



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA - FAENQUIL
Departamento de Biotecnologia - PPG Biotecnologia Industrial

Dissertação de Mestrado

**“UTILIZAÇÃO DE CARVÃO ATIVO, RESINAS E TERRA
DIATOMÁCEA PARA O TRATAMENTO DO HIDROLISADO DE
EUCALIPTO NA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL”**

Giovani Brandão Mafra de Carvalho

**Lorena – SP - Brasil
2005**



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO
SECRETARIA DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA - FAENQUIL
Departamento de Biotecnologia - PPG Biotecnologia Industrial

Dissertação de Mestrado

**“UTILIZAÇÃO DE CARVÃO ATIVO, RESINAS E TERRA
DIATOMÁCEA PARA O TRATAMENTO DO HIDROLISADO DE
EUCALIPTO NA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL”**

Giovani Brandão Mafra de Carvalho

**Lorena – SP - Brasil
2005**

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Universitária - FAENQUIL

Carvalho, Giovani Brandão Mafra de

C253u Utilização de carvão ativo, resinas e terra diatomácea para o tratamento do hidrolisado de eucalipto na produção biotecnológica de xilitol. / Giovani Brandão Mafra de Carvalho. Lorena, 2005. 110f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Departamento de Biotecnologia.

Orientador: João Batista de Almeida e Silva

1. Biotecnologia. 2. Xilitol - fermentação 3. Tratamento do hidrolisado hemicelulósico. 4. Adsorventes. 5. Planejamento de experimentos. 6. Modelagem Matemática. 7. Estatística. I. Almeida e Silva, João Batista de, orient. II. Título.

CDU: 574.6

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

**UTILIZAÇÃO DE CARVÃO ATIVO, RESINAS E TERRA
DIATOMÁCEA PARA O TRATAMENTO DO HIDROLISADO DE
EUCALIPTO NA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL**

Dissertação de mestrado
apresentado como parte das
exigências para a obtenção do
título de Mestre em
Biotecnologia Industrial

Banca Examinadora:

Dr. João Batista de Almeida e Silva, FAENQUIL (Presidente)
Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe, FAENQUIL
Dr. Urgel de Almeida Lima, USP

Estudante:

Giovani Brandão Mafra de Carvalho

**Lorena – SP – Brasil
2005**

**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

**UTILIZAÇÃO DE CARVÃO ATIVO, RESINAS E TERRA
DIATOMÁCEA PARA O TRATAMENTO DO HIDROLISADO DE
EUCALIPTO NA PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL**

Este exemplar corresponde a versão
final da dissertação de mestrado
aprovada pela banca examinadora

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

**Lorena – SP – Brasil
2005**

“Não está na natureza das coisas que o homem realize um descobrimento súbito e inesperado; a ciência avança passo a passo e cada homem depende do trabalho de seus predecessores”

(Sir Ernest Rutherford).

AGRADECIMENTOS

-À Deus pela Vida e o Amor Infinito.

-Ao Professor Dr. João Batista de Almeida e Silva pela brilhante orientação, a amizade, a confiança, os ensinamentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

-À Professora Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe, pelas valiosas sugestões e os ensinamentos transmitidos durante a realização deste trabalho, pelo seu grande potencial como pesquisadora. Muito obrigado.

- Aos Pesquisadores Dr. Júlio César dos Santos e Dr. Walter Carvalho, que com sua amizade, valiosos ensinamentos e conselhos despertaram em mim o amor pela pesquisa.

-Aos Professores e Pesquisadores do DEBIQ-FAENQUIL, pelos ensinamentos e amizade, em especial, aos Professores Dr. Arnaldo Márcio, Dr. George, Dr. Silvio Silvério, Dra. Inês, Dr. Ismael, Dr. Samuel e Dra. Eleonora, pela amizade, o carinho, os ensinamentos e as sugestões.

-Aos amigos Rita, Solange, Giuliano, Larissa C., Waltinho, Yovanka, Francislene, Andréia, Mário, Baby, Soninha, Marcos Paulo, André (Piranguinho), Rogério, Thalita, Valdeir, Thaís, Aline, Boltrus, Marta (Martica), Daniel, Denise, Lais, Lili, Larissa P., Priscila, Fernando (Budáia), Dra. Heizir, Paty e a todos os colegas pela amizade, pelo carinho e ajuda desinteressada nos momentos precisos.

-Aos alunos de Iniciação Científica Juliana Polizel, Sílvia (Syltalita), Audrei, Arismar, Adriana, Lucilene (Cotôco), Diego, Ricardo, "Chopininho", Fernanda, Michel Brienzo, Rymenes e, em especial Cleiton Carvalho (Seu Creisson), pela ajuda

durante o trabalho no laboratório, pela grande amizade, respeito e apoio. A todos eles muito obrigado.

-Ao Departamento de Biotecnologia – FAENQUIL, pela oportunidade da realização do mestrado.

-Aos funcionários do DEBIQ-FAENQUIL, Lílian, Walkiria, Isnaldi, Ismael, André, Selma, José Carlos, Jussara, Nicamor, Paulinho, Lucinha e André Prado, que colaboraram com a realização deste trabalho.

-À minha querida noiva Priscila pelo carinho, respeito, incentivo, paciência e amor incondicional durante a realização deste trabalho. Muito obrigado.

-Aos meus pais Ângela e João, minha avó Terezinha, tia Inês, minha irmã Munique e a todos os tios e familiares que, mesmo de longe, participaram me apoiando e incentivando em todos os momentos.

-À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo –FAPESP, pela bolsa de mestrado concedida.

-A todas aquelas pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Giovani Brandão Mafra de Carvalho, filho de João Batista de Carvalho e Ângela Maria Rodrigues Brandão Carvalho, nasceu em 21 de maio de 1978 em Cristina – MG.

Em dezembro de 1997 formou-se Técnico em Química pelo Colégio Itajubá de Itajubá – MG.

Em julho de 2003 graduou-se em Engenharia Industrial Química pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena - FAENQUIL (Estadual), Lorena – SP.

Em agosto de 2003, iniciou o curso de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, em nível de Mestrado, no Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena – FAENQUIL (Estadual), Lorena – SP.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Biomassa Lignocelulósica	3
2.2. Resíduos de Eucalipto.....	7
2.3. Xilitol.....	9
2.3.1. <i>Propriedades e aplicações</i>	9
2.3.2. <i>Vias de obtenção</i>	13
2.4. Inibidores do metabolismo microbiano	22
2.5. Tratamento dos hidrolisados hemicelulósicos	26
2.5.1. <i>Alteração do pH</i>	27
2.5.2. <i>Tratamento com adsorventes</i>	28
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. Obtenção e preparo do hidrolisado	39
3.1.1. <i>Matéria Prima</i>	39
3.1.2. <i>Hidrólise ácida das aparas de eucalipto</i>	39
3.1.3. <i>Concentração</i>	39
3.1.4. <i>Tratamento</i>	39
3.2. Microrganismo e preparo do inóculo	40
3.2.1. <i>Microrganismo</i>	40
3.2.2. <i>Preparo do inóculo</i>	40
3.3. Meio e Condições de Fermentação.....	41
3.4. Métodos Analíticos	42
3.4.1. <i>Determinação do teor de umidade das aparas de eucalipto</i>	42
3.4.2. <i>Viabilidade e pureza da cultura</i>	42
3.4.3. <i>Determinação da concentração celular</i>	42
3.4.4. <i>Determinação do pH</i>	43
3.4.5. <i>Determinação das concentrações de açúcares e ácido acético</i>	43
3.4.6. <i>Determinação das concentrações de furfural e Hidroximetilfurfural</i>	43
3.4.7. <i>Determinação do teor de produtos de degradação da lignina</i>	44
4. METODOLOGIA DOS RESULTADOS	44
4.1. Determinação das porcentagens de redução das concentrações dos inibidores e dos açúcares.....	44
4.2. Determinação dos parâmetros fermentativos.....	45
4.3. Análise estatística e modelagem matemática	45

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. Obtenção e preparo do hidrolisado concentrado	48
5.2. Tratamento do hidrolisado concentrado	52
5.3. Fermentação do hidrolisado concentrado submetido a diferentes combinações de tratamento	57
5.4. Análise estatística e modelagem matemática	62
5.4.1. <i>Análise estatística e modelagem matemática para a remoção dos inibidores e da xilose</i>	62
5.4.1.1. <i>Análise estatística e modelagem matemática para a remoção de xilose</i>	63
5.4.1.2. <i>Análise estatística e modelagem matemática para a remoção de compostos aromáticos derivados da degradação da lignina</i>	63
5.4.1.3. <i>Análise estatística e modelagem matemática para a remoção de ácido acético</i>	67
5.4.1.4. <i>Análise estatística e modelagem matemática para a remoção de furfural</i>	71
5.4.1.5. <i>Análise estatística e modelagem matemática para a remoção de 5-hidroximetilfurfural</i>	75
5.4.2. <i>Análise estatística e modelagem matemática para fator de rendimento em xilitol</i>	80
6. CONCLUSÕES	85
7. RECOMENDAÇÕES	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
9. APÊNDICE	104

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Plantações florestais no Brasil em 2000 8
- Tabela 2-** Propriedades físico-químicas do xilitol (MANZ et al., 1973, HYVÖNEN et al., 1982, BÄR, 1991) 10
- Tabela 3-** Leveduras produtoras de xilitol – os códigos indicam diferentes linhagens dos fungos, e a produção é por litro de meio de cultura (LIMA & BERLINCK, 2003) 17
- Tabela 4-** Utilização de hidrolisados hemicelulósicos de diferentes matérias primas para a produção biotecnológica de xilitol21
- Tabela 5-** Composição química do material diatomáceo (SOUSA et al., 2003) ... 34
- Tabela 7-** Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial fracionário 2^3 com mais oito ensaios, fixando nestes, o ponto central para o pH do hidrolisado 6
- Tabela 8-** Matriz de planejamento composta pelos valores dos fatores originais e codificados no projeto fatorial fracionário 2^3 com mais oito ensaios, fixando nestes, o ponto central para o pH do hidrolisado 46
- Tabela 9-** Composição parcial, em g/L, do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto obtido por hidrólise ácida, em sua forma original e após ser submetido ao processo de concentração 48
- Tabela 10-** Matriz de planejamento para o projeto fatorial 2^3 com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH e composição parcial, em g/L dos açúcares e inibidores presentes nos hidrolisados tratados 53
- Tabela 11-** Redução dos açúcares e inibidores do hidrolisado de eucalipto submetido às diferentes combinações de tratamentos (em porcentagens) 54
- Tabela 12-** Consumo de xilose, ácido acético, produção de biomassa e xilitol no cultivo de *Candida guilliermondii* no hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto submetido a diferentes combinações de tratamento 57
- Tabela 13-** Parâmetros fermentativos da bioconversão de xilose a xilitol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto submetido às diferentes combinações de tratamento61

- Tabela 14-** Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a remoção de xilose seguindo um planejamento fatorial 2^3 com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto 63
- Tabela 15-** Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a remoção dos CDL seguindo um planejamento fatorial 2^3 com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto 64
- Tabela 16-** Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2^3 com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH para o modelo que representa a remoção dos CDL no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto..... 64
- Tabela 17-** Análise da curvatura para o modelo que descreve a remoção dos CDL no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto..... 65
- Tabela 18-** Análise de variância da regressão do modelo que representa a remoção dos CDL no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto 65
- Tabela 19-** Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a remoção de ácido acético seguindo um planejamento fatorial 2^3 com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto..... 68
- Tabela 20-** Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2^3 com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH para o modelo que representa a remoção de ácido acético no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto..... 68
- Tabela 21-** Análise da curvatura para o modelo que descreve a remoção de ácido acético no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto..... 69
- Tabela 22-** Análise de variância da regressão do modelo que representa a remoção de ácido acético no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto..... 69
- Tabela 23-** Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a remoção do furfural, seguindo um planejamento

fatorial 2^3 com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto	72
Tabela 24- Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2^3 , com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH para o modelo que representa a remoção do furfural no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.....	72
Tabela 25- Análise da curvatura para o modelo que descreve a remoção do furfural no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.....	73
Tabela 26- Análise de variância da regressão do modelo que representa a remoção do furfural no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto	73
Tabela 27- Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a remoção do 5-hidroximetilfurfural seguindo um planejamento fatorial 2^3 , com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto	76
Tabela 28- Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2^3 , com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH para o modelo que representa a remoção do 5-hidroximetilfurfural no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto	76
Tabela 29- Análise da curvatura para o modelo que descreve a remoção do 5-hidroximetilfurfural, no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.....	77
Tabela 30- Análise de variância da regressão do modelo, que representa a remoção do 5-hidroximetilfurfural no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.....	77
Tabela 31- Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para o fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$) seguindo um planejamento fatorial 2^3 , com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto	.81
Tabela 32- Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2^3 , com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH para o modelo que representa o fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$) no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto	81

Tabela 33- Análise da curvatura para o modelo que descreve o fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$), no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.....	82
Tabela 34- Análise de variância da regressão do modelo, que representa o fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$) no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto	82
Tabela A1- Variação da concentração de xilose e ácido acético em g/L na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto submetido a diferentes tratamentos	105
Tabela A2- Variação da concentração celular em g/L da levedura <i>Candida guilliermondii</i> no hidrolisado de aparas de eucalipto em diferentes tempos de fermentação.....	106
Tabela A3- Características principais do carvão ativo <i>SYNTH</i> utilizado no presente trabalho	107
Tabela A3- Características principais da Terra Diatomácea calcinada e purificada <i>REAGEN</i> utilizada no presente trabalho	108
Tabela A4- Características principais da resina MACRONET MN-150 <i>PUIROLITE</i> utilizada no presente trabalho	109
Tabela A5- Características principais da resina aniônica A860S <i>PUIROLITE</i> utilizada no presente trabalho	110

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Estrutura de alguns tipos de hemiceluloses [figura A] e de um fragmento de celulose [figura B] (FERRAZ, 2001).....5
- Figura 2-** Modelo de uma estrutura de lignina proposta por H. Nimz (Ferraz, 2001)6
- Figura 3-** Estrutura do catalisador Níquel Raney e um possível mecanismo de adsorção de monossacarídeos no mesmo (MIKKOLA *et al.*, 1999) 13
- Figura 5-** Esquema das reações principal e paralelas na hidrogenação da xilose (MIKKOLA & SALMI, 1999, MIKKOLA *et al.*, 1999)..... 14
- Figura 4-** Produção de xilitol e xilose (MELAJA & HÄMÄLÄINEN, 1977; HYVÖNEN *et al.*, 1982)..... 16
- Figura 6-** Metabolismo de xilose e glicose em leveduras fermentadoras de xilose (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 1994).....20
- Figura 7-** Representação Esquemática de diferentes tipos de poros em uma partícula de carvão ativo (SWIATKOWSI, 1998)31
- Figura 8 -** Detalhes morfológicos do material diatomáceo (SOUSA *et al.*, 2003) 33
- Figuras 9 e 10-** Exemplo de resinas catiônica e aniônica (MENDHAM *et al.*, 2002) 37
- Figura 11-** Relação entre valores previstos e os valores observados no modelo proposto para o tratamento visando maior remoção dos CDL do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto66
- Figura 12-** Relação entre valores previstos e valores observados no modelo proposto para o tratamento, visando maior remoção de ácido acético do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto 70
- Figura 13-** Relação entre valores previstos e os valores observados no modelo proposto para o tratamento visando maior remoção de furfural do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto74

Figura 14- Relação entre valores previstos e os valores observados no modelo proposto para o tratamento, visando maior remoção de 5-hidroximetilfurfural do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto..... 78

Figura 15- Relação entre valores previstos e os valores observados do modelo proposto, visando maior fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$) no hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto83

RESUMO

“Utilização de Carvão Ativo, Resinas e Terra Diatomácea para o Tratamento do Hidrolisado de Eucalipto na Produção Biotecnológica de Xilitol”. Giovani Brandão Mafra de Carvalho, Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial, Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Orientador: Dr. João Batista de Almeida e Silva (Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, SP, Brasil). Banca Examinadora: Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe e Dr. Urgel de Almeida Lima. Agosto, 2005.

Diversas pesquisas têm demonstrado que a obtenção de xilitol por fermentação de hidrolisados de materiais lignocelulósicos apresenta limitações devido a presença de compostos inibidores do metabolismo microbiano, resultantes do procedimento de hidrólise da estrutura lignocelulósica. Vários tratamentos físico-químicos têm sido propostos para reduzir as concentrações destes compostos nos hidrolisados, sendo a alteração de pH do hidrolisado associado ao uso de adsorventes e resinas um dos tratamentos mais promissores e economicamente viáveis.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma metodologia de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de *Eucalyptus grandis* a fim de melhorar a eficiência de conversão de xilose em xilitol pela levedura *Candida guilliermondii*. Foram estudadas diferentes combinações de tratamento baseadas na variação do pH e no uso de adsorventes (carvão ativo ou terra diatomácea) e resinas (resina MN-150 ou A860S) em hidrolisado concentrado 5,8 vezes de seu valor inicial.

Os ensaios foram realizados baseados em conceito de estatística multivariada, aplicando-se técnicas de planejamento fatorial fracionário, para identificar os fatores importantes para o processo. A seguir foram quantificados os níveis dos fatores significativos.

O estudo resultou em um modelo matemático empírico que representa os parâmetros envolvidos no processo:

$$Y_5 = 0,341 + 0,0434 X_1 - 0,0921 X_2 - 0,0859 X_3 - 0,0764 X_1 X_2 + 0,0419 X_1 X_3 + 0,0574 X_2 X_3$$

Onde Y_5 representa o fator de rendimento em xilitol, em função dos fatores resina (X_1), pH (X_2) e adsorvente (X_3).

A metodologia desenvolvida permitiu estabelecer, entre as condições avaliadas, o melhor tratamento com o qual foi possível obter o máximo fator de rendimento em xilitol (0,544 g xilitol/g xilose): fermentação com o hidrolisado 5,8 vezes concentrado, tratado pela elevação do seu pH inicial para 3,5, adsorção com 2,4% de carvão ativo (a 30°C por 34,5 minutos) e passagem pela resina MN-150 (a 30°C com um fluxo de 0,9 mL/minuto e volume de leite de 200 mL).

ABSTRACT

“Utilization of Active Charcoal, Resins and Diatomaceous Earth for the Treatment of the Eucalyptus Hydrolysate in the Biotechnological Xylitol Production”. Giovanni Brandão Mafra de Carvalho. Master degree Dissertation. Post-Graduation Program in Industrial Biotechnology. Department of Biotechnology. Chemical Engineering College of Lorena. Adviser: Dr. João Batista de Almeida e Silva (Department of Biotechnology, FAENQUIL, Lorena, SP, Brazil). Examining Board: Dr. João Batista de Almeida e Silva (Chairman), Dr. Maria das Graças de Almeida Felipe and Dr. Urgel de Almeida Lima. August, 2005.

Several researches have demonstrated that the xylitol obtainment by fermentation of lignocelulosic hydrolysates is restricted due to the presence of inhibitory compounds of the microbial metabolism, which are proceeded from the lignocelulosic structure hydrolysis. Many physico-chemical treatments have been proposed in order to reduce the concentrations of these compounds in the hydrolysates. The pH alteration combined with the use of adsorbents and resins is one of the more promising and economically viable treatments.

In this way, the present work aimed the development of a methodology for the treatment of Eucalyptus Grandis shavings hemicelulosic hydrolysate in order to improve the efficiency of the xylose-to-xylitol conversion by *Candida guilliermondii* yeast. Different combinations of treatments based on the pH variation and the use of adsorbents (active charcoal or diatomaceous earth) and resins (resin MN-150 or A860S) in the 5.8-fold concentrated hydrolysate were studied.

The assays were performed based on the concept of multivariate statistics, applying the fractional factorial design, to identify the important factors for the process. Afterwards, the levels of the significant factors were quantified.

The study resulted in an empirical mathematical model that represents the parameters involved in the process:

$$Y_5 = 0,341 + 0,0434 X_1 - 0,0921 X_2 - 0,0859 X_3 - 0,0764 X_1 X_2 + 0,0419 X_1 X_3 + 0,0574 X_2 X_3$$

Where Y_5 represents the xylitol yield factor, as a function of the resin (X_1), pH (X_2) and adsorbent (X_3).

The methodology allowed to establish, among the evaluated conditions, the best treatment that obtained the maximum xylitol yield factor (0.544 g xylitol/g xylose): fermentation with the 5.8-fold concentrated hydrolysate, treated by initial pH increase to 3.5, adsorption with 2.4% active charcoal (at 30°C for 34.5 minutes) and flow through the resin MN-150 (at 30°C with 0.9 m/L/minute flowrate and 200 mL bed volume).

1 INTRODUÇÃO

Atualmente tem-se observado um grande aumento dos estudos que visam o aproveitamento integral dos resíduos agro-industriais e florestais, destacando-se as aparas de eucalipto.

O aproveitamento desses materiais nos processos fermentativos tem sido, nos últimos anos, objeto de pesquisas cada vez mais numerosas, em decorrência do impacto ambiental negativo causado.

Em consequência do desenvolvimento da indústria madeireira e de papel e celulose, os resíduos de eucalipto no Brasil constituem, atualmente, uma das principais fontes renováveis e abundantes de carboidratos a serem utilizados nos processos de bioconversão para a obtenção de produtos de interesse econômico e social, como por exemplo, o xilitol.

O xilitol é um poliálcool, com poder adoçante semelhante ao da sacarose e que pode ser utilizado em alimentos destinados a pacientes diabéticos, obesos e deficientes da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase. Possui propriedade anti cariogênica e pode ser utilizado em vários segmentos da indústria alimentícia e farmacêutica para obtenção de uma grande variedade de produtos de interesse econômico e social.

A produção comercial desse adoçante ocorre por via química, através da hidrogenação catalítica da xilose presente nos hidrolisados obtidos dos materiais lignocelulósicos. Este processo resulta em uma mistura de açúcares e polióis, o que torna complexa a etapa de purificação de xilitol. Adicionalmente, o rendimento e a qualidade do xilitol obtido dependem da pureza da solução inicial de xilose, sendo necessárias extensivas etapas de purificação do hidrolisado hemicelulósico. A descoberta de microrganismos capazes de converter xilose em xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos torna o processo microbiológico alternativa promissora para obtenção comercial deste adoçante.

Projetos voltados para o desenvolvimento dessa tecnologia vem sendo desenvolvidos pelo Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL).

Estudos realizados até o presente momento mostram que os teores de xilitol obtidos em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, de palha de arroz e palha de trigo são superiores ao que foi obtido em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. Presume-se que tal comportamento se deva ao fato de este hidrolisado apresentar maior teor de compostos tóxicos que outros. Esses compostos são oriundos do procedimento de hidrólise da estrutura lignocelulósica, como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e compostos derivados da lignina solúvel em meio ácido.

Desta forma justifica-se a realização de estudos do tratamento deste hidrolisado com vista a remover ou minimizar as concentrações dos compostos tóxicos, para que melhor eficiência desta bioconversão possa ser alcançada empregando-se hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influencia das diferentes combinações de tratamentos sobre a remoção de compostos tóxicos do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto, visando melhorar o bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* a partir deste hidrolisado.

A desintoxicação do hidrolisado foi realizada utilizando óxido de cálcio, carvão ativo, terra diatomácea e resinas de acordo com um planejamento fatorial 2^3 . Posteriormente ocorreu a fermentação do hidrolisado tratado, em agitador. Os resultados dos ensaios foram expressos em tabelas estimativas de efeitos, gráficos de valores previstos contra valores observados, erros-padrão, teste t de "Student" e análise de variância. Os fatores que exibiram efeito significativo foram utilizados para compor os modelos matemáticos de natureza empírica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIOMASSA LIGNOCELULÓSICA

A biomassa lignocelulósica é constituída pelas árvores, plantas, gramíneas e algas, sendo considerada atualmente como a quarta fonte renovável de energia mais abundante no planeta (EUREC Agency, 1996). Os produtos florestais e agrícolas representam mais de 60% da biomassa total, sendo estimada a produtividade de biomassa seca em 155 bilhões de t/ano (SING, MISHRA, 1995).

Como conseqüência do desenvolvimento da agricultura e da indústria florestal são gerados, a cada ano, milhões de toneladas de resíduos lignocelulósicos, os quais constituem fontes potenciais de energia e matérias-primas de baixo custo. Estes materiais podem ser utilizados em diversos processos de bioconversão, com a finalidade de obter vários produtos de maior valor agregado tais como combustíveis, compostos químicos de interesse industrial e alimentos, entre outros (OLIVEIRA, 1980, SADDLER *et al.* 1983, RIPOLI *et al.* 1990, FULLER *et al.*, 1996). Existe ainda um benefício ambiental no aproveitamento desses resíduos, tendo em vista que os mesmos representam poluentes ambientais potenciais (EUREC Agency, 1996).

O reconhecimento da natureza finita dos combustíveis energéticos convencionais, a necessidade de se controlar a poluição ambiental e a mudança dos valores sociais e culturais tem incentivado a comunidade científica internacional a examinar fontes alternativas de materiais e energia (KHUAD, SINGH, 1993). Uma solução prática para estes problemas é o desenvolvimento de tecnologias que permitam o uso das fontes renováveis de energia existentes na natureza, como a biomassa lignocelulósica (EUREC Agency, 1996).

O potencial de aproveitamento da biomassa lignocelulósica baseia-se em sua composição química. Independente de sua origem, os materiais lignocelulósicos contêm celulose, hemicelulose e lignina como principais componentes, em proporções que variam de 40 a 50%, 25 a 35% e 15 a 25%, respectivamente (WYMAN, GOODMAN, 1993).

Segundo FERRAZ (2001), no caso específico das madeiras, a celulose é o componente mais abundante (cerca de 50%), sendo um polímero linear (parte amorfo e parte cristalino), formado exclusivamente por moléculas de anidro-glicose unidas através de ligações β -(1-4)-glicosídicas. Estritamente a celulose é composta por unidades monoméricas de celobiose, que se repetem sempre, apresentando o oxigênio que liga os anéis glicosídicos na posição equatorial conforme mostrado na Figura 1.

As polioses (ou hemicelulose) são compostas pelos açúcares glicose, manose e galactose (hexoses) e xilose e arabinose (pentoses), podendo ainda quantidades variáveis de ácidos urônicos e desoxi-hexoses em alguns tipos de madeira (Figura 1). Esses açúcares apresentam-se na forma de polímeros ramificados, de menor massa molecular que a celulose e podem ser homopolímeros (exemplo: xilana, formado por xilose), ou heteropolímeros (exemplo: glicomanana, formado por glicose e manose). O teor de polioses em diferentes tipos de madeira é bastante variável, mas pode-se admitir um valor médio de cerca de 20% (FERRAZ, 2001).

A lignina é composta basicamente por unidades de fenilpropano formando uma macromolécula tridimensional e amorfa, representando 20% a 30% do total da madeira. O acoplamento das unidades de fenilpropano não ocorre de forma regular e repetitiva, o que é atribuído ao mecanismo de biossíntese da lignina, que se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes álcoois cinamílicos precursores. Os diferentes tipos de acoplamento entre os precursores dão origem a vários tipos de ligações entre as unidades fenilpropano. As mais abundantes são: β -O-4 e α -O-4 (50-65%), β -5 (6-15%), β -1 (9-15%), 5-5 (2-9%) e β - β (2-5%). A terminologia empregada na química da lignina é baseada numa estrutura básica de fenilpropano. Nessa terminologia considera-se como carbono 1 do anel aromático aquele que está ligado à cadeia propânica. Os carbonos dessa cadeia lateral são então denominados, respectivamente, como, α , β e γ , partindo do carbono ligado ao anel aromático. Uma estrutura modelo para lignina é mostrada na Figura 2. Existe ainda uma fração menor na madeira, formada basicamente por compostos fenólicos e resinas, que comumente são chamados de extrativos (solúveis em solventes orgânicos e água) e compreendem cerca de 2 a 4% (FERRAZ, 2001).

Conforme relatado por DEKKER (1985), os materiais lignocelulósicos não podem ser utilizados “in natura” na maioria dos processos de bioconversão, pois não podem ser diretamente utilizados pelos microrganismos produtores das substâncias de interesse industrial, sendo o fracionamento das principais frações poliméricas um pré-requisito para a utilização integrada desses materiais. A hidrólise dos materiais lignocelulósicos é efetuada por processos físicos, químicos e biológicos e pela combinação destes. Dentre estes métodos se incluem a hidrólise ácida (ALMEIDA e SILVA, *et al.*2002), hidrólise enzimática (TSAO, 1978), explosão a vapor (CONVERTI *et al.*, 2000 a) e extração com soluções alcalinas (do TOIT *et al.*, 1984).

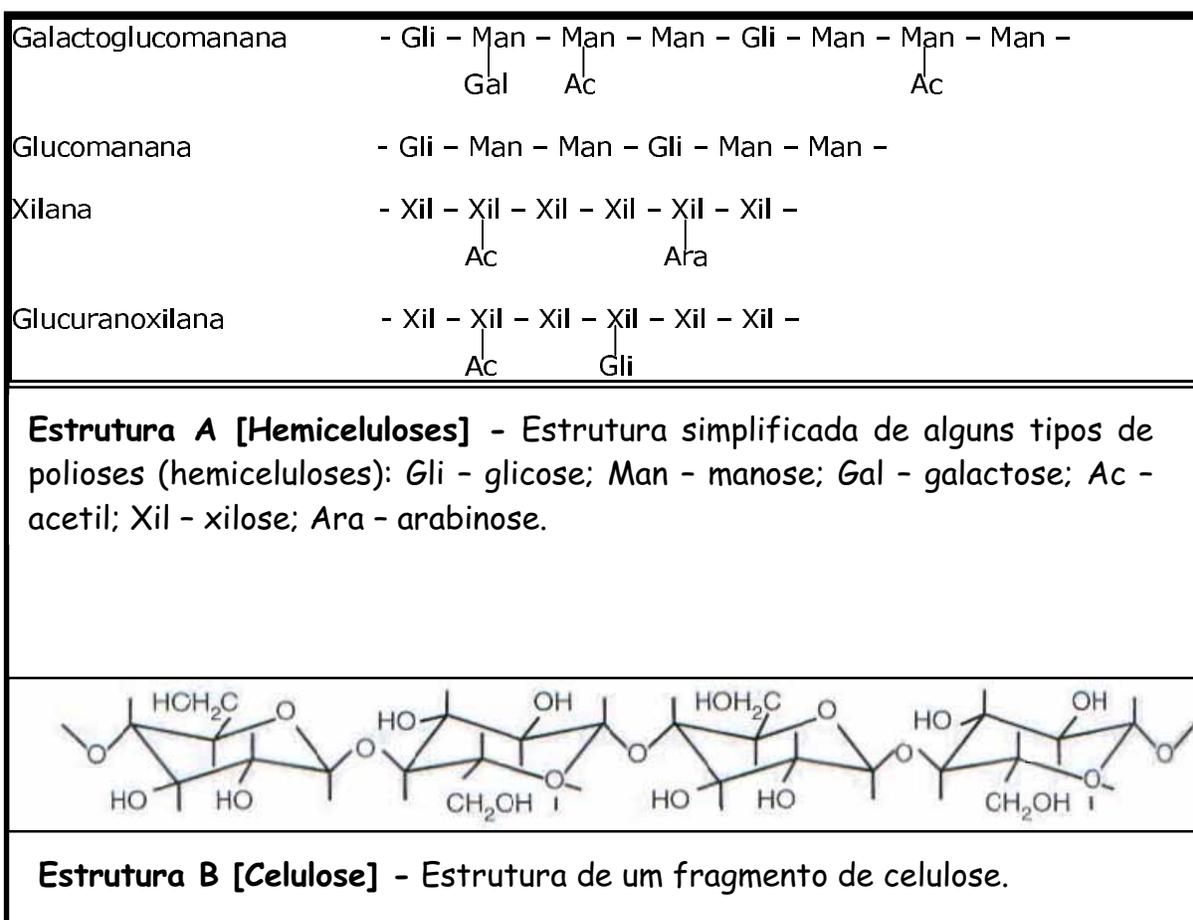


Figura1- Estrutura de alguns tipos de hemiceluloses [figura A] e de um fragmento de celulose [figura B] (FERRAZ, 2001).

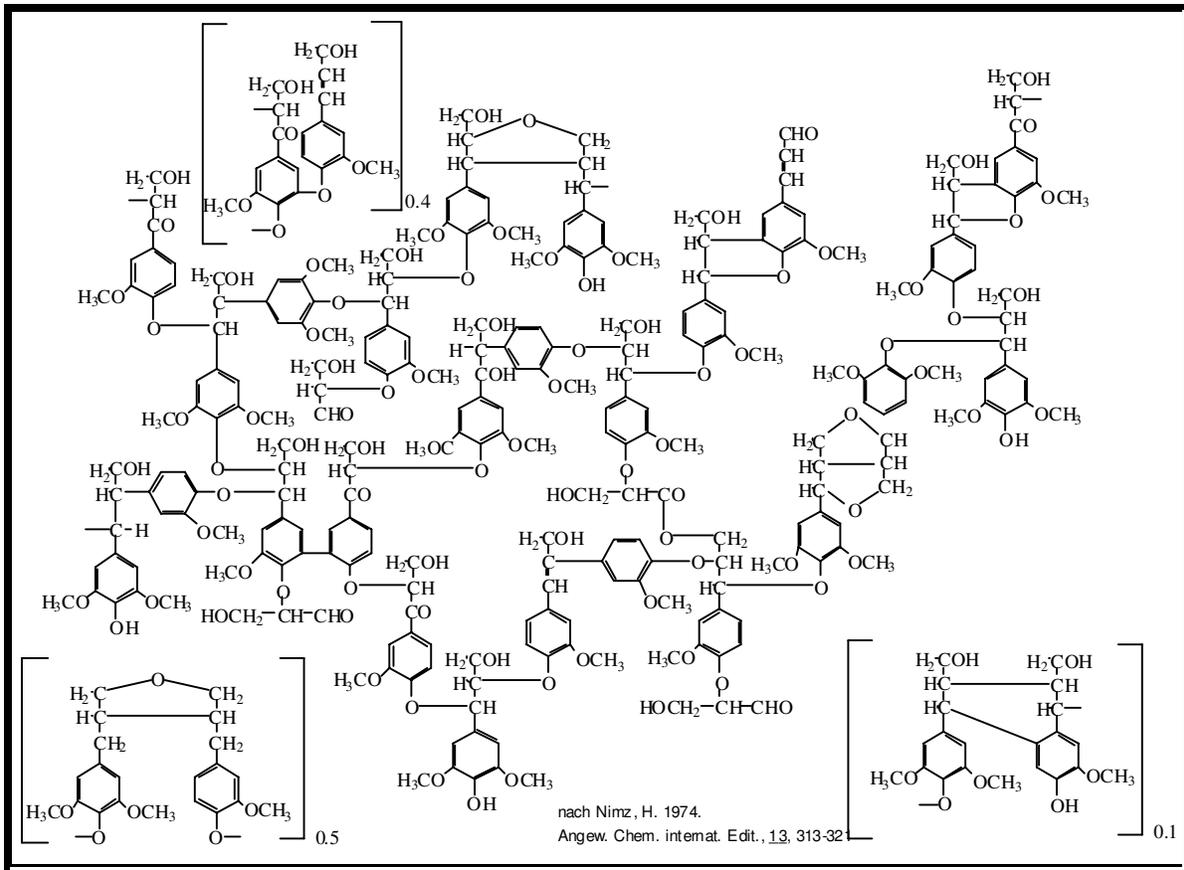


Figura 2- Modelo de uma estrutura de lignina proposta por H. Nimz (Ferraz, 2001).

Quando se realiza a hidrólise de materiais lignocelulósicos nota-se que a principal dificuldade encontrada no aproveitamento dos hidrolisados é que além da fração hemicelulósica podem ser encontrados outros compostos provenientes do processo de hidrólise tais como ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, ácido fórmico, ácido levulínico, assim como compostos aromáticos derivados da degradação da lignina e dos extrativos da madeira, os quais possuem grande potencial inibitório na atividade fermentativa dos microrganismos. Portanto, é necessária a remoção ou redução de suas concentrações para que os hidrolisados possam ser empregados efetivamente nos processos de bioconversão (PARAJÓ *et al.*, 1998b).

O resíduo sólido do processo de hidrólise é composto por celulose, lignina e uma mínima fração de hemicelulose, podendo ser aproveitado, segundo FUNK

(1975), em diferentes aplicações como produção de papel, aglomerados, alimento animal, carvão ativo e para o processo de gaseificação. A gaseificação é um método de processamento de restos de madeiras. Este método, em vez da queima do resíduo lignocelulósico em caldeiras como se faz atualmente, consiste na produção de gases combustíveis a partir dessa matéria prima, os quais adicionam as turbinas e os geradores das usinas com maior eficiência que o método empregado atualmente. Desse processo resultaria ainda o vapor, que também seria utilizado para movimentar geradores no sistema tradicional. Com isso, o potencial de produção de energia poderia ser dobrado (AGROFOLHA, 2001).

2.2 Resíduos de eucalipto

O Brasil possui a maior área de selva tropical do mundo e conta com aproximadamente 5 milhões de hectares de plantações florestais, que devem ser incrementados nos próximos anos com uma taxa de crescimento de 135 000 ha/ano (FAO, 2000). Segundo relato de FERNSIDE (1998), somente no estado de São Paulo o governo procurou aumentar a área de plantações florestais de 750 000 ha em 1990 para 1,5 à 2,8 milhões de ha em 2005.

Conforme estatísticas da FAO de 2000 o Brasil era considerado o quinto produtor de madeira de uso industrial e o maior produtor de madeiras tropicais em nível mundial. Quase metade de sua produção de madeira é processada para uso industrial destinando-se o restante à elaboração de polpa e papel. O Brasil aproveita uma proporção relativamente elevada de sua produção de madeira, ainda assim, continua a ser um dos dez maiores exportadores de produtos florestais e um dos três maiores produtores e consumidores de lenha do mundo.

Nas últimas décadas no Brasil, o eucalipto vem sendo o gênero florestal mais utilizado para aumentar a área de plantações utilizadas para fins industriais, contribuindo assim para o desenvolvimento vertiginoso das indústrias madeireiras e de polpa e papel. Somente em 2000 forem plantados 2 964 000 ha, o que representa 59,5% da área total de plantações florestais no país (Tabela 1).

Tabela 1- Plantações florestais no Brasil em 2000.

Grupo de espécies	Área plantada		Industrial	Não industrial
	ha	%	%	%
Eucaliptos	2.964.000	59,5	100	-
Seringueira	180.000	3,6	-	100
Teca	13.500	0,3	100	-
Pinhos	1.769.300	35,5	100	-
Outras coníferas	54.000	1,1	100	-
Total	4.981.500	100	-	-

Fonte: FAO (2000)

O eucalipto é uma angiosperma do gênero *Eucalyptus*, abrangendo mais de 600 espécies. A sua distribuição natural ocorre na Austrália, Tasmânia e Indonésia. Foi introduzido em outros continentes, inicialmente como planta ornamental e medicinal, passando posteriormente a ser utilizado para reflorestamento em geral (CÔRREA, 1978).

Dentre as poucas espécies de eucalipto consideradas como excelentes do ponto de vista comercial, o *Eucalyptus grandis* destaca-se por ser a espécie dominante no Brasil. Os projetos de reflorestamento econômicos com esta espécie tiveram início após a introdução do eucalipto da Austrália, por Edmundo Navarro de Andrade, a partir de 1904, para cobrir as necessidades de dormentes das companhias de estradas de ferro (CORRÊA, 1995).

Atualmente sua produtividade se encontra entre as maiores do mundo e os rendimentos em matéria seca são estimados em torno de 50t/ha.ano (EL BASSAM, 1998). As características que tornam esta espécie parte definitiva da produção florestal no Brasil são sua precocidade, produtividade, rentabilidade e qualidade dos produtos finais obtidos (COUTO *et al.*, 1998).

Somente 51,7% da massa seca total do eucalipto é aproveitado pela indústria brasileira, permanecendo o restante no campo na forma de folhas, galhos, copas e madeiras finas que constituem resíduos com grande potencial para serem utilizados em processos biotecnológicos (BRITO *et al.*, 1979, CANETTIERI, 2004).

A composição química (p/p) dos resíduos de eucalipto é de $40,20 \pm 0,6$ % celulose; $15,67 \pm 1,7$ % hemicelulose; $23,44 \pm 1,2$ % lignina insolúvel; $3,46 \pm 0,2$ % lignina solúvel; $26,90 \pm 1,0$ % lignina total; $2,43 \pm 1,0$ % grupos acetila e $1,41 \pm 0,1$ % cinza (CANETTIERI *et al.*, 2002a). Em função da facilidade da hidrólise da fração hemicelulósica, pode-se obter um hidrolisado rico em açúcares fermentescíveis, em particular a xilose (CARVALHO *et al.*, 2005a).

A descoberta de microrganismos capazes de fermentar xilose (ONISHI & SUZUKI, 1966; BARBOSA *et al.*, 1988; SIRISANSANEEYAKUL *et al.*, 1995) propiciou o desenvolvimento de uma série de pesquisas visando o aproveitamento biotecnológico desses resíduos, com a finalidade de obter produtos de elevado valor agregado como butanol, ácido butírico (SADDLER *et al.*, 1983) ácido cítrico (PRATA, 1989), 2,3-butanodiol (PRATA, 1997), proteína microbiana (ALMEIDA e SILVA, 1991, 1996, 2003) e xilitol (FELIPE *et al.*, 1996a).

2.3 XILITOL

2.3.1 Propriedades e Aplicações

O xilitol ($C_5H_{12}O_5$), um álcool pentahidroxilado (pentiol) de massa molar 152,15 g/mol. É um produto intermediário do metabolismo de carboidratos no homem e em animais. Sua concentração no sangue humano varia de 0,03-0,06 mg/100mL (MANZ *et al.*, 1973). É também encontrado em frutas e vegetais (WANG & van EYS, 1981; HYVÖNEN *et al.*, 1982), porém em baixas concentrações, fato que, do ponto de vista econômico, inviabiliza o uso dessas fontes para a sua extração (EMODI, 1978).

Algumas das suas propriedades físico-químicas estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2- Propriedades físico-químicas do xilitol (MANZ *et al.*, 1973, HYVÖNEN *et al.*, 1982, BÄR, 1991).

Fórmula Química	C ₅ H ₁₂ O ₅
Massa Molar [g/mol]	152,15
Sabor	Doce
Odor	Inodoro
Aparência	Pó cristalino, branco.
Ponto de fusão [°C]	92-96
Ponto de ebulição [°C]	216
pH de uma solução a 5%	5-7
Umidade (20 °C, 60%URAr) [%]	Aproximadamente 0,5
Viscosidade a 20 °C [cP]	A 10%:1,03; a 60%: 1,23.
Solubilidade a 30 °C	68g/100g de solução, igual a da sacarose (abaixo dessa temperatura o xilitol é menos solúvel, com o aumento da temperatura o xilitol se torna significativamente mais solúvel que a sacarose).
Densidade [g/cm ³]	A 10%: 1,03; a 60%: 1,23.
Calor de dissolução	-34,8 cal/g (efeito “refrescante”)
Poder adoçante	Igual ao da sacarose, superior ao sorbitol e manitol.
Valor calórico [Kcal/g]	4,06
Índice de refração a 25 °C	A 10%: 1,3471; a 50%: 1,4132.
Estabilidade	Estável a 120 °C e sob as condições normais de processamento de alimentos. A caramelização ocorre se aquecido por vários minutos próximo ao ponto de ebulição.
Higroscopicidade	Em umidade relativa alta o xilitol é mais higroscópico que a sacarose, mas menos que o sorbitol.

A importância econômica e social do xilitol deve-se principalmente a seu potencial como substituto de açúcares convencionais, devido a seu poder adoçante (EMODI, 1978; HYVÖNEN *et al.*, 1982), comparável ao da sacarose e superior ao do sorbitol e manitol (BAR, 1991; WINKELHAUSEN & KUZMANOVA, 1998).

Conforme relatado por MORENO (2002), as moléculas de alimento se dissolvem na saliva para poder penetrar na papila e entrar em contato com os receptores.

Estes enviam impulsos nervosos ao cérebro o qual interpreta os sinais dos receptores nos permitindo sentir os diferentes sabores. Tem-se demonstrado que o receptor do sabor doce é uma proteína helicoidal com a qual substâncias doces interagem. Observa-se também que a característica mínima que os açúcares devem apresentar para serem considerados doces é a presença do grupo glicol. Esta característica é apresentada pelo xilitol.

O xilitol apresenta também propriedade anticariogênica, pelo fato de não ser utilizado pelos microrganismos da flora bucal, em particular pela bactéria *Streptococcus mutans*, e de conseqüentemente evitar a formação de ácidos que atacam o esmalte dos dentes (LINGSTROM *et al.*, 1997; GALES, NGUYEN, 2000). Além da redução de cáries dentárias, o xilitol induz à remineralização do esmalte do dentes, revertendo lesões recém-formadas, uma vez que a composição química da saliva parece ser favoravelmente afetada pelo xilitol, apresentando um significativo aumento de íons, cálcio e fosfato (MAKINEN, 1976).

Na indústria alimentícia o xilitol tem um grande potencial de aplicação. Devido à ausência de grupos aldeídicos e cetônicos em suas moléculas, o xilitol não provoca nos alimentos reações de escurecimento do tipo “Maillard” (MANZ *et al.*, 1973). Sendo assim, ele é apropriado para o processamento, em temperaturas elevadas, de alimentos nos quais estas reações são indesejáveis. Uma vez que o xilitol não é fermentado por leveduras, sua utilização no preparo de xaropes e refrescos é altamente vantajosa, eliminando a necessidade de pasteurização do produto e da adição de conservantes para estoque por 4 ou 5 meses em frascos fechados (MANZ *et al.*, 1973). Por ser muito bem tolerado pelo organismo humano (MAKINEN, 1976), o xilitol é empregado com segurança na área clínica. De fato, esse adoçante tem sido indicado para pacientes com doenças biliares e renais, como também para pessoas obesas, já que contribui muito pouco para a formação de tecidos gordurosos, quando comparado a outros açúcares (BAR, 1991). O xilitol pode ser também eficazmente empregado, no tratamento de outras desordens metabólicas, como a deficiência da enzima glicose-6 fosfato desidrogenase (EMODI, 1978) e na dieta de diabéticos, por não requerer insulina para seu metabolismo (YLIKAHRI, 1979). Segundo MAKINEN (2000), os efeitos clínicos

associados com a administração de xilitol pode ser explicados por uma simples teoria pentiol-hexitol, a qual se baseia no fato de que o metabolismo dos carboidratos que apresentam 6 átomos de carbono em sua estrutura é freqüentemente inibido pelo metabolismo de carboidratos com 5 átomos de carbono.

Tem sido relatado que este poliol previne a redução da densidade dos ossos, bem como seu conteúdo de minerais, cálcio e fósforo, melhorando consideravelmente as propriedades biomecânicas dos ossos (MATTILA *et al.*, 1998a; MATTILA *et al.*; 1998b; MATTILA *et al.*, 1999) pelo que poderia ser utilizado no tratamento de doenças ósseas como a osteoporose.

Vários estudos têm mostrado que o xilitol inibe com efetividade o crescimento das espécies bacterianas *S. pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* que causam a otite média aguda, sendo recomendado seu uso como um tratamento alternativo promissor ao emprego de antibióticos para combater essa doença (UHARI *et al.*, 2000; ERRAMOUPE, HENEMAN, 2000).

O xilitol combinado com glicóis é utilizado no campo da traumatologia para preparar poliésteres ramificados, como por exemplo, o hidroxipropilxilitol, cujas propriedades mecânicas termofísicas são semelhantes às das espumas de poliuretano usadas para imobilização de lesões traumatológicas (SANROMÁN *et al.*, 1991).

No Japão, Alemanha e outros países da Europa, o xilitol foi aceito na nutrição parenteral (TOUSTER, 1974; MAKINEN, 1976) e no preparo de soluções parenterais contendo aminoácidos, pois, ao contrário do que ocorre com a glicose, não reage com aminoácidos (FÖRSTER, 1974).

Existe um número significativo de companhias nos Estados Unidos que se encontram interessadas na produção de xilitol por via biotecnológica em grande escala no futuro, similar interesse se demonstra na Suíça, Finlândia e Alemanha (CORONADO & NÁPOLES 2002).

Tudo isso faz do xilitol um insumo de grande importância nas indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica. Como adoçante, é largamente

empregado na Alemanha e Suíça; no Brasil, é utilizado na formulação de gomas de mascar, pastilhas e creme dental.

2.3.2 Vias de obtenção

O xilitol pode ser extraído das fontes naturais por extração sólido-líquido, porém, devido a sua baixa concentração, na ordem de 900mg/100g, nessas fontes, este processo se torna economicamente inviável (HYVÖNEN *et al.*, 1982).

Via química

O processo tradicional de obtenção de xilitol por via química consiste na hidrogenação de uma solução de xilose de alta pureza, na presença de catalisador Níquel Raney finamente disperso (Figura 3). Este processo é conduzido em reator descontínuo trifásico operando de forma isotérmica e isobárica (MIKKOLA & SALMI, 1999, MIKKOLA *et al.*, 1999).

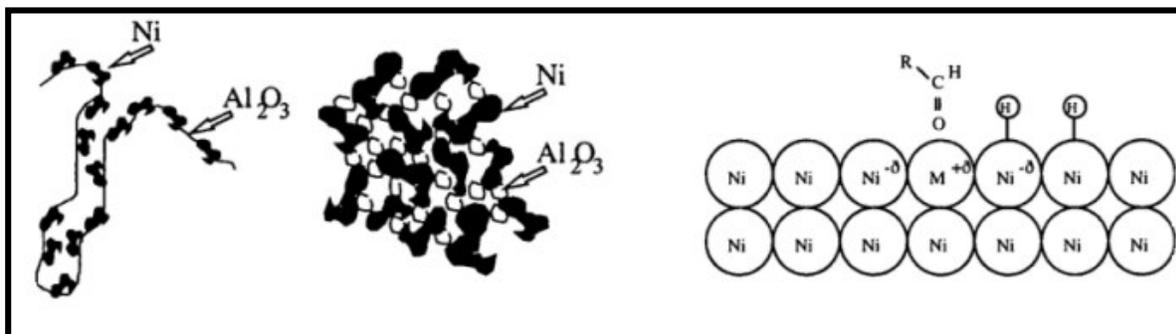


Figura 3- Estrutura do catalisador Níquel Raney e um possível mecanismo de adsorção de monossacarídeos no mesmo (MIKKOLA *et al.*, 1999).

A solução de xilose empregada na produção de xilitol por esta via é obtida da hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos ricos em xilana. Após esta hidrólise, a solução segue várias etapas de purificação (Figura 4), até a transformação química da xilose em uma mistura de xilitol com outros açúcares e polióis (HYVÖNEN *et al.*, 1982). O rendimento e a qualidade do xilitol obtido por esse processo estão

intimamente relacionados com a pureza da solução inicial de xilose. Além disso, são necessárias várias etapas posteriores de purificação de resíduos tóxicos do catalisador, originados durante o processo de hidrogenação (MELAYA & HÄMÄLÄINEN, 1977), o que ocasiona aumento do tempo de processo e encarecimento do produto. Segundo MIKKOLA & SALMI (1999), após vários ciclos de hidrogenação pode-se observar a desativação do catalisador devido ao colapso da estrutura de poros, lixiviação dos promotores (alumina) e acúmulo dos materiais orgânicos sobre a superfície do catalisador. Os materiais orgânicos tidos como tóxicos ao catalisador são provenientes da solução de xilose mal purificada e dos produtos de reações paralelas a formação de xilitol (Figura 5). Estudos empregando tratamento ultra-sônico integrado a hidrogenação catalítica da xilose, têm demonstrado uma notável redução na desativação do catalisador Níquel Raney, o que resulta na estabilidade catalítica do mesmo (MIKKOLA & SALMI, 1999, 2001).

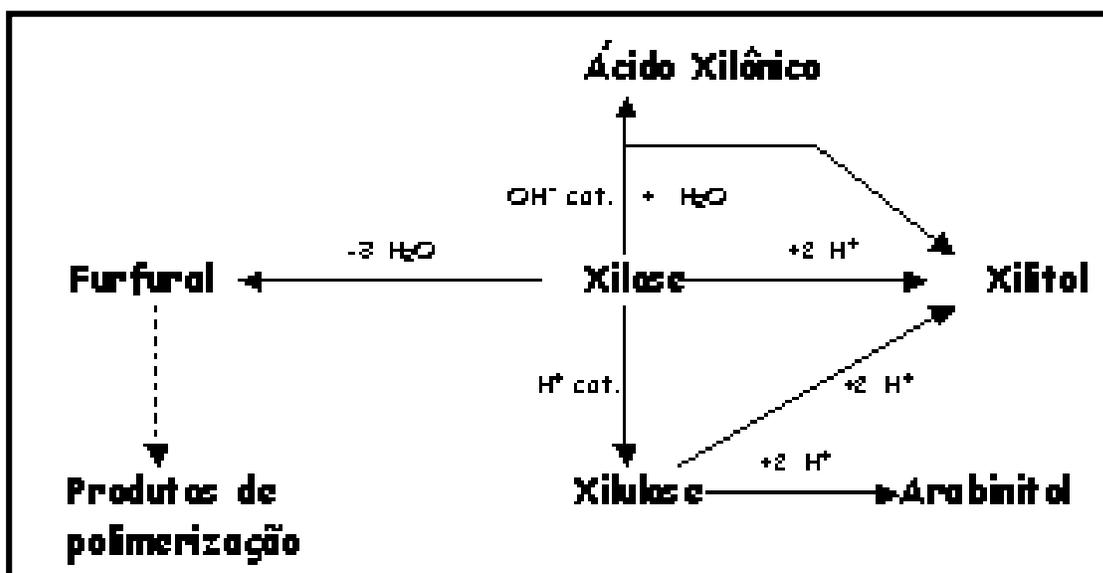


Figura 5- Esquema das reações principal e paralelas na hidrogenação da xilose (MIKKOLA & SALMI, 1999, MIKKOLA *et al.*, 1999).

Após a hidrogenação catalítica da xilose, o material hidrogenado é separado mediante filtração mecânica e separação cromatográfica e, posteriormente, é

realizada a cristalização do xilitol obtido (MELAJA & HÄMÄLÄINEN, 1977; HEIKKILA *et al.*, 1992).

Uma alternativa para a via química é a obtenção biotecnológica de xilitol a qual não requer uma solução de pentose de elevada pureza (CANETTIERI *et al.*, 2002b; CANILHA *et al.*, 2003b, MUSSATTO & ROBERTO, 2003; CARVALHO *et al.*, 2004; FAVERI *et al.*, 2004). Ademais, o processo biotecnológico opera em condições mais brandas de pressão e temperatura que o processo químico, e seu emprego pode reduzir os altos níveis de poluição ambiental bem como os gastos relacionados com o tratamento de resíduos produzidos pela via química (WINKELHAUSEN & KUSMANOVA, 1998).

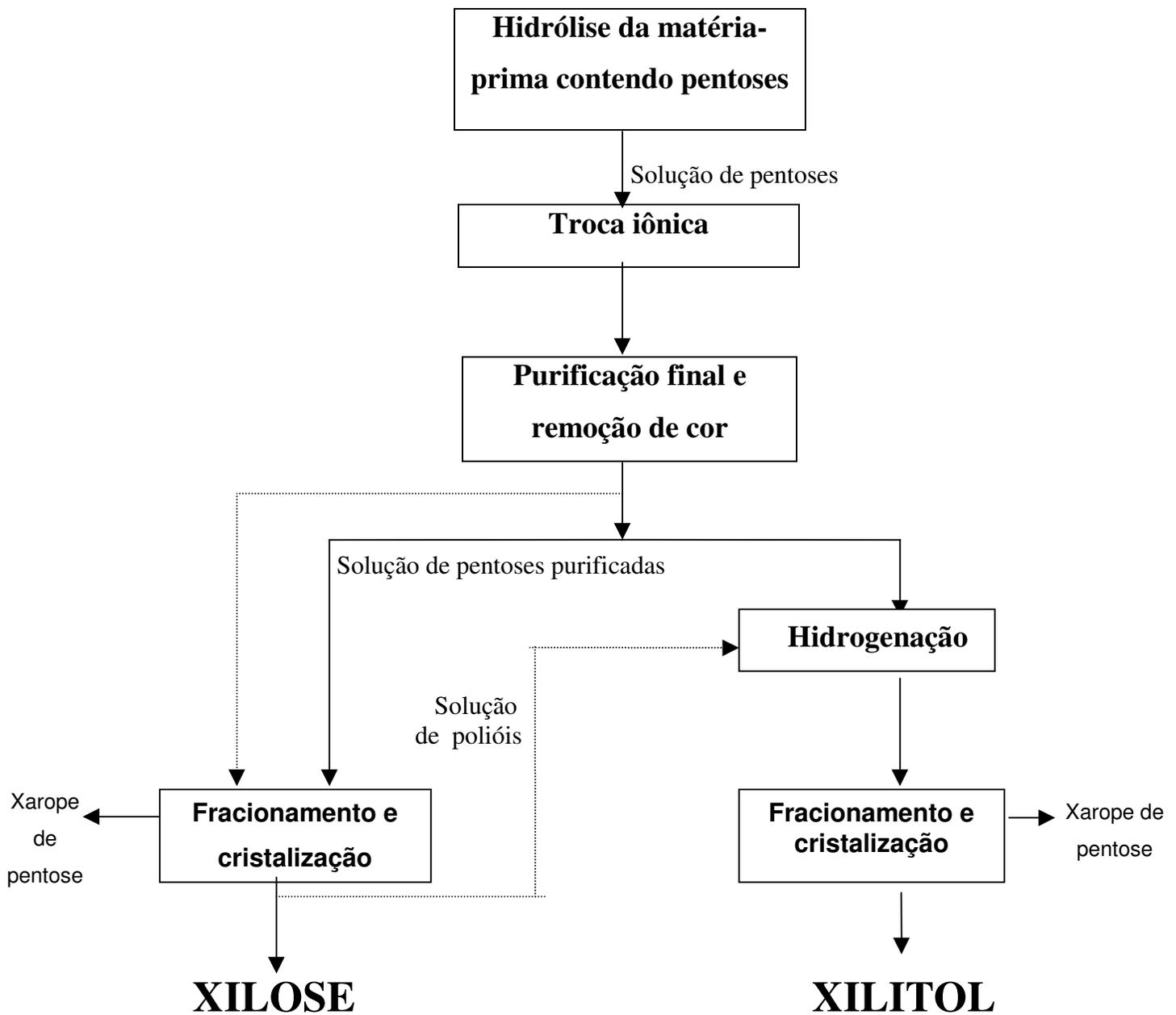


FIGURA 4– Produção de xilitol e xilose (MELAJA & HÄMÄLÄINEN, 1977; HYVÖNEN et al., 1982).

Via biotecnológica

O metabolismo de D-xilose em xilitol ocorre em vários microrganismos, porém, a maioria das pesquisas sobre a obtenção biotecnológica de xilitol é realizada com leveduras, embora em alguns trabalhos sejam empregados fungos filamentosos e bactérias (FELIPE, 2004). Segundo LIMA & BERLINCK (2003), dentre as leveduras, que são fungos amorfos, várias espécies foram identificadas como produtoras de xilitol, destacando-se as do gênero *Candida*, pela maior eficiência de conversão (Tabela 3).

Tabela 3- Leveduras produtoras de xilitol – os códigos indicam diferentes linhagens dos fungos, e a produção é por litro de meio de cultura (LIMA & BERLINCK, 2003).

Leveduras	Concentrações de Xilitol (g/L)
<i>Candida boidinii</i> (NRRL Y - 17213)	2,9
<i>Candida guilliermondii</i> (FTI – 20037)	37
<i>Candida intermedia</i> (RJ – 248)	5,7
<i>Candida mogii</i> (ATCC 18364)	31
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 34078)	20
<i>Candida pseudotropicalis</i> (IZ-431)	4,3
<i>Candida tropicalis</i>	2,1
<i>Candida tropicalis</i> (HXP 2)	4,8
<i>Candida tropicalis</i> (1004)	17
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 7349)	20
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 20240)	5,5
<i>Candida utilis</i> (ATCC 22023)	1,8
<i>Candida utilis</i> (C – 40)	3
<i>Debaryomyces hansenii</i> (C – 98, M – 21)	0,8
<i>Hansenula anomala</i> (IZ – 1420)	6,1
<i>Kluyveromyces fragilis</i> (FTI – 20066)	4,6
<i>Kluyveromyces marxianus</i> (IZ – 1821)	6,1
<i>Pichia (Hansenula) anomala</i> (NRRL Y – 366)	2
<i>Pachysolen tannophilus</i> (NRRL Y – 2460)	2,2
<i>Saccharomyces</i> (SC – 13)	0,7
<i>Saccharomyces</i> (SC – 37)	2,3
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (16979)	0,2

Em bactérias, D-xilose é inicialmente convertida em D-xilulose pela xilose isomerase em um único passo, enquanto em leveduras e fungos filamentosos, D-xilose é metabolizada principalmente por dois estágios envolvendo oxidação e redução. Neste caso, ocorre redução de xilose em xilitol por uma xilose redutase (XR) dependente de NAD(P)H e uma oxidação de xilitol em xilulose pela xilitol desidrogenase (XD) dependente de NAD⁺. Xilulose é então fosforilada pela xilulose quinase em D-xilulose-5-fosfato, a qual pode ser catabolizada pelas vias pentose fosfato, Embden-Meyerhof-Parnas ou Fosfocetolase. Um desbalanço do sistema redox NAD⁺:NADH no metabolismo de xilose de leveduras é evitado pela redução de xilose em xilitol com participação de NAD(P)H. Em microrganismos fermentadores de xilose, a xilose redutase geralmente usa ambos NADPH e NADH, enquanto a xilitol desidrogenase é principalmente dependente de NAD⁺ (FELIPE, 2004).

Dentre os fatores que regulam o acúmulo e a excreção do xilitol, destaca-se a disponibilidade de oxigênio (O₂). Segundo SKOOG & HAHN-HÄGERDAL (1988) as células requerem oxigênio para sintetizar esteróis, ácidos graxos insaturados e ácidos nicotínicos necessários para realizar as funções de transporte de açúcares através da membrana celular. A assimilação de xilose é favorecida em cultivos conduzidos sob condições aeróbias, indicando com isto que o oxigênio induz ou ativa o sistema de transporte desta pentose (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 1994).

Conforme relatado por NOLLEAU *et al.* (1995), 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. A disponibilidade de oxigênio no meio de fermentação direciona o metabolismo da xilose em leveduras, para o processo respiratório ou fermentativo (VANDESKA & KUSMANOVA, 1995a). NOLLEAU *et al.* (1995) relatam que, este comportamento metabólico deve-se a que, 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 regenerado na cadeia respiratória, onde o oxigênio participa como acceptor final de elétrons.

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 (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-Meyerhof-Parnas, resultando na formação de piruvato. Em consequência, menos xilitol é acumulado no meio. Laplace *et al.* (1991) citados por WINKELHAUSEN & KUSMANOVA (1998), têm sugerido que na presença de oxigênio o piruvato é oxidado completamente através do CAT, resultando em um aumento da massa celular.

Têm sido detectadas a presença, em pequenas quantidades, de etanol, glicerol e arabitol, dentre outros compostos, durante a bioconversão de xilose em xilitol por algumas espécies de leveduras. Isto, segundo NOLLEAU *et al.* (1995), pode ser devido ao fato de que em condições limitadas de oxigênio a célula regenera o NADH através da formação destes compostos. A via metabólica de obtenção de xilitol está esquematizada na Figura 6.

Nos últimos anos têm sido desenvolvidas inúmeras pesquisas com a finalidade de conseguir a melhoria do processo microbiológico de obtenção de xilitol a partir do aumento da produtividade e/ou rendimento deste processo. Estes trabalhos aplicam parâmetros cinéticos e de engenharia relacionados aos processos fermentativos tais como o tipo de biorreator utilizado e a forma de condução do bioprocessamento.

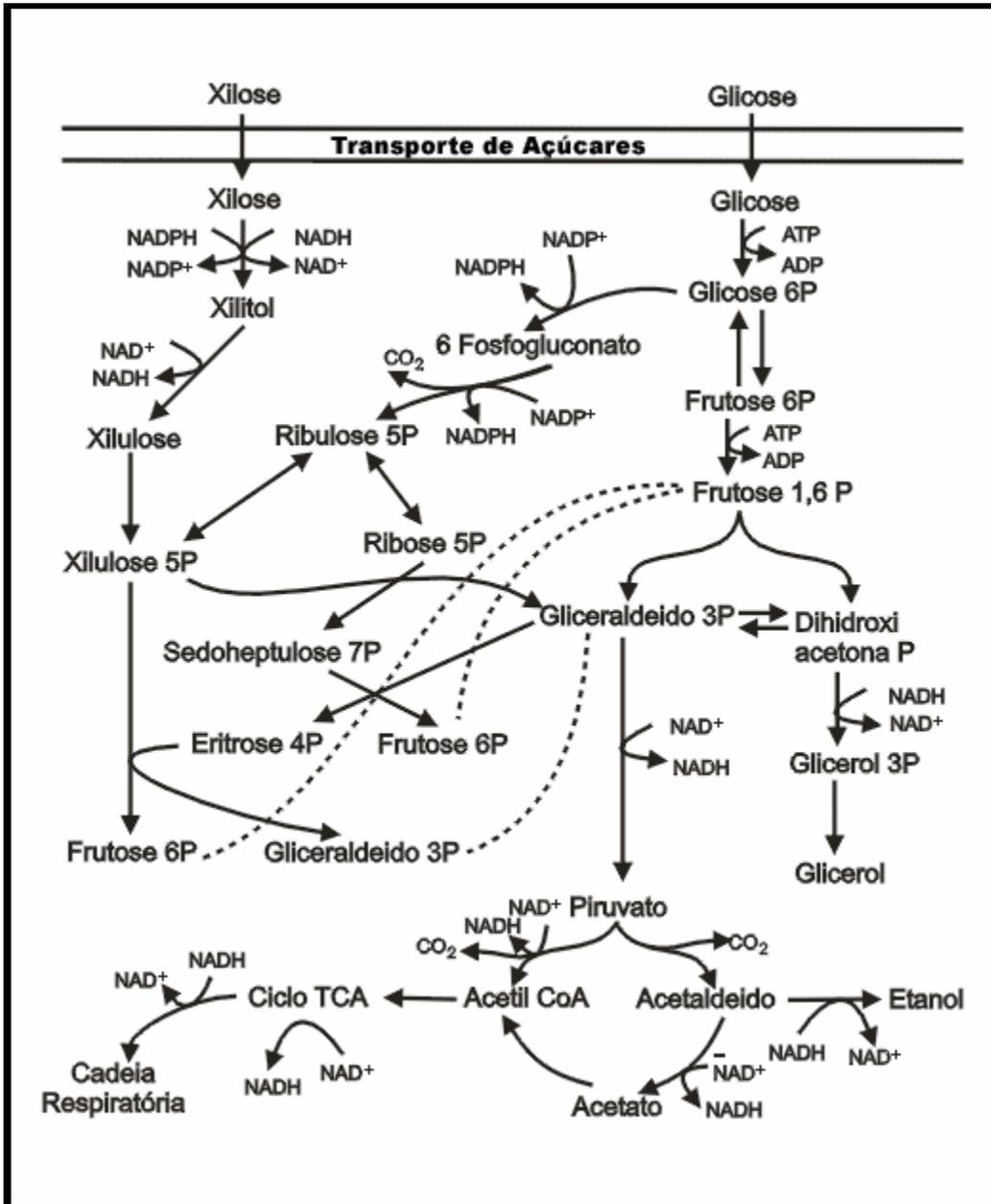


Figura 6- Metabolismo de xilose e glicose em leveduras fermentadoras de xilose (HAHN-HÄGERDAL et al., 1994).

As pesquisas sobre o bioprocesso de obtenção do xilitol estão sendo desenvolvidas utilizando diferentes matérias primas (Tabela 4) e concentram-se também nos diversos fatores que influenciam a bioconversão de xilose em xilitol tais como a concentração inicial de xilose (MEYRAL *et al.*, 1991; NOLLEAU *et al.*, 1993), a presença de glicose no meio de fermentação (BICHO *et al.*, 1988, SUGAI & DELGENES, 1995, GÍRIO *et al.*, 2000, SILVA *et al.*, 2004a), a presença de arabinose (KONDARZEWSKY *et al.*, 2004), a fonte de nitrogênio (BARBOSA *et al.*, 1988), o pH (SLININGER *et al.*, 1990, FELIPE *et al.*, 1997b, RODRIGUES *et al.*, 2003), a temperatura (BARBOSA *et al.*, 1988, CONVERTI *et al.*, 2001) a disponibilidade de oxigênio (WINKELHAUSEN *et al.*, 1996; ACOSTA *et al.*, 2000), a concentração de células no inóculo (PARAJÓ *et al.*, 1996c; ROBERTO *et al.*, 1996a, FELIPE *et al.*, 1997a) e a presença de compostos tóxicos formados durante o processo de hidrólise dos materiais lignocelulósicos (CLARK & MACKIE, 1984, MUSSATO & ROBERTO, 2004a).

Tabela 4- Utilização de hidrolisados hemicelulósicos de diferentes matérias primas para a produção biotecnológica de xilitol.

Matéria Prima	Microrganismo	Biorreator	Modo de Operação	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/L.h)	Referência
Cavacos de eucalipto	<i>Candida guilliermondii</i> (FTI – 20037)	FE	Descontínuo	0,76	0,68	Canilha <i>et al.</i> (2003a)
Bagaço de cana de açúcar	<i>Candida guilliermondii</i> (FTI – 20037)	STR*	Descontínuo	0,58	0,39	Carvalho <i>et al.</i> (2003)
Bagaço de cana de açúcar	<i>Candida guilliermondii</i> (FTI – 20037)	STR	Contínuo	0,70	0,70	Martinez <i>et al.</i> (2003)
Palha de arroz	<i>Debaryomyces hansenii</i> (NRRL Y-7426)	STR	Descontínuo	0,73	0,70	Faveri <i>et al.</i> (2004)
Palha de arroz	<i>Candida guilliermondii</i> (FTI – 20037)	STR	Descontínuo	0,84	0,17	Mussato, Roberto (2003)
Palha de trigo	<i>Candida guilliermondii</i> (FTI – 20037)	STR	Descontínuo	0,90	0,50	Canilha <i>et al.</i> (2003b)

$Y_{P/S}$: Fator de conversão de xilose em xilitol, Q_P : Produtividade volumétrica de xilitol, FE: Frascos Erlenmeyer, STR: Biorreator agitado mecanicamente, * :Célula Imobilizada.

2.4 Inibidores do Metabolismo Microbiano

O processo fermentativo de produção de xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos apresenta ainda algumas limitações, principalmente quanto a produtividade, devido principalmente, à presença de compostos inibidores do metabolismo microbiano no hidrolisado hemicelulósico usado como substrato. Estes incluem o furfural e o hidroximetilfurfural (produtos da degradação da hemicelulose), os compostos fenólicos e aromáticos (produtos da degradação da lignina), o ácido acético (originado de radicais acetila presentes em algumas hemiceluloses) e os metais pesados tais como, cromo, cobre, níquel e ferro provenientes do equipamento de hidrólise. Vários destes inibidores podem estar presentes no hidrolisado, dependendo da fonte de matéria-prima e das condições da hidrólise (LEE *et al.*, 1983; HEIKKILA *et al.*, 1992; LOHMEIR-VOGER *et al.*, 1998).

O efeito destes compostos na formação de xilitol por leveduras estão relacionados com a sua concentração no meio e com os parâmetros fermentativos associados à produção de xilitol, principalmente o pH e a aeração (PARAJÓ *et al.*, 1998).

Ácido Acético

O ácido acético é o principal derivado dos grupos acetila liberados das xilanas acetiladas nos hidrolisados hemicelulósicos. O modo de ação nas células de leveduras pode ser pela redução do pH intracelular, resultando em diminuição do crescimento e do metabolismo (LOHMEIR-VOGER *et al.*, 1998).

A toxicidade do ácido acético na conversão de xilose em xilitol tem sido constatada quando este está presente em concentrações apreciáveis (aproximadamente 3g/L) (FELIPE *et al.*, 1995). O ácido acético é considerado como um potente inibidor do metabolismo da xilose em leveduras e seu efeito é função da sua concentração na forma não ionizada (pKa 4,75) e, portanto, depende do pH do meio de fermentação. No pH ótimo para fermentação por

leveduras (pH 4,0 – 5,0) este ácido encontra-se em maior proporção sob a forma não ionizada e difunde-se livremente para dentro do citoplasma, onde dissocia-se causando um decréscimo no pH intracelular. As leveduras são capazes de regular seu pH interno por meio de bomba de prótons mediante a ATPase situada no plasma da membrana. Quando o pH intracelular diminui, aumenta a atividade da ATPase resultando em uma prejudicial dissipação de ATP (KUSUMEGI *et al.*, 1998). Acima de uma certa concentração (3g/L) de ácido acético, o catabolismo celular não pode gerar suficiente ATP, portanto, o gradiente de prótons na membrana não é mantido, a produção de energia é desajustada e o transporte de vários nutrientes é afetado (HERRERO *et al.*, 1985).

FELIPE (1994) observou que nenhuma bioconversão (xilose à xilitol) ocorreu quando a levedura *Candida guilliermondii* cresceu em hidrolisado hemicelulósico de cana-de-açúcar contendo ácido acético em concentrações maiores que 5g/L e pH < 4,50.

Em meio quimicamente definido (meio sintético) o ácido acético favorece a produção de biomassa (na levedura *Debaryomyces hansenii* CCMI 941) em concentrações inferiores a 6,0 g/L (GÍRIO *et al.*, 2005).

Segundo estudos realizados por SILVA (2004b), o efeito inibitório do ácido acético sobre a bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* é dependente da fase de crescimento da levedura, sendo este mais marcante quando o ácido se encontra em maior concentração no meio após 12 horas de fermentação. Segundo estes autores este efeito pode ser potencializado pela presença de outros compostos tóxicos no hidrolisado, tais como furfural, hidroximetilfurfural e fenóis.

Lima *et al.* (2004) estudando o efeito do ácido acético nas atividades das enzimas xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XRH) de *Candida guilliermondii*, concluíram que este ácido não interfere na formação de xilitol desde que o aumento na atividade da enzima xilose redutase seja proporcional para a atividade da enzima xilitol desidrogenase.

Furfural e Hidroximetilfurfural

O furfural e o hidroximetilfurfural são os principais produtos formados pela desidratação das pentoses e hexoses, respectivamente. Em estudos realizados por SANCHES & BAUTISTA (1988) o furfural e o hidroximetilfurfural provocaram retardamento no processo fermentativo no início da fermentação e inibiram o crescimento da levedura *Candida guilliermondii*. Estes efeitos foram provavelmente causados pela ação destes compostos sobre as enzimas glicolíticas triose-fosfatodesidrogenase e a álcool desidrogenase. A inibição pelo furfural foi observada para concentrações maiores de 1g/L e a inibição pelo hidroximetilfurfural para concentrações maiores que 1,5g/L..

Em estudos realizados com *Pichia stipis*, o efeito tóxico do furfural foi relacionado à inibição na respiração e na fosforilação oxidativa (PARAJÓ *et al.*, 1998). WEIGERT *et al.* (1988) atribuíram a inibição pelo furfural à sua interferência direta no transporte de elétrons na cadeia de transporte na mitocôndria. Soboleya (1974) citado por WEIGERT *et al.* (1988), constatou efeito inibitório do furfural sobre a síntese de citocromos.

Na fermentação alcoólica empregando *Saccharomyces cerevisiae*, AZHAR *et al.* (1981), verificaram a inibição da multiplicação da levedura, em presença de furfural, na concentração de 3,0g/L.

Em estudos realizados por GUTIÉRREZ *et al.* (2002), em grupos de bactérias etanologênicas cultivadas em Agar, foi verificado que o furfural em concentrações superiores a 10mM (10 micromolar) diminui a velocidade de formação de etanol, mas não afeta a produção final deste álcool.

Compostos Derivados da Degradação da Lignina

Durante a hidrólise ácida, uma pequena fração da lignina é degradada, resultando na liberação de compostos aromáticos. Destes, os compostos fenólicos de baixa massa molecular têm sido considerados os de maior força inibitória (CLARK & MACKIE, 1984). Segundo VILLA *et al.* (1998) os compostos fenólicos presentes no hidrolisado, embora em baixas concentrações, inibem a conversão de

xilose em xilitol pela levedura *Candida guilliermondii*. Concentrações maiores que 0,1g/L mostraram efeito inibitório na velocidade de consumo da xilose, crescimento celular e na produção de xilitol.

GÍRIO *et al.* (2005) testando vários compostos fenólicos, constataram que, em meio sintético estes compostos diminuíram fortemente a velocidade específica de crescimento da levedura *Debaryomyces hansenii* CCMI 941.

PARAJÓ *et al.* (1998) relataram que a maioria dos produtos da degradação da lignina são mais tóxicos que o furfural e o hidroximetilfurfural e apresentam uma alta potencialidade inibitória em baixas concentrações.

Em estudos realizados por FELIPE *et al.* (1999), sobre efeito do fenol na bioconversão de xilose à xilitol por *Candida guilliermondii* cultivada em meio sintético, foi constatado que a exposição da cultura ao fenol inibiu esta bioconversão. Em meio sem fenol, 99% da xilose foi consumida pela levedura (com 48h de fermentação), ao passo que, com 0,05 g/L de fenol, o consumo foi reduzido de 16%. Foram observadas no cultivo em presença de fenol, redução na concentração celular, alterações morfológicas e perda da viabilidade celular. Estes autores observaram também que o máximo fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S} = 0,68$ g/g) foi obtido no meio sem fenol. Porém, no meio com fenol (0,05 g/L) houve redução deste fator de rendimento em 76%.

Cátions Metálicos

Cátions metálicos também influenciam a atividade das enzimas que participam do metabolismo da xilose. Estudos realizados por GIRIO *et al.* (1996) indicaram que Ca^{2+} , Mg^{2+} e Mn^{2+} não afetam a atividade da xilitol desidrogenase; no entanto, esta enzima pode ser fortemente inibida por Zn^{2+} , Cd^{2+} e Co^{2+} .

WATSON *et al.* (1984) estudaram os efeitos de íons sobre o crescimento celular de *Pachysolen tannophilus*, para a produção de xilitol e constataram que os íons Cu^{2+} e Cr^{3+} nas concentrações de até 0,004 e 0,10g/L respectivamente não afetaram significativamente a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), mas a presença de íons Ni^{2+} na concentração de 0,10g/L resultou na redução de

60% no valor deste parâmetro.

2.5 Tratamentos dos Hidrolisados Hemicelulósicos

Vários tratamentos têm sido utilizados a fim de melhorar o potencial dos hidrolisados hemicelulósicos para serem utilizados em processos de bioconversão, através da remoção ou redução das concentrações dos compostos tóxicos aos microrganismos. Segundo o princípio empregado para a separação dos compostos inibidores, estes tratamentos podem ser agrupados em três classes principais:

Tratamentos físicos:

- Troca iônica (TRAN & CHAMBERS, 1985; FRAZER & MacCASKEY, 1989; DOMINGUEZ *et al.*, 1996; NÁPOLES *et al.*, 1998; CARVALHO *et al.*, 2002; CANILHA *et al.*, 2003a).
- Adsorção em carvão ativo (FRAZER & MacCASKEY, 1989; MARTON *et al.*, 2003; MUSSATTO & ROBERTO, 2004b; CARVALHO 2005b).
- Extração com solventes orgânicos (FRAZER & MacCASKEY, 1989; PARAJÓ *et al.*, 1997a; CRUZ *et al.*, 1999).
- Extração em corrente de vapor (Beck, 1986; citado por PARAJÓ *et al.*, 1998 b; CONVERTI *et al.*, 2000).
- Tratamento magnético (ACEA, 2002).

Tratamentos químicos:

- Ajuste de pH com álcalis (TRAN, CHAMBERS, 1985; FRAZER & MacCASKEY, 1989; DOMINGUEZ *et al.*, 1996; SILVA *et al.*, 1998).
- Alteração de pH com álcalis e ácidos (TRAN & CHAMBERS, 1985; AMARTEY & JEFRIES, 1996; ROBERTO *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 1998).
- Adição de substâncias redutoras (sulfitação) (PARAJÓ *et al.*, 1997b).
- Purificação mediante corrente de ozônio (NARANJO *et al.*, 2002).

Tratamentos biológicos:

- Desintoxicação utilizando fungos e leveduras (SCHNEIDER, 1996; PALQMVIST *et al.*, 1997).

Devido à 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 dos processos de bioconversão. A literatura especializada relata o uso de diferentes alternativas a estas técnicas, dentre as quais podem ser citado o uso de cepas mutantes (MOHANDAS *et al.*, 1995), adaptação das leveduras aos hidrolisados (FELIPE *et al.*, 1996b; SILVA & ROBERTO, 2001), reutilização de células (SENE *et al.*, 1998) assim como o uso combinado dos tratamentos físicos, químicos e biológicos, sendo a alteração de pH combinado com a adsorção em carvão ativo um dos procedimentos mais utilizados para desintoxicar os hidrolisados (PARAJÓ *et al.*, 1996a; ALVES, 1997; FRAZER & MacCASKEY, 1989; PARAJÓ *et al.*, 1997b; DOMINGUEZ *et al.*, 1996, MUSSATTO & ROBERTO, 2004a).

2.5.1 Alteração do pH

O tratamento do hidrolisado por ajuste de pH consiste na utilização de álcalis para a elevação deste, inicialmente ácido, a valores apropriados para a atividade microbiana.

Foi constatado que a elevação do pH resulta na precipitação de componentes tóxicos como íons de metais pesados, acetatos, taninos, terpenos e compostos fenólicos (LEE & MacCASKEY, 1983; FRAZER & MacCASKEY, 1989). Segundo Leonard, Hajny (1945), citados por PARAJÓ *et al.* (1998b), os álcalis mais adequados para efetuar este tratamento são os hidróxidos de bário, cálcio, sódio amônio. Entretanto, foram desenvolvidos vários trabalhos usando outros álcalis, dentre eles o óxido de cálcio (ROBERTO *et al.*, 1991), o carbonato de magnésio (PARAJÓ *et al.*, 1996a).

A influência do tratamento do hidrolisado pela elevação do pH com

diferentes álcalis sobre o consumo de xilose por *C. guilliermondii* foi verificada por ROBERTO *et al.* (1991). Esses autores constataram que, com a utilização de CaO e Ca(OH)₂, o consumo de xilose foi de 20% e 12%, respectivamente, enquanto que elevando o pH com KOH a levedura não foi capaz de assimilar essa pentose.

Vários estudos mostraram que o tratamento por elevação do pH fornece hidrolisados pouco susceptíveis à fermentação, obtendo-se baixa ou nenhuma eficiência de bioconversão (TRAN & CHAMBERS, 1985; FRAZER & MacCASKEY, 1989; ROBERTO *et al.*, 1991).

O tratamento baseado na alteração de pH com álcalis e ácidos consiste da elevação do pH inicial do hidrolisado com o uso de um álcali seguido da redução deste pela adição de um ácido, até o pH ótimo de fermentação.

Este tratamento tem sido proposto como um método para a desintoxicação dos hidrolisados devido sua eficiência para remover o mesmo tipo de composto que a elevação do pH. Porém tem um marcado efeito benéfico devido a precipitação de compostos aromáticos de baixa massa molecular e à conversão de furfural em álcool furfurílico (TRAN & CHAMBERS, 1985; Strickland, Beck, 1984, citados por ROBERTO *et al.*, 1991).

No entanto, este tratamento pode provocar degradação parcial dos açúcares. AMARTEY & JEFFRIES (1996) relataram perdas de glicose (14%), xilose (4%) e arabinose (8%) após o tratamento de hidrolisados de espigas de milho.

2.5.2 Tratamento com Adsorventes

Quando se mistura um sólido finamente dividido em uma solução diluída corada, observa-se que a intensidade da coloração decresce pronunciadamente. Expondo um sólido finamente dividido a um gás a baixa pressão, esta pressão decresce. Nestas situações o corante ou o gás são adsorvidos sobre a superfície do sólido. A intensidade do efeito depende da temperatura, da natureza da substância adsorvida (o adsorvato), da natureza e estado de agregação do adsorvente (o sólido finamente dividido) e da concentração do corante ou da

pressão do gás (CASTELLAN, 1999).

Se entre o adsorvato e a superfície do adsorvente agirem apenas forças de van der Waals, a adsorção é denominada física ou de van der Waals. As moléculas encontram-se fracamente ligadas à superfície e os calores de adsorção são baixos. O aumento da temperatura produz uma diminuição notável na quantidade adsorvida. Ao contrário, quando as moléculas adsorvidas reagem quimicamente com a superfície, o fenômeno é denominado de adsorção química. Como na adsorção química ligações são rompidas e formadas, o calor de adsorção é da mesma ordem dos calores de reação química (CASTELLAN, 1999).

Baseado nestas propriedades dos materiais adsorventes tem-se estudado a remoção de compostos indesejáveis em diferentes soluções: soluções açucaradas coradas utilizando resina adsorvente (PUROLITE, 1998), óleo de oliva dissolvido em n-hexano utilizando terra diatomácea (RIBEIRO *et al.*, 2001) e hidrolisados hemicelulósicos utilizando carvão ativo (MUSSATTO & ROBERTO, 2004a,b).

Carvão Ativo

O tratamento de hidrolisados hemicelulósicos utilizando carvão ativo baseia-se na capacidade deste material poroso, de origem natural, de adsorver sobre a superfície diferentes tipos de moléculas, as quais são retidas na superfície do carvão através de interações físicas fracas denominadas de van der Waals. Estas interações são resultantes de uma atração intermolecular de tal modo que seu potencial é, basicamente, uma função da área superficial do material. Dentre vários materiais comumente usados em processos de adsorção física o carvão ativo apresenta a maior área superficial, podendo variar entre 600 e 1600 m²/g, dependendo da matéria prima empregada para sua fabricação (CONSIDINE, 1974).

O carvão ativo é um material orgânico escuro (preto), inodoro que queima sem chama. É um resíduo caracterizado por se constituir de um material altamente poroso, obtido por carbonização de produtos ou substâncias orgânicas tratadas por processos que lhe conferem elevado poder adsorvente, capaz de remover com

elevada eficiência, uma grande quantidade de compostos (NAMASIVAYAM *et al.*, 1997).

Geralmente, o carvão ativo pode ser obtido em forma de pó, granulado, esférico e pastilhas. Cerca de 55% dos carvões ativos são produzidos em forma de pó, 35% granular, e 10% compreende as formas restantes (esférico e pastilhas). Também, cerca de 80% da produção total de carvão ativo é utilizada em aplicações na fase líquida, e 20% em aplicações na fase gasosa (SWIATKOWSKI, 1998).

O carvão ativo pode ser obtido a partir de matéria-prima vegetal (pinus, acácia, pinho, eucalipto, cascas de côco, palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar) ou mineral (hulha e antracito), porém, na prática as principais matérias-primas usadas incluem a madeira, a hulha, e a casca de côco (AHMEDNA *et al.*, 2000b). A escolha da matéria prima deve ser feita de forma que se tenha alto teor de carbono e baixo conteúdo de compostos inorgânicos. Também deve ser levados em conta seu custo, disponibilidade e qualidade (SWIATKOWSKI, 1998). O tipo de matéria-prima, as substâncias utilizadas e as temperaturas de carbonização e ativação são de grande importância na preparação de carvões ativos, em relação a sua estrutura porosa. Os poros podem ser constituídos por fissuras, canais e espaçamentos maiores, podendo ser divididos em três classes básicas: microporos, mesoporos e macroporos. Uma representação esquemática destes tipos de poros é mostrada na Figura 7.

De acordo com SWIATKOWSKI (1998), os poros do carvão ativo podem ser classificados como: microporos (poros < 2nm), mesoporos (poros entre 2 e 50 nm), e macroporos (poros > 50nm). Dentre estes, os microporos são os que apresentam maior significância para o processo de adsorção, uma vez que apresentam uma área superficial específica e um volume específico muito grande, pois compreendem a maior parte da área superficial total do carvão ativo. A presença de poros de vários tamanhos na estrutura do carvão ativo é de grande importância, uma vez que poros de tamanho pequeno não são capazes de adsorver moléculas de tamanho grande, e poros de tamanho grande também não são capazes de adsorver moléculas de tamanho pequeno (AHMEDNA *et al.*, 2000a). Além disto, carvões ativos com alta porcentagem de microporos, tendem a adsorver

compostos de baixa massa molecular. Quando a porcentagem de microporos não é tão alta, o carvão pode adsorver compostos de tamanhos variados, com diferentes pesos moleculares.

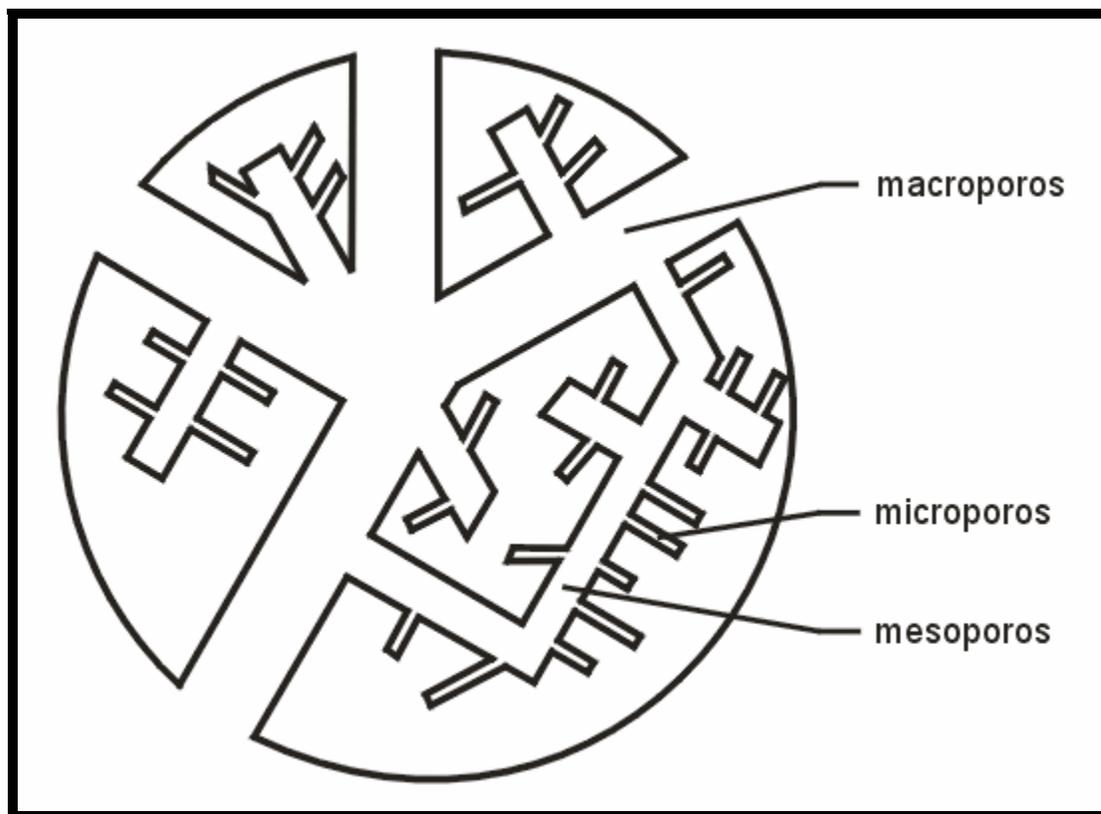


Figura 7- Representação Esquemática de diferentes tipos de poros em uma partícula de carvão ativo (SWIATKOWSI, 1998).

Apesar da estrutura porosa do carvão ativo ser um dos principais fatores determinantes da sua capacidade de adsorção, esta também é influenciada pelo processo de ativação a que o carvão foi submetido, pela sua granulometria, área superficial, densidade, pH, teor de cinzas, estrutura interna dos poros, e pela presença de grupos funcionais em sua superfície, como grupos carboxila, fenólicos carbonilas, lactonas, anidridos e peróxidos cíclicos (AHMEDNA *et al.*, 2000a,b; COUTINHO *et al.*, 2000). De acordo com estes autores, a carga elétrica destes grupos presentes na superfície do carvão ativo, pode aumentar ou impedir a adsorção de compostos. Se o adsorvato tem a mesma carga eletrostática que a

superfície do carvão, ocorrerá repulsão, inibindo desta forma o processo de adsorção. Porém, substâncias com cargas opostas a da superfície do carvão, serão adsorvidas em sua superfície.

Normalmente os carvões ativos apresentam uma grande área superficial interna, uma porosidade altamente desenvolvida, um alto grau de reatividade superficial, e conseqüentemente uma grande capacidade de adsorção de compostos químicos presentes em líquidos e gases (SWIATKOWSKI, 1998; COUTINHO *et al.*, 2000). Estas características fazem do carvão ativo de origem vegetal ou mineral, uma matéria-prima importante no tratamento de hidrolisados hemicelulósicos.

Segundo GINORIS (2001), o tratamento dos hidrolisados por adsorção em carvão ativo constitui um dos métodos mais econômicos para reduzir as concentrações de compostos tóxicos presentes nos hidrolisados.

Estudos realizados por MARTON *et al.* (2003), avaliando diferentes marcas de carvão ativo no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, verificaram que a remoção de compostos tóxicos (ácido acético, fenóis, furfural e 5-hidroximetilfurfural) presentes neste hidrolisado, não apresentou diferenças significativas com a variação das marcas de carvão. Porém, o mesmo não ocorreu quanto à remoção de D-xilose, pois a utilização do carvão ativo Synth resultou na maior remoção desta pentose (18,83%). A perda de D-xilose no tratamento do hidrolisado é indesejável porque este açúcar é o precursor da formação de xilitol.

Dentre as principais variáveis que influenciam o processo de adsorção com carvão ativo, incluem-se o pH, a temperatura, o tempo de contato e a concentração de carvão ativo empregada (MUSSATTO, ROBERTO, 2004a). GINORIS (2001), após fermentar o hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, tratado com carvão ativado em diferentes condições de adsorção, verificou que o melhor fator de conversão de xilose em xilitol (0,56 g/g) foi alcançado no hidrolisado concentrado 4,5 vezes, previamente tratado pela elevação de seu pH para 3,5, adsorção em 2,4% de carvão ativo a 30^oC por 34,5 minutos. MARTON *et al.* (2003), observaram que as condições de adsorção determinadas pelos parâmetros temperatura, tempo

de contato, agitação, pH e concentração de carvão, interferiram de forma diferenciada na remoção de compostos tóxicos presentes no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Porém, somente o parâmetro concentração de carvão (%) apresentou efeito significativo positivo na remoção dos compostos avaliados neste hidrolisado.

Terra Diatomácea

Terra diatomácea é um sedimento amorfo, originado a partir de carapaças de organismos unicelulares vegetais tais como algas microscópicas aquáticas, marinhas e lacustres, normalmente denominada diatomita. Por apresentarem natureza silicosa, as frústulas desenvolvem-se indefinidamente nas camadas geológicas da crosta terrestre (SOUSA *et al.*, 2003). Detalhes morfológicos do material podem ser observados na Figura 8.

Segundo AGUIAR *et al.* (2002), a terra diatomácea é constituída em sua maior parte por aluminossilicato, possibilitando o emprego da mesma na remoção de metais pesados como, por exemplo, o chumbo presente em efluentes industriais.

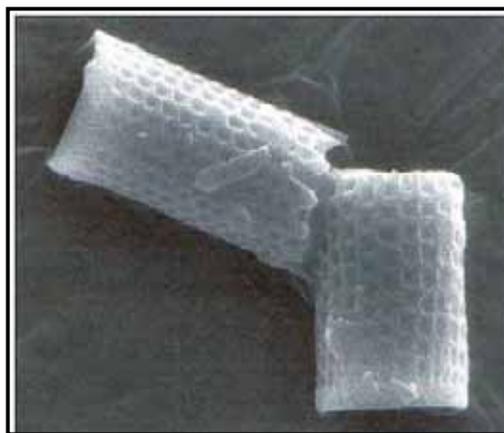


Figura 8- Detalhes morfológicos do material diatomáceo (SOUSA *et al.*, 2003).

Os resultados da determinação da composição química de uma amostra de material diatomáceo (Tabela 5) coletado em um depósito no sudeste do Brasil

(Campos dos Goytacazes-RJ) permitiram verificar que o material, do ponto de vista químico, é constituído basicamente pelos óxidos SiO_2 , Al_2O_3 e Fe_2O_3 , que correspondem à cerca de 85%. A perda ao fogo de 11,75% é relativamente alta e pode estar relacionada principalmente com a presença de impurezas na amostra, tais como argilominerais, hidróxidos e matéria orgânica. Os teores dos óxidos alcalinos (K_2O e Na_2O) e alcalino terrosos (MgO e CaO) são baixos (SOUSA *et al.*, 2003).

O aluminossilicatos, quimicamente presentes em maior percentual na constituição das terras diatomáceas, possui em sua natureza, sílica, de fórmula empírica aproximadamente (SiO_2). A substituição parcial de átomos de silício por alumínio dá origem ao grupo dos aluminossilicatos. Como o alumínio apresenta valência (3+) menor do que a do silício (4+), a estrutura do aluminossilicato apresenta uma carga negativa para cada átomo de alumínio. Esta carga é balanceada por cátions alcalinos ou alcalino-terrosos, chamados de cátions de compensação, intersticiais ou trocáveis, normalmente o Na^+ , K^+ ou Ca^{2+} , que são livres para se moverem nos canais da rede e podem ser trocados por outros cátions em solução (AGUIAR *et al.*, 2002).

Tabela 5- Composição química do material diatomáceo (SOUSA *et al.*, 2003).

Composição	(% em peso)
SiO_2	65,78
Al_2O_3	17,42
Fe_2O_3	2,19
CaO	0,12
MgO	0,60
Na_2O	0,30
K_2O	0,88
TiO_2	0,96
Perda ao fogo	11,75

A capacidade de troca catiônica (CTC) de um aluminossilicato é a quantidade de íons, particularmente cátions, que este pode adsorver e trocar. É uma das propriedades mais importantes, que resulta do desequilíbrio das cargas elétricas na estrutura cristalina devido às substituições isomórficas, às ligações químicas quebradas nas arestas das partículas e a interação dos íons H_3O^+ com as

cargas nestas ligações quebradas. Para neutralizar estas cargas, existem cátions trocáveis, que estão fixos eletrostaticamente ao longo das faces e entre as camadas estruturais. A afinidade dos materiais trocadores de íons está relacionada com a carga e o tamanho dos íons na solução. O poder de troca de um cátion será maior, quanto maior for sua valência e menor sua hidratação. A força iônica com que um íon é atraído é proporcional a sua carga iônica e por consequência, íons de maior valência são mais fortemente atraídos pelo material. Entre cátions de mesma valência, a seletividade aumenta com o raio iônico, em função do decréscimo do grau de hidratação, pois quanto maior for o volume do íon, mais fraco será o campo elétrico na solução e, conseqüentemente, menor o grau de hidratação. Logo, para uma mesma série de íons, o raio hidratado é geralmente inversamente proporcional ao raio iônico do cristal. Entretanto, o grau de hidratação do íon depende da viscosidade da solução, da temperatura, da presença de interferentes e de vários outros fatores, podendo ter valor variável em função de determinada aplicação. No caso de cátions monovalentes, a seletividade segue a seguinte seqüência: $H^+ > Cs^+ > Rb^+ > NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$. Para cátions bivalentes a seqüência é a seguinte: $Ba^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Mg^{2+}$ (AGUIAR *et al.*, 2002). Estes autores afirmam também, que os aluminossilicatos não devem ser empregados em pH extremamente ácidos, exceto por períodos de tempo muito curtos. A protonação da camada octaédrica é seguida pela lenta hidrólise da estrutura de alumínio que acarreta a perda gradual da (CTC) e, em alguns casos o colapso da estrutura. Entretanto, a troca de íons metálicos multivalentes necessita de baixos valores de pH na solução, de maneira a evitar o limite de solubilidade dos metais.

Conforme estudos realizados por RIBEIRO *et al.* (2001) utilizando diferentes materiais adsorventes como terra diatomácea, carvão ativo em pó e granulado, em solução de óleo de oliva bruto dissolvido em n-hexano, foi possível obter bons resultados na remoção seletiva de impurezas como clorofila, fenóis, ácidos graxos livres e produtos da oxidação do óleo.

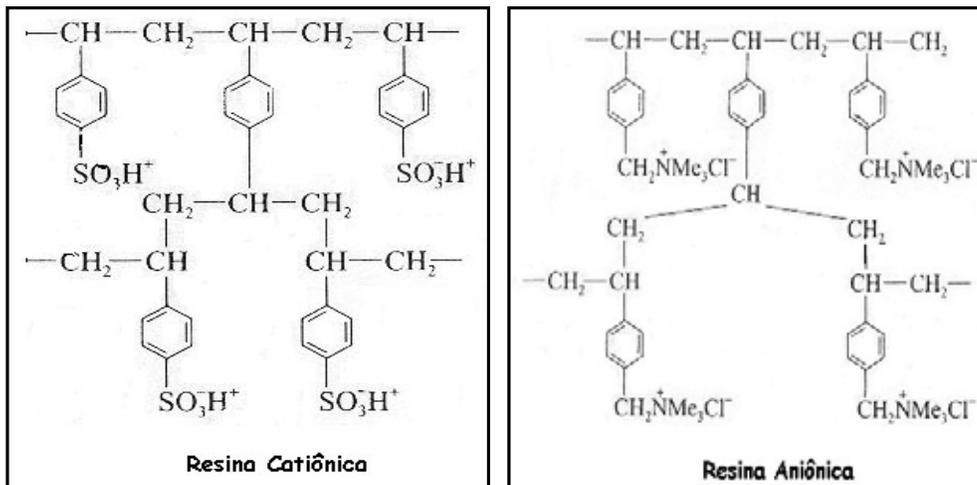
Dentre as propriedades desse material, a capacidade de adsorção e de troca iônica, podem possibilitar o uso deste material no tratamento de hidrolisados hemicelulósicos.

As propriedades da terra diatomácea permitem sua aplicação em distintas áreas como auxiliar de filtração, isolamento térmico e acústico, como carga de enchimento, adsorvente e cerâmica dielétrica (SOUSA *et al.*, 2003).

Resinas

Diversas resinas tem sido desenvolvidas para as mais diversas aplicações industriais. Dentre elas, encontram-se as resinas adsorventes, que são aquelas que apenas adsorvem compostos em sua superfície, e as resinas de troca iônica, que adsorvem e trocam íons com a solução (PUROLITE, 1998).

O termo troca iônica é geralmente entendido como a troca de íons de carga de mesmo sinal entre uma solução e um material insolúvel em contato com ela. O sólido (trocador de íons) contém seus próprios íons e, do ponto de vista prático, para que a troca se processe com rapidez necessária e de maneira extensiva, o sólido deve ter uma estrutura molecular aberta e permeável, de modo que os íons e as moléculas do solvente possam circular livremente pela estrutura. Dentre trocadores de íons com aplicações especiais encontram-se as resinas de troca iônica (ou trocadores de íons orgânicos sintéticos). Para que estas resinas tenham aplicações nos processos químicos, elas necessitam apresentar propriedades em comum: insolubilidade em água e em solventes orgânicos, conter íons ativos (ou contra-íons) capazes de troca reversível com outros íons em solução e não sofrer modificação física apreciável. A resina de troca iônica é um polímero complexo cuja carga elétrica é exatamente neutralizada pelas cargas dos contra-íons. Esses íons são cátions em um trocador de cátions e ânions em um trocador de ânions. Assim, um trocador de cátions é um poliânion polimérico com cátions ativos e um trocador de ânions é um policátion polimérico com ânions ativos. As Figuras 9 e 10 dão exemplos de resinas catiônicas e aniônicas respectivamente (MENDHAM *et al.*, 2002).



Figuras 9 e 10- Exemplo de resinas catiônica e aniônica (MENDHAM *et al.*, 2002).

De acordo com HARLAND, (1994), as resinas de troca iônica são classificadas segundo os grupos ativos em catiônicas ácido forte (fortemente ácidas), catiônicas ácido fraco (fracamente ácidas), aniônicas base forte (fortemente básicas) e aniônicas base fraca (fracamente básica), conforme apresentado na Tabela 6. A definição de fraca ou forte não depende da resina mas da natureza do íon fixado a matriz polimérica. Estas resinas são comercializadas na forma iônica que se ilustra na Tabela 6.

Tabela 6- Classificação das resinas de troca iônica (HARLAND, 1994).

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

Quando uma resina trocadora de cátions com íons móveis C^+ entra em contato com uma solução que contém cátions B^+ , estes últimos difundem-se pela estrutura da resina ocupando as posições dos cátions C^+ que, por sua vez, se difundem para a solução até que o equilíbrio seja atingido. Assim, a resina e a solução contém os cátions C^+ e B^+ em proporções que dependem da posição de equilíbrio. Um mecanismo semelhante opera no caso de uma resina trocadora de

ânions (MENDHAM *et al.*, 2002).

A técnica de troca iônica vem sendo amplamente utilizada na área biotecnológica, destacando-se a imobilização de enzimas, a purificação de produtos biotecnológicos como o xilitol, antibióticos, vitaminas, aminoácidos e proteínas, descoloração de vinhos, licores e sucos (DECHOW, 1989).

O tratamento de neutralização e/ou purificação de hidrolisados hemicelulósicos com resinas de troca iônica, remove eficientemente não só a cor, mas também compostos fenólicos, ácidos orgânicos e inorgânicos, compostos furânicos e metais que são inibidores do processo fermentativo e não apresenta o problema de perda de xilose parecendo ser um método promissor para o tratamento de hidrolisados hemicelulósicos (NÁPOLES *et al.*, 1998; CARVALHO *et al.*, 2002).

Em estudos realizados por CANILHA *et al.* (2003a) no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto usando carvão ativo ou resinas de troca iônica, verificou-se que após a fermentação deste hidrolisado, os melhores resultados em termos de fator de conversão de xilose em xilitol (0,76g/g), produtividade volumétrica de xilitol (0,68g/L.h) e eficiência (83%) foram obtidos no hidrolisado previamente tratado com resinas de troca iônica. Semelhante comportamento foi observado por VERDE, (2001), ao avaliar o tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Foi observado que a melhor condição de tratamento com resinas de troca iônica, proporcionou 0,679g/L.h de produtividade volumétrica de xilitol , 0,748g/g de fator de rendimento de xilose em xilitol e 81,60% de eficiência quando comparados com o tratamento utilizando carvão ativo (0,478g/L.h, 0,595g/g e 81,60%, respectivamente).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO E PREPARO DO HIDROLISADO DE EUCALIPTO

3.1.1 Matéria prima

Neste trabalho foram utilizados aparas de eucalipto da espécie *Eucalyptus grandis* provenientes da Cia. Susano de Papel e Celulose (São Luiz do Paraitinga-SP).

3.1.2 Hidrólise ácida das aparas de eucalipto

As aparas de eucalipto foram hidrolisadas em um reator de aço de 40 L de capacidade útil. A hidrólise foi realizada conforme metodologia estabelecida por CANETTI (2004) de acordo com as seguintes condições: relação massa seca de madeira para solução ácida igual a 1 para 8,6; temperatura de 157⁰C; tempo de reação de 20 minutos e concentração de 0,65% de ácido sulfúrico. O hidrolisado obtido foi armazenado em câmara fria, caracterizado e concentrado para o tratamento.

3.1.3 Concentração

A fim de aumentar o teor de xilose para valor 5,8 vezes maior que o inicial, o hidrolisado foi concentrado em evaporador rotatório a vácuo de 4 L de capacidade útil, operando a 70 ± 5⁰C. O hidrolisado concentrado foi caracterizado quanto a pH, concentração de açúcares (glicose, xilose, arabinose), ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural e compostos derivados da degradação da lignina.

3.1.4 Tratamento

O hidrolisado concentrado foi submetido a diferentes tratamentos, visando a redução dos compostos químicos tóxicos provenientes do processo de hidrólise ácida.

Foram estudadas diferentes combinações que consistiram da elevação do pH original do hidrolisado para 3,5 ou 7,0 pela adição de CaO, seguida da adsorção em carvão ativo ou terras diatomáceas, na proporção de 2,4% (peso/volume) para

ambos. O tratamento com carvão ativo ou terra diatomácea ocorreu em incubadora de movimento rotatório (New Brunswick, Scientific Co.), utilizando-se frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de hidrolisado, sob agitação de 200 rpm a 30^oC por 34,5 minutos. O hidrolisado passou por colunas de vidro contendo resinas de troca iônica (A860S) ou adsorvente (MN-150) num fluxo de 9 mL/minuto a 30^oC. Finalmente, o pH dos hidrolisados foram ajustados para 5,5. Nas etapas de alteração do pH e adsorção em carvão ativo e/ou terra diatomácea os precipitados formados foram removidos por filtração a vácuo em filtro de porcelana (tipo Büchner) com papel de filtro qualitativo.

3.2 MICRORGANISMO E PREPARO DE INÓCULO

3.2.1 *Microrganismo*

As fermentações foram conduzidas com a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, da coleção de culturas do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos - Departamento de Biotecnologia - FAENQUIL, selecionada por BARBOSA *et al.*, (1988).

3.2.2 *Preparo do inóculo*

O inóculo foi obtido a partir de uma cultura estoque da levedura *C. guilliermondii*, mantida a 4^oC inclinado em meio de ágar malte. O cultivo da levedura foi feito inoculando-se células da cultura estoque recém repicada (24 horas) em meio semi-sintético com a seguinte composição em (g/L): 30,0 de D-xilose, 7,0 de glicose, 2,0 de sulfato de amônio, 0,1 de cloreto de cálcio dihidratado e 20,0 de solução de extrato de farelo de arroz “in natura”.

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

Para o cultivo foram utilizados frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 50mL do meio acima descrito, em incubadora de movimento rotatório (New Brunswick,

Scientific Co.), sob agitação de 200 rpm, a 30°C durante 24 horas.

Após o período de incubação as células foram separadas por centrifugação a 2000 rpm por 15 minutos, ressuspensas em água destilada esterilizada, lavadas e, após nova centrifugação, foi preparada a suspensão de células utilizada como inóculo. Para todos os ensaios a concentração celular inicial, determinada por turbidimetria, foi de 3,0g/L, equivalente a 10^8 células/mL (GINÓRIS, 2001).

3.3 MEIO E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

O meio de fermentação foi preparado com os hidrolisados concentrados e tratados de acordo com as variantes experimentais (Tabelas 7 e 8).

Os hidrolisados foram autoclavados a 111°C por 15 minutos e suplementados com sulfato de amônio e farelo de arroz nas concentrações de 1,1g/L e 5,0g/L, respectivamente, conforme estabelecido por GINÓRIS (2001).

A avaliação dos tratamentos dos hidrolisados foi feita através de ensaios de fermentação. Os ensaios serão efetuados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50mL do meio de fermentação (formado por 48,5 mL de hidrolisado, 1,25 mL da solução de farelo de arroz e 0,22 mL de solução de sulfato de amônio inoculado com 5,45 da solução de células), a 30°C, sob agitação de 200 rpm em incubadora de movimento rotatório (New Brunswick, Scientific Co.), por 96 horas.

A caracterização dos hidrolisados, após as etapas de hidrólise, concentração e tratamento foi feita através de análises de pH, concentração de glicose, xilose e arabinose, ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, bem como dos compostos aromáticos provenientes da degradação da lignina e extrativos da madeira.

Para o acompanhamento das fermentações cada variante experimental foi realizada colocando 3 frascos Erlenmeyer, sendo que cada um foi retirado a cada 24 horas a partir das 48 horas de cultivo até o final da fermentação, para realizar observações de viabilidade e pureza da cultura, determinação do consumo de glicose, xilose e arabinose, ácido acético, produção de xilitol, células e variação do pH bem como para o armazenamento em “freezer” para posteriores análises.

3.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.4.1 Determinação do teor de umidade dos cavacos de eucalipto

O teor de umidade dos cavacos de eucalipto foi determinado pela secagem das amostras em estufa a 105⁰C, até peso constante.

3.4.2 Viabilidade e pureza da cultura

A viabilidade celular durante os ensaios efetuados em incubadora de movimento rotatório foi verificada por contagem em câmara de Neubauer (1/400 mm²x1/10mm). As amostras foram coradas adicionando igual volume de uma solução 0,01% (p/v) de azul de metileno dissolvido em citrato de sódio 2% (p/v) (ODUMERO *et al.* 1992).

A pureza da cultura foi verificada usando lâminas fixadas e coradas com fucsina.

As observações foram feitas em microscópio óptico Leitz.

3.4.3 Determinação da concentração celular

A medida do crescimento celular para o preparo do inóculo e para os ensaios de fermentação foi feito por turbidimetria em espectrofotômetro BECKMAN DU 640B. A concentração celular (g/L) foi calculada através de uma curva padrão que correlaciona a absorbância a 600nm com a massa das células secas obtidas num cultivo de 24 horas em meio semi-sintético.

3.4.4 Determinação do pH

Os valores de pH dos hidrolisados tratados, bem como para o acompanhamento das fermentações foram determinados em pHmetro MICRONAL modelo 374.

3.4.5 Determinação das concentrações de açúcares e ácido acético

As concentrações de açúcares e ácido acético foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em equipamento Shimadzu-LC-10AD, empregando-se as seguintes condições: coluna Biorad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), temperatura da coluna de 45^oC, fluxo de eluente igual a 0,6 mL/min, volume da amostra injetada 20 µL. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro Sepack C18 (Millipore) e o eluente antes do uso, foi filtrado à vácuo em membrana HAWP 0,45 µm (Millipore) e em seguida foi degaseificado em banho ultra-som (Microsonic SX-50) por 15 minutos.

3.4.6 Determinação das concentrações de furfural e hidroximetilfurfural

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural nos hidrolisados foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) em equipamento Shimadzu-LC-10AD, sob as seguintes condições: coluna Hewlett-Packard RP 18 (200 mm); temperatura da coluna: 25^o C, detetor de ultravioleta SPD-10A UV-VIS; eluente: solução de acetronitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético; volume de amostra injetada 20µL. As amostras foram diluídas e filtradas a vácuo em membrana HAWP 0,45 µm (Millipore). O eluente foi filtrado a vácuo em membrana GVWP 0,22 µm (Millipore) e, em seguida, degaseificado em banho ultra-som (Microsonic SX-50) por 15 minutos.

3.4.7 Determinação do teor de produtos de decomposição da lignina

O teor dos produtos derivados da decomposição da lignina foi analisado através da quantificação da lignina Klason solúvel em meio ácido, de acordo com metodologia proposta por ROCHA (2000).

Uma alíquota do hidrolisado foi alcalinizada até pH 12 pela adição de NaOH

6M e diluída com água destilada de forma a se obter uma leitura inferior a 1 unidade de absorbância. A absorbância desta solução foi determinada num comprimento de onda de 280nm utilizando água destilada como referência. A concentração de lignina foi calculada por meio da Equação abaixo, levando-se em consideração a normalização das concentrações em função do fator de diluição utilizado.

$$C_{LIG} = 4,187 \times 10^{-2} (A_{LIG} - A_{PD280}) - 3,279 \times 10^{-4}$$

Onde:

C_{LIG} = Concentração de lignina Klason solúvel em meio ácido (g/L)

A_{LIG280} = absorbância da solução em 280nm

$A_{PD280} = C_1 \times \varepsilon_1 + C_2 \times \varepsilon_2$; Onde C_1, C_2 = Concentrações de furfural e hidroximetilfurfural determinadas por HPLC; $\varepsilon_1, \varepsilon_2$ = coeficientes de extinção do furfural ($146,85 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$) e do hidroximetilfurfural ($114,00 \text{ Lg}^{-1}\text{cm}^{-1}$), determinados por espectroscopia UV em 280nm.

4 METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

4.1 Determinação das percentagens de redução das concentrações dos inibidores e dos açúcares

As percentagens de remoção dos compostos inibidores foram calculadas pela relação entre as concentrações dos compostos tóxicos antes e depois dos tratamentos, de acordo com a seguinte equação:

$$\%R_{Ci} = \{ (C_{iST} - C_{iT}) / C_{iST} \} \times 100$$

sendo,

$\%R_{Ci}$ – percentagem de redução da concentração do composto inibidor i

C_{iST} – concentração do composto inibidor i antes do tratamento

C_{iT} – concentração do composto inibidor i após o tratamento

i – composto inibidor: furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético, compostos derivados da degradação da lignina e dos extrativos da madeira.

De forma similar aos compostos inibidores, as percentagens de redução do teor de açúcares (xilose, glicose, arabinose) serão calculadas pela relação entre as

concentrações desses açúcares antes e após os tratamentos de detoxificação, de acordo com a equação:

$$\%R_{Ca} = \{ (C_{aST} - C_{aT}) / C_{aST} \} \times 100$$

sendo,

$\%R_{Ca}$ – percentagem de redução da concentração de açúcar

C_{aST} – teor de açúcares antes do tratamento

C_{aT} – teor de açúcares após o tratamento

4.2 Determinação dos parâmetros fermentativos

Os parâmetros fermentativos, fator de rendimento, produtividade e eficiência de conversão serão determinados como segue:

- ◆ Fator de rendimento

$$Y_{p/s} = \{ \text{massa de xilitol produzido} / \text{massa de xilose consumida} \} \text{ (g/g)}$$

- ◆ Produtividade volumétrica

$$Q_p = \{ \text{concentração de xilitol produzido} / \text{tempo} \} \text{ (g/L.h)}$$

- ◆ Eficiência

$$\eta = \{ (Y_{p/s} / 0,917^*) \cdot 100 \} \text{ (\%)}$$

*rendimento teórico em g xilitol/ g xilose, segundo BARBOSA *et al.* (1988).

4.3 Análise estatística e modelagem matemática

A fim de minimizar o número de experimentos e modular o tratamento do hidrolisado visando maior produção de xilitol, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 (BOX *et al.*, 1978; BARROS NETO *et al.*, 1995). Os fatores estudados estão demonstrados na Tabela 7 e seus respectivos níveis, avaliados no tratamento do hidrolisado, estão apresentados na Tabela 8, sendo que os sinais (-1), (+1) e (0) representam os níveis inferior, superior e o ponto central dos fatores, respectivamente.

Tabela 7- Fatores e níveis estudados no planejamento fatorial fracionário 2³ com mais oito ensaios, fixando nestes, o ponto central para o pH do hidrolisado.

Fatores	Níveis	
	(-1)	(+1)
Fator Resina [FR]	A860S	MN-150
pH [FpH]	3,5	7,0
Fator Adsorvente [FA]	Carvão Ativo (2,4%)	Terra Diatomácea (2,4%)

Tabela 8- Matriz de planejamento composta pelos valores dos fatores originais e codificados no projeto fatorial fracionário 2³ com mais oito ensaios, fixando nestes, o ponto central para o pH do hidrolisado.

Ensaio	FR	FpH	FA	FR	FpH	FA
01	A860S	3,5	C.Ativo	-1	-1	-1
02	MN-150	3,5	C.Ativo	+1	-1	-1
03	A860S	7,0	C.Ativo	-1	+1	-1
04	MN-150	7,0	C.Ativo	+1	+1	-1
05	A860S	3,5	T.Diatomácea	-1	-1	+1
06	MN-150	3,5	T.Diatomácea	+1	-1	+1
07	A860S	7,0	T.Diatomácea	-1	+1	+1
08	MN-150	7,0	T.Diatomácea	+1	+1	+1
09	A860S	5,25	C.Ativo	-1	0	-1
10	A860S	5,25	C.Ativo	-1	0	-1
11	A860S	5,25	T.Diatomácea	-1	0	+1
12	A860S	5,25	T.Diatomácea	-1	0	+1
13	MN-150	5,25	C.Ativo	+1	0	-1
14	MN-150	5,25	C.Ativo	+1	0	-1
15	MN-150	5,25	T.Diatomácea	+1	0	+1
16	MN-150	5,25	T.Diatomácea	+1	0	+1

Os resultados foram analisados estatisticamente de acordo com o planejamento preestabelecido, para verificar os efeitos dos fatores em estudo sobre a bioconversão de xilose em xilitol. A análise dos dados foi efetuada pelo programa STATGRAPHICS PLUS e STATÍSTICA versão 5, considerando os níveis de significância de 5% de probabilidade. Os resultados foram expressos em tabelas estimativas de efeitos, gráficos de valores previstos contra valores observados, erros-padrão, teste t de “Student”, assim como tabelas de análise de variância com colunas de causa de variação (CV), graus de liberdade (GL), soma dos quadrados (SQ), quadrado médio (QM) e nível de significância (p).

Desta forma foi efetuada a análise estatística dos resultados obtidos segundo o planejamento 2^3 (com mais oito ensaios, fixando nestes, o ponto central para o pH do hidrolisado) e os fatores que exibiram efeito significativo foram utilizados para compor os modelo matemáticos de natureza empírica.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO E PREPARO DO HIDROLISADO CONCENTRADO

Na primeira etapa do presente, trabalho foi obtido o hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto conforme metodologia descrita por CANETTIERI (2004). O hidrolisado ácido foi concentrado a vácuo 5,8 vezes de sua concentração inicial. As características do hidrolisado original, obtido da fração hemicelulósica de eucalipto, bem como do hidrolisado concentrado pelo fator 5,8, estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9- Composição parcial, em g/L, do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto obtido por hidrólise ácida, em sua forma original e após ser submetido ao processo de concentração.

<i>Características Quantificadas</i>	<i>Hidrolisado de Aparas de Eucalipto</i>	
	<i>Original</i>	<i>5,8 vezes concentrado</i>
pH	1,75	0,83
[Açúcares]		
Xilose	11,800	68,440
Glicose	2,720	15,830
Arabinose	0,244	1,185
[Inibidores]		
Acido acético	4,410	6,855
Furfural	2,454	0,0550
*5-HMF	0,207	0,691
**CDL	3,100	17,981

* 5 – Hidroximetilfurfural.

** Compostos aromáticos derivados da degradação da lignina solúvel em ácido e dos extrativos da madeira.

Observa-se na Tabela 9 que a xilose (11, 800 g/L) é o açúcar predominante no hidrolisado. A glicose (2,720 g/L) e a arabinose (0,244 g/L), estão presentes em baixas concentrações conforme já constatado nos hidrolisados hemicelulósicos de cavacos de eucalipto (GINORIS, 2001; CANETTIERI *et al.*, 2002b) , de bagaço de

cana-de-açúcar (VERDE, 2001) e de palha de arroz (MUSSATTO & ROBERTO, 2002).

A predominância de xilose em relação a outros açúcares comumente encontrados nos hidrolisados hemicelulósicos, em particular a glicose, é uma característica desejável para a bioconversão de xilose em xilitol, uma vez que a presença de glicose inibe o metabolismo de xilose nas leveduras (LEE *et al.*, 1996; PREZIOSI-BELLOY *et al.*, 1997; GIRIO *et al.*, 2000), sendo esta inibição dependente da concentração dessa hexose no meio de fermentação (SUGAI & DELGENES, 1995; FELIPE, 1994, SILVA *et al.*, 2004).

Pela análise da Tabela 9, verifica-se que além dos açúcares, o hidrolisado apresenta um grupo de compostos que são inibidores potenciais do metabolismo de leveduras. Os compostos tóxicos caracterizados neste trabalho foram: Furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético e os compostos aromáticos de baixa massa molar oriundos da degradação da lignina e dos extrativos da madeira.

Os teores de ácido acético, furfural e 5-hidroximetilfurfural encontrados no hidrolisado (Tabela 9) não foram similares aos valores obtidos por GINORIS, 2001 ao submeter cavacos de eucalipto da mesma espécie a condições hidrolíticas diferentes às utilizadas neste estudo.

Tem sido observado que a concentração desses compostos nos hidrolisados hemicelulósicos varia em função do tipo de material lignocelulósico e das condições hidrolíticas empregadas para a extração da fração hemicelulósica (FRAZER & MacCASKEY, 1989; SILVA *et al.*, 1998; LARSON *et al.*, 1999). Assim sendo, têm sido relatada a presença de ácido acético nos hidrolisados de diferentes tipos de madeiras em concentrações na ordem de 12,0 g/L (TRAN & CHAMBERS, 1985), 10,0 g/L (FERRARI *et al.*, 1992) para os hidrolisados de carvalho vermelho e 5,90 g/L para hidrolisado de cavacos de eucalipto (CARVALHO, 2005a).

Nota-se ainda na Tabela 9 que o hidrolisado obtido contém um grupo de compostos aromáticos de baixa massa molar. Segundo CLARK & MACKIE (1994), a hidrólise da fração hemicelulósica da madeira promove a solubilização simultânea da lignina, o que resulta na formação destes compostos. Segundo

esses autores, as madeiras duras como o eucalipto, caracterizam-se por apresentar uma lignina de baixa massa molar pouco reativa, o que impede a ocorrência de reações de condensação dos fragmentos de lignina solúveis em meios ácidos, favorecendo deste modo, à solubilização de compostos monoméricos. O teor desses compostos encontrado no hidrolisado do presente trabalho foi superior aos valores encontrados por CANETTIERI *et al.*, 2002b (1,25 g/L) e GINORIS, 2001 (1,41 g/L) em hidrolisados de cavacos de eucalipto.

Verifica-se também na Tabela 9 que as condições de hidrólise utilizadas provocaram a degradação parcial das pentoses e hexoses, gerando furfural e 5-hidroximetilfurfural em baixas concentrações. Os teores de furfural e 5-hidroximetilfurfural obtidos nas condições do presente estudo foram superiores aos valores obtidos por GINORIS, 2001 (0,54 g/L e 0,10 g/L respectivamente). PARAJÓ *et al.* (1996a) não detectaram a presença de 5-hidroximetilfurfural no hidrolisado de *Eucalyptus globulus*.

Podemos constatar (Tabela 9) que, ao se concentrar o hidrolisado, ocorreu um aumento proporcional da concentração dos açúcares em função do fator de concentração (razão de volume inicial pelo volume final de hidrolisado), mantendo-se constante a relação xilose/glicose (4,3) tanto no hidrolisado original quanto no hidrolisado concentrado 5,8 vezes. Tem sido constatado um aumento dessa relação durante o processo de concentração a vácuo, o qual, segundo FENGUEL, WEGENEGER (1989), deve-se à degradação parcial da xilose a furfural durante este processo, o que no presente trabalho não ocorreu.

Semelhante aos açúcares, o 5-hidroximetilfurfural teve sua concentração aumentada proporcionalmente aos fatores de concentração. MARTÍNEZ (1999) constatou um comportamento similar ao concentrar hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar três vezes de seu volume inicial.

Quanto ao ácido acético, verifica-se na Tabela 9 um aumento de concentração deste composto, porém de forma não proporcional ao fator de concentração utilizado. Conforme estudos realizados por RODRIGUES (1999), o baixo pH do hidrolisado (aproximadamente 1,0) favorece a parcial volatilização deste ácido que, nestas condições, encontra-se sob a forma não dissociada. O

aumento não proporcional na concentração do ácido também foi observado por Parajó *et al.* (1997b) durante a concentração de hidrolisado hemicelulósico de *Eucalyptus globulus*.

Observa-se na Tabela 9 que o processo de concentração a vácuo causou uma redução substancial da concentração furfural em 97,76% no hidrolisado concentrado 5,8 vezes, em relação a sua concentração no hidrolisado original. Esse comportamento pode ser atribuído às características físico-químicas deste composto que, em condições de pressão reduzida apresenta ponto de ebulição de 54-55°C (PERRY, 1997), o que possibilita a sua remoção quase total nas condições de temperatura ($\pm 70^\circ$ C) e pressão utilizadas neste trabalho. Uma redução inferior, porém considerável (30%) do teor deste composto foi observada por MUSSATTO & ROBERTO, 2002, após concentrar o hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz a 6,5 vezes de sua concentração inicial de xilose.

Os compostos aromáticos de baixa massa molar (Tabela 9) aumentaram sua concentração proporcional ao fator de concentração avaliado. O aumento foi de 100% para o hidrolisado concentrado 5,8 vezes. Nos estudos de GINORIS (2001) foi verificado que estes compostos (CDL) não aumentaram de forma proporcional a sua concentração. Este autor relata que este comportamento pode ser explicado se levarmos em consideração que, além dos compostos oriundos da degradação da lignina, o hidrolisado original contém uma variedade de compostos aromáticos derivados da degradação dos extrativos da madeira, sendo que alguns deles são voláteis e hidrossolúveis, pelo que, nas condições operacionais do processo de concentração a vácuo, podem ser arrastados pelo vapor de água.

Verifica-se ainda na Tabela 9, que o processo de concentração a vácuo provocou um decréscimo do pH original de 1,75 para 0,83 no hidrolisado concentrado no fator de concentração (FC= 5,8). Essa redução provavelmente está relacionada com o aumento da concentração de íons H^+ provenientes do H_2SO_4 , utilizado na hidrólise ácida das aparas de eucalipto (CÔRREA *et al.*, 1995) e também de ácido acético presente no hidrolisado.

5.2 TRATAMENTO DO HIDROLISADO CONCENTRADO

O hidrolisado concentrado foi submetido a diferentes combinações de tratamentos (Tabela 7), objetivando avaliar a influência dos fatores pH do hidrolisado, adição de adsorventes em pó (carvão ativo ou terra diatomácea) e passagem por resinas (A860S ou MN-150), sobre a remoção dos compostos inibidores da atividade fermentativa de *Candida guilliermondii*.

Os ensaios foram efetuados de acordo com o delineamento experimental proposto no item 4.3 com mais oito ensaios, fixando nestes, o ponto central para o pH do hidrolisado. A composição parcial dos hidrolisados e as porcentagens de redução das concentrações dos açúcares e inibidores após os diferentes tratamentos estão apresentadas nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

A análise preliminar dos resultados (Tabelas 10 e 11) mostra uma tendência de aumento das perdas de glicose, quando se realizou a adsorção no hidrolisado com carvão ativo (ensaios 01 e 14). Comparando esses ensaios, evidencia-se um aumento máximo na perda de glicose quando esta adsorção ocorreu em pH 3,5, com a conseqüente passagem deste hidrolisado pela resina aniônica A860S. Por outro lado, as menores remoções desta hexose ocorreram ao se tratar o hidrolisado com a resina MN-150 (ensaios 14 e 16), demonstrando a mínima perda de glicose ao se adsorver previamente o hidrolisado com terra diatomácea em pH 5,25. Um comportamento semelhante de remoção de glicose foi observado nos ensaios 6 e 9, quando variou-se todos os três fatores propostos nas seguintes condições: pH 3,5 ou 5,25, resinas A860S ou MN-150 e carvão ativo ou terra diatomácea.

Tabela 10- Matriz de planejamento para o projeto fatorial 2³ com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH e composição parcial, em g/L dos açúcares e inibidores presentes nos hidrolisados tratados.

Ensaio	FR	FpH	FA	Glicose	Xilose	Ac. Acético	Furfural	*HMF	**CDL
01	-1	-1	-1	11,140	49,390	3,508	0,000	0,0488	5,624
02	+1	-1	-1	14,890	67,540	1,198	0,000	0,000	1,074
03	-1	+1	-1	14,810	62,490	1,986	0,000	0,0308	4,334
04	+1	+1	-1	14,520	62,580	5,859	0,000	0,000	5,554
05	-1	-1	+1	14,080	60,880	5,826	0,0195	0,1508	9,074
06	+1	-1	+1	13,600	60,640	1,684	0,000	0,000	3,369
07	-1	+1	+1	13,070	52,540	1,891	0,00769	0,107	5,687
08	+1	+1	+1	13,390	53,340	4,756	0,000	0,000	6,001
09	-1	0	-1	13,600	60,260	1,166	0,000	0,0450	2,792
10	-1	0	-1	13,510	59,920	2,438	0,000	0,0403	2,967
11	-1	0	+1	13,210	59,230	2,333	0,00665	0,0860	5,748
12	-1	0	+1	13,520	60,290	1,097	0,0145	0,145	5,280
13	+1	0	-1	14,040	57,110	3,899	0,000	0,000	1,049
14	+1	0	-1	12,920	56,840	4,323	0,000	0,000	1,050
15	+1	0	+1	14,620	62,460	5,612	0,000	0,000	3,380
16	+1	0	+1	15,450	63,050	4,960	0,000	0,000	2,791

* 5 – Hidroximetilfurfural.

** Compostos aromáticos derivados da degradação da lignina solúvel em ácido e dos extrativos da madeira.

De acordo com as Tabelas 10 e 11, verifica-se que os tratamentos avaliados influenciaram sobre a remoção do teor de xilose. A menor perda (1,32%) foi observada quando o pH do hidrolisado foi ajustado para 3,5, seguidos da adsorção com carvão ativo, passando posteriormente pela resina adsorvente MN-150 (ensaio 02). A maior perda desta pentose (27,83%) foi obtida no ensaio 01, em que o tratamento do hidrolisado consistiu na alteração do pH para 3,5, adsorção em carvão ativo e passagem do hidrolisado pela resina A860S. Embora haja evidências da influencia do pH no processo de adsorção e conseqüente remoção

dos açúcares nos hidrolisados hemicelulósicos, não podemos afirmar que existiu efeito único deste fator sobre as perdas de xilose na faixa de pH utilizados no presente trabalho. Tal fato pode ser observado nos ensaios 01 e 02 onde, mesmo os fatores pH e adsorventes permanecendo constantes, uma variação no fator resina gerou resultados demasiadamente discrepantes quanto à remoção da xilose neste hidrolisado. Segundo MARTON *et al.* (2003), a concentração de D-xilose é um dos principais fatores que influenciam na produtividade de xilitol, sendo assim, perdas significativas deste açúcar precursor comprometem a eficiência do bioprocessamento.

Tabela 11- Redução dos açúcares e inibidores do hidrolisado de eucalipto submetido às diferentes combinações de tratamentos (em porcentagens).

Ensaio	Glicose	Xilose	Ac. Acético	Furfural	*HMF	**CDL
01	29,63	27,83	48,83	100,00	92,94	68,72
02	5,94	1,32	82,52	100,00	100,00	94,03
03	6,44	8,69	71,03	100,00	95,54	75,90
04	8,28	8,56	14,53	100,00	100,00	69,11
05	11,05	11,05	15,01	64,55	78,18	49,54
06	14,09	11,40	75,43	100,00	100,00	81,26
07	17,44	23,23	72,41	86,02	84,52	68,37
08	15,41	22,06	30,62	100,00	100,00	66,63
09	14,09	11,95	82,99	100,00	93,49	84,47
10	14,66	12,45	64,43	100,00	94,17	83,50
11	16,55	13,46	65,97	87,91	87,55	68,03
12	14,59	11,91	84,00	73,65	79,02	70,64
13	11,31	16,55	43,12	100,00	100,00	94,17
14	18,38	16,95	36,94	100,00	100,00	94,16
15	7,64	8,74	18,13	100,00	100,00	81,20
16	2,40	7,88	27,64	100,00	100,00	84,48

* 5 – Hidroximetilfurfural.

** Compostos aromáticos derivados da degradação da lignina solúvel em ácido e dos extrativos da madeira.

Quanto ao ácido acético, os resultados apresentados nas Tabelas 10 e 11 demonstraram que as maiores reduções deste composto (84,00%, 82,99% e 82,52%) aconteceram nos ensaios 12, 09 e 02, respectivamente. Ao comparar os ensaios 12 e 09, observa-se que nas condições experimentais adotadas, variou-se apenas o fator adsorvente (terra diatomácea ou resina), sendo o pH de adsorção para ambos os ensaios mantido em 5,25 e posterior passagem dos hidrolisados pela mesma resina (A860S). Apesar da existência da influência dos fatores combinados na remoção deste composto, pode-se atribuir, do ponto de vista químico, que a maior influência desta remoção se deu pelo fato de utilizar pH 5,25 e resina de troca iônica aniônica A860S. Isto porque segundo BRADY (1989), o ácido acético possui $pK_a = 4,74$. Logo, em pH 5,25 ele se encontra totalmente ionizado e o íon acetato presente no hidrolisado pode ser facilmente trocado pelo contra-íon da resina aniônica A860S. Já no ensaio 02 observa-se que, em pH 3,5, onde o ácido acético não se encontra ionizado, ele pode ser melhor removido na presença de dois fortes adsorventes, tais como carvão ativo e resina adsorvente MN-150. As menores remoções deste composto aconteceram quando variou-se todos os três fatores propostos nas seguintes condições: pH 3,5 ou 7,0; resinas A860S ou MN-150 e carvão ativo ou terra diatomácea (ensaios 05 e 04). Em estudos realizados por GINORIS (2001) utilizando carvão ativo, observou-se que no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de cavacos de eucalipto, o valor do pH 3,5 teve efeito significativo sobre a remoção de ácido acético em 9,4%, não influenciando a bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii*.

No caso do furfural, os resultados apresentados na Tabela 10 mostram que todas as combinações de tratamento avaliadas reduziram a concentração deste composto a valores menores que 0,03 g/L, apontados como não inibitórios do metabolismo da xilose por *Candida guilliermondii*.

A concentração de 5-hidroximetilfurfural (Tabela 11) foi reduzida a 100% nos ensaios 02, 04, 06, 08, 13, 14, 15 e 16, demonstrando que, mesmo variando todos os parâmetros de pH (3,5; 5,25 e 7,0) e de adsorção (carvão ativo ou terra diatomácea), a remoção total deste inibidor só se tornou possível pela utilização da resina MN-150 nos tratamentos. FELIPE *et al.* (1993), trabalhando com a levedura

Candida guilliermondii, verificaram que baixas concentrações de 5-hidroximetilfurfural (0,11 g/L) não afetaram a bioconversão de xilose em xilitol. Pode-se observar na Tabela 11, que as concentrações de 5-hidroximetilfurfural nos demais ensaios (01, 03, 05, 07, 09, 10, 11 e 12), foram inferiores e/ou próximos ao valor citado como inibitório (0,11 g/L).

Por outro lado, os tratamentos avaliados influenciaram a remoção dos compostos aromáticos de baixa massa molar oriundos da degradação da lignina e dos extrativos da madeira (CDL). Os melhores resultados de remoção (94,17%; 94,16% e 94,03%) foram obtidos nos ensaios 13, 14 e 02, respectivamente (Tabela 11). Em todos estes ensaios pode-se observar a supremacia da ação combinada dos fatores resina (MN-150) e adsorvente (carvão ativo) que não variaram, na remoção destes compostos. Observou-se que apenas o fator pH foi variável nestes ensaios, ocorrendo melhores remoções apenas nos valores de pH iguais a 3,5 e 5,25.

Segundo PARAJÓ *et al.* (1996a), o objetivo principal do tratamento dos hidrolisados hemicelulósicos pela adsorção em carvão ativo é a remoção de uma ampla gama de compostos de natureza fenólica provenientes da lignina solúvel em meio ácido. Estes autores relataram uma maior redução na concentração dos referidos compostos ($\pm 90\%$), presentes no hidrolisado de eucalipto neutralizado com CaCO_3 , utilizando 5% de carvão ativo. Como alternativa de tratamento do hidrolisado hemicelulósico de cavacos de eucalipto, CARVALHO *et al.* (2002) utilizaram resinas de troca iônica A860S (aniônica) combinada a C150S (catiônica) em pH 1,5 no hidrolisado 2,5 vezes concentrado obtendo remoção de 61,36% dos compostos fenólicos. O presente trabalho demonstra uma associação entre estas técnicas de remoção de compostos inibidores do metabolismo microbiano.

5.3 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO CONCENTRADO SUBMETIDO A DIFERENTES COMBINAÇÕES DE TRATAMENTOS.

A fim de se avaliar a influência das diferentes combinações de tratamentos sobre a bioconversão de xilose em xilitol foram efetuados ensaios de fermentação em meios preparados com o hidrolisado concentrado, tratado de acordo com as combinações de tratamento propostas nas Tabelas 7 e 8. As variações das concentrações de xilose, ácido acético e concentração celular em diferentes tempos de fermentação, encontram-se em anexo.

De acordo com estudos realizados por FELIPE *et al.* (1996b) e CANETTIERI *et al.* (1997), para efetuar os ensaios de fermentação foi selecionada uma concentração inicial de células de 3,0 g/l (10^8 células/mL).

Na Tabela 12 estão apresentados os dados referentes ao consumo de xilose, ácido acético, concentração de células e produção de xilitol após a fermentação por *Candida guilliermondii* dos hidrolisados tratados.

Tabela 12- Consumo de xilose, ácido acético, produção de biomassa e xilitol no cultivo de *Candida guilliermondii* no hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto submetido a diferentes combinações de tratamento.

Ensaio	Consumo Xilose (%)	Consumo Ac. Acético (%)	Células (g/L)	Xilitol (g/L)
01	98,45	36,83	6,649	13,120
02	98,83	76,37	9,175	18,450
03	99,63	3,16	12,126	7,047
04	94,55	13,39	9,636	2,285
05	85,70	13,30	8,224	4,730
06	100,00	65,97	11,076	16,820
07	99,11	100,00	12,988	8,196
08	90,43	5,34	10,518	2,538
09	100,00	65,86	11,077	15,790
10	100,00	66,18	11,074	15,770
11	90,46	5,50	10,519	2,535
12	90,49	5,70	10,516	2,531
13	98,84	76,22	9,172	18,090
14	98,83	76,32	9,173	18,100
15	99,62	4,36	12,125	7,038
16	99,63	2,93	12,128	7,035

A glicose, presente nos hidrolisados foi totalmente consumida nas primeiras 48 horas da fermentação (dados não apresentados). Comportamento semelhante no consumo desta hexose por *Candida guilliermondii* foi constatado nas fermentações dos hidrolisados de bagaço de cana (FELIPE *et al.*, 1993; ALVES *et al.*, 1997, ACOSTA *et al.*, 2000), de palha de arroz (ROBERTO *et al.*, 1994) e de cavacos de eucalipto (GINORIS, 2001).

Apesar de alguns autores relatarem que a presença de glicose no meio de fermentação causa inibição da bioconversão de xilose em xilitol (JEFFRIES *et al.*, 1993; BICHO *et al.*, 1988, WALTHER *et al.*, 2001), neste trabalho tal fato não foi constatado. A assimilação de xilose por *Candida guilliermondii* está sujeita a repressão catabólica exercida pela glicose sobre as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase (LEE *et al.*, 1996). Segundo FELIPE *et al.* (1993), a presença de glicose em baixas concentrações no meio, em torno de 10% da concentração de xilose, não interfere na bioconversão de xilose em xilitol pela levedura *Candida guilliermondii*. Estudos recentes realizados SILVA *et al.* (2004a), demonstram que a repressão catabólica exercida pela glicose sobre as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase depende da relação xilose/glicose. Segundo os autores uma relação de glicose correspondendo a 1/5 da concentração de xilose favorece a formação de xilitol por *Candida guilliermondii*.

Com relação ao consumo de xilose, os resultados apresentados na Tabela 12 mostram que esta pentose foi totalmente assimilada nas fermentações efetuadas nas condições estabelecidas nos ensaios 03, 06, 09, 10, 15 e 16. Os ensaios 09 e 10 foram executados tratando o hidrolisado concentrado em pH 5,25 com carvão ativo e posterior passagem pela resina A860S. Já os ensaios 15 e 16 foram executados no mesmo pH, porém, tratando o hidrolisado concentrado com terra diatomácea e resina MN-150. As fermentações executadas nestes hidrolisados demonstraram que quando se manteve o pH de tratamento 5,25, o consumo total da xilose no meio não dependeu da resina ou do adsorvente utilizado previamente no tratamento. Nas fermentações conduzidas com o hidrolisado concentrado tratado nas condições dos ensaios 01, 02, 13 e 14 o cultivo praticamente assimilou toda a xilose presente inicialmente no meio com percentagens que variaram de

98,45% (ensaio 1) a 98,84% (ensaio 13). Observa-se que nos ensaios 02,13 e 14 o hidrolisado concentrado foi tratado com carvão ativo e resina MN-150, variando-se apenas o pH no ensaio 02 (pH=3,5). Nestas condições de tratamento, o consumo de xilose na fermentação, manteve-se na faixa de 98,83 – 98,84%.

Estes resultados sugerem que as combinações de tratamento avaliadas no presente trabalho promoveram o consumo de xilose pela levedura.

Conforme relatado por DOMINGUEZ *et al.* (1996), o consumo de xilose por *Candida guilliermondii* foi maior (96%), quando a fermentação foi conduzida com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar tratado pela adição de 5% de carvão ativo seguido de neutralização com CaO.

O ácido acético (Tabela 12), presente inicialmente no meio em concentrações apontadas como inibitórias para o metabolismo das leveduras também foi assimilado por *Candida guilliermondii* observando-se os menores consumos (2,93 e 3,16%) para os ensaios 03 e 16 respectivamente. Comparando-se ambos os ensaios verificam-se que nenhum fator permaneceu invariável. Os maiores consumos (76,37 e 76,32%) ocorreram nos ensaios 02 e 14, respectivamente. Nesses casos o tratamento dos hidrolisados foi efetuado com o uso de carvão ativo e resina MN-150, variando-se o fator pH (3,5 ou 5,25).

A assimilação deste ácido ocorreu simultaneamente com o consumo de xilose (dados não apresentados), semelhante ao observado por FELIPE *et al.* (1995), FELIPE *et al.* (1996a), GINORIS (2001) em fermentações conduzidas em meio semi-sintético, hidrolisado de bagaço de cana de açúcar e de cavacos de eucalipto, respectivamente. FELIPE *et al.* (1995), sugeriram que a assimilação desse ácido por *Candida guilliermondii*, poderia contribuir para a desintoxicação dos hidrolisados, visto que esse composto é considerado como potente inibidor da atividade fermentativa (PAMPULHA & LOUREIRO-DIAS, 1990; HERRERO *et al.*, 1985; NODA *et al.*, 1992; FERRARI *et al.*, 1992).

O favorecimento de ácido acético pelo esgotamento de xilose tem sido relatado por vários autores, porém nas condições estudadas neste trabalho, é difícil estabelecer uma relação entre todos os fatores que possam estar interferindo no consumo deste composto devido à dinâmica do processo fermentativo.

Alguns trabalhos relatam que a presença de ácido acético no meio em concentrações acima de 5,0 g/L exercem um potente efeito inibidor no crescimento celular em leveduras (FELIPE *et al.*, 1997b, PARAJÓ *et al.*, 1997b), porém no presente trabalho tal efeito não foi observado. Podemos constatar na Tabela 12 que o maior valor de concentração celular, obtido no ensaio 07 (12,988 g/L), coincidiu com o maior consumo deste ácido pela levedura (100%). Neste ensaio o hidrolisado concentrado foi tratado a pH=7,0 com terra diatomácea e resina A860S. Verifica-se também que a menor concentração de biomassa (6,649 g/L) foi obtida no ensaio 01. Neste ensaio o hidrolisado concentrado foi tratado a pH=3,5 com carvão ativo e resina A860S.

Tem sido demonstrado que além da concentração, o potencial inibitório deste ácido é dependente das condições experimentais empregadas durante o cultivo tais como pH (LAWFORD *et al.*, 1993; FELIPE *et al.*, 1997b; RODRIGUES *et al.*, 2003), disponibilidade de oxigênio (MORITA & SILVA, 2000), temperatura (van ZYL *et al.*, 1988), relação xilose/ácido acético (du PREEZ *et al.*, 1991), bem como da presença de outros compostos inibitórios (CONVERTI, 2000b), o que sugere que a influência favorável do consumo de ácido acético no crescimento celular observado aqui pode ter sido causado pelo efeito combinado de todos esses fatores associado com o tratamento do hidrolisado, que podem ter propiciado condições que estimulam a produção de biomassa.

SILVA *et al.* (2004b), realizaram recentemente ensaios em que o ácido acético (2,0 g/L) foi adicionado ao meio (hidrolisado de bagaço de cana) em diferentes tempos de fermentação, com o objetivo de avaliar o efeito deste ácido neste bioprocessos. Os autores concluíram que o efeito inibitório do ácido acético sobre a bioconversão de xilose em xilitol foi dependente do tempo de fermentação em que a adição do ácido foi feita e não apenas de sua concentração no meio.

Neste trabalho as maiores concentrações de xilitol (18,450; 18,090 e 18,100%) foram alcançadas nos ensaios 02, 13 e 14. Nesses casos o processo fermentativo efetuou-se com o hidrolisado tratado com carvão ativo e resina MN-150, variando-se apenas os pHs dos ensaios (ensaio 02, pH=3,5; ensaios 13 e 14, pH=5,25).

Apenas uma posterior análise estatística poderá definir a influencia das condições de tratamento empregadas nestes ensaios, sobre a produção de xilitol.

Os parâmetros fermentativos da bioconversão de xilose-xilitol por *Candida guilliermondii* encontram-se na Tabela 13, onde se pode constatar que os máximos valores de rendimento em xilitol (0,561 e 0,544 g xilitol/g xilose) correspondentes as maiores eficiências de bioconversão (61,178 e 59,324%, respectivamente), foram obtidos nos ensaios 01 e 02, respectivamente. Verifica-se no ensaio 02 (onde o hidrolisado foi tratado a pH=3,5 com carvão ativo e resina MN-150), a maior concentração de xilitol (Tabela 12) e a máxima produtividade volumétrica em xilitol (0,192 g/Lh).

Tabela 13- Parâmetros fermentativos da bioconversão de xilose a xilitol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto submetido às diferentes combinações de tratamento.

Ensaio	$Y_{P/S}$ (g/g)	Q_P (g/Lh)	η (%)
01	0,561	0,137	61,178
02	0,544	0,192	59,324
03	0,405	0,0734	44,166
04	0,102	0,0238	11,123
05	0,133	0,0497	14,504
06	0,392	0,175	42,748
07	0,226	0,0854	24,646
08	0,160	0,0264	17,448
09	0,368	0,164	40,131
10	0,368	0,164	40,131
11	0,160	0,0264	17,448
12	0,160	0,0264	17,448
13	0,534	0,188	58,233
14	0,534	0,189	58,233
15	0,405	0,0733	44,166
16	0,405	0,0733	44,166

$Y_{P/S}$ (g/g) – Fator de rendimento em xilitol; Q_P (g/Lh) – Produtividade volumétrica em xilitol; η (%) – Eficiência de bioconversão.

Quanto à influência dos tratamentos avaliados sobre este bioprocessos, a discussão será feita posteriormente após a análise estatística.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA E MODELAGEM MATEMÁTICA

5.4.1 *Análise estatística e modelagem matemática para a remoção dos inibidores e da xilose*

Com o intuito de se fazerem conhecidos os níveis de remoção dos compostos inibidores da atividade fermentativa de *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto submetido às condições de tratamento estudadas, os dados experimentais referentes às porcentagens de redução das concentrações de ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural assim como dos compostos aromáticos derivados da degradação da lignina solúvel em meio ácido e dos extrativos da madeira, foram analisados estatisticamente.

A análise dos resultados partiu de um planejamento fatorial 2^3 , seguindo a seqüência proposta por BOX *et al.*, 1988; Barros Neto *et al.*, 1995. Esta seqüência estabelece o cálculo dos efeitos, estimativa do erro, interpretação dos resultados e obtenção do modelo estatístico.

A fim de diminuir a carência de graus de liberdade para a realização do cálculo do erro experimental que permite avaliar se os fatores estudados são significativos ou não, foram realizados mais oito ensaios com duplicatas, estabelecendo como ponto central o pH do hidrolisado (pH= 5,25).

Na análise do planejamento fatorial 2^3 , foi constatado que para todas as respostas (exceto na remoção dos compostos aromáticos derivados da degradação da lignina solúvel em meio ácido e dos extrativos da madeira), os modelos não apresentaram curvatura significativa, indicando que as variações nas porcentagens da remoção dos inibidores podem ser adequadamente representadas por modelos matemáticos de primeira ordem (lineares).

A partir do teste t de “Student”, foi feita uma triagem inicial permanecendo no modelo somente os fatores e interações que apresentaram efeito significativo a 95% de confiança.

5.4.1.1 Análise estatística e modelagem matemática para a remoção de xilose

As estimativas, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a remoção de xilose encontram-se na Tabela 14, onde pode se verificar que nenhum dos fatores avaliados apresentou efeito significativo ao nível de 95% de confiança. Isto é um benefício, visto que a concentração deste açúcar é um dos principais fatores que influenciam na produtividade de xilitol. Sendo assim, perdas significativas deste açúcar precursor, comprometem a eficiência do bioprocessamento (MARTON *et al.* 2003).

Tabela 14- Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a remoção de xilose seguindo um planejamento fatorial 2³ com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fatores de interações	Estimativas	Erros-padrão	t	p
Média	13,37688	1,594305	8,39041	0,000015*
[Fr]	-3,38875	3,188610	-1,06277	0,315571
[FpH]	2,73500	4,509376	0,60651	0,559160
[FA]	0,67875	3,188610	0,21287	0,836174
[Fr] [FpH]	6,21500	4,509376	1,37824	0,201422
[Fr] [FA]	0,99625	3,188610	0,31244	0,761824
[FpH] [FA]	8,68500	4,509376	1,92599	0,086225

*Significativo ao nível de 95% de confiança.

5.4.1.2 Análise estatística e modelagem matemática para a remoção dos compostos aromáticos (CDL).

No caso dos compostos aromáticos, as estimativas dos efeitos, erros-padrão, teste t de “Student” e níveis de significância (Tabela 15) mostram que o efeito do fator resina (FR) é significativo ao nível de 95% de confiança. Observa-se também que quando se passou do nível -1 (resina A860S) para o nível +1 (resina MN-150) a remoção dos compostos aromáticos aumentou em média 11,986%.

Observa-se na mesma tabela que o efeito do fator adsorvente também apresenta significância estatística ($p < 0,05$). Deste modo, quando se passou do

nível -1 (Carvão Ativo) para o nível +1 (Terra Diatomácea) a remoção destes compostos diminuiu em média 11,736%.

A Tabela 15 demonstra também que há interação entre os fatores resina (FR) e pH do hidrolisado (FpH), porém a mesma é negativa. Observa-se significância estatística ao nível de 5% de probabilidade quando se trabalhou com a resina no seu nível máximo +1 (MN-150) e pH do hidrolisado no seu nível mínimo -1 (3,5).

Tabela 15- Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a remoção dos CDL seguindo um planejamento fatorial 2³ com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fatores de interações	Estimativas	Erros-padrão	t	p
Média	77,13790	1,84752	41,75161	0,000000*
[Fr]	11,98630	3,69504	3,24388	0,010096*
[FpH]	-3,38000	5,22557	-0,64682	0,533896
[FA]	-11,73630	3,69504	-3,17622	0,011253*
[Fr] [FpH]	-16,39500	5,22557	-3,13746	0,011977*
[Fr] [FA]	2,26130	3,69504	0,61197	0,555700
[FpH] [FA]	5,48000	5,22557	1,04869	0,321665

*Significativo ao nível de 95% de confiança.

Na tabela 16, encontram-se os coeficientes, erros-padrão, valores de t e níveis de significância referentes ao modelo representativo da remoção dos CDL.

Tabela 16- Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2³ com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH para o modelo que representa a remoção dos CDL no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fatores de interações	Parâmetros	Coeficientes	Erros-padrão	t	p
Constante	Constante	77,13687	1,84752	2,61279	0,000000
[Fr]	X ₁	5,99313	1,84752	3,24388	0,010096
[FpH]	X ₂	-1,69000	2,61279	-0,64682	0,533896
[FA]	X ₃	-5,86813	1,84752	-3,17622	0,011253
[Fr] [FpH]	X ₁ X ₂	-8,19750	2,61279	-3,13746	0,011977
[Fr] [FA]	X ₁ X ₃	1,13063	1,84752	0,61197	0,555700
[FpH] [FA]	X ₂ X ₃	2,74000	2,61279	1,04869	0,321665

R² = 0,78233 e R² ajustado = 0,63722

A partir dos coeficientes de regressão (Tabela 16), pode-se verificar uma curvatura significativa ($p < 0,05$) representativa do modelo (Tabela 17). Em seqüência, foi realizada uma análise de variância para o modelo proposto (Tabela 18), comprovando assim a significância estatística do mesmo ($p < 0,05$) com coeficiente de determinação ($R^2 = 0,7824$), que descreve 78,24% da variância total em torno da média. Assim pode-se verificar que um modelo de ordem superior descreveria de maneira mais apropriada os resultados de remoção para os CDL.

Tabela 17- Análise da curvatura para o modelo que descreve a remoção dos CDL no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Análise dos Fatores	Coeficientes	Erros-padrão	t	p
Média das interações	71,69250	0,519305	138,0547	0,000000
Curvatura	10,88875	0,734408	14,8266	0,000000

$$R^2 = 0,99236$$

Na figura 11, encontra-se a disposição dos pontos estimados pelo modelo, e a relação entre os valores previstos e os valores observados. Nota-se uma aproximação entre estes valores na reta que intercepta os pontos, indicando que os erros seguem uma distribuição normal e que os pontos foram satisfatoriamente representados pelo modelo escolhido.

Tabela 18- Análise de variância da regressão do modelo que representa a remoção dos CDL no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de P
Modelo	1766,48	6	294,414	5,39	0,0127
Resíduos	491,292	9	54,588	-	
Total	2257,78	15	-	-	

$$R^2 = 0,7824$$

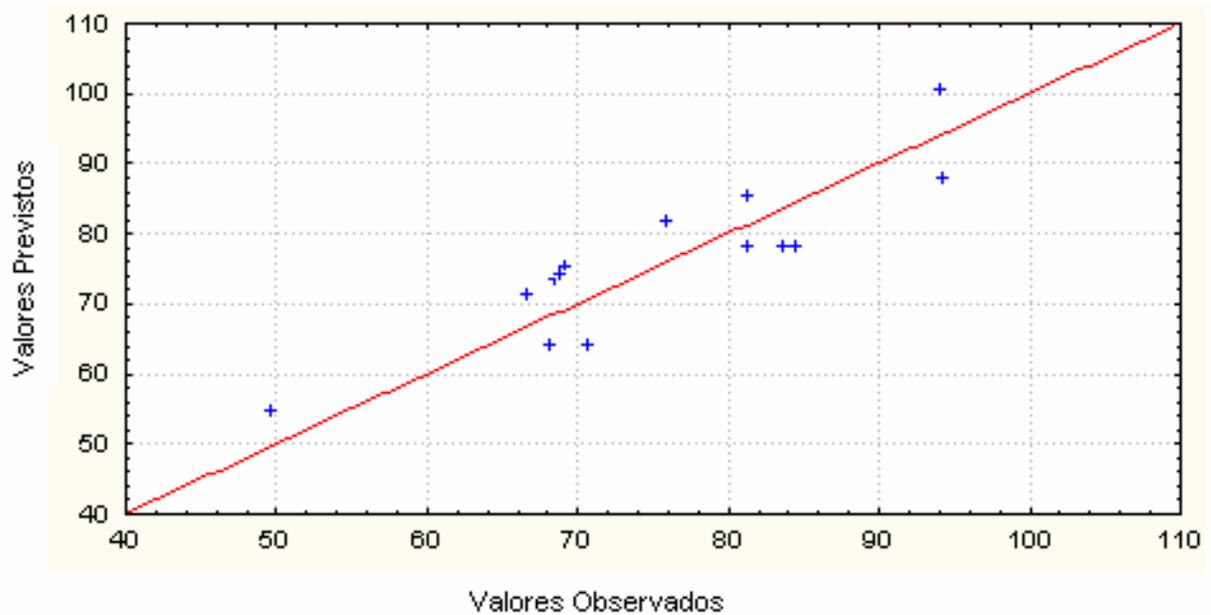


Figura 11- Relação entre valores previstos e os valores observados no modelo proposto para o tratamento visando maior remoção dos CDL do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

O modelo matemático resultante que descreve a remoção dos CDL do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto é definido pela seguinte equação:

$$Y_1 = 77,138 + 5,992 X_1 - 1,693 X_2 - 5,869 X_3 - 8,195 X_1 X_2 + 1,132 X_1 X_3 + 2,743 X_2 X_3$$

em que:

Y_1 é a remoção dos CDL, %

X_1 , X_2 e X_3 são os fatores resina, pH e adsorventes, respectivamente.

Este modelo prevê o favorecimento da remoção dos CDL, trabalhando com a resina no seu nível máximo +1 (MN-150) bem como o pH do hidrolisado e o fator adsorvente no seu nível mínimo -1 (3,5) e (carvão ativo), respectivamente.

5.4.1.3 Análise estatística e modelagem matemática para a remoção de ácido acético.

A Tabela 19, mostra as estimativas dos efeitos, erros-padrão, teste t de "Student" e níveis de significância referentes a remoção do ácido acético para o planejamento fatorial 2^3 com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH do hidrolisado. Conforme os resultados apresentados nessa tabela, observa-se que ao nível de 95% de confiança o fator resina, bem como a interação entre os fatores resina e pH, foram significativos. Analisando o fator resina (FR), observa-se que quando se passou do nível -1 (resina A860S) para o nível +1 (resina MN-150) a remoção de ácido acético diminuiu em média 21,968%.

A Tabela 19 demonstra também que a interação entre os fatores resina (FR) e pH do hidrolisado (FpH) é negativa. Os melhores resultados foram obtidos quando se trabalhou com a resina no seu nível mínimo -1 (A860S) e pH do hidrolisado no seu nível máximo +1 (7,0).

Tabela 19- Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a remoção de ácido acético seguindo um planejamento fatorial 2³ com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fatores de interações	Estimativas	Erros-padrão	t	p
Média	52,1000	4,22110	12,34274	0,000001*
[Fr]	-21,9675	8,44221	-2,60210	0,028639*
[FpH]	-8,3000	11,93909	-0,69520	0,504484
[FA]	-6,8975	8,44221	-0,81703	0,435007
[Fr] [FpH]	-48,1000	11,93909	-4,02878	0,002978*
[Fr] [FA]	0,5750	8,44221	0,06811	0,947187
[FpH] [FA]	14,5950	11,93909	1,22246	0,252583

*Significativo ao nível de 95% de confiança.

Na tabela 20, encontram-se os coeficientes, erros-padrão, valores de t e níveis de significância referentes ao modelo representativo da remoção de ácido acético.

Tabela 20- Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2³ com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH para o modelo que representa a remoção de ácido acético no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fatores de interações	Parâmetros	Coeficientes	Erros-padrão	t	p
Constante	Constante	52,1000	4,221105	12,34274	0,000001
[Fr]	X ₁	-10,9838	4,221105	-2,60210	0,028639
[FpH]	X ₂	-4,1500	5,969543	-0,69520	0,504484
[FA]	X ₃	-3,4488	4,221105	-0,81703	0,435007
[Fr] [FpH]	X ₁ X ₂	-24,0500	5,969543	-4,02878	0,002978
[Fr] [FA]	X ₁ X ₃	0,2875	4,221105	0,06811	0,947187
[FpH] [FA]	X ₂ X ₃	7,2975	5,969543	1,2246	0,252583

R² = 0,74027 e R² ajustado = 0,56712

A partir dos coeficientes de regressão (Tabela 20), pode-se verificar que não houve curvatura significativa ($p < 0,05$) representativa do modelo (Tabela 21). Em seqüência, foi realizada uma análise de variância para o modelo proposto (Tabela 22), comprovando assim que o modelo não apresentou significância estatística ao nível de 95% de confiança. Nesta tabela observa-se um coeficiente de determinação ($R^2 = 0,74027$) que descreve 74,03% da variância total em torno da média. Assim pode-se verificar que um modelo de primeira ordem descreve de maneira apropriada os resultados de remoção para o ácido acético.

Tabela 21- Análise da curvatura para o modelo que descreve a remoção de ácido acético no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Análise dos Fatores	Coefficientes	Erros-padrão	t	p
Média das interações	51,297500	6,318930	8,118070	0,000039
Curvatura	1,605000	8,936317	0,179600	0,861929

$$R^2 = 0,74132$$

Na figura 12, encontra-se a disposição dos pontos estimados pelo modelo, e a relação entre valores previstos e valores observados. Nota-se uma aproximação entre estes valores na reta que intercepta os pontos, indicando que os erros seguem uma distribuição normal e que os pontos foram satisfatoriamente representados pelo modelo escolhido.

Tabela 22- Análise de variância da regressão do modelo que representa a remoção de ácido acético no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de P
Modelo	7312,94	6	1218,82	4,28	0,0258
Resíduos	2565,752	9	285,084	-	-
Total	3878,689	15	-	-	-

$$R^2 = 0,74027$$

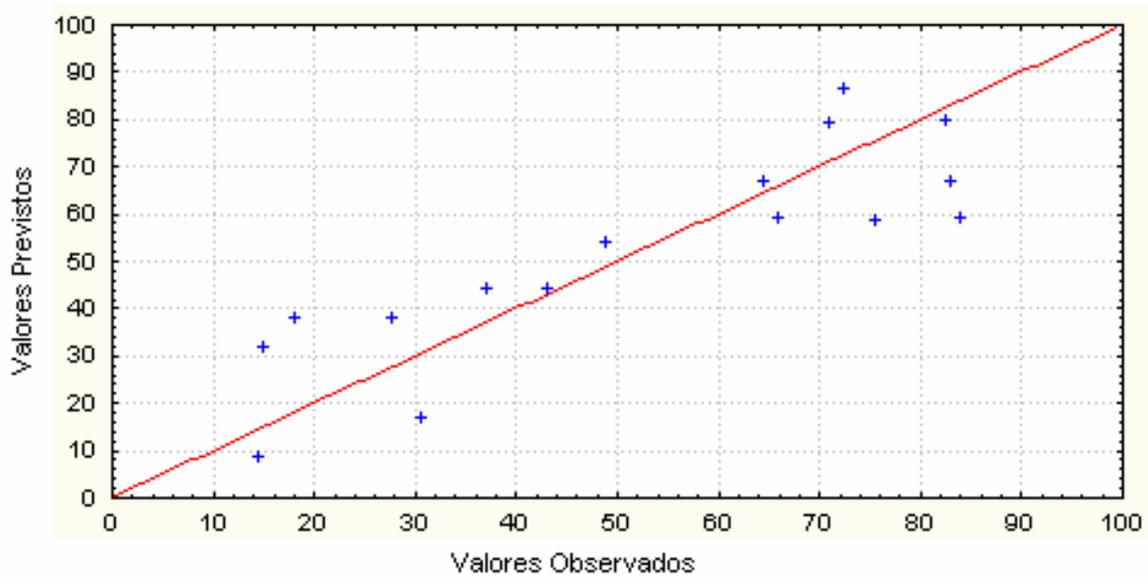


Figura 12- Relação entre valores previstos e valores observados no modelo proposto para o tratamento, visando maior remoção de ácido acético do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

O modelo matemático resultante que descreve a remoção de ácido acético do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto é definido pela seguinte equação:

$$Y_2 = 52,100 - 10,984 X_1 - 4,150 X_2 - 3,449 X_3 - 24,050 X_1 X_2 + 0,288 X_1 X_3 + 7,298 X_2 X_3$$

em que:

Y_2 é a remoção de ácido acético, %

X_1 , X_2 e X_3 são os fatores resina, pH e adsorventes, respectivamente.

Este modelo prevê o favorecimento da remoção do ácido acético, trabalhando com a resina no seu nível mínimo -1 (A860S) e pH do hidrolisado no seu nível máximo +1 (7,0), independente do adsorvente utilizado.

5.4.1.4 Análise estatística e modelagem matemática para a remoção de furfural.

As estimativas dos efeitos, erros-padrão, teste t de “Student” e níveis de significância para a remoção de furfural encontram-se na Tabela 23, onde pode-se verificar que o efeito do fator resina (FR) apresenta significância estatística ($p < 0,05$). Observa-se também, que quando se passou do nível -1 (resina A860S) para o nível +1 (resina MN-150), a remoção do furfural aumentou em média 10,984%.

Observa-se na mesma tabela, que o efeito do fator adsorvente também é significativo ao nível de 95% de confiança. Deste modo, quando se passou do nível -1 (Carvão Ativo) para o nível +1 (Terra Diatomácea), a remoção destes compostos diminuiu em média 10,984%.

A Tabela 23 demonstra também que há interação positiva entre os fatores resina (FR) e adsorvente (FA), com significância estatística ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 23- Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a remoção do furfural, seguindo um planejamento fatorial 2³ com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fatores de interações	Estimativas	Erros-padrão	t	p
Média	94,50810	1,14713	82,38696	0,000000*
[Fr]	10,98380	2,29425	4,78751	0,000991*
[FpH]	5,36750	3,24456	1,65431	0,132452
[FA]	-10,98380	2,29425	-4,78751	0,000991*
[Fr] [FpH]	-5,36750	3,24456	-1,65431	0,132452
[Fr] [FA]	10,98380	2,29425	4,78751	0,000991*
[FpH] [FA]	5,36750	3,24456	1,65431	0,132452

*Significativo ao nível de 95% de confiança.

Na tabela 24, encontram-se os coeficientes, erros-padrão, valores de t e níveis de significância referentes ao modelo representativo da remoção do furfural.

Tabela 24- Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2³, com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH para o modelo que representa a remoção do furfural no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fatores de interações	Parâmetros	Coeficientes	Erros-padrão	t	p
Constante	Constante	94,50813	1,14713	82,38696	0,000000
[Fr]	X ₁	5,49187	1,14713	4,78751	0,000991
[FpH]	X ₂	2,68375	1,62228	1,65431	0,132452
[FA]	X ₃	-5,49188	1,14713	-4,78751	0,000991
[Fr] [FpH]	X ₁ X ₂	-2,68375	1,62228	-1,65431	0,132452
[Fr] [FA]	X ₁ X ₃	5,49188	1,14713	4,78751	0,000991
[FpH] [FA]	X ₂ X ₃	2,68375	1,62228	1,65431	0,132452

R² = 0,89531 e R² ajustado = 0,82552

A partir dos coeficientes de regressão (Tabela 24), pode-se verificar que não houve curvatura significativa ao nível de 95% de confiança, representativa do modelo (Tabela 25). Uma análise de variância para o modelo proposto (Tabela 26), comprovou que o modelo realmente não é significativo ao nível de 5% de probabilidade. Na mesma tabela, observa-se um coeficiente de determinação ($R^2 = 0,89531$) que descreve 89,53% da variância total em torno da média. Assim, pode-se verificar que um modelo de primeira ordem (linear) descreve de maneira correta os resultados de remoção para o furfural.

Tabela 25- Análise da curvatura para o modelo que descreve a remoção do furfural no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Análise dos Fatores	Coeficientes	Erros-padrão	t	p
Média das interações	93,82125	1,68607	55,64510	0,000000
Curvatura	1,37375	2,38446	0,57613	0,580371

$R^2 = 0,89948$

Na figura 13, encontra-se a disposição dos pontos estimados pelo modelo e a relação entre valores previstos e valores observados. Nota-se uma aproximação entre estes valores na reta que intercepta os pontos, indicando que os erros seguem uma distribuição normal e que os pontos foram satisfatoriamente representados pelo modelo escolhido.

Tabela 26- Análise de variância da regressão do modelo que representa a remoção do furfural no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de P
Modelo	1620,57	6	270,096	12,83	0,0006
Resíduos	189,48900	9	21,05430	-	-
Total	1810,06200	15	-	-	-

$R^2 = 0,89531$

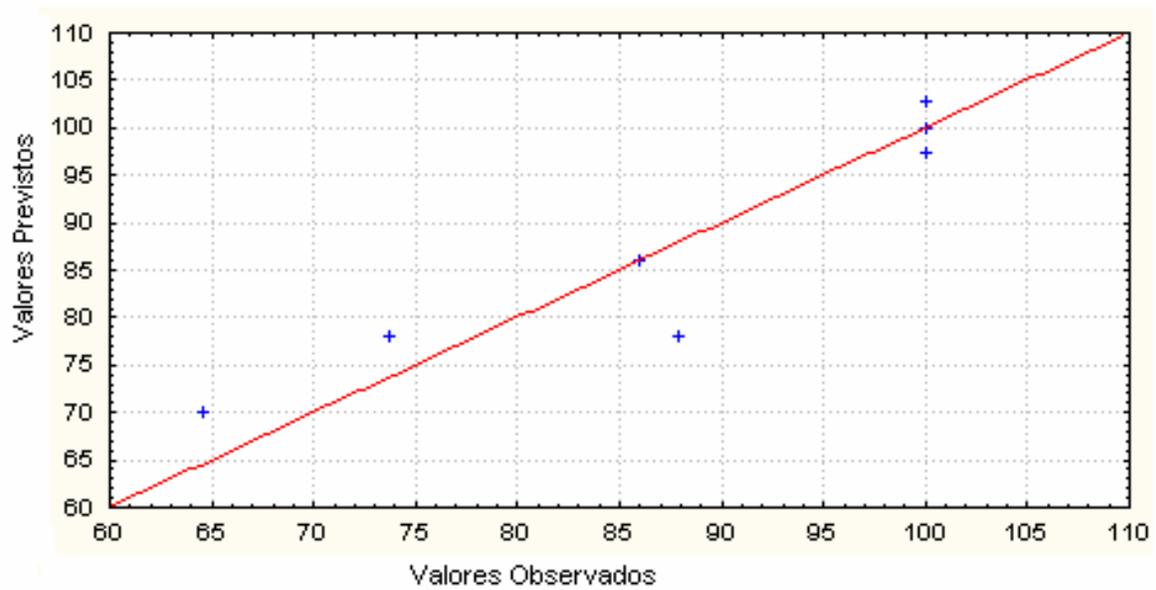


Figura 13- Relação entre valores previstos e os valores observados no modelo proposto para o tratamento visando maior remoção de furfural do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

O modelo matemático resultante que descreve a remoção do furfural no hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto é definido pela seguinte equação:

$$Y_3 = 94,508 + 5,492 X_1 + 2,684 X_2 - 5,492 X_3 - 2,684 X_1 X_2 + 5,492 X_1 X_3 + 2,684 X_2 X_3$$

em que:

Y_3 é a remoção do furfural, %

X_1 , X_2 e X_3 são os fatores resina, pH e adsorventes, respectivamente.

Este modelo prevê o favorecimento da remoção do furfural, trabalhando com a resina no seu nível máximo +1 (MN-150) e o adsorvente no seu nível mínimo -1 (carvão ativo), independente dos níveis de pH do hidrolisado, adotados neste tratamento.

5.4.1.5 Análise estatística e modelagem matemática para a remoção de 5-hidroximetilfurfural.

No caso do hidroximetilfurfural, as estimativas dos efeitos, erros-padrão, teste t de “Student” e níveis de significância (Tabela 27) mostram que o efeito do fator resina (FR) é significativo ao nível de 95% de confiança. Observa-se também que quando se passou do nível -1 (resina A860S) para o nível +1 (resina MN-150) a remoção dos compostos aromáticos aumentou em média 11,824%.

Observa-se na mesma tabela, que o efeito do fator adsorvente também apresenta significância estatística ($p < 0,05$). Deste modo, quando se passou do

nível -1 (Carvão Ativo) para o nível +1 (Terra Diatomácea), a remoção destes compostos diminuiu em média 5,859%.

A Tabela 27 demonstra também que há interação positiva entre os fatores resina (FR) e adsorvente (FA) com significância estatística ao nível de 95% de confiança.

Tabela 27- Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para a remoção do 5-hidroximetilfurfural seguindo um planejamento fatorial 2³, com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fatores de interações	Estimativas	Erros-padrão	t	p
Média	94,08813	0,54181	173,65510	0,000000*
[Fr]	11,82375	1,08362	10,91130	0,000002*
[FpH]	2,23500	1,53247	1,45840	0,178719
[FA]	-5,85875	1,08362	-5,40660	0,000429*
[Fr] [FpH]	-2,23500	1,53247	-1,45840	0,178719
[Fr] [FA]	5,85875	1,08362	5,40660	0,000429*
[FpH] [FA]	0,93500	1,53247	0,61010	0,556868

*Significativo ao nível de 95% de confiança.

Na tabela 28, encontram-se os coeficientes, erros-padrão, valores de t e níveis de significância referentes ao modelo representativo da remoção do hidroximetilfurfural.

Tabela 28- Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2³, com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH para o modelo que representa a remoção do 5-hidroximetilfurfural no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fatores de interações	Parâmetros	Coeficientes	Erros-padrão	t	p
Constante	Constante	94,08813	0,54181	173,65510	0,000000
[Fr]	X ₁	5,91188	0,54181	10,91130	0,000002
[FpH]	X ₂	1,11750	0,76624	1,45840	0,178719
[FA]	X ₃	-2,92938	0,54181	-5,40660	0,000429
[Fr] [FpH]	X ₁ X ₂	-1,11750	0,76624	-1,45840	0,178719
[Fr] [FA]	X ₁ X ₃	2,92938	0,54181	5,40660	0,000429
[FpH] [FA]	X ₂ X ₃	0,46750	0,76624	0,61010	0,556868

R² = 0,95292 e R² ajustado = 0,92153

A partir dos coeficientes de regressão (Tabela 28), pode-se verificar que não houve curvatura significativa ao nível de 5% de probabilidade, representativa do modelo (Tabela 29). Uma análise de variância para o modelo proposto (Tabela 30), comprovou que o modelo realmente não é significativo ($p < 0,05$). Na mesma tabela observa-se um coeficiente de determinação ($R^2 = 0,95292$), que descreve 95,29% da variância total em torno da média. Assim, pode-se verificar que um modelo de primeira ordem (linear) descreve de maneira correta os resultados de remoção para o furfural.

Tabela 29- Análise da curvatura para o modelo que descreve a remoção do 5-hidroximetilfurfural, no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Análise dos Fatores	Coeficientes	Erros-padrão	t	p
Média das interações	93,89750	0,80711	116,33830	0,000000
Curvatura	0,38125	1,14142	0,33400	0,746957

$R^2 = 0,95356$

Na figura 14, encontra-se a disposição dos pontos estimados pelo modelo e a relação entre os valores previstos e os valores observados. Nota-se uma aproximação entre estes valores na reta que intercepta os pontos, indicando que os erros seguem uma distribuição normal e que os pontos foram satisfatoriamente representados pelo modelo escolhido.

Tabela 30- Análise de variância da regressão do modelo, que representa a remoção do 5-hidroximetilfurfural no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de P
Modelo	855,533	6	142,589	30,36	0,0000
Resíduos	42,27240	9	4,69690	-	-
Total	897,80560	15	-	-	-

$R^2 = 0,95292$

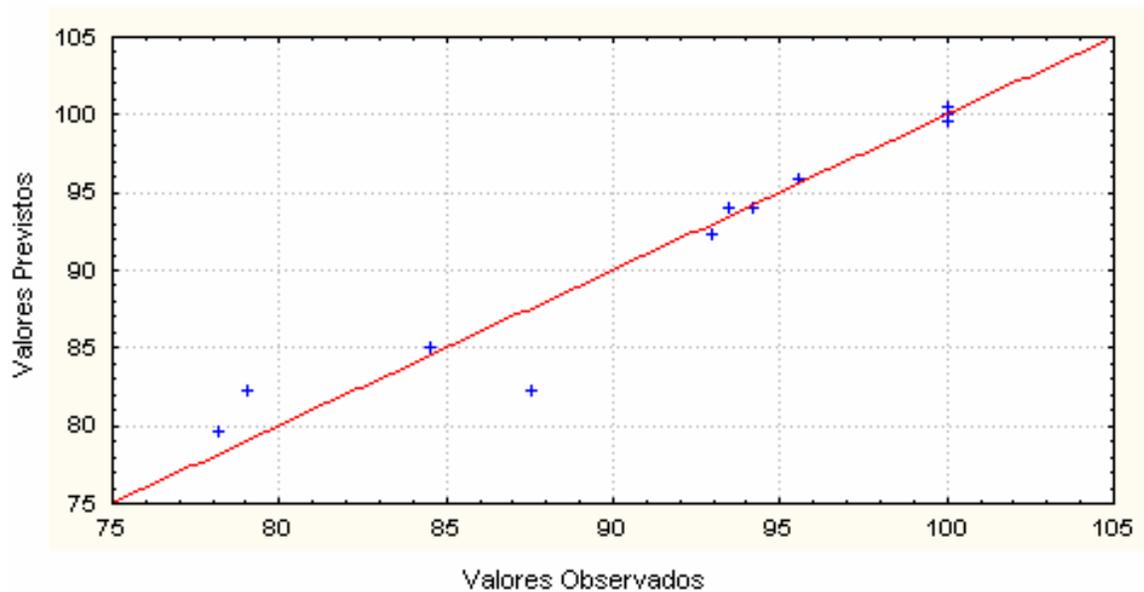


Figura 14- Relação entre valores previstos e os valores observados no modelo proposto para o tratamento, visando maior remoção de 5-hidroximetilfurfural do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

O modelo matemático resultante, que descreve a remoção do 5-hidroximetilfurfural do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto é definido pela seguinte equação:

$$Y_4 = 94,088 + 5,912 X_1 + 1,118 X_2 - 2,929 X_3 - 1,118 X_1 X_2 + 2,929 X_1 X_3 + 0,468 X_2 X_3$$

em que:

Y_4 é a remoção do 5-hidroximetilfurfural, %

X_1 , X_2 e X_3 são os fatores resina, pH e adsorventes, respectivamente.

Este modelo prevê o favorecimento da remoção do 5-hidroximetilfurfural, trabalhando com a resina no seu nível máximo +1 (MN-150) e o adsorvente no seu nível mínimo -1 (carvão ativo), independente dos níveis de pH do hidrolisado, adotados neste tratamento.

Após a análise estatística do tratamento do hidrolisado hemicelulósico das aparas de eucalipto, pode-se verificar que a resina MN-150 apresentou maior efeito de remoção sobre o furfural, 5-hidroximetilfurfural e os compostos aromáticos. Quanto aos adsorventes, o carvão ativo demonstrou maior eficiência na remoção dos compostos aromáticos e do furfural. A eficiência da remoção do ácido acético e do 5-hidroximetilfurfural foi, independente do adsorvente, adotado no tratamento. O pH não interferiu estatisticamente na remoção de furfural e de 5-hidroximetilfurfural, porém, nos pH (3,5) e (7,0) ocorreram maiores remoções de compostos aromáticos

e ácidos acético, respectivamente. Deste modo, pode-se adotar como melhor condição de tratamento, o experimento 2 (resina MN-150, carvão ativo como adsorvente e pH 3,5), garantindo a maior remoção de furfural, 5-hidroximetilfurfural e compostos aromáticos. A remoção de ácido acético neste ensaio, apesar de não ter sido a mais elevada (84%), apresentou um valor muito próximo da mesma (82,52%).

5.4.2 Análise estatística e modelagem matemática para o fator de rendimento em xilitol

A fim de se verificar a influência dos fatores estudados no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto sobre a atividade fermentativa de *Candida guilliermondii* e determinar as condições que permitam obter um hidrolisado susceptível a fermentação com a máxima remoção dos compostos tóxicos, os dados obtidos foram processados estatisticamente.

Dentre os parâmetros deste bioprocessamento, foi dada ênfase ao fator de rendimento em xilitol, como resposta analítica do processo frente a análise estatística.

A Tabela 31 mostra as estimativas dos efeitos, erros-padrão, teste t de “Student” e níveis de significância referentes ao fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$) de acordo com o planejamento fatorial 2^3 com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH do hidrolisado. Conforme os resultados apresentados nessa tabela, observa-se que ao nível de 95% de confiança o fator pH, adsorvente e a interação entre os fatores resina e pH foram significativos. Analisando-se o fator pH (FpH), observa-se que ao se passar do nível -1 (3,5) para o nível +1 (7,0) o fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$) diminuiu em média 0,184%. Da mesma forma pode-se observar quanto ao fator adsorvente (FA) que, ao se passar do nível -1 (carvão ativo) para o nível +1 (terra diatomácea) o fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$) diminuiu em média 0,172%.

A Tabela 31 demonstra também que há interação entre os fatores resina (FR) e pH do hidrolisado (FpH). Observa-se também, que a mesma é negativa. Os

melhores resultados foram obtidos quando se trabalhou com a resina no seu nível máximo +1 (MN-150) e pH do hidrolisado no seu nível mínimo -1 (3,5).

Tabela 31- Estimativa dos efeitos, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância para o fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$) seguindo um planejamento fatorial 2^3 , com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fatores de interações	Estimativas	Erros-padrão	t	p
Média	0,34106	0,022815	14,94886	0,000000*
[Fr]	0,08688	0,045631	1,90388	0,089332
[FpH]	-0,18425	0,064531	-2,85520	0,018928*
[FA]	-0,17188	0,046310	-3,76666	0,004439*
[Fr] [FpH]	-0,152750	0,064531	-2,36707	0,042111*
[Fr] [FA]	0,083875	0,045631	1,83813	0,099206
[FpH] [FA]	0,11475	0,064531	1,77820	0,109085

*Significativo ao nível de 95% de confiança.

Na tabela 32, encontram-se os coeficientes, erros-padrão, valor de t e níveis de significância referentes ao modelo representativo do fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$).

Tabela 32- Coeficientes de regressão, erros-padrão, teste t de “student” e níveis de significância do planejamento fatorial 2^3 , com mais oito ensaios de ponto central fixados no pH para o modelo que representa o fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$) no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fatores de interações	Parâmetros	Coeficientes	Erros-padrão	t	p
Constante	Constante	0,34106	0,022815	14,94886	0,000000
[Fr]	X_1	0,022815	1,90388	0,089332	0,089332
[FpH]	X_2	-0,092125	0,032266	-2,85520	0,018928
[FA]	X_3	-0,085938	0,022815	-3,76666	0,004439
[Fr] [FpH]	X_1X_2	-0,076375	0,032266	-2,36707	0,042111
[Fr] [FA]	X_1X_3	0,041938	0,022815	1,83813	0,099206
[FpH] [FA]	X_2X_3	0,057375	0,032266	1,77820	0,109085

$R^2 = 0,80895$ e R^2 ajustado = 0,68159

A partir dos coeficientes de regressão (Tabela 32), pode-se verificar que não houve curvatura significativa a 95% de confiança, representativa do modelo (Tabela 33). Uma análise de variância para o modelo proposto (Tabela 34), comprovou que o modelo não é significativo ($p < 0,05$). Na mesma tabela, observa-se um coeficiente de determinação ($R^2 = 0,80895$), que descreve 80,90% da variância total em torno da média. Assim, pode-se verificar que um modelo de primeira ordem (linear) descreve de maneira correta os resultados quanto ao fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$).

Tabela 33- Análise da curvatura para o modelo que descreve o fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$), no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Análise dos Fatores	Coefficientes	Erros-padrão	t	p
Média das interações	0,31538	0,031721	9,94203	0,000009
Curvatura	0,051375	0,04486	1,14521	0,28523

$$R^2 = 0,83586$$

Na figura 15, encontra-se a disposição dos pontos estimados pelo modelo e a relação entre os valores previstos e os valores observados. Pode-se observar uma aproximação entre estes valores na reta que intercepta os pontos, indicando que os erros seguem uma distribuição normal e que os pontos foram satisfatoriamente representados pelo modelo escolhido.

Tabela 34- Análise de variância da regressão do modelo, que representa o fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$) no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de P
Modelo	0,31739	6	0,0528983	6,35	0,0074
Resíduos	0,074957	9	0,008329	-	-
Total	0,392347	15	-	-	-

$$R^2 = 0,80895$$

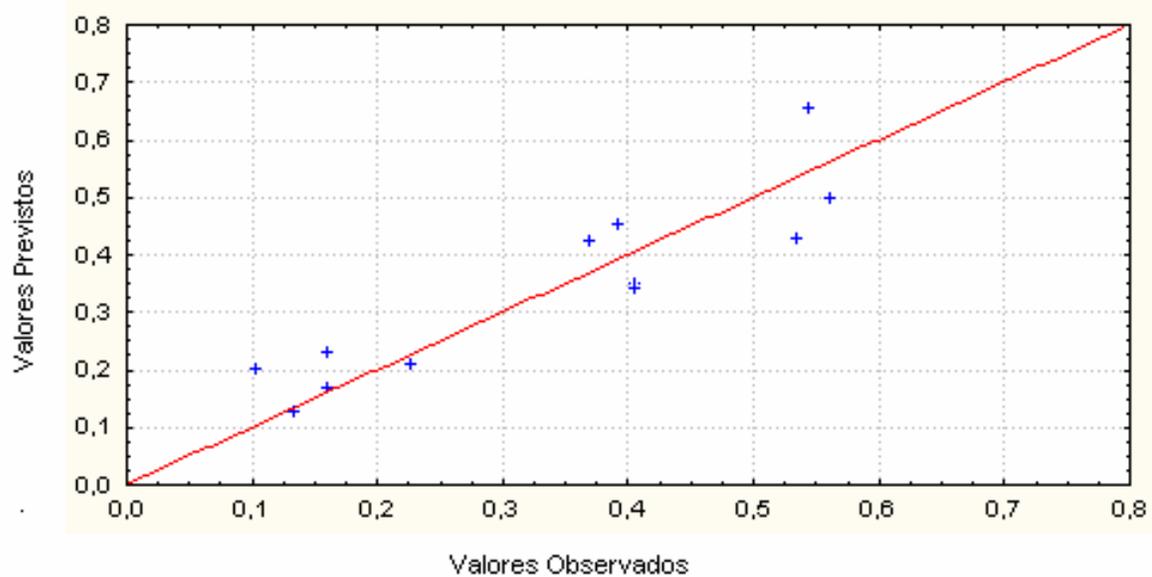


Figura 15- Relação entre valores previstos e os valores observados do modelo proposto, visando maior fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$) no hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto.

O modelo matemático resultante que descreve o fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$) no hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto é definido pela seguinte equação:

$$Y_5 = 0,341 + 0,0434 X_1 - 0,0921 X_2 - 0,0859 X_3 - 0,0764 X_1 X_2 + 0,0419 X_1 X_3 + 0,0574 X_2 X_3$$

em que:

Y_5 é o fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$), %

X_1 , X_2 e X_3 são os fatores resina, pH e adsorventes, respectivamente.

Este modelo prevê o favorecimento do aumento do fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$), trabalhando-se com a resina no seu nível máximo +1 (MN-150), o adsorvente e o pH do hidrolisado no seu nível mínimo -1 (carvão ativo) e (3,5), respectivamente.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

O tratamento do hidrolisado de aparas de eucalipto (concentrado 5,8 vezes) com carvão ativo, resina MN-150 e pH=3,5, reduz as concentrações de furfural e 5-hidroximetilfurfural totalmente. Este tratamento também reduz significativamente a concentração de ácido acético a nível não inibitório ao metabolismo da xilose pela levedura *Candida guilliermondii*.

Estatisticamente a melhor condição do tratamento foi alcançada com o hidrolisado (concentrado 5,8 vezes) tratado pela elevação do seu pH inicial para 3,5, adsorção com 2,4% de carvão ativo (a 30⁰C por 34,5 minutos) e passagem pela resina MN-150 (a 30⁰C com um fluxo de 0,9 mL/minuto e volume de leito de 200 mL). Estas condições garantiram a maior remoção de furfural, 5-hidroximetilfurfural e compostos aromáticos. Já a remoção de ácido acético, apesar de não ter sido a mais elevada (84%), apresentou um valor muito próximo da mesma (82,52%).

O melhor resultado para a bioconversão de xilose a xilitol (0,561 g/g) foi obtido com o hidrolisado (concentrado 5,8 vezes) tratado com carvão ativo em pH=3,5 e posterior passagem do mesmo pela resina A860S (ensaio 1). Porém, a estatística demonstrou que, utilizando-se a resina MN-150 ao invés da A860S pode-se alcançar um elevado fator de rendimento em xilitol (0,544 g/g), na melhor condição de tratamento (ensaio 2), para a remoção dos compostos inibidores.

O uso dos conceitos da estatística multivariada permitiram obter 5 modelos matemáticos que descreveram as variações das porcentagens de remoções dos inibidores, tais como: compostos aromáticos derivados da degradação da lignina solúvel em meio ácido e dos extrativos da madeira (Y_1), ácido acético (Y_2), furfural (Y_3) e 5-hidroximetilfurfural (Y_4), bem como do fator de rendimento em xilitol (Y_5):

$$Y_1 = 77,138 + 5,992 X_1 - 1,693 X_2 - 5,869 X_3 - 8,195 X_1 X_2 + 1,132 X_1 X_3 + 2,743 X_2 X_3$$

$$Y_2 = 52,100 - 10,984 X_1 - 4,150 X_2 - 3,449 X_3 - 24,050 X_1 X_2 + 0,288 X_1 X_3 + 7,298 X_2 X_3$$

$$Y_3 = 94,508 + 5,492 X_1 + 2,684 X_2 - 5,492 X_3 - 2,684 X_1 X_2 + 5,492 X_1 X_3 + 2,684 X_2 X_3$$

$$Y_4 = 94,088 + 5,912 X_1 + 1,118 X_2 - 2,929 X_3 - 1,118 X_1 X_2 + 2,929 X_1 X_3 + 0,468 X_2 X_3$$

$$Y_5 = 0,341 + 0,0434 X_1 - 0,0921 X_2 - 0,0859 X_3 - 0,0764 X_1 X_2 + 0,0419 X_1 X_3 + 0,0574 X_2 X_3$$

em que X_1 , X_2 e X_3 correspondem aos valores codificados das variáveis resina (FR), pH (FpH) e adsorvente (FA).

7 RECOMENDAÇÕES

Efetuar uma caracterização completa do hidrolisado quanto a qualificação e quantificação dos metais provenientes da corrosão do equipamento de hidrólise (Cr, Ni, Fe) e compostos aromáticos provenientes da lignina bem como outros compostos tais como os ácidos fórmico e levulínico.

Continuar realizando estudos sobre o tratamento do hidrolisado de aparas de eucalipto para melhorar a bioconversão de xilose em xilitol, empregando-se combinações de técnicas que permitam a remoção seletiva dos compostos que realmente exercem efeito tóxico no metabolismo de *Candida guilliermondii*.

Reproduzir em biorreator de bancada os melhores ensaios de fermentação obtidos em frascos e fim de se obter um estudo cinético do processo fermentativo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACEA, C.M. Efecto del Tratamiento Magnético en la Decoloración de Licores. In: **VII Congreso Internacional Sobre Azúcar y Derivados de La Caña**. Habana, Junio., 2002.
- 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.
- AGROFOLHA, Gás pode dobrar o potencial energético da sobra da cana. **Folha de São Paulo, Agrofolha**, São Paulo, 29 maio, 2001.
- AGUIAR, M.R.M.P., NOVAES, A.C., GUARINO, A.W.S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, n.6B, v.25, p.1145-1154, 2002.
- AHMEDNA, M., MARSHALL, W.E., RAO, R.M. Surface properties of granular activated carbons from agricultural by-products and their effects on raw sugar decolorization. **Bioresource Technology**, v.71, p.103-112, 2000a.
- AHMEDNA, M., MARSHALL, W.E., RAO, R.M. Production of granular activated carbons from agricultural by-products and evaluation of their physical, chemical and adsorption properties. **Bioresource Technology**, v.71, p.113-123, 2000b.
- ALMEIDA e SILVA, J.B., LIMA, U. A., TAQUEDA, M. E. S., GUARAGNA, F. G. Use response surface methodology for selection of nutrient levels for culturing *Paecilomyces variotii* in eucalyptus hemicellulosic hydrolysate. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 45-50, 2003.
- ALMEIDA e SILVA, J.B., LIMA,U.A, TAQUEDA, M.E.S., SOARES, C. M. F., GUARAGNA, F. G. Utilization of response surface methodology for study of acida hydrolysis of eucalyptus wood. **Boletín de la Sociedad chilena de Química**. Ano 2002, in press.
- ALMEIDA e SILVA, J. B. **Aplicação de modelagem matemática na produção proteína microbiana por *Paecilomyces variotii*, em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto**. São Paulo: FCF/USP, 1996. 160 p. (Tese de Doutorado).

- ALMEIDA e SILVA, J. B. **Utilização do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto para a produção de proteína microbiana.** Viçosa: UFV, 1991. 63 p. (Tese de Mestrado).
- ALVES, L.A. **Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar para a Produção Biotecnológica de Xilitol.** São Paulo, FAENQUIL/Faculdade de Engenharia Química de Lorena, 1997, 100 p, (Dissertação de mestrado).
- AMARTEY, S., JEFFRIES, T. An improvement in *Pichia stipitis* fermentation of acid-hydrolysed hemicellulose achieved by overliming (calcium hydroxide treatment) and strain adaption. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, p. 281-283, 1996.
- AZHAR, A.F., BERY, M.K., COLCORD, A.R. Factors Affecting Alcohol Fermentation of Wood Acid Hydrolysate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 11, p. 293-300, 1981.
- BAR, A. Xylitol. In: O'BRIEN NABORS L.; GELARDI, R. **Alternative Sweeteners.** New York: Marcel Dekker, p. 185-216, 1991.
- 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**, New York, v. 32, p. 125-234, 1976.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos.** Campinas: Editora UNICAMP, 1995. 299p.
- 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.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. S. **Statistics for experimenters: na introduction to design, data analysis and model building.** New York: John Wiley & Sons Inc., 1978, 653p.
- BRADY, J. E.; HUMISTON, G. E. **Química Geral 2.** São Paulo: Livros Técnicos e Científicos Editora LTDA, 1989, 601p.
- BRITO, J.O.; BARRICHELO, L.E.G.; COUTO, H.T.Z.; FAZZIO, E.C.M.; CARRADINI, L.; CARRARA, M.A.; MIGLIORINI, A.J. **Avaliação das**

características dos resíduos de exploração florestal de eucalipto para fins energéticos. Piracicaba:IPEF, 1979.(Circ. Tec.62).

CANETTIERI, V. E. **Aproveitamento do hidrolisado hemicelulósco de eucalipto para produção de xilitol utilizando projeto de experimentos.** Lorena: FAENQUIL, 1998, 98 p. (Tese de Mestrado).

CANETTIERI, E. V., ALMEIDA E SILVA, J. B., FELIPE, M. G. A. Application of factorial design to the study of xylitol production from *Eucalyptus* hemicellulosic hydrolysate. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 24, p. 159-168, 2001.

CANETTIERI, V.E.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; JUNIOR, J.A.C.; ROCH, G.J.M. Composition of eucalyptus grandis wood residues. In: **VII Congreso Internacional Sobre Azúcar y Derivados de la Caña.** Habana, Junio., 2002a.

CANETTIERI, E. V., ALMEIDA E SILVA, J. B., FELIPE, M. G. A. Obtenção biotecnológica de xilitol a partir de cavacos de eucalipto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 24, p. 159-168, 2002b.

CANETTIERI, V. E. **Obtenção dos Parâmetros e Estudo Cinético da Hidrólise Ácida dos Resíduos Florestais.** Guaratinguetá: UNESP, 2004, 92 p. (Tese de Doutorado).

CANILHA, L., ALMEIDA E SILVA, J. B., SOLENZAL, A. I. N. Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production. **Process Biochemistry**, *in press*, 2003a.

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

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: **VII Congreso Internacional Sobre Azúcar y Derivados de la Caña.** Habana, Junio., 2002.

CARVALHO, G. B. M.; ALMEIDA E SILVA, J. B. Principais açúcares obtidos da fração hemicelulósica das aparas de eucalipto através de hidrólise ácida. In: **I Congresso Brasileiro De Industrialização da Madeira e Produtos de Base Florestal.** Curitiba, PR, 17-19 Março, 2004.

CARVALHO, G. B. M., GINORIS, Y. P., CÂNDIDO, E. J., CANILHA, L., CARVALHO, W., ALMEIDA E SILVA, J. B. Estudo do Hidrolisado de Eucalipto em Diferentes Concentrações Utilizando Evaporação a Vácuo para Fins Biotecnológicos. **Revista Analytica**, n. 14, p. 54-57, 2005a.

- CARVALHO, G. B. M., GINORIS, Y. P., SILVA, C. C., CÂNDIDO, E, J., ALMEIDA E SILVA, J. B. Avaliação Preliminar do Tratamento do Hidrolisado Hemicelulósico de Eucalipto para fins Biotecnológicos. **Revista Analytica**, n. 17, p. 33-37, 2005b.
- CARVALHO, W., SILVA, S. S., SANTOS, J. C., CONVERTI, A. Xylitol production by Ca-alginate entrapped cells: comparison of different fermentation systems. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 58, v. 32, p. 553-559, 2003.
- CARVALHO, W., SANTOS, J.C., CANILHA, L., ALMEIDA E SILVA, J.B., FELIPE, M.G.A., MANCILHA, I.M., SILVA. A study on xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by Ca-alginate entrapped cells in a stirred tank reactor. **Process Biochemistry**, in press, 2004.
- CASTELLAN, G. **Fundamentos de Físico-Química**. Rio de janeiro: Livros Técnicos e Científicos S.A, 1999, 530p.
- 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.
- 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, nr. 45, p. 339-345, 2001.
- CONVERTI, A., DOMÍNGUEZ, J. M., PEREGO, P., ILVA, S. S., ZILLI, M. Wood hydrolysis and hydrolysate detoxification for subsequent xylitol production. **Chemical Engineering and Technology**, v. 23, nr. 11, p. 1013-1020, 2000a.
- CONSIDINE, D. M., ed **Chemical and process technology encyclopedia**. New York. MacGraw-Hill, 1974.
- CÔRREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1926-1978, v. 1, p. 475-482.
- CÔRREA, P. E. O., RAMOS, R. M., SILVA, S. S., MANCILHA, I. M. Avaliação do fator de concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar no crescimento e consumo de açúcares por *Candida guilliermondii*. In: **Congresso Brasileiro de Engenharia Química – Iniciação Científica**. 1, São Carlos, SP. 8-10 ago., 1995. Anais.
- CORONADO, C.; NÁPOLES, A..I. Estudio Bibliográfico de la Producción de Xilosa y Xilitol. In: VII **Congreso Internacional Sobre Azúcar y Derivados de la Caña**. Habana, Junio., 2002.

- COUTINHO, A.R., BARBIERI, F.C., PAVANI, P.A. Preparação de carvões ativados a partir de fibras de celulose. In: **II Encontro Brasileiro Sobre Adsorção**, Florianópolis, 2000, p 139-144.
- COUTO, L., DANIEL, O., GARCIA, R., BROWERS, W., DUBÉ, F. **Sistemas Agroflorestais com Eucalipto no Brasil: uma visão geral**. Documento SIF nr. 17, Viçosa, 49p. 1998.
- CRUZ, J. M., DOMÍNGUEZ, J. M., DOMÍNGUEZ, H., PARAJÓ, 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, nr. 2, p. 147-153, 1999.
- DECHOW, F. J. **Separation and Purification Techniques in Biotechnology**. New Jersey: Noyes Publications, 1989p.
- DEKKER, R. F. H. The enzymatic hydrolysis of biomass. In: **Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassa**, 2, Maringá, 1985, Universidade Estadual de Maringá, 1985, p. 11-13.
- 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.
- du TOIT, P. J., OLIVIER, S. P., VAN BILJON, P. L. Sugar cane bagasse as possible source of fermentable carbohydrates. I. Characterization of bagasse with regard to monosaccharide. Hemicellulose and acid composition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, p. 1071-1078, 1984.
- EL BASSAM, N. ed. **Energy Plant Species: Their Use and Impact on Environmental and Development**. James & James, London, UK: 321p. 1998.
- EMODI, A. Xylitol: Its Properties and Food Applications. **Food Technology**, January, p. 28-32, 1978.
- ERRAMOUSPE, J., HEYNEMAN, C. A. Treatment and prevention of otitis media. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 34, nr. 12, p. 1452-1468, 2000.
- EUREC. Agency the Future for Renewable Energy. Cap. I: **Biomass**. James & James ed., London, UK: 209p.1996.
- FAO (Food Agriculture Organization Of the United Nations) Disponível na Internet vi www. URL: <http://www.fao.org> em 02/04/01.
- FAVERI, D. D., TORRE, P., PEREGO, P. CONVERTI, A. Statistical investigation on the effects of starting xylose concentration and oxygen mass flowrate on xylitol

production from rice straw hydrolysate by response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, n. 3, v. 65, p. 383-389, 2004.

FEARNSIDE, P. M. Plantation forestry in Brazil: Projections to 2050. **Biomass and Bioenergy**, v. 15, nr. 6, p. 437-450, 1998.

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 Biotecnologia**. v. 36, n. 1, 1993.

FELIPE, M.G.A. **Obtenção de Xilitol para fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. São Paulo, USP/Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 1994, 141p. (Tese de doutorado).

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. 6, n. 1, p. 73-79, 1996b.

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

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

FELIPE, M.G.A., SILVA, S. S., RODRIGUES, R. C. L.. B. VITOLO, M. PILLAR, M. V. Effect of Phenol Concentration on the Xylose-Xylitol Bioconversion by *Candida guilliermondii*. In: **XXI Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**, Colorado (USA), 2-6 maio 1999.

FELIPE, M. G. A. Xilitol: Uma abordagem enzimática no metabolismo de xilose durante fermentações do hidrolisado de bagaço de cana de açúcar. In: **VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, Rio de Janeiro, 05-07 abril 2004, p 143.

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

FERRAZ, A. Processos Fermentativos e Enzimáticos. In **Biotecnologia Industrial**, São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001, p 465-484.

- FÖRSTER, H. Comparative Metabolism of Xylitol, Sorbitol and Fructose. In: SIPPLE, H.L., McNUTT, K.W. eds. **Sugar in Nutrition**. New York: Academic Press, 1974. p. 259.
- 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.
- FULLER, G., McKEON, T. A., BILLS, D. D. (eds). **Agricultural Materials as Renewable Resources: Nonfood and Industrial Applications**. Washington: American Chemical Society, 1996 (ACS Symposium Series), 647p.
- FUNK, H. F. Recovery of Pentoses and Hexoses from Wood and other Material Containing Hemicellulose, and Further Processing of C₅- and C₆- Components. **Applied Polymer Symposium**. nr. 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, nr. 3, p. 203-206, 1996.
- GALES, M. A., NGUYEN, T. M. Sorbitol compared with xylitol in prevention of dental caries. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 34, nr. 1, p. 98-100, 2000.
- GINORIS, Y. P, **Avaliação de Tratamentos do Hidrolisado de Eucalipto para a Produção Biotecnológica de Xilitol por *Candida guilliermondii***. (Dissertação de Mestrado), p.81,82, 2001.
- GÍRIO, F. M., AMARO, C., AZINHEIRAL, H., PELICA, F., AMARAL-COLLAÇO, M. T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. **Bioresearch Technology**, v. 71, nr. 3, p. 245-251, 2000.
- GÍRIO, F. M., DUARTE, L.C., CARVALHEIRO, F., NEVES, I. Effects of Acids, Furfural and Phenolic Compounds on *Debaryomyces hansenii* CCM1 941. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 121-124, p. 413-425, 2005.
- GUTIÉRREZ, T., BUSZKO, M. L., INGRAM, L. O., PRESTON, J. F. Reduction of Furfural to Furfuryl Alcohol by Ethanologenic Strains of Bacteria and Its Effect on Ethanol Production from Xylose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. V. 98-100, p.237-240, 2002.
- HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v.16, nov. 1994.
- HARLAND, C.E. **Ion Exchange: Theory and Practice**-Second edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry Paperbacks, 1994, 285p.

- HEIKKILÄ, H., NURMI, J., RAHKILA, L., TOYRYLA, M. **Method for Production of Xylitol**. Patents. 081,026. Jan. 14, 1992.
- HERRERO, A.A., GOMES, R.F., SNEDUOR, B., TOLMAN, C., ROBERTS, M.F. Growth Inhibition of *Clostridium thermocellum* by Carboxylic Acid: A Mechanism Based on Uncoupling by Weak Acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 53-62, 1985.
- HYVÖNEN, L.; KOIVISTOINEN, P.; VOIROL, F. Food Technological Evaluation of Xylitol. **Advances in Food Research**, v. 28, p. 373-403, 1982.
- JEFFRIES, T.W. Utilization of Xylose by Bacteria, Yeasts and Fungi. **Advances in Biochemical Engineering**, New York, v. 27, p. 1-32, 1983.
- KONDARZEWSKY, M., FELIPE, M. G. A., MATOS, G. S., BERNARDI, F. P., RODRIGUES, R. C. L. B. Atividade das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii* em fermentações contendo xilose ou arabinose como fontes de carbono. In: **VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, Rio de Janeiro, 05-07 abril 2004, p 151.
- KHUAD, R. C., SINGH, A., Lignocellulosic biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, nr. 2, p. 151-172, 1993.
- KUSUMEGI, K., YOSHIDA, H., TOMIYAMA, S. inhibitory Effects of Acetic Acid on Respiration and Growth of *Zygosaccharomyces rouxii*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.85, p. 213-217, 1998.
- LAPLACE, J. M., DELGENES, J. P., MOLETTA, R., NAVARRO, J. M., Alcoholic Fermentation of Glucose and Xylose by *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*: Oxygen Requirement as a Key Factor. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p. 158-162, 1991.
- LEE, Y.Y., McCASKEY, T.A. Hemicellulosic Hydrolysis and Fermentation of Resulting Pentoses to Ethanol. **Tappi Journal**, v. 66, n. 5, p. 102-107, 1983.
- LIMA, L. H. A., BERLINCK, C. N. Xilitol, o adoçante do futuro. **Ciência Hoje**, v. 33, n. 195, p. 66-69, 2003.
- LIMA, L. H. A., FELIPE, M. G. A., VITOLO, M., TORRES, F. A. G. Effect of Acetic Acid present in Bagasse Hydrolysate on the activities of Xylose reductase and Xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 65, p. 734-738, 2004.

- LINGSTROM, P., LUNDGREN, F., BIRKHED, G., TAKAZOE, I., FROSTELL, G. Effects of frequent mouthrinses with palatinose and xylitol on dental plaque. **European Journal of Oral Sciences**, v. 105, nr. 2, p. 162-169, 1997.
- LOHMEIER-VOGER, E.M., SOPHER C.R., LEE, H. intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** v. 20, p. 75-81, 1998.
- MAKINEN, K. K. Can the pentitol-hexitol theory explain the clinical observation made with xylitol? **Medical Hypotheses**, v. 54, nr. 4, p. 603-613, 2000.
- MAKINEN, K.K. Xylitol: The Sugar That Prevents Tooth Decay. **The Futurist**, June, p. 135-139, 1976.
- MANZ, U.; VANNINEN, E.; VOIROL, F. Xylitol - Its Properties and Use as a Sugar Substitute in Foods. In: **Food R. A. Symp. Sugar and Sugar Replacements**, London, 10 oct., 1973.
- 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 *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1677-1683, 2003.
- MARTON, J.M., FELIPE, M.G.A., ALMEIDA E SILVA, J.B., PESSOA JUNIOR, A. Avaliação de carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana empregando planejamento de experimentos. **Revista Analytica**, n.3, p.45-53, 2003.
- MATTILA, P. T., KNUUTTILA, M. L. E., SVANBERG, M. J. Dietary xylitol supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin-diabetic rats. **Metabolism-clinical and Experimental**, v. 47, nr. 5, p. 578-583, 1998a.
- MATTILA, P.T., SVANBERG, M.J., POKKA, P., KNUUTTILA, M.L.E. Dietary xylitol protects against weakening of bone biomechanical properties in ovariectomized rats. **Journal of Nutrition**, v. 128, n. 10, p. 1811-1816, 1998b.
- MATTILA, P., KNUUTTILA, M., KOVANEN, V., SVANBERG, M. Improved bone biomechanical properties in rats after oral xylitol administration. **Calcified Tissue International**, v. 64, nr. 4, p. 340, 1999.
- MELAJA, A.J., HÄMÄLÄINEN, L. **Process for Making Xylitol**. US Patent. 4.008.285. Dep. 18jun. 1975. Publ. 15fev., 1977.

- MENDHAM, J., DENNEY, R.C., BARNES, J.D., THOMAS, M. **Vogel - Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos S.A, 2002, 139p.
- 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.
- 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.
- MORENO, P.L.G. Relación entre la Estructura Química y el Dulzor de los Edulcorantes. In: **VII Congreso Internacional Sobre Azúcar Y Derivados De La Caña**. Habana, Junio., 2002.
- MIKKOLA, J.P., SALMI, T. In-situ ultrasonic catalyst rejuvenation in three-phase hydrogenation of xylose. **Chemical Engineering Science**, v.54, p.1583-1588, 1999.
- MIKKOLA, J.P., SALMI, T. Three-phase catalytic hydrogenation of xylose to xylitol – prolonging the catalyst activity by means of on-line ultrasonic treatment. **Catalysis Today**, v.64, p.271-277, 2001.
- MIKKOLA, J.P., SJÖHOLM, R., SALMI, T., MÄKI-ARVELA, P. Xylose hydrogenation: Kinetic and NMR studies of the reaction mechanisms. **Catalysis Today**, v.48, p.73-81, 1999.
- 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, 2002.
- MUSSATO, S. I., ROBERTO, I. C. Xylitol production from high xylose concentration: evaluation of the fermentation in bioreactor under different stirring rates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 331-337, 2003.
- MUSSATTO, S. I., ROBERTO, I. C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, v. 93, p. 1-10, 2004a.
- MUSSATTO, S. I., ROBERTO, I. C. Optimal experimental condition for hemicellulosic hydrolysate treatment with activated charcoal for xylitol production. **Biotechnol. Prog**, v.20, p. 134-139, 2004b.
- NAMASIVAYAM, C., KADIRVELU, K. A. Activated carbons prepared from coir pith by physical and chemical activation methods. **Bioresource technology**, v.62, p.123-127, 1997.

- NÁPOLES, A.I., SILVA, S.S., MANCILHA, I.M., FELIPE, M.G.A., ACOSTA, E., VILLA, P., CEPERO, I., GONZÁLEZ, M., MANGANALLY, E. Application of Ion-Exchange Resins to Upstream Processing of Sugar Cane Bagasse Hydrolysate for its Utilization in Bioprocesses. In: **II European Symposium on Biochemical Engineering Science**. Porto, Sep., 1998.
- NARANJO, M.E.; BARQUINERO, E.; NÁPOLES, A.I.; CEPERO, I.; GONZÁLEZ, M.; MANGANALLY, E.; RODRÍGUEZ, E. Purificación de Hidrolisados Hemicelulósicos de Bagazo de Caña de Azúcar Mediante Corriente de Ozono. In: **VII Congreso Internacional Sobre Azúcar y Derivados de la Caña**. Habana, Junio., 2002.
- NOLLEAU, V.; PREZIOSI-BELLOY, 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.
- NOLLEAU, V., PREZIOSI-BELLOY, L., NAVARRO, J. M. The reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*: Incidence of oxygen and pH. **Biotechnology Letters**, v. 17, nr. 4, p. 417-422, 1995.
- ODUMERO, J. A., D'AMORE T., RUSSEL I., STEWART, G. G., **Effect of Heat and Ethanol Stress on the Viability of a *Saccharomyces uvarum* (carlsbergensis)**. Brewing Yeast Strain during fermentation of High Gravity Wort, v. 10, p. 111-116, 1992.
- OLIVEIRA, H. P. Aproveitamento do bagaço de cana como combustível nas usinas e destilarias. **Brasil Açucareiro**, v. 45, p. 20-30, 1980.
- ONISHI, H.; SUZUKI, T. The Production of Xylitol, L-Arabinitol and Ribitol by Yeasts. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokio, v. 30, n. 11, p. 1139-1144, 1966.
- 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., DOMÍNGUEZ, H., DOMÍNGUEZ, J. M. Charcoal Adsorption of Wood Hydrolysate for Improving their Fermentability: Influence of the Operational Conditions. **Bioresource Technology**, v. 57, p. 179-185, 1996a.
- PARAJÓ, J. C., DOMÍNGUEZ, H., DOMÍNGUEZ, J. M. Production of xylitol from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii*: Effect of the initial cell concentration. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 5, p. 593-598, 1996c.
- PARAJÓ, J. C., DOMÍNGUEZ, H., DOMÍNGUEZ, J. M. Xylitol production from

- Eucalyptus* wood hydrolysates extrated with organic solvents. **Process Biochemistry**, v. 32, nr. 7, p. 599-604, 1997a.
- PARAJÓ, J. C., DOMÍNGUEZ, H., DOMÍNGUEZ, J. M., Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 18-24, 1997b.
- PARAJÓ, J.C., DOMÍNGUEZ, H., DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological Production of Xylitol. Part. 3: Operation in Culture Media Made from Lignocellulose Hydrolysates. Review. **Bioresearch Technology**, v. 66, p.25-44, 1998b.
- PERRY, R. H., GREEN, D.W. Perry's Chemical Engineering Handbook. Seven edition, McGraw-Hill, New York, USA (1997).
- PRATA, A. M. R. **Avaliação do Hidrolisado Celulósico de Bagaço de Cana-de-Açúcar para obtenção de Ácido Cítrico**. Viçosa: UFV, 1989. 72p. (Tese de Mestrado).
- PRATA, A. M. R. **Obtenção de 2, 3 Butanodiol a partir de Hidrolisado Hemicelulósico de Eucalipto em Regime Descontínuo Alimentado**. São Paulo: FCF/USP, 125 p., 1997. (Tese de Doutorado).
- PUROLITE. (Resins). Disponível na internet via: <http://www.puroliteusa.com> em 1998.
- RIPOLI, T. C., MIALHE, L. G., BRITO, J. O. Queima de canaviais – o desperdício não mais admissível. **Álcool e Açúcar**, v. 54, p. 18-23, 1990.
- RIBEIRO, M. H.L., LOURENÇO, P.A.S., MONTEIRO, J.P., DIAS, S. F. Kinetics of selective 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., 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.
- ROBERTO, I. C., MANCILHA, I.M., SOUZA, C.A., FELIPE, M.G.A., SAIO, S., CASTRO, H.F. Evaluation of Rice Straw Hemicellulosic Hydrolysate in the Production of Xylitol by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letter**. v. 16, n. 11, p. 1211-1216, 1994.
- 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.

- ROCHA, G. J. M. **Deslignificação de Bagaço de Cana de Açúcar assistida por Oxigênio**. São Paulo: Instituto de Química de São Carlos-USP, 2000, 136 p. (Tese de Doutorado).
- RODRIGUES, D. C. G. A., SILVA, S. S., FELIPE, M. G. A. Fed-batch culture of *Candida guilliermondii* FTI 20037 for xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate. **Letters Applied Microbiology**. V. 29, p.359-356, 1999.
- RODRIGUES, R. C. L. B., FELIPE, M. G. A., ROBERTO, I. C., VITOLO. Batch Xylitol Production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 from Sugarcane bagasse Hemicellulosic Hydrolysate at Controlled pH Values. **Bioprocess Bio. Eng.** p. 103-107, 2003.
- 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*. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 165, p. 484-490, 1991.
- SADDLER, J. N., YU, E. K. C., MÊS-HARTREE, M., LEVITIN, N., BROWNELL, H.H. Utilization of enzymatically hydrolysed wood hemicelluloses by microorganisms for production of liquid fuels. **Applied and Environmental microbiology**, v. 45, nr. 1, p. 153-160, 1983.
- SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of Furfural and 5-Hydroxymethylfurfural on the Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and Biomass Production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme Microbial and Technology**, Surrey, v. 10, p.315-318, 1988.
- SANROMÁN, M.A., DOMINGUEZ, H., NUFJES, M.J. **Xilitol: Un Alcohol con Futuro**, In: AFINIDAD XLVIII, Julio-Agosto, 1991.
- SENE, L., FELIPE, M. G. A., VITOLO, M., SILVA, S. S., MANCILHA, I. M. Adaptation and reutilization of *Candida guilliermondii* cells for xylitol production in bagasse hydrolysate. **Journal of Basic Microbiology**, v. 38, nr. 1, p. 61-69, 1998.
- SCHNEIDER, H. Selective removal of acetic acid from hardwood-spent sulfite liquor using mutant yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 94-98, 1996.
- SILVA, S. S., FELIPE, M. G. A., ALMEIDA e SILVA, J. B., PRATA, A .M. R. Acid hydrolysis of *Eucalyptus grandis* chips for microbial production of xylitol. **Process Biochemistry**, v. 33, nr. 1, p. 63-67, 1998.

- 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, 2001.
- SILVA, D. D. V., FELIPE, M. G. A., RODRIGUES, R. C. L. B. Influência da relação glicose/xilose nas atividades das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase de *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado de bagaço de cana. In: **VI Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**, Rio de Janeiro, 05-07 abril 2004a, p 155.
- SILVA, D. D. V., FELIPE, M. G. A., MANCILHA, I. M., LUCHESE, R. H., SILVA, S. S. Inhibitory Effect of Acetic Acid on Bioconversion of Xylose in Xylitol by *Candida guilliermondii* in Sugarcane Bagasse Hydrolysate. V. 35, p. 248-254, 2004b.
- SINGH, A., MISHRA, P. Microbialpentose utilization. **Current applications in Biotechnology. Progress in Industrial Microbiology**. Elsevier Science, v.33, 1995.
- SIRISANSANEEYAKUL, S., SATANISZEWSKI, M., RIZZI, M. Screening of yeasts for Production of xylitol from D-xylose. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. V. 80, nr. 6, p. 565-570, 1995.
- SKOOG, K., HAHN-HÄGERDAL, B. Effect of Oxygenation on Xylose Fermentation by *Pichia stipitis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, nr. 11, p. 3389-3394, nov. 1990.
- SLININGER, P.J.; BOLEN, P.L.; KURTZMAN, C. *Pachysolen tannophilus*: Properties and Process Consideration for Ethanol Production from D-Xylose. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v.9, p. 5-15, 1987.
- SOUSA, G.P., FILGUEIRA, M., ROSENTHAL, R., HOLANDA, J.N.F. Characterization of natural diatomaceous composite material. **Cerâmica**, v.49, p.40-43, 2003.
- 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, ne. 4, p. 239-244, 1995.
- SWIATKOWSKI, A. Industrial Carbon Adsorbentes. In: Adsorption and its Applications in Industry and Environmental Protection. **Studies in Surface Science and Catalysis**, Dabrowski, A. (ed), v.120, p.69-93, 1998.
- 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**, Amsterdam, v. 16, p. 29-41, 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, 1986.
- TSAO, G.T. Cellulosic material as a renewable resource. **Process Biochemistry**, v.10, p.12-14, 1978.
- TOUSTER, O. The Metabolism of Polyols. In: SIPPLE, H.L., McNUTT, K.W. eds. **Sugars in Nutrition**. New York: Academic Press, 1974. p.229.
- 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, 1986.
- UHARI, M., TAPIAINEN, T., KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, v. 19, n. 144-147, Suppl. 1, 2000.
- VANDESKA, E., KUSMANOVA, 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, 1996.
- VANDESKA, E.; KUZMANOVA, S.; JEFFRIES, T.W. Xylitol formation and key enzyme activities in *Candida Boidinii* under different oxygen transfer rate. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 80, nr. 5, p. 513-516, 1995a.
- 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.213-218, 1995b.
- VERDE, M. V. **Aplicações de resinas de troca iônica no tratamento de hidrolisado hemicelulósico para processos fermentativos**. Lorena: DEBIQ-FAENQUIL, 2001, 79p. (Tese de Mestrado).
- VILLA, P., FELIPE, M.G.A., RODRIGUEZ, R.C.L.B., VITOLO, M., REIS, E.L., SILVA, S. S., NÁPOLES, A.I., MANCILHA, I.M. Influence of Phenolic Compounds on the Bioprocess of Xylitol Production by *Candida guilliermondii*. In: **II European Symposium on Biochemical Engineering Science**. Porto, sep, 1998.
- WANG, Y.M., van EYS, J. Nutritional Significance of Fructose and Sugar Alcohols. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v.1, p.437-475, 1981.
- WATSON, N.E., PRIOR, B.A., du PREEZ, J.C., LATEGAN, P.M. Oxygen Requirement for the Xylose Fermentation to Ethanol and Polyols by *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 6, p. 447- 450, 1984.
- WEBB, S.R.; LEE, H. Regulation of Xylose Utilization by Hexoses in Pentose-

- Fermenting Yeasts. **Biotechnology Advances**, Oxford, v.8, p. 685-697, 1990.
- WEIGERT, B., KLEIN, O., RIZII, M., LAUTERBACH, O., DELLWEG, H. Xylose Fermentation by Yeast, Influence of Furfural on the Aerobic Growth of the Yeast *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 10, n. 12, p. 895-900, 1988.
- WYMAN, C. E., GOODMAN, B. J. Biotechnology for Production of Fuels. Chemicals and Material from Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 39/40, p. 41-59, 1993.
- WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering** , v.86,n.1, p. 1-14, 1998.
- WINKELHAUSEN, E., PITTMAN P., KUZMANOVA, S., JEFFRIES, T. W. Xylitol formation by *Candida boidinii* in oxygen limited chemostat culture. **Biotechnonology Letters**, v. 18, nr. 7, p. 753-758, 1996.
- YLIKAHRI, R. Metabolic and Nutritional Aspects of Xylitol. **Advances in Food Research**, New York, v. 25, p. 159-180 1979.

9 APÊNDICE

Tabela A1- Variação da concentração de xilose e ácido acético em g/L na fermentação do hidrolisado hemicelulósico de aparas de eucalipto submetido a diferentes tratamentos.

Ensaio	Xilose		Ácido acético	
	Inicial*	Final**	Inicial*	Final**
01	23,740	0,368	3,709	2,343
02	34,290	0,402	1,701	0,402
04	17,450	0,0656	0,411	0,398
04	23,600	1,286	3,279	2,840
05	41,370	5,915	3,871	3,356
06	42,880	0,000	1,440	0,490
07	36,540	0,326	1,471	0,000
08	17,500	1,674	1,909	1,807
09	42,850	0,000	1,441	0,492
10	42,831	0,000	1,443	0,488
11	17,512	1,670	1,910	1,805
12	17,509	1,665	1,911	1,802
13	34,295	0,399	1,703	0,405
14	34,296	0,401	1,702	0,403
15	17,461	0,0665	0,413	0,395
16	17,455	0,0644	0,409	0,397

Inicial* - Concentração inicial de fermentação.

Final** - Concentração em 96 horas de fermentação.

Tabela A2- Variação da concentração celular em g/L da levedura *Candida guilliermondii* no hidrolisado de aparas de eucalipto em diferentes tempos de fermentação.

Ensaio	Concentração de células (g/L)				
	Início	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas
01	4,296	5,322	5,709	6,259	6,649
02	4,305	8,001	8,235	8,785	9,175
03	6,063	6,844	11,186	11,736	12,126
04	7,671	8,593	8,696	9,246	9,636
05	5,834	6,445	7,284	7,834	8,224
06	8,130	9,162	10,136	10,686	11,076
07	8,668	9,311	10,128	10,678	12,988
08	8,741	9,545	9,578	10,128	10,518
09	8,131	9,164	10,137	10,684	11,077
10	8,129	9,166	10,134	10,679	11,074
11	8,742	9,544	9,576	10,126	10,519
12	8,744	9,542	9,575	10,123	10,516
13	4,303	8,011	8,233	8,784	9,172
14	4,301	8,013	8,231	8,786	9,173
15	6,062	6,846	11,188	11,732	12,125
16	6,066	6,845	11,186	11,733	12,128

Tabela A3 – Características principais do carvão ativo *SYNTH* utilizado no presente trabalho.

Características	
Número de Iodo	890 mg/g
Umidade	3,87%
Cinzas	4,51%
Adsorção em Azul de Metileno	16,10g/100g
Teor de Ferro	650 ppm
Índice de Melão	174
pH	10,20

Tabela A3 – Características principais da Terra Diatomácea calcinada e purificada *REAGEN* utilizada no presente trabalho.

Especificações	Limite Máximo de Impurezas
Solúveis em HCl a 10%	1,0%
Perda por ignição	10,0%
Sulfatos (SO ₄)	0,01%
Ferro (Fe)	0,05%
Carbonato	ausente
Impurezas Orgânicas	Passa no teste

Tabela A4– Características principais da resina MACRONET MN-150 PUROLITE utilizada no presente trabalho.

Características Física e Química Típicas	
Estrutura da Matriz Polimérica	Poli(estireno)
Aparência Física	Leito esférico laranja acastanhado
Leito Cheio	>90%
Grupo funcional	Terc-amino
Capacidade de adsorção	0,5 eq/L
Concentração	670-700 g/L (42-44 lbs/ft ³)
Granulometria	16-50 Mesh
Tamanho do grão	5% Max>1,2 mm; 1% Max<0,3 mm
Volatilidade (mistura) %	51-56
Fator de Inchaço/Encolhimento, Max	±5%
Densidade específica	1,04 g/mL
Área Superficial específica	900-1200 m ² /g
Volume do Poro	0,6-0,8 mL/g
Limites de Temperatura	<120 °C
Escala de pH (Estabilidade)	0-14

Tabela A5- Características principais da resina aniônica A860S *PUROLITE* utilizada no presente trabalho.

Características Física e Química Típicas	
Estrutura da Matriz Polimérica	Gel Acrílico
Aparência Física	Leito esférico branco opaco
Leito Cheio	95%Min
Grupo Funcional	Amônia Quaternária
Forma Iônica (como troca)	Cl ⁻
Concentração	680-715 g/L (42,5 – 44,5 lb/ft ³)
Granulometria	14-52 Mesh
Tamanho do Grão	+1,2mm<5%: -0,3mm<1%
Retenção na Mistura, forma Cl ⁻	66-72%
Irreversibilidade Inchada	10%Max
Reversibilidade Inchada Cl ⁻ → OH ⁻	15%Max
Densidade Específica	1,09 g/mL
Capacidade Total de Troca, forma Cl ⁻	0,8 eq/L.minuto
Temperatura de Operação (Max)	40 ^o C (100 ^o F)
Escala de pH (Estabilidade)	Sem limites