FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGIA

PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

APROVEITAMENTO DO HIDROLISADO DE PALHA DE TRIGO PARA A OBTENÇÃO DE XILITOL POR VIA MICROBIANA

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

Banca examinadora:

Dr. João Batista de Almeida e Silva (presidente)
Dr Urgel de Almeida Lima
Dra Maria das Graças A. Felipe

Faculdade de Engenharia Química de LORENA
2394
CEBIQ
T272

FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA DE LORENA
FAENQUIL
T272
BIBLIOTECA

Tranferido da Biblioteca do DEBIQ para a Bilblioteca Universitária em Junho/2004
Proc. n° 202/04

Estudante:

Larissa Canilha

Lorena - SP -Brasil
2002

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

APROVEITAMENTO DO HIDROLISADO DE PALHA DE TRIGO PARA A OBTENÇÃO DE XILITOL POR VIA MICROBIANA

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
2002

Dedico este trabalho:

a minha vó, *Joca*;

aos meus pais, *Gustavo e Jussara;*

aos meus irmãos, *Melissa e Gustavo;*

a minha sobrinha, *Julia;*

pelo carinho e presença constante.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

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

Ao Departamento de Biotecnologia-FAENQUIL pela oportunidade da realização do Mestrado.

Aos Professores e Pesquisadores do DEBIQ- FAENQUIL, em especial Adilson, André, Arnaldo Márcio, George, Graça, Inês Roberto, Silvio Silvério, pelos ensinamentos, sugestões e amizade.

Ao "chegado" Paulo Roberto, amigo inseparável nas "horas mais difíceis".

Aos amigos queridos, André, Brexola, Daniel, Denise(X), Ely, Ernesto, Giovanni, Giuliano, Helen, Júlio, Lili, Mabel, Marcelo, Marta, Priscila, Sandrinha, Solange, Waltinho (B1), Yovanka, Zuzel e a todos os colegas pela amizade, carinho e ajuda nos momentos precisos.

Aos funcionários da FAENQUIL, Ana Márcia, André Prado, Cristina, Glauciele, Isnaldi, Lucinha, Ludmila, Maria Eunice, Nicamor, Regina, Renato, Rita, Sandra, Teresinha, Valkíria, Zé Carlos e Zé Moreira e todos que colaboraram para a realização deste trabalho.

A FAPESP, pela bolsa de Mestrado concedida.

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

BIOGRAFIA

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

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

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

Em setembro de 1999, ingressou no curso de Pós- Graduação em Biotecnologia Industrial, em nível de Mestrado, no Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Lorena, SP.

RESUMO

Aproveitamento do hidrolisado de palha de trigo para obtenção de xilitol por via microbiana. Larissa Canilha. 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, CP116, 12600-970, Lorena, SP, Brasil). Banca Examinadora: Dra. Maria das Graças Almeida Felipe e Dr. Urgel de Almeida Lima. Fevereiro de 2002.

Materiais lignocelulósicos, como a palha de trigo, são fontes abundantes e renováveis de carboidratos que podem ser utilizados em bioprocessos. Seus maiores componentes, celulose, hemicelulose e lignina, variam entre espécies vegetais. O conteúdo da hemicelulose é superior das outras frações. A fração hemicelulósica pode ser separada por tratamento ácido liberando a xilose.

A influência da temperatura, concentração ácida, relação massa seca:solução ácida, na hidrólise da palha de trigo foi estudada.

Inicialmente, a palha de trigo foi moída e seca antes da hidrólise. As hidrólises foram conduzidas em condições determinadas por um planejamento fatorial, para identificar os fatores importantes no processo.

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

$$Y = 15{,}2443 + 3{,}181*X_1 + 2{,}84*X_2 + 3{,}65471*X_1^2 - 1{,}9625*X_1X_2$$

em que Y representa o rendimento de xilose em relação à palha de trigo (%), X_1 a temperatura em °C, X_2 a concentração ácida (%).

A metodologia desenvolvida dentro das condições estudadas, permitiu estabelecer qual a melhor condição de hidrólise para obter o máximo de extração de xilose e, consequentemente o máximo de rendimento (26,2 %).

A maior concentração de xilose foi encontrada em hidrolisado de palha de trigo obtido tratado com 1% de solução ácida na proporção de 1:15 de palha seca:solução ácida, temperatura de 140°C por 20 minutos de tempo de reação.

ABSTRACT

Lignocellulosic materials, such as wheat straw, are abundant and renewable sources of carbohydrates that can be used in bioprocesses. Their largest components, cellulose, hemicellulose and lignin, vary between species. The amount of hemicellulose, and therefore xylose, is higher than other fraction. The hemicellulose fraction can be easily removed by acid treatment.

The influence of temperature, acid concentration, and the effect of the relation between dry matter of straw and acid solution on hydrolysis procedures were studied.

The wheat straw was ground and dried before the hemicellulose hydrolysis, carried out under planned conditions for a centered face factorial design, to identify the main factors affecting the process.

The assays resulted in a mathematical model representing the parameters involved in the process:

$$Y = 15{,}2443 + 3{,}181*X_1 + 2{,}84*X_2 + 3{,}65471*X_1^2 - 1{,}9625*X_1X_2$$

in which Y means the yield (%), X_1 the temperature (°C) and X_2 the acid concentration (%).

The methodology developed under the outlined state allowed to establishing the best acid hydrolysis conditions to reach the highest extraction and the maximum yield of xylose (26.2 %).

The highest amount of xylose (15.37 g/L) was reached in a wheat straw hydrolysis with a 1 % sulphuric acid concentration in a proportion of 1:15 between straw dry matter and acid solution, at a temperature of 140°C in 20 minutes of time reaction.

CONTEÚDO

1 INTRODUÇÃO 1

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 3

2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS 3

2.1.1 PALHA DE TRIGO 6

2.2 PROCESSOS HIDROLÍTICOS 7

2.3 XILITOL 11

2.3.1 PROPRIEDADES E APLICAÇÕES 11

2.3.2 VIAS DE OBTENÇÃO 15

2.4 FATORES QUE INFLUENCIAM A BIOCONVERSÃO XILOSE - XILITOL 18

2.4.1 PRESENÇA DE GLICOSE 19

2.4.2 CONCENTRAÇÃO INICIAL DE XILOSE 20

2.4.3 AERAÇÃO 21

2.4.4 pH 22

2.4.5 TEMPERATURA 23

2.4.6 FONTE DE NITROGÊNIO 23

2.4.7 CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS NO INÓCULO 24

2.5 CARACTERÍSTICAS DOS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS 24

3 MATERIAL E MÉTODOS 27

3.1 PALHA DE TRIGO 27

3.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE TRIGO 27

3.3 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO 28

3.4 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO 29

3.4.1 PLANEJAMENTO FATORIAL 2^{4-1} COM PONTO CENTRAL 30

3.4.2 PLANEJAMENTO FATORIAL COMPOSTO DE FACE CENTRADA 31

3.5 EXECUÇÃO DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO 32

3.5.1 CONCENTRAÇÃO DO HIDROLISADO 32
3.5.2 TRATAMENTO DO HIDROLISADO 33
3.5.3 MICRORGANISMO E PREPARO DO INÓCULO 34
3.5.4 CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO 34
3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS 35
3.6.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE DA PALHA DE TRIGO 35
3.6.2 DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS 36
3.6.3 DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES FERMENTESCÍVEIS E AÇÚCARES REDUTORES NÃO FERMENTESCÍVEIS 36
3.6.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE LIGNINA 36
3.6.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CELULOSE E HEMICELULOSE 37
3.6.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS 37
3.6.7 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO CELULAR 37
3.6.8 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES E ÁCIDO ACÉTICO 37
3.6.9 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FURFURAL E HIDROXIMETILFURFURAL 37
3.6.10 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS 38
3.6.11 DETERMINAÇÃO DO pH 39
3.7 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS 39
3.7.1 RENDIMENTO DE XILOSE EM RELAÇÃO À PALHA DE TRIGO ($Y_{S0/S}$) 39
3.7.2 RENDIMENTO DE XILITOL EM RELAÇÃO À XILOSE ($Y_{P/S}$) 39
3.7.3 PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA 40
3.7.4 EFICIÊNCIA DE CONVERSÃO 40

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 41

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE TRIGO 41
4.2 DETERMINAÇÃO DO MODELO PROPOSTO PARA A HIDRÓLISE DA PALHA DE TRIGO 42
4.2.1 OBTENÇÃO DE PARÂMETROS DE HIDRÓLISE NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^{4-1} COM PONTO CENTRAL 42
4.2.2 OBTENÇÃO DE PARÂMETROS DE HIDRÓLISE NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 COM PONTO CENTRAL 44
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO 49
4.3.1 HIDROLISADO ORIGINAL 49

4.3.2 HIDROLISADO HEMICELULÓSICO CONCENTRADO 53

4.4 PROCESSO FERMENTATIVO 54

4.4.1 FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO DE PALHA DE TRIGO OBTIDO NA CONDIÇÃO ÓTIMA, EM BIOREATOR 54

4.4.2 FERMENTAÇÃO CONDUZIDA EM FRASCOS AGITADOS, DOS HIDROLISADOS ORIGINAIS DE ACORDO COM ENSAIOS DA TABELA 4.11 59

5 CONCLUSÕES 64

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1-Composição química dos materiais lignocelulósicos(%) ---------- 6
Tabela 2.2 – Área plantada de trigo no mundo (ha) 1997/1999. ---------- 8
Tabela 2.3 – Propriedades físico-químicas do xilitol (MANZ et al.,1973, HYVÖNEN et al.,1982) ---------- 12
Tabela 3.1 - Matriz de planejamento referente aos fatores avaliados no planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central ---------- 30
Tabela 3.2 - Níveis dos fatores usados no planejamento 2^{4-1} com ponto central -------- 30
Tabela 3.3 - Esquema da matriz de planejamento fatorial de face centrada ---------- 31
Tabela 3.4 - Níveis dos fatores utilizados no planejamento de face centrada ---------- 31
Tabela 4.1 Composição química da palha de trigo ---------- 41
Tabela 4.2 Composição química da palha de trigo na literatura ---------- 41
Tabela 4.3 - Matriz de planejamento para o projeto fatorial 2^{4-1} com ponto central e os valores de rendimento de xilose em relação à palha de trigo obtidos nas hidrólises ácida do hidrolisado de palha de trigo. ---------- 42
Tabela 4.4 – Estimativa dos efeitos, erro-padrão e teste t de Student para os parâmetros estudados na hidrólise ácida da palha de trigo para um planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central ---------- 43
Tabela 4.5 – Análise de variância para os efeitos estimados no planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central para um modelo linear ---------- 43
Tabela 4.6– Análise de variância para o planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central para um possível modelo quadrático ---------- 44
Tabela 4.7 - Matriz de planejamento para o projeto fatorial 2^3 com ponto central e face centrada e os valores de rendimento de xilose em relação à palha de trigo obtidos nas hidrólises ácida do hidrolisado de palha de trigo. ---------- 45
Tabela 4.8 - Análise de variância para os efeitos estimados no planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central e face centrada ---------- 46
Tabela 4.9 – Análise de variância da regressão do modelo que representa o processo de hidrólise ácida da palha de trigo no planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central e face centrada ---------- 46
Tabela 4.10 - Composição química do hidrolisado hemicelulósico da palha de trigo sob condições ótima de hidrólise: ---------- 49

Tabela 4.11 - Concentrações dos açúcares dos hidrolisados originais ---------- 50
Tabela 4.12 - Concentrações dos inibidores e os pH dos hidrolisados originais -------- 52
Tabela 4.13 - Composição parcial do hidrolisado hemicelulósico da palha de trigo em sua forma original e após ser submetido ao processo de concentração. ---------- 53
Tabela 4.14 - Concentrações de glicose, xilose, arabinose, xilitol, ácido acético e concentração de células durante a fermentação do hidrolisado da palha de trigo por Candida guilliermondii . ---------- 55
Tabela 4.15 - Parâmetros fermentativos durante a fermentação do hidrolisado de palha de trigo por Candida guilliermondii . ---------- 59
Tabela 4.16 – Variação das concentrações de açúcares na fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de trigo por Candida guilliermondii FTI 20037. ---------- 60
Tabela 4.17 – Consumo de xilose e de ácido acético, produção de xilitol e células durante a fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de trigo por Candida guilliermondii FTI 20037 após 48 horas. ---------- 61
Tabela 4.18 – Parâmetros fermentativos da bioconversão de xilose a xilitol por C. guilliermondii em hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo submetido a diferentes hidrólises ácidas. ---------- 63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 – Fórmula estrutural dos açúcares presentes nas hemiceluloses (FENGEL e WEGENER, 1989). ---------- 4

FIGURA 2.2- Exemplos de produtos que contêm xilitol ---------- 13

FIGURA 2.3– Produção de xilitol e xilose (MELAJA & HÄMÄLÄINEN, 1977; HYVÖNEN et al.,1982). ---------- 16

FIGURA 2.4 – Metabolismo de xilose e glicose em leveduras fermentadoras de xilose (HAHN – HÄGERDAL et al., 1994) ---------- 19

FIGURA 3.1- grãos de trigo *FIGURA 3.2 - Palha de trigo sem grãos* ---------- 27

FIGURA 3.3- Reator de hidrólise ácida com capacidade volumétrica total de 40L, para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo. ---------- 29

FIGURA 3.4 - Concentrador utilizado para aumentar o teor de açúcares do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo. ---------- 33

FIGURA 4.1 – Distribuição de resíduos do modelo proposto para a obtenção do hidrolisado de palha de trigo. ---------- 47

FIGURA 4.2 – Superfície de resposta e curvas de nível descritas pelo modelo quadrático para o fator de rendimento de xilose em relação à palha de trigo da hidrólise ácida do hidrolisado hemicelulósico da palha de trigo ---------- 48

FIGURA 4.3 - Consumo de ácido acético, glicose, xilose, arabinose, produção de xilitol, por C. guilliermondii em hidrolisado de palha de trigo. ---------- 57

FIGURA 4.4- Produção de células e de xilitol por C. guilliermondii em hidrolisado de palha de trigo em relação ao tempo de fermentação. ---------- 58

1 INTRODUÇÃO

O aproveitamento de resíduos lignocelulósicos de origem industrial ou florestal por processos fermentativos tem sido, nos últimos anos, objeto de pesquisas cada vez mais numerosas, com vistas a reduzir o prejuízo ambiental. Vários resíduos lignocelulósicos podem ser decompostos por hidrólise ácida em celulose, hemicelulose e lignina. A fração hemicelulósica é uma fonte potencial para processos de bioconversão, porque seu hidrolisado contém elevado teor de açúcares fermentescíveis, representados em até 80 % pela xilose, que é substrato primordial para o processo de obtenção de xilitol por via microbiana.

O xilitol, açúcar de elevado poder adoçante, anticariogênico e substituto de açúcares para diabéticos, tem grande importância econômica e social, pela sua aplicabilidade nas indústrias farmacêutica, odontológica e alimentícia, sendo comercializado no Brasil em produtos como creme dental, pastilhas e gomas de mascar.

A produção comercial desse adoçante ocorre por via química a partir de hidrolisados ricos em xilose, obtidos de materiais lignocelulósicos. O processo químico, no entanto, tem custo bastante elevado, pois requer extensivas etapas de purificação do hidrolisado, porque os resíduos da lignina interferem no processo catalítico. Por essa razão, o processo fermentativo, que não sofre essa interferência, apresenta-se como alternativa para a obtenção de xilitol.

Projetos voltados para o desenvolvimento dessa tecnologia constituem a principal linha de pesquisa do Grupo de Processos Fermentativos do Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena. Os trabalhos concentram-se no aproveitamento de materiais lignocelulósicos como o bagaço de cana-de-açúcar, a palha de arroz e cavacos de eucalipto.

cevada

Atualmente estão sendo iniciadas pesquisas com palha de trigo, cujo conteúdo em fração hemicelulósica é superior das demais matérias-primas citadas.

Este trabalho teve como objetivo geral o emprego da palha de trigo para a bioconversão de xilose em xilitol utilizando-se a levedura *Candida guilliermondii* FTI20037, em um projeto em que foram estudados os parâmetros

de hidrólise ácida por meio de metodologias estatísticas (BOX *et al*, 1978 e BARROS NETO *et al*, 1995). O objetivo específico foi determinar o modelo matemático que melhor representasse este bioprocesso avaliando os fatores que influenciam a hidrólise ácida como a temperatura, tempo, concentração da solução ácida e relação entre massa seca do resíduo na solução ácida.

Inicialmente foram executados vários ensaios de hidrólise ácida da palha de trigo e seus resultados foram analisados com o objetivo de definir a melhor condição de hidrólise para esta matéria-prima. Depois foram determinados os pHs adequados para as fermentações assim como as concentrações dos nutrientes para a suplementação dos hidrolisados. Foram empregados frascos Erlenmeyer sob agitação (200 rpm), a 30 °C. As fermentações foram avaliadas quanto ao consumo de açúcares, produção de xilitol e células, concentração de ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, e pH.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 MATERIAIS LIGNOCELULÓSICOS

A maioria dos materiais lignocelulósicos são constituídos por três componentes principais: celulose, hemicelulose e lignina, nas proporções 4:3:3 (TSAO, 1978).

A celulose é um composto orgânico que representa de 40 a 60% dos resíduos sólidos urbanos e pode ser encontrada em abundância nos resíduos florestais e agrícolas, bem como nos resíduos das indústrias de processamento de frutas e vegetais (MANDELS *et al.*, 1974). Segundo GOLDSTEIN, 1978, a produção de celulose compreende aproximadamente 50% da produção de biomassa de todo material orgânico da Terra, o que eqüivale a 100 bilhões de toneladas por ano. A celulose é um polissacarídeo linear composto de unidades anidroglicosídicas interligadas por ligações β-glicosídicas de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)n$, em ligações glicosídicas 1,4, formando a celobiose que se repete várias vezes na cadeia de celulose (GOLDSTEIN, 1978). A celulose é completamente insolúvel em água, devido à presença de grupos hidroxílicos em cada resíduo de glicose, e às inúmeras ligações das pontes hidrogeniônicas. Soluções fortes de ácidos e álcalis conseguem dissolver a celulose e transformam os polímeros em glicose, substrato fundamental na produção de alimentos, de energia e de produtos químicos e farmacêuticos. A intenção de se utilizar a celulose para a produção de alimentos, seja por fermentação direta seja por prévia hidrólise ácida, é relativamente antiga. Segundo DUNLAP, 1975, a Alemanha, na década de 1940, utilizava a celulose de madeira para a produção de açúcar.

As hemiceluloses diferem substancialmente da celulose por serem amorfas, tornando-a bem mais fácil de ser hidrolisada do que a celulose. Apresentam estrutura ramificada e composta pela combinação de vários açúcares (pentoses, hexoses, ácidos hexurônicos e deoxi-hexoses) (FIGURA 2.1) (FENGEL e WEGENER, 1989; PAARHAM, 1993). As hemiceluloses são classificadas basicamente de acordo com os açúcares presentes na cadeia principal do polímero: xilanas, glucomananas e galactanas.

A cadeia principal pode ser um homopolímero, como no caso das xilanas, ou um heteropolímero, como no caso das glucomananas e podem apresentar arabinose, galactose, ácido 4-O-metilglucorônico e grupos acetil ligados à cadeia principal.

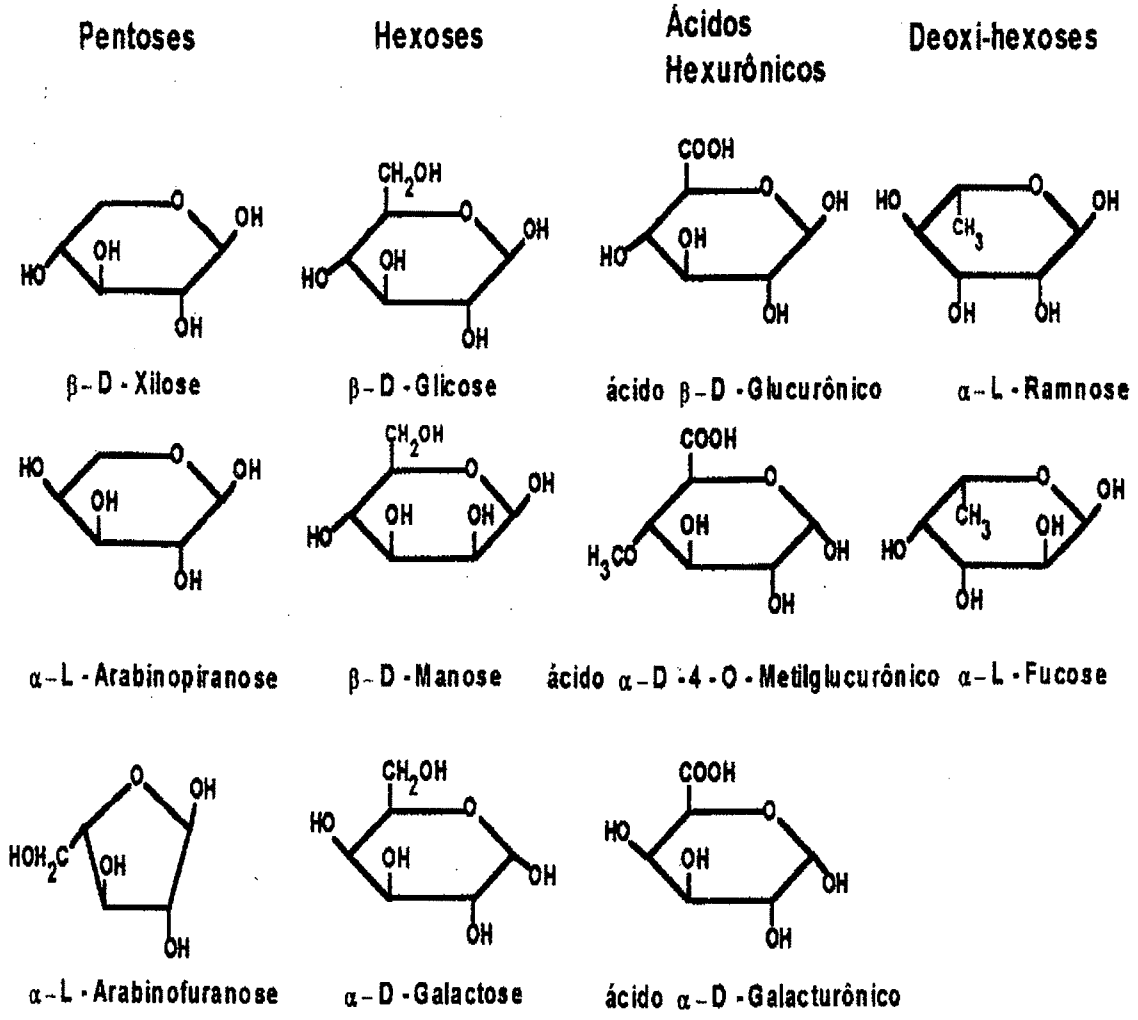

FIGURA 2.1 – Fórmula estrutural dos açúcares presentes nas hemiceluloses (FENGEL e WEGENER, 1989).

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

Além desses três componentes principais, a biomassa lignocelulósica contém extrativos e carboidratos não estruturados. Os principais extrativos são tupertina, resinas de ácidos graxos, taninos, cânfora, óleos voláteis, gomas e borracha (GOLDSTEIN, 1978). Os extrativos contêm uma grande variedade de compostos orgânicos que podem ser extraídos por solventes orgânicos ou água. São compostos alifáticos, aromáticos alicíclicos, álcoois, cetonas e uma grande variedade de ácidos, ésteres e compostos fenólicos (TITCHENER, 1975).

Atualmente o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos apresenta vários pontos a serem considerados. A pré-hidrólise remove primeiramente a fração hemicelulósica do material original e o resíduo sólido resultante é composto de lignina e celulose. No processo hidrolítico com vistas à produção de etanol, a celulose é o constituinte mais importante, por ser um polímero de glicose. A celulose amorfa possui uma alta constante de reação de hidrólise e por tratamento ácido libera glicose. Por outro lado, a celulose cristalina e a lignina constituem os dois maiores problemas para a utilização efetiva dos resíduos lignocelulósicos durante o processo de conversão química, enzimática ou microbiológica. A lignina restringe o ataque químico e microbiano e a celulose cristalina restringe, além desses, o ataque enzimático (MILLET *et al.*, 1976).

Os materiais lignocelulósicos são representados pelos resíduos florestais e agrícolas, por subprodutos da indústria de alimentos e forragens (MONTEIRO, 1986). Segundo SRINIVASAN *et al.*, 1983, a palha de cereais é um dos resíduos agrícolas de maior importância para os países em desenvolvimento, e sua produção chega a 560 milhões de toneladas anuais

somente nos países asiáticos. Segundo CARRAU *et al.*, 1987, as sobras de palha-de-arroz e de bagaço de cana-de-açúcar no Brasil atingiam 2 e 14 milhões de toneladas por ano, respectivamente.

2.1.1 Palha de trigo

Dentre as diferentes biomassas que compõem os materiais lignocelulósicos, a palha de trigo constitui um resíduo agrícola abundante. Uma pequena porção deste material é utilizada para ração animal e combustível doméstico. A palha do trigo pode ser devolvida ao solo (matéria orgânica), ou ser usada para instalação de animais (SEAGRI, 2001).

Também é o alimento básico predominante no Ocidente, como também na China e na India (BROWN,L.R., 2002). Em alguns países da Europa, a palha de trigo é usada para produção de polpas, se estendendo até a produção de papel (HAMILTON & LEOPOLD, 1987).

Semelhante a outros materiais lignocelulósicos, a palha de trigo também é constituída de 3 principais componentes: celulose, hemicelulose e lignina, nas proporções 3:5:2, o que significa que o teor de xilose nesta matéria-prima é muito maior que nos demais materiais (Tabela 2.1).

Tabela 2.1-Composição química dos materiais lignocelulósicos(%)

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

n.d.- não determinado

Fonte:Hon,D.N.S., 1996.

No ano agrícola de 1998 a área cultivada com trigo no Brasil foi de 1.378.000 hectares. A produção atingiu 2.032.900 toneladas de grãos, com uma produtividade média de 1.475 Kg/ha. Essa produção representou, nesse

ano agrícola, aproximadamente 30% do consumo nacional, que ficou na ordem de 8.500.000 toneladas (EMBRAPA, 1999). No ano de 1987 foram cultivados 3.439.982 hectares de trigo no Brasil, ou seja, 2.501.982 hectares a mais que na safra de 1998. Em 1987, o Brasil produziu 6,2 milhões de toneladas de trigo, o que prova a viabilidade técnica da cultura no país. A área cultivada com trigo no Brasil sofreu esse decréscimo até 1998, basicamente, devido a desregulamentação da compra estatal de trigo e em consequência da abertura do mercado.(EMBRAPA; 1999).

Dados da Companhia Nacional do Abastecimento (CONAB) estimavam para a safra de 2000 que a área plantada aumentasse para 1,43 milhão de hectares, o que corresponde a 4,1% a mais em relação a safra passada. Com exceção do Paraná, onde há uma tendência de redução do plantio em torno de 2%, os outros Estados produtores (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo) aumentaram sua área plantada de trigo (ABITRIGO, 2001).

De acordo com a EMBRAPA (2000) o Brasil ocupava o 22° lugar dentre outros países do mundo em áreas plantadas de trigo. Em 1999 passou a ocupar o 21° lugar embora com menor área plantada (Tabela 2.2).

A vantagem do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo para a produção de xilitol é a potencialidade de obtenção de alto teor de açúcares fermentescíveis, sobretudo de xilose, o que torna essa matéria-prima adequada para esse processo de bioconversão.

2.2 PROCESSOS HIDROLÍTICOS

Vários processos têm sido desenvolvidos para realizar a hidrólise dos materiais lignocelulósicos. Os primeiros processos usados para a hidrólise da celulose empregaram ácido sulfúrico e os principais foram o Bergius (1935), com ácido concentrado, o Scholler (1935), com ácido diluído e o Udic-Rheinau, com ácido clorídrico. Em 1946 surgiu o processo Madison em sistema contínuo e em 1961 surgiram os processos japoneses Nihon-Mokuzai-Kagaku e Hokaido, que utilizam solução de ácido sulfúrico, e Moguchi-Chisso que utiliza ácido clorídrico (DUNLAP,1975).

Tabela 2.2 – Área plantada de trigo no mundo (ha) 1997/1999.

Área plantada de trigo (*ha*)	**Ano**		
	1997	**1998**	**1999**
Mundo	228.478,514	224.715,550	214.198,999
Marrocos	2.492,900	3.087,000	2.286,000
África do Sul	1.392,000	748,000	700,000
Canadá	11.409,900	10.768,000	10.303,000
México	772,303	770,090	815,000
Estados Unidos	25.430,000	23.878,000	22.042,000
Argentina	5.702,000	4.758,000	5.000,000
Brasil	**1.505,671**	**1.378,000**	**1.249,199**
Chile	417,406	383,622	380,000
Paraguai	224,046	200,700	220,000
Uruguai	226,500	200,000	200,000
Afeganistão	2.124,000	2.186,000	2.186,000
China	30.057,020	29.800,020	29.000,020
Índia	25.930,000	26.686,000	27.356,000
Irã	6.298,995	6.179,747	5.000,000
Iraque	1.405,000	1.557,000	1.600,000
Kasaquistão	11.479,000	9.110,100	7.770,000
Paquistão	8.109,100	8.354,600	8.312,300
Síria	1.760,799	1.550,000	1.750,000
Turquia	9.340,000	9.400,000	8.650,000
Uzbequistão	1.457,000	963,000	1.000,000
República Checa	825,450	862,015	867,360
Dinamarca	689,000	678,000	700,000
França	5.110,000	5.234,000	5.134,000
Alemanha	2.727,898	2.802,455	2.800,000
Grécia	859,813	855,422	853,400
Hungria	1.247,570	1.200,000	735,000
Itália	2.366,121	2.305,357	2.304,000
Polônia	2.555,092	2,631,319	2.631,319
Rússia	26.056,150	26.100,390	22.985,000
Romênia	2.377,200	2.023,000	1.660,000
Espanha	2.049,500	1.874,900	2.195,800
Reino Unido	2.035,000	2.044,000	1.881,000
Ucrânia	6.508,400	5.641,000	5.900,000
Austrália	10.439,000	11.583,000	11.957,000

Fonte: EMBRAPA, 2000.

O processo Bergius utiliza o HCl concentrado, para dissolver a celulose da madeira colocada em duas baterias de extratores paralelos, de modo que permitam a extração em contracorrente. A solução ácida arrasta 32% de carboidratos. Por destilação a vácuo, recupera-se o ácido e o material seco que contém glicose, manose, xilose e frutose na forma tetramérica e que podem ser

transformados na sua forma monomérica diluindo e aquecendo o material a 120 °C (PERRONE, 1977).

O processo Scholler consiste em aquecer uma carga de madeira embebida em H_2SO_4 a 0,6%, em percoladores, a 134 °C, extraindo-se o hidrolisado várias vezes. A solução de açúcares a 4% assim obtida é neutralizada com hidróxido de cálcio (PERRONE, 1977).

O processo Udic-Rheinau que é uma modificação do processo Rheinau, patenteado em 1880, originalmente utilizava HCl fumegante. O processo derivado consiste em realizar uma pré-hidrólise com HCl a 32% para a remoção da hemicelulose, e logo após, a hidrólise principal com ácido clorídrico a 41%. Ambos os tratamentos são feitos a 20 °C. As soluções obtidas são diluídas e submetidas a pós-hidrólise a 100 °C (TITCHENER, 1975).

O processo Madison é uma modificação do processo Scholler, que também usa ácido sulfúrico entre 0,5 e 0,6%, temperatura de hidrólise entre 150 e 180 °C, e poucos segundos de percolação. Esse processo é mais produtivo que o processo Scholler (HARRIS, BEGLINGER, 1946; PERRONE, 1977).

No processo Hokaido os cavacos são submetidos a um tratamento a vapor a 180-185°C ou a 140-150 °C, com H_2SO_4 a 1,2-1,5%. Após essa pré-hidrólise, a madeira e o resíduo são secos e a hidrólise principal é realizada a temperatura ambiente, com uma solução de H_2SO_4 a 80% (TITCHENER, 1975).

O ponto crítico da hidrólise com ácido concentrado é o custo de recuperação do ácido. Devido a isso, surgiram várias pesquisas sobre o tratamento com ácidos halogênicos (GOLDSTEIN, EASTER, 1992). Por essa mesma razão, outras formas de pré-tratamento dos materiais lignocelulósicos estão sendo pesquisadas, a fim de se obter um material apropriado para a utilização direta ou indireta. Os processos de hidrólise enzimática, por explosão à vapor, e por tratamento com ácido diluído são os mais empregados.

O tratamento por explosão a vapor teve início na década de 70. Em vários trabalhos submeteu-se a pressão e vapor para melhorar o aproveitamento dos volumosos de baixa qualidade nutritiva (MELLO JÚNIOR, 1987). Basicamente esse procedimento consiste em submeter o material lignocelulósico a elevadas pressões e temperaturas, durante um determinado

período de tempo, e em seguida submetê-lo a uma repentina descompressão. Isso provoca no complexo lignina-polissacarídeo uma ruptura que se processa em duas etapas. Na primeira etapa ocorre o que se denomina de auto-hidrólise, que ocasiona a clivagem dos grupos acetil da hemicelulose, cuja magnitude depende das condições de tempo e pressão empregadas no tratamento. A liberação dos grupos acetil proporciona um meio ácido que promove a hidrólise da hemicelulose, resultando no rompimento da parede celular. Na segunda etapa, denominada descompressão rápida, ocorre a abertura dos fragmentos do bagaço de cana, por meio da vaporização da água contida no material. A vaporização repentina promove o rompimento e o afrouxamento da estrutura fibrosa da parede celular (MELLO JÚNIOR, 1987).

A hemicelulose é mais facilmente hidrolisável a açúcares monoméricos que a celulose. Para se obter um melhor aproveitamento dos carboidratos presentes nos materiais lignocelulósicos, geralmente se pesquisa a hidrólise ácida em dois estágios. O primeiro estágio consiste na hidrólise da fração hemicelulósica em condições moderadas (PESSOA JUNIOR, 1991). Este autor estudou a remoção de xilana por meio de hidrólise ácida do bagaço de cana e concluiu que ela está relacionada com a temperatura, com o tempo de hidrólise, com a concentração ácida e a proporção sólido-líquido no reator.

Estudos conduzidos por ALMEIDA e SILVA, 1996 com cavacos de eucalipto chegaram a remover 90% da fração hemicelulósica da madeira tratando o hidrolisado a uma temperatura de 157°C, por 27 minutos com uma concentração de 0,35% de H_2SO_4 e relação entre sólido e solução ácida de 1:4,5.

Atualmente, vários trabalhos foram desenvolvidos para realizar a hidrólise da palha de trigo visando a obtenção de produtos de interesse econômico e social. Para a obtenção do etanol, DELGENES *et al.* (1990), hidrolisaram a palha de trigo nas seguintes condições: 2% de ácido sulfúrico, relação 1:15 entre sólido e solução ácida, temperatura de 120°C, tempo de 30 minutos. Desta hidrólise foram obtidos 71,6% de xilose, 13,7% de glicose, 10,5% de arabinose, 2,4% de manose e 4,0% de galactose. FANTA *et al.*(1984) utilizaram ácido trifluoroacético (1N) na proporção de 1:10 entre sólido e solução ácida, temperatura de 100°C em diferentes períodos de tempo, obtendo-se 80% de conversão da hemicelulose em xilose até o tempo de 7

horas. Após este período observou-se um decréscimo de xilose provavelmente devido à formação de furfural.

A hidrólise da palha de trigo para a obtenção de xilitol foi realizada por SIRISANSANEEYAKUL *et al.* (1992), com 1,5 % de ácido sulfúrico, temperatura de 121°C, por 30 minutos. GONZALEZ *et al.*, (1986) utilizaram 0,5-2% de ácido sulfúrico, em tempos entre 1-24 horas, relação de sólido-líquido de 1:20 nas temperaturas de 34°C e 90°C para produção de xilitol por via microbiana.

Portanto, a hidrólise ácida de palha de trigo rende um hidrolisado rico em açúcares, sobretudo a xilose, que pode ser usada para produção de vários produtos, como o etanol e o xilitol, tornando promissor seu aproveitamento pelo processo biotecnológico.

2.3 XILITOL

2.3.1 Propriedades e aplicações

O xilitol ($C_5H_{12}O_5$), um álcool pentahidroxilado 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/100 mL (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 2.3.

O xilitol tem se destacado nos últimos anos devido às suas propriedades, que o tornam um composto de interesse para as indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica. Alguns exemplos de produtos que vêm sendo lançados no mercado contendo xilitol são apresentados na FIGURA 2.2.

Tabela 2.3 – Propriedades físico-químicas do xilitol (MANZ et al.,1973, HYVÖNEN et al.,1982)

Fórmula Química	$C_5H_{12}O_5$
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%:1,23 ; a 60%:20,63
Solubilidade a 30°C	68 g / 100 g de solução, igual a da sacarose (abaixo desta temperatura o xilitol é menos solúvel, com o aumento da temperatura o xilitol se torna significamente 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 condições normais de processamentos 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).

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 consequentemente 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 dos 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).

FIGURA 2.2- Exemplos de produtos que contêm xilitol

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 o seu metabolismo (YLIKAHRI, 1979). Segundo MAKINEN (2000), os efeitos clínicos associados com a administração de xilitol podem ser explicados por uma simples teoria pentiol-hexitol, a qual baseia-se 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 que este poliol previne a redução da densidade dos ossos, bem como seu conteúdo de minerais, cálcio e fósforo, melhorando consideravelmente as propriedades bio-mecânicas 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 *Haenophilus influenzae* que causam da otite média aguda, sendo recomendado seu uso como um tratamento alternativo promissor ao emprego de antibióticos para combater esta doença (UHARI *et al.*, 2000; ERRAMOUPSE, HEYNEMAN, 2000).

O xilitol combinado com glicóis é utillizado 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 açúcar e aminoácidos, pois, ao contrário do que ocorre com a glicose, não reage com aminoácidos (FÖRSTER, 1974).

Essas características fazem do xilitol um insumo de grande importância nas indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica. Como adoçante, é largamente empregado na Alemanha e na Suíça; no Brasil, é utilizado na formulação de gomas de mascar, pastilhas e creme dental.

2.3.2 Vias de obtenção

2.3.2.1 Via química

O xilitol foi primeiramente sintetizado em 1891 por Fischer e Bertrand, sob a forma de xarope, através da redução da D-xilose, empregando amálgama de sódio. A obtenção de xilitol na forma cristalina deu-se em 1942, por Wolfrom e Kohn, após a redução catalítica, sob alta pressão, de uma solução de xilose altamente purificada (MANZ *et al.,* 1973). Somente a partir de 1964 foi possível encontrar no mercado maiores quantidades de xilitol, que passou a ser empregado na área clínica, em casos de diabetes, sob a forma de solução intravenosa, principalmente no Japão e na Alemanha (MANZ *et al.,* 1973).

A produção de xilitol por via química, em escala comercial, iniciou-se na Finlândia, com a Finnish Sugar Co. Ltd., Helsink, que tem capacidade para produzir acima de 3.000 t/ano. Esse processo (FIGURA 2.3) consiste na hidrogenação catalítica da xilose pura, obtida através da hidrólise de materiais lignocelulósicos (JAFFE *et al.*, 1974; MELAJA, HÄMÄLÄINEN, 1977; HYVÖNEN, *et al.*, 1982).

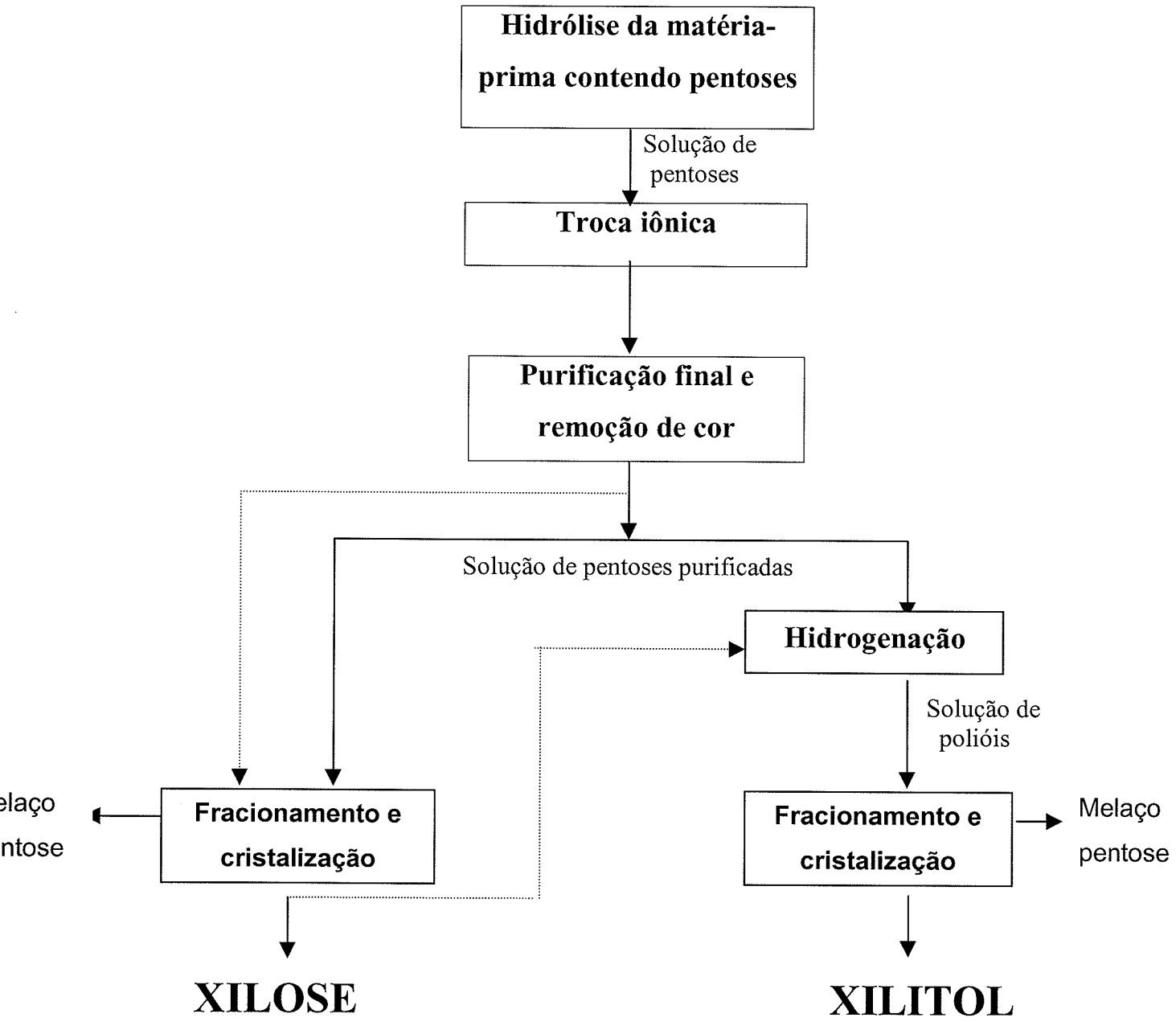

FIGURA 2.3– Produção de xilitol e xilose (MELAJA & HÄMÄLÄINEN, 1977; HYVÖNEN et al.,1982).

De modo geral, são necessárias quatro etapas básicas: 1. desintegração (hidrólise ácida) de materiais naturais ricos em xilana; 2. separação da xilose do hidrolisado por cromatografia, resultando em uma solução de xilose pura; 3. hidrogenação catalítica da xilose pura a xilitol na presença de catalisador níquel; 4. cristalização do xilitol na forma ortorrômbica (MELAJA, HÄMÄLÄINEN, 1977).

O rendimento e a qualidade do xilitol obtido por esse processo estão intimamente relacionados com a pureza da solução inicial de xilose, já que a presença de impurezas interfere no processo de catálise. Além disso, a produção de xilitol por via química requer várias etapas posteriores de purificação para remoção de resíduos tóxicos do catalisador e de subprodutos originados durante o processo de hidrogenação (MELAJA, HÄMÄLÄINEN, 1977), o que ocasiona aumento do tempo de processo e encarecimento do produto

2.3.2.2 Via biotecnológica

O uso do xilitol como adoçante ainda é bastante limitado devido ao seu custo ser alto em relação à outros açúcares (cerca de 10 vezes o custo de produção da sacarose e do sorbitol). Isto tem encorajado o desenvolvimento de tecnologias capazes de diminuir os custos de produção (PARAJÓ *et al.*, 1998a).

Nos últimos anos vários trabalhos vem sendo conduzidos na busca de uma via alternativa para a produção do xilitol, destacando- se o processo microbiológico. Este se apresenta promissor, uma vez que não requer uma solução de xilose de alta pureza, pois os microrganismos fermentam os próprios hidrolisados hemicelulósicos obtidos dos resíduos lignocelulósicos ricos em xilana (ROBERTO *et al.,* 1994 ; PARAJÓ *et al.*, 1995 ; FELIPE *et al.,* 1997a; CANETTIERI, 1998). Ademais, o processo biotecnológico opera em condições mais brandas de pressão e temperatura que o processo químico, e seu emprego pode reduzir os altos níveis de poluição ambiental bem como os gastos relacionados com o tratamento dos resíduos produzidos pela via química (WINKELHAUSEN, KUSMANOVA, 1998).

Existem bactérias, fungos e leveduras capazes de assimilar e fermentar a xilose produzindo etanol, xilitol e outros compostos (PARAJÓ *et al.*, 1998a). As leveduras tem sido apontadas como as melhores produtoras de xilitol, especialmente as do gênero *Candida* (SIRISANSANEEYAKUL *et al.,*1995). Dentro deste gênero, *Candida guilliermondii* tem mostrado uma espécie promissora para produzir xilitol, tanto quando cultivada em meio sintético

(ONISH, SUZUKI, 1996), quanto em hidrolisado de materiais lignocelulósicos (FELIPE *et al.,* 1993; CANETTIERI *et al.*,2001; MUSSATO, 2002).

O processo microbiano tornou-se possível a partir da descoberta por ONISH, SUZUKI (1966), de leveduras capazes de induzir, na presença de xilose, a enzima xilose redutase (E.C.1.1.1.21) que catalisa a redução de xilose a xilitol na presença dos cofatores NAD(P)H e NADH, no início do metabolismo da xilose (BARNETT, 1976; JEFFRIES, 1983). Posteriormente ocorre a participação da enzima xilitol desidrogenase (E.C.1.1.1.9), que emprega NAD+ ou NAD(P)+ como cofator, oxidando o xilitol a xilulose (SLININGER *et al.*, 1987). A xilulose é fosforilada a xilulose 5-fosfato, que, na via das fosfopentoses, é convertida em frutose 5-fosfato. A frutose 5-fosfato pode ser convertida em piruvato, pela conexão com a via Embden Meyerhof Parnas - EMP ou retornar à via das fosfopentoses (TAYLOR *et al.,*1990; WEBB, LEE, 1990; ROSEIRO *et al.,*1991), conforme esquema apresentado na FIGURA 2.4.

A produção de xilitol por via microbiana depende da utilização de microrganismos capazes de metabolizar xilose, do meio adequado e das condições de cultivo para a conversão de xilose e xilitol. Assim, diferentes espécies de microrganismos capazes de metabolizar pentose têm sido estudadas: algumas espécies do gênero *Candida sp.*(GONG *et al.,* 1981, SIRISANSANEEYAKUL *et al.*, 1995) como a *Candida guilliermondii* FTI 20037 (BARBOSA *et al.,* 1988; FELIPE *et al.*, 1995) e *Candida mogii* ATCC 18364 (SIRISANSANEEYAKUL & REUSS, 1992).

2.4 FATORES QUE INFLUENCIAM A BIOCONVERSÃO XILOSE - XILITOL

Diferentes fatores regulam a bioconversão de xilose em xilitol, entre os quais a presença de glicose no meio de fermentação (du PREEZ *et al.*, 1986; FELIPE *et al.*, 1993; GIRIO, 2000), concentração de xilose (OJAMO, *et al.,* 1988; PARAJÓ, 1998b), aeração (GONG *et al.*, 1981; WINKELHAUSEN *et al.*,1998), pH (FELIPE *et al.*, 1994; ROBERTO *et al.*, 1996b), temperatura (BARBOSA *et al.*, 1988; CONVERTI *et al.,* 2001), concentração de células no inóculo (PARAJÓ *et al.,* 1996, FELIPE *et al.*, 1997a) e a fonte de nitrogênio (BARBOSA *et al.*, 1988, ROBERTO *et al.*, 1996b).

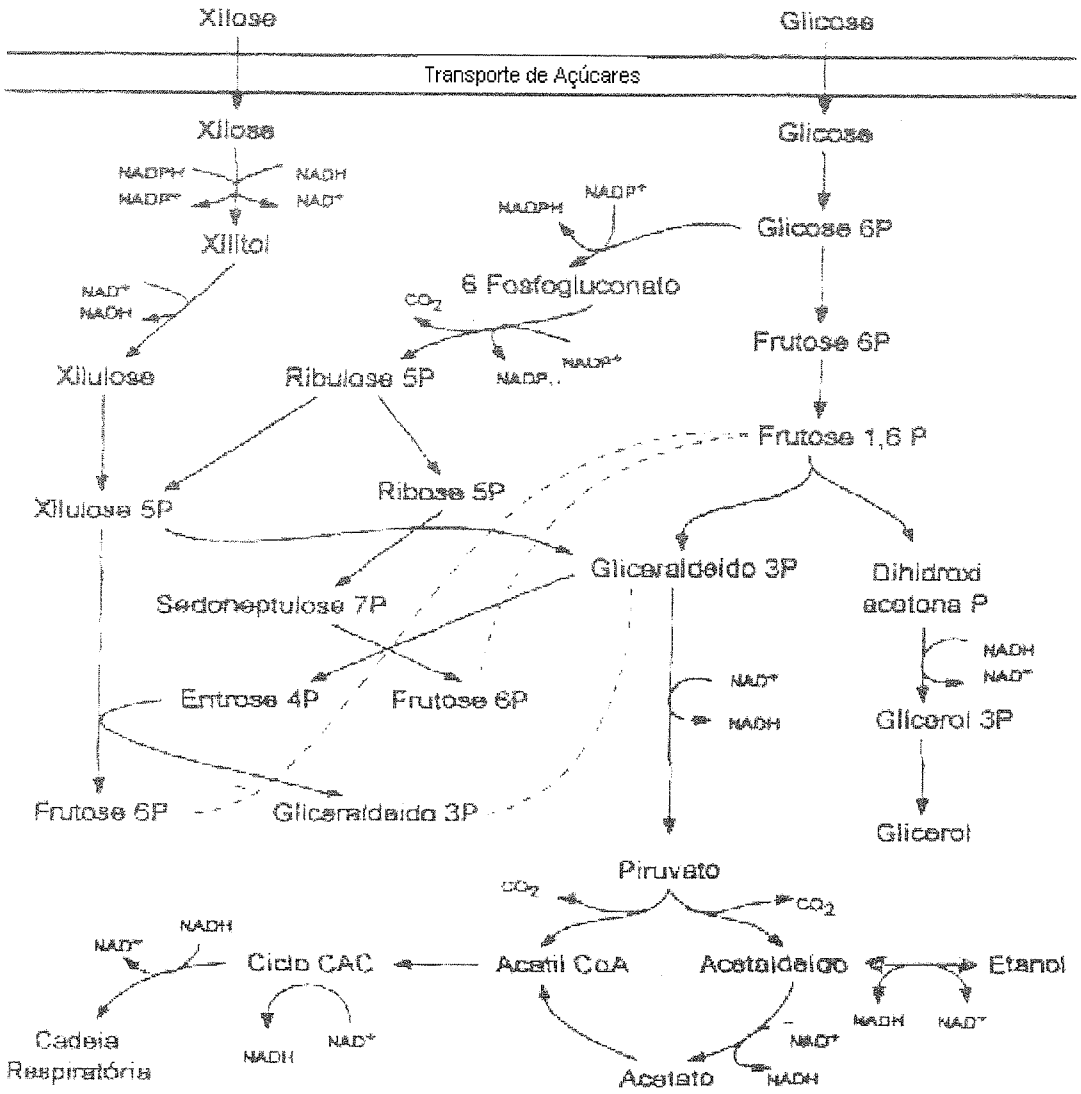

FIGURA 2.4 – Metabolismo de xilose e glicose em leveduras fermentadoras de xilose (HAHN – HÄGERDAL *et al.*, 1994)

2.4.1 Presença de glicose

A habilidade das leveduras fermentadoras de xilose em converter açúcares presentes nos resíduos lignocelulósicos é importante para uma aplicação efetiva na produção de insumos úteis. O fenômeno de repressão por glicose em leveduras tem sido objeto de estudos (BICHO *et al.*, 1988; LEE, 1992).

A presença de glicose no meio pode ser considerado um fator limitante para a bioconversão de xilose-xilitol, por essa ser metabolizada preferencialmente, em relação à xilose (du PREEZ *et al.*, 1986). Foram observadas a utilizações preferenciais de glicose em meio contendo glicose e xilose (du PREEZ *et al.*, 1986; BICHO *et al.*, 1988). FELIPE *et al.*, (1993), cultivando a levedura *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana, verificaram que o efeito da glicose estava relacionado à relação glicose/ xilose presente no meio, sendo que quanto maior esta proporção maior a inibição causada pela glicose.

Em estudos realizados por SILVA *et al.* (1997b) com *Candida guilliermondii* FTI 20037 em meio semi-sintético, a ausência de glicose no meio de fermentação acarretou um aumento de mais de 40% na produção de xilitol.

PREZIOSI-BELLOY *et al.* (1997) observou que quando a glicose está presente em elevadas concentrações acontece repressão catabólica sobre as enzimas-chave da bioconversão xilose-xilitol, xilose redutase e xilitol desidrogenase (LEE *et al.*, 1996; GIRIO, 2000), diminuindo as suas atividades enzimáticas.

2.4.2 Concentração inicial de xilose

A concentração inicial de xilose no meio de fermentação exerce grande influência sobre a produção de xilitol por leveduras, sendo que elevadas concentrações promovem o consumo desse açúcar e, conseqüentemente, intensificam a produção de xilitol (SILVA & AFSCHAR, 1994; PARAJÓ, 1998b). Entretanto, o aumento excessivo da concentração de xilose sofre um decréscimo nas taxas de crescimento do microrganismo, com consequente queda das taxas de produção de xilitol (NOLLEAU *et al.*, 1993; SILVA & AFSCHAR, 1994; PARAJÓ, 1998b). Dependendo da espécie da levedura e das condições operacionais, a inibição ocorre geralmente entre 150-200 g/L de xilose (PARAJÓ, 1998b).

Segundo GONG *et al.* (1981), a produção de xilitol por *Candida tropicalis* foi favorecida quando aumentou-se a concentração de xilose de 50 para 200 g/L. Entretanto, em concentrações de xilose superiores a 300 g/L verificou- se interferência negativa na produção de xilitol. VANDESKA *et al.* (1995)

29
Mestrado USP / Nexta : 630h
rabiha :

constataram que a produção de xilitol por *Candida boidinnii* aumentou significativamente quando a concentração inicial de xilose foi aumentada de 20 para 150 g/L. Entretanto, concentrações iniciais de xilose de 200 g/L provocaram um decréscimo na concentração de xilitol.

A pressão osmótica exercida pelas maiores concentrações de xilose (OJAMO, *et al.,* 1988; SILVA & AFSCHAR, 1994) e a repressão das enzimas que participam do metabolismo da xilose (NIGAM & SINGH, 1995) podem explicar a interferência de altas concentrações de xilose na produção de xilitol.

2.4.3 Aeração

A bioconversão de xilose em xilitol é dependente da regulação da aeração do meio fermentativo (GONG *et al.*, 1981), uma vez que a sua variação acima ou abaixo de um valor ótimo leva a diminuição significativa do rendimento em xilitol (JEFFRIES, 1983; LIGHTELM *et al.*, 1988; SILVA, 1997a).

De acordo com DELGENES *et al.* (1989), o fator de rendimento em xilitol depende da velocidade de transferência de oxigênio, estando esta influência relacionada com a regeneração de coenzimas e com a produção de ATP durante a fosforilação oxidativa (BARNETT, 1976; HÖFER & NASSAR, 1987; NOLLEAU *et al.*, 1993). Em condições aeróbicas ocorre maior produção de massa celular, enquanto que em condições limitadas de oxigênio uma grande parte da xilose é convertida em xilitol (BRUINENBERG *et al.*, 1984; LIGHTELM *et al.*, 1988). Um rigoroso controle da disponibilidade de oxigênio é fundamental para se obter elevada eficiência fermentativa, evitando-se o desvio do metabolismo para a formação de células. Por outro lado, a falta de oxigênio proporciona um desbalanço no potencial redox das células ocasionando a paralização de crescimento celular, da assimilação da xilose e consequentemente da formação de xilitol (VANDESKA, 1995).

O suprimento limitado de oxigênio favorece a produção de xilitol devido ao desbalanço entre as concentrações NAD^+ e NADH (BRUINENBERG *et al.*, 1984). À taxas específicas de fornecimento de oxigênio decrescentes, o sistema de transporte de elétrons não é capaz de oxidar todo o $NADH_2$ produzido. Como conseqüência, o nível de $NADH_2$ intracelular aumenta, reduzindo a velocidade de reação da enzima xilitol desidrogenase e

determinando acúmulo de xilitol no meio de cultivo (JEFFRIES, 1983; HAHN-HÄGERDAL *et al.*,1994 ; OH *et al.,* 1998).

SILVA *et al.* (1997a), cultivando *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana com uma concentração inicial de xilose de 62,13 g/ L e agitação de 400 rpm, mostraram que nos experimentos com maior crescimento celular (10,29 g/L), com aeração de 0,80 vvm, houve um rendimento de 0,49 g de xilitol / g de xilose e uma produtividade de 0,70 g/L.h. Nos experimentos onde o crescimento celular foi baixo (0,75 g/L), com 0,10 vvm, obteve- se 0,45 g de xilitol / g de xilose e uma produtividade de 0,87 g/L.h. No entanto, os melhores resultados foram em 0,45vvm, com um crescimento celular de 5,19 g/L produzindo 0,67 g de xilitol/ g de xilose e produtividade de 0,87 g/L.h.

2.4.4 pH

Outro fator importante na bioconversão de xilose em xiitol é o pH do meio de fermentação. FELIPE *et al.* (1997b) estudando o efeito do pH sobre a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, constataram inibição do consumo de glicose, xilose e arabinose, bem como a produção de xilitol e células em pH inferior a 4,5. Contudo, em valor de pH superior ou igual a 5,5, a levedura *Candida guilliermondii* produziu xilitol com um rendimento de 0,75 g de xilitol / g de xilose e com uma produtividade de 0,57 g/L.h. ROBERTO *et al.* (1996b) também estudaram diferentes valores de pH inicial para a fermentação do hidrolisado de palha de arroz para produção de xilitol, verificando o melhor rendimento (0,68 g de xilitol / g de xilose) e a melhor produtividade (0,51 g/L.h) em pH 5,3.

O efeito do pH em fermentações de hidrolisados hemicelulósicos pode estar relacionado com a presença de compostos tóxicos, principalmente o ácido acético, considerado potente inibidor do crescimento de vários microrganismos (KUSUMEGI *et al.*, 1998) e também ao metabolismo da xilose (FERRARI *et al.,* 1992; MAYERHOFF, 1997).

2.4.5 Temperatura

A temperatura também exerce grande influência sobre o metabolismo dos microrganismos e deve ser ajustada ao seu cultivo (BROCK *et al.,* 1994). A faixa adequada de temperatura para o crescimento de leveduras varia de 20 a 30 °C, no entanto, existem espécies que crescem em uma faixa mais ampla, entre 0 e 47°C (PELCZAR *et al.*,1980). Para a levedura *Candida guilliermondii* foi verificado que, tanto para o consumo de xilose quanto para a produção de xilitol, as temperaturas na faixa de 30 a 35°C apresentaram- se mais favoráveis (BARBOSA *et al.*, 1988).

2.4.6 Fonte de nitrogênio

A importância das fontes de nitrogênio no rendimento em xilitol a partir de xilose por *Candida guilliermondii* foi relatada por BARBOSA *et al.*, (1988). Segundo estes autores, a utilização da uréia individualmente e adicionada com ácido casamínico resultou em um aumento no rendimento em xilitol. Resultados similares foram obtidos por VANDESKA *et al.*, (1995) em experimentos realizados com a levedura *Candida boidinii.*

ROBERTO *et al.,* (1996) avaliaram o efeito do uso de diferentes fontes de nitrogênio, em função do pH, em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Estes autores constataram que o uso de uréia em meio pH 4,5 proporcionou um aumento de 25% na produção de xilitol, quando comparado com os experimentos conduzidos com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Esse comportamento pode está relacionado com o aumento do pH devido a liberação de amônia e dióxido de carbono durante a hidrólise da uréia (PHAFF *et al.,* 1978). Também observaram que os maiores fatores de rendimento em xilitol foram obtidos em diferentes condições de pH e fontes de nitrogênio: 0,68 g/g para sulfato de amônio em pH 5,3 e 0,66 g/g para uréia em pH 4,5. Embora os resultados quanto a rendimento em xilitol tenham sido similares, a maior produtividade volumétrica em xilitol foi alcançada empregando- se sulfato de amônio como fonte de nitrogênio.

2.4.7 Concentração de células no inóculo

Segundo ROBERTO *et al.* (1996a) a bioconversão xilose- xilitol por *Candida guilliermondii* foi influenciada pelo nível de inóculo. O aumento na concentração de inóculo afeta negativamente na produção de xilitol e biomassa. Quando o meio contendo hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz foi inoculado com concentração inicial de células de 0,67 g/L, os valores da concentração de xilitol e massa celular foram de 39,46 g/L e 6,74 g/L, respectivamente, depois de 72 horas de fermentação. Estes resultados decresceram para 21,74 g/L e 4,79 g/L, respectivamente, quando a concentração de inóculo aumentou para 2,41 g/L. Sreenath *et al.* (1986) citado por ROBERTO, 1996a observaram que o rendimento do xilitol para *Candida boidinii* aumentou de 0,12 g/g para 0,24 g/g quando o inóculo foi aumentado de 1,3 para 5,1 g/L. Este fato pode ser atribuído ao uso de diferentes espécies de microrganismos e também de diferentes condições experimentais utilizadas.

FELIPE *et al.* (1997a), estudaram o efeito da concentração de células e da idade do inóculo na formação de xilitol por *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, em frascos agitados com uma concentração inicial de xilose de 54,5 g/L. Os melhores resultados ocorreram ao utilizar 3,0 g/L de células, com idade de 24 h, o que resultou num rendimento de 0,74 g xilitol/ g xilose e uma produtividade de 0,75 g/ L.h.

2.5 CARACTERÍSTICAS DOS HIDROLISADOS HEMICELULÓSICOS

Quando da utilização de hidrolisados, a bioconversão é afetada pela presença de compostos tóxicos resultantes da degradação da estrutura lignocelulósica. Estes incluem o furfural, o hidroximetilfurfural (5HMF), oriundos da desidratação de açúcares (NIMZ & CASTEN, 1986; LARSSON *et al.,* 2000), o ácido acético, oriundo dos grupos acetil das cadeias laterais da hemicelulose (FENGEL & WEGENER, 1989; LOHMEIER-VOGEL *et al.,* 1998; LARSSON *et al.,* 2000), os compostos fenólicos, ácidos aromáticos e aldeídos, derivados da degradação da lignina (PARAJÒ *et al.*, 1997), bem como os íons metálicos como o cobre, cromo, ferro e níquel, provenientes da corrosão dos equipamentos (PARAJÓ *et al.*, 1998b).

O efeito tóxico desses compostos depende do seu tipo, do seu nível de concentração, das condições fisiológicas intracelulares, da concentração de oxigênio dissolvido e do pH do meio (PARAJÓ *et al.*, 1998b).

Fermentações conduzidas com *Candida guilliermondii* na presença de furfural e 5HMF demonstraram que os referidos compostos inibem o crescimento celular em concentrações acima de 1,0 e 1,5 g/L, respectivamente (SANCHEZ & BAUTISTA *et al.*, 1988). No entanto, o composto mais tóxico à bioconversão de xilose em xilitol, presente no hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, é o ácido acético (FELIPE *et al.,* 1996b), cuja concentração oscila em torno de 5,4 g/L (ALMEIDA e SILVA, 1996). Esse ácido vem sendo apontado como forte inibidor do metabolismo de xilose em xilitol, quando em concentrações acima de 3,0 g/L (FELIPE *et al.*, 1995). Sua ação inibitória tem sido atribuída à sua concentração na forma não dissociada, que depende do pH do meio (NODA *et al.*, 1982; HERRERO *et al.*, 1985). Sua toxicidade é aumentada em condições de baixo pH, devido à maior proporção de moléculas não dissociadas em relação ao meio com pH próximo ao neutro (NODA *et al.*, 1982).

Segundo Clark, Mackie (1984), citados por PARAJÓ *et al.* (1998b), dentre os inibidores do metabolismo da xilose, os produtos da decomposição da lignina são mais tóxicos que o furfural e o hidroximetilfurfural. Esses autores constataram que estes compostos, presentes no meio de cultivo em concentrações menores que 0,1 g/L, possuem uma elevada potencialidade inibitória.

RUI-ORDAZ *et al.* (1998) estudaram o efeito inibitório do fenol sobre o crescimento de *Candida tropicalis* quando presente no meio na faixa de 0-400 ppm, e observaram que este composto inibiu o crescimento da levedura.

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

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

O tratamento baseado na alteração do pH com álcalis e ácidos consiste da elevação do pH inicial do hidrolisado com uso de um álcali seguido da redução deste pela adição de um ácido, até o pH ótimo de fermentação. Este tratamento tem sido proposto como um método para a destoxificação dos hidrolisados devido à sua eficiência para remover o mesmo tipo de compostos inibitórios que a elevação do pH. Porém tem um marcado efeito benéfico devido a precipitação de compostos aromáticos de baixa massa molar e a 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, JEFRIES, 1996).

O tratamento dos hidrolisados com carvão ativo constitui um dos métodos mais econômicos e eficientes para a redução de compostos tóxicos presentes no hidrolisado. Este tratamento baseia- se na capacidade deste material poroso, de origem natural, de adsorver sobre sua superfície diferentes tipos de moléculas, as quais são retidas na superfície do carvão através de forças fracas denominadas de Van Der Waals. Estas forças são resultantes de uma atração intermolecular de tal modo que seu potencial é, basicamente, uma função da área superficial do material. Dentre os vários materiais comumente usados em processos de adsorção física o carvão ativo apresenta a maior área superficial, podendo variar entre 600 e 1600 m^2/g, dependendo da matéra-prima empregada para sua fabricação (CONSIDINE, 1974). PARAJÓ *et al.*, (1997) constataram uma redução das concentrações de ácido acético e de compostos aromáticos em hidrolisado de eucalipto, obtendo uma maior produtividade e rendimento em xilitol utilizando o tratamento do hidrolisado de adsorção por carvão ativo do que quando comparados com o hidrolisado não tratado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PALHA DE TRIGO

A palha de trigo foi proveniente da Estação Experimental do Instituto Agronômico de Campinas localizado no município de Tietê, SP.

Após a retirada dos grãos (FIGURA 3.1), a palha resultante (FIGURA 3.2) foi moída e seca para determinação do teor de umidade e posteriormente ser submetida a hidrólise ácida.

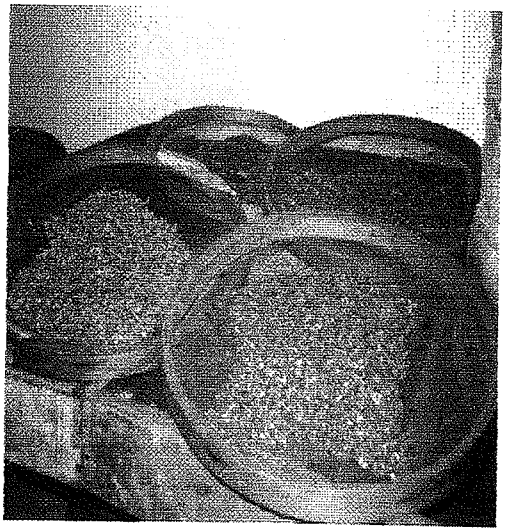

FIGURA 3.1- grãos de trigo

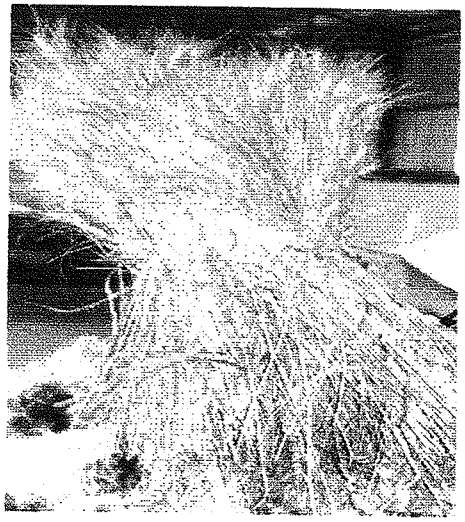

FIGURA 3.2 - Palha de trigo sem grãos

3.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE TRIGO

A análise da palha de trigo foi feita de acordo com a metodologia sugerida por DUNNING, DALLAS, 1949 adaptada por CÂNDIDO (2001), que se fundamenta na sacarificação quantitativa dos polissacarídeos de diferentes matérias-primas vegetais. A palha de trigo foi moída e passada por peneira de 20 "mesh" (diâmetro nominal do fio de 0,510 mm e abertura da peneira de 0,841 mm; segundo PERRY, CHILTON, 1980). Todo o material peneirado foi seco em estufa a 60° C, por 1 hora. Após reduzir a umidade do material a

menos de 10%, foi feita a pesagem da palha de trigo moída, com precisão de até 0,1 mg. Um béquer contendo aproximadamente 2 g do material e 10 ml de H_2SO_4 a 72% (p/p) foi agitado continuamente por 7 minutos, mantendo a mistura em banho termostático a 50° C. Nessa etapa, denominada hidrólise principal, ocorreu o rompimento das fibras de celulose em oligômeros.

Ao completar o tempo da hidrólise, a reação foi interrompida com adição de 275 ml de água destilada e o conteúdo foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 500 ml. A suspensão foi autoclavada a 121° C por 45 minutos. Ocorreu então o que se denomina pós-hidrólise, sendo os oligômeros transformados em monômeros. Após resfriamento, a suspensão foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico. O volume foi completado com água destilada e, na suspensão, foi feita a análise de açúcares redutores totais (ART), açúcares redutores fermentescíveis (ARF), açúcares redutores não fermentescíveis (ARNF), celulose, hemicelulose, lignina e cinzas.

3.3 OBTENÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

A palha de trigo foi submetida à hidrólise ácida em um reator de aço inoxidável com capacidade volumétrica de 40 litros (FIGURA 3.3), nas condições determinadas por um planejamento estatístico fatorial fracionário 2^{4-1} (Box *et al*,1978) para estudar a relação entre a massa seca do resíduo e a solução ácida, e os efeitos da temperatura, do tempo de reação e da concentração da solução de ácido sulfúrico.

Os hidrolisados obtidos foram filtrados ,caracterizados e armazenados em câmara fria a 4°C para posteriormente serem tratados.

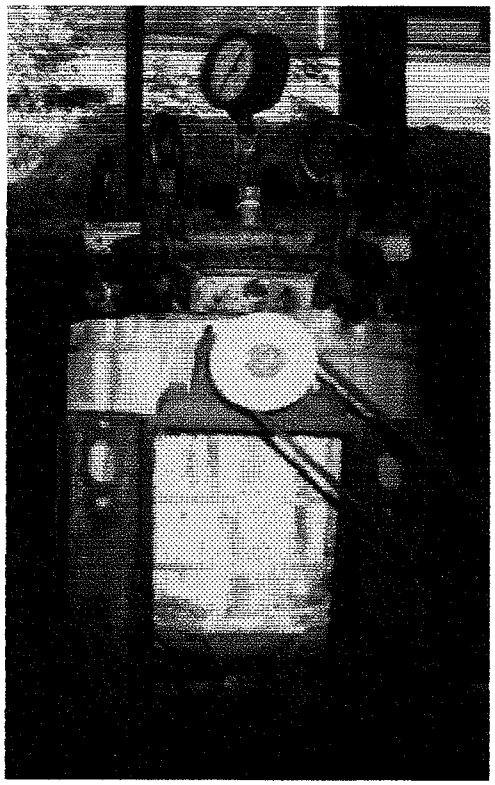

FIGURA 3.3- Reator de hidrólise ácida com capacidade volumétrica total de 40L, para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo.

3.4 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO

Para minimizar o número de experimentos e modelar o processo de hidrólise visando maior produtividade de xilose foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (BOX *et al.*,1978). A Tabela 3.1 mostra este planejamento. Os fatores avaliados e seus respectivos níveis estão apresentados na Tabela 3.2, onde (-1) e (+1) significam o menor nível e o maior nível, respectivamente. Os resultados experimentais obtidos foram analisados estatisticamente, de acordo com o planejamento pré- estabelecido, para verificar os efeitos dos fatores em estudo.

A análise dos resultados foi feita por meio do programa Design- Expert 5, versão 5.0 e pelo programa STATGRAPHICS, versão 4.0. Os resultados foram expressos em tabela com estimativa de efeitos, erro- padrão, teste t de "Student", e em tabela que mostraram a análise de variância com colunas de causa de variação (CV), graus de liberdade (GL), soma de quadrados (SQ), quadrado médio (QM), teste F e nível de significância (p).

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

Foram realizados 3 experimentos no ponto central a fim de identificar se o modelo foi linear ou quadrático.

A matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com triplicata no ponto central está mostrada na Tabela 3.1. Os níveis dos fatores utilizados no planejamento são mostrados na Tabela 3.2, onde (-1) significa o menor nível, (+1) significa o maior nível e (0) significa o ponto central.

Tabela 3.1 - Matriz de planejamento referente aos fatores avaliados no planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central

Hidrolisado	*Temperatura*	*Concentração ácida*	*Tempo*	*MS : sol. ác.*
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1
9	0	0	0	0
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0

MS : sol. ác. – massa seca do resíduo (palha de trigo) na solução ácida (H_2SO_4).

Tabela 3.2 - Níveis dos fatores usados no planejamento 2^{4-1} com ponto central

FATORES	*SIGLAS*	*NÍVEIS*		
		(-1)	*(0)*	*(+1)*
Temperatura (°C)	TT	120	130	140
Concentração ácida(%)	CA	0,50	0,75	1,00
Tempo (min.)	TE	20	30	40
MS : sol. ác.	HM	1:5	1:17,5	1:20

MS : sol. ác. – massa seca do resíduo (palha de trigo) na solução ácida (H_2SO_4).

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

$$X_i = \frac{X - \sum X/2}{\Delta X/2} \tag{3.1}$$

em que,

X_i - é o valor codificado

X - valor real

$\sum X/2$ - o valor médio entre os níveis superiores e inferiores,

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

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

$$Y_i = b_0 + \sum b_i X_j + \sum b_{ij} X_i X_j + \sum b_{ii} X_i^2 \tag{3.2}$$

em que,

Y_i - variável dependente ou variável de resposta,

b - coeficiente de regressão,

X - nível dos fatores experimentais com unidades codificadas.

3.5 EXECUÇÃO DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

3.5.1 Concentração do hidrolisado

O hidrolisado obtido de acordo com o modelo previsto (hidrolisado sob condição ótima de hidrólise), foi concentrado em concentrador a vácuo com volume de 4L de capacidade útil (FIGURA 3.4), operando a 70± 5°C, a fim de que o teor inicial de xilose alcançasse 30-40 g/L.

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

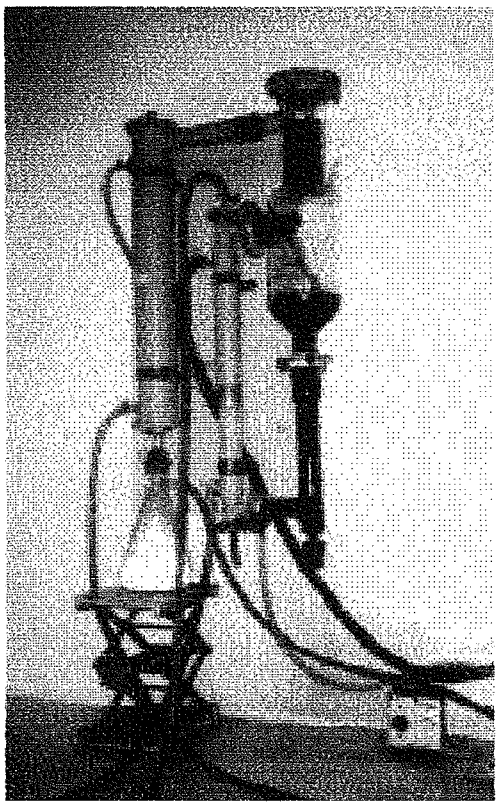

FIGURA 3.4 - Concentrador utilizado para aumentar o teor de açúcares do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo.

3.5.2 Tratamento do hidrolisado

O meio de fermentação foi preparado com os hidrolisados submetidos ao tratamento com óxido de cálcio comercial (CaO) para elevar o pH inicial de 1,8 para 7,0; os precipitados formados foram removidos por filtração à vácuo em funil de porcelana e papel de filtro qualitativo Klabin. Posteriormente os pH foram abaixados para 5,5 com ácido fosfórico (ALVES,1997).

Foi feita ainda a adição de carvão ativado sob agitação de 200 rpm, por 1 hora, a 30°C e em seguida, os hidrolisados foram novamente submetidos a filtração em filtros de porcelana e papel de filtro Klabin e os filtrados foram autoclavados a 111°C, por 15 minutos.

3.5.3 Microrganismo e preparo do inóculo

Foi utilizada a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, da coleção de culturas do Grupo de Processos Fermentativos-Departamento de Biotecnologia -FAENQUIL.

O inóculo foi preparado com células obtidas de uma cultura estoque de *Candida guilliermondii*, mantida a 4°C em meio inclinado de ágar extrato de malte. O cultivo da levedura foi feito a pela inoculação de células da cultura estoque recém- repicada (7 a 10 dias) em meio semi-sintético contendo (g/L): 30,0 de D-xilose,7,0 de glicose, 2,0 de sulfato de amônio, 0,1 de cloreto de cálcio e 20,0 de farelo de arroz "in natura".

As soluções de xilose e glicose e o extrato de farelo de arroz foram autoclavadas a 111°C por 15 minutos e as demais soluções esterilizadas a 121°C por 20 minutos.

Para o cultivo foram usados frascos Erlenmeyer de 125 mL, com 50 mL do meio de fermentação, em incubadora de movimento circular a 200 rpm, a 30°C, por 24 horas. Em seguida, as células foram recolhidas por centrifugação a 2.000 rpm, por 15 minutos, e lavadas com água destilada esterilizada sob nova centrifugação, para o preparo da suspensão utilizada como inóculo da fermentação.

3.5.4 Condições de fermentação

Os experimentos foram realizados em fermentador de bancada e em frascos agitados e permitiram estudar a influência da concentração do hidrolisado, do sulfato de amônio e do farelo de arroz) tanto no consumo dos açúcares quanto na produção de xilitol, de acordo com as condições estabelecidas por CANILHA, 1998, em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto.

3.5.4.1 Ensaio em fermentador de bancada

A fermentação foi realizada com o meio preparado como em 3.5.2, em fermentador de bancada de 5L de capacidade total, suplementado com 1g/L de sulfato de amônio e 5 g/L de farelo de arroz. O processo foi iniciado com a

inoculação de 0,5g de células de leveduras e conduzido por 78 horas, 30°C sob agitação de 300 rpm e aeração de 0,4 vvm.

3.5.4.2 Ensaios em frascos agitados

O meio de fermentação foi preparado com os hidrolisados obtidos nas 17 hidrólises, suplementados com os nutrientes especificados em 3.5.4.1.

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio esterilizados, em incubadora de movimento rotatório a 200 rpm, a 30°C, por 48 horas, inoculação de 3,0 g de células de leveduras.

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

A caracterização da palha de trigo foi feita por análises químicas, com relação a açúcares redutores totais, açúcares redutores fermentescíveis, açúcares redutores não fermentescíveis; teor de lignina, celulose, hemicelulose e cinzas.

A caracterização dos hidrolisados foi feita pela determinação de pH e análises das concentrações de xilose, glicose, arabinose e de ácido acético, furfural, e hidroximetilfurfural.

O acompanhamento das fermentações foi feito por análises de amostras do meio, pelas quais foram determinados o consumo de xilose, glicose, arabinose, a concentração de ácido acético, a produção de xilitol, a variação de pH e a concentração de células.

Na fermentação em bancada as amostras foram retiradas em 6 em 6 horas.

3.6.1 Determinação do teor de umidade da palha de trigo

A determinação do teor de umidade da palha de trigo foi realizada em balança modelo MB200, por exposição do material a radiação infra-vermelha, à temperatura de 105°C durante 30 minutos.

3.6.2 Determinação dos açúcares redutores totais

A concentração de açúcares redutores totais (ART) foi determinada pelo método de Somogyi e Nelson (NELSON, 1944).

3.6.3 Determinação dos açúcares redutores fermentescíveis e açúcares redutores não fermentescíveis

A concentração dos açúcares redutores não fermentescíveis (ARNF) foi obtida segundo a metodologia descrita por DUNNING, DALLAS (1949) e SAEMAN *et al.* (1945) que se baseia no consumo de ART por *Saccharomyces cerevisiae*. O hidrolisado foi neutralizado com $CaCO_3$ e filtrado. A 10 ml do hidrolisado foi adicionado 2 ml de tampão citrato 0,05M, pH 5,2, e 2 g de fermento prensado, previamente suspenso com 8 ml de água destilada. A mistura foi incubada a 30° C por 1 hora e depois, centrifugada e submetida à análise de açúcar pelo método de Somogyi e Nelson (NELSON, 1944). As concentrações de ARF foram determinadas pela diferença entre ART e ARNF.

3.6.4 Determinação do teor de lignina

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

$$\%\ lignina = \frac{m_L \times dil}{m_A \times \%\ da\ m_S}$$

em que,

m_L corresponde à massa da lignina em gramas.

dil. corresponde à diluição realizada.

m_A corresponde à massa da amostra.

m_S corresponde à massa seca da amostra (%).

3.6.5 Determinação do teor de celulose e hemicelulose

Os teores de celulose e hemicelulose foram calculados dividindo-se os valores das concentrações de glicose e xilose, que também foram encontradas, respectivamente, por 1,111 g/L e 1,136 g/L, conforme metodologia descrita por ROCHA., 2000.

3.6.6 Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada de acordo com o método de SILVA, 1990, que consiste em aquecer o material em altas temperaturas (500 à 600° C), ou seja, até o aquecimento ao rubro, durante quatro horas ou até combustão total da matéria orgânica.

3.6.7 Determinação da concentração celular

A concentração para avaliação do crescimento celular foi determinada por contagem de células em Câmara de Neubauer (1/400mm2 x 1/10mm).

3.6.8 Determinação das concentrações de açúcares e ácido acético

As concentrações dos açúcares e do ácido acético foram determinadas por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu LC-10AD), sob as seguintes condições: coluna BIO RAD Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm), temperatura da coluna de 45 °C, eluente, solução de H2SO4 0,01N, fluxo de 0,6 mL/min, volume da amostra injetada 20 µL. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro Sep Pack C18 (Millipores) e o eluente, antes do uso, filtrado a vácuo em membrana Hawp 0,45 Millipore e em seguida desgaseificado pela ação de ultra-som (THORNTON) por 25 minutos.

3.6.9 Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural nos hidrolisados foram determinadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu-LC-10AD), sob as seguintes condições: coluna Resolve 5µ Spherical C18 (3,9 x 300mm); temperatura da coluna: 25^{0}C; detector de ultra-violeta SPD-10A UV-

VIS; eluente: solução de acetronitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético; volume da amostra injetada: 20 µL. As amostras foram filtradas em membrana ME25 com 0,45µm e D13mm. O eluente foi filtrado a vácuo em membrana GVWP 0,22 (MILLIPORE) e, em seguida, desgaseificado pela ação de ultra-som (THORNTON) por 10 min.

3.6.10 Determinação da concentração dos compostos fenólicos

O teor dos produtos derivados da decomposição da lignina foram analisados através da quantificação da lignina Klason solúvel em meio ácido de acordo com a metodologia proposta por ROCHA, 2000.

Uma alíquota do hidrolisado foi alcalinizada até pH 12 pela adição de NaOH 6 M diluída com água destilada de forma a se obter uma leitura inferior a 1 unidade de absorbância. A absorbância desta solução foi determinada em espectrofotômetro Beckman DU 640B em um comprimento de onda de 280 nm utilizando- se água destilada como referência. A concentração de lignina foi calculada por meio da seguinte equação:

$$C_{LIG} = 4{,}187*10^{-2} \, (A_{LIG280} - A_{PD280}) - 3{,}279*10^{-4} \qquad (3.3)$$

em que,

C_{LIG} – concentração de lignina solúvel em meio ácido (g/L),

$A_{LIG280nm}$ - Absorbância de todos os compostos em 280 nm

$$APD_{280} = C1\varepsilon 1 + C_2 \varepsilon_2 \qquad (3.4)$$

em que,

C_1 e C_2 -concentração de furfural e hidroximetilfurfural determinadas por CLAE,

ε_1 e ε_2 – coeficientes a 280nm de extinção do furfural e do hidroximetilfurfural (146,85 L/gcm e 114 L/g cm), respectivamente.

3.6.11 Determinação do pH

Os valores de pH dos hidrolisados originais, do hidrolisado concentrado e das fermentações foram determinados em pH-metro modelo B474,com uma faixa de trabalho que vai –5,0°C a +105°C.

3.7 DETERMINAÇÃO DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS

Os parâmetros fermentativos, isto é, fator de rendimento, produtividade e eficiência de conversão foram determinados como segue:

3.7.1 Rendimento de xilose em relação à palha de trigo ($Y_{S0/S}$)

O rendimento (gramas de xilose obtida por grama de palha de trigo hidrolisada),é dado pela seguinte equação:

$$Y_{S/So} = \frac{S}{S_0} x V_r \qquad (3.5)$$

em que,

S corresponde à concentração de xilose.

S_0 corresponde à concentração inicial da palha de trigo.

V_r corresponde ao volume ocupado do reator utilizado para a hidrólise (30L).

3.7.2 Rendimento de xilitol em relação à xilose ($Y_{P/S}$)

O rendimento que expressa: massa de xilitol produzido por massa de xilose consumida, é calculado pela seguinte equação:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta p}{\Delta S} = \frac{Pf - Pi}{Sf - Si} \qquad (3.6)$$

em que,

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

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

3.7.3 Produtividade volumétrica

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

$$Q_p = \frac{\Delta p}{\Delta t} = \frac{Pf - Pi}{tf - ti} \qquad (3.7)$$

onde,

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

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

3.7.4 Eficiência de Conversão

Este parâmetro fermentativo, expresso em %, representa a razão entre $Y_{P/S}$ calculado e o fator de conversão teórico de 0,917 g/g, calculado segundo BARBOSA *et al.*,1988.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA PALHA DE TRIGO

A Tabela 4.1 mostra os resultados referentes à composição química da palha de trigo obtidos no presente trabalho. A Tabela 4.2 mostra os resultados referentes à composição química em relação aos principais componentes.

Tabela 4.1 Composição química da palha de trigo

Componentes	*% Sobre matéria Seca*
Glicose	56
Xilose	47
Arabinose	6
ART	72
ARF	59
ARNF	13

Tabela 4.2 Composição química da palha de trigo na literatura

Componentes	*% Sobre matéria Seca*			
Celulose	30[a]	30[b]	36[c]	33
Hemicelulose	24[a]	50[b]	28[c]	33
Lignina	18[a]	15[b]	29[c]	20
Cinzas	10[a]	5[b]	-	8

Fonte: [a]KUHAD, R. C.,SINGH, A (1993)
[b]HON, D.N.S (1996)
[c]OLSSON, L., HAHN-HÄGERDAL, B (1996)

De acordo com os dados apresentados na Tabela 4.2, a palha de trigo utilizada no presente trabalho apresentou uma composição percentual de celulose, hemicelulose, lignina e cinzas igual a 33, 33, 20 e 8 %, respectivamente. Esta composição se aproximou daquelas encontradas por KUHAD e SINGH (1993) e por OLSSON e HÄHN-HAGERDAL (1996). Entretanto foi verificada uma discrepância entre os resultados encontrados neste trabalho e aqueles encontrados por HON (1996), principalmente em relação ao teor de hemicelulose.

A fração hemicelulósica encontrada da palha de trigo foi superior aquelas encontrada para as outras matérias- primas até então estudadas como eucalipto com 10,6% (ALMEIDA e SILVA, 1996), bagaço de cana-de-açúcar com 25% (Pandey *et al.*(2000), citado por CARVALHO, 2001) e palha de arroz com 22% (MUSSATO, 2002).

Desta forma esperou-se que a hidrólise da palha de trigo fosse ocorrer em situações mais amenas que os demais resíduos.

4.2 DETERMINAÇÃO DO MODELO PROPOSTO PARA A HIDRÓLISE DA PALHA DE TRIGO

4.2.1 Obtenção de parâmetros de hidrólise no planejamento fatorial 2^{4-1} com ponto central

O delineamento experimental proposto foi um planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com ponto central.

Experimentos no ponto central foram conduzidos com 3 repetições afim de minimizar o erro experimental e identificar se o modelo é linear ou quadrático. A matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} com triplicata no ponto central está mostrada na Tabela 4.3. Os resultados da análise estatística estão expressos nas Tabelas 4.4, 4.5 e 4.6.

Tabela 4.3 - Matriz de planejamento para o projeto fatorial 2^{4-1} com ponto central e os valores de rendimento de xilose em relação à palha de trigo obtidos nas hidrólises ácida do hidrolisado de palha de trigo.

Hidolisado.	*T (°C)*	*Conc.ácida (%)*	*tempo (min)*	*MS : sol. ác*	*Rendimento (%)*
1	120	0,5	20	1:15	12,1
2	140	0,5	20	1:20	20,4
3	120	1,0	20	1:20	22,1
4	140	1,0	20	1:15	26,2
5	120	0,5	40	1:20	13,1
6	140	0,5	40	1:15	21,9
7	120	1,0	40	1:15	20,1
8	140	1,0	40	1:20	17,4
9	130	0,75	30	1:17,5	17,8
10	130	0,75	30	1:17,5	16,3
11	130	0,75	30	1:17,5	16,2

MS : sol. ác. – massa seca do resíduo (palha de trigo) na solução ácida (H_2SO_4).

Tabela 4.4 – Estimativa dos efeitos, erro-padrão e teste t de Student para os parâmetros estudados na hidrólise ácida da palha de trigo para um planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central

	Estimativas	*Erros-padrão*	*t*
média	18,51	+/-0,654	-
Fator T	4,625	+/-1,534	3,018**
Fator CA	4,575	+/-1,534	2,981**
Fator M	-1,825	+/-1,534	1,189
Fator t	-2,075	+/-1,534	1,352
TCA+Mt	-3,925	+/-1,534	2,558**
TM+CAt	-3,325	+/-1,534	2,167
Tt+CAM	-1,575	+/-1,534	1,026

T- temperatura, CA- concentração ácida, M- massa seca do resíduo na solução ácida, t- tempo.

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($t \geq 3,18245$)

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

Tabela 4.5 – Análise de variância para os efeitos estimados no planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central para um modelo linear

Efeitos	*Soma de quadrados*	*Grau de liberdade*	*Quadrado médio*	*Teste f*	*Nível de significância(p)*
Fator T	42,781	1	42,781	9,08	0,0570
Fator CA	41,781	1	41,781	8,89	0,0585
Fator M	6,6612	1	6,6612	1,41	0,3199
Fator t	8,6112	1	8,6112	1,83	0,2692
TCA+Mt	30,811	1	30,811	6,54	0,0834
TM+CAt	22,111	1	22,111	4,69	0,1188
Tt+CAM	4,9612	1	4,9612	1,05	0,3803
Erros	14,130	3	4,7101		
Total	171,929	10			

T- temperatura, CA- concentração ácida, M- massa seca do resíduo na solução ácida, t- tempo

R^2= 0,917813

Verifica-se na Tabela 4.4 que nenhum dos fatores exerceu influência significativa em nível de 5% de probabilidade, devido ao fato dos valores de t calculados serem inferiores aos valores de t tabelados. No nível de 10% de probabilidade verificou-se que os fatores T e CA, que correspondem a temperatura e concentração ácida, assim como a interação TCA+Mt, apresentaram efeito significativo.

Na Tabela 4.5, estão mostrados os níveis de significância dos fatores T e CA e da interação TCA+Mt, correspondendo a 5,70% ; 5,85% e 8,34% , respectivamente.

A fim de verificar a existência de curvatura para o modelo, ou seja, se os resultados obtidos já se encontravam na região de otimização ou se indicavam um possível passo ascendente, foi feita a análise mostrada na Tabela 4.6.

Tabela 4.6– Análise de variância para o planejamento fatorial 2^{4-1} com triplicata no ponto central para um possível modelo quadrático

Efeitos	*Soma de quadrados*	*Grau de liberdade*	*Quadrado médio*	*Teste f*	*Nível de significância(p)*
Fator T	42,781	1	42,781	53,25	0,0183
Fator CA	41,781	1	41,781	52,11	0,0187
Fator M	6,6612	1	6,6612	8,29	0,1024**
Fator t	8,6112	1	8,6112	10,72	0,0820
TCA+Mt	30,811	1	30,811	38,35	0,0251
TM+CAt	22,111	1	22,111	27,52	0,0345
Tt+CAM	4,9612	1	4,9612	6,18	0,1309
Curvatura	12,523	1	12,523	15,59	0,0586
Erros	1,6066	2	0,8033		
Total	171,929	10			

T- temperatura, CA- concentração ácida, M- massa seca do resíduo na solução ácida, t- tempo

R^2= 0,990655

Na Tabela 4.6 observa-se pelo nível de significância da curvatura (p=0,0586) que o modelo é quadrático e que outros fatores principais e de interação passam a ser significativos, confirmando assim que o modelo é de 2 ªordem.

4.2.2 Obtenção de parâmetros de hidrólise no planejamento fatorial 2^3 com ponto central

A fim de determinar os coeficientes dos termos quadráticos foram feitos ensaios complementares de acordo com um planejamento fatorial 2^3 composto de face central. A matriz do planejamento fatorial fracionário 2^3 com triplicata no ponto central e face centrada e os resultados do rendimento das hidrólises estão mostrados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Matriz de planejamento para o projeto fatorial 2^3 com ponto central e face centrada e os valores de rendimento de xilose em relação à palha de trigo obtidos nas hidrólises ácida do hidrolisado de palha de trigo.

Hidolisado.	*T (°C)*	*Conc.ácida (%)*	*MS : sol. ác*	*Rendimento (%)*
1	120	0,5	1:15	12,1
2	140	0,5	1:20	20,4
3	120	1,0	1:20	22,1
4	140	1,0	1:15	26,2
5	120	0,5	1:20	13,1
6	140	0,5	1:15	21,9
7	120	1,0	1:15	20,1
8	140	1,0	1:20	17,4
9	130	0,75	1:17,5	17,8
10	130	0,75	1:17,5	16,3
11	130	0,75	1:17,5	16,2
12	120	0,75	1:17,5	11,2
13	140	0,75	1:17,5	24,5
14	130	0,50	1:17,5	8,0
15	130	1,0	1:17,5	18,0
16	130	0,75	1:15	13,7
17	130	0,75	1:20	16,6

MS : sol. ác. – massa seca do resíduo (palha de trigo) na solução ácida (H_2SO_4).

Quanto ao rendimento (massa de xilose obtida por massa de palha de trigo hidrolisada), o melhor resultado foi 26,2 g/g obtido no ensaio 4, em que a hidrólise foi realizada com solução de H_2SO_4 a 1% a 140 °C, na proporção de 1:15 de palha:solução, durante 20 minutos. Os piores resultados foram 11,2 e 8,0 g/g nos ensaios 12 e 14 respectivamente. No ensaio 12 a hidrólise foi realizada com solução de H_2SO_4 a 0,75% a 120 °C na proporção de 1:17,5 de palha e solução durante 30 minutos, enquanto que no ensaio 14 as condições foram de: solução de H_2SO_4 a 0,50%, a 130 °C na proporção de 1:17,5 de palha:solução durante 30 minutos. A princípio parece que a temperatura e a concentração ácida influenciam no processo hidrolítico.

A análise de variância para os efeitos estimados no planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central e face centrada para o modelo que representa o rendimento em função dos parâmetros de hidrólise, está mostrada na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Análise de variância para os efeitos estimados no planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central e face centrada

Efeitos	*Soma de quadrados*	*Grau de liberdade*	*Quadrado médio*	*Teste f*	*Nível de significância(p)*
Fator T	101,124	1	101,124	11,05	0,0061*
Fator CA	80,089	1	80,089	8,75	0,0120*
TT	55,5034	1	55,5034	6,06	0,0299*
TCA	30,8113	1	30,8113	3,37	0,0914**
Erros	109,830	12	9,1525		
Total	377,358	16			

onde, T- temperatura, CA- concentração ácida R^2= 0,7090

* significativo ao nível de 5% de probabilidade

** significativo ao nível de 10% de probabilidae

A temperatura e a concentração ácida tiveram efeitos significativos ($p<0,05$), assim como o efeito quadrático da temperatura e o de interação da temperatura e concentração ácida ($p<0,10$).

Foi realizada uma análise de variância para o modelo proposto (Tabela 4.9), comprovando, assim, a sua significância estatística ($p<0,01$), com coeficiente de determinação de R^2 = 0,7090 que descreve 70,90% da variância ocorrida no fator de rendimento na hidrólise ácida da palha de trigo.

Tabela 4.9 – Análise de variância da regressão do modelo que representa o processo de hidrólise ácida da palha de trigo no planejamento fatorial 2^3 com triplicata no ponto central e face centrada

CV	*Soma de quadrados*	*Grau de liberdade*	*Quadrado médio*	*Teste F**	*Nível de significância(p)*
Modelo	267,528	4	66,8819	7,31	0,0032*
Resíduo	109,830	12	9,1525		
Total	377,358	16			

* Significativo ao nível de 5 % de probabilidade. R^2 = 0,7090

Na FIGURA 4.1, encontra-se a disposição os pontos estimados pelo modelo em relação a média e seus respectivos resíduos. Observa-se que a distribuição dos resíduos é totalmente aleatória em torno do eixo igual a zero, sugerindo que o modelo não é tendencioso.

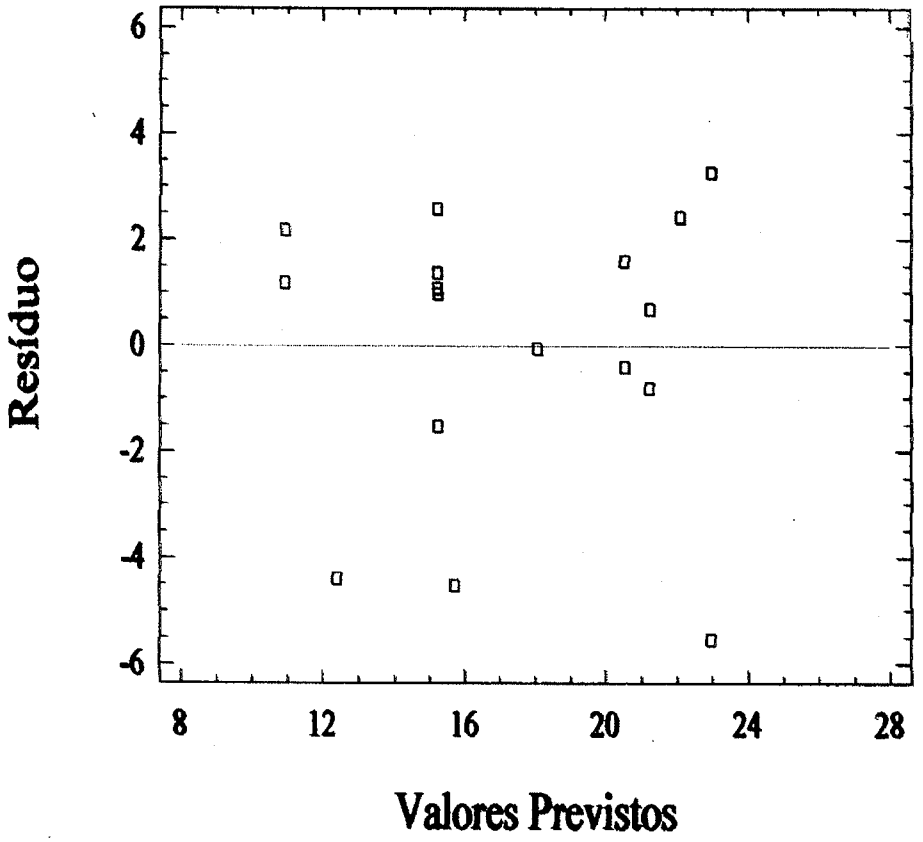

FIGURA 4.1 – Distribuição de resíduos do modelo proposto para a obtenção do hidrolisado de palha de trigo.

O modelo matemático para representar o processo de hidrólise ácida da palha de trigo, considerando os termos que realmente influenciam no processo hidrolítico, pode ser expresso pela equação:

$$Y = 15{,}2286 + 3{,}18*X_1 + 2{,}83*X_2 + 3{,}67143*X_1^2 - 1{,}9625*X_1X_2 \qquad (4.1)$$

em que,

Y representa o rendimento de xilose em relação à palha de trigo (%),

X_1 a temperatura em °C,

X_2 a concentração ácida (%).

O modelo matemático ajustado aos dados obtidos, ilustrado pela superfície de resposta apresentada na FIGURA 4.2, forneceu um máximo de rendimento de extração de xilose quando se utilizou concentração de ácido e temperatura nos níveis superiores, correspondendo a 1% e 140°C, respectivamente, em 30 minutos. Nestas condições é possivel obter um rendimento de obtenção de xilose entre 22 e 24%.

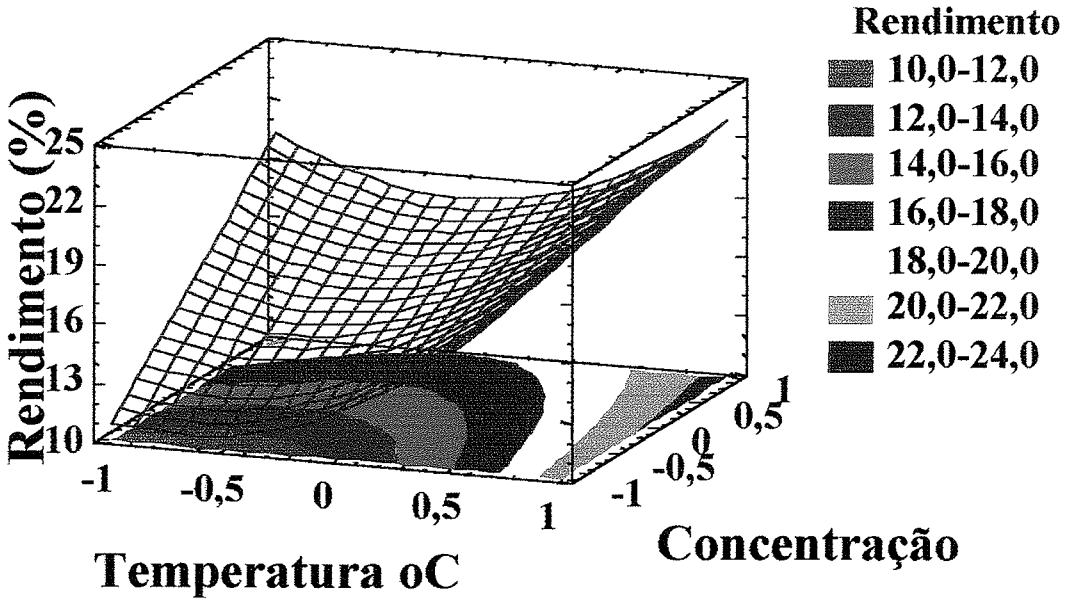

FIGURA 4.2 – Superfície de resposta e curvas de nível descritas pelo modelo quadrático para o fator de rendimento de xilose em relação à palha de trigo da hidrólise ácida do hidrolisado hemicelulósico da palha de trigo

Conforme pode ser observado na FIGURA 4.2, o rendimento de obtenção de xilose é mais sensível a variações na temperatura do que em relação a variações na concentração de ácido usada durante a hidrólise. A utilização de temperaturas inferiores a 140 °C (nivel 1) pode reduzir sensivelmente o rendimento de xilose, enquanto a variação da concentração de ácido entre 0,75 (nível 0) e 1 % (nível 1) permite a obtenção de rendimentos de extração de xilose entre 22 e 24 %.

Para a validação do modelo proposto para o rendimento da hidrólise ácida foi realizada uma triplicata nas condições determinadas pela metodologia estatística. A palha de trigo foi hidrolisada na temperatura de 144,5°C, com uma concentração ácida de 2,51%, tempo de reação de 30 minutos e relação de palha:solução ácida de 1:17,5. Com a substituição destes valores codificados na equação 4.1, obtêm- se um valor estimado para o rendimento de 27,4 ± 2,03 %. Experimentalmente foi obtido 24,0 ± 0,14, %, podendo ser considerado iguais ao valor estimado. Isso indica que o modelo pode representar matematicamente o rendimento de xilose.

A Tabela 4.10 apresenta a composição química das triplicatas da hidrólise ótima nas condições determinadas pela metodologia estatística. Observa-se que foi alcançada uma extração de 87,4% correspondendo a 10,65 g/L de xilose contra 12,19 g/L estimado pelo modelo.

Tabela 4.10 - Composição química do hidrolisado hemicelulósico da palha de trigo sob condições ótima de hidrólise:

Composição química	*Ta*	*Tb*	*Tc*	*T*
Xilose (g/L)	10,85	10,46	10,64	10,65±0,200
Glicose (g/L)	4,107	2,571	1,704	2,794±1,217
Arabinose (g/L)	2,047	1,620	1,658	1,775±0,236
Acido acético (g/L)	0,574	0,704	0,748	0,675±0,091
Furfural (g/L)	0,378	0,254	0,378	0,336±0,072
HMF (g/L)	0,046	0,020	0,026	0,030±0,014
pH	0,68	0,57	0,61	0,62

onde Ta- triplicata 1 , Tb- triplicata 2 e Tc -triplicata 3, T -média das triplicatas

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO

A palha de trigo, utilizada como matéria-prima para a obtenção do hidrolisado hemicelulósico, apresentou um teor de umidade entre 12,3% a 14%.

4.3.1 Hidrolisado original

4.3.1.1 Concentrações dos açúcares presentes:

As concentrações da glicose, xilose e arabinose presentes nos hidrolisados originais e no hidrolisado conduzido sob condições ótimas

resultantes das hidrólises ácida, de acordo com o planejamento experimental 2^3 com triplicata no ponto central e face centrada, estão apresentadas na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 - Concentrações dos açúcares dos hidrolisados originais

Hidrolisado	*Glicose (g/L)*	*Xilose (g/L)*	*Arabinose (g/L)*
1	0,85	7,17	1,66
2	2,46	8,97	1,21
3	2,42	9,69	1,47
4	4,41	15,37	2,23
5	1,30	7,48	1,33
6	3,63	12,55	1,89
7	2,77	11,74	1,98
8	2,54	7,64	1,11
9	1,24	8,93	1,76
10	1,05	8,27	1,68
11	0,995	8,13	1,63
12	1,67	5,52	1,97
13	3,58	12,1	2,53
14	0,94	3,94	1,55
15	1,86	8,98	2,14
16	1,30	7,83	2,09
17	1,42	7,15	1,87
Condição ótima	2,79	10,65	1,78

Como pode ser visto, em todas as condições experimentais os hidrolisados obtidos tiveram a xilose como açúcar predominante, seguido de glicose e arabinose presentes em menor quantidade, conforme já constatado nos hidrolisados de eucalipto (ALMEIDA e SILVA, 1996, CANETTIERI, 1998), de bagaço de cana-de-açúcar (FELIPE *et al.*, 1993; ALVES *et al.*, 1998), de palha de arroz (ROBERTO *et al.,* 1994) e de palha de trigo (GONZALÉZ *et al.*, 1986; DELGENES *et al.*, 1990). A maior extração de xilose (15,37 g/L) foi obtida no ensaio 4.

A presença de baixas concentrações de glicose é um ponto favorável ao processo fermentativo, o que indica também que as condições de hidrólise estão sendo adequadas para a extração da fração hemicelulósica, o que pode ser confirmado pelas pequenas concentrações de furfural e hidroximetilfurfural, apresentadas no item 4.3.1.2. Quando o teor desses inibidores estiver elevado,

significa que a condição de hidrólise está sendo drástica, o que implica na decomposição da xilose e de glicose no meio.

Por outro lado, quando a glicose está presente em elevadas concentrações, acontece repressão catabólica sobre as enzimas-chave da bioconversão xilose-xilitol, xilose redutase e xilitol desidrogenase (LEE *et al*, 1996; GIRIO, 2000), causando diminuição de suas atividades conforme constatado durante o cultivo de *C. guilliermondii* em meio contendo xilose e glicose em diferentes concentrações de glicose (ROSA *et al.*, 1998). Este comportamento é acompanhado também do consumo mais rápido de glicose e precedente ao consumo da xilose nas primeiras horas de fermentação (LEE *et al*, 1996; LAWFORD E ROUSSEAU, 1998, SENE *et al*, 2000). Outro fator é que a presença de glicose em baixas concentrações em meio contendo não apenas xilose, mas também ácido acético, contribuiu para minimizar o efeito tóxico exercido pelo ácido durante o metabolismo de xilose (LAWFORD E ROUSSEAU, 1998). Quanto à arabinose, pode também ser indutora de enzimas (LEE *et al*, 1996).

4.3.1.2 Concentrações dos inibidores presentes nos hidrolisados de palha de trigo e seus valores de pH:

As concentrações do ácido acético, furfural, HMF nos hidrolisados originais e no hidrolisado sob condições ótimas resultantes das hidrólises ácida, de acordo com o planejamento experimental 2^3, estão apresentadas na Tabela 4.12.

Pode ser observado nos hidrolisados, a presença de compostos tóxicos, inibidores do metabolismo microbiano como o ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural originados durante o processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica (CHUNG e LEE, 1985). Segundo FELIPE *et al*, 1995 o teor de ácido acético no hidrolisado foi abaixo do considerado inibitório, ou seja, quando for superior a 3,0 g/L. Estes autores relataram que a presença de até 1,0 g/L deste ácido estimulou o consumo de xilose, uma vez que a levedura foi capaz de crescer e excretar xilitol em todas as condições empregadas. Observa-se também na Tabela 4.12 que a concentração de ácido acético no

meio é independente do pH do hidrolisado e consequentemente da concentração ácida de hidrólise.

As concentrações dos demais compostos tóxicos foram baixas, semelhante ao encontrado por RODRIGUES, 1999, em trabalhos conduzidos com hidrolisado de bagaço de cana. Como relatado por OJAMO *et al.*, 1988, o furfural e o HMF não foram considerados tóxicos para *Candida guilliermondii* quando presente nas concentrações de 0,2 a 1,0 g/L e que estas concentrações inclusive favorescem a conversão de xilose em xilitol por estas leveduras.

Tabela 4.12 - Concentrações dos inibidores e os pH dos hidrolisados originais

Hidrolisado	*Ác.acético (g/L)*	*Furfural (g/L)*	*HMF (g/L)*	*Fenóis (g/L)*	*pH*
1	0,47	0,07	0,02	1,82	1,72
2	0,33	0,46	0,06	1,37	1,62
3	0,53	0,27	0,04	1,09	1,24
4	1,16	0,53	0,09	3,34	1,31
5	0,33	0,006	0,01	2,23	1,58
6	0,63	0,40	0,06	1,56	1,66
7	0,63	0,20	0,03	1,31	1,12
8	0,45	0,58	0,06	5,35	1,21
9	0,54	0,06	0,03	1,57	1,51
10	0,45	0,06	0,03	1,50	1,53
11	0,52	0,003	0,03	1,71	1,51
12	0,51	0,01	0,007	1,44	1,52
13	0,86	0,02	0,11	1,24	1,48
14	0,27	0,03	0,009	1,30	1,49
15	0,66	0,07	0,009	1,32	1,38
16	0,57	0,04	0,01	1,63	1,54
17	0,57	0,03	0,008	1,12	1,33
Cond. ótima	0,68	0,34	0,03	3,00	0,68

Nota- se na Tabela 4.12 que os hidrolisados obtidos apresentaram concentrações de compostos fenólicos em meio ácido que variaram entre 1,09 e 5,35 g/L (hidrolisados 3 e 8, respectivamente). No hidrolisado sob condição ótima de xilose foi verificado uma concentração de compostos fenólicos de 3,00 g/L. Devido à natureza hidrofóbica, os compostos fenólicos oriundos da degradação da lignina determinam perda da integridade das membranas biológicas, afetando a sua habilidade em servir como barreiras seletivas e

matrizes enzimáticas (HEIPIEPER *et al.*, 1994). De acordo com PALMQVIST e HAHN-HAGERDAL (2000b), o mecanismo de inibição destes compostos ainda não está bem elucidado, principalmente devido à falta de análises qualitativas e quantitativas acuradas.

4.3.2 Hidrolisado hemicelulósico concentrado

Como a concentração de xilose no hidrolisado original obtido sob condições ótimas de hidrólise, foi considerada baixa para a bioconversão de xilose a xilitol por *Candida guilliermondii* , foi necessário que ele fosse concentrado. Desta forma, o hidrolisado antes de ter sido usado na fermentação, foi concentrado à vácuo. A composição parcial do hidrolisado concentrado está apresentada na Tabela 4.13.

Comparando as composições parciais do hidrolisado original com o hidrolisado após ser submetido ao processo de concentração, pode- se observar que as concentrações dos açúcares xilose, glicose e arabinose foram aumentadas proporcionalmente ao fator de concentração utilizado (razão de volume inicial pelo volume final do hidrolisado).

Tabela 4.13 - Composição parcial do hidrolisado hemicelulósico da palha de trigo em sua forma original e após ser submetido ao processo de concentração.

Composição parcial	***original***	***FC=4,0***
Xilose (g/L)	10,65	39,57
Glicose (g/L)	2,79	8,36
Arabinose (g/L)	1,78	6,41
Acido acético (g/L)	0,68	1,60
Furfural (g/L)	0,34	0,05
HMF (g/L)	0,03	0,12
pH	0,68	0,47

FC= fator de concentração

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

Observou-se que o ácido acético presente não teve sua concentração aumentada proporcionalmente ao fator de concentração. O aumento não proporcional na concentração de ácido acético também foi observado por PARAJÓ *et al.* (1997) durante a concentração de hidrolisado hemicelulósico de *Eucaliptus globulus*.

Nota- se na Tabela 4.13 que o processo de concentração à vácuo causou uma redução substancial da concentração de furfural em relação a sua concentração inicial (de 0,34 a 0,05 g/L). Este comportamento pode ser atribuido às condições do processo de concentração do hidrolisado e as características fisico-químicas desse composto. Uma redução considerável do teor deste composto também foi observada por CANETTIERI (1998) após concentrar o hidrolisado de eucalipto a 3 e 4 vezes sua concentração inicial de xilose.

Verifica- se ainda que o processo de concentração à vácuo provocou um decréscimo do pH original de 0,68 para 0,47. Essa redução provavelmente está relacionada com o aumento da concentração de íons H+ provenientes do ácido sulfúrico utilizado na hidrólise ácida da palha de trigo e também do ácido acético presente no hidrolisado.

4.4 PROCESSO FERMENTATIVO

4.4.1 Fermentação do hidrolisado de palha de trigo obtido na condição ótima, em bioreator

A fermentação em fermentador de bancada foi realizada a fim de verificar o comportamento da levedura *Candida guilliermondii* visando a produção de xilitol utilizando o hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo sob as melhores condições de hidrólise. Foi utilizado um tempo de 78 horas afim de verificar o comportamento da levedura durante a fermentação.

O tratamento do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo foi realizado conforme item 3.5. A composição do meio foi de 1,0 g/L de sulfato de amônio e 5,0 g/L de farelo de arroz. Empregou- se um inóculo de 0,5 g/L. A agitação e a aeração foram de 300 rpm e 0,6 vvm, respectivamente (valores

baseados em trabalhos conduzidos anteriormente por FELIPE (1994) e ALVES (1997).

Na Tabela 4.14 estão apresentadas as concentrações de glicose, xilose, consumo de xilose, ácido acético, arabinose, xilitol e concentração de células durante a fermentação.

Tabela 4.14 - Concentrações de glicose, xilose, arabinose, xilitol, ácido acético e concentração de células durante a fermentação do hidrolisado da palha de trigo por *Candida guilliermondii* .

Tempo (h)	***Glicose (g/L)***	***Xilose (g/L)***	***Consumo de xilose (%)***	***Ácido Acético (g/L)***	***Arabinose (g/L)***	***Xilitol (g/L)***	***Células (células/mLx10^8)***
0	6,927	30,93	0,000	1,268	5,380	-	0,21
6	2,255	27,72	10,38	1,301	6,423	1,841	1,50
12	0,133	27,50	11,09	0,927	5,434	2,387	2,38
18	0,294	23,27	24,77	0,972	6,271	6,724	2,43
24	0,187	16,63	46,23	0,855	5,583	10,97	3,06
36	0,201	11,32	63,40	0,815	5,427	16,18	2,72
42	0,408	3,886	75,43	0,747	4,988	18,46	3,60
48	0,407	1,447	92,83	0,605	3,995	24,04	3,20
54	0,358	0,367	98,81	0,480	2,701	27,86	3,63
60	0,347	0,157	99,49	0,446	1,778	24,54	3,34
66	0,295	0,107	99,65	0,446	1,368	25,22	4,00
72	0,103	0,103	99,67	0,366	0,642	24,33	4,90
78	0,104	0,106	99,66	0,144	0,218	24,00	3,26

não parecem dos gráficos

Observa-se que a glicose presente no hidrolisado foi sendo consumida rapidamente nas primeiras horas de fermentação. Apesar de alguns autores (BICHO *et al.*, 1988 ; WALTHER *et al.*,2001) relatarem que a presença de glicose no meio de fermentação causa inibição da bioconversão da xilose a xilitol, neste trabalho tal fato não foi constatado. Segundo FELIPE *et al.*(1993), a presença desta hexose em pequenas concentrações no meio não interfere na bioconversão xilose a xilitol pela levedura *Candida guilliermondii.*

Em relação a xilose, observa-se que esta pentose foi assimilada lentamente nas primeiras 12 horas de fermentação. Após este período, a velocidade de consumo aumentou significamente determinando um consumo quase total após 48 horas. A partir de 60 horas a sua concentração

permaneceu praticamente constante, mostrando o fim do processo de sua conversão à xilitol.

A arabinose e o ácido acético presentes no meio também foram assimilados por *Candida guilliermondii.* 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.*,1997; PARAJÓ, *et al.*,1997). Uma pequena assimilação de arabinose na presença de xilose foi constatada em fermentações conduzidas com *C. guilliermondii* (ALVES *et al.*, 1998) e também em outras espécies como *Candida shehatae* (JEFRIES *et al.*,1988). Observa-se que a levedura consumiu lentamente a arabinose presente no hidrolisado durante as primeiras 54 horas de fermentação. Possílvemente isto se deve ao esgotamento das outras fontes de carbono que existiam no meio, principalmente a glicose e a xilose. Desta forma, este comportamento sugere uma inibição do consumo de arabinose pelas células de *C. guilliermondii* cultivadas na presença de outros açúcares. De acordo com MEYRIAL *et al.* (1991), as leveduras pertencentes ao gênero *Candida* possuem a habilidade de converter a arabinose em arabitol.

Conforme pode ser observado na Tabela 4.14 a levedura *C. guilliermondii* FTI 20037 foi capaz de produzir xilitol a partir da xilose presente no hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo. A produção de xilitol variou proporcionalmente quanto ao consumo de xilose e glicose, estabilizando após 60 horas. Sabe-se que a produção de xilitol está associada ao crescimento conforme constatado por ROBERTO (1997) em hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz. Também sabe-se da literatura que fermentadores que proporcionam maior oxigenação do meio favorecem o crescimento celular. Por isso, utilizou-se uma menor concentração de células no inóculo (0,5 g/L), acreditando que com uma menor população, iria aumentar a disponibilidade de oxigênio no meio favorecendo o crescimento celular e também a produção de xilitol sendo observado no presente trabalho.

Quanto ao crescimento celular, a medida que vai passando o tempo, ocorre um aumento de células no meio. Observa- se um rápido crescimento celular nas primeiras 12 horas possivelmente pelo consumo inicial de glicose presente no hidrolisado. Após o esgotamento da xilose (54 horas) foi observado um aumento na concentração celular, provavelmente devido ao

consumo de arabinose e xilitol. A maior concentração celular (4,90 x 10^8 células/ mL) foi observada em 72 horas. Após esse tempo, ocorreu uma diminuição no crescimento celular provavelmente por não haver mais nenhuma fonte de carbono disponível para o microrganismo.

Na Figura 4.3, é mostrada a variação da concentração de xilose, glicose, arabinose, acido acético e produção de xilitol, por *C. guilliermondii* em hidrolisado de palha de trigo, em função do tempo. Observa-se que a assimilação de xilose foi seqüencial em relação à glicose, e também que o xilitol começou a ser produzido após o consumo da glicose.

A Figura 4.4 apresenta a produção de células e de xilitol por *C. guilliermondii* em hidrolisado de palha de trigo em relação ao tempo de fermentação. Observa- se que pelo perfil das curvas que realmente a produção de xilitol está associada ao crescimento celular.

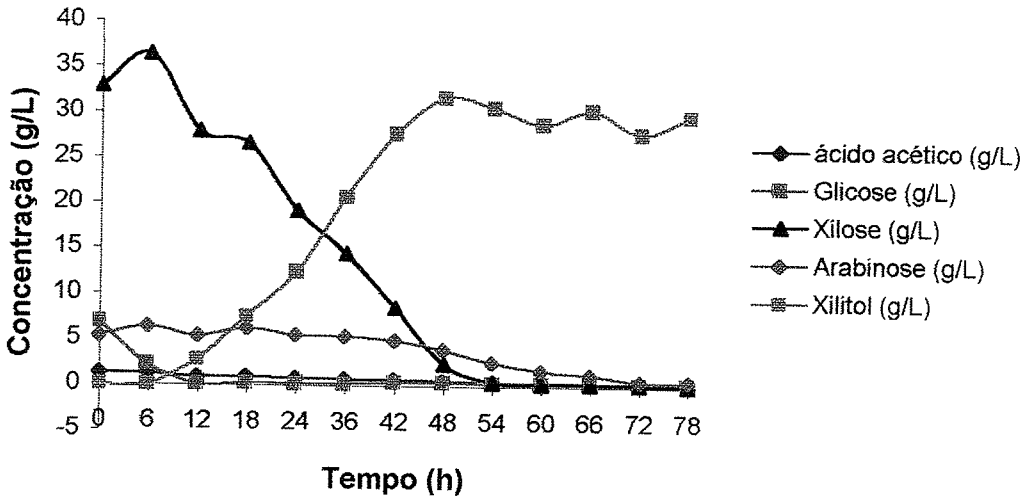

FIGURA 4.3 - Consumo de ácido acético, glicose, xilose, arabinose, produção de xilitol, por *C. guilliermondii* em hidrolisado de palha de trigo.

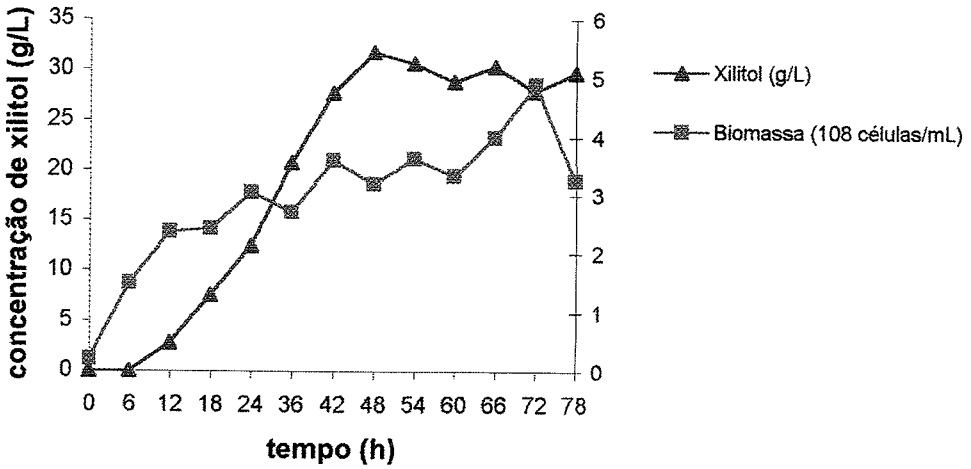

FIGURA 4.4- Produção de células e de xilitol por *C. guilliermondii* em hidrolisado de palha de trigo em relação ao tempo de fermentação.

Os parâmetros fermentativos da bioconversão de xilose-xilitol por *C. guilliermondii* são apresentados na Tabela 4.15. Os maiores valores de eficiência de bioconversão (aproximadamente 97%), correspondendo a um rendimento em xilitol de 0,889 g xilitol/g de xilose, e produtividade (aproximadamente 0,5 g/L.h) foram obtidos em 54 horas de fermentação. Este valor de rendimento está muito próximo do valor teórico máximo proposto por BARBOSA *et al.* (1988) e evidencia a potencialidade do uso da palha de trigo como matéria-prima no processo de produção de xilitol por via biotecnológica.

Destaca-se que o máximo valor de rendimento da bioconversão obtido com o uso da palha de trigo (0,89 g/g) foi superior àqueles obtidos com a utilização de palha de arroz (0,72 g/g) (MUSSATO,2002), bagaço de cana (0,57 g/g) (ALVES, 1997) e cavacos de eucalipto (0,53 g/g) (GINORIS, 2001). Com relação a produtividade, o valor obtido com a utilização da palha de trigo foi semelhante àquele obtido com a utilização de palha de arroz (0,55 g/L.h) (MUSSATO,2002) e superior àqueles obtidos com a utilização de bagaço de cana (0,39 g/L.h) (ALVES, 1997) e cavacos de eucalipto (0,45 g/L.h) (GINORIS, 2001).

Tabela 4.15 - Parâmetros fermentativos durante a fermentação do hidrolisado de palha de trigo por *Candida guilliermondii*.

hidrolisado *t(h)*	*Rendimento* *(g/g)*	*Eficiência* *(%)*	*Produtividade* *(g/L.s)*
0	-	-	-
6	0,574	62,60	0,307
12	0,696	75,90	0,199
18	0,878	95,75	0,374
24	0,767	83,64	0,457
36	0,825	89,97	0,449
42	0,791	86,29	0,440
48	0,837	91,31	0,501
54	0,889	96,95	0,503
60	0,803	87,57	0,409
66	0,818	89,20	0,383
72	0,789	86,04	0,338
78	0,779	84,95	0,308

máximo valor teórico de rendimento=0,917 g/g (BARBOSA *et al.*, 1988).

4.4.2 Fermentação conduzida em frascos agitados, dos hidrolisados originais de acordo com ensaios da Tabela 4.11

A fim de avaliar a influência das diferentes condições de hidrólise ácida sobre a bioconversão de xilose em xilitol foram efetuados ensaios de fermentação em meios preparados com os diferentes hidrolisados hemicelulósicos de palha de trigo. De acordo com estudos realizados por FELIPE *et al.* (1996b) e CANETTIERI (1998), para efetuar os ensaios de fermentação, foi selecionada uma concentração inicial de células de 3,0 g/L (10^8 células/mL). As concentrações dos nutrientes foram baseadas em estudos realizados por CANILHA, 1998. Foi proposto um tempo de fermentação de 48 horas, devido as baixas concentrações de xilose nos hidrolisados.

Os resultados das fermentações conduzidas em frascos agitados estão apresentados nas Tabelas 4.16 e 4.17.

A glicose presente nos hidrolisados foi consumida antes das 48 horas da fermentação. Comportamento semelhante no consumo desta hexose por *Candida guilliermondii* foi constatado nas fermentações dos hidrolisados de bagaço de cana de açúcar (FELIPE *et al.*, 1993, ACOSTA *et al.*, 2000), de palha de arroz (ROBERTO *et al.*, 1994) e de eucalipto (FELIPE *et al.*, 1996a). A presença de glicose no meio de cultivo de leveduras pode inibir o metabolismo

de xilose por repressão e inativação do sistema de transporte de xilose ou enzimas catabólicas (PARAJÓ, 1998), o que leva a assimilação preferencial de glicose em relação à xilose. Para as fermentações realizadas em shaker, não há evidências para se afirmar que a assimilação de xilose foi seqüencial em relação à glicose, devido as baixas concentrações de glicose e xilose no meio e seus rápidos consumos. Outro açúcar presente no hidrolisado numa concentração muito baixa foi a arabinose, sendo parcialmente consumida (Tabela 4.16). Segundo MEYER *et al.*, 1992 tanto a presença de D-glicose quanto a presença de D-xilose, inibiram a utilização de L-arabinose, em estudos envolvendo diferentes leveduras.

Tabela 4.16 – Variação das concentrações de açúcares na fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de trigo por *Candida guilliermondii* FTI 20037.

hidrolisado	***Glicose (g/L)***		***Xilose (g/L)***		***Arabinose (g/L)***	
	inicial	***final***	***inicial***	***final***	***inicial***	***final***
1	0,953	0,081	5,051	0,046	1,383	0,055
2	1,874	0,144	5,570	0,033	0,953	0,052
3	2,019	0,091	6,485	0,040	1,168	0,049
4	3,608	0,255	10,88	0,128	1,784	0,130
5	3,608	0,087	4,914	0,037	1,097	0,042
6	3,355	0,158	9,617	0,123	1,585	0,112
7	2,514	0,115	8,549	0,101	1,574	0,077
8	2,139	0,105	5,635	0,069	0,992	0,069
9	1,641	0,085	6,442	0,094	1,290	0,070
10	1,550	0,075	6,202	0,090	1,275	0,073
11	1,324	0,065	5,638	0,089	1,174	0,072
12	1,178	0,126	3,939	0,027	1,157	0,064
13	1,734	0,112	5,738	0,036	1,156	0,060
14	0,800	0,114	3,375	0,019	0,998	0,056
15	1,331	0,074	6,611	0,088	1,225	0,087
16	0,884	0,074	5,855	0,091	1,268	0,076
17	0,896	0,062	5,026	0,060	1,037	0,059
c.o.	2,375	0,132	8,104	0,057	1,334	0,002

Quanto a influência do tratamento dos hidrolisados, observa- se que houve perda do conteúdo inicial de xilose em comparação com sua concentração no hidrolisado não tratado (ver em Tabela 4.13).

Tabela 4.17 – Consumo de xilose e de ácido acético, produção de xilitol e células durante a fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos de palha de trigo por *Candida guilliermondii* FTI 20037 após 48 horas.

hidrolisado	*Consumo de xilose (%)*	*Consumo de ác.acético (%)*	*Xilitol (g/L)*	*n.cél/mL ($x10^8$)*
1	99,09	96,89	1,299	2,73
2	99,41	100,0	1,351	4,78
3	99,38	98,88	1,891	4,95
4	98,82	82,77	3,505	4,05
5	99,25	100,0	1,211	8,20
6	98,72	82,01	3,437	6,75
7	98,82	99,04	3,347	8,20
8	98,78	100,0	1,683	6,35
9	98,54	100,0	2,195	4,85
10	98,55	100,0	1,980	3,30
11	98,42	99,29	1,772	4,15
12	99,31	97,14	0,507	3,45
13	99,37	100,0	1,346	5,15
14	99,43	100,0	0,382	3,00
15	98,67	100,0	2,092	5,15
16	98,45	98,67	1,818	3,30
17	98,81	100,0	1,287	4,65
c.o.	99,30	98,41	2,519	2,80

Em relação ao consumo de xilose, verificou- se que em todos os hidrolisados houve um bom consumo desta hexose, variando entre 98,42 a 99,43. Os melhores resultados de xilitol ocorreram nos ensaios 4 e 6 (3,505 e 3,437 g/L), que foram as hidrólises realizadas nas temperaturas mais altas (140°C). Nos ensaios 5, 12 e 14 foi observado as mais baixas produções de xilitol, o que pode ser atribuído à baixa concentração inicial de xilose dos hidrolisados (4,914; 3,939 e 3,375, respectivamente).

O ácido acético (Tabela 4.17) também foi consumido por *Candida guilliermondii,* observando- se que os menores consumos nos ensaios 4 e 6 (82,77 e 82,01% respectivamente) também foram os ensaios que produziram mais xilitol. A assimilação deste ácido ocorreu simultaneamente ao consumo de xilose, semelhante ao observado por FELIPE *et al* (1996b) em fermentações conduzidas em meio sintético, em hidrolisado de bagaço e cana e de eucalipto. FELIPE *et al* (1997b) relataram que a presença do ácido acético no meio de fermentação em concentrações acima de 5,0 g/L exercem um potente efeito inibidor no crescimento celular em leveduras, porém no presente trabalho isso

não foi observado. Pode- se constatar na Tabela 4.17 que os maiores valores de concentração celular foram obtidos nos ensaios 5 (8,20 g/L) e 7(8,20 g/L), que coincidiram com altos consumos deste ácido pela levedura.

As concentrações dos demais compostos tóxicos, furfural e hidroximetilfurfural, foram baixas (dados não apresentados).

Estas observações sugerem que a temperatura de hidrólise e o teor inicial de xilose, influenciam na produção de xilitol, sendo que o aumento da temperatura de hidrólise favorece uma maior formação de xilose inicial para o processo fermentativo. É extremamente difícil realizar uma comparação entre valores obtidos neste trabalho e aqueles obtidos por outros pesquisadores, uma vez que as matérias- primas, as formas de obtenção e tratamento dos hidrolisados adotados variam amplamente. Desta forma procurou- se comparar os dados obtidos à produção de xilitol com aqueles nos quais as condições adotadas mais se aproximaram deste trabalho.

Os parâmetros fermentativos da bioconversão de xilose a xilitol por *C. guilliermondii* encontram-se na Tabela 4.18. Pode- se constatar que para os ensaios 4, 6 e 7 houve os máximos valores de rendimento em xilitol (0,3260; 0,3620 e 0,3962 g xilitol/ g xilose, respectivamente) que correspondentes as maiores eficiências de bioconversão (35,55; 39,48 e 43,21%, respectivamente). Nestes ensaios foram obtidos altas concentrações de xilitol, confirmando assim, o favorecimento deste poliol com o aumento do teor de xilose no hidrolisado. As máximas produtividades também correspondem aos ensaios 4, 6 e 7 (7,30; 7,16 e 6,97 g/L.h, respectivamente). O menor valor foi encontrado no ensaio 14 (0,80 g/L.h) o que pode ser atribuído à baixa concentração inicial de xilose (3,375 g/L), bem como os efeitos de outros fatores e interações que possam ter interferido no processo.

Tabela 4.18 – Parâmetros fermentativos da bioconversão de xilose a xilitol por *C. guilliermondii* em hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo submetido a diferentes hidrólises ácidas.

hidrolisado	***$Y_{P/S}$ (g/g)***	***η (%)***	***Q_p ($x10^{-2}$) (g/L.h)***
1	0,2595	28,30	2,71
2	0,2440	26,61	2,82
3	0,2934	32,00	3,94
4	0,3260	35,55	7,30
5	0,2483	27,08	2,52
6	0,3620	39,48	7,16
7	0,3962	43,21	6,97
8	0,3024	32,97	3,51
9	0,3458	37,71	4,57
10	0,3240	35,33	4,13
11	0,3193	34,82	3,69
12	0,1296	14,13	1,06
13	0,2361	25,74	2,80
14	0,1138	12,41	0,80
15	0,3207	34,97	4,36
16	0,3154	34,40	3,79
17	0,2592	28,26	2,68
c.o.	0,3130	34,14	5,25

$Y_{P/S}$ (g/g) - Fator de rendimento em xilitol, η (%) - Eficiência de Bioconversão, Q_p (g/L.h) - Produtividade volumétrica em xilitol

5 CONCLUSÕES

✓ Os resultados do presente trabalho permitem concluir que a obtenção do hidrolisado hemicelulósico de palha de trigo, que pode ser empregado para a obtenção de xilitol por via microbiana, é influenciada pela temperatura e pelo teor de acidez do hidrolisado.

✓ A maior concentração de xilose (15,33 g/L) foi obtida com a hidrólise ácida realizada nas seguintes condições: a 140°C, 1% de solução ácida, tempo de 20 minutos e relação de 1:15 entre a massa seca e a solução ácida, proporcionando um rendimento de extração de xilose em relação a matéria seca de 26,2%.

✓ Foi possível estabelecer um modelo matemático representativo do processo de hidrólise da palha de trigo, utilizando a metodologia de superfície de resposta, que é dado pela equação:

$$Y = 15,2286 + 3,18*X_1 + 2,83*X_2 + 3,67143*X_1^2 - 1,9625*X_1X_2,$$

em que, Y representa o rendimento em %, X_1 a temperatura em °C e X_2 a concentração da solução ácida em %.

✓ O modelo mostrou- se adequado uma vez que o resultado obtido (24,0 ± 0,14 %), mostrou-se próximo do valor previsto pelo modelo (27,4 ± 2,03%).

✓ Na fermentação em bancada, o máximo valor de rendimento em xilitol (0,889 g xilitol/ g de xilose) correspondente à maior eficiência de bioconversão (96,95%), que está muito próximo do valor teórico obtido por BARBOSA *et al.*, 1988.

✓ Na fermentação em shaker, os máximos valores de rendimento em xilitol (0,3260; 0,3620 e 0,3962 g xilitol/ g de xilose) também correspondem as

maiores eficiências de bioconversão (35,55; 39,48 e 43,21% respectivamente) e as maiores produtividades (7,30; 7,16 e 6,97, respectivamente).

✓ Durante o tratamento dos hidrolisados para as fermentações, observou-se que houve uma perda do conteúdo de xilose comparando com as concentrações de xilose antes de serem tratadas. Sugere-se para futuros estudos que sejam realizadas etapas de concentrações, antes ou após os tratamentos do hidrolisado.

✓ O valor de rendimento de bioconversão obtido com a utilização de palha de trigo foi superior àqueles obtidos com a utilização de palha de arroz, bagaço de cana e cavaco de eucalipto, evidenciando a potencialidade da utilização da palha de trigo como matéria-prima para produção de xiltiol por via biotecnológica.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABITRIGO. Produção Brasileira de trigo. Disponível em: <www.abitrigo.com.br/Port/TrigoProd.htm>.Data: 10/08/2001 Acesso em: 23/fev/2002.

ACOSTA, E. Estudo de Parâmetros do Processo Contínuo de Produção de Xilitol a partir de Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana- de Açúcar. Lorena: FAENQUIL/ Departamento de Biotecnologia e Química, 1999. 100p. (Tese de Mestrado).

ACOSTA, E.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A. Effect of the oxygen Transfer Coefficiente on Xylitol Production from Sugarcane Bagasse Hydrolysate by Continuous Stirred- Tank Reactor Fermentation Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 84-86, p. 633-637, 2000.

ALMEIDA e SILVA, J.B. Aplicação de modelagem matemática na produção de proteína microbiana por *Paecilomyces variotii*, em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. São Paulo: FCF-USP, 1996. 160p. (Tese de Doutorado).

ALVES,L.A. Tratamento do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana de açúcar para a produção biotecnológica de xilitol. Lorena: FAENQUIL/ Departamento de Biotecnologia e Química, 1997. 100p. (Tese de Mestrado).

AMARTEY, S.; JEFRIES, 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.

BAR, A. Xylitol. In: O'BRIEN NABORS L.; GELARDI, R. Alternative Sweetners. New York: Marcel Dekker, 1991. p. 185-216.

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

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. Statistic for experimenters: na introduction to design, data analysis and model building, New York: John Wiley & Sons Inc., 1978, 653p.

BROCK, MADIGAN; MARTINKO, PARKER Biology of microorganisms. Prentice Hall International Editions, 1994, 909p.

BROWN, L.R. Queda na colheita de grãos. Disponível em: <www.iuma.org.br/SV_quedagraos.htm>. Acesso em: março, 2002.

BRUINENBERG, P.M.; de BOT, P.H.M.; van DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. NADH-linked aldose redutase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. Applied Microbiology and Biotechnology, v.19, p. 256-260, 1984.

CÂNDIDO, E.J. Determinação da composição química e das condições de hidrólise da palha de trigo, Lorena /FAENQUIL/DEBIQ, 2001 (Relatório de atividades n°3 I.C. FAPESP Proc.00/14355-5).

CANETTIERI, E.V. Aproveitamento do hidrolisado hemicelulósico de eucalipto para a produção de xilitol utilizando projetos de experimentos. Lorena:FAENQUIL, 1998, 98p.(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. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.24, p.159-168, 2001.

CANILHA,L. Avaliação da produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de eucalipto utilizando projeto de experimentos, Lorena /FAENQUIL/DEBIQ, 1998 (Relatório de atividades n°3 I.C. FAPESP Proc.97/10143-9).

CARRAU, F.M.; NEIROTTI, E; GAGGERO, C.; AZEVEDO, J.L. Separation and biodegradation of rice hulls and sugarcane bagasse alkali lignins. Arquivos de Biologia e Tecnologia, Curitiba, v.30, n.4, p.577-584, 1987.

CARVALHO, W. de. Otimização da produção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana em sistema com células imibilizadas operado em bioreator de mistura. Lorena: FAENQUIL, 2001, 76p. (Exame de qualificação).

CHEN, L.F.; GONG, C.S. Fermentation of Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate to Xylitol by a Hydrolysate - Acclimatized Yeast. Journal of Food Science, Chicago, v. 50, p. 226-228, 1995.

CHUNG, I.S.; LEE, Y.Y. Ethanol Fermentation of Crude Acid Hydrolysate of Cellulose Using High-Level Yeast Inocula. Biotechnology and Bioengineering, v.27, p.308-315, 1985.

CONSIDINE, D.M. ed. Chemical and process technology encyclopedia New York: MacGraw-Hill, 1974.

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.

DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M Fermentation of D- xylose, D- glucose, L- arabinose mixture by *Pichia stipitis*. Effect of the oxygen tranfer rate on fermentation performance. Biotechnology and Bioengineering, v.34, p. 398-402, 1989.

DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Acid Hydrolysis of Wheat Straw and Process Considerations for Ethanol Fermentation by *Pichia stipitis* Y7124. Process Biochemistry International, p. 132-135, 1990.

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

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

du PREEZ, J.C.; BOSCH, M.; PRIOR, B.A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effectes of pH, temperature and substrate concentration. Enzyme and Microbial Technology, v.8, n.3, p. 360-364, 1986.

EMBRAPA. Produção de trigo pode gerar mais de 30 mil empregos. Disponível em: <www.embrapa.com.br>.Data: 25/03/99 Acesso em: março. 2002.

EMBRAPA. Àrea plantada de trigo no mundo (ha) 1997/1999. Disponível em: <www.embrapa.com.br>. Acesso em: out. 2000.

EMODI, A. Xylitol: Its Properties and Food Applications. Food Technology, January, p. 28-32, 1978.

ERRAMOUPSE, J.; HEYNEMAN, C.A. Treatment and prevention of otitis media, Annals of Pharmacotherapy, v.34, nr. 12, p. 1452 - 1468, 2000.

FANTA, G.F.; ABBOTT, T.P.; HERMAN, A.I.; BURR, R.C.; DOANE, W.M. Hydrolysis of Wheat straw Hemicellulose with Trifluoroacétic Acid Fermentation of Xylose with *Pachysolen tannophilus.* Biotechnology and Bioengineering, v.24, p. 1122-1125, 1984.

FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; VITOLO, M.; ROBERTO, I.C.; SILVA, S.S.; ROSA, S.A.M. Preparação de xilitol por fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Arquivos de Biologia e Tecnologia, Curitiba, v.36. n.1, p.103-114, 1993.

FELIPE, M.G.A. Obtenção de xilitol por fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana- de -.açúcar. São Paulo: FCF/USP, 1994. 141p. (Tese de Doutorado).

FELIPE, M.G.A.; VIEIRA, D.C.; VITOLO, M.; SILVA, S.S.; ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xilitol by *Candida guilliermondii.* Journal of Basic Microbiology, Berlin, v.35. n.3, p.171-177, 1995.

FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I.M. Fermentation of *Eucalyptus* hemicellulosic hydrolisate to xylitol by *Candida guilliermondii.* Bioresource Technology, 1996a.

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

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

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

FELIU, J.A.; GONZALEZ, G.; MAS, C. SPC Production by *Hansenula polymorpha* from Xylose. Process Biochemistry International, p. 136-140, 1990.

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

FERRARI, M. D.; NEIROTTI, E.; ALBORNOZ, C.; SAUCEDO, E. Ethanol production from eucalyptus wood hemicelullose hydrolysate by *Pichia stipitis.* Biotechnology and Bioengineering, v.40, p.753-759, 1992.

FÖRSTER, H. Comparative Metabolism of Xylitol, Sorbitol and Fructose. In: SIPLLE, H.L., McNUTT, K.W. eds. Sugar in Nutrition. New York: Academic Press, 1974. p. 259.

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. Lorena: FAENQUIL/ Departamento de Biotecnologia e Química, 2001. 105p. (Tese de Mestrado).

GIRIO, F.M.; AMARO, C.; AZINHEIRAL, H.; PELICA, F.; AMARAL-COLLAÇO, M.T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Deubaryomyces hansenii.* Bioresource Technology, v.71, nr3, p. 245-251, 2000.

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

GOLDSTEIN, I.S.; EASTER, J.M. Chemicals from wood: an improved process for converting cellulose to ethanol. Tappi Jounal,Atlanta, v.75, p.135-140, 1992.

GONZALEZ,G.; LÓPEZ-SANTIN, J.; CAMINAL, G.; SOLÀ, C. Dilute Acid Hydrolysis of Wheat straw Hemicellulosic at Moderate Temperature: A Simplified Kinetic Model. Biotechnology and Bioengineering, v.28, p.288-293, 1986.

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

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B.A. Biochemistry and physiology of fermentation by yeasts. Enzyme and Microbial Technology, v.16, nov. 1994.

HAMILTON F., LEOPOLD B. Pulp and paper manufacture, Joint Textbook Committee of the Paper Industry, v.3, p. 82-84, 1987.

HARRIS, E.E.; BEGLINGER, E. Madison wood sugar process. Industrial and Engineering Chemistry, Washington, v.38, n.9, p.890-895, 1946.

HEIPIEPER, H.J.; WEBER, F.J.; SIKKEMA, J.; KEWELO, H.; de BONT, J.A.M. Mechanism of resistence of whole cells to toxic organic solvents. TibTech. v. 12, p. 409-15, 1994.

HERRERO , A.A.; GOMES, R.F.; SNEDECOR, B.; TOLMAN, C.J.; ROBERTS, M.F. Growth Inhibiton of *Clostidium thermocellum* by Carboxilic Acids: A mechanism based on uncoupling by weak acids. Applied Microbiology and Biotechnology, v.22, p.53-62, 1985.

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

HON, D.N.S. Chemical modification of lignocellulosic materials. New York: Marcel Dekker, 1996, p.370.

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

JAFFE, G.M.; SZKRYBALO, W.; WEINERT, P.H. Process for Producing Xylose. US n. 3.784.408. 16 set. 1970; 08 jan. 1974.

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

KUHAD, R. C., SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. Critical Reviews in Biotechnology, Cleveland, v. 13, n. 2, p. 151-172, 1993.

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

LARSSON, S.; QUINTANA-SAINZ, A.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N.O.; JONSSON, L. Influence of Lignocellulosic- Derived Aromatic Compounds on Oxygen- Limited Growth and Ethanolic Fermentation by *Saccharomyces cerevisae.* Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 84-86, p.617-632, 2000.

LAWFORD, H.G.; ROUSSEAU, J.D. Improving Fermentation Performance of Recombinant *Zymomonas* in Acetic Acid-Containing Media. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 70-72, p.161-172, 1998.

LEE, H. Reversible inactivation of D-Xylose utilization by D-glucose in the pentose fermenting yeast *Pachysolen tannophilus.* FEMS Microbiology Letters, v. 92, p.1-14, 1992.

LEE, H.; SOPHER, C.R.; YAU, K.Y.F. Induction of Xylose Reductase and Xylitol Dehydrogenase Activities on Mixed Sugars in *Candida guilliermondii.* Journal of Chemistry Technology and Biotechnology, v.66, p.375-379, 1996

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

LINGSTROM, P.; LUNDGREN, F.; BIRKHED, D.; TAKAZOE, I.; FROSTELL, G. Effects of frecuent mouthrinses with palatinose and xylitol on dental plaque. European Journal of Oral Scienses, v. 105, n.2, p. 162-169, 1997.

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

MADDOX, I.S.; MURRAY, A.E. Production of n-Butanol by Fermentation of Wood Hydrolysate. Biotechnology Letters, Middlesex, v. 5, n. 3, p. 175-178, 1983.

MAKINEN, K.K. Xylitol: The Sugar That Prevents Tooth Decay. The Futurist, June, p. 135-139, 1976.

MAKINEN, K.K.Can the pention-hexitol theory explain the clinical observation made with xylitol?. Medical Hypotheses, v.54,nr. 4, p. 603-613, 2000.

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

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.

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, nr.10, p. 1811-1814, 1998b.

MATTILA, P.T.; KNUUTTILA, M.L.E.; KOVANCN, V.; SVANBERG, M.J. Improved bone biomechanical properties in rats after oral xylitol administration.Calcified Tissue International, v.64, nr.4, p. 340, 1999.

MAYERHOFF, Z.D.V.L. Obtenção de Xilitol a partir de Hidrolisado Hemicelulósico de palha de arroz: Seleção de Leveduras e determinação de parâmetros fermentativos por Modelagem Estatística, Lorena:FAENQUIL, 1997. 94p. (Tese de Mestrado).

MELAJA, A.J.; HÄMÄLÄINEN, L. Process for Making Xylitol. U S n. 4.008.285. 18 jun. 1975. 15 fev. 1977.

MELLO JÚNIOR, C.A. Efeitos do tratamento com pressão e vapor sobre a composição e a cinética da fermentação "in vitro" do bagaço de cana de açúcar. Piracicaba: ESALQ/USP, 1987. (Tese de Mestrado).

MEYER, P.R.; du PREEZ, J.C.; KILIAN, S. Isolation and evaluation of yeasts for biomass production from bagasse hemicellulose hydrolysate system. Applied Microbiology, Washington, v.15, p. 161-165, 1992.

MILLETT, M.A.; BAKER, A.J.; SATTER, L.D. Phisical and chemical pretreatments for enhancing cellulose saccharification. Biotechnology and Bioengineering Symposium, New York, v.6, p.125-153, 1976.

MONTEIRO, J.B.R. Crescimento de *Trichoderma reesei* e *Rhizopus oligosporus* em bagaço de cana-de-açúcar para produção de proteína. Viçosa: UFV , 1986 (Tese de Mestrado).

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

NELSON,N. A photometric adaptation of the Somogy method for the determination of glucose. Journal of Biological Chemistry, Bethesda, v.153, p.375-380, 1944.

NIGAM, P.; SINGH, D. Processes for fermentative production of xylitol- A sugar substitute. Process Biochemistry, v. 30, n.2, p.117-124, 1995.

NIMZ, H.H.; CASTEN, R. Chemical Processing of Lignocellulosics. Holz als Roh-und werkstoff, Berlin, v. 44, p. 207-212, 1986.

NODA, F.; HAYASHI, K.; MIZUNUMA, T. Influence of pH on Inhibitory Activity of Acetic Acid on Osmophilic Yeasts Used in Brine Fermentation of Soy Sauce. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 43, n.1, p. 245-246, 1982.

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.

OH, D.K.; KIM, S.Y.; KIM, J.H. Increase of xylitol production rate by controlling redox potencial in *Candida parapsilosos*. Biotechnology and Bioengineering, v.58, n.4, p.440-444, 1998.

OJAMO, H.; YLINEN, L.; LINKO, M. Process for the Preparation of Xylitol from Xylose by Cultivation *Candida guilliermondii*. WO 88/ 05467. Dep. 08.12.87. Publ. 28.07.88.

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.

OLSSON, L., HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolyzates for ethanol production. Enzyme and Microbial Technology. New York, p. 312-331, 1996.

PALMQVIST, E.; HÄHN-HAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates: Inhibitors and mechanisms of inhibition. Bioresource Technology. v. 74, p. 25-33, 2000.

PARAJÓ, J.C.; ALONSO, J.L.; SANTOS, V. Kinetics of Eucalyptus Wood Fractionation in Acetic Acid-HCl-Water Media. Bioresource Technology, v.51, p.153-162, 1995.

PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J.M. Production of Xylitol from concentrated Wood Hydrolysates by *Debariomyces hansenii:* Effect of the inicial cell concentration. Biotecnology Letters, v.18, n.5, p. 593-598, 1996.

PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, J.M. Improved xylitol production with *Debariomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysate. Enzime and Microbial Technology, v.21, p.18-24, 1997.

PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J.M. Biotechnological Production of Xylitol: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. Bioresource Technology, v.65, p.191-201, 1998a.

PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J.M. Biotechnological Production of Xylitol: Operation in Culture Media made from Lignocellulose Hydrolysates. Bioresource Technology, v.66, p.25-40, 1998b.

PARHAM, R. A. Ultra-structure and chemistry. In: HAMILTON, F.; LEOPOLD, B. Pulp and paper Manufacture. Atlanta: TAPPI/CPPA, v.3, p. 35-45, 1993.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E.C.S. Microbiologia. São Paulo:Mc Graw Hill, v.1, 566p., 1980.

PERRONE, J.C. Os processos hidrolíticos no aproveitamento dos recursos renováveis. Silvicultura, São Paulo: Edição Especial, p.23-32, 1977.

PERRY,R.H.; CHILTON, C.H. Manual de engenharia química. Ed Guanabara 2, 5ª edição, cap. 21, p. 38, 1980.

PESSOA Jr, A. Produção de biomassa microbiana a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. Viçosa: UFDV, 1991. 178p. (Tese de mestrado).

PHAFF, H.J.; MILLER, M.W.; MRAK, E.W. The Life of Yeasts. 2. Ed. Cambridge, Harvard University Press, p.142, 1978.

PREZIOSI- BELLOY, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J.M. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugars mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. Enzyme Microbial and Technology, v.21, p.124-129, 1997.

ROBERTO, I.C.; FELIPE, M.G.A;, LACIS, L.S.; SILVA, S.S.; MANCILHA, I.M. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. Bioresource Technology, New York, v.36, p.271-275, 1991.

ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M.; SOUZA, C.A Evaluation of Rice Straw hemicellulose Hydrolisate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii* Biotechnology Letters, v.16,n.11, p.1211-1216, 1994.

ROBERTO, I.C.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, Efect of Inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulosic hydrolyzate by *Candida guilliermondii*. Journal of Industrial Microbiology, v. 16, p. 348-350, 1996a.

ROBERTO, I.C.; SILVA, S.S.; FELIPE, M.G.A.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Bioconversion of Rice Straw Hemicellulosic Hydrolyzate for the Production of Xylitol. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.57/58, p.339-347, 1996b.

ROCHA, G.J.M. Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio. São Carlos: IQSC/USP, 2000. 136p. (Tese de Doutorado).

RODRIGUES, R.C.L.B. Avaliação das Condições de Concentração a Vácuo do Hidrolisado Hemicelulósico de Bagaço de Cana para a Produção do Xilitol. Lorena: FAENQUIL/Departamento de Biotecnologia e Química, 1999. 109p. (Tese de Mestrado).

ROSA, S.M.A., FELIPE, M.G.A., SILVA, S.S., VITOLO, M.Xylose Reductase Production by *Candida guilliermondii.* Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 70-72, p. 127-135, 1998.

ROSEIRO, J.C.; PEITO, M.A.; GIRIO, F.M.; AMARAL-COLLAÇO, M.T. The Effects of the Oxygen Transfer Coefficient and Substrate Concentration on the Xylose Fermentation by *Debaromyces hansenii.* Archieves of Microbiology, Berlin, v. 165, p. 484-490, 1991.

RUI-ORDAZ, N; HERNANDEZ-MANZANO, E.; RUI-LAGUNEZ, J.C.; CRISTIANI, E.; GALÍNDEZ, J. Growth Kinetic Model that Describes the Inhibitory and Lytic Effects of Phenol on *Candida tropicalis* yeast. Biotechnology Progress, v. 14, p. 966-969, 1998.

SAEMAN, J.F.; HARRIS, E.E.; KLINE, A.A. Analysis of wood sugar. Industrial and Engineering Chemistry, Washington, v.17, p.95-99, 1945.

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.

SANROMAN, M.A.; DOMÍNGUEZ, H.; NUÑEZ, M. J.; LEMA, J.M. Xilitol: Un alcohol com futuro. Affinidad XLVIII, Julio-Agosto, 1991.

SEAGRI (Secretaria da Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária) Importância e uso do trigo. Disponível em: <www.bahia.ba.gov.br/seagri/trigo>.Data: 2001 Acesso em: março. 2002.

SENE, L., VITOLO, M., FELIPE, M.G.A, SILVA, S.S. Effect of Environmental Conditions on Xylose Reductase and Xylitol Dehydriogenase Production in *Candida guilliermondii*. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 84-86, p. 371-380, 2000.

SILVA, D.J. Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos. Viçosa/UFV, Imprensa Universitária, 1990. 165p.

SILVA, S.S.; AFSCHAR, A.S. Microbial production of xylitol from D- Xilose using *Candida tropicallis*. Bioprocess Engineering, v.11, p. 129-134, 1994.

SILVA, S.S.; RIBEIRO, J.D.; FELIPE, M.G.A.; VITOLO, M. Maximizing the xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate by controlling the aeration rate. Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 63/65, p.557-564, 1997a.

SILVA, S.S.; QUESADA-CHANTO, A.; VITOLO, M. Up stream parameters affectting the cell growth and xylitol production by *Candida guilliermondii*. Zeitschrift für Naturforschung, v.52,n.5/6, p.359-363, 1997b.

SIRISANSANEEYAKUL, M.R.; REUSS, M. Microbial production of xylitol from wheat straw hydrolysates. 10th. Annual Meeting of Biotechnologists, June 1 to 3, F.R.G., v.5, Part B, 1992.

SIRISANSANEEYAKUL, S.; STANISZEWSKI, M.; RIZZI, M. Screening of Yeasts for Production of Xylitol from D-Xylose Journal of Fermentation and Bioenginnering, v.80, nr.6, p. 565-570, 1995.

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.

SRINIVASAN, M.C.; RAO, R.R.; DESHMUKH, S.S.; SAHASRABUDHE, N.A. Microbial biomass production from rice straw by fermentation with *Pinicillium jánthinelum*. Enzyme and Microbial Technology, Surrey, v.5, p.269-272, 1983.

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.

TITCHENER, A.L. Acid hydrolysis of wood. In: SYMPOSIUM ON THE POTENTIAL FOR ENERGY FARMING IN NEW ZEALAND, Lower Hutt, New Zealand, 26 november 1975. Dsir Information Series, v.117, p.69-76, 1975.

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. Read Oak Wood Derived Inhibitors in the Ethanol Fermentation of Xylose by *Picchia stipitis* CBS 5776. Biotechnology Letters, v.7, nr.1, p. 841-846, 1985.

TSAO, G.T. Cellulosic material as a renewable resource. Process Biochemistry, v.10, p.12-14, 1978.

UHARI, M.; TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. Vaccine, v. 19, nr. 144-147, Suppl. 1, 2000.

VANDESKA, E.; AMARTEY, S.; KUZMANOVA, S.; JEFFRIES, T.W. Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, v.11, n.141, p.71- 74, 1995.

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.

WALTHER,T.; HENSIRISAK, P.; AGBLEVOR, F.A. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. Bioresource Technology, v.76, nr.3, p.213-220,2001.

WEBB, S.R.; LEE, H. Regulation of Xylose Utilization by Hexoses in Pentose-Fermenting Yeasts. Biotechnology Advances, Oxford, v.8, p. 685-697, 1990.

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

YLIKAHRI, R. Metabolic and Nutritional Aspects of Xylitol. Advances in Food Research, New York, v. 25, p. 159-180, 1979.