEN, 2002). A redução do tamanho praticamente não acrescenta nenhum valor à matéria-prima, mas requer gasto de energia e pode aumentar significativamente o custo total do processo. Conseqüentemente, considerável atenção tem sido dispensada aos processos de picagem e moagem, considerados como a tecnologia mais barata para obter partículas compatíveis ao subsequente tratamento escolhido (DUFF; MURRAY, 1996). A energia requerida para diminuição

mecânica dos resíduos agroindustriais depende do tamanho final da partícula e das características da biomassa (CADOCHÉ; LOPEZ, 1989).

Bouchard *et al.* (1989), sugerem que apenas cerca de 60-70% do rendimento teórico em glicose a partir da celulose pode ser obtido usando reator “plug-flow”, porque a celulose é quimicamente alterada após cerca de 70% de conversão. Segundo este autor, o substrato sólido resultante não é quantificado como celulose e pode não mais ser hidrolisado para liberar glicose. De acordo com Mok; Antal; Varhegyi (1992), estudos sobre a hidrólise ácida da celulose empregando 4% de ácido sulfúrico em reator de percolação, revelaram que cerca de 30% da celulose hidrolisada dá origem a oligômeros, os quais não podem ser convertidos em glicose, devido à temperatura da reação ou ao uso das condições usuais de hidrólise.

2.3. Toxicidade e Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico

A via biotecnológica de obtenção de xilitol a partir da biomassa vegetal apresenta limitações quanto à eficiência e produtividade do processo fermentativo devido à presença de compostos inibidores do metabolismo microbiano nos hidrolisados hemicelulósicos empregados na formulação dos meios de fermentação. Estes incluem produtos da degradação da hemicelulose (furfural e hidroximetilfurfural), produtos da degradação da lignina, produto de radicais acetila presentes em algumas hemiceluloses (ácido acético) e metais pesados provenientes do equipamento da hidrólise (cobre, cromo, ferro, níquel) também são encontrados no hidrolisado. O modo de ação destes inibidores sobre o desempenho das leveduras tem sido estudado, o qual depende principalmente da concentração destes no hidrolisado que por sua vez depende da origem da matéria prima e das condições da hidrólise (LOHMEIR-VOGER *et al.*, 1998).

Fermentações conduzidas com *C. guilliermondii* na presença de furfural e hidroximetilfurfural demonstraram que os referidos compostos inibiram o crescimento celular quando se encontraram nas concentrações de 1,0 a 1,5 g/L, respectivamente (SANCHEZ; BAUTISTA *et al.*, 1988). No entanto, segundo FELIPE *et al.* (1996) o ácido acético foi o composto mais tóxico, presente no hidrolisado de eucalipto. Esse ácido vem sendo apontado como forte inibidor do metabolismo de xilose em xilitol, quando em concentrações acima de 3,0 g/L (FELIPE *et al.*, 1995). Sua ação

inibitória tem sido atribuída à sua concentração na forma não dissociada, que depende do pH do meio (NODA; HAYASHI; MIZUNUNA, 1982; HERRERO *et al.*, 1985). Sua toxicidade é aumentada em condições de baixo pH, devido à maior proporção de moléculas não dissociadas em relação ao meio com pH próximo ao neutro (NODA; HAYASHI; MIZUNUNA, 1982).

Segundo Clark e Mackie (1984), dentro os inibidores do metabolismo da xilose, os produtos da decomposição da lignina são mais tóxicos que o furfural e o hidroximetilfurfural. Esses autores constataram que estes compostos, presentes no meio de cultivo em concentrações menores que 0,1 g/L, possuem uma elevada potencialidade inibitória.

Segundo Rui-Ordaz *et al.* (1998) a presença de fenol na faixa de 100 a 400 ppm inibiu o crescimento de *C. tropicalis*.

O efeito inibitório dos compostos sobre a atividade microbiana é minimizado com tratamentos adequados dos hidrolisados que visam a melhorar o potencial de suas utilizações na formulação de meios empregados em bioprocessos. Entre eles a adsorção por carvão ativo e retenção em resinas de troca iônica (MADDOX; MURRAY, 1983), neutralizando-se o pH do hidrolisado com adição de ácidos e bases (ROBERTO *et al.*, 1991), e utilizando células adaptadas ao hidrolisado (CHEN; GONG, 1995; FELIPE *et al.*, 1996a).

Algumas destas técnicas encarecem o processo, sendo que dependendo do tipo de hidrolisado, seu uso pode se tornar economicamente inviável. Além disso, devido a presença nos hidrolisados de compostos tóxicos com diferentes propriedades físico-químicas, a maioria destes tratamentos, quando usados separadamente, não são eficazes para remover ou reduzir as concentrações de todos esses compostos a níveis que permitam o desenvolvimento do processo de bioconversão (GINORIS, 2001).

Em função da presença nos hidrolisados hemicelulósicos, de compostos tóxicos aos microrganismos, diferentes métodos químicos, físicos e biológicos tem sido empregados para a remoção destes de forma a favorecer a fermentabilidade dos hidrolisados como a alteração de pH, por meio da adição de ácidos e bases (ROBERTO *et al.*, 1991), a combinação da alteração de Ph e adsorção em carvão vegetal ativado (ALVES *et al.*, 1998; MARTON, 2002), a combinação da adsorção

em carvão vegetal e resinas de troca iônica (CARVALHO JUNIOR, MARTON, FELIPE, 2005) e a floculação por polímeros vegetais (SILVA *et al.*, 2006).

Roberto *et al.* (1991) avaliaram a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, obtido por “steam explosion”, pelo método de alteração de pH, o qual consistiu na elevação deste por meio da adição ao hidrolisado de um álcali, seguida da sua redução com ácido e verificaram a melhoria da fermentabilidade do hidrolisado após este procedimento. Segundo estes autores, o tratamento empregado proporcionou a remoção de compostos fenólicos que foi favorecida pela presença de íons cálcio devido à base utilizada no tratamento. Comportamento semelhante foi encontrado por Alves *et al.* (1998), avaliando a metodologia de alteração de pH combinada à adsorção com carvão vegetal, na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, porém obtido por hidrólise ácida. Esses autores atribuíram aos íons cálcio presente no meio, a capacidade de perda de compostos tóxicos aos microrganismos, ocorrida durante a precipitação, após o ajuste de pH do hidrolisado com óxido de cálcio. Para Martinez *et al.* (2001), o tratamento pela alteração de pH do hidrolisado contribuiu para a precipitação de compostos aromáticos e para a conversão de furfural em álcool furfurílico, enquanto Amartei e Jefries (1996) relataram que os açúcares podem ser também degradados durante o processo.

Marton (2002), ao avaliar a destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, também obtido por hidrólise ácida, pela metodologia de alteração de pH combinada à adsorção em carvão vegetal ativado, constatou que este procedimento reduziu a concentração de compostos fenólicos, porém propiciou a remoção, também, da xilose.

A utilização de resinas de troca iônica também tem sido empregada para o tratamento de hidrolisados hemicelulósicos, e seu mecanismo de atuação deve-se à capacidade destas de adsorver diversos subprodutos do hidrolisado, e também de clarificação do mesmo (CANILHA *et al.*, 2004; MARTON, 2005). Em trabalho realizado por Carvalho Junior; Marton; Felipe (2005), no qual se utilizou combinação de resinas e carvão, verificou-se a eficácia deste procedimento na remoção de 95% de fenóis com conseqüente melhoria da fermentabilidade do hidrolisado de bagaço, porém ocorreu perda de 40% de D-xilose, o qual é indesejável.

Na busca de métodos mais eficientes e de baixo custo para o tratamento do hidrolisado de bagaço de cana, pesquisas se iniciaram com a utilização de polímeros vegetais (SILVA, 2006). Os polímeros à base de tanino vegetal podem ser empregados como um tratamento alternativo, a fim de remover compostos tóxicos do hidrolisado hemicelulósico, uma vez que estes polímeros possuem capacidade de se ligarem às proteínas, insolubilizando-as, além de formarem complexos com metais e removerem fenóis de efluentes e águas, bem como de serem biodegradáveis, de baixo custo e de fácil manipulação (ACQUAQUÍMICA, 2008 a e b). Em trabalhos recentes, utilizando estes polímeros para a destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana, obtido da moagem artesanal durante preparo de caldo de cana, foi constatada a capacidade destes de removerem valores superiores a 80% de compostos fenólicos e íons metálicos, sem perda significativa de xilose (SILVA, 2006).

Uma vez realizada a destoxificação dos hidrolisados hemicelulósicos, estes podem ser eficientemente empregados em processos de bioconversão de xilose em xilitol.

2.4. Xilitol

2.4.1. Propriedades e Aplicações

O uso de adoçantes vem aumentando a cada dia, pois estes compostos promovem ou transmitem sabor doce aos produtos alimentícios, oferecem benefícios psicológicos e fisiológicos. Dentre os adoçantes nutritivos encontra-se o xilitol que também auxilia na redução e manutenção do peso, redução de cáries e de riscos associados com a obesidade e controle da diabetes (VALERIE *et al.*, 1998; CCC, 2008).

O xilitol, um álcool pentahidroxilado de xilose, possui fórmula empírica $C_5H_{12}O_5$ e é um produto intermediário do metabolismo de carboidratos nos seres humanos e em animais (MAKINEN, 2000; MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973; YLIKAHRI, 1979). Este pentiol é encontrado em frutas e vegetais, porém em concentrações muito baixas comparadas à concentração de sacarose em cana-de-açúcar, sendo antieconômica a sua extração a partir dessas fontes (EMODI, 1978; BISWAS; VASHISHTHA, 1998).

Dentre as propriedades físico-químicas do xilitol encontram-se o poder adoçante equivalente ao da sacarose. Consumido em forma sólida, produz um frescor devido a seu calor de solução altamente negativo (-34,6 cal/g). Outras propriedades físico-químicas do xilitol estão descritas na Tabela 2.2 segundo dados apresentados por Aminoff; Vanninen; Doty (1978); Biswas; Vashishtha (1998); Hyvonen; Koivistoinen; Voirol (1982) e Ullmanns (1998). Por outro lado, o xilitol, devido à sua relativa baixa velocidade de absorção no intestino, apresenta propriedades laxantes e, se consumido em grandes quantidades, pode causar diarreia osmótica (CURTAYRES, 1980; DUFFY; ANDERSON, 1998; EMODI, 1978; GRENBY; COLLEY, 1983; MÄKINEN, 2000). Este efeito varia entre indivíduos e com a forma em que o xilitol é consumido, sendo comparado ao sorbitol e a outros carboidratos de baixa absorção. O nível de tolerância é de 20 a 30 g/dose ou 50 g/dia, podendo ser aumentado se for ingerido em várias refeições diárias (AMINOFF; VANNINEN; DOTY, 1978; EMODI, 1978; MÄKINEN, 2000; SANROMÁN *et al.*, 1991).

Tabela 2.2. Propriedades físico-químicas do xilitol

Propriedades	
Massa molar	152,15
Aparência	Cristal branco
Odor	Inodoro
Sabor	Doce
Ponto de ebulição (°C)	216
Ponto de fusão (°C)	92-95
Solubilidade (30 °C)	65 – 68 g / 100 g solução Abaixo desta temperatura é menos solúvel que a sacarose, maiores temperaturas é mais solúvel. 1,2 g/100g de solução 96 % etanol 6,0 g/100g de solução 96 % metanol
pH em água	5 – 7
Calor de solução (kcal/g)	- 34,6
Calor de cristalização (cal/g)	45,3
Viscosidade (cP)	μ (% sol.) = 0.497 e 0.7152 %sol. 10-60 % solução
	μ (T) = 32,27 T $^{-1.4267}$ T = 20-80°C
Índice de refração (25°C)	IR = 0,0165 %sol. + 1,3295 10 – 50 % solução
Estabilidade	Alta estabilidade microbiológica
Densidade (g/cm ³)	ρ = 0.068 %sol. + 0,95 10 – 60 % solução
Higroscopicidade	Tem umidade crítica relativa alta, o xilitol é mais higroscópico que a sacarose, mas menos que o sorbitol.
Atividade ótica $[\alpha]_D^{20}$	Não produz rotação do plano de luz polarizado

Devido à ausência de grupos aldeídicos ou cetônicos na molécula, o xilitol não participa de reação de escurecimento do tipo Maillard (EMODI, 1978; MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973). Esta propriedade é desejada no processamento de alimentos a temperaturas elevadas, no qual essa reação é indesejável. O xilitol pode também substituir a lactose em alguns alimentos, podendo ser aplicado em casos de indivíduos intolerantes a este açúcar (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973).

O xilitol é metabolizado independentemente da insulina, e flutuações súbitas nos níveis de glicose no sangue. É não cariogênico, pois não é metabolizado por microrganismos presentes na flora bucal, como por exemplo, *Streptococcus mutans*. Segundo Mäkinen (2000) este comportamento pode ser devido à ausência na estrutura de grupos carbonilos, aldeídico ou cetônico, o microrganismo não pode produzir ácidos que podem ser metabolizados a partir de D-glicose. Além disso, também é capaz de inibir o desenvolvimento de cáries existentes (cariostático), reduzir a gengivite e controlar a halitose (IWATA *et al.*, 2003; MÄKINEN, 1979; MÄKINEN, 2000; NOTHENBERG, 1994). Por outro lado, segundo Mäkinen (1979), o consumo deste poliol está associado a um ligeiro incremento nos níveis de atividade das glicosidases salivares, enzimas que produzem uma película fina que protege o esmalte dos dentes. Pode ser também empregado como substituto do açúcar na dieta de pacientes portadores de *diabetes mellitus*, bem como ser utilizado por pessoas com doenças biliares e renais, e também por pacientes obesos, uma vez que exerce um efeito normalizante sobre o metabolismo das gorduras (MANZ; VANNINEN; VOIROL, 1973).

Segundo Wang; van Eys (1981) o xilitol pode ser utilizado também no tratamento de portadores de insuficiência de glicose 6-fosfato desidrogenase, a qual pode ocasionar anemia hemolítica. Este poliol é usado como componente nas transfusões de sangue para evitar choques após cirurgias (FUNK, 1975; MÄKINEN, 2000). Segundo Biswas, Vasshishtha (1998), este poliol tem sido usado como tópico no tratamento do aumento da pressão intra-ocular, e quando preparado em complexos com cálcio numa relação molar xilitol:cálcio de 1:5 o xilitol pode incrementar a absorção/retenção intestinal de cálcio.

O xilitol, em combinação com glicóis, é utilizado no campo da traumatologia para preparar poliésteres ramificados, como por exemplo, o hidroxipropil-xilitol, cujas propriedades mecânicas e termofísicas são semelhantes às das espumas de

poliuretano, usadas para a imobilização de lesões traumatológicas (SANROMÁN *et al.*, 1991). Além disto, Biswas, Vasshishtha (1998) referem-se ao uso de xilitol em preparação de cosméticos, pois ajudam a restaurar o balanço da flora da pele inibindo o crescimento de germens patogênicos.

Estas e outras propriedades tornam o xilitol um produto de grande valor para indústrias alimentícia, farmacêutica e odontológica.

2.4.2. Métodos de Obtenção do Xilitol

O xilitol pode ser obtido pela extração sólido-líquido de frutas e vegetais, porém esta forma não é vantajosa devido às baixas concentrações (90 mg/100 g) encontradas nestas fontes (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982; PEPPER; OLINGER, 1988).

No entanto, para a produção do xilitol a partir da D-xilose emprega-se a síntese química, através da hidrogenação catalítica da xilose ou redução eletrolítica. Outra possibilidade é o bioprocessos, no qual podem ser empregados microrganismos como leveduras e bactérias assimiladoras de pentoses e, ainda enzimas como catalisadores do processo (HEIKKILÄ *et al.*, 1990; HEIKKILÄ *et al.*, 1991; HEIKKILÄ *et al.*, 1992; MIKKOLA, 1999; OJAMO; YLINEN; LINKO, 1988).

2.4.2.1. Obtenção de Xilitol por Via Química

Para fins comerciais, o processo químico é a forma pelo qual o xilitol é atualmente produzido através da hidrogenação catalítica da xilose, obtida por hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos (JAFFE; SZKRYBALO; WEINERT, 1974).

Este processo envolve a etapa de obtenção da xilose, que pode ser feita através da hidrólise ácida do material lignocelulósico rico em xilana, ou por hidrólise enzimática, empregando enzimas com alta atividade xilanolítica e celulolítica (BISARIA; GHOSE, 1981). Posteriormente, realiza-se a purificação do hidrolisado para se obter uma solução de xilose pura, condição essencial para o sucesso do processo de hidrogenação (MIKKOLA, 1999). Este procedimento de purificação inclui operações com resinas de troca iônica, descoloração e fracionamento

cromatográfico (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998). A etapa seguinte compreende a hidrogenação catalítica da xilose purificada na presença do catalisador níquel-Raney. Segundo Mikkola (1999) esta reação é realizada industrialmente em processos isobáricos ou isotérmicos em reatores trifásicos funcionando em batelada. Este processo é em princípio uma reação direta de xilose em xilitol, dificultado pela formação de de subprodutos em dependência do pH do meio de reação e da temperatura. Mikkola (1999) descreve que após vários ciclos de hidrogenação se observa o envenenamento e desativação do catalisador devido ao colapso da estrutura de poros, lixiviação dos promotores (Ni e/ou alumina) e acúmulo dos materiais orgânicos sobre a superfície do catalisador.

O material hidrogenado é purificado mediante filtração e cromatografia e, posteriormente, é realizada a cristalização do xilitol (HEIKKILÄ *et al.*, 1990; HEIKKILÄ *et al.*, 1991; HEIKKILÄ *et al.*, 1992; MELAJA; HÄMÄLÄINEN, 1977;).

Devido às características peculiares do processo catalítico e às várias etapas de purificação, o produto final possui elevado custo (HEIKKILÄ *et al.*, 1990; HEIKKILÄ *et al.*, 1991; HEIKKILÄ *et al.*, 1992). Estas características do processo químico abrem caminhos para o estudo de novas tecnologias para a obtenção de xilitol.

2.4.2.2. Obtenção de Xilitol por Via Biotecnológica

A via biotecnológica como uma alternativa à via química de obtenção de xilitol a partir de microrganismos capazes de metabolizar a xilose presente nos hidrolisados hemicelulósicos pode ser sintetizada como no esquema apresentado na Figura 2.1.

Figura 2.1. Obtenção de xilitol através da via química e biotecnológica (SILVA *et al.*, 2003)

Diferentes microrganismos são capazes de converter xilose em xilitol como: bactérias, fungos filamentosos e leveduras, sendo este último o mais estudado para este bioprocessos (FELIPE, 2004). Algumas das leveduras selecionadas para a produção de xilitol são: *C. guilliermondii* (BARBOSA *et al.*, 1988; FELIPE *et al.*, 1993; ROBERTO *et al.*, 1994; SILVA *et al.*, 1996a), *C. mogii* (SIRISANSANEEYAKUL; STAISZEWSKI; RIZZI, 1995) e *C. tropicalis* (SIRISANSANEEYAKUL; STAISZEWSKI; RIZZI, 1995);

Pesquisas quanto à obtenção de xilitol a partir da xilose se iniciaram em 1966 quando Onishi e Suzuki (1966) selecionaram várias leveduras produtoras de xilitol, descrevendo a atividade bioquímica de enzimas envolvidas no passo inicial do metabolismo de xilose e conversão desta em xilitol como a xilose redutase (E.C.1.1.1.21), enzima que catalisa a redução da xilose em xilitol na presença dos cofatores NAD(P)H (BARNETT, 1976; JEFFRIES, 1983) e xilitol desidrogenase a

qual requer o NAD (P)⁺ como cofator e oxida xilitol em xilulose (SLININGER; BOLEN; KURTZMAN, 1990).

A xilulose obtida é fosforilada a xilulose 5-fosfato, que na via das fosfopentoses, é convertida em frutose-fosfato. A frutose-fosfato pode ser convertida em piruvato, através da conexão com a via Embden Meyerhoff Parnas (EMP) ou retornar à via das fosfopentoses (NOLLEAU *et al.*, 1993; ROSEIRO *et al.*, 1991; TAYLOR *et al.*, 1990; WEBB, LEE, 1990;).

O metabolismo da xilose em leveduras pode ser direcionado para o processo respiratório ou fermentativo em função da disponibilidade de oxigênio no meio de fermentação (VANDESKA *et al.*, 1995). Segundo Nolleau; Preziosi-Belloy; Navarro (1995), este comportamento metabólico deve-se, em geral, à existência de diferenças no requerimento dos cofatores necessários para a atividade das enzimas específicas do metabolismo da xilose, sendo que o NADPH é requerido pela xilose redutase, enquanto a xilitol desidrogenase requer NAD⁺ para sua atividade catalítica. Conforme relatado por Taylor *et al.* (1990) o NADH produzido é oxidado na cadeia respiratória, onde o oxigênio participa como acceptor final de elétrons.

Desta forma, a formação de xilitol é favorecida sob condições limitadas de oxigênio, como consequência do acúmulo intracelular de NADH, o que resulta na inibição da xilitol desidrogenase NAD⁺ dependente. Este fenômeno surge da incapacidade das leveduras para compensar o excesso intracelular de NADH, uma vez que estes microrganismos carecem de atividade transhidrogenase (van DIJKEN, SCHEFFER, 1986) citados por Winkelhausen; Kusmanova (1998).

Conforme relatado por Furlan *et al.* (1991), condições excessivas de oxigênio ativam o Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (CAT) e o sistema de transporte de elétrons onde o NAD⁺ é regenerado, tornando possível a transformação do xilitol em xilulose, que adicionalmente é degradada através da via das fosfopentoses e Embden-Meyerhoff-Parnas, resultando na formação de piruvato. Em consequência, menos xilitol é acumulado no meio. Laplace *et al.* (1991) citados por Winkelhausen; Kusmanova (1998) sugeriram que na presença de oxigênio o piruvato é oxidado completamente através do CAT, resultando em um aumento da massa celular.

Em diversas pesquisas tem sido constatado a formação de etanol, glicerol e arabitól, dentre outros compostos, como subproduto do metabolismo de xilose conforme verificado durante a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii*

(VAZ, 2007). Isto, segundo Nollet; Preziosi-Belloy; Navarro (1995) pode ser devido ao fato de que em condições limitadas de oxigênio a célula regenera o NADH através da formação destes compostos.

Nos últimos anos têm sido desenvolvidas inúmeras pesquisas com a finalidade de aumentar a produção de xilitol por via microbiológica. Os trabalhos centram-se no estudo de diversos fatores que influenciam a bioconversão de xilose em xilitol tais como a concentração inicial de xilose (FELIPE *et al.*, 1997a; MEYRAL *et al.*, 1991; NOLLEAU *et al.*, 1993), a presença de glicose no meio de fermentação (BICHO *et al.*, 1988; SILVA, 2004; GÍRIO *et al.*, 2000; SUGAI, DELGENES, 1995), a fonte de nitrogênio (BARBOSA *et al.*, 1988), o pH (FELIPE *et al.*, 1997a; SLININGER; BOLEN; KUTZMAN, 1990), a temperatura (BARBOSA *et al.*, 1988, CONVERTI *et al.*, 2001) a disponibilidade de oxigênio (ACOSTA; SILVA; FELIPE, 2000), a concentração de células no inóculo (FELIPE *et al.*, 1997b; ROBERTO; SATO; MANCILHA, 1996) e o efeito dos compostos inibidores formados durante o processo de hidrólise dos materiais lignocelulósicos (CLARK, MACKIE, 1984; LARSSON *et al.*, 1999, LARSSON *et al.*, 2000).

2.5. Fatores que Interferem na Bioconversão de Xilose em Xilitol

Para a utilização de hidrolisados hemicelulósicos na formulação de meios de cultura para a produção microbiológica de xilitol, diversos fatores que este bioprocessos devem ser considerados como a presença de glicose, a concentração de açúcares iniciais no meio, o tipo de material lignocelulósico, o pH, a temperatura, o fornecimento de oxigênio, a fonte de nitrogênio, concentração de inóculo, a concentração de inibidores presentes nos hidrolisados e a forma de condução do processo (FELIPE, 2004).

2.5.1. Presença de Glicose

A presença de glicose junto à xilose no meio de fermentação pode ser considerada fator limitante da bioconversão de xilose em xilitol com conseqüente redução do consumo de xilose e da produtividade de xilitol em função da repressão catabólica exercida por esta hexose (BICHO *et al.*, 1988; YAHASHI *et al.*, 1996).

Felipe *et al.* (1993), cultivando a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado de bagaço de cana, verificaram que o efeito da glicose estava relacionado à relação glicose/xilose presente no meio. De acordo com estes autores quanto maior esta proporção maior a inibição causada pela glicose, enquanto em concentrações iniciais de glicose inferiores à 10% de xilose, a produção de xilitol não foi afetada.

Segundo Gírio *et al.* (2000), altas concentrações de glicose resultam em diminuição das atividades enzimáticas de xilose redutase e xilitol desidrogenase, enzimas-chave da bioconversão de xilose em xilitol. Segundo estes autores, este comportamento é acompanhado do consumo mais rápido de glicose, precedente ao consumo de xilose, nas primeiras horas de fermentação. Lee *et al.* (2003) observaram que, em um processo fermentativo contendo estas duas fontes de carbono a glicose é usada como fonte de energia para crescimento celular e como um co-substrato para regeneração de cofatores, enquanto a xilose é utilizada prioritariamente para a conversão em xilitol.

Silva *et al.* (2004) também relataram que o efeito repressor da glicose sobre o metabolismo de xilose é dependente da proporção entre os dois açúcares. Estes autores avaliaram a bioconversão de xilose em xilitol por *C. guilliermondii* a partir da adição de glicose do meio em diferentes concentrações e constataram o favorecimento deste bioprocessos com o aumento da proporção glicose/xilose sendo que quando esta proporção foi 1:5 o rendimento e a produtividade de xilitol aumentou em 15 e 20% respectivamente, em relação ao meio sem adição de glicose.

2.5.2. Concentração Inicial da Xilose

A concentração inicial da xilose no meio de fermentação exerce grande influência sobre a produção de xilitol por leveduras, sendo que quando a concentração de xilose se encontra na faixa entre 60 e 80 g/L a produção de xilitol é favorecida. Entretanto, o aumento excessivo da concentração de xilose provoca um decréscimo na velocidade de crescimento do microrganismo, com conseqüente queda na produção de xilitol (SILVA; AFSCHEER, 1994).

Segundo Gong; Chen; Tsao (1981), a produção de xilitol por *C. tropicalis* em meio YME (extrato de levedura, extrato de malte, peptona, xilose) foi favorecida pelo aumento da concentração de xilose de 50 para 200 g/L. Entretanto, em

concentrações de xilose superiores a 300 g/L, verificou-se a interferência negativa na produção de xilitol. Vandeska *et al.* (1995) constataram que a produção de xilitol por *C. boidinii* em meio sintético (sulfato de amônio, uréia, ácido casamino e xilose) aumentou significativamente quando a concentração inicial de xilose foi aumentada de 20 para 150 g/L. Entretanto concentrações iniciais de xilose de 200 g/L provocaram um decréscimo na concentração de xilitol. Felipe *et al.* (1997b) utilizando *C. guilliermondii* FTI 20037 nas fermentações de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, observaram que o aumento da concentração inicial de xilose de 37,6 g/L para 54,5 g/L resultou em aumentos de 40%, 20% e 44%, na concentração de células, fator de conversão de xilose em xilitol e na produtividade volumétrica em xilitol, respectivamente. Porém, o aumento da concentração inicial de xilose para 74,2 g/L reduziu a concentração celular e a produtividade de xilitol. Silva e Roberto (2001), utilizando hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz para produção de xilitol com a mesma levedura, determinaram uma máxima concentração inicial de xilose da ordem de 80 g/L, de forma a se evitar problemas de inibição com conseqüente queda nas taxas de bioconversão.

2.5.3. pH Inicial

Outro fator importante na bioconversão de xilose em xilitol é o pH do meio de fermentação. O efeito do pH em fermentações de hidrolisados hemicelulósicos pode estar relacionado com a presença de compostos inibitórios, principalmente o ácido acético, considerado potente inibidor do crescimento de vários microrganismos (KUSUMEGI; YOSHIDA; TOMIYAMA, 1998).

Várias pesquisas tem avaliado o efeito do pH de fermentação durante o cultivo de *C. guilliermondii* em hidrolisados hemicelulósicos de diferentes materiais lignocelulósicos. Felipe *et al.* (1997a), estudando o efeito do pH sobre a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar, constaram a inibição do consumo de glicose, xilose e arabinose, bem como da produção de xilitol e células em pH inferior a 4,5. Porém, o aumento do pH de fermentação favoreceu a produção de xilitol encontrando-se o máximo fator de conversão de xilose em xilitol (0,75 g/g) e uma produtividade volumétrica de 0,57 g/L.h nas fermentações realizadas em pH 5,5. Martínez *et al.* (2003) também avaliando a fermentação do hidrolisado

hemicelulósico de bagaço de cana os máximos valores de fator de conversão de xilose em xilitol (0,69 g/g), produtividade volumétrica de xilitol (0,68 g/L.h) e uma concentração de xilitol de 18,0 g/L quando o pH da fermentação foi 6,7.

Roberto *et al.* (1996b) também estudaram diferentes valores de pH inicial para a fermentação em hidrolisado de palha de arroz, e constaram que em pH 5,3 foram alcançados valores de concentração de xilitol (36,92 g/L), fator de conversão de xilose em xilitol (0,68 g/g) e produtividade volumétrica de xilitol (0,51 g/L.h). Canettieri; Almeida e Silva; Felipe (2001) também estudaram o efeito do pH sobre a produção de xilitol, porém em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, e verificaram que os máximos valores de concentração de xilitol (10,0 g/L), fator de conversão de xilose em xilitol (0,2 g/g) e produtividade volumétrica em xilitol (0,1 g/L.h) foram obtidos com um pH inicial de fermentação igual a 8,0.

2.5.4. Oxigênio

A aeração é fator limitante na produção de xilitol por leveduras (MOLWITZ *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 1996). O oxigênio fornecido através da aeração é utilizado na respiração, transporte de açúcar, regeneração de coenzimas, produção de ATP durante a fosforilação oxidativa e no incremento da massa celular. Pequenas alterações na disponibilidade de oxigênio ocasionam mudanças no metabolismo da levedura e consequentemente alteram a excreção de xilitol. Segundo Jeffries (1983), esta influência parece estar relacionada com a regeneração dos cofatores essenciais para a atividade das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase e, também, com a produção de ATP durante a fosforilação oxidativa.

Em condições aeróbias ocorre a maior produção de massa celular, enquanto que em condições limitadas de oxigênio, uma grande parte da xilose é convertida em xilitol (GROOTJEN; van der LANDS; LUYBEN, 1991; LIGHTELM; PRIOR, du PREEZ, 1988; WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998). A dependência do comportamento fermentativo das leveduras em relação à disponibilidade de oxigênio pode ser devido ao fato de que sob condições anaeróbias, ou em taxas de transferência de oxigênio muito baixas, o sistema de transporte de elétrons é incapaz de oxidar completamente o NADH intracelular, ocasionando um aumento de sua concentração e consequente alteração das concentrações de NADH e NAD⁺,

permitindo a excreção de xilitol, enquanto o aumento da taxa de transferência de oxigênio favorece a fermentação de xilose. Este fato pode ser devido ao papel do oxigênio como aceptor final de elétrons, que alivia a desproporção dos dois passos iniciais do metabolismo anaeróbio de xilose. Esta hipótese está sustentada pela relação inversa entre o grau de aeração e a produção de xilitol observada em algumas leveduras. Por outro lado, quando o oxigênio é fornecido em excesso, ocorre um desvio no fluxo de piruvato, resultando em uma alta produção de massa celular (Laplace *et al.*, 1991, citado por WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

Altos rendimentos em xilitol são observados sob condições de aeração e agitação apropriadas (SILVA *et al.*, 1997). Estudos realizados por Silva *et al.* (1996) relatam que a produtividade volumétrica de xilitol por *C. guilliermondii* foi favorecida em 288 %, pelo aumento da agitação de 200 (k_{La} 5,3 h⁻¹) para 300 rpm (k_{La} 10,6 h⁻¹). Entretanto, o aumento para 400 rpm (k_{La} 41 h⁻¹) provocou um incremento de 22 % no consumo de xilose e uma diminuição de 71 % na produtividade volumétrica em xilitol. Silva; Quesada-Chanto; Vitolo (1997), em fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar pela levedura *C. guilliermondii*, obtiveram maiores valores de produtividade volumétrica (0,87 g/L.h) e conversão de xilose em xilitol (0,67 g/g), com coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio igual a 27 h⁻¹ e agitação de 400 rpm. Morita; Silva (2000) estudaram o efeito da aeração na produção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana cultivando *C. guilliermondii* FTI 20037, e observaram que os máximos valores de produtividade volumétrica (0,72 g/L.h) e concentração de xilitol (928,6 g/L) foram obtidos com uma aeração de 3,0 vvm e agitação de 300 rpm (k_{La} =22,5 h⁻¹). Aguilar Jr *et al.* (2002), em estudos da fermentação de D-xilose por *C. guilliermondii*, reportaram maiores valores de produtividade volumétrica em xilitol (1,52 g/L.h) com maior aeração (100 h⁻¹) e maior concentração inicial celular (4 g/L). Martinez *et al.* (2003), durante a fermentação contínua de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, reportaram que a produtividade volumétrica em xilitol não foi influenciada significativamente pelo nível de aeração (10 e 30 h⁻¹). SANTOS *et al.* (2005), em estudos da produção de xilitol por células imobilizadas de *C. guilliermondii* em reator de leito fluidizado reportaram que, maiores níveis de aeração (0,093 h⁻¹) e de concentração de xilose (125 g/L) provocaram menores valores de rendimento (0,21 g/g) e de produtividade volumétrica em xilitol (0,18 g/L.h). Por outro

lado, foi obtida uma maior concentração celular (23,9 g/L) o qual indica que o metabolismo celular foi dirigido preferencialmente para a produção de biomassa celular.

A aeração afeta significativamente a assimilação de ácido acético pelas leveduras sendo o grau de inibição do metabolismo da xilose por este ácido, relacionado a sua concentração e a disponibilidade de oxigênio (du PREEZ; MEYER; KILIAN, 1991; FELIPE *et al.*, 1996). van Zyl; Prior; du Preez (1991), observaram um efeito favorável da aeração sobre o consumo de ácido acético e xilose pela levedura *Pichia stipitis*, com diminuição de 56 % da produtividade volumétrica em etanol, de 17 % da velocidade específica de crescimento e de 33 % do fator de conversão de xilose em xilitol, sob condições limitadas de oxigênio. Em condições anaeróbias de cultivo não foi verificado consumo de ácido acético enquanto o crescimento celular foi mínimo. Entretanto, o fator de conversão de xilose em etanol (0,47 g/g) não foi afetado pela presença de ácido acético e a produtividade volumétrica de etanol foi reduzida em 38%.

Resultados encontrados por Felipe *et al.* (1996) demonstraram que, em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, a melhor produtividade volumétrica de xilitol (0,65 g/L.h) ocorreu a 0,6 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto), condição em que as células de *C. guilliermondii* adaptaram-se bem na presença de ácido acético. Segundo Silva; Afschar (1994) em condições de aeração de 20 mL de ar/min, em meio contendo 1,0 g/L de ácido acético, a produção de xilitol também por *C. guilliermondii* foi reduzida em 4,36 %.

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

2.5.5. Fonte de Nitrogênio

A importância das fontes de nitrogênio no rendimento em xilitol a partir da xilose por algumas espécies de levedura foi relatada por Barbosa *et al.*, (1988). Durante pesquisas com *C. guilliermondii* foi constatado que a utilização da uréia

individualmente e adicionada com casamino ácido resultou em um aumento no rendimento de xilitol. Resultados similares foram obtidos por Vandeska *et al.* (1995) em experimentos efetuados com a levedura *C. boidinii*.

Roberto *et al.* (1996) encontraram uma relação entre a fonte de nitrogênio empregada e o pH de fermentação. Estes autores avaliaram a fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *C. guilliermondii* em função de diferentes fontes de nitrogênio e pH. De acordo com os resultados a utilização da uréia durante a fermentação em pH 4,5 proporcionou um aumento de 25% na produção de xilitol, quando comparado com os experimentos conduzidos com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio neste mesmo valor de pH. Segundo Phaff; Miller, Mrak, 1978 esse comportamento pode estar relacionado com o aumento do pH devido a liberação de amônia e dióxido de carbono durante a hidrólise da uréia. Nestas pesquisas foi também constatado que a condição ótima de pH que levou aos maiores rendimentos de xilitol diferiram em função da fonte de nitrogênio empregada.

2.5.6. Concentração Inicial Celular

A bioconversão de xilose em xilitol por diferentes microrganismos também é influenciada pela concentração inicial de células. Um aumento excessivo desta concentração provoca um decréscimo no fator de conversão de xilose em xilitol, tal como constatado por Sreenath *et al.* (1986), citado por Roberto *et al.* (1996), que observaram que para *C. shehatae* cultivada em meio sintético o fator de conversão de xilose em xilitol para diminui de 0,20 para 0,14 g/g quando a concentração celular foi aumentada de 0,42 para 3,60 g/L. Por outro lado, Vandeska *et al.* (1995), utilizando levedura *C. boidinii* em meio sintético, observaram que o fator de conversão em xilitol obtido com uma alta concentração celular inicial (5,1 g/L) foi o dobro daquele obtido quando da utilização da mais baixa concentração celular (1,3 g/L) já que se observou um aumento de 0,12 para 0,24 g/g no valor deste parâmetro.

Segundo Roberto *et al.* (1996), o aumento da concentração inicial celular durante a fermentação em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz por *C. guilliermondii* afetou negativamente a produção de xilitol por esta levedura uma vez que o aumento da concentração de células de 0,67 para 2,41 g/L decresceu a

concentração de xilitol de 39,46 para 20,76 g/L. Comportamento semelhante foi verificado para esta mesma levedura, durante a fermentação em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana (FELIPE *et al.*, 1997 b). Segundo estes autores, a condição de favorecimento deste bioprocessos ocorreu com a utilização de concentração celular inicial na faixa de 0,1 a 1,0 g/L, enquanto o aumento desta concentração até 6,0 g/L levou à queda de produtividade volumétrica de 0,57 g/L.h para 0,41 g/L.h encontrados com a utilização de 0,2 e 6,0 g/L de células, respectivamente.

2.6. Purificação do Caldo Fermentado

O problema básico que confrontam os tecnólogos é a complexidade da mistura onde está presente, geralmente em baixas concentrações o produto de interesse. O caldo fermentado obtido das fermentações de xilose em xilitol por leveduras (material de partida do processo de purificação) contém células, fragmentos destas, outros componentes do meio de cultivo, substrato residual, subprodutos da fermentação e o produto a purificar (BELTER, 1979). Segundo Martinez e Aracil (1991), um dos passos mais complexos nos processos biotecnológicos industriais é a recuperação do produto de interesse. O estabelecimento de um processo para o isolamento de um produto deve levar em consideração: o valor do produto, a qualidade final para sua utilização, propriedades físico-químicas, impurezas, e comparação de várias possibilidades de purificação (BELTER, 1979).

Existem, no entanto, algumas similaridades na sequência destes processos na maioria dos esquemas de purificação.

Em geral se dividem nas seguintes etapas:

- ✓ Separação sólido-líquido (filtração, centrifugação e decantação).
- ✓ Isolamento primário do produto (adsorção física e/ou troca iônica, extração com solvente, precipitação, microfiltração, ultrafiltração).

Convencionalmente a filtração se define como a separação de partículas sólidas de uma corrente líquida ou gasosa. Com o uso de membranas este conceito se estende para a separação de solutos em solução. De acordo com a seletividade

do filtro um determinado processo pode ser esquematizado de forma que o produto de interesse se localize no filtrado, ou seja, retido (NÁPOLES, 2000; SCOTT, 1991).

Existem dois tipos de processos de membranas, os quais são muito usados na purificação de proteínas em grandes escalas, microfiltração e ultrafiltração. A primeira está relacionada com partículas de tamanho entre 0,05 μm e 0,2 μm , ao passo que a ultrafiltração está relacionada com partículas ou moléculas de tamanho entre 0,2 μm e 200 μm . Sendo a habilidade de retenção dessas moléculas dependente do tamanho, forma, tipo e configuração do material da membrana, vários fatores afetam a presença de outros solutos (SCOTT, 1991). Segundo estes autores, a adsorção de soluto pelas membranas deve ser também considerada.

Deve também ser considerado que uma das variáveis mais importantes nestas técnicas de separação é o fluxo do filtrado o qual é definido como a velocidade de transporte através da membrana em unidades de massa ou volume por área de filtrado por tempo.

A recuperação de xilitol obtido por via fermentativa não tem sido muito abordada na literatura, principalmente quando sua obtenção é a partir da fermentação de hidrolisados hemicelulósicos (DELER *et al.*, 2000; GURGEL *et al.*, 1995; NÁPOLES *et al.*, 2002). A recuperação deste poliálcool depende, em grande parte, da pureza do hidrolisado lignocelulósico a ser utilizado como fonte de carbono porque implica em maiores rendimentos produto/substrato e facilita o processo de purificação do xilitol.

De forma geral o processo de purificação de xilitol é uma combinação de operações das indústrias açucareira e biotecnológica. Primeiramente é necessário separar a célula do sobrenadante por centrifugação ou filtração, clarificação total, logo são necessários os passos cromatográficos para a separação dos poliálcoois e descoloração e por último concentração e cristalização (GURGEL *et al.*, 1995).

Heikkila *et al.* (1992) patentearam um eficiente processo de produção de xilitol por fermentação de licor de xilose purificado obtido de polpa de abedúl, pela levedura *Debaryomyces hansenii*. Os autores propuseram os seguintes métodos de purificação após a fermentação: centrifugação e filtração para a remoção de células, separação de xilitol e de outros açúcares (xilose, glicose, galactose, manitol) por resinas cromatográficas poliestirênicas divenilbenzeno Zerolit 225, catiônica em

forma Ca^{+2} e por último cristalização da fração rica em xilitol. Obtiveram cristais de xilitol de 250 a 600 micrômetros de diâmetro.

GURGEL *et al.* (1995) realizaram a recuperação deste poliálcool obtido por fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar da seguinte maneira: centrifugação para a remoção de células, tratamento do sobrenadante com carvão ativado numa relação de 100 mL de caldo: 25 g de carvão a 80°C por 60 minutos onde obteve uma remoção total de proteínas, diminuição de 0,38% de fenóis e perdas de 19,1% de xilitol. Logo aplicaram um processo de troca iônica sem efeitos apreciáveis e por último cristalizaram. Observaram a presença de compostos coloridos os quais não foram retidos pelo carvão nem pelas resinas. Ao comparar os resultados de ambos verifica-se que neste último as perdas de xilitol na etapa de purificação com carvão ativado são maiores que com resinas.

Morita; Silva e Maugieri (2003) avaliaram a separação do xilitol utilizando zeólita como uma alternativa aos processos cromatográficos convencionais, verificando que a separação do xilitol a partir de bagaço de cana fermentado levou a frações com xilitol puro.

Mais recentemente, o xilitol foi recuperado por cristalização tanto do caldo fermentado obtido a partir de solução sintética quanto deste obtido da fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, obtendo-se cristais com 98-99% e 92-94% de pureza, respectivamente (MARTINEZ *et al.*, 2005; 2007). Resultados de recuperação semelhante aos obtidos neste trabalho com bagaço de cana foram encontrados a partir de hidrolisado de palha de trigo (CANILHA, 2006). Segundo Canilha (2006) a vantagem deste método de cristalização para purificação de xilitol é a obtenção de cristais com alta pureza e uniformidade, fato que facilita os passos seguintes do processo de obtenção deste produto.

2.7. Estudo de Viabilidade Econômica

Na indústria de processos a estimativa dos custos e a evolução econômica de um processo é considerada uma temática especializada. A análise de custos geralmente pretende responder às seguintes perguntas: quanto custa produzir um produto, que inversão se requer e quanto se recupera do mesmo, além de tentar identificar e quantificar a inter-relação entre vários parâmetros de desenhos ou

operações do processo e os custos de inversão. Dentro desta análise de custo a estimativa destes está relacionada com o custo do produto e a inversão de capital (KALK e LANGLYKKE, 1985).

Apesar da diferença entre os processos químicos e biológicos, o custo e o procedimento da evolução econômica assim como a metodologia básica desenvolvida para a indústria química é aplicável na biotecnologia (ATKINSON, 1991).

Existem alguns elementos de custo total de um produto e valores típicos para a estimativa (KALK e LANGLYKKE, 1985), como por exemplo:

1. Matérias primas (30 a 80% dos custos de produção).
2. Administração
 - ✓ De operação (3 a 5 % do salário dos operadores diretos e da operação)
 - ✓ De manutenção (100% do salário do pessoal de manutenção ou 2 a 5% do capital fixo de inversão).
 - ✓ De laboratório (20 a 40% do salário do pessoal de laboratório).
3. Salário e supervisão (10 a 40% do custo de produção).
4. Facilidades auxiliares (5 a 20% do custo de produção).

Custos fixos:

1. Depreciação e interesses (8 a 12 % do capital fixo de inversão para a depreciação e 10 a 15% do capital fixo de inversão para os interesses).
2. Impostos (1 a 4% do capital fixo de inversão).
3. Seguro (1 a 3% do capital fixo de inversão).
4. Outros gastos de planta (10 a 70% dos salários de supervisão).
5. Administração
6. Marketing
7. Pesquisa e Desenvolvimento

2.7.1. Técnicas de Análise de Investimento

Uma das técnicas de análise de investimento é a determinação do valor presente líquido – VPL, sendo um dos critérios mais recomendado por especialistas em finanças para decisão de investimento. Esta recomendação está fundamentada no fato de que o VPL considera o valor temporal do dinheiro, não é influenciado por

decisões menos qualificadas, utiliza todos os fluxos de caixa futuros gerados pelo projeto, refletindo toda a movimentação de caixa. Além disso, permite uma decisão mais acertada quando há dois tipos de investimentos, pois, ao considerar os fluxos futuros a valores presentes, os fluxos podem ser adicionados e analisados conjuntamente (BRUNI; FAMÁ, 2001).

De acordo com Ross *et al.* (1995), o valor presente líquido de um investimento é um critério simples para que se decida se um projeto deve ser executado ou não.

Uma outra alternativa para análise de investimento é o método do payback que representa o período de recuperação do investimento inicial. É obtido calculando-se o número de anos que será necessário para que os fluxos de caixa futuros acumulados igualem o montante do investimento inicial. Esta alternativa pressupõe inicialmente a definição de um limite de tempo máximo para retorno do investimento. Após a definição deste prazo é analisado o fluxo de recursos do projeto, comparando o volume necessário de investimento com os resultados a serem alcançados futuramente, verificando o período onde o saldo tornou-se igual a zero (BRUNI; FAMÁ, 2001). Este método é aplicado de duas formas: payback simples e payback descontado. A principal diferença entre os dois é que o payback descontado considera o valor temporal do dinheiro, ou seja, atualiza os fluxos futuros de caixa a uma taxa de aplicação no mercado financeiro, trazendo os fluxos a valor presente, para depois calcular o período de recuperação.

A taxa interna de retorno - TIR - independe da taxa de juros do mercado financeiro. É uma taxa intrínseca do projeto, dependendo apenas dos fluxos de caixa projetados. É a taxa que remunera o investimento e que torna nulo o valor presente líquido dos fluxos de caixa (BRUNI; FAMÁ, 2001).

3. Objetivo Geral

Contribuir para o desenvolvimento da área de conversão de biomassa, especificamente de tecnologia para obtenção de xilitol empregando rota biotecnológica a partir da palha de cevada.

3.1. Objetivos Específicos

- ✓ Determinar a composição química da palha de cevada,
- ✓ Determinar as condições de hidrólise ácida da palha de cevada visando a máxima extração das frações hemicelulósica e celulósica,
- ✓ Determinar os parâmetros fermentativos para obtenção do xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico em frascos agitados,
- ✓ Avaliar a agitação e aeração em fermentador de 1 L utilizando-se dos parâmetros fermentativos estabelecidos em frascos agitados,
- ✓ Realizar fermentações em reator de 16 L utilizando-se das condições estabelecidas em fermentador de 1 L.
- ✓ Purificar o caldo fermentado proveniente da fermentação em reator de 16 L utilizando resinas de troca iônica,
- ✓ Avaliar a viabilidade econômica do processo de produção de xilitol via biotecnológica,

4. Materiais e Métodos

4.1. Determinação da Composição Química da Palha de Cevada

A palha de cevada cedida pela Malteria do Vale – Taubaté foi caracterizada as suas principais frações quanto ao teor de celulose, hemicelulose e lignina. A análise dos teores de seus componentes foi realizada de acordo com a metodologia sugerida por Dunning e Dallas (1949), adaptada por Cândido (2001) que se fundamenta na sacarificação quantitativa dos polissacarídeos de diferentes matérias-primas vegetais. A palha de cevada foi moída e passada por peneira de 20 “mesh”, sendo o material peneirado seco em estufa a 60° C, por 1 hora (umidade inferior a 10%). Em béquer foram colocados 2 g do material e 10 ml de H₂SO₄ 72% (p/p) o qual foi agitado continuamente por 10 minutos, mantendo-se a mistura mantida sob temperatura controlada a 45° C. Nessa etapa, denominada hidrólise principal, ocorreu o rompimento das fibras de celulose em oligômeros.

Ao completar o tempo da hidrólise, a reação foi interrompida com adição de 275 ml de água destilada e o conteúdo foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 500 ml. A suspensão foi autoclavada a 121° C por 45 minutos, tempo necessário para a pós-hidrólise do material e transformação dos oligômeros em monômeros. Após resfriamento, a suspensão foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico. O volume foi completado com água destilada para a determinação das concentrações dos açúcares (xilose, glicose e arabinose), ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural presentes na suspensão. Posteriormente, ocorreu a conversão dos açúcares em hemicelulose e celulose. Foi também determinada a porcentagem de lignina e cinzas.

4.2. Hidrólise Hemicelulósica de Palha de Cevada

A palha de cevada foi submetida à hidrólise ácida em reator de aço inoxidável dotado de quatro recipientes com capacidade de 1500 mL cada. O reator foi carregado com 150 g da palha de cevada em cada recipiente, nas condições determinadas por um planejamento estatístico fatorial fracionário 2⁴⁻¹ (BOX *et al.*, 1978) para estudar os efeitos da relação entre a massa seca do resíduo e a solução

ácida, da temperatura, do tempo de reação e da concentração da solução de ácido sulfúrico.

Os hidrolisados obtidos foram filtrados, caracterizados e armazenados em câmara fria a 4°C para posterior fermentação.

4.2.1. Planejamento fatorial 2^{4-1} com ponto central

A matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com triplicata no ponto central está mostrada na Tabela 4.1. Os níveis dos fatores utilizados no planejamento estão mostrados na Tabela 4.2, onde (-1) significa o menor nível, (+1) significa o maior nível e (0) significa o ponto central.

Tabela 4.1. Matriz de planejamento referente aos fatores avaliados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com triplicata no ponto central

Ensaio	Temperatura	Tempo	Concentração Ácida	Relação Sólido- Líquido
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

Tabela 4.2. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com ponto central

Fatores	Siglas	Níveis		
		(-1)	(0)	(+1)
Temperatura (°C)	A	120	130	140
Tempo (minutos)	B	20	30	40
Concentração Ácida (%)	C	0,50	0,75	1,00
Relação Sólido- Líquido	D	1:8	1:10	1:12

4.2.2. Planejamento fatorial composto de face centrada

A matriz do planejamento fatorial composto de face centrada está mostrada na Tabela 4.3. Os níveis dos fatores utilizados nesse planejamento estão mostrados na Tabela 4.4.

Tabela 4.3. Esquema da matriz de planejamento fatorial 2^{4-1} de face centrada

Ensaio	Temperatura	Tempo	Concentração Ácida	Relação Sólido- Líquido
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	-1	0	0	0
13	+1	0	0	0
14	0	-1	0	0
15	0	+1	0	0
16	0	0	-1	0
17	0	0	+1	0
18	0	0	0	-1
19	0	0	0	+1

Tabela 4.4. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^{4-1} de face centrada

Fatores	Siglas	Níveis		
		(-1)	(0)	(+1)
Temperatura (°C)	A	120	130	140
Tempo (minutos)	B	20	30	40
Concentração Ácida (%)	C	0,50	0,75	1,00
Relação Sólido-Líquido	D	1:8	1:10	1:12

Para análise estatística dos dados foi necessário corrigir os níveis codificados para os fatores temperatura, concentração ácida, tempo e a relação entre a massa seca do resíduo e a solução ácida, uma vez que os valores utilizados para a realização dos experimentos sofreram alguns desvios dos valores planejados inicialmente. A codificação dos níveis dos fatores foi estabelecida segundo a equação 4.1.

$$X_i = \frac{X - \sum \frac{X}{2}}{\Delta \frac{X}{2}} \quad \text{Eq. 4.1}$$

Em que,

X_i corresponde ao valor codificado,

X corresponde ao valor real,

$\sum X/2$ corresponde ao valor médio entre os níveis superiores e inferiores,

$\Delta X/2$ corresponde à média da diferença entre os níveis superiores e inferiores.

O modelo estatístico proposto foi baseado na metodologia da superfície de resposta, representado pela equação 4.2.

$$Y_i = b_0 + \sum b_i X_j + \sum b_{ij} X_i X_j + \sum b_{ij} X_i^2 \quad \text{Eq. 4.2}$$

Em que,

Y_i corresponde à variável dependente ou variável de resposta,

b corresponde ao coeficiente de regressão,

X corresponde aos níveis dos fatores experimentais com unidades codificadas.

4.2.3. Preparação do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Cevada

4.2.3.1. Concentração

O hidrolisado (original) obtido de acordo com o modelo obtido (hidrolisado sob condição ótima de hidrólise), foi concentrado em concentrador à vácuo com volume de 30 litros de capacidade útil, operando a $70 \pm 5^\circ\text{C}$, a fim de elevar o teor de xilose para 80-100 g/L.

O hidrolisado concentrado foi caracterizado quanto a pH, concentração de açúcares (glicose, xilose, arabinose), ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e fenóis.

4.2.3.2. Destoxificação do Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Cevada

A destoxificação foi realizada segundo metodologia estabelecida por Marton (2002). Primeiramente, empregando o método de overliming, foi ajustado o pH inicial do hidrolisado para pH 7,0 pela adição óxido de cálcio (CaO), seguido pela sua diminuição até pH 2,5 utilizando ácido fosfórico (H₃PO₄). Após esta etapa, o hidrolisado foi submetido a um processo de adsorção empregando 1% (p/v) de carvão ativo sob agitação em frascos agitados em incubadora de movimento orbital (New Brunswick, Scientific Co.) a 200 rpm, a 60°C durante 30 minutos. Ao final de cada etapa de alteração de pH e adição de carvão o hidrolisado foi filtrado em papel de filtro Whatmann para a remoção do precipitado formado.

O hidrolisado concentrado e tratado foi autoclavado a 111°C por 15 minutos e em seguida foi novamente caracterizado quanto ao pH e à concentração de xilose, glicose, arabinose, furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético e fenóis totais.

4.3. Hidrólise Celulósica de Palha de Cevada

4.3.1. Tratamento Alcalino da Celolignina

O resíduo de celolignina foi submetido a pré tratamento com NaOH concentrado para a remoção da lignina. A hidrólise foi realizada em reator de 40 L, à temperatura de 100°C, concentração de NaOH 1,5%(p/v), tempo de reação de 1 hora e relação sólido-líquido de 1:20.

4.3.2. Hidrólise Celulósica da Palha de Cevada

Após o tratamento com álcali o resíduo da celolignina resultante do processo da hidrólise hemicelulósica foi utilizado para obtenção do hidrolisado celulósico. Para a obtenção dos parâmetros de hidrólise, foi utilizado um planejamento fatorial 2⁴⁻¹, para avaliar as condições para a relação sólido-líquido, temperatura, tempo de reação e concentração ácida, em que as condições do ponto central foram 1:8, 165°C, 30 minutos e 2 % de ácido.

O reator utilizado para se realizarem os experimentos foram ampolas de aço-inox de 180 ml de volume, sem agitação, fechadas hermeticamente e imersas em banho de silicone, o qual foi aquecido por resistência elétrica. As amostras foram filtradas em papel de filtro Klabi e devidamente diluídas. Os hidrolisados celulósicos foram analisados quanto às concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural.

A matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com triplicata no ponto central está mostrada na Tabela 4.5. Os níveis dos fatores utilizados no planejamento estão mostrados na Tabela 4.6, onde (-1) significa o menos nível, (+1) significa o maior nível e (0) significa o ponto central.

Tabela 4.5. Matriz de planejamento referente aos fatores avaliados para hidrólise da celulose na palha de cevada no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com triplicata no ponto central

Ensaio	Temperatura	Tempo	Concentração ácida	Relação Sólido-Líquido
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

Tabela 4.6. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com ponto central

Fatores	Siglas	Níveis		
		(-1)	(0)	(+1)
Temperatura (°C)	A	155	165	175
Tempo (minutos)	B	20	30	40
Concentração Ácida (%)	C	1	2	3
Relação sólido: líquido	D	1:6	1:8	1:10

4.4. Microrganismo e Preparo do Inóculo

Utilizou-se como microrganismo a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037, proveniente do laboratório de culturas do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos - Departamento de Biotecnologia – EEL.

O inóculo foi preparado a partir de células obtidas de uma cultura estoque, mantida a 4°C em ágar inclinado de extrato de malte. O cultivo da levedura foi feito a partir da inoculação destas células da cultura estoque recém-repicada (7 a 10 dias) em meio semi-sintético contendo (g/L): 20,0 de D-xilose, 2,0 de sulfato de amônio, 0,1 de cloreto de cálcio e 20,0 de farelo de arroz “in natura”.

As soluções de xilose, glicose e solução de extrato de farelo de arroz foram autoclavadas a 111°C por 15 minutos e as demais soluções foram esterilizadas a 121°C por 20 minutos em autoclave SOC.FABBE LTDA.

Para o cultivo foram utilizados frascos Erlenmeyer de 125 mL, com 50 mL do meio de fermentação, em incubadora de movimento orbital a 200 rpm, a 30°C, por 24 horas. Em seguida, as células foram recolhidas por centrifugação a 2000 rpm, por 15 minutos para preparar uma suspensão que foi utilizada como inóculo da fermentação. A concentração inicial de células em cada frasco foi em torno de 1,0 g/L.

4.5. Meio e Condições de Fermentação Utilizadas em Frascos Erlenmeyer

Experimentos para avaliar a influência dos fatores (sulfato de amônio, cloreto de cálcio, farelo de arroz, pH, concentração do hidrolisado, concentração de glicose e tempo de alimentação de glicose) foram feitos a partir de um planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} (BOX, 1978). Para realizá-los, foram empregados frascos Erlenmeyer de 125 ml com 50 ml do meio de fermentação, em incubadora de movimento rotatório (200 rpm) a 30°C, por um tempo de 72 h. Foram avaliados o consumo de açúcares e a produção de xilitol.

A Tabela 4.7 apresenta o planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} . Os níveis dos fatores utilizados no planejamento estão apresentados na Tabela 4.8, onde (-1) e (+1) significam o menor e o maior nível, respectivamente e (0) significa o nível do ponto central

Tabela 4.7. Matriz de planejamento referente aos fatores avaliados na bioprodução de xilitol em frascos agitados de acordo com planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} com ponto central

Ensaio	Sulfato de Amônio	Cloreto de Cálcio	Farelo de arroz	Concentração do hidrolisado	Concentração de glicose	Tempo para alimentação de glicose
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	+1	-1
3	-1	+1	-1	-1	+1	+1
4	+1	+1	-1	-1	-1	+1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	-1	-1
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1
10	+1	-1	-1	+1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1	-1
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1	+1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0

Tabela 4.8. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} com ponto central

Fatores	Siglas	Níveis		
		(-1)	(0)	(+1)
Sulfato de amônio (g/L)	AS	1,00	2,00	3,0
Cloreto de cálcio (g/L)	CC	0	0,50	1
Farelo de arroz (g/L)	FA	5	12,5	20
Fator concentração de xilose (g/L)	CX	60,0	70,0	80,0
Fator concentração de glicose (g/L)	CG	5	7	9
Tempo para a alimentação de glicose (hora)	TG	20	40	60

4.6. Condições de Fermentação Utilizadas em Reator de 1L

Após a obtenção dos resultados nos experimentos em frascos agitados, foram conduzidos ensaios em bioreator de 1 litro de capacidade total (New Brunswick Scientific Co, modelo MULTIGEN dotado de controlador de temperatura e agitação. A concentração inicial de células no reator foi de 1,0 g/L, para todos os ensaios. O meio e as condições de fermentação utilizados foram os previstos pelo modelo para frascos agitados.

Os níveis dos fatores utilizados no planejamento estão apresentados na Tabela 4.9, onde (-1) e (+1) significam o menor e o maior nível, respectivamente e (0) significa o nível do ponto central. A Tabela 4.10 apresenta o planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} .

Tabela 4.9. Matriz de planejamento referente aos fatores avaliados na bioprodução de xilitol em reator de bancada de acordo com planejamento fatorial fracionário 2^2 com ponto central

Ensaio	Agitação	Aeração
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Tabela 4.10. Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^2 com ponto central

Fatores	Siglas	Níveis		
		(-1)	(0)	(+1)
Agitação (rpm)	AG	200	350	500
Aeração (vvm)	AE	0,3	0,6	0,9

Após a determinação da melhor condição experimental a produção de xilitol foi ampliada para reator com capacidade total de 16 L (modelo: AG Tipo L 1523, Bioengineering) contendo 12 L de meio sendo que o parâmetro utilizado para ampliação de escala foi o $K_L a$. Posteriormente foi realizada a clarificação do caldo fermentado.

4.7. Preparo do Meio Fermentado

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

4.8. Clarificação do Caldo Fermentado

Para a realização dos ensaios de clarificação, foram empregadas as condições obtidas por Canilha (2006) em experimentos com palha de trigo, a qual estabeleceu as melhores condições de clarificação a partir de testes realizados com proporções diferentes de resina de troca iônica e caldo fermentado que foi 25 mL de resina + 50 mL de caldo fermentado. O processo de troca iônica foi realizado em frascos Erlenmeyer de 2000 mL, utilizando as resinas A-860S, A-500PS (regenerante NaOH 10%) e C-150 (regenerante HCl 5%).

O ciclo de operação das resinas de clarificação foi dividido em cinco fases:

- a) as resinas foram mantidas em água deionizada por 24 horas,
- b) Após foi feita regeneração das resinas com os regenerantes e proporções indicadas anteriormente sendo em seguida as resinas lavadas com água deionizada a fim de eliminar o regenerante residual. O contato entre as resinas e os regenerantes e a lavagem com água deionizada foram realizados em frascos sob agitação de 200 rpm a 30°C por 90 minutos,
- c) A terceira fase da clarificação correspondendo à saturação da resina com o xilitol foi realizada empregando-se volume de solução utilizado aproximadamente igual à metade do volume da resina utilizada. A saturação também foi realizada em frascos sob agitação de 200 rpm a 30°C por 60 minutos.
- d) Após a saturação, o caldo permaneceu em contato com as resinas empregando-se frascos Erlenmeyer agitados a 200 rpm a 30°C por 60 minutos ,
- e) Por último as resinas foram novamente lavadas com a finalidade de remover qualquer material proveniente do caldo fermentado.

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

4.9. Métodos Analíticos

Foram determinados o teor de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas na caracterização da palha de cevada.

As hidrólises e as fermentações foram acompanhadas por meio de retiradas periódicas de amostras para determinação das concentrações de xilose, glicose, arabinose, xilitol, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, concentração celular e do pH.

4.9.1. Determinação do Teor de Lignina

Após a hidrólise total dos polissacarídeos, o conteúdo do balão de 500 ml foi filtrado em papel de filtro Klabin, previamente seco a 105° C, por 1 hora, e tarado. O resíduo foi lavado com água destilada até completa neutralização, e então, submetido a secagem a 105° C, e pesado até peso constante. O teor de lignina foi calculado pela equação 4.3.

$$\%lignina = \frac{m_L * 10000}{m_A * \%m_s} \quad \text{Eq. 4.3}$$

Em que,

m_L corresponde à massa da lignina em gramas.

m_A corresponde à massa da amostra.

m_s corresponde à massa seca da amostra (%).

4.9.2. Determinação do Teor de Celulose e Hemicelulose

A fração líquida da hidrólise total foi analisada por HPLC, e as concentrações de glicose, xilose e arabinose foram utilizadas para a determinação da porcentagem de celulose e hemicelulose existentes na palha de cevada (IRICK *et al.*, 1988).

4.9.3. Determinação do Teor de Cinzas

A determinação do teor de cinzas foi efetuada de acordo com o método de Silva, 1990, que consiste em aquecer o material a altas temperaturas que vão de 500 a no máximo 600° C, ou seja, até o aquecimento a rubro, durante quatro horas ou até combustão total da matéria orgânica.

4.9.4. Determinação das Concentrações de Açúcares (Xilose, Glicose e Arabinose, Xilitol) e Ácido Acético

As concentrações dos açúcares (xilose, glicose e arabinose), xilitol, etanol, glicerol e do ácido acético foram determinadas por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Waters, Milford, MA) operado com coluna Biorad Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm) empregando-se as seguintes condições: temperatura da coluna de 45°C, eluente, solução de H₂SO₄ 0,01N, fluxo de 0,6 ml/min, volume da amostra injetada 20 µl. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro Sep Pack C18 (Millipores) e o eluente, antes do uso, foi filtrado a vácuo em membrana Hawp 0,45 Millipore e em seguida desgaseificado em banho ultra-som (Microsonic SX-50) por 15 minutos.

4.9.5. Determinação das Concentrações de Furfural e Hidroximetilfurfural

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural nos hidrolisados foram determinadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Waters, Milford, MA) operado com coluna Hewlett-Packard RP 18 (200 mm), sob as seguintes condições: temperatura da coluna: 25°C; detector de ultra-violeta SPD-10A UV-VIS; eluente: solução de acetronitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético; volume da amostra injetada: 20 µL. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas a vácuo em membrana HAWP 0,45 (MILLIPORE). O eluente foi filtrado a vácuo em membrana GVWP 0,22 (MILLIPORE) e, em seguida, desgaseificado em banho de ultra-som (Microsonic SX-50) por 15 min.

4.9.6. Determinação do Índice de Clarificação do Hidrolisado e do Caldo Fermentado

A cor do hidrolisado foi determinada pelo método ICUMSA. Neste método a absorbância (DO) das amostras foi determinada em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B (USA) a 420 mn, usando água deionizada como referência e determinada

a concentração de sólidos solúveis das amostras diluídas. A cor ICUMSA foi determinada pelas equações 4.4 e 4.5.

$$CorICUMSA = \frac{DO * 1000}{\rho * {}^{\circ}Brix_d / 100} * diluição \quad Eq. 4.4$$

$$\rho = 1 + \frac{{}^{\circ}Brix(200 + {}^{\circ}Brix)}{54000} \quad Eq. 4.5$$

Em que,

${}^{\circ}Brix$ corresponde à % de sólidos solúveis na amostra original,

${}^{\circ}Brix_d$ corresponde à % de sólidos solúveis na amostra diluída,

DO corresponde à absorbância determinada em espectrofotômetro a 420 nm utilizando água deionizada como referência e

ρ corresponde à densidade da amostra.

4.9.7. Determinação da concentração de fenóis totais

A concentração de fenóis totais foi determinada utilizando o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton *et al.* (1999). Foram preparados 3 mL de amostra do hidrolisado diluído e adicionados a este 0,2 mL de reagente Folin. Passados 3 a 5 minutos foram adicionados 0,8 mL de solução de carbonato de sódio (150 g/L). Os tubos foram agitados em vórtex e mantidos no escuro. Decorridos 30 minutos, a absorbância da solução resultante foi determinada a 760 nm em espectrofotômetro computadorizado BECKMAN DU 640B e comparada a uma curva padrão de vanilina.

4.9.8. Determinação do pH

O pH das amostras dos hidrolisados bem como das amostras do processo fermentativo foi determinado em pH-metro Micronal modelo B 474, o qual executa leituras de temperaturas atreves de uma sonda apropriada (tipo Pt 100) na faixa de – 5,0 a +105°C.

4.9.9. Determinação do k_La inicial

No início do processo fermentativo conduzido no bioreator (item 4.7), variou-se a agitação e aeração do sistema. Anteriormente à adição do inoculo ao meio de fermentação, foi determinado o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) pelo método de Pham *et al.* (1998). Este parâmetro foi determinado segundo a equação 4.6 que apresenta a relação da pressão parcial de oxigênio com o tempo.

$$\frac{d((pO_2)/(pO_2)^*)}{dt} = kLa * (1 - \frac{pO_2}{(pO_2)^*}) \quad \text{Eq. 4.6}$$

Em que,

pO_2 corresponde à pressão parcial de O_2 no meio,

pO_2^* corresponde à pressão parcial de O_2 na saturação.

A pressão parcial de oxigênio dissolvido no meio foi anotada em tempos regulares plotandos em gráfico de acordo com a equação 4.7.

$$\ln(1 - \frac{pO_2}{(pO_2)^*}) = f(t) \quad \text{Eq. 4.7}$$

O valor de k_La foi dado pela inclinação da reta obtida na regressão linear.

4.9.10. Determinação do teor de umidade da palha de cevada

A umidade contida na palha de cevada foi determinada por exposição do material à radiação infravermelha, à temperatura de 105°C durante 20 minutos (ORION, modelo MB200).

4.9.11. Determinação da concentração celular no meio fermentativo

O crescimento celular foi determinado através da medida da absorbância lida a 600nm em espectrofotômetro (Beckman-DU 640B) e a concentração celular calculada por uma curva padrão que correlaciona a absorbância a 600 nm e o peso seco das células.

4.9.12. Determinação da concentração de sólidos solúveis

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

4.9.13. Determinação da concentração de sólidos totais

Primeiramente cadinhos calcinados em mufla elétrica 800°C durante 4 horas, foram resfriados e pesados. A seguir, 3 mL das amostras a serem analisadas foram colocadas nos cadinhos e submetidas à evaporação a 60°C por dois dias e a 103°C até massa constante. A diferença entre a massa do cadinho e este valor encontrado correspondeu aos sólidos totais. Para o cálculo da concentração de sólidos totais, presentes nas amostras, utilizou-se a equação 4.8.

$$ST = \frac{M_1 - M_0}{V} * 1000 \quad \text{Eq. 4.8}$$

Em que,

ST corresponde à sólidos totais (g/L),

M_1 corresponde à massa do cadinho + amostra após secagem (g),

M_0 corresponde à massa do cadinho (g),

V corresponde ao volume da amostra (mL),

1000 corresponde ao fator para expressar os resultados em g/L.

4.9.14. Determinação dos parâmetros fermentativos

O fator de conversão de substrato em célula foi determinado pela equação 4.9

$$Y_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad \text{Eq. 4.9}$$

em que,

X_i e X_f correspondem às concentrações inicial e final de células.

S_i e S_f correspondem às concentrações inicial e final de xilose.

O fator de conversão de xilitol em relação a xilose foi determinado pela equação 4.10.

$$Y_{p/s} = \frac{\Delta p}{\Delta S} = \frac{P_f - P_i}{S_i - S_f} \quad \text{Eq. 4.10}$$

Em que,

S_i e S_f correspondem às concentrações inicial e final de xilose.

P_i e P_f correspondem às concentrações inicial e final de xilitol.

A produtividade volumétrica expressa a concentração de xilitol produzido (g/L) por tempo (h) e foi calculada com a seguinte equação 4.11.

$$Q_p = \frac{\Delta p}{\Delta t} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \quad \text{Eq. 4.11}$$

Em que,

P_i e P_f correspondem às concentrações inicial e final de xilitol.

t_i e t_f correspondem aos tempos inicial e final de fermentação.

A eficiência de conversão, expressa em %, foi calculada pela razão entre $Y_{P/S}$ e o fator de conversão teórico de 0,917 g/g, calculado segundo BARBOSA *et al.* (1988).

5. Resultados e Discussão

5.1. Determinação da Composição Química da Palha de Cevada

Os resultados referentes à caracterização da palha de cevada cuja metodologia descrita no item 4.1 se encontram na Tabela 5.1.

Os dados apresentados nesta Tabela revelam a composição percentual da palha de cevada com relação à matéria seca de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas cujos valores são 38,55; 21,41; 19,90 e 9,50 respectivamente. Esta composição se aproximou daquela encontrada por Khuad e Singh (1993) quanto ao teor de celulose, hemicelulose (polímero de principal interesse em processos de bioconversão de xilose à xilitol), lignina e cinzas (Tabela 2.1).

Tabela 5.1. Composição química da palha de cevada e de diferentes matérias-primas

Matéria-prima	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Cinzas (%)	Referência
Palha de Cevada	38,55	21,41	19,90	9,50	Presente trabalho
Bagaço de Cana	35,42	25,02	22,57	5,83	RUBIO MATTOS <i>et al.</i> , 2002
Casca de Aveia	30,51	28,63	23,09	8,00	FELIPE <i>et al.</i> , 2003
Casca de Café	39,91	14,40	28,06	6,80	CARVALHO <i>et al.</i> , 2004
Palha de Arroz	43,50	22,00	17,20	11,40	MUSSATTO, 2002
Palha de Trigo	33,81	31,83	20,12	8,02	CÂNDIDO <i>et al.</i> , 2003
Resíduos de Eucalipto	40,20	15,67	26,90	1,41	CANETTIERI <i>et al.</i> , 2002

A composição química da palha de cevada “in natura” (Tabela 5.1) é semelhante à encontrada nos resíduos como bagaço de cana de açúcar, palha de arroz e casca de aveia, os quais vêm sendo amplamente pesquisados como matéria-prima potencial para a produção biotecnológica de xilitol. Por outro lado, a palha de cevada possui teor de hemicelulose superior aos resíduos de eucalipto e casca de café, o que favorece a obtenção de hidrolisado hemicelulósico desta matéria-prima com maior teor de xilose em condições de hidrólise menos drástica.

5.2. Hidrólise Hemicelulósica da Palha de Cevada

Após a caracterização da palha de cevada foram realizados ensaios referentes à sua hidrólise ácida de acordo com o planejamento fatorial 2^{4-1} com três repetições no ponto central com a finalidade de minimizar o erro experimental e identificar se o modelo é linear ou quadrático (Tabela 5.2).

Os rendimentos do processo de hidrólise (Tabela 5.2), definidos em função da porcentagem de xilose liberada a partir da matriz polimérica da hemicelulose do resíduo de cevada, variaram de 13,61 g/L a 26,91 g/L.

Os resultados das análises estatísticas estão expressos nas Tabelas 5.3, 5.4 e 5.5.

Tabela 5.2. Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} empregado para avaliar a influência da temperatura, concentração ácida, tempo de hidrólise e relação sólido-líquido sobre a concentração de xilose obtida após a hidrólise hemicelulósica de palha de cevada

Ensaio	Temperatura (°C)	Conc. Ácida (%)	Tempo (min.)	Relação Sólido: Líquido	Rendimento (%)
1	120	0,50	20	1:8	45,26
2	140	0,50	20	1:12	47,67
3	120	1,00	20	1:12	45,28
4	140	1,00	20	1:8	69,86
5	120	0,50	40	1:12	57,16
6	140	0,50	40	1:8	89,56
7	120	1,00	40	1:8	78,22
8	140	1,00	40	1:12	41,55
9	130	0,75	30	1:10	40,60
10	130	0,75	30	1:10	50,74
11	130	0,75	30	1:10	50,23

Tabela 5.3. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para os parâmetros estudados na hidrólise ácida da palha de cevada para o planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central

	Estimativas	Erros-padrão	t
Média	17,20	±0,750	-
Fator A	1,38	±1,758	0,784
Fator B	-0,69	±1,758	0,392
Fator C	4,25	±1,758	2,417**
Fator D	-7,19	±1,758	4,090*
AB+CD	-3,19	±1,758	1,815
AC+BD	-2,02	±1,758	1,149
AD+BC	-3,36	±1,758	1,911

A – Temperatura, B – Concentração Ácida, C – Tempo, D – Relação Sólido: Líquido

* Significativo ao nível de 10% de probabilidade ($t \geq 2,352$)

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($t \geq 3,182$)

Verifica-se na Tabela 5.3 que somente o fator D (relação sólido: líquido) exerceu influência ao nível de 5% de probabilidade e o fator C ao nível de 10% de probabilidade. Os fatores A, B e suas interações não foram significativos ao processo de hidrólise, sob as condições avaliadas.

Tabela 5.4. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para os parâmetros estudados na hidrólise ácida da palha de cevada para o planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central

Efeitos	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Teste f	Nível de Significância (p)
Fator A	3,781	1	3,781	0,61	0,4912
Fator B	0,952	1	0,952	0,15	0,7029
Fator C	32,886	1	32,886	5,32	0,1044*
Fator D	103,392	1	103,392	16,73	0,0264**
AB+CD	20,352	1	20,352	3,29	0,1672
AC+BD	8,120	1	8,120	1,31	0,3349
AD+BD	22,579	1	22,579	3,65	0,1519
Erros	18,546	3	6,182		
Total	210,608	10			

$R^2=0,912$

A – Temperatura, B – Concentração Ácida, C – Tempo, D – Relação Sólido: Líquido

* Significativo ao nível de 10% de probabilidade

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade

No presente estudo, o menor nível de significância assumido para rejeitar a hipótese nula foi de 11% e, como pode ser visto na Tabela 5.4, tais valores para os fatores C (tempo) e D (relação sólido: líquido), corresponderam a 10,44% e 2,64%, respectivamente. Assim, ambos os resultados apresentam significância estatística.

Isto demonstra que o modelo linear poderia ser descartado. Uma nova análise de variância foi realizada com a finalidade de verificar a linearidade ou curvatura do modelo. Como pode ser comprovado na Tabela 5.5, a análise estatística que um modelo quadrático se ajusta aos resultados obtidos, comprovada pela curvatura bastante significativa ($p = 0,0016$).

Observa-se ainda (Tabela 5.5) que todos os fatores e suas interações apresentaram significância estatística, quando um modelo quadrático foi considerado.

Tabela 5.5. Análise de variância para o planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central para um possível modelo quadrático

Efeitos	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Teste f	Nível de Significância (p)
Fator A	3,781	1	3,781	130,24	0,0076*
Fator B	0,952	1	0,952	32,80	0,0292**
Fator C	32,886	1	32,886	1132,70	0,0009*
Fator D	103,392	1	103,392	3561,15	0,0003*
AB+CD	20,352	1	20,352	700,99	0,0014*
AC+BD	8,120	1	8,120	279,69	0,0036*
AD+BD	22,579	1	22,579	777,70	0,0013*
Curvatura	18,486	1	18,486	636,73	0,0016*
Erros	0,058	2	0,029		
Total	210,608	10			

$R^2=0,999$

A – Temperatura, B – Concentração Ácida, C – Tempo, D – Relação Sólido: Líquido

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 10% de probabilidade

Uma vez que xilose na concentração de 60 a 80 g/L exerce um efeito positivo na produção de xilitol por *C. guilliermondii* (FELIPE, 2004) novos ensaios de hidrólises da palha de cevada foram realizados com o objetivo de se obter a região de maximização, alcançando-se desta forma, máximos valores de concentração desta pentose. Para isto um planejamento com face centrada foi composto e a matriz correspondente (fatorial fracionário 2^{4-1} com triplicata no ponto central e face centrada) bem como os resultados do rendimento das hidrólises estão apresentados na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} empregado para avaliar a influência da temperatura, concentração ácida, tempo de hidrólise e relação sólido-líquido sobre a concentração de xilose obtida após a hidrólise hemicelulósica de palha de cevada

Ensaio	Temperatura (°C)	Conc. Ácida (%)	Tempo (min.)	Relação Sólido: Líquido	Rendimento (%)
1	120	0,50	20	1:8	45,26
2	140	0,50	20	1:12	47,67
3	120	1,00	20	1:12	45,28
4	140	1,00	20	1:8	69,86
5	120	0,50	40	1:12	57,16
6	140	0,50	40	1:8	89,56
7	120	1,00	40	1:8	78,22
8	140	1,00	40	1:12	41,55
9	130	0,75	30	1:10	40,60
10	130	0,75	30	1:10	50,74
11	130	0,75	30	1:10	50,23
12	120	0,75	30	1:10	45,05
13	140	0,75	30	1:10	50,80
14	130	0,5	30	1:10	58,29
15	130	1,0	30	1:10	50,67
16	130	0,75	20	1:10	52,00
17	130	0,75	40	1:10	59,95
18	130	0,75	30	1:8	73,13
19	130	0,75	30	1:12	60,65

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.6 o melhor resultado de rendimento foi 89,56 g/g obtido no ensaio 6, em que a hidrólise foi realizada com solução de H_2SO_4 a 0,50% a 140°C, na proporção de 1:8 de palha: solução, durante 40 minutos. Observa-se que os rendimentos em xilose empregando esta proporção de sólido-líquido são influenciados pelo tempo empregado no processo de hidrólise, uma vez que rendimentos inferiores a 70% foram obtidos quando se empregou tempo de 20 minutos, independente da concentração de ácido empregado e da temperatura. Observa-se ainda que para todos os ensaios nos quais empregou-se proporção de líquido superior a 10 em relação aos sólidos, os rendimentos de xilose foram inferiores a 61% (aproximadamente), independentemente da condição utilizada para os demais fatores avaliados.

A análise de variância para os efeitos estimados no planejamento para o modelo que representa o rendimento em função dos parâmetros de hidrólise está mostrada na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Análise de variância para os efeitos estimados no planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central e face centrada

Efeitos	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Teste f	Nível de Significância (p)
Fator A	80,833	1	80,833	2,87	0,1009**
Fator B	439,971	1	439,971	15,63	0,0027*
Fator D	1076,715	1	1076,715	38,25	0,0001*
AB	122,460	1	122,460	3,70	0,0834**
AD	302,584	1	302,584	4,35	0,0636**
BD	275,423	1	275,423	10,75	0,0086*
A ²	104,063	1	104,063	9,79	0,0107*
D ²	551,698	1	551,698	19,60	0,0013*
Erros	281,471	10	28,151		
Total	3148,080	18			

 $R^2=0,911$ *A – Temperatura, B – Concentração ácida, D – Relação Sólido: Líquido*

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade

** Significativo ao nível de 10% de probabilidade

Os resultados apresentados na Tabela 5.7 demonstram que tanto a temperatura como as interações entre a temperatura e a concentração ácida e a temperatura e a relação sólido: líquido tiveram efeito significativo ao nível de 90% de confiança ($p < 0,10$), a concentração ácida e a relação sólido: líquido tiveram efeitos significativos assim como as interações entre esses dois fatores e também os efeitos quadráticos da temperatura e da relação sólido: líquido ao nível de 99% de confiança ($p < 0,01$).

A análise de variância para o modelo proposto (Tabela 5.8), comprova sua significância estatística ($p < 0,01$), com coeficiente de determinação $R^2=0,95$ que descreve 94,60,% da variância ocorrida para o fator de rendimento na hidrólise ácida da palha de cevada.

Tabela 5.8. Análise de variância da regressão do modelo que representa o processo de pré-hidrólise ácida da palha de cevada no planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central e face centrada

CV	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Teste f	Nível de Significância (p)
Modelo	3013,861	11	274,043	176,94	0,0009*
Resíduo	134,262	7	19,208		
Total	3148,087	18			

 $R^2=0,911$

*Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Na Figura 5.1, encontra-se a disposição dos pontos estimados pelo modelo em relação à média e seus respectivos resíduos. Observa-se que a distribuição dos resíduos é totalmente aleatória em torno do eixo igual a zero, sugerindo que o modelo não é tendencioso.

Figura 5.1. Distribuição dos resíduos do modelo proposto para obtenção do hidrolisado de palha de cevada.

O modelo matemático para representar o processo da pré-hidrólise ácida da palha de cevada, considerando os termos que realmente influenciam no processo hidrolítico, pode ser expresso pela equação 5.1.

$$Y = 5220 + 2,84 * X_1 + 6,33 * X_2 - 10,38 * X_3 - 3,91 * X_1 * X_2 - 6,15 * X_1 * X_3 - 5,86 * X_2 * X_3 - 5,74 * X_1^2 + 13,22 * X_3 \quad \text{Eq.5.1}$$

Em que,

Y corresponde ao rendimento de xilose em relação à palha de cevada (%),

X_1 corresponde à temperatura em $^{\circ}\text{C}$,

X_2 corresponde à ácida,

X_3 corresponde à relação sólido: líquido.

Para o modelo matemático descrito acima foi fixada a variável temperatura (X_1) em -1 e os valores atribuídos à mesma foram somados à constante do modelo e às variáveis concentração ácida (X_2) e relação sólido: líquido (X_3) onde existia interação, conforme a equação 5.2.

$$Y = 43,62 + 10,55 * X_2 - 4,23 * X_3 - 5,87 * X_1 * X_3 + 13,22 * X_3^2 \quad \text{Eq. 5.2}$$

Sendo assim, o modelo ajustado aos dados obtidos, ilustrado pela superfície de resposta apresentada na Figura 5.2, forneceu um máximo de rendimento de xilose quando se utilizou concentração de ácido no nível superior (1%) e a relação sólido: líquido no nível inferior (1:8), sendo a reação conduzida a 120°C durante 20 minutos. Nessas condições foi possível obter um rendimento de obtenção de xilose de aproximadamente 73%.

Figura 5.2. Superfície de resposta descrita pelo modelo quadrático para o fator rendimento de xilose em relação à palha de cevada da hidrólise hemicelulósica a palha de cevada.

Os valores da variável resposta aumentam com o uso de menores níveis para relação sólido: líquido e maiores para concentração ácida.

Para a validação do modelo proposto para o rendimento da hidrólise ácida foram realizadas triplicatas nas condições determinadas pela metodologia estatística. A palha de cevada foi hidrolisada na temperatura de 120°C, com uma concentração ácida de 2,6%, tempo de reação de 20 minutos e relação sólido: líquido de 1:13,5. Com a substituição destes valores codificados na equação proposta para o modelo, obtêm-se um valor estimado para o rendimento de 87,52%, sendo que experimentalmente foi obtido um resultado de 84,38%. Isso indica que o modelo pode representar matematicamente o rendimento de xilose.

A Tabela 5.9 apresenta a composição química do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada na condição ótima determinada pela metodologia estatística (valores em triplicata).

Tabela 5.9. Composição química do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada sob as condições ótimas de hidrólise

Composição Química	Ta	Tb	Tc	T
Xilose (g/L)	21,35	20,78	20,63	20,92
Glicose (g/L)	4,05	3,78	4,15	3,99
Arabinose (g/L)	0,95	0,85	1,02	0,94
Ácido Acético (g/L)	1,89	1,77	1,93	1,86
Furfural (g/L)	0,08	0,05	0,07	0,06
Hidroximetilfurfural (g/L)	0,0056	0,0089	0,0063	0,0096
pH	1,26	1,32	1,31	1,30

Ta - triplicata 1, Tb – triplicata 2, Tc – Triplicata 3, T – Média das triplicatas

5.2.1. Hidrolisado Original

5.2.1.1 Concentração dos Açúcares

As concentrações de glicose, xilose e arabinose presentes nos hidrolisados obtidos de acordo com o planejamento experimental 2^{4-1} com triplicata no ponto central e face centrada e no hidrolisado obtido sob condições ótimas resultantes das hidrólises, estão apresentadas na Tabela 5.10.

Tabela 5.10. Concentrações dos açúcares dos hidrolisados originais

Hidrolisado	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)
1	2,06	14,94	0,94
2	4,02	14,33	0,85
3	4,10	13,61	0,89
4	6,30	21,00	0,87
5	3,47	17,18	0,67
6	5,61	26,92	1,11
7	5,23	23,51	0,51
8	3,88	12,49	0,53
9	4,04	14,91	0,92
10	4,93	15,25	0,91
11	5,42	15,10	0,94
12	3,55	13,54	0,78
13	3,99	15,27	0,99
14	3,23	17,52	1,05
15	2,88	15,23	0,89
16	3,46	15,63	0,88
17	3,62	18,02	0,75
18	4,22	21,98	0,83
19	3,51	18,23	0,80
Condição ótima	4,05	21,35	0,95

Como pode ser visto na Tabela 5.10, em todas as condições experimentais avaliadas a xilose se apresenta como açúcar predominante no hidrolisado hemicelulósico, seguido de glicose e arabinose presentes em menor quantidade, semelhante ao constatado para os hidrolisados de eucalipto (CANETTIERI *et al.*, 2002), de bagaço de cana-de-açúcar (FELIPE *et al.*, 1997a), de palha de arroz (MUSSATO; ROBERTO, 2002), de palha de trigo (CANILHA *et al.*, 2003) e casca de aveia (FELIPE *et al.*, 2003). A maior concentração de xilose (26,92 g/L) o que corresponde ao rendimento de 89,56% foi obtida no ensaio 6, no qual se utilizou maior temperatura e tempo de hidrólise e menor concentração de ácido e relação solido: líquido. Entretanto, condição ótima de hidrólise determinada pelo modelo a concentração de xilose obtida foi de 21,35 g/L, o que corresponde a 81,02% da concentração total dos açúcares presentes neste hidrolisado.

A presença de baixas concentrações de glicose no hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada é um ponto favorável para a bioconversão de xilose em xilitol uma vez que elevadas concentrações desta hexose junto à xilose pode acarretar em repressão catabólica interagindo nas atividades das enzimas-chave deste bioprocessos: a xilose redutase e xilitol desidrogenase (SILVA *et al.*, 2004) Por outro lado quando a hexose está em baixas concentrações, em relação à xilose, porém

na presença também de ácido acético, esta contribuiu para minimizar o efeito tóxico exercido pelo ácido durante a bioconversão da xilose (LAWFORD; ROSSEAU, 2002). Quanto à arabinose também presente no hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada em baixas concentrações, pode também ser indutora de enzimas (LEE; SOPHER; YAU, 1996).

5.2.1.2. Concentração de Compostos Tóxicos Presentes nos Hidrolisados de Palha de Cevada e Valores de pH

Uma vez que os hidrolisados hemicelulósicos resultantes da hidrólise ácida de diferentes materiais sua composição contém além de açúcares compostos tóxicos aos microrganismos como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural os quais inibem o metabolismo microbiano (FELIPE, 2004), a identificação e determinação da concentração e remoção destes são importantes para a utilização dos hidrolisados na formulação de meios de fermentação. A concentração destes compostos presentes nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de cevada resultantes das hidrólises ácida, de acordo com o planejamento descrito no item 4.2.3.2, estão apresentadas na Tabela 5.11.

Tabela 5.11. Concentração de compostos tóxicos e os valores de pH dos hidrolisados de palha de cevada

Hidrolisado	Ac. Acético (g/L)	Furfural (g/L)	Hidroxiacetilfurfural (g/L)	Fenóis (g/L)	pH
1	1,51	0,02	0,0035	1,95	1,89
2	1,17	0,04	0,0069	1,39	1,51
3	1,42	0,06	0,0044	1,08	1,36
4	2,35	0,09	0,0086	3,56	1,41
5	1,74	0,08	0,0026	1,56	1,19
6	2,53	0,02	0,0036	2,25	1,25
7	2,16	0,06	0,0042	1,36	1,74
8	1,59	0,09	0,0082	4,46	1,71
9	1,44	0,03	0,0021	1,85	1,50
10	1,47	0,05	0,0052	1,83	1,45
11	1,65	0,08	0,0061	1,87	1,42
12	0,98	0,06	0,0059	1,25	1,29
13	1,52	0,06	0,0071	1,47	1,32
14	0,75	0,04	0,0032	2,53	1,52
15	1,53	0,07	0,0031	2,17	1,47
16	2,05	0,05	0,0042	2,19	1,38
17	1,36	0,04	0,0096	1,58	1,55
18	1,42	0,04	0,0075	2,69	1,87
19	1,36	0,06	0,0046	2,83	1,11
Condição ótima	1,89	0,08	0,0056	2,26	1,26

Verifica-se a presença do ácido acético, furfural, hidroxiacetilfurfural originados durante o processo da pré-hidrólise da biomassa lignocelulósica (CHUNG; LEE, 1985). Dentre estes compostos os fenólicos se encontraram em maior concentração cujos valores variaram entre 1,08 e 4,46 g/L (ensaios 3 e 8, respectivamente). No hidrolisado contendo maior concentração de xilose verificou-se uma concentração de compostos fenólicos de 2,26 g/L, e de acordo com Palmqvist e Hahn-Hagerdal (2000), o mecanismo de inibição destes compostos ainda não está bem elucidado, principalmente devido à falta de análises qualitativas e quantitativas apuradas.

Com relação ao ácido acético, verifica-se que os valores se encontraram na faixa de 0,75 a 2,53 g/L (ensaios 14 e 6, respectivamente), o que pode ser considerado não prejudicial ao metabolismo microbiano considerando que segundo Felipe *et al.* (1995) concentrações abaixo de 3,0 g/L não foram prejudiciais à bioconversão de xilose em xilitol durante fermentação de meio cultivado por *C. guilliermondii*.

As concentrações dos demais compostos tóxicos furfural e hidroxiacetilfurfural foram baixas, semelhante ao encontrado por Rodrigues *et al.* (2001), em trabalhos conduzidos com hidrolisado de bagaço de cana. Como relatado por Ojamo; Ylinen e

Linko (1988), estes compostos não foram considerados tóxicos para *C. guilliermondii* quando presentes em concentrações de 0,2 a 1,0 g/L, respectivamente, e inclusive favoreceram a bioconversão de xilose em xilitol.

5.3. Hidrólise Celulósica da Palha de Cevada

A celolignina da palha de cevada foi submetida ao processo de hidrólise celulósica para a obtenção da glicose que foi um dos parâmetros avaliados na bioconversão de xilose em xitol em frascos agitados.

Com o objetivo de se obter a melhor região das condições de hidrólise, ou seja, obter a máxima eficiência de extração de glicose da cadeia celulósica e assim otimizar as condições de hidrólise desta fração, foram realizados ensaios segundo um planejamento 2^{4-1} com triplicata no ponto central. Foram empregadas as mesmas variáveis avaliadas durante experimentos sobre a hidrólise da fração hemicelulósica, conforme apresentados na Tabela 5.12.

Tabela 5.12. Matriz do planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central empregado para avaliar a influência da temperatura, concentração ácida, tempo de hidrólise e relação sólido-líquido para a hidrólise celulósica da palha de cevada

Ensaios	Temperatura (°C)	Concentração Ácida (%)	Tempo (min.)	Relação Sólido: Líquido
1	155	1	20	1:6
2	155	3	40	1:6
3	155	1	40	1:10
4	155	3	20	1:10
5	175	1	40	1:6
6	175	3	20	1:6
7	175	1	20	1:10
8	175	3	40	1:10
9	165	2	30	1:8
10	165	2	30	1:8
11	165	2	30	1:8

Após serem realizados os ensaios previstos no planejamento fatorial foram feitas as análises para a verificação da quantidade de glicose presente no hidrolisado celulósico da palha de cevada, as quais estão apresentadas na Tabela 5.13.

Tabela 5.13. Eficiência de extração e concentração de glicose nos hidrolisados de acordo com o planejamento experimental 2^{4-1} com ponto central

Ensaio	Eficiência*	Glicose (g/L)
1	0,62	0,13
2	2,63	0,52
3	2,36	0,30
4	2,23	0,28
5	6,55	2,84
6	6,16	2,67
7	5,86	1,52
8	5,86	1,52
9	11,70	1,37
10	12,20	1,43
11	12,40	1,48

*Eficiência de extração da glicose da cadeia celulósica da palha de cevada(%).

Como pode ser observado na Tabela 5.13 os valores mínimo e máximo de extração de glicose foram 0,62 e 12,40%, respectivamente, sendo que a máxima eficiência foi adquirida no ponto central do planejamento proposto.

Os fatores que têm sido identificados como aqueles que mais interferem na hidrólise da celulose incluem a porosidade do material (áreas superficial acessível), a cristalinidade da fibra celulósica e o conteúdo de hemicelulose e de lignina (McMILLAN,1994). Segundo esse autor, a presença de hemicelulose e de lignina dificulta o acesso à celulose reduzindo, portanto a eficiência da hidrólise. A celulose tem na maior parte de sua estrutura, ligações axiais entre moléculas de glicose, formando cadeias que se acoplam por ligações fortes como pontes de hidrogênio, resultado em uma estrutura cristalina e resistente à hidrólise ácida (FENGEL, 1989). Observa-se analisando as pequenas concentrações de glicose durante a hidrólise que a cadeia celulósica realmente não foi hidrolisada nessas condições uma vez que o equipamento utilizado para a realização dos ensaios da hidrólise celulósica não é provido de sistema de agitação, a reação de hidrólise da cadeia celulósica catalisada pelo H_2SO_4 pode ter sido prejudicada pela falta de homogeneização do meio, dificultando o acesso da água e do ácido à palha, diminuindo o rendimento de extração.

Mosier *et al.*, (2001) avaliando a hidrólise celulósica de resíduos de eucalipto, utilizando temperatura de 175° C por 30 minutos, solução de ácido sulfúrico 50mM e relação sólido-líquido de 1:25, observaram que 7% da celulose inicial foi hidrolisada (0,82 g/L), e que 7,5% da celulose convertida foi transformada em produto de

degradação. É difícil fazer uma comparação dos resultados obtidos para a extração de glicose a partir da hidrólise celulósica neste presente trabalho com os da literatura, pois esse rendimento não depende somente das condições de hidrólise empregadas, mas também do tipo de reator utilizado e da matéria-prima empregada.

Devido às baixas extrações de glicose obtidas no presente trabalho, optou-se pela avaliação de outro método baseado na solubilidade da lignina em NaOH concentrado, com o objetivo de facilitar a reação de hidrólise da cadeia celulósica após a remoção da lignina.

5.3.1. Pré-tratamento da Palha de Cevada com NaOH Concentrado para Remoção da Lignina.

O hidróxido de sódio concentrado foi utilizado para solubilizar a lignina presente no resíduo, facilitando assim a reação de hidrólise ácida para clivar a celulose em glicose.

A hidrólise alcalina foi conduzida em um reator descontínuo conforme descrito no item 4.4.2, a uma temperatura de 100°C, relação sólido-líquido de 1:20, tempo de reação de 1 hora e concentração alcalina de 1,5% (p/v) (ROCHA, 2000).

Após o tratamento alcalino, foram repetidos os ensaios realizados sob as condições previstas pelo planejamento fatorial, nestes, empregou-se resíduos quase completamente livre da lignina. A análise das concentrações de glicose presentes no hidrolisado celulósico da palha de cevada se encontram apresentados na Tabela 5.14.

Tabela 5.14. Eficiência de extração e concentração de glicose nos hidrolisados de acordo com o planejamento experimental 2^{4-1} com ponto central após o tratamento do resíduo com NaOH concentrado

Ensaio	Eficiência*	Glicose (g/L)
1	2,63	1,05
2	6,89	3,12
3	5,32	2,13
4	5,82	2,32
5	36,51	17,83
6	37,88	18,46
7	10,90	4,36
8	47,31	18,90
9	52,26	16,76
10	51,03	16,36
11	52,30	16,77

*Eficiência de extração da glicose da cadeia celulósica da palha de cevada(%).

Como se pode observar na Tabela 5.14, os resultados obtidos após o tratamento da palha com NaOH concentrado se apresentaram muito mais satisfatórios que os resultados obtidos anteriormente à remoção da lignina (Tabela 5.13).

O processo de fracionamento em dois estágios de materiais lignocelulósicos é o mais indicado para o aproveitamento total dessa biomassa, já que antes da fração celulósica poder ser utilizada como substrato, é necessário separá-la das restrições causadas pelo envoltório hemicelulose-lignina, como também pode aumentar sua área superficial (DUFF; MURRAY, 1996).

Foi realizada a análise estatística para a hidrólise celulósica apenas para os resultados obtidos a partir da hidrólise do resíduo após o tratamento com NaOH sendo que a análise de variância para o modelo estudado se encontra apresentado na Tabela 5.15.

Tabela 5.15. Análise da variância para o modelo estudado na hidrólise celulósica da palha de cevada para o planejamento fatorial 2^{4-1} com ponto central

CV	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Teste f	Nível de Significância (p)
Modelo	2305,40	7	329,38	631,98	0,0016
Curvatura	2333,81	1	2333,81	4477,53	0,0002
Resíduo	1,046	2	0,520	-	-
Erro puro	1,045	2	0,520	-	-

Observa-se (Tabela 5.15) através da análise do nível de significância (p) da curvatura que o modelo para extração de glicose da fração celulósica da palha de cevada é quadrático ao nível de confiança de quase 100%.

A Tabela 5.16 mostra que todos os fatores possuem efeito principal significativos ao nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). As interações entre os fatores também foram significativas e isso indica que o nível de um fator interfere no outro. Os coeficientes estimados do efeitos temperatura, concentração ácida e tempo são positivos, indicando que obtém-se maior extração de glicose quando se utiliza maior temperatura (175°C), maior concentração ácida (3%) e maior tempo de reação (30 minutos). O coeficiente estimado do fator relação sólido-líquido é negativo, indicando que a utilização da relação palha/água de 1:6 obtém-se a glicose mais concentrada.

O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,99, isto significa que mais de 99% das variações totais em torno das médias, provocadas pelas condições experimentais, foram explicadas pelo modelo.

Tabela 5.16. Análise da variância, estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para os parâmetros estudados na hidrólise celulósica da palha de cevada com planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central

Efeitos	Coeficientes Estimados	Grau de Liberdade	Erro-padrão	Nível de Significância (p)
Média	19,16	1	0,26	-
Fator A	13,99	1	0,26	0,0003
Fator B	5,32	1	0,26	0,0023
Fator C	4,85	1	0,26	0,0028
Fator D	-1,82	1	0,26	0,0191
AB	4,13	1	0,26	0,0038
AC	3,91	1	0,26	0,0042
AD	-2,22	1	0,26	0,0129
Ponto central	32,71	2	0,49	0,0002

$R^2=0,999$

A– Temperatura, B– Concentração Ácida, C – Tempo, D – Relação Sólido: Líquido

Segundo Jacobsen e Wiman (2000) os modelos cinéticos estudados para a hidrólise da celulose de resíduos de eucalipto mostram que o rendimento em glicose aumenta com aumento da concentração ácida e da temperatura. Porém, nenhum dos modelos propõe um rendimento superior a 70% do valor teórico devido à perda de glicose em vários produtos de degradação, com a elevação da temperatura.

O modelo matemático encontrado para representar a porcentagem de extração de glicose a partir da hidrólise celulósica da palha de cevada foi expresso pela equação 5.3.

$$Y = 19,16 + 13,99X_1 + 5,32X_2 + 4,85X_3 - 1,82X_4 - 2,22X_1X_4 + 4,13X_1X_2 + 3,91X_2X_3 \quad \text{Eq. 5.3}$$

Em que,

Y corresponde à porcentagem de extração de glicose da fração celulósica da palha de cevada;

X_1 corresponde à temperatura (°C);

X_2 corresponde à concentração ácida em % (m/v);

X_3 corresponde ao tempo de reação (minutos);

X_4 corresponde à relação sólido: líquido.

A estimativa do modelo para extração máxima de glicose da fração celulósica da palha de cevada é de 47,31%. Observa-se na Figura 5.3 que a extração de glicose da fração celulósica da palha de cevada é mais sensível à variação de temperatura, já que utilizando uma relação sólido-líquido de 1:6 e variando-se a temperatura de 155°C para 175°C, o rendimento de extração de glicose vai de 2,63 a 36,61%. Quando se utiliza uma temperatura de 175°C e varia-se a concentração ácida de 1 a 3%, o rendimento de extração de glicose varia apenas de 36,51 a 37,88%. Variando-se a relação sólido-líquido de 1:10 a 1:6, nessa mesma temperatura, o rendimento de extração passa de 10,9 a 36,61%.

Figura 5.3. Interações entre os efeitos temperatura, relação sólido-líquido e concentração ácida a partir da hidrólise celulósica da palha de cevada.

Para obtenção dos coeficientes do modelo quadrático foi ampliado o planejamento 2^{4-1} com ponto central para um rotacional, que constitui em acrescentar ao planejamento novos ensaios, localizados em 45 graus em relação à orientação de partida. Os novos pontos estão a uma distância de $2^{1/2}$ do ponto central (em variáveis codificadas). A Tabela 5.17 mostra a matriz do planejamento rotacional, sendo que os níveis dos fatores utilizados no planejamento estão mostrados na Tabela 5.18, e foram codificados em (-1) menor nível, (+1) maior nível, (0) ponto central, (+1,41) maior nível do planejamento rotacional e (-1,41) menor nível do planejamento rotacional.

Tabela 5.17. Matriz de planejamento referente aos fatores avaliados para hidrólise da celulose na palha de cevada no planejamento fatorial fracionário rotacional 2^{4-1} com triplicata no ponto central

Ensaio	Temperatura (°C)	Concentração Ácida (%)	Tempo (min.)	Relação Sólido: Líquido
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	+1,41	0	0	0
13	-1,41	0	0	0
14	0	+1,41	0	0
15	0	-1,41	0	0
16	0	0	+1,41	0
17	0	0	-1,41	0
18	0	0	0	+1,41
19	0	0	0	-1,41

Tabela 5.18. Níveis de fatores utilizados no planejamento fatorial fracionário rotacional 2^{4-1} com ponto central

Fatores	Siglas	Níveis				
		(-1)	(-1,41)	0	(+1)	(+1,41)
Temperatura (°C)	A	155	151	165	175	179
Conc. Ácida (%)	B	1	0,6	2	3	3,4
Tempo (minutos)	C	20	16	30	40	44
Relação sólido: líquido	D	1:6	1:5,2	1:8	1:10	1:10,8

Com a realização dos novos ensaios, obteve-se os coeficientes quadráticos do modelo para a hidrólise celulósica da palha de cevada.

A Tabela 5.19 mostra os resultados da eficiência e concentração de glicose presentes no hidrolisado celulósico da palha de cevada.

Tabela 5.19. Eficiência de extração e concentração de glicose nos hidrolisados de acordo com o planejamento experimental rotacional 2^{4-1} com ponto central após o tratamento do resíduo com NaOH concentrado

Ensaio	Eficiência*	Glicose (g/L)
1	2,63	1,05
2	6,89	3,12
3	5,32	2,13
4	5,82	2,32
5	36,51	17,83
6	37,88	18,46
7	10,90	4,36
8	47,31	18,90
9	52,26	16,76
10	51,03	16,36
11	52,30	16,77
12	62,58	19,36
13	26,89	15,52
14	45,85	18,35
15	25,23	4,25
16	58,95	19,69
17	15,69	12,52
18	38,63	10,49
19	15,69	7,52

*Eficiência de extração da glicose da cadeia celulósica da palha de cevada(%).

Quanto à porcentagem de eficiência de extração da glicose da cadeia celulósica da palha de cevada, o melhor resultado alcançado foi 62,58% obtido no ensaio 12, em que a hidrólise foi realizada com solução de H_2SO_4 a 2% a $179^{\circ}C$, na proporção de 1:8 de palha: solução, durante 30 minutos.

As estimativas dos efeitos, os erros-padrão e o teste t de “Student” para o planejamento fatorial rotacional 2^{4-1} com triplicata no ponto central são apresentados na Tabela 5.20.

Tabela 5.20. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para o planejamento fatorial rotacional 2^{4-1} com triplicata no ponto central que representa a eficiência de extração da glicose da cadeia celulósica da palha de cevada

Efeitos e Interações	Estimativas	Erros-Padrão	Teste t
Média	52,27	$\pm 3,517$	
Fator A	15,51	$\pm 4,371$	3,548*
Fator B	28,88	$\pm 4,371$	6,607*
Fator C	11,88	$\pm 4,371$	2,718**
Fator D	2,42	$\pm 4,371$	0,554
A ²	-7,88	$\pm 5,253$	1,499
B ²	-17,13	$\pm 5,253$	3,260**
C ²	-15,34	$\pm 5,253$	2,919**
D ²	-25,56	$\pm 5,253$	4,865*
AD+BC	7,82	$\pm 5,348$	1,462
AB+CD	8,26	$\pm 5,348$	1,435
AC+BD	-4,45	$\pm 5,348$	0,832

A – Temperatura, B – Concentração Ácida, C – Tempo, D – Relação Sólido: Líquido

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($t \geq 3,355$)

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($t \geq 2,306$)

Verifica-se na Tabela 5.20 que o fator D, referente à relação sólido: líquido, a interação quadrática A², referente à temperatura, bem como nenhuma das interações de um fator com outro, exerceram influência significativa em nível de 5% de probabilidade, devido ao fato dos valores de *t* calculados serem inferiores aos valores de *t* tabelados. Considerando-se um nível de 5% de probabilidade verificou-se que o fator C (tempo) e as interações quadráticas B (concentração ácida) e D (relação sólido: líquido), apresentaram efeito significativo. Os fatores A (temperatura) e B (concentração ácida), bem como a interação quadrática C (tempo), apresentaram efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade.

A Tabela 5.21 mostra a análise de variância para os efeitos estimados, sendo retirados os efeitos não significativos a este planejamento ao nível de 10% de probabilidade.

Tabela 5.21. Análise de variância para os efeitos estimados no planejamento fatorial rotacional 2^{4-1} com triplicata no ponto central frente à eficiência de extração da glicose da cadeia celulósica da palha de cevada

Efeitos	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Teste f	Nível de Significância (p)
Fator A	720,06	1	720,06	10,22	0,0077*
Fator B	2497,21	1	2497,21	35,46	0,0001*
Fator C	422,64	1	422,64	6,00	0,0306**
B ²	513,82	1	513,82	7,30	0,0193**
C ²	1398,71	1	1398,71	19,86	0,0008*
D ²	637,49	1	637,49	9,05	0,0109**
Erros	845,06	12	70,42		
Total	7034,99	18			

$$R^2 = 0,884$$

A – Temperatura, B – Concentração Ácida, C – Tempo, D – Relação Sólido: Líquido

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

** Significativo ao nível de 5% de probabilidade

A temperatura, a concentração ácida e o efeito quadrático do tempo tiveram efeitos significativos ao nível de 99% de confiança. O fator tempo e os efeitos quadráticos da relação sólido: líquido e da concentração ácida apresentaram efeito significativo ao nível de 95% de confiança.

Foi realizada uma análise de variância para o modelo proposto (Tabela 5.22), comprovando, assim, sua significância estatística ($p < 0,01$), com coeficiente de determinação (R^2) correspondendo a 0,8843 que descreve 88,43% de variância ocorrida no fator eficiência de extração da glicose da cadeia celulósica da palha de cevada.

Tabela 5.22. Análise de variância da regressão do modelo que representa o processo de hidrólise celulósica da palha de cevada no planejamento fatorial rotacional 2^{4-1} com triplicata no ponto central frente à eficiência de extração da glicose da cadeia celulósica da palha de cevada

CV	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Teste f	Nível de Significância (p)
Modelo	6189,93	6	327,56	211,8	0,0007*
Resíduo	845,06	12	27,68		
Total	7034,99	18			

$$R^2 = 0,8843$$

* Significativo ao nível de 1% de probabilidade

O modelo matemático para representar o processo de hidrólise celulósica de palha de cevada, considerando os termos que realmente influenciam o processo hidrolítico, pode ser expresso pela equação 5.4.

$$Y = 32,63 + 15,51X_1 + 28,88X_2 + 11,81X_3 - 15,73X_2^2 - 25,95X_3^2 \quad \text{Eq. 5.4}$$

Em que,

Y corresponde a eficiência de extração da glicose da cadeia celulósica da palha de cevada(%),

X_1 corresponde à temperatura ((C);

X_2 corresponde à concentração ácida em % (m/v);

X_3 corresponde ao tempo de reação (minutos);

O modelo matemático ajustado aos dados obtidos, ilustrado pela superfície de resposta apresentada na Figura 5.4, forneceu um máximo de eficiência de extração da glicose quando, o processo foi conduzido por 30 minutos, e se utilizou concentração de ácido e temperatura nos níveis superiores, correspondendo a 3% e 175°C, respectivamente. Nestas condições foi possível obter uma eficiência de extração da glicose de aproximadamente 70%.

Figura 5.4. Superfície de resposta descrita pelo modelo quadrático para o fator eficiência de extração de glicose (%).

Os melhores valores são previstos quando a concentração ácida (%) e temperatura (°C) são empregadas em seus maiores níveis.

Para a validação do modelo proposto para eficiência de extração da glicose foram realizadas triplicatas nas condições determinadas pela metodologia estatística. A celolignina foi primeiramente tratada com NaOH e posteriormente hidrolisada na temperatura de 179°C, com uma concentração ácida de 3%, tempo de reação de 30 minutos e relação sólido: líquido de 1:8. Com a substituição destes valores codificados na equação proposta para o modelo, obtêm-se um valor estimado para eficiência de extração da glicose de 68,58%. Experimentalmente foi obtido 67,96%, indicando a adequação do modelo para representar matematicamente o rendimento de glicose.

5.4. Processo de Bioconversão para Obtenção de Xilitol empregando Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Cevada em Frascos Erlenmeyer

O hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada obtido das condições ótimas de hidrólise foi empregado como meio de fermentação para produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037, enquanto o hidrolisado, rico em glicose, foi utilizado como um dos parâmetros fermentativos estudados neste bioprocessos segundo planejamento fatorial 2^{6-2} foi empregado.

5.4.1. O Substrato: Hidrolisado Hemicelulósico

O hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada obtido após a hidrólise sob as condições ótimas definidas anteriormente, o hidrolisado original, (item 5.2) foi caracterizado quanto aos teores de açúcares e compostos tóxicos aos microrganismos conforme apresentados na Tabela 5.23.

Tabela 5.23. Composição do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	7,23
Xilose	21,35
Arabinose	2,77
Ácido Acético	3,25
Furfural	0,35
Hidroximetilfurfural	0,12
Fenóis totais	1,26

Como observado na Tabela 5.23, a xilose foi o açúcar predominante, seguido da glicose e arabinose em quantidades decrescentes. Segundo Mussato (2002), a porcentagem de separação das pentosanas (xilose + arabinose) presentes na matéria-prima é calculada pela quantidade de palha seca e volume de solução ácida na hidrólise ácida e das concentrações de xilose e arabinose encontradas. Sabendo-se que a palha utilizada neste trabalho apresentou em sua constituição 21,41% de hemicelulose o que corresponde à fração de pentosanas presentes na matéria-prima, pode-se estimar que nas condições de hidrólise empregadas, foi alcançada uma recuperação de 82,36% das pentosanas presentes na palha de cevada.

Quanto à concentração de glicose (7,23 g/L) esta se mostrou bastante elevada quando comparada às de hidrolisados de palha de arroz (3,50 g/L) (MUSSATO, 2002) e bagaço de cana (1,40 g/L) (CARVALHO, 2004). Neste contexto, acredita-se que a elevada concentração de glicose no hidrolisado de palha de cevada é devido além, das diferentes condições de hidrólise, à presença de amido residual neste material, fato também constatado com outro resíduo, o bagaço de malte, com 14,9 g/L de xilose e 6,2 g/L de glicose (CARVALHEIRO et al., 2005).

Com relação aos compostos inibitórios ao metabolismo microbiano, as pequenas concentrações de furfural (0,35 g/L) e hidroximetilfurfural (0,12 g/L) encontradas no hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada indicam que as condições de hidrólise foram adequadas para extrair os açúcares contidos na fração hemicelulósica da palha, sem causar a sua decomposição. Concentrações de furfural de 0,10 g/L, 0,15 g/L e 0,26 g/L e hidroximetilfurfural 0,20 g/L, 0,03 g/L e 0,18 g/L, foram obtidas durante as hidrólises da palha de arroz (MUSSATO, 2002), bagaço de cana (CARVALHO, 2004), e palha de trigo (CANILHA, 2006), respectivamente.

Quanto à concentração de ácido acético resultante (3,25 g/L) verifica-se na tabela 5.23 que está superior às obtidas nos hidrolisados hemicelulósicos de palha de arroz (1,13 g/L) (MUSSATO, 2002), bagaço de cana (2,60 g/L) (CARVALHO, 2004) e palha de trigo (2,05 g/L) (CANILHA, 2006), enquanto para os fenóis totais (1,26 g/L), o valor obtido é inferior ao encontrado nos hidrolisados de bagaço de cana (2,60 g/L) (CARVALHO, 2004) e palha de trigo (1,49 g/L) (CANILHA, 2006).

Após esta caracterização inicial o hidrolisado (original) foi concentrado com o intuito de aumentar o teor inicial de xilose para 60, 70 e 80 g/L, uma vez que baixas concentrações de xilose no meio inicial pode resultar em perda de produtividade (FELIPE *et al.*, 1996b)

A Tabela 5.24 apresenta a composição dos hidrolisados após o processo de concentração descrito no item 4.2.3.2.

Tabela 5.24. Composição dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de cevada após concentração à vácuo

Componente	Concentração (g/L)		
	60	70	80
Glicose	19,16	21,52	23,69
Xilose	62,59	72,22	81,25
Arabinose	10,39	11,88	13,85
Ácido Acético	2,79	2,87	2,41
Furfural	0,08	0,11	0,15
Hidroximetilfurfural	0,21	0,31	0,40
Fenóis totais	6,23	10,25	11,56

Comparando as Tabelas 5.23 e 5.24, observa-se que os teores dos açúcares presentes no hidrolisado original aumentaram de maneira proporcional aos fatores de concentração utilizados para que se chegasse à concentração de xilose nos valores de 60, 70 e 80 g/L. Com relação aos teores de inibidores quantificados, verificou-se um comportamento diferenciado uma vez que não se verifica uma tendência de aumento proporcional no teor de ácido acético com o aumento do fator de concentração do hidrolisado diferentemente ao observado para os demais compostos. Segundo Rodrigues (1999), o baixo valor de pH do hidrolisado favorece a volatilização parcial do ácido acético por esse se encontrar na sua forma não dissociada nesta condição. Portanto, pode ter ocorrido volatilização parcial deste composto nas condições empregadas. A concentração de furfural foi reduzida, esta remoção pode ter sido favorecida pelas condições de operação do processo de concentração (70°C), uma vez que, segundo Perry (1997), o furfural apresenta ponto de ebulição de 54 – 55 °C. Para hidroximetilfurfural e fenóis totais, verificaram-se aumentos progressivos nas suas concentrações.

Após a concentração dos hidrolisados, o teor de compostos inibidores do metabolismo microbiano se modificou. Com as características mostradas na tabela 5.24 os rendimentos do processo de bioconversão ficariam significativamente reduzidos, comprometendo a viabilidade do processo (MARTON, 2002). Desta forma, com a finalidade de reduzir a concentração de compostos inibitórios e possibilitar o emprego do hidrolisado em processos de bioconversão, este foi submetido à destoxificação por alteração de pH realizada segundo metodologia descrita no item 4.2.3.2. Os resultados referentes à composição dos hidrolisados após este processo encontram-se na Tabela 5.25.

Tabela 5.25. Composição dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de cevada após a destoxificação

Componente	Concentração (g/L)		
	60	70	80
Glicose	21,32	28,69	30,58
Xilose	59,50	68,26	80,06
Arabinose	8,78	9,85	11,45
Ácido Acético	2,35	2,68	2,40
Furfural	0,002	0,006	0,008
Hidroximetilfurfural	0,004	0,007	0,09
Fenóis totais	0,25	0,98	2,74

Conforme pode ser observado na Tabela 5.25, o tratamento utilizado para a destoxificação dos hidrolisados foi capaz de reduzir as concentrações dos inibidores presentes, exceto o ácido acético.

O furfural e o hidroximetilfurfural foram praticamente eliminados dos hidrolisados. O teor de fenóis totais permaneceram em concentrações progressivamente crescentes nos hidrolisados concentrados, embora não se possa deixar de destacar uma grande redução destes compostos em relação às concentrações nos hidrolisados concentrados (Tabela 5.24).

A quantidade de furfural e hidroximetilfurfural (Tabela 5.25) presentes no hidrolisado destoxificado pode não ser considerada inibitória a este bioprocessamento uma vez que segundo Ojamo; Yline e Linko (1988) concentrações destes entre 0,2 e 1,0 g/L, respectivamente, não foram consideradas tóxicas para a levedura *C. guilliermondii*.

Com relação à concentração de ácido acético presente no hidrolisado destoxificado (Tabela 5.25) esta pode também não ser considerada inibitória a este bioprocessamento, pois segundo Felipe *et al.* (1995) concentrações deste ácido menores ou iguais a 3,0 g/L não foram consideradas inibitórias para a levedura *C. guilliermondii*.

Com relação à redução no teor dos açúcares após a destoxificação (Tabela 5.25), observa-se que as maiores perdas de glicose e de arabinose foram 15,41% e 17,32%, respectivamente. Em relação à xilose que é o substrato para a produção de xilitol, a maior perda foi de apenas 5,5%, valor bem inferior ao encontrado em outros trabalhos como no caso do tratamento de hidrolisado de bagaço de cana destoxificado pelo método utilizando resinas de troca iônica (CARVALHO JUNIOR; MARTON; FELIPE, 2005).

5.4.2. Avaliação da Produção de Xilitol por *C. guilliermondii* em Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Cevada empregando Frascos Agitados

Nesta etapa, a bioconversão de xilose em xilitol foi realizada através de processo descontínuo, em frascos Erlenmeyer, variando-se as concentrações de: a sulfato de amônio, cloreto de cálcio, solução de extrato de farelo de arroz, concentração de xilose e glicose no meio, sendo que para a glicose o seu tempo de adição ao meio também foi avaliado.

Para esta este estudo, foi empregado um planejamento fatorial 2^{6-2} com três repetições no ponto central a fim de identificar os fatores que influenciam a produtividade volumétrica de xilitol (Q_p).

Na Tabela 5.26 estão apresentados os valores da produtividade volumétrica de xilitol (Q_p) obtidos após 72 horas de fermentação, em diferentes condições de cultivo.

Tabela 5.26. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} com triplicata no ponto central e os valores de produtividade volumétrica (Q_p) no processo de bioconversão de xilose em xilitol

Ensaio	Sulfato de Amônio (g/L)	Cloreto de Cálcio (g/L)	Farelo de Arroz (g/L)	Xilose (g/L)	Glicose (g/L)	Alimentação de glicose (min)	Q_p (g/L.h)
1	1,0	0	5,0	60,0	5,0	20	0,69
2	3,0	0	5,0	60,0	9,0	20	0,53
3	1,0	1,0	5,0	60,0	9,0	60	0,67
4	3,0	1,0	5,0	60,0	5,0	60	0,59
5	1,0	0	20,0	60,0	9,0	60	0,49
6	3,0	0	20,0	60,0	5,0	60	0,36
7	1,0	1,0	20,0	60,0	5,0	20	0,46
8	3,0	1,0	20,0	60,0	9,0	20	0,41
9	1,0	0	5,0	80,0	5,0	60	0,48
10	3,0	0	5,0	80,0	9,0	60	0,25
11	1,0	1,0	5,0	80,0	9,0	20	0,47
12	3,0	1,0	5,0	80,0	5,0	20	0,31
13	1,0	0	20,0	80,0	9,0	20	0,62
14	3,0	0	20,0	80,0	5,0	20	0,31
15	1,0	1,0	20,0	80,0	5,0	60	0,32
16	3,0	1,0	20,0	80,0	9,0	60	0,45
17	2,0	0,5	12,5	70,0	7,0	40	0,48
18	2,0	0,5	12,5	70,0	7,0	40	0,38
19	2,0	0,5	12,5	70,0	7,0	40	0,39

Ainda com relação à Tabela 5.26 pode-se observar que as diferentes condições de cultivo da levedura proporcionaram variações nos valores da produtividade volumétrica de xilitol, sendo o valor máximo de 0,69 g/L.h obtido no ensaio 1 o que correspondeu às concentrações de nutrientes e tempo de adição de glicose em seus níveis inferiores.

Pela metodologia de planejamento de experimentos, foram quantificados os efeitos das principais interações entre dois fatores que influenciaram o parâmetro fermentativo produtividade volumétrica (Qp). A Tabela 5.27 apresenta a estimativa dos efeitos, os erros-padrão e o teste t de "Student", análise utilizada para verificar o nível de significância estatística do efeito determinado sobre Qp.

Tabela 5.27. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de "Student" para o planejamento fatorial 2^{6-2} com triplicata no ponto central que representa o fator de produtividade volumétrica (Qp)

Efeitos e Interações	Estimativas	Erros-Padrão	Teste t
Média	0,455	+/- 0,014	-
Fator A	-0,123	+/- 0,032	3,858*
Fator B	-0,006	+/- 0,032	0,195
Fator C	-0,071	+/- 0,032	2,221**
Fator D	-0,123	+/- 0,032	3,858*
Fator E	0,046	+/- 0,032	1,442
Fator F	-0,023	+/- 0,032	0,740
AB + CE	0,083	+/- 0,032	2,611*
AC + BE	0,033	+/- 0,032	0,112
AD + EF	-0,018	+/- 0,032	0,584
AE + BC + DF	-0,028	+/- 0,032	0,896
AF + DE	0,046	+/- 0,032	0,153
BD + CF	-0,021	+/- 0,032	0,662
BF + CD	0,118	+/- 0,032	3,702*

$$R^2 = 0,926$$

A: sulfato de amônio, B: cloreto de cálcio, C: solução de extrato de farelo de arroz, D: concentração inicial de xilose, E: concentração de glicose, F: tempo de alimentação de glicose

*Significativo ao nível de 95% de confiança ($t \geq 2,571$)

*Significativo ao nível de 90% de confiança ($p \leq 2,015$)

Verifica-se na Tabela 5.27 que o sulfato de amônio (A), a concentração inicial de xilose no hidrolisado (D), bem como as interações sulfato de amônio e cloreto de cálcio mais farelo de arroz e concentração de glicose (AB+CE) bem como cloreto de cálcio e tempo de alimentação de glicose mais farelo de arroz e concentração inicial de xilose (BF+CD) influenciaram significativamente o parâmetro produtividade volumétrica em xilitol ao nível de 5% de probabilidade. O farelo de arroz (C), como efeito principal, apresentou significância de 10 % de probabilidade.

Observa-se ainda que (Tabela 5.27) a concentração de glicose (E) e seu tempo de alimentação (F), não foram significativos como efeitos principais e também suas interações. Desta forma, estes fatores, assim como suas interações, foram descartadas para o prosseguimento de uma análise estatística considerando apenas fatores significativos. Ressalta-se que o cloreto de cálcio (B), apesar de não apresentar significância como fator principal foi mantido para a análise pois apresentou significância quando interagido com o sulfato de amônio (A).

Foi realizada uma nova análise estatística com os valores de produtividade volumétrica (Qp) alcançados após 72 horas de fermentação sendo que o planejamento fatorial fracionário 2^{6-2} , passou a ser um planejamento fatorial completo 2^4 com triplicata no ponto central, sendo que a concentração de glicose (E) e seu tempo de alimentação (F), foram excluídos da análise estatística por não apresentarem significância.

A Tabela 5.28 apresenta a estimativa dos efeitos, os erros-padrão e o teste t de "Student", segundo o planejamento 2^4 com triplicata no ponto central.

Tabela 5.28. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de "Student" para o planejamento fatorial 2^4 com triplicata no ponto central que representa o fator de produtividade volumétrica (Qp)

Efeitos e Interações	Estimativas	Erros-Padrão	Teste t
Média	0,455	+/- 0,016	-
Fator A	-0,123	+/- 0,035	3,502*
Fator B	-0,006	+/- 0,035	0,177
Fator C	-0,071	+/- 0,035	2,026**
Fator D	-0,123	+/- 0,035	3,502*
AB	0,083	+/- 0,035	2,370**
AC	0,033	+/- 0,035	0,955
AD	-0,018	+/- 0,035	0,531
BC	-0,028	+/- 0,035	0,814
BD	-0,021	+/- 0,035	0,601
CD	0,118	+/- 0,035	3,361*

$$R^2 = 0,856$$

A: sulfato de amônio, B: cloreto de cálcio, C: solução de extrato de farelo de arroz, D: concentração inicial de xilose

*Significativo ao nível de 95% de confiança ($t \geq 2,571$)

*Significativo ao nível de 90% de confiança ($p \geq 2,015$)

Observando a Tabela 5.28, verifica-se que o cloreto de cálcio (B), continua não apresentando significância considerando-se um intervalo de confiança de 90%, no entanto sua interação com o sulfato de amônio (A) apresenta-se como significativo neste intervalo.

Com a análise de curvatura obtida com os resultados analisados com o planejamento 2^4 com ponto central, verifica-se um valor representativo e significativo da curvatura dentro do intervalo de 95% de confiança ($p=0,0034$), indicando que um modelo quadrático é mais adequado para explicação do processo.

Para obtenção dos coeficientes do modelo quadrático foi ampliado o planejamento 2^4 compondo um planejamento em face centrada, e experimentos adicionais foram realizados para obtenção dos coeficientes do modelo quadrático.

A Tabela 5.29 apresenta os valores da produtividade volumétrica (Q_p) obtidos em 72 horas de fermentação, utilizando-se as diferentes condições de cultivo no planejamento 2^4 com face centrada e triplicata no ponto central.

Tabela 5.29. Matriz do planejamento fatorial 2^4 com face centrada e triplicata no ponto central e os valores de produtividade volumétrica (Q_p) no processo de bioconversão de xilose em xilitol

Ensaios	Sulfato de Amônio (g/L)	Cloreto de Cálcio (g/L)	Farelo de Arroz (g/L)	Concentração Inicial de Xilose (g/L)	Q_p (g/L.h)
1	1,0	0	5,0	60,0	0,69
2	3,0	0	5,0	60,0	0,53
3	1,0	1,0	5,0	60,0	0,67
4	3,0	1,0	5,0	60,0	0,59
5	1,0	0	20,0	60,0	0,49
6	3,0	0	20,0	60,0	0,36
7	1,0	1,0	20,0	60,0	0,46
8	3,0	1,0	20,0	60,0	0,41
9	1,0	0	5,0	80,0	0,48
10	3,0	0	5,0	80,0	0,25
11	1,0	1,0	5,0	80,0	0,47
12	3,0	1,0	5,0	80,0	0,31
13	1,0	0	20,0	80,0	0,62
14	3,0	0	20,0	80,0	0,31
15	1,0	1,0	20,0	80,0	0,32
16	3,0	1,0	20,0	80,0	0,45
17	2,0	0,5	12,5	70,0	0,48
18	2,0	0,5	12,5	70,0	0,38
19	2,0	0,5	12,5	70,0	0,39
20	3,0	0	12,5	70,0	0,57
21	1,0	0	12,5	70,0	0,42
22	2,0	1,0	12,5	70,0	0,40
23	2,0	0,5	12,5	70,0	0,36
24	2,0	0	20,0	70,0	0,51
25	0	0	5,0	70,0	0,52
26	0	0	12,5	80,0	0,61
27	0	0	12,5	60,0	0,67

A Tabela 5.30 apresenta a estimativa dos efeitos, os erros-padrão e o teste t de "Student", análise utilizada para verificar o nível de significância estatística do

efeito determinado sobre Qp, segundo o planejamento fatorial 2^4 com face centrada e triplicata no ponto central.

Tabela 5.30. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para o planejamento fatorial 2^4 com face centrada e triplicata no ponto central que representa o fator de produtividade volumétrica (Qp)

Efeitos e Interações	Estimativas	Erros-Padrão	Teste t
Média	0,479259	+/- 0,028759	-
Fator A	-0,12667	+/- 0,036789	3,443*
Fator B	-0,01	+/- 0,036789	0,271
Fator C	-0,06222	+/- 0,036789	1,691
Fator D	-0,1033	+/- 0,036789	2,808*
A ²	-0,0311	+/- 0,097334	0,320
AB	0,0838	+/- 0,036789	2,277**
AC	0,0338	+/- 0,036789	0,919
AD	-0,0188	+/- 0,036789	0,511
B ²	-0,2611	+/- 0,097334	2,683*
BC	-0,0288	+/- 0,036789	0,783
BD	-0,0213	+/- 0,036789	0,579
C ²	0,0089	+/- 0,097334	0,091
CD	0,1188	+/- 0,036789	3,229*
D ²	0,2589	+/- 0,097334	2,660*

$$R^2 = 0,8053$$

A: sulfato de amônio, B: cloreto de cálcio, C: solução de extrato de farelo de arroz, D: concentração inicial de xilose

*Significativo ao nível de 95% de confiança ($t \geq 2,571$)

*Significativo ao nível de 90% de confiança ($p \geq 2,015$)

Verifica-se na Tabela 5.30, que o farelo de arroz (A), concentração inicial de xilose (D), as interações quadráticas do cloreto de cálcio (B²) e da concentração inicial de xilose (D²), bem com as interações sulfato de amônio e cloreto de cálcio (AB), farelo de arroz e concentração inicial de xilose (CD), influenciaram significativamente o parâmetro fermentativo Qp.

A Tabela 5.31 apresenta a análise de variância apenas com as variáveis independentes e interações significativas. Os efeitos que apresentaram níveis de significância desprovidos de significado estatístico ($p \geq 0,10$) foram excluídos previamente da análise de variância.

Tabela 5.31. Análise de variância para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais e interações sobre a produtividade volumétrica em xilitol

Efeitos	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste f	Nível de significância (p)
Fator A	0,0722	1	0,0722	14,07	0,0013*
Fator D	0,04805	1	0,04805	9,36	0,0062*
AB	0,02806	1	0,02806	5,47	0,0299*
B ²	0,06075	1	0,06075	11,84	0,0026*
CD	0,05641	1	0,05641	10,99	0,0035*
D ²	0,05208	1	0,05208	10,15	0,0046*
Erro Total	0,10265	20	0,00513		
Total	0,37546	26			

$$R^2 = 0,8053$$

A: sulfato de amônio, B: cloreto de cálcio, C: solução de extrato de farelo de arroz, D: concentração inicial de xilose

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

De uma maneira geral, pode-se constatar que apenas as concentrações sulfato de amônio (A) e de xilose inicial (D), bem como as interações do sulfato de amônio com cloreto de cálcio (AB) e farelo de arroz com a concentração inicial de xilose (CD) apresentaram significância ao nível de 95% de confiança.

O fator concentração inicial de xilose no hidrolisado exerce grande influência na produção de xilitol. Os melhores resultados obtidos com a menor concentração inicial de xilose no hidrolisado (60,0 g/L) podem ser explicados pela baixa concentração de compostos inibitórios presentes no hidrolisado após a destoxificação. Como pode ser observado na Tabela 5.24, o hidrolisado com 60,0 g/L de xilose apresentou menor concentração de fenóis totais que o hidrolisado com 80,0 g/L de xilose. Sabe-se que os compostos fenólicos podem inibir fortemente a bioconversão, destruindo a integridade da membrana e afetando as suas propriedades, como a de barreira seletiva (HEIPIEPER *et al.*, 1994). Também é preciso destacar a alta concentração de glicose (30,58 g/L) no hidrolisado com 80,0 g/L de xilose (Tabela 5.24), que pode ter contribuído para valores menores de produção de xilitol. Walther; Hensirisak e Agblevor (2001), cultivando a levedura *C. tropicalis* em meios sintéticos compostos de glicose e xilose e Silva (2004), com levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado de bagaço de cana, constataram que a relação glicose/xilose interfere no bioprocessamento.

O tipo e concentração de nutrientes a ser suplementado nos hidrolisados hemicelulósicos com vista à sua utilização na formulação de meios de cultivo depende do tipo de matéria-prima da qual o hidrolisado é obtido. Como exemplo, a

suplementação com sulfato de amônio, cloreto de cálcio e farelo de arroz do hidrolisado de palha de arroz se mostrou, além de desnecessária, prejudicial à bioconversão de xilose em xilitol pela levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 (SILVA; ROBERTO, 1999). Entretanto foi necessária a suplementação do hidrolisado de eucalipto com sulfato de amônio e farelo de arroz, para a bioconversão de xilose em xilitol pela mesma levedura (CANETTIERI; ALMEIDA e SILVA; FELIPE, 2002). A suplementação com estes mesmos nutrientes proporcionou melhor desempenho dessa levedura para a bioconversão de xilose em xilitol no hidrolisado de bagaço de cana (CARVALHO, 2004).

A Tabela 5.32 corresponde à análise de variância utilizada para determinar a significância estatística do modelo matemático obtido para prever os valores de produtividade no sistema em estudo.

Tabela 5.32. Análise de variância para verificar as significâncias estatísticas do modelo quadrático em prever os valores da produtividade volumétrica em xilitol

Efeitos	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	Nível de significância (p)
Modelo	0,27282	6	0,04547	14,50	0,0000
Resíduo	0,10265	20	0,00563		
Total	0,37546	26			

$$R^2 = 0,819$$

Conforme pode ser observado na Tabela 5.32, o modelo quadrático apresentou elevada significância ($p \leq 0,01$) e capacidade de predição adequada sendo capaz de explicar 81% da variação total. A Tabela 5.33 apresenta os valores dos coeficientes de regressão mantidos nos modelos, bem como seus respectivos níveis de significância (p).

Tabela 5.33. Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da produtividade volumétrica em xilitol

Efeitos e Interações	Estimativas	Erros-Padrão	Teste t
Média	0,477	0,025	18,795
Fator A	-0,126	0,033	-3,751
Fator D	-0,103	0,033	-3,059
AB	0,083	0,035	2,338
B ²	-0,270	0,078	-3,440
CD	0,1187	0,035	3,315
D ²	0,250	0,078	3,186

A: sulfato de amônio, B: cloreto de cálcio, C: farelo de arroz, D: concentração inicial de xilose

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5.33, o modelo proposto

para a predição do valor da produtividade volumétrica no processo em estudo foi definido de acordo com equação 5.5.

$$Q_p = 0,47778 - 0,1266X_1 - 0,1033X_2 + 0,0837X_1X_3 - 0,27X_3^2 + 0,1187X_2X_4 + 0,25X_2^2 \quad \text{Eq. 5.5}$$

Em que,

Q_p corresponde à produtividade volumétrica de xilitol (g/L.h),

X_1 corresponde à concentração de sulfato de amônio (g/L),

X_2 corresponde à concentração inicial de xilose (g/L),

X_3 corresponde à concentração de cloreto de cálcio (g/L),

X_4 farelo de ar corresponde à concentração de arroz (g/L).

Para a elaboração da superfície de resposta em função do sulfato de amônio e concentração inicial de xilose, foram fixadas em seus níveis superiores a concentração de cloreto de cálcio e farelo de arroz, a fim de maximizar a resposta (Q_p). A equação 5.6 apresenta o modelo proposto para a predição do valor da produtividade.

$$Y = 0,208 - 0,043X_1 - 0,015X_2 + 0,250X_2^2 \quad \text{Eq. 5.6}$$

Em que,

Y corresponde à produtividade volumétrica em xilitol (g/L.h),

X_1 corresponde à concentração de sulfato de amônio (g/L)

X_2 corresponde à concentração inicial de xilose no hidrolisado (g/L).

A superfície de resposta descrita pela equação é apresentada na Figura 5.5.

Figura 5.5. Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona o fator de sulfato de amônio com a concentração inicial de xilose, representando a produtividade volumétrica de xilitol no sistema em estudo

Conforme pode ser observado na Figura 5.5, a produtividade volumétrica pode ser aumentada à medida que aumenta o valor da concentração de sulfato de amônio e diminui a concentração inicial de xilose no hidrolisado.

Com a substituição dos valores codificados das variáveis independentes estudadas, sulfato de amônio e fator de concentração inicial de xilose no hidrolisado, na equação 5.6, o valor da produtividade volumétrica do xilitol obtida no tempo de 72 horas foi igual a 0,48 g/L.h conforme predito pelo modelo proposto.

Para a validação do modelo proposto, foi realizado um ensaio fermentativo nas melhores condições de cultivo determinadas pelo modelo: 3,0 g/L de sulfato de amônio, 1,0 g/L de cloreto de cálcio, 20,0 g/L de farelo de arroz e 60 g/L de xilose sendo a concentração inicial de células em cada frasco de 1,0 g/L.

A Figura 5.6 apresenta o comportamento da levedura nas condições estabelecidas encontrando-se 33,12 g/L de xilitol em 72 horas de fermentação o que correspondeu à produtividade volumétrica de xilitol de 0,46 g/L.h, resultado que representa 95% de confiança daquele valor estimado pelo modelo (0,48 g/L.h).

FIGURA 5.6. Consumo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, produção de xilitol e células, durante a fermentação do hidrolisado de palha de cevada por *C. guilliermondii* FTI 20037.

Observa-se na Figura 5.6 que a xilose foi consumida juntamente com a glicose sendo que esta foi totalmente assimilada nas primeiras 24 horas semelhante ao encontrado nos hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana (MARTINEZ *et al.*, 2000), de palha de arroz (MUSSATO, 2002), de eucalipto (FELIPE *et al.*, 1996) e de palha de trigo (CANILHA, 2006), empregando-se esta mesma levedura. Verifica-se nesta figura que nestas primeiras 24 horas de fermentação o consumo da xilose foi de 30% em relação à sua concentração inicial.

A arabinose e o ácido acético, também foram assimilados pela levedura (22% e 52%, respectivamente). A assimilação parcial do ácido acético pela levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 também foi observada por outros autores, em hidrolisados

de bagaço de cana (ALVES *et al.*, 1998; MARTON, 2002), eucalipto (GINORIS, 2001) e palha de trigo (CANILHA, 2006). A lenta e pequena assimilação de arabinose também foi constatada em fermentações conduzidas com *C. guilliermondii* FTI 20037 em hidrolisado de bagaço de cana (SILVA, 2001) e em palha de trigo (CANILHA, 2006). Segundo Walther; Hensirisak e Agblevor (2001) o consumo desta pentose induz a atividade da enzima xilose redutase e como consequência estimula o fator de conversão e a produtividade de xilitol. Carvalheiro *et al.* (2005), cultivando *Debaryomyces hansenii* em hidrolisado de bagaço de malte, também observaram o pequeno consumo de arabinose durante a fermentação.

Pode-se constatar na Figura 5.6 que a produção de células ocorreu ao longo do período de fermentação alcançando a máxima concentração (6,89 g/L) após 72 horas correspondendo ao período de máximo consumo de xilose (96,59%).

5.5. Avaliação da Produção de Xilitol por *C. guilliermondii* em Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Cevada empregando Biorreator de 1L

Após a obtenção das melhores condições de cultivo em frascos agitados (3,0 g/L de sulfato de amônio, 1,0 g/L de cloreto de cálcio, 20,0 g/L de farelo de arroz e 60 g/L de concentração inicial de xilose), sendo a concentração inicial de células de 1,0 g/L, foram realizados ensaios em fermentador de bancada, com capacidade total de 1L com 600 mL de meio de fermentação. Para este estudo, empregou-se um planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central, com o qual se avaliou a influência da agitação e aeração no processo de bioconversão de xilose em xilitol, verificando como essas variáveis influenciam os parâmetros fermentativos produtividade volumétrica (Q_P), a concentração final de xilitol (P) e fator de conversão em xilitol ($Y_{P/S}$).

A Tabela 5.34 apresenta os valores de $k_L a$ para cada ensaio do planejamento em estudo. As medições foram realizadas no início de cada fermentação de acordo com o item 4.12.9.

Tabela 5.34. Valores das medições do k_{La} para o planejamento fatorial fracionário 2^2 com triplicata no ponto central

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	k_{La}
1	200	0,3	9,87
2	500	0,3	12,56
3	200	0,9	18,42
4	500	0,9	26,41
5	350	0,6	13,88
6	350	0,6	13,74
7	350	0,6	13,75

A Tabela 5.35 apresenta os valores dos parâmetros fermentativos obtidos em 72 horas de fermentação, utilizando-se as diferentes combinações de agitação e aeração, correspondentes ao planejamento em questão.

Tabela 5.35. Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^2 com triplicata no ponto central e os valores de produtividade volumétrica (Q_p), concentração final do produto (P) e fator de conversão em xilitol ($Y_{P/S}$) no processo de bioconversão de xilose em xilitol

Ensaio	Agitação (rpm)	Aeração (vvm)	Q_p (g/L.h)	P (g/L)	$Y_{P/S}$ (g/g)
1	200	0,3	0,43	30,71	0,54
2	500	0,3	0,24	17,50	0,30
3	200	0,9	0,76	55,00	0,91
4	500	0,9	0,67	48,21	0,82
5	350	0,6	0,53	38,32	0,83
6	350	0,6	0,57	41,23	0,87
7	350	0,6	0,59	42,25	0,80

Observando a Tabela 5.35, nota-se a variação do comportamento da levedura com relação à combinação dos níveis de variáveis independentes estudadas no planejamento proposto (agitação e aeração). O maior valor de produção de xilitol (55,0 g/L), produtividade volumétrica (0,76 g/L.h) e fator de conversão em xilitol (0,91 g/g) que correspondeu a uma eficiência de conversão de 99,24%, foi encontrado no ensaio 3 (200 rpm; 0,9 vvm e $k_{La} \cong 18,42 \text{ h}^{-1}$).

Pela metodologia de planejamento de experimentos, foram quantificados os efeitos dos principais fatores e suas interações que influenciaram o parâmetro fermentativo produtividade volumétrica (Q_p), a concentração final de xilitol (P) e fator de conversão em xilitol ($Y_{P/S}$).

As Tabelas 5.36, 5.37 e 5.38 apresentam a estimativa dos efeitos, os erros-padrão e o teste t de "Student", análise utilizada para verificar o nível de significância estatística do efeito determinado sobre Q_p , P e $Y_{P/S}$.

Tabela 5.36. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para o planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central que representa o fator de produtividade volumétrica (Qp)

Efeitos e Interações	Estimativas	Erros-Padrão	Teste t
Média	0,541	$\pm 0,014$	-
Fator A	-0,140	$\pm 0,038$	3,662*
Fator B	0,380	$\pm 0,038$	9,939*
AB	0,050	$\pm 0,038$	1,308

$R^2 = 0,989$

A: agitação, B: aeração

*Significativo ao nível de 95% de confiança ($t \geq 2,571$)

Tabela 5.37. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para o planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central que representa a concentração final de xilitol (P)

Efeitos e Interações	Estimativas	Erros-Padrão	Teste t
Média	39,031	$\pm 1,005$	-
Fator A	-10,000	$\pm 2,660$	3,759*
Fator B	27,500	$\pm 2,660$	10,336*
AB	3,210	$\pm 2,660$	1,206

$R^2 = 0,990$

A: agitação, B: aeração

*Significativo ao nível de 95% de confiança ($t \geq 2,571$)

Tabela 5.38. Estimativa dos efeitos, erros-padrão e teste t de “Student” para o planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central que representa o fator de conversão em xilitol ($Y_{P/S}$)

Efeitos e Interações	Estimativas	Erros-Padrão	Teste t
Média	0,724	$\pm 0,005$	-
Fator A	-0,160	$\pm 0,035$	4,556*
Fator B	0,450	$\pm 0,035$	12,81*
AB	0,080	$\pm 0,035$	1,708

$R^2 = 0,991$

A: agitação, B: aeração

*Significativo ao nível de 95% de confiança ($t \geq 2,571$)

Verifica-se nas Tabelas 5.36, 5.37 e 5.38 que a agitação (A) e aeração (B) influenciaram significativamente o parâmetro produtividade volumétrica de xilitol, concentração final do produto e fator de conversão em xilitol ao nível de 5% de probabilidade. A interação entre estes dois fatores não apresentou significância no processo fermentativo em fermentador de bancada.

Uma vez que a interação AB não apresentou significância estatística ($p \geq 0,10$), esta foi retirada da análise. As Tabelas 5.39, 5.40 e 5.41 apresentam as análises de variância para as respostas estudadas (Qp, P e $Y_{P/S}$), apenas com as variáveis independentes que se apresentaram significativas: agitação (A) e aeração (B), verificando-se uma influência significativa destes dois fatores sobre os

parâmetros fermentativos avaliados.

Tabela 5.39. Análise de variância para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais sobre a produtividade volumétrica

Efeitos	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste f	Nível de significância (p)
Fator A	0,019	1	0,019	11,391	0,0279*
Fator B	0,144	1	0,144	83,885	0,0008**
Erro Total	0,006	4	0,001		
Total	0,170	6			

$$R^2 = 0,959$$

A: agitação, B: aeração

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p \leq 0,01$)

Tabela 5.40. Análise de variância para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais sobre a concentração final do produto

Efeitos	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste f	Nível de significância (p)
Fator A	100,002	1	100,002	12,683	0,0236*
Fator B	756,251	1	756,251	95,910	0,0006**
Erro Total	31,543	4	7,882		
Total	887,792	6			

$$R^2 = 0,964$$

A: agitação, B: aeração

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

**Significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p \leq 0,01$)

Tabela 5.41. Análise de variância para verificar o nível de significância estatística dos efeitos principais sobre o fator de conversão em xilitol

Efeitos	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F _{calc}	Nível de significância (p)
Fator A	0,027	1	0,027	9,872	0,0789*
Fator B	0,198	1	0,198	11,231	0,0285**
Erro Total	0,070	4	0,017		
Total	0,295	6			

$$R^2 = 0,861$$

A: agitação, B: aeração

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

**Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,05$)

O acúmulo de xilitol e sua excreção no meio de fermentação é regulado pela disponibilidade de oxigênio no meio. Segundo Vandeska *et al.* (1995) a taxa de consumo de oxigênio determina quando a xilose é utilizada em processos respiratórios ou fermentativos. Sob condições anaeróbias a xilose não pode ser assimilada, não pela falta de enzimas específicas para o metabolismo da xilose, mas pelo fato de que o NADH produzido não pode ser regenerado através da fosforilação

oxidativa (NOLLEAU; PREZIOSI-BELLOY; NAVARRO, 1995). Em condições de forte aeração, a fermentação é direcionada para a produção de biomassa acarretando em um decréscimo no rendimento de xilitol (GIRIO *et al.*, 2000).

De acordo com Martinez *et al.* (2000), tanto a agitação quanto a aeração empregadas num processo fermentativo podem influenciar na transferência de oxigênio, e consequentemente, interferir no consumo de xilose e formação do produto, semelhante ao observado no processo fermentativo em estudo no qual foi utilizada palha de cevada.

Segundo Furlan *et al.* (1991) o oxigênio oxida o NADH a NAD^+ e uma alta relação NAD^+/NADH leva à oxidação de xilitol à xilulose, reduzindo a quantidade de xilitol acumulado no meio. Assim o nível de O_2 que favorece a produção de xilitol está na faixa de limitação de oxigênio (VANDESKA *et al.*, 1995). Ojamo; Ylinen e Linko (1988) 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 NAD^+ - xilitol desidrogenase e aumentando, portanto, a excreção de xilitol.

A bioconversão de xilose em xilitol é facilitada pela aeração do meio fermentativo (GONG; CHEN; TSAO, 1981), uma vez que a presença de oxigênio no meio de cultura é imprescindível para o transporte de açúcares (BARNETT, 1976; HÖFER; NASSAR, 1987).

No processo fermentativo em estudo, utilizando hidrolisado de palha de cevada como substrato para a produção de xilitol, pode ser observado na Tabela 5.36 que a maior concentração de xilitol ocorreu ensaio 3 (55,00 g/L), onde a aeração se apresentou maior (0,9 vvm), fato que mostra que essa aeração foi favorável tanto para o crescimento celular quanto para a produção de xilitol pela levedura *C. guilliermondii*.

Os valores de produtividade volumétrica, concentração de xilitol e fator de conversão em xilitol (Tabela 5.35) foram ajustados a modelos lineares. As Tabelas 5.42, 5.43 e 5.44 correspondem às análises de variância utilizadas para determinar as significâncias estatísticas desses modelos em prever os valores de produtividade, concentração de xilitol e do fator de conversão no sistema em estudo.

Tabela 5.42. Análise de variância para verificar as significâncias estatísticas do modelo linear em prever os valores de produtividade volumétrica

Efeitos	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste f	Nível de significância (p)
Modelo	0,164	2	0,362	14,87	0,0000
Resíduo	0,006	4	0,001		
Total	0,170	6			

$R^2 = 0,962$

Tabela 5.43. Análise de variância para verificar as significâncias estatísticas do modelo linear em prever os valores de concentração de xilitol

Efeitos	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste f	Nível de significância (p)
Modelo	856,252	2	14,582	14,90	0,0000
Resíduo	31,54	4	7,885		
Total	887,791	6			

$R^2 = 0,962$

Tabela 5.44. Análise de variância para verificar as significâncias estatísticas do modelo linear em prever os valores o fator conversão de xilitol

Efeitos	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Teste f	Nível de significância (p)
Modelo	0,225	2	0,297	12,14	0,0000
Resíduo	0,070	4	0,017		
Total	0,295	6			

$R^2 = 0,869$

Conforme pode ser observado nas Tabelas 5.42, 5.43 e 5.44, os modelos lineares apresentaram elevadas significâncias ($p < 0,01$) e capacidades de predição adequadas (0,96; 0,96 e 0,86), com capacidade para explicar 96 % da variação total para produtividade volumétrica e concentração de xilitol, assim como, 86 % da variação total para o fator de conversão de xilose em xilitol. As Tabelas 5.45, 5.46 e 5.47 apresentam os valores dos coeficientes mantidos nos modelos, bem como seus respectivos níveis de significância.

Tabela 5.45. Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da produtividade volumétrica, bem como seus respectivos níveis de significância

Fator	Coeficiente	Erro-Padrão	t_{calc}	p
Constante	0,541	0,015	34,528	0,0000
Fator A	-0,143	0,041	-3,374	0,0279
Fator B	0,382	0,041	9,158	0,0008

A: agitação, B: aeração

Tabela 5.46. Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição da concentração de xilitol, bem como seus respectivos níveis de significância

Fator	Coeficiente	Erro-Padrão	t_{calc}	p
Constante	39,031	1,061	36,776	0,0000
Fator A	-10,006	2,807	3,561	0,0236
Fator B	27,507	2,807	9,793	0,0006

A: agitação, B: aeração

Tabela 5.47. Valores dos coeficientes de regressão mantidos no modelo proposto para a predição do fator de conversão, bem como seus respectivos níveis de significância

Fator	Coeficiente	Erro-Padrão	t_{calc}	p
Constante	0,724	0,050	14,429	0,0000
Fator A	-0,327	0,132	-2,462	0,0789
Fator B	0,445	0,132	3,351	0,0285

A: agitação, B: aeração

De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 5.45, 5.46 e 5.47, os modelos propostos para as predições dos valores da produtividade volumétrica, concentração de xilitol e do fator de conversão no processo em estudo foram definidos de acordo com as equações 5.7, 5.8 e 5.9.

$$Q_p = 0,5414 - 0,14X_1 + 0,38X_2 \quad \text{Eq. 5.7}$$

$$P = 39,014 - 10,00X_1 + 27,50X_2 \quad \text{Eq. 5.8}$$

$$Y_{P/S} = 0,7242 - 0,33X_1 + 0,45X_2 \quad \text{Eq. 5.9}$$

Em que,

Q_p corresponde a produtividade volumétrica de xilitol (g/L.h),

P corresponde à concentração de xilitol (g/L),

$Y_{P/S}$ corresponde ao fator de conversão de xilose em xilitol (g/g),

X_1 corresponde à agitação (rpm),

X_2 corresponde à aeração (vvm).

As superfícies de resposta descritas pelas equações acima são apresentadas nas Figuras 5.7, 5.8 e 5.9.

Figura 5.7. Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona o fator agitação com aeração, representando a produtividade volumétrica em xilitol no sistema em estudo

Figura 5.8. Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona o fator agitação com aeração, representando a concentração de xilitol no sistema em estudo

Figura 5.9. Superfície de resposta descrita pela equação que relaciona o fator agitação com aeração, representando a concentração de xilitol no sistema em estudo

Conforme pode ser observado nas Figuras 5.7, 5.8 e 5.9, a produtividade volumétrica, concentração de xilitol e o fator de conversão podem ser aumentados à medida que se aumenta o valor da aeração e diminui-se o valor da agitação. A máxima produtividade volumétrica, concentração de xilitol e o fator de conversão foram obtidos quando a aeração foi 0,9 vvm (nível superior) e a agitação foi 200 rpm (nível inferior).

Com a substituição dos valores codificados das variáveis independentes estudadas, agitação (-1) e aeração (+1), nas equações 5.7, 5.8 e 5.9, valores de produtividade volumétrica, concentração de xilitol e fator de conversão iguais a 0,79 g/L.h, 56,53 g/L e 0,84 g/g, respectivamente, foram preditos pelos modelos propostos, no tempo de 72 horas.

Para a validação dos modelos propostos e finalizar as análises estatísticas dos dados obtidos, foi realizado ensaio fermentativo nas melhores condições de cultivo determinadas pelos modelos: 3,0 g/L de sulfato de amônio, 1,0 g/L de cloreto de cálcio, 20,0 g/L de farelo de arroz e 60 g/L de concentração inicial de xilose,

concentração inicial de células de 1,0 g/L, sendo a agitação de 200 rpm e aeração de 0,9 vvm.

Como pode ser observado na Figura 5.10 a produção de xilitol foi crescente encontrando no tempo de 72 horas de fermentação, 51,28 g/L de xilitol, uma produtividade volumétrica de 0,71 g/L.h e fator de conversão de xilose em xilitol de 0,88 g/g, resultados que se encontram dentro dos intervalos de confiança estimados, indicando que os modelos podem representar matematicamente as variáveis dependentes estudadas.

Figura 5.10. Consumo de glicose, xilose, arabinose e ácido acético, produção de xilitol e células, durante a fermentação do hidrolisado de palha de cevada por *C. guilliermondii* FTI 20037.

Observa-se na Figura 5.10 o crescimento da levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 durante todo o processo sendo que já nas primeiras 24 horas observa-se um aumento da população de células principalmente pelo rápido consumo de glicose. A maior concentração celular (9,87 g/L) ocorreu em 72 horas de fermentação. Observa-se ainda um rápido crescimento celular nas primeiras 24 horas, possivelmente pelo consumo inicial de glicose presente no hidrolisado. Já, entre 24 e 48 horas, observa-se uma fase em que parece não haver muito crescimento

celular, simultaneamente, onde ocorreu um aumento na produção de xilitol, semelhante ao observado em frascos agitados.

5.6. Avaliação da Produção de Xilitol por *C. guilliermondii* em Hidrolisado Hemicelulósico de Palha de Cevada em Biorreator de 16 L

Visando a obtenção do xilitol em reator de maior capacidade (16 L) a partir das condições de fermentação empregadas em reator de 1 L utilizando o K_La como critério de ampliação de escala, novos ensaios foram realizados. Quanto às condições nutricionais foi empregada as obtidas pelo modelo em frascos agitados, enquanto a condição de agitação e aeração foi obtida pelo modelo em reator de 1 L. Semelhante aos experimentos anteriores a concentração inicial de células foi de 1,0 g/L, obtida do cultivo da levedura em meio contendo apenas glicose como fonte de carbono. A fermentação foi conduzida a 30°C, sob agitação de 200 rpm e aeração de 0,9 vvm ($k_La \approx 18 \text{ h}^{-1}$).

Avaliando-se os dados obtidos das fermentações em reatores de 1 L (Tabela 5.48) e de 16 L (Tabela 5.49), verifica-se o comportamento da levedura quanto ao consumo de açúcares bem como de ácido acético são semelhantes. Nota-se ainda nestas Tabelas a produção de xilitol e células pela levedura.

Tabela 5.48. Fermentação do hidrolisado de palha de cevada realizada em fermentador com capacidade de 1 L sob condições ótimas de cultivo

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Q_p (g/L.h)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Eficiência de Conversão (%)	Células (g/L)
0	58,25	0	-	-	-	1,00
24	14,69	10,15	0,42	0,23	25,08	8,25
48	5,25	39,58	0,82	0,75	81,79	9,02
72	0,00	51,28	0,71	0,88	95,97	9,87

Tabela 5.49. Fermentação do hidrolisado de palha de cevada realizada em fermentador com capacidade de 16 L sob condições ótimas de cultivo

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Xilitol (g/L)	Q_p (g/L.h)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Eficiência de Conversão (%)	Células (g/L)
0	61,26	0	-	-	-	1,02
24	32,45	3,75	0,16	0,13	14,17	7,02
48	12,49	19,52	0,41	0,40	43,62	7,85
72	0,32	55,63	0,77	0,91	99,23	8,23

Verifica-se na Tabela 5.49 que nas fermentações em reator de 16 L tanto a quantidade de xilitol obtida quanto a produtividade volumétrica de xilitol (55,63 g/L e 0,77 g/L.h), foram semelhantes às encontradas em reator de 1 L (Tabela 5.48). Por outro lado, o fator de conversão encontrado nesta fermentação (0,91 g/g) o que corresponde a uma eficiência de conversão de xilose em xilitol de 99,23%, foram superiores aos obtidos na fermentação utilizando reator de 1 L (0,88 g/g e 95,97%, respectivamente). Quanto ao crescimento celular verifica-se valores próximos (8,23 e 9,87 g/L) para as fermentações em reatores de 1 L e 16 L de acordo com os dados das tabelas 5.48 e 5.49, respectivamente.

De acordo com os resultados obtidos não se pode deixar de destacar que foi possível a ampliação de escala de produção de xilitol de um fermentador de 1 L para um fermentador de 16 L, utilizando como critério de ampliação o K_{La} , uma vez que, os valores dos parâmetros fermentativos foram bastante semelhantes. Segundo Yantorno (2005), os critérios mais utilizados industrialmente para a ampliação de escala são o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}), a relação de potência de agitação por unidade de volume (P/V) e a velocidade de agitação (V).

5.6.1. Clarificação do caldo fermentado

Uma vez que nas aplicações do xilitol está sua utilização em indústrias alimentícias e farmacêuticas, este deve apresentar alta pureza. Para alcançar este objetivo, foi realizada a etapa de clarificação do xilitol presente no caldo fermentado obtido de acordo com metodologia descrita no item 4.9. Anterior à clarificação o caldo foi centrifugado conforme item 4.8 cujos resultados se encontram na Tabela 5.50.

De acordo com os dados da Tabela 5.50, após processo de centrifugação realizado para retirada de células foram verificadas perdas de xilose (8%) e de ácido acético (42%), além de um decréscimo no valor do pH, e ainda pequenos aumentos nas concentrações de xilitol e arabinose de 2,23 e 1,56%, respectivamente.

Tabela 5.50. Característica do caldo fermentado com 72 horas de fermentação (A) e após centrifugação (B)

Componente	Etapas do processo	
	A	B
Xilitol (g/L)	55,63	56,87
Xilose (g/L)	0,32	0,29
Arabinose (g/L)	3,07	3,12
Ácido acético (g/L)	1,12	0,67
Fenóis totais (g/L)	ND	9,87
Sólidos totais (g/L)	ND	4,56
Células (g/L)	8,23	0,00
pH	6,87	6,32
°Brix	ND	12
Cor ICUMSA	ND	4,87x10 ⁶

ND – não determinado

O meio fermentado contendo xilitol foi submetido a processo de clarificação. Para tanto empregou-se um processo em três etapas constituído de: i) remoção empregando resina acrílica de troca aniônica fortemente básica tipo 1 (A-860S); ii) centrifugação para retirada do precipitado; iii) remoção por resina macroporosa de troca aniônica fortemente básica tipo 1 (A-500PS). Após o processo empregou-se como regenerante para as duas resinas aniônicas solução alcalina de NaOH a 10%. De acordo com a Tabela 5.51 a clarificação utilizando a seqüência de resinas (A-860S e A-500PS), apresentou resultados satisfatórios para a remoção de fenóis totais, ácido acético, sólidos totais, xilose e arabinose, e redução da coloração, observou-se ainda pouca perda na concentração de xilitol.

Tabela 5.51. Composição do caldo fermentado durante cada etapa de clarificação e após concentração

	pH	Concentração (g/L)						Cor ICUMSA
		Xilose	Arabinose	Xilitol	Fenóis totais	Ác. Acético	Sól. totais	
Caldo fermentado	6,32	0,29	3,12	56,87	9,87	0,67	4,56	4,87x10 ⁶
Após A-860S	13,52	0,08	0,62	53,78	3,25	0,20	2,23	ND
Centrifugado	13,25	0,09	0,98	51,23	1,26	0,18	1,89	ND
Após A-500PS	14,63	0,02	0,48	50,43	1,02	0,03	1,62	ND
Concentrado	6,28	0,31	2,56	652,36	8,88	1,15	ND	6,26x10 ⁴

ND – não determinado

Pela análise da Tabela 5.51, após a última etapa do processo de clarificação, verifica-se redução das concentrações de xilose e arabinose presentes no caldo fermentado em comparação ao meio clarificado (93 e 85%, respectivamente).

Também deve ser destacada a eficiência alcançada neste processo quanto à remoção de compostos tóxicos, resultando em remoções de 90, 96 e 65% de fenóis totais, ácido acético e sólidos totais, respectivamente. Nilvebrant *et al.* (2001) trataram hidrolisado de madeira com resinas de troca iônica para a sua utilização na formulação de meio visando a produção de etanol e também observaram que as resinas aniônicas foram as mais efetivas para remoção de fenóis totais, furanos, aldeídos e ácidos alifáticos do hidrolisado estudado.

Observa-se ainda (Tabela 5.51) diminuição de xilitol de 27,50% ao comparar o caldo fermentado com o meio clarificado. Carvalho *et al.* (2005), avaliando o tratamento do hidrolisado de bagaço de cana de açúcar com carvão ativo e resinas de troca iônica, observaram perdas de 40% do seu açúcar de interesse (xilose) após o tratamento com carvão e com as resinas A-860S, A-500PS e C-150, em seqüência. Martinez (2005) observou perdas em xilitol (de 8,12% e 15,23%) ao utilizar resinas de troca iônica A-505 e C-505 para clarificar um meio obtido após fermentação de hidrolisado de bagaço de cana de açúcar por *C. guilliermondii* FTI 20037.

Após a clarificação, o processo como um todo foi submetido a um estudo de viabilidade econômico-financeira.

5.7. Análise de Viabilidade Econômico-Financeira

A análise econômico-financeira foi realizada segundo os fatores que mais influenciam a produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada: equipamentos fundamentais, consumo de matérias-primas, produtos químicos e custos fixos anuais para a produção do xarope purificado de xilitol.

Para o cálculo foram utilizadas as facilidades auxiliares existentes no Departamento de Biotecnologia/ EEL-USP, tais como: ar comprimido e cromatógrafo líquido de alta eficiência.

5.7.1. Base de Estudo

A análise de viabilidade econômico-financeira a seguir foi realizada inicialmente para a produção biotecnológica de xilitol realizada a partir de reatores

de 100 L. Para tal foram analisadas cada etapa do bioprocesso, desde a chegada da matéria-prima até a purificação do caldo fermentado.

5.7.2. Custo de Investimento Inicial

A Tabela 5.52 apresenta o orçamento e a quantidade dos equipamentos fundamentais utilizados desde a caracterização da matéria-prima, obtenção do xilitol e posterior purificação do xarope; com isso foi calculado o custo para investimento inicial.

Tabela 5.52. Orçamento dos equipamentos utilizados na produção biotecnológica de xilitol

Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unitário	Valor Total
Agitador mecânico	Unid.	1	1.990,00	1.990,00 ¹
Agitador “Vórtex”	Unid.	1	415,00	415,00 ¹
Autoclave vertical	Unid.	1	3.300,00	3.300,00 ¹
Balança analítica	Unid.	1	3.240,00	3.240,00 ¹
Bancada de fluxo laminar	Unid.	1	31.315,00	31.315,00 ¹
Banho termostático	Unid.	1	950,00	950,00 ¹
Bomba de vácuo e ar comprimido	Unid.	1	1.250,00	1.250,00 ¹
Capela de exaustão de gases	Unid.	1	5.950,00	5.950,00 ¹
Centrífuga “SHARPLES”	Unid.	1	11.220,00	11.220,00 ¹
Centrífuga de eppendorf	Unid.	1	920,00	920,00 ¹
Concentrador à vácuo ($V_{\text{útil}}=50$ L)	Unid.	1	87.540,00	87.540,00 ¹
Deionizador (50 L/h)	Unid.	1	1.380,0	1.380,00 ¹
Determinador de umidade	Unid.	1	6.995,00	6.995,00 ¹
Espectrofotômetro	Unid.	1	29.250,00	29.250,00 ¹
Estufa de esterilização e secagem	Unid.	1	1.250,00	1.250,00 ¹
Estufa para cultura bacteriológica	Unid.	1	2.390,00	2.390,00 ¹
Fermentador ($V_{\text{útil}}=1$ L)	Unid.	1	52.800,00	52.800,00 ²
Fermentador ($V_{\text{útil}}=16$ L)	Unid.	1	98.740,00	98.740,00 ²
Fermentador ($V_{\text{útil}}=100$ L)	Unid.	3	122.200,00	366.600,00 ²
Fermentador ($V_{\text{útil}}=1000$ L)	Unid.	3	566.345,00	1.699.035,00 ²
Forno tipo mufla	Unid.	1	4.570,00	4.570,00 ¹
Reator de hidrólise ($V_{\text{útil}}=40$ L)	Unid.	1	23.280,00	23.280,00 ²
Reator de hidrólise ($V_{\text{útil}}=350$ L)	Unid.	1	87.345,00	87.345,00 ²
Incubadora de bancada “shacker”	Unid.	2	8.900,00	17.800,00 ¹
Microscópio biológico binocular	Unid.	1	5.680,00	5.680,00 ¹
Moinho	Unid.	1	10.254,00	10.254,00 ¹
pHmetro	Unid.	1	990,00	990,00 ¹
Refratômetro portátil	Unid.	1	570,00	570,00 ¹
Refrigerador	Unid.	1	1.250,00	1.250,00 ³
Custo de Investimento Inicial				2.558.269,00

Fontes de Informação: 1. Alpax – Divisão Analítica (2008), 2. Marconi Equipamentos (2008), 3. Ponto Frio (2008)

5.7.3. Custo de Produção

O custo de produção são aqueles que ocorrem na fabricação do produto final e são classificados em:

- a) Custos diretos variáveis: são aqueles que variam de acordo com a quantidade produzida, sendo os principais na produção de xilitol os que seguem:
 - ✓ Matérias-primas e materiais auxiliares,
 - ✓ Consumo de energia elétrica no processo produtivo,
 - ✓ Água industrial,
- b) Custos diretos fixos: são aqueles que normalmente não variam proporcionalmente à produção, sendo os principais para esse bioprocessos os que seguem:
 - ✓ Manutenção, depreciação e impostos.
 - ✓ Mão-de-obra.

Considera-se como base de cálculo um ano de produção equivalente a 12 meses de trabalho.

O esquema proposto de produção se estabelece da seguinte forma:

- ✓ Caracterização da composição química da palha de cevada,
- ✓ Produção de 4 m³ de hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada, com um teor de aproximadamente 23,58 g/L de xilose,
- ✓ Concentração do hidrolisado hemicelulósico para elevar seu teor de xilose para 60 g/L,
- ✓ Tratamento do hidrolisado para remoção dos compostos inibidores ao metabolismo microbiano para posterior utilização na fermentação,
- ✓ Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada, obtendo um caldo fermentado com aproximadamente 56,87 g/L de xilitol,
- ✓ Purificação do caldo fermentado com resinas de troca iônica.

Nesta pesquisa o processo fermentativo foi conduzido em biorreator de 1 L e posteriormente utilizando como parâmetro o $K_L a$ as fermentações foram realizadas em biorreator de maior capacidade (16 L).

Para o estudo econômico a produção foi baseada supondo que seriam realizadas 3 fermentações semanais em biorreatores com volume útil de 100 L cada um sendo utilizado para as fermentações 90 L de cada biorreator com 72 horas de

duração. O processo equivale a aproximadamente 270 L de caldo fermentado semanais a uma concentração de 56,87 g/L de xilitol. Uma vez que fermentações conduzidas em reator de 16 L realizadas no presente trabalho observou-se após a etapa de clarificação uma perda de 11,32% na concentração de xilitol (50,43 g/L), levando-se em consideração essa perda estima-se que a produção mensal deste poliálcool seja de aproximadamente 654 Kg para a produção de 270 L de caldo fermentado como proposto.

É importante considerar ainda que foi considerado no cálculo três turnos de trabalho diário com uma equipe de dois especialista e seis técnicos. Além disto, para a estimativa do custo de produção mensal estabeleceu-se o gasto com cada etapa do processo conforme mostra a Tabela 5.53, sendo os valores expressos em reais.

Tabela 5.53. Custo direto variável relacionado à produção mensal de xilitol por via biotecnológica

1ª Etapa: Caracterização da Composição Química da Palha de Cevada				
Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unitário	Valor Total
Palha de Cevada	Kg	0,012	-	-
Ácido Sulfúrico ¹	L	0,06	15,00	0,90
Subtotal: 0,90				
2ª Etapa: Hidrólise Hemicelulósica da Palha de Cevada				
Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unitário	Valor Total
Palha de Cevada	Kg	297,00	-	-
Ácido Sulfúrico ¹	L	57,00	15,00	855,00
Água ²	m ³	4,00	2,23	8,92
Hidrolisado Hemicelulósico	m ³	4,00	215,98	863,92
Subtotal: 863,92				
3ª Etapa: Concentração à Vácuo do Hidrolisado Hemicelulósico				
Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unitário	Valor Total
Hidrolisado Hemicelulósico	m ³	1,34	644,72	863,92
Subtotal: 863,92				
3ª Etapa: Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico da Palha de Cevada				
Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unitário	Valor Total
Ácido Ortofosfórico ¹	L	2,50	10,50	26,25
Carvão Vegetal ¹	Kg	40,00	15,00	600,00
Óxido de Cálcio ¹	Kg	86,00	9,50	817,00
Hidrolisado Hemicelulósico	m ³	1,34	1.702,18	2.280,92
Subtotal:2.280,92				
4ª Etapa: Preparo do Inóculo (shacker)				
Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unitário	Valor Total
Inóculo				
Cloreto de Cálcio ¹	Kg	0,12	13,30	1,60
Farelo de Arroz ¹	Kg	24,00	23,00	552,00
Sulfato de Amônio ¹	Kg	3,60	8,00	28,80
Xilose ³	Kg	24,00	990,00	23.760,00
Subtotal:24.342,40				
Fermentação em Reator				
Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unitário	Valor Total
Cloreto de Cálcio ¹	Kg	1,20	13,30	15,96
Farelo de Arroz ¹	Kg	24,00	23,00	552,00
Sulfato de Amônio ¹	Kg	4,00	8,00	32,00
Hidrolisado Hemicelulósico	L	984,00	1,71	1.682,64
Subtotal:2.282,60				
5ª Etapa: Purificação do Caldo Fermentado				
Descrição	Unid.	Quant.	Valor Unitário	Valor Total
NaOH ¹	Kg	2	6,50	13,00
Resina A 860S ¹	Kg	2	240,00	480,00
Resina A 500 PS ¹	Kg	2	260,00	520,00
Subtotal: 1.013,00				
Gasto com Energia Elétrica e Água				
Serviço	Quantidade Mensal		Valor Total	
Energia elétrica (KW.h) ⁴	1500		401,70	
Água no processo (m ³) ²	30		67,13	
Subtotal: 468,83				
TOTAL: R\$ 30.414,90				

Fontes de Informação: 1. Audaz Brasil, 2008, 2. Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo, 2008, 3. Merse, 2008, 4. Bandeirante Energia AS, 2008.

A Tabela 5.54 apresenta os custos em salários mensais, sendo os valores expressos em reais.

Tabela 5.54. Custo direto fixo: salários, encargos financeiros e depreciação

Cargo	Quant.	Salário Básico	Encargos	Total
Engenheiro Químico	2	6.700,00	3.634,08	10.334,08
Técnico	6	5.040,00	2.733,70	7.773,70
Auxiliar Técnico	2	1.000,00	542,40	1.542,40
TOTAL: R\$ 19.650,18				

Para estimar os custos diretos fez-se a somatória dos valores gastos com matérias-primas e materiais, serviços auxiliares e salários.

$$\text{Custos Diretos: } 30.414,90 + 19.650,18 = \text{R\$ } 50.065,08$$

Os custos indiretos referem-se à depreciação, correspondente a um valor de 1% mensal do valor referente aos equipamentos.

$$\text{Custos Indiretos: } 2.558.269,00 \cdot 1\% = \text{R\$ } 25.582,69$$

Logo o custo da produção mensal de xilitol é o somatório dos custos diretos e indiretos totalizando um valor de **R\$ 75.647,77**.

Como a estimativa da produção mensal de xilitol é de 54,46 Kg, pode-se dizer que o valor de produção é de **R\$ 1.389,05/ Kg**.

Comparativamente o custo do xilitol produzido via biotecnológica no primeiro ano de produção é cerca de 113% maior que o produzido comercialmente devido aos gastos com investimentos iniciais referentes à compra e instalação de equipamentos.

Prevendo-se um cenário para 6 anos de produção de xilitol, verifica-se na Tabela 5.55 que no segundo ano a produção tenha um aumento de 5 vezes, no terceiro ano permaneça constante, no quarto ano aumente 10 vezes e no quinto e sexto ano permaneça constante.

Tabela 5.55. Perspectiva para a produção de xilitol via biotecnológica em 5 anos

		ANO 1	ANO 2	ANO 3
Receita Líquida	Qtde (Kg)	653,52	3.630,00	3.630,00
	Preço Unitário (R\$)	650,00 ¹	650,00 ¹	650,00 ¹
	Total (R\$)	424.788,00	2.359.500,00	2.359.500,00
Custo de Produção	Qtde (Kg)	653,52	3.630,00	3.630,00
	Preço Unitário (R\$)	1.317,63	706,86	706,83
	Total (R\$)	907.771,95	2.612.438,40	2.612.438,40
Margem Final		- 488.983,95	- 252.938,40	- 252.938,40
		ANO 4	ANO 5	ANO 6
Receita Líquida	Qtde (Kg)	36.300,00	36.300,00	36.300,00
	Preço Unitário (R\$)	650,00 ¹	650,00 ¹	650,00 ¹
	Total (R\$)	23.595.000,00	23.595.000,00	23.595.000,00
Custo de Produção	Qtde (Kg)	36.300,00	36.300,00	36.300,00
	Preço Unitário (R\$)	583,82	583,82	583,82
	Total (R\$)	21.239.130,00	21.239.130,00	21.239.130,00
Margem Final		2.355.870,00	2.355.870,00	2.355.870,00
FLUXO DE CAIXA		INICIAL: R\$ 2.558.269,00		
		ANO 1	ANO 2	ANO 3
Pay-Back Simples		- 3.047.252,90	- 3.300.191,30	- 3.553.129,70
Pay-Back Descontado (TIR=12,51%)		- 2.994.861,80	- 3.196.502,70	- 3.376.539,20
		ANO 1	ANO 2	ANO 3
Pay-Back Simples		- 1.197.259,70	1.158.610,30	3.514.480,30
Pay-Back Descontado (TIR=12,51%)		- 1.879.341,20	- 545.530,30	648.026,80

1. Valor de venda do xilitol – contato pessoal – MERCK (2008)

A receita líquida apresentada na Tabela 5.55 corresponde ao valor de venda do produto, sendo a margem final a diferença entre a receita líquida e o custo de produção. Observa-se ainda na Tabela 5.55 que nos três primeiros anos de produção de xilitol a margem final permanece negativa, pois o custo de produção ainda é superior ao valor de venda no mercado. Porém, a partir do segundo ano observa-se uma queda no custo de produção de 51,81%, o que demonstra que utilizando-se biorreatores de maior capacidade é possível a redução dos custos do processo de forma significativa.

Os fluxos de caixa (Tabela 5.55) foram propostos por seis anos de produção de xilitol, de acordo com as condições estabelecidas anteriormente, com os valores para pay-back simples e pay-back descontado, sendo que para este último a taxa interna de retorno (TIR) foi de 12,51% .

Utilizando pay-back simples a partir do quinto ano de produção obtêm-se o retorno do capital investido inicialmente. Com a utilização no projeto de pay-back descontado atinge-se um valor presente líquido (VPL) de aproximadamente R\$ 648.026,80 no sexto ano de produção, demonstrando dessa forma que o processo de bioconversão de xilose em xilitol utilizando a levedura *C. guilliermondii* FTI20037 torna-se viável a partir do sexto ano de produção.

6. Conclusões

- ✓ A máxima extração da xilose (73%) a partir da hidrólise ácida da fração hemicelulósica da palha de cevada foi possível com a metodologia estatística empregada.
- ✓ Com relação aos ensaios de hidrólise da fração celulósica a máxima extração de glicose (70%) só foi possível quando a celolignina foi submetida ao tratamento alcalino.
- ✓ Dentre os diferentes fatores nutricionais avaliados as concentrações de xilose e sulfato de amônio foram imprescindíveis para a produção de xilitol por *C. guilliermondii* FTI 20037 a partir de hidrolisado obtido da fração hemicelulósica da palha de cevada, obtendo-se nestas condições produtividade volumétrica de xilitol e eficiência de conversão de xilose em xilitol de 0,56 g/L.h e 59,98%, respectivamente.
- ✓ A disponibilidade de oxigênio determinada pelo modelo estatístico nas fermentações utilizando biorreator de 1L foi favorável ao processo, pois permitiu um aumento de 26,79 e 60% nos valores de produtividade volumétrica de xilitol (0,71 g/L.h) e eficiência de conversão de xilose em xilitol (95,97%), respectivamente, em relação aos valores obtidos em frascos agitados.
- ✓ Foi possível uma melhoria crescente nos valores de produtividade volumétrica de xilitol e eficiência conversão de xilose em xilitol com o aumento de escala do processo de frascos agitados até reator de 16 L no qual pode-se obter os máximos valores destes parâmetros de 0,77 g/L.h e 99,54%, respectivamente.
- ✓ De acordo com os estudos de viabilidade econômica o custo de produção biotecnológica do xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico de palha de cevada é cerca de 113% (R\$1.389,05 Kg) superior ao valor de venda do xilitol comercial considerando uma produção estimada de 653 Kg no primeiro ano, levando em consideração os custos iniciais dos investimentos.

- ✓ Uma redução de 42,12% no custo do xilitol seria possível supondo um cenário para os cinco anos seguintes, em que no último seriam produzidos aproximadamente 3 toneladas de xilitol o que sugere o favorecimento do aumento de escala do processo o que poderia valorizar o produto tornando-o competitivo no mercado principalmente nos seguimentos farmacêutico e alimentício.

Sugestões de Trabalhos Futuros

- ✓ Avaliação da produção de xilitol por *C. guilliermondii* geneticamente modificada, com o intuito de aumentar o valor de produtividade volumétrica de xilitol.
- ✓ Estudos de purificação da xilose obtida de hidrolisados hemicelulósicos, para a possível substituição da xilose comercial obtida via química utilizada na formulação do inóculo para o processo fermentativo.

Referências

ACEA, C.M. Efecto del Tratamiento Magnético en la Decoloración de Licores. In: **VII CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE AZÚCAR Y DERIVADOS DE LA CAÑA**. Junio, 2002, Habana.

ACQUAQUÍMICA. Produtos, Acquapol ww. Disponível em: <http://www.setasa.com.br/site/acquaquimica/produto.php?codigo=65>. Acesso em 08/2008a.

ACQUAQUÍMICA. Produtos, Acquapol ww. Disponível em: <http://www.setasa.com.br/site/acquaquimica/produto.php?codigo=23>. Acesso em 08/2008b.

ACOSTA, E.M.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Effect of the oxygen transfer coefficient on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by continuous stirred-tank reactor fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 633-637, 2000.

AGUILAR, R.; RAMIREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v.55, p.309-318, 2002.

AGUIRRE-ZERO, D.; ZERO, D.T.; PROSKIN, H. M. Effect of Chewing Xylitol Chewing Gum on Salivary Flow Rate and the Acidogenic Potencial of Dental Plaque. **Caries Research**, n. 27, p. 55 - 59, 1993.

ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA e SILVA, J. B.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 89-98, 1998.

AMINOFF, C., VANNINEN, E., DOTY, T.E. The occurrence, Manufacture and Properties of Xylitol. In: COUNSELL, J.N., ed. **Xylitol**. London: Applied Science Publishes Ltda, 1978. p 1-9.

APEL, M-R. ALFONS; GEORG ROSSIER, M-K. Preparation of stable polyol solutions and the resulting product. **US Patent Office 2,917,390**. Dec. 15, 1959.

ATKINSON, B. **Biochemical Engineering and Biotechnology** Handbook, 2 ed. p.1060 – 1109, 1991.

BAMBANESTE, R. **La industria de los derivados de la caña de azúcar**. La Habana. Editorial Científico-Técnica, 1995, Cap. IV.

BARBOSA, M.F.S.; MEDEIROS, M.B.; MANCILHA, I.M.; SCHNEIDER, H.; LEE, H. Screening of Yeasts for Production of Xylitol from D-Xylose and some factors which affect Xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v.3, p.241-251, 1988.

BARNETT, J.A. The Utilization of Sugars by Yeasts. **Advances in Carbohydrates Chemistry and Biochemistry**, v. 32, p. 125-234, 1976.

BELTER, P., CUSSLER, E.L., HU, W. **Bioseparation Downstream Process for Biotechnology**. New York: John Wiley, 1988. 368p.

BELTER, P.A. **General procedure for isolation of fermentation products.** Microbial Technology, 2 nd, Academic Press, 1979, p.403-431, v. 2.

BICHO, P. A.; RUNNALS, P. L.; CUNNIGHAM, J. D.; LEE, H. Introduction of Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Activities in *Pachysolen tannophilus* and *Phichia stipitis* on Mixed Sugars. **Applied and Environmental Microbiology**, v.54, n.1, p. 50-54, 1988.

BIENKOWSKI, P.R.; LADISH, M.R.; NARAYAN, R.; TSAO, G.T.; ECKERT, R. Correlation of Glucose (Dextrose) Degradation at 90 to 190 °C in 0,4 to 20% Acid. **Chemistry Engineering Communications**, v. 51, p. 179-192, 1987.

BISARIA, V. S.; GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzyme and products. **Enzyme and Microbial Technology**, v.3, p.90-104, 1981.

BISWAS, S.; VASHISHTHA, N. Xylitol: Technology & Bussines Opportunities. **Chemical Engineering World**, v. 33, n. 1, p.103-08, 1998.

BOUCHARD, J.; ABATZOGLOU, N.; CHORNET, E.; OVEREND, R.P. Characterization of Depolymerized Cellulosic Residues. **Wood Science Technology**, 23, 343, 1989.

BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. S. **Statistic for experimenters: na introduction to design, data analysis and model building**, New York: John Wiley, 1978. 653p.

BRUNI, L.A.; FAMÁ, R. S.; José de O. **Análise de Risco na Avaliação de Projetos de Investimento: Uma Aplicação do Método de Monte Carlo.** São Paulo: FEA-USP, Caderno de Pesquisas em Administração, v.1, n. 6, 1º trim./1998.

CADOCHÉ, L.; LOPEZ, G.D. Assessment of Size Reduction as a Preliminare Step in the Production of Ethanol from Lignocellulosic Wastes. **Biotechnology Wastes**, v. 30, p. 153-157, 1989

CÂNDIDO, E. J.; CANILHA, L.; ALMEIDA e SILVA, J. B. Determinação da composição química da palha de trigo. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSAS, 7., 2002, Maringá.

CANETTIERI, E.V.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; CARVALHO JUNIOR, J.A.; ROCHA, G.J.M. Composition of *Eucalyptus Grandis* Wood Residues. In: CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE AZÚCAR Y DERIVADOS DE LA CAÑA, 7., Junio, 2002, Habana.

CANETTIERI, E. V.; ALMEIDA e SILVA, J. B.; FELIPE, M. G. A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavaco de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 3, p. 323-331, 2002.

CANETTIERI, E. V.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; FELIPE, M. G. A. Aplicattion of factorial design to the study of xylitol production from eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24, p. 159-168, 2001.

CANILHA, L. **Produção de xilitol no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo.** 2006, 153 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Departamento de Biotecnologia, EEL/USP, Lorena, 2006.

CANILHA, L.; ALMEIDA e SILVA; FELIPE, M. G. A.; CARVALHO, W. Batch xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate using *Candida guilliermondii* in a stirred tank reactor. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1811-1814, 2003.

CARRASCO, F. Fundamentos de la Producción de Furfural. **Afinidad**, v. 48, p. 183-189, 1991.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; LOPES, S.; PARAJÉ, J. C.; PEREIRA, H.; GÍRIO, F. M. Evalution of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xilitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1215-1223, 2005.

CARVALHO, G. B. M., CÂNDIDO, E. J., CARVALHO, W., DRAGONE, G., ALMEIDA e SILVA, J. B. Chemical characterization of coffe rind: a plentiful residue that can be used in biotechnological bioprocesses. In: SYMPOSIUM ON BIOTECHNOLOGY FOR FUELS AND CHEMICALS, 26., May 2004, Tenesse.

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 de obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana com células imobilizadas em gel alginato de cálcio**. 2004, 110p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2004.

CARVALHO, G.B.M.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Evaluación del Hidrolizado Hemicelulósico de Eucalipto Buscando la Remoción de Compuestos Inhibidores del Crecimiento de Microorganismos. In: CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE AZÚCAR Y DERIVADOS DE LA CAÑA, 7., Junio, 2002, Habana.

CCC (Calorie Control Council), **Benefits of Using Low-Calories Sweeteners, The role of Low-Calories Sweeteners in Weigth Control**, 1999. Disponível em: <http://caloriecontrol.org/benefit.html>. Acesso em: Junho/ 2008.

CHUNG, I. S.; LEE, Y. Y., Ethanol fermentation of crude acid hydrolysate of cellulose using high-level inocula. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p.308-315, 1985.

CLARK, T.A.; MACKIE, K.L. Fermentation Inhibitors in Wood Hydrolysates Derived from the Softwood *Pinus radiata*. **Chemical Technology and Biotechnology**, v. 34, p. 101-110, 1984.

CONAB. Sementes de Cevada - Fevereiro/2003. Disponível em: www.conab.br/gov/br/conabweb. Acesso em: junho/ 2008.

CONNER, A.H.; LORENZ, L.F. Kinetic Modelling of Hardwood Prehydrolysis. Part III: Water and Dilute Acetic Acid of Southern red Oak Prehydrolysis. **Wood Fiber Science**, v. 18, p. 248-263, 1986.

CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M.; PEREGO, P., SILVA, S. S. Effect of temperature on the microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 45, p. 339-345, 2001.

CONVERTI, A.; DOMÍNGUEZ, J. M.; PEREGO, P.; SILVA, S. S.; ZILLI, M. Wood hydrolysis and hydrolysate detoxification for subsequent xylitol production. **Chemical Engineering and Technology**, v. 23, n. 11, p. 1013-1020, 2000.

COWLING, E.B. Physical and chemical constraints in the hydrolysis of cellulose and lignocellulosic materials. **Biotechnology and Bioengineering Symposium**, n. 5, p. 163-181, 1975.

CRUZ, J.M.; DOMINGUEZ, J. M.; DOMINGUEZ, H.; PARAJO, J. C. Preparation of fermentation media from agricultural wastes and their bioconversion into xylitol. **Food Biotechnology**, v.14, n.1-2, p.79-97, 2000.

CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H., PARAJO, J. C. Solvent extraction of hemicellulose wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 67, n. 2, p. 147-153, 1999.

CURTAYRES, D. D. S. Dental Caries and Sugar Substitutes. **Dental Hygiene**, April 1980.

DAVID, C.; FORNASIER, R.; GREINDL-FALLON, C.; VANLAUTEM, N. Enzymatic Hydrolysis and Bacterial Hydrolysis-Fermentation of Eucalyptus Wood Pretreated with Sodium Hypochlorite. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 1591-1595, 1985.

De FAVERI, D.; TORRE, P.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Optimization of xylitol recovery by crystallization from synthetic solutions using response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, v.61, p.407-412, 2004.

De FAVERI, D.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; DEL BORGHI, M. Xylitol recovery by crystallization from synthetic solutions and fermented hemicellulose hydrolysate. **Chemical Engineering Journal**, v.90, p.291-98, 2002.

DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Effects of Lignocellulose Degradation Products on Ethanol Fermentations of Glucose and Xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 19, p. 220-225, 1996.

DELLER, R. M. L.; NÁPOLES, A. I.; VILLARREAL, M. L.; ACOSTA, E. Obtención de xilitol a partir de hidrolizados de bagazo de caña de azúcar. **Cuba Azúcar**, v. 24, n. 1, p. 21-26, 2000.

DERENZO, S. **Estudo da cristalização de ácido adípico em batelada, por resfriamento e em escala de laboratório**. São Paulo, 162p. (Dissertação de Mestrado), EPUSP. 1994..

DOMINGUEZ, J. M.; CAO, N.; GONG, C. S.; TSAO, G. T. Dilute acid hemicellulosic hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast. **Bioresource Technology**, v.61, p.85-90, 1997.

DOMÍNGUEZ, J. M.; GONG, C. S.; TSAO, G. T. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57-58, p. 49-56, 1996.

DORAN, J.B.; ALDRICH, H.C.; INGRAN, L.O. Saccharification and Fermentation of Sugar Cane Bagasse by *Klebsiella oxytoca* P2 Containing Chromosomally Integrated Genes

Encoding the *Zymomonas mobilis* Ethanol Pathway. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 240-247, 1994.

DUFFY, V.B.; ANDERSON, G.H. Use of nutritive and nonnutritive sweeteners – Position of ADA. **Journal of American Diet Association**, v. 98, p.580-87, 1998.

DUFF, S.J.B.; MURRAY, W.D. Bioconversion of Forest Products Industry Waste Cellulosics to Fuel Ethanol: a Review. **Bioresource Technology**, v. 55, p. 1-33, 1996.

DUNNING, J.W.; DALLAS, D.E. Analytical procedures for control of saccharification process. **Analytical Chemistry**, v.21, n.6, p. 727-729, 1949.

DUNLAP, C.E. Nutrients from cellulose. **Food Technology**, p.62-67, 1975.

du PREZZ, J. C; MEYER, P. S.; KILIAN, S. G. The Effect of Mixtures of Acetic Acid and D-Xylose on the Growth Rate of *Candida blankii*. **Biotechnology Letters**, v. 13, n.1, 1991.

du TOIT, P. T.; OLIVIER, S. P.; van BILTON, P. L. Sugar cane bagasse as a possible source of fermentable carbohydrates. I. Characterization of bagasse with regard to monosaccharide. Hemicellulose and amino acid composition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p.1071-1078, 1984.

EMBRAPA. Cevada é destaque em abril na Embrapa Trigo. Disponível em www.embrapa.com.br Acesso em: maio/ 2008.

EMODI, A. Xylitol its properties and food applications. **Food Technology**, p.28-32 jan., 1978.

FAN, L.T.; GHARPURAY, M.M.; LEE, Y.H. **Cellulose Hydrolysis**. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1987.

FANTA, G. F.; ABBOTT, A. I.; HERMAN, R. C.; BURR.; DOANE, W. M. Hydrolysis of wheat straw hemicellulose with trifluoroacetic acid. Fermentation of xylose with *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 1122-1125, 1984.

FELIPE, M. G. A. **Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic materials**. Lignocellulose Biodegradation, American Chemical Society, p. 300-315, 2004.

FELIPE, M. G. A.; HAULY, M. A. O.; CANNETTIERI, E. V.; CÂNDIDO, E. J.; TAMANINI, C. Avaliação da casca de aveia para obtenção de hidrolisado hemicelulósico e produção de xilitol por processo fermentativo. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 14., 2003. Florianópolis/ SC, 1 CD-rom.

FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M. ; SILVA, S.S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate for Xylitol production: Effect pH. **Biomass and Bioenergy**, v.13,n. 1/2, p.11-14, 1997a.

FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M.; SILVA, S.S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology & Biothecnology**, v.18, p.251-254, 1997b.

FELIPE, M.G.A.; ALVES, L. A.; SILVA, S. S.; ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I.M.; ALMEIDA e SILVA, J. B. Fermentation of *Eucalyptus* hemicellulosic hydrolysate to xylitol by *Candida*

guilliermondii. **Bioresource Technology**, v. 56, p. 281-283, 1996a.

FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M. Xylitol formation by *Candida guilliermondii* grown in a sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate: effect of aeration and inoculum adaptation. **Acta Biotechnologica**, v.16, n.1, p.73-79, 1996b.

FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; VITOLO, M.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S.; ROSA, S. A. Preparação de xilitol por fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 36, n.1, p.103-14, 1993.

FELIU, J. A.; GONZALEZ, G.; MAS, C. SPC production by *Hansenula polymorfa* from xylose. **Process Biochemistry International**, p. 136-140, 1990.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry ultrastructure reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613p.

FERNANDEZ, C.; AVELINO, A.; FARELO, F. Crystallization of xylitol from hydro-alcoholic solutions containing arabitol and adonitol. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INDUSTRIAL CRYSTALLIZATION, 14., 12-16 sept. 1999, University of Cambridge.

FRANZ, R.; ERCKEL, R.; RIEHM, T.; WOERNLE, R.; DEGER, H.M. Lignocellulose Saccharification by HF. In: **ENERGY from Biomass**. London: Applied Science Publishers, p. 873-878, 1982.

FRAZER, F.R.; McCASKEY, T.A. Wood Hydrolysate Treatments for Improved Fermentation of Wood Sugars to 2,3-Butanediol. **Biomass**. v. 18, p. 31-42, 1989.

FUNK, H. F. Recovery of pentoses and hexoses from wood and others materials containing hemicellulosic and further processing of C₅ and C₆ components. **Applied Polymer Symposium**, v. 28, p. 145-152, 1975.

FURLAN, S. A.; BOILLOUD, P.; STREHAIANO, P.; RIBA, J. P. Study of xylitol from xylose under oxygen limiting conditions. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 3, p. 203-206, 1991.

GINORIS, Y. P. **Avaliação de tratamento do hidrolisado de eucalipto para a produção biotecnológica de xilitol**. 2001. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2001.

GIULIETTI, M.; SECKLER, M.; DERENZO, S.; RÉ, M.I.; CESINSKI, E. Industrial crystallization and precipitation from solutions: state of the technique. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.18, n.4, p.423-440, 2001.

GÍRIO, F. M.; AMARO, C.; AZINHEIRAL, H.; PELICA, F.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaromyces hansenii*. **Bioresourche Technology**, v. 71, n. 3, p. 245-251, 2000.

GOLDSTEIN, C.H.; GLAYPOOL, T.A.; McCracken, L.D.; MAUN, C.M.; UENG, P.P.; TSAO, G.T. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 85-102, 1978.

GOLDSTEIN, I.S.; PEREIRA, H.; PITTMAN, J.L.; STROUSE, B.A.; SCARINGELLI, F.P. The Hydrolysis of Cellulose with Superconcentrated Hydrochloric Acid. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 13, p. 17-25, 1983.

GOLDSTEIN, I.S.; EASTER, J.M. An Improved Process for Converting Cellulose to Ethanol. **Tappi Journal**, v. 75, n. 8, p.135-140, 1992.

GONG, C.; CHEN, L.F.; TSAO, G.T. Quantitative production of xylitol from D-xilose by a high xylitol producting yeast mutant *Candida tropicalis* HXP2. **Biotechnology Letters**, v. 3, n. 3, p. 125-130, 1981.

GONZÁLEZ, G.; LÓPEZ-SANTÍN, J.; CAMINAL, G.; SOLÀ, C. Dilute acid hydrlisis os wheat straw hemicellulose at moderate temperature: a simolified kinetic model. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 28, p. 288-293, 1986.

GRENBY, T. H.; COLLEY, J. Dental Effects of Xylitol Compared With Other Carbohydrates and Polyols in the Diet of Laboratory Rats. **Archives of Oral Biology**, v.28, n.8, p.745-758, 1993.

GRETHLEIN, H.E.; CONVERSE, A.O. Common Aspects of Acid Prehydrolysis and Steam Explosion for Pretreating Wood. **Bioresouce Technology**, v. 36, p. 77-82, 1991.

GROHMANN, K.; TORGET, R.; HIMMEL, M. Optimization of Dilute-Acid Pretreatment of Biomass. **Biotechnology Symposium**, v. 15, p. 59-80, 1985.

GROOTJEN, D. R. J.; van der LANDS, R. G. M.; LUYBEN, K. Ch. A. M. Conversion of glucose/xyllose mistures by *Pichia stipitis* under oxygen-limited conditions. **Enzyme Microbial and Technology**, v.13, p.648-54, 1991.

GURGEL, P. V.; MANCILHA, I. M.; PEÇANHA, R. P.; SIQUEIRA, J. F. M. Xylitol Recovery from Fermented Sugarcane Bagasse Hydrolysate. **Bioresource Technology**, v.52, p.219-223, 1995.

HEIKKILÄ, H.; PUUPPO, O.; TYLLI, M.; NIKANDER, H.; NYGRÉN, J.; LINDROOS, M.; EROMA, O-P. Method for producing xylitol. **WO97/49659**, 23 june 1997.

HEIKKILÄ, H.; NURMI, J.; RAHKILA, L.; TOYRYLA, M. Method for the production of xylitol. **WO5.081,026**. Jan. 14, 1992.

HEIKKILÄ, H.; HYRÖKY, G.; RAHKILA, L.; SARKKI, L.; VILJAVA, T. A. Process for the simultaneous production of xylitol and ethanol. **WO 91/10740**. 25 July 1991.

HEIKKILÄ, H.; NUMI.,J.; RAHKILA, L.; SARKKI, L.; TÖYRYLA, M. Method for the production of xylitol from mixtures containing xilose. **WO 90/08193**. 15/01/1990.

HEIPIEPER, H. J.; WEBER, F. J.; SIKKEMA, J.; KEWELO, H.; DE BONT, J. A. M. Mechanism of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **Trends in Biotechnology**, v. 12, p. 409-615, 1994.

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

HÖFER, M.; NASSAR, F. R. Aerobic and anaerobic uptake in *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal of General Microbiology**, v.133, p.2163-2172, 1987.

IRANMANHOOB, J.; NADIM, F.; MONEMI, S. Optimization acid-hydrolysis: A critical step for production of ethanol from mixed wood chips. **Biomass and Bioengineering**, v.22, p.401-404, 2002.

IRICK, T. J.; WEST, K.; BROWNELL, H. H.; SCHALD, W.; SADDLER, J. N. Comparison of colorimetric and HPLC techniques for quantitating the carbohydrate components of steam – Treated wood. Scientific Note. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p. 137-149, 1988.

IWATA, C.; NAKAGAKI, H.; MORITA, I.; SEKITA, T.; GOSHIMA, M.; ABE, T.; ISOGAI, A.; HANAKI, M.; KUWAHARA, M.; TATEMATSU, M.; ROBINSON, C. Daily use of dentifrice with and without xylitol and fluoride: effect on glucose retention in humans in vivo. **Archives of Oral Biology**, v.48, p.389-395, 2003.

JACOBSEN, S.E.; WYMAN, C.E. Cellulose and Hemicellulose Hydrolysis Models for Application to Current and Novel Pretreatment Processes. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, 81-96, 2000.

JAFFE, G.M.; SZKRYBALO, W.; WEINERT, P.H. Process for producing xylose. **US Patent. 3.784.408**. Dep. 16/9/70. Publ. 08/01/74.

JEFFRIES, T.W. Utilization of Xylose by Bacteria, Yeasts and Fungi. **Advances in Biochemical Engineering**, v. 27, p.1-32, 1983.

JEFFRIES, T.W.; SREENATH, H.K. Production of Ethanol from Wood Hydrolysate by Yeasts. **Bioresource Technology**, 72, 253-260, 2000.

JEFFRIES, T. W. Emerging technology for fermenting D-xylose. **Trends in Biotechnology**, v. 3, n. 8, 1985.

KALK, K.P., LANGLYKKE, A.F. Cost Estimation for Biotechnology Project. In Manual of Industrial, **Microbiology and Biotechnology**, p.363-388. 1985.

KHUAD, R. C.; SINGH, A., Lignocellulosic biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 151-172, 1993.

KIM, J. H.; RYU, Y. W.; SEO, J. H. Analysis and optimization of two-substrate fermentation for xylitol production using *Candida tropicalis*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 181-186, 2002.

KRISTIAN, E.; JUHA, N.; OLLI-PEKKA, E. Method for recovering an organic compound from solutions. **US5980640**, 9 november 1999.

KUSUMEGI, K.; YOSHIDA, H.; TOMIYAMA, S. Inhibitory effects of acetic acid on respiration and growth of *Zygosaccharomyces rouxii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.85, n.1, p. 21-25, 1998.

LADISCH, M. R., Fermentable sugars from cellulosic residues. **Process Biochemistry**, v.14, n.1, p.21-5, 1979.

LARSSON, S.; QUINTANA-SÁINS, A.; REIMANN, A.; NILVERBRANT, N-O.; JÖNSSON, L. J. Influence of Lignocellulosic-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84-86, p.617-632, 2000.

LARSSON, S.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N.-O.; JÖNSSON, L.J. Comparison of different methods for detoxification of lignocellulosic hydrolysates of spruce. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v.77-79, p.91-103, 1999.

LAWFORD, H. G.; ROSSEAUS, J. D. Performance testing of *Zimomonas mobilis* metabolically engineering of cofermentation of glucose, xylose and arabinose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 429-448, 2002.

LEE, W. J.; KIM, M. D.; YOO, M. S.; RYO, Y. M.; SEO, J. H. Effects of xilose reductase activity on xilitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 13, p. 725-730, 2003.

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

LIDE, D. R.; MILNE, G. W. A. **Properties of organic compounds**. Boca Raton, CRC Press, 1996. CD-ROM.

LIGTHELM, M. E.; PRIOR, B. A.; du PREEZ, J. C. The oxygen requeriments of yeasts for the fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 63-68, 1988.

LOHMEIER-VOGEL, E.M.; SOPHER, C.R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolisis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biothecnology**, v.20, p.75-81, 1998.

McMILLAN, J.D. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. Enzimatis conversion os biomass for Fuels Production, ed. Himmel, M.F., Baker, J.O., Overend, R.P. **American Chemical Society**, p.292-234,1994.

MANDELS, M.; HONTZ, L.; NYSTROM, J. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 16, p. 1471-1493, 1974.

MANZ, U.; VANNINEN, E.; VOIROL, F. Xylitol-Its properties and use as a sugar substitute in foods. IN: FOODS R. A SYMP. SUGAR AND SUGAR REPLACEMENTS., 10 october 1973. London

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

MÄKINEN, K. K. Xylitol and Oral Health. **Advances in Food Research**, v.25, p.137-158, 1979.

MARTÍN, C.; GALBE, M.; NILVEBRANT, N. O.; JONSSON, L. J. Comparison of the fermentability of enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse pretreated by steam explosion using diffrent impregnation agents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98/100, p. 699-716, 2002.

MARTÍNEZ, M.; ARACIL, J. Introducción a los métodos de purificación de bioproductos. **Industria farmacéutica**. Enero Febrero, 1991.

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

MARTINEZ, E. A.; SILVA, S. S.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; SOLENZAL, A I. N.; FELIPE, M. G. A. The influence of pH and dilution rate on continuous production of xylitol from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v.38, p.1677-1683, 2003.

MARTINEZ, E. A.; SILVA, S. S. ; FELIPE, M. G. A. Effect of the oxygen transfer coefficient on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by continuous stirred tank reactor fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.84-86, p.633-641, 2000.

MARTINEZ, E.A. **Estudo de parâmetros do sistema contínuo de produção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 98p. (Dissertação de mestrado) – FAENQUIL, Lorena, 1999.

MARTON, J. M.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA e SILVA, J. B.; PESSOA JR, A. Avaliação de carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana empregando planejamento de experimentos. **Revista Analítica**. n. 3, p. 45-53, 2003.

MARTON, J. M. **Avaliação dos diferentes carvões ativados e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar para a obtenção biotecnológica de xilitol**. 2002. 105p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial), Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2002.

McMILLAN, J.D. Pretreatment of Lignocellulosic Biomass. In: **Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production**, p. 292-324, (eds) Himmel, M.F., Baker, J.O., Overend, R.P.American Chemical Society, Washington, 1994.

MEYRIAL, V.; DELGENES, J.P.; MOLLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Xylitol Production from D-Xylose by *Candida guilliermondii*: Fermentation Behaviour. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 4, p. 281-286, 1991.

MELAJA, A. J.; HÄMÄLÄINEN, L. Process for making xylitol. **US Patent 4.008.285**. Dep. 18/6/75. Publ. 15/02/77.

MERCK, S.A. Contato pessoal em 15 de agosto de 2008.

MIKOLLA, J-P. **Hydrogenation of xylose to xylitol over Raney-Nickel catalyst- towards na improved production technology**. Faculty of Chemical Engineering, Abo Akademi. 1999. (Tese de doutorado).

MOHANDAS, D. C.; WHELAN, D. R.; PANCHAL, C. J. Development of xylose-fermenting yeast for ethanol production at high acetic acid concentrations. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 51/52. p. 307-318, 1995.

MOK, W.S.; ANTAL JR.; M.J., VARHEGYI, Productive and Parasitic Pathways in Dilute Acid-Hydrolysis of Cellulose. **Industrial Engineering Chemistry Research**. 31, 94-100, 1992.

MOLWITZ, M. ; SILVA, S. S. ; RIBEIRO, J. D. ; ROBERTO, I. C. ; FELIPE, M. G. A. ; PRATA, A. M. R. ; MANCILHA, I. M. Aspects of the Cell Grown of *Candida guilliermondii* in Sugar Cane Bagasse Hydrolysate. **Z. Naturforsch**, 51c, 1996.

MORITA, T. A.; SILVA, S. S. Innibition of microbial xylitol production by acetic acid and its relation with fermentative parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 801-808, 2000.

MOSIER, N.; WYMAN, C.; DALE, B.; ELANDER, R.; LEE, Y.Y.; LADISCH, M. Features of promising technologies for treatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.96, p.673-686, 2005.

MOSIER, N.S.; SARIKAYA, A.; LADISCH, C.M.; LADISCH, M.R. Characterization of Dicarboxylic Acids for Cellulose Hydrolysis. **Biotechnology Progress**, 474-480, 2001.

MULLIN, J.W. **Crystallization**, Fourth Edition, Butterworth-Heinemann, Oxford, 2001. 594p.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocelluloisc hydrolysates for use in fermentative process: a review. **Bioresource technology**, v.93, p.1-10, 2004.

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

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

NÁPOLES, A. I.; ACOSTA, E.; VILLA, P.; CEPERO, A.. Obtención de xilitol a partir de de bagazo de la caña de azúcar. **Revista del I Congresso Iberoamericano de Aprovechamiento de Desechos y Tecnologías Limpías**, p. 35-36, 1997.

NÁPOLES, A. I.; NARANJO, M. E.; ACOSTA, E.; DÍAZ de los RIOS, M. Concepción Tecnológica de planta industrial para obtención de siropes de xilosa a partir de hidrolisados de bagazo de caña de azúcar. **Memorias Diversificación, Tomo I**, p. 54-57, 2002.

NÁPOLES, A. I.; NARANJO, M. E.; ACOSTA, E. Posibilidades de producción de xilitol en Cuba. **Revista Cañaveral**, v. 6, n. 2, p. 9-11, 2000.

NARANJO, M.E.; BARQUINERO, E.; NÁPOLES, A. I.; CEPERO, I.; GONZÁLEZ, M.; MANGANELLY, E.; RODRÍGUEZ, E. Purificación de Hidrolizados Hemicelulósicos de Bagazo de Caña de Azúcar Mediante Corriente de Ozono. IN: CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE AZÚCAR Y DERIVADOS DE LA CAÑA. 7., Junio., 2002, Habana.

NGUYEN, Q.A.; TUCKER, M.P.; KELLER, F.A.; HEDÍ, F.P. Two-Stage Dilute-Acid Pretreatment of Softwoods. **Applied Biochemistry Biotechnology**, p. 84-86, 561-576, 2000.

NGUYEN, Q.A.; TUCKER, M.P.; KELLER, F.A.; BEATY, D.A.; CONNORS, K.; EDDI, F.P. Dilute Acid Hydrolysis of Softwoods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, p. 84-86, 561-576, 1999

NILVERBRANT, N. O.; REIMANN, A.; LARSSON, S.; JÖNSSON, L. J. Detoxification of lignocellulosic hydrolysates with ion-exchange resins. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.91-93, p.35-49, 2001.

NIMZ, H. H.; CASTEN, R. Chemical processing of lignocellulosics. **Holz als Roh- und Werkstoff**, v.44, p.207-12, 1986.

NISHIKAWA, N. K.; SUTCLIFFE, R.; SADDLER, J. N. The influence of lignin degradation products on xylose fermentation by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 549-552, 1988.

NOLLEAU, V.; PREZIOSI-BELLOU, L.; NAVARRO, J. M. The reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii*. And *Candida parapsilosis*: Incidence of oxygen and pH. **Biotechnology Letters**, v. 17, n. 4, p. 417-422, 1995.

NOLLEAU, V.; PREZIOSI-BELLOU, L.; DELGENES, J.P.; DELGENES, J.M. Xylitol Production from Xylose by Two Yeast Strains: Sugar Tolerance. **Current Microbiology**, v. 27, p.191-197, 1993.

NOTHENBERG, M. Políois adoçam a boca e amarguram o bolso. **Química e Derivados**, Setembro, 1994.

OJAMO, H.; YLINEN, L.; LINKO, M. Process for the preparation of xylitol from xylose by cultivating *Candida guilliermondii*. **WO 88/05467**, 1988.

ONISHI, H.; SUZUKI, T. The Production of Xylitol, L-Arabinitol and Ribitol by Yeasts. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 30, n. 11, p. 1139-1144, 1966.

OTT, E.; SPURLIN, H.; GRAFFLIN, M.; MARK, H. Structures and Properties of Cellulose Fibers. In: **Celulose and Cellulose Derivatives**. 2nd ed. New York: Interscience publishers., 1954 vol.1, cap 94, 217-300.

PHAFF, H.J.; MILLER, M.W.; MRAK, E.W. **The Life of Yeasts**. 2nd ed. Cambridge: Harvard University Press, 1978, p.142.

PALMAROLA-ANDRADOS, B.; CHOTEBORSKÁ, P.; GALBE, M.; ZACCHI, G. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. **Bioresource Technology**, v.96, p.843-850, 2005.

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

PALMQVIST, E.; HAHN-HAGEDAL, B.; SZENGEL, Z.; ZACCHI, G.; RECZEY, K. Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysate obtained after stream pretreatment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 286-293, 1997.

PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Biotechnological Production of Xylitol. Part 1: Interest of Xylitol and Fundamentals of its Biosynthesis. **Bioresource Technology**, v.65, p.191-201, 1998.

PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Xylitol production from *Eucalyptus* wood hydrolysates extracted with organics solvents. **Process Biochemistry**, v. 32, n.7, p.599-604, 1997.

PARISI, F. Advances in Lignocellulosics Hydrolysis and in the Utilization of the hydrolysates. In: FIECHTER, A. **Advances in Biochemical Engineering**, 1989, pag 38, 53-87.

PERRY, R. H.; GREEN, D. W. **Perry's Chemical Engineering Handbook**. 7th ed. Nova York: Mc Graw-Hill, 1997.

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

PULS, J.; SCHUSEIL, J. In: COUGHLAN, M. P.; HAZLEWOOD, G. P. eds. **Hemicellulose and Hemicellulases**. Cambridge: Portland Press, 1993. p. 1-27

PURWADI, R., NIKLASSON, TAHERZADEH, M. J. Kinetic study of detoxification of dilute-acid hydrolysates by $\text{Ca}(\text{OH})_2$. **Journal of Biotechnology**, v.114, p.187-198, 2004.

RIBEIRO, M. H.L.; LOURENÇO, P.A.S.; MONTEIRO, J.P.; DIAS, S. F. Kinetics of seletive adsorption of impurities from a crude vegetable oil in hexane to activated earths and carbons. **European Food Research and Technology**, v. 213, n. 2, p. 132-138, 2001.

ROBERTO, I. C.; SATO, S.; MANCILHA, I. M. Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, p. 348-350, 1996a.

ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate for the production of xylitol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.57/58, p.339-347, 1996b.

ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I. M.; SOUZA, C. A.; FELIPE, M. G. A.; SATO, S.; CASTRO, H. F. Evaluation of rice straw hemicellulosic hydrolysate in the production by *C. guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v.16, n.11, p.1211-1216, 1994.

ROBERTO, I. C.; FELIPE, M.G.A.; LACIS, L.S.; SILVA, S.S.; MANCILHA, I.M. Utilization of Sugar Cane Bagasse Hemicellulosic Hydrolysate by *Candida guilliermondii* for Xylitol Production. **Bioresource Technology**, v. 36, n. 3, p.271-275, 1991.

RODRIGUES, R. C. L. B. **Avaliação das condições de concentração à vácuo do hidrolisado de bagaço de cana de açúcar para a produção de xilitol**. 1999. 112p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 1999.

RODRIGUES, R. C. L. R.; FELIPE, M. G. A.; ALMEIDA E SILVA, J. B.; VITOLO, M.; GOMEZ, P. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.18, n.3, p.299-311, 2001.

ROSEIRO, J.C.; PEITO, M.A.; GIRIO, F.M.; AMARAL-COLLAÇO, M.T. The Effects of the Oxygen Transfer Coefficient and Substrate Concentration on the Xylose Fermentation by *Debaromyces hansenii*. **Archieves of Microbiology**, v. 165, p. 484-490, 1991.

RUBIO MATOS, Z.; SILVA, S.S.; PRATA, A.M.R.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Evaluación del efecto de las condiciones de hidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar em la

recuperacion de xilosa usando planeamiento estatístico. IN: VII CONGRESO INTERNACIONAL SOBRE AZÚCAR Y DERIVADOS DE LA CAÑA, Junio, 2002, Habana.

SAEMAN, J.F. Kinetics of Wood saccharification:Hydrolysis of Cellulose and decomposition of Sugars in Dilute Acid at High Temperatures. **Industrial Engineering Chemistry**,v.37,n.1, 43-52, 1945.

SAHA, B. C. Hemicellulosic bioconversion. **Journal of Industrial Microbial Biotechnology**, v.30, p.279-291, 2003.

SAHA, B.C.; BOTHAST, R.J. Enzymes in Lignocellulosic Biomass Conversion, In: Fuels and Chemicals from Biomass. Saha, B.C., Woodward, J. A.C.S, 1997. 356p.p.46-56.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hidroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccaromyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme Microbial and Technology**, v. 10, p. 315-318, 1988.

SANROMAN, M. A.; DOMINGUEZ, H.; NUÑEZ, M. J.; LEMA, J. M. Xylitol. Un alcohol con futuro. **Afinidad**, v.48, Julio-agosto, 1991.

SANTOS, J. C.; CONVERTI, A.; CARVALHO, W.; MUSSATO, S. I.; SILVA, S. S. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process Biochemistry**, v.40, p.113-118, 2005.

SCHEEL, H.J. Historical aspects of crystal growth technology. **Journal of Crystal Growth**, v.211, p.1-12, 2000.

SCHNEIDER, H. Selective removal of acetic acid from hardwood-spent sulfite liquor using mutant yeast. **Enzyme and Microbial Techonology**, v. 19, p. 94-98, 1996.

SCOTT, M. **Protein purification: design and scale up to downstream processing**. New York: Oxford University Press, 1991, p.99-126.

SENE, L.; CONVERTI, A.; ZILLI, M.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Metabolic study of the adaptation of the yeast *C. guilliermondii* to sugar cane bagasse hydrolysate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.57, p.738-743, 2001.

SIDIRAS, D.K. Simulation of Dilute Acid Hydrolysis of Lignocellulosic Materials: Wheat Straw, **Cellulose Chemistry and Technology**, v. 32, p.405-424, 1998.

SINGLETON, V. L.; ORTHFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants bt means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzimology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SILVA, D. D. V. **Efeito da relação glicose: xilose na bioconversão de xilose em xiltol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana de açúcar**. 2004. 82p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2004.

SILVA, C. J. S. M.; ROBERTO, I. C. Optimization of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 36, p. 1119-1124, 2001.

SILVA, C. J. S. M.; ROBERTO, I. C. Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Letters in Applied Microbiology**, v. 32, nr. 4, p. 248-252, 2001b.

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

SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; PRATA, A. M. R. Acid hydrolysis of *Eucalyptus grandis* chips for microbial production of xylitol. **Process Biochemistry**, v.33, n.1, p.63-67, 1998.

SILVA, S. S.; QUESADA-CHANTO, A.; VITOLO, M. Up Stream Parametres Affecting the Cell Growth and Xylitol Production by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Zeitschrift Naturforschung**, v.52c, p. 359-363,1997.

SILVA, S. S.; ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M. Batch fermentation of xylose for xylitol production in a stirred tank bioreactor. **Process Biochemistry**, v.31 n.6, p.549-553, 1996.

SILVA, S.S.; AFSCHAR, A.S. Microbial production of xylitol from D- Xilose using *Candida tropicalis*. **Bioprocess Engineering**, v.11, p. 129-134, 1994.

SILVA, D.J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1990. 165p.

SIRISANNEEYAKUL, S.; STAISZEWSKI, 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.

SIRISANSANEEYAKUL, M.R.; REUSS, M. Microbial production of xylitol from wheat straw hydrolysates.In: ANNUAL MEETING OF BIOTECHNOLOGISTS, 10., June 1 to 3,, v.5, Part B, 1992.

SLININGER, P.J.; BOLEN, P.L.; KURTZMAN, C. *Pachysolen tannophilus*: Properties and Process Consideration for Ethanol Production from D-Xylose. **Enzyme and Microbial Technology**, v.9, p. 5-15, 1990.

SPRINGER, E.L. Hydrolysis of aspenwood Xylan with Aqueous Solutions of Hydrochloric Acid. **Tappi Journal**, v.49, p.102-106, 1966.

SUGAI, J. K.; DELGENES, J. P. Catabolite repression of induction of aldose reductase activity and utilization of mixed hemicellulosic sugars in *Candida guilliermondii*. **Current Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 239-244, 1995.

SUN, X. F.; XU, F.; SUN, R. C.; FOWLER, P.; BAIRD, M. S. Characteristics of degraded cellulose obtained from steam exploded wheat straw. **Carbohydrate Research**, v.340, p.97-106, 2005.

SUN, J. X.; SUN, X. F.; ZHAO, H.; SUN, R. C. Isolation and characterization of cellulose from sugarcane bagasse. **Polymer Degradation and Stability**, v.84, p.331-339, 2004a.

SUN, X. F.; XU, F.; SUN, R. C.; WANG, Y. X.; FOWLER, P.; BAIRD, M. S. Characteristics of degraded lignins obtained from steam exploded wheat straw. **Polymer Degradation and Stability**, v.86, p.245-56, 2004b.

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

TAYLOR, K.B.; BECK, M. J.; HUANG, D.H.; SAKAI, T.T. The Fermentation of Xylose: Studies by Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, p.29-41, 1990.

TORGET, R.W.; KIM, J.S.; LEE, Y.Y. Fundamental Aspects of Dilute Acid Hydrolysis/Fractionation Kinetics of Hardwood Carbohydrates. 1.Cellulose Hydrolysis. **Industrial Engineering Chemistry Research**, v.30, p.2817-2825, 2000.

TORGET, R.; WERDENE, P.; HIMMEL, M.; GROHMANN, K. Dilute-Acid Pretreatment of Short Rotation Woody and Herbaceous Crops. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.24/25, n.115-126, 1990.

TRAN, A.V.; CHAMBERS, R.P. Ethanol Fermentation of Red Oak Acid Prehydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CDB 5776. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 8, p. 439-444, 1985.

UHARI, M.; KONTIOKARI, T.; NIEMELA, M. A Novel Use of Xylitol Sugar in Preventing Acute Otitis Media. **Pediatrics**, v.42, n.4, p.879-884, Part 1, 1998.

UHARI, M.; KONTIOKARI, T.; KOSKELA, M.; NIEMELA, M. Xylitol Chewing-gum in Prevention of Acute Otitis Media: Double Blind Randomized Trial. **British Medical Journal**, v.313, n.7066, p.1180-1183, 1996.

Ullmanns Encyclopedia Of Industrial Chemistry, 6th ed. SUGAR ALCOHOLS-Xylitol. Electronic Release. 1998.

van ROSMALEN, S.; BRUINSMA, D.; KRAMER, H.; BERMINGHAM, S.; WITKAMP, G.; DERENZO, S.; GIULIETTI, M.; SECKER, M. M.; RE, M. I.; CEKINSKI, E. **Industrial Crystallization and Precipitation**. IPT-TU: DELFT, 2003. (Apostila do Curso de Cristalização Industrial).

van ZYL, C.; PRIOR, B. A.; du PREEZ, J. C. Acetic acid inhibition of D-xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 13, January, 1991.

VANDESKA, E.; AMARTEY, S.; KUZMANOVA, S.; JEFFRIES, T.W. Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.11, n.141, p.71- 74, 1995.

VIÑALS, M. V. **Aplicação de resinas de troca iônica no tratamento de hidrolisado hemicelulósico para processos fermentativos**. Lorena: 90p. Dissertação Mestrado. FAENQUIL/DEBIQ, 2001.

VIIKARI, L.; TENKANEN, M.; BUCHERT, J.; RÄTTO, M.; BAILEY, M.; SIIKAAHO, M.; LINKO, M. Hemicellulases for Industrial Applications. In: SADDLER, J.N. ed. **Biotechnology in Agriculture, No. 9. Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues**, Wallingford: C.A.B. International, 1993. p. 131- 182.

VYGLAZOV, V.V. Kinetics characteristics of xylitol crystallization from aqueous-ethanolic solutions. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v.77, p.26-29, 2004.

WALTHER, T.; HENSIRISAK, P.; AGBLEVOR, F. A. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xilitol production by *Candida tropicalis*. **Bioresource Technology**, v. 76, p. 213-220, 2001.

WANG, M.Y.; VAN EYS, J. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols. **Annual Review Nutrition**, v.1, p.437-75, 1981.

WEATHERLEY, L. R. **Engineering Process for Bioseparations**. Oxford: Butterworth-Heinemann Ltd., 1994. 296p.

WEBB, S.R.; LEE, H. Regulation of xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts. **Biotechnology Advances**, v.8, p. 685-697, 1990.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.86, n.1, p.1-4, 1998.

WOLFROM, M. L.; KOHN, E. J. Crystalline Xylitol. **Journal of the American Chemical Society**, v. 64, n. 19, p.1739, 1942.

YAHASHI, Y.; HORITSU, H.; KAWAI, K.; SUZUKI, T.; TAKAMIZAWA, K. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: the effect of the D-glucose feeding. **Journal Fermentation and Bioengineering**, v. 81, n. 2, p. 148-152, 1996.

YANTORNO, O. **Aspectos tecnológicos del cultivo de microorganismos y células eucariotas**, curso oferecido pelo CBABio (Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia) e CNPq, 17 a 28 de outubro, 2005.

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

ZALDIVAR, J.; MARTÍNEZ, A.; INGRAM, L. O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on growth and fermentation of ethanogenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 5, p. 524-530, 2000.

APÊNDICES

Apêndice 01. Resultados das fermentações em frascos Erlenmeyer

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	18,16	61,23	11,05	-	1,00	3,06	-	-	-	-
24	-	54,23	11,13	9,68	3,25	2,89	0,32	0,90	11,43	98,15
48	-	18,15	11,02	26,87	3,19	2,78	0,05	0,62	70,36	67,61
72	-	5,62	10,89	49,68	4,89	2,51	0,07	0,89	90,82	97,06

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	14,15	59,29	9,40	-	1,05	2,51	-	-	-	-
24	-	22,23	9,26	23,46	4,56	2,35	0,09	0,63	62,51	68,70
48	-	2,76	9,81	32,16	4,97	2,12	0,07	0,57	95,34	62,16
72	-	0	8,06	38,16	5,25	1,56	0,07	0,64	100	69,79

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	16,72	60,84	12,05	-	0,98	1,89	-	-	-	-
24	-	39,84	9,40	9,89	4,89	1,91	0,19	0,47	34,51	51,25
48	-	12,40	8,66	32,66	5,73	1,77	0,09	0,67	79,62	73,06
72	-	2,69	4,56	48,24	6,52	1,72	0,09	0,83	95,58	90,51

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	22,16	62,23	12,05	-	1,00	2,58	-	-	-	-
24	-	35,87	14,37	12,25	6,25	2,55	0,20	0,46	42,35	50,16
48	-	10,12	11,62	26,84	7,42	2,14	0,12	0,51	83,74	55,62
72	-	2,65	10,60	42,48	7,87	2,12	0,11	0,71	95,74	77,42

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	18,56	60,43	11,58	-	0,97	2,05	-	-	-	-
24	-	45,24	10,26	6,52	6,35	2,11	0,35	0,43	25,13	46,89
48	-	20,35	9,68	18,75	6,78	2,08	0,14	0,47	66,32	51,25
72	-	12,15	9,52	35,28	7,56	1,98	0,13	0,73	79,89	79,61

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	22,18	62,58	12,89	-	1,00	2,72	-	-	-	-
24	-	38,52	11,52	13,54	5,16	2,26	0,17	0,56	38,44	61,07
48	-	19,23	10,56	22,27	5,28	1,05	0,09	0,51	69,27	55,62
72	-	2,78	9,22	25,92	7,89	1,03	0,11	0,43	95,56	46,89

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	21,12	61,25	15,23	-	1,02	2,05	-	-	-	-
24	-	37,75	13,80	11,33	5,20	1,98	0,18	0,48	38,36	52,34
48	-	12,56	12,88	28,56	5,91	1,56	0,10	0,59	79,50	64,34
72	-	1,89	12,82	33,12	6,80	1,12	0,09	0,56	96,91	61,07

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	16,25	59,85	11,25	-	1,03	1,89	-	-	-	-
24	-	43,50	10,89	10,23	5,70	1,52	0,29	0,63	27,31	68,70
48	-	10,81	10,23	19,76	6,66	1,38	0,11	0,40	81,94	43,62
72	-	5,83	9,85	29,52	7,97	1,23	0,13	0,55	90,26	59,97

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	19,52	81,23	10,89	-	1,00	1,89	-	-	-	-
24	-	58,79	10,25	15,70	4,89	1,63	0,17	0,70	27,62	76,34
48	-	25,62	9,52	31,21	6,78	1,06	0,10	0,56	68,46	61,07
72	-	11,29	9,23	34,56	8,95	0,99	0,11	0,49	86,10	53,44

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	19,26	84,88	13,52	-	1,00	3,05	-	-	-	-
24	-	62,85	11,02	8,49	5,89	2,52	0,22	0,39	25,95	42,53
48	-	36,27	9,87	13,16	7,89	2,23	0,14	0,27	57,27	29,44
72	-	12,36	8,52	18,15	8,95	1,87	0,11	0,25	85,44	27,26

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	20,16	78,95	10,52	-	1,00	2,12	-	-	-	-
24	-	45,17	10,11	22,89	6,75	1,89	0,17	0,68	42,79	74,15
48	-	31,26	9,87	21,56	7,88	1,52	0,14	0,45	60,41	49,07
72	-	18,75	8,54	33,84	9,12	1,05	0,13	0,56	76,25	61,07

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	23,85	81,52	10,12	-	1,00	2,13	-	-	-	-
24	-	45,23	9,87	8,75	4,89	1,85	0,11	0,24	44,52	26,17
48	-	19,52	8,56	19,52	6,71	1,54	0,09	0,31	76,05	33,81
72	-	11,34	8,25	22,32	8,52	1,02	0,11	0,32	86,09	34,90

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	21,12	80,54	8,52	-	1,00	3,10	-	-	-	-
24	-	42,15	7,98	12,56	5,65	2,45	0,12	0,33	47,67	35,98
48	-	18,74	7,23	29,54	7,12	2,12	0,09	0,48	76,73	52,34
72	-	9,52	6,52	44,64	8,65	1,56	0,11	0,63	88,18	68,70

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	23,34	81,52	9,52	-	1,00	3,05	-	-	-	-
24	-	35,65	8,45	9,84	5,98	2,56	0,11	0,20	56,27	21,81
48	-	15,23	7,65	15,47	7,23	2,02	0,09	0,23	81,32	25,08
72	-	12,87	7,23	22,35	8,12	1,78	0,10	0,33	84,21	35,99

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	21,04	79,98	9,56	-	0,97	2,96	-	-	-	-
24	-	31,08	8,87	7,52	4,12	2,45	0,06	0,15	61,14	16,35
48	-	19,52	7,52	14,56	6,54	2,01	0,09	0,24	75,60	26,17
72	-	10,25	7,13	23,04	7,96	1,87	0,10	0,33	87,18	35,99

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	21,54	81,45	10,23	-	1,00	2,45	-	-	-	-
24	-	29,87	9,87	10,58	5,12	2,12	0,08	0,21	63,33	22,90
48	-	16,13	9,56	23,54	6,78	1,98	0,09	0,36	80,20	39,26
72	-	11,02	8,12	32,40	7,85	1,56	0,10	0,46	86,47	50,16

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	20,52	71,89	12,56	-	1,00	2,12	-	-	-	-
24	-	31,52	10,52	12,52	4,52	2,05	0,09	0,31	56,16	33,81
48	-	18,65	9,85	29,14	6,26	1,65	0,10	0,55	74,06	59,97
72	-	9,52	9,62	34,56	7,65	1,23	0,11	0,55	86,76	59,97

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	21,23	72,56	11,89	-	0,99	2,72	-	-	-	-
24	-	26,89	10,63	9,85	3,89	2,63	0,06	0,22	62,94	23,99
48	-	12,58	9,87	19,72	6,25	2,01	0,09	0,33	82,66	35,98
72	-	9,87	9,23	27,36	8,05	1,24	0,13	0,44	86,40	47,98

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	22,02	71,46	12,25	-	1,00	2,25	-	-	-	-
24	-	19,52	9,65	8,65	4,23	2,01	0,06	0,17	72,68	18,54
48	-	11,23	8,15	19,23	5,87	1,98	0,08	0,32	84,28	34,90
72	-	6,87	8,02	28,08	6,12	1,04	0,08	0,43	90,39	46,89

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	21,52	73,25	10,39	-	1,00	2,12	-	-	-	-
24	-	32,14	9,85	12,74	4,20	2,01	0,08	0,31	56,12	33,81
48	-	12,87	8,72	32,84	6,13	1,95	0,08	0,54	82,43	58,89
72	-	6,58	8,21	41,04	7,95	1,52	0,10	0,62	91,02	67,61

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	20,12	72,56	10,25	-	1,03	2,32	-	-	-	-
24	-	29,52	9,07	8,54	4,87	1,98	0,09	0,20	59,32	21,81
48	-	12,65	9,32	21,78	6,03	1,05	0,08	0,36	82,57	39,26
72	-	8,40	8,29	30,24	7,24	0,99	0,10	0,47	88,42	51,25

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	21,23	71,52	11,13	-	1,00	2,02	-	-	-	-
24	-	25,45	10,23	12,65	4,97	1,65	0,08	0,27	64,42	29,44
48	-	19,62	9,52	21,04	5,63	1,23	0,09	0,41	72,57	44,71
72	-	12,62	9,02	28,80	7,42	1,07	0,10	0,49	82,35	53,44

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	21,56	72,13	9,85	-	1,00	2,14	-	-	-	-
24	-	24,68	9,52	7,52	5,13	2,02	0,08	0,16	65,78	17,45
48	-	13,65	8,23	19,87	6,52	1,85	0,09	0,34	81,08	37,08
72	-	9,21	7,98	25,92	7,89	1,56	0,10	0,41	87,23	44,71

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	21,02	70,89	10,20	-	1,00	2,16	-	-	-	-
24	-	27,52	9,56	8,98	4,98	2,13	0,14	0,21	61,18	22,90
48	-	12,65	9,24	22,78	5,12	2,05	0,07	0,39	82,16	42,53
72	-	5,62	8,98	36,76	7,54	1,85	0,10	0,56	92,07	61,07

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	21,32	72,56	9,85	-	0,95	2,02	-	-	-	-
24	-	32,45	9,52	8,12	3,68	1,98	0,07	0,20	55,28	21,81
48	-	13,87	8,16	26,87	5,27	1,65	0,09	0,46	80,88	50,16
72	-	10,36	7,89	37,44	7,89	1,02	0,13	0,60	85,72	65,43

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	27,52	81,52	13,58	-	1,00	2,13	-	-	-	-
24	-	32,58	11,02	12,65	4,23	2,01	0,06	0,26	60,03	28,35
48	-	13,02	10,79	32,47	5,74	1,65	0,07	0,47	84,03	51,25
72	-	10,87	10,11	43,92	7,54	1,52	0,09	0,62	86,67	67,61

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

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	18,12	61,25	9,87	-	1,00	2,13	-	-	-	-
24	-	45,23	9,52	8,23	4,02	2,01	0,19	0,51	26,16	55,62
48	-	21,01	8,06	32,45	5,63	1,98	0,12	0,80	65,70	87,24
72	-	6,23	7,87	48,24	7,05	1,26	0,11	0,88	89,83	95,97

Tabela A1.28. Fermentação do hidrolisado de palha de cevada por *Candida guilliermondii*. Erlenmeyer sob condições ótimas de cultivo

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	19,15	62,23	10,25	-	1,00	2,95	-	-	-	-
24	-	42,26	9,25	7,58	3,89	2,05	0,14	0,38	32,09	41,44
48	-	15,12	8,52	22,87	4,15	1,65	0,06	0,49	75,70	43,43
72	-	2,12	8,02	33,12	6,89	1,42	0,12	0,55	96,59	59,98

Apêndice 02. Resultados das fermentações em fermentador de bancada (1 L)

Tabela A2.1. Fermentação do hidrolisado de palha de cevada por *Candida guilliermondii*. Ensaio 1 da matriz do planejamento experimental

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	8,97	57,32	14,52	-	0,84	6,25	-	-	-	-
24	-	16,74	11,07	24,66	1,50	3,96	0,016	0,61	70,80	66,52
48	-	2,91	2,56	31,56	2,43	2,51	0,029	0,56	94,92	61,07
72	-	-	-	52,36	3,36	1,12	0,044	0,54	100	58,89

Tabela A2.2. Fermentação do hidrolisado de palha de cevada por *Candida guilliermondii*. Ensaio 2 da matriz do planejamento experimental

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	8,28	58,39	8,09	-	0,92	6,78	-	-	-	-
24	-	2,53	5,13	17,50	6,85	4,23	0,106	0,31	95,67	34,81
48	-	1,75	1,14	15,09	13,53	3,56	0,108	0,27	97,00	29,44
72	-	-	0,54	17,50	15,69	1,27	0,109	0,30	100	32,71

Tabela A2.3. Fermentação do hidrolisado de palha de cevada por *Candida guilliermondii*. Ensaio 3 da matriz do planejamento experimental

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	10,12	59,31	15,31	-	0,99	5,23	-	-	-	-
24	-	8,32	10,24	14,18	1,55	4,58	0,045	0,28	85,97	30,53
48	-	1,97	8,32	29,80	2,82	3,95	0,183	0,52	96,68	56,71
72	-	-	2,16	55,00	1,72	3,25	0,195	0,91	100	99,24

Tabela A2.4. Fermentação do hidrolisado de palha de cevada por *Candida guilliermondii*. Ensaio 4 da matriz do planejamento experimental

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	11,25	58,71	8,10	-	0,91	4,81	-	-	-	-
24	-	3,45	5,14	18,96	8,48	3,27	0,137	0,34	94,12	37,08
48	-	-	3,27	30,13	14,75	2,63	0,236	0,51	100	55,62
72	-	-	1,81	48,21	21,90	1,01	0,356	0,82	100	89,42

Tabela A2.5. Fermentação do hidrolisado de palha de cevada por *Candida guilliermondii*. Ensaio 5 da matriz do planejamento experimental

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	10,11	55,36	9,27	-	1,11	4,87	-	-	-	-
24	-	39,36	5,23	12,13	2,64	3,52	0,096	0,76	28,90	82,88
48	-	25,29	2,51	21,37	2,80	2,07	0,056	0,71	54,32	77,43
72	-	9,13	1,12	38,32	4,15	1,56	0,066	0,83	83,51	90,51

Tabela A2.6. Fermentação do hidrolisado de palha de cevada por *Candida guilliermondii*. Ensaio 6 da matriz do planejamento experimental

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	9,98	52,31	10,13	-	1,02	5,13	-	-	-	-
24	-	38,72	8,57	11,98	1,72	4,25	0,211	0,88	25,98	95,97
48	-	17,00	7,32	23,54	1,81	3,87	0,099	0,67	67,50	73,06
72	-	5,02	1,78	41,23	1,88	2,22	0,089	0,87	90,43	94,87

Tabela A2.7. Fermentação do hidrolisado de palha de cevada por *Candida guilliermondii*. Ensaio 7 da matriz do planejamento experimental

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	11,54	57,81	9,81	-	0,91	3,98	-	-	-	-
24	-	29,70	8,31	12,54	2,64	2,56	0,062	0,45	48,62	49,07
48	-	13,24	7,23	25,17	3,66	2,12	0,062	0,56	77,10	61,07
72	-	4,98	2,15	42,25	4,57	1,05	0,086	0,80	91,39	87,24

Tabela A2.8. Fermentação do hidrolisado de palha de cevada por *Candida guilliermondii*. Condições ótimas de cultivo

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	15,74	58,25	11,03	-	1,00	3,18	-	-	-	-
24	-	14,69	9,26	10,15	8,25	2,87	0,166	0,23	74,78	25,08
48	-	5,25	6,75	39,58	9,02	2,01	0,151	0,75	90,99	81,79
72	-	0,00	2,14	51,28	9,87	1,78	0,152	0,88	100	95,97

Apêndice 03. Resultado da fermentações em fermentador de bancada (16 L)

Tabela A3.1. Fermentação do hidrolisado de palha de cevada por *Candida guilliermondii*.

Tempo (h)	Glicose (g/L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Xilitol (g/L)	Células (g/L)	Ac. Acético (g/L)	$Y_{X/S}$ (g/g)	$Y_{P/S}$ (g/g)	Consumo de Xilose (%)	Eficiência de Conversão (%)
0	12,53	61,26	9,87	-	3,23	1,02	-	-	-	-
24	-	32,45	7,26	3,75	1,92	7,02	0,21	0,13	47,02	25,08
48	-	12,49	4,96	19,52	1,52	7,85	0,14	0,40	79,66	81,79
72	-	0,32	3,07	55,63	1,12	8,23	0,12	0,91	99,48	99,54