

MARIA TEREZA DE FREITAS

UTILIZAÇÃO DA CASCA DE SEMENTE DE ALGODÃO COMO SUBSTRATO
PARA PRODUÇÃO MICROBIOLÓGICA DE XILITOL

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2003

MARIA TEREZA DE FREITAS

UTILIZAÇÃO DA CASCA DE SEMENTE DE ALGODÃO COMO SUBSTRATO
PARA PRODUÇÃO MICROBIOLÓGICA DE XILITOL

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 1º de agosto de 2003.

Prof^a Flávia Maria L. Passos

Dr^a. Virginia Maria Chaves-Alves

Prof^a Célia Alencar de Moraes

Prof. Jorge Luiz C. Coelho

Prof. Hilário Cuquetto Mantovani
(Orientador)

A Deus.

Aos meus pais, Dinho e Lidinha.

Às minhas irmãs Luiza, Ene e Débora.

Ao meu sobrinho Yuri.

Ao meu namorado Geraldo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por toda sua bondade e pela inúmeras graças concedidas.

À Universidade Federal de Viçosa, especialmente ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao CNPq pela bolsa de estudo.

Ao Professor Hilário Cuquetto Mantovani por toda atenção, orientações, sugestões, ensinamentos que permitiram a concretização deste trabalho.

À Professora Flávia Maria Lopes Passos e Dr^a Virgínia Maria Chaves-Alves por todas as sugestões e ensinamentos.

Ao Professor Jorge Luiz Cavalcante Coelho, agradeço especialmente, por todas orientações, ensinamentos, compreensão e apoio fundamentais à realização deste trabalho.

À Professora Célia Alencar de Moraes pelas sugestões e apoio.

A todos os professores por todo apoio e ensinamentos.

Ao Fábio, meu agradecimento especial por todos os auxílios, atenção, ensinamentos e sugestões.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia por toda contribuição, especialmente à Nilcéia e Dona Aparecida.

Aos queridos amigos do Laboratório de Fisiologia e demais Laboratórios: Agenor, Juliana, Marcelo, Wendel, Ane, Grace, Cláudia, Ximena, Néia, Chelen, João, Akihiko, Luciana, Francis, Elisângela, Elisete, Marciana, Zefa e Aline.

Aos amigos de todas as horas: Liliane, André, Alex, Dani, Webel e Rachel, por toda ajuda e amizade.

Ao meu pai Dinho que sempre foi meu maior exemplo e à minha mãe por todo seu amor, dedicação, torcidas e orações.

À minha querida avó Tereza.

Às minhas queridas irmãs, Luiza, Ene e Débora e ao “fofucho” Yuri por todo amor, carinho e incentivo.

Ao meu namorado Geraldo por todo seu carinho, apoio, compreensão, estímulo e incontáveis ajudas.

Às amigas Graça, Dadadi e Dona Chica por todas orações.

A todos amigos que sempre me apoiaram.

BIOGRAFIA

MARIA TEREZA DE FREITAS, filha de Geraldo de Freitas Santos e Ovídia Maria Moreira Freitas, nasceu em Ervália - MG, em 14 de abril de 1966.

Em outubro de 1989 graduou-se no curso de Nutrição pela Universidade Federal de Viçosa, MG.

Em abril de 2001 iniciou o Curso de Mestrado em Microbiologia Agrícola na Universidade Federal de Viçosa.

CONTEÚDO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Resíduos lignocelulósicos	4
2.2. Xilitol: Propriedades e Aplicações	7
2.3. Obtenção do xilitol	10
2.4. Fatores que afetam a bioconversão de xilose em xilitol	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Obtenção e preparo do hidrolisado hemicelulósico de casca de semente algodão.....	16
3.2. Triagem das leveduras	17
3.2.1. Microrganismos	17

3.2.2. Manutenção da cultura	17
3.2.3. Produção e padronização do inóculo	18
3.2.4. Meio de cultivo	18
3.3. Avaliação dos parâmetros reguladores da bioconversão de D-xilose a xilitol	18
3.3.1. Determinação da relação massa celular versus densidade óptica	18
3.3.2. Avaliação da concentração de D-xilose e aeração por controle da agitação	19
3.4. Métodos analíticos	19
3.5. Determinação dos parâmetros de produção de xilitol	20
3.6. Delineamento experimental	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Obtenção e caracterização do hidrolisado hemicelulósico	21
4.2. Triagem das leveduras	23
4.3. Efeito da concentração de D-xilose e do nível de aeração pelo controle de agitação	26
5. DISCUSSÃO	32
6. RESUMO E CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
APÊNDICES	52

RESUMO

FREITAS, Maria Tereza, M. S., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2003. **Utilização da casca de semente de algodão como substrato para produção microbiológica de xilitol.** Orientador: Hilário Cuquetto Mantovani. Conselheiros: Flávia Maria Lopes Passos e Virgínia Maria Chaves-Alves.

O acúmulo de resíduos agroindustriais constitui-se em problema ambiental devido à dificuldade de reciclagem. No Brasil são gerados vários tipos de resíduos, cujo volume demanda a sua liberação no ambiente. A casca de semente de algodão é problema para a indústria algodoeira e existe o interesse pelo desenvolvimento de tecnologias para o aproveitamento deste resíduo. Neste trabalho, avaliou-se o potencial do hidrolisado da casca de semente de algodão (HCA) como substrato para a produção microbiológica de xilitol. Foram utilizadas cinco leveduras (1.55, *Debaryomyces hansenii* UFV-170, 1.71, 2.64, 2.80) isoladas por SAMPAIO (2001) e caracterizadas como boas produtoras de xilitol em meio sintético. As leveduras foram cultivadas em hidrolisado hemicelulósico obtido de casca de semente de algodão antes e após moagem, acrescido de meio mineral e extrato de levedura, com agitação de 200 rpm, a 30 °C. A produção de xilitol foi cerca de 4 a 34% maior no hidrolisado de casca de semente de algodão moída (HCAM) do que no hidrolisado de casca de semente de algodão sem moer (HCASM). Das cinco leveduras testadas, apenas a levedura 2.80 não

apresentou valores significativos de produção de xilitol nas condições utilizadas neste trabalho. As demais leveduras produziram xilitol no HCA e a produtividade volumétrica (Q_p), produtividade específica (q_p) e rendimento ($Y_{p/s}$) de xilitol entre os isolados foram semelhantes. A levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170 cresceu no HCA concentrado cinco vezes, mas não produziu xilitol. No HCA não concentrado, os melhores resultados de produção de xilitol foram obtidos após 24 h de cultivo. Os maiores valores de produtividade volumétrica ($0,38 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e rendimento ($0,56 \text{ g g}^{-1}$) foram obtidos com o hidrolisado concentrado três vezes, na agitação de 100 rpm e após 72 h de cultivo. Os resultados indicam que o hidrolisado de casca de semente de algodão pode ser utilizado para a produção microbiológica de xilitol. Entretanto, a influência de outros fatores no processo de bioconversão precisa ainda ser investigada e o efeito de produtos tóxicos presentes neste hidrolisado deve ser minimizado.

ABSTRACT

FREITAS, Maria Tereza, M. S., Universidade Federal de Viçosa, August, 2003.

Utilization of cotton husk hydrolysate for microbiological production of xylitol. Adviser: Hilário Cuquetto Mantovani. Committee Members: Flávia Maria Lopes Passos and Virgínia Maria Chaves-Alves.

Previous studies indicated that five yeasts isolated from dairy environments could produce high levels of xylitol in synthetic media. When these isolates were cultivated in cotton husk hydrolysate added with yeast extract and mineral media, xylitol production was detected in the cell-free supernatants of only four isolates. Three isolates did not show significant differences in xylitol production, and the average volumetric productivity was a function of D-xylose concentration. If the isolate that presented the highest xylitol production in synthetic media (yeast *Debaryomyces hansenii* UFV-170) was incubated in media containing cotton husk hydrolysate, maximal xylitol production occurred after 24 h under agitation of 100 rpm. When the hydrolysate was concentrated 3-fold, xylitol production increased, but only if the fermentation period was approximately 72 h. Xylitol production did not occur if the hydrolysate was concentrated 5-fold. Because substrate concentration alone could not explain the effect on xylitol production, it appears that toxic substances in the hydrolysate caused the inhibitory effect.

1. INTRODUÇÃO

O estabelecimento de monoculturas e sistemas intensivos de cultivos ocorridos no século passado tem resultado na liberação excessiva de resíduos florestais e agroindustriais no ambiente. Este acúmulo constitui-se em problema de âmbito mundial devido à dificuldade de reciclagem de alguns destes resíduos. Muitas vezes os resíduos agroindustriais são transportados para áreas designadas, sendo posteriormente queimados ou enterrados. Esta prática resolve parte do problema do acúmulo de resíduos nas lavouras e nas indústrias, mas acarreta a perda de substratos que poderiam ser convertidos em produtos nobres para uso industrial.

No Brasil são gerados vários tipos de resíduos agroindustriais tais como sabugo e folhas de milho, palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, madeira de eucalipto, farelo de cevada, caroço e casca de semente de algodão, dentre outros.

O algodão é considerado a mais importante das fibras têxteis no Brasil e no mundo, situando-se entre as dez maiores fontes de riqueza do setor agropecuário brasileiro. Sendo uma planta que oferece vários produtos, o algodoeiro gera grande quantidade de resíduos em seu processamento. Apesar da casca de semente de algodão ser usada como combustível, na alimentação

animal e na elaboração de rações e adubos, o volume de resíduos demanda a sua liberação no ambiente. Assim, é interessante desenvolver tecnologias para melhor aproveitar a casca de semente de algodão.

Cientistas vêm desenvolvendo tecnologias que visam não só reduzir o impacto ambiental causado pelos resíduos, mas também gerar produtos de interesse industrial. A tecnologia de obtenção de hidrolisados hemicelulósicos a partir destes resíduos é relevante, pois a conversão dos açúcares contidos nestes hidrolisados, principalmente xilose, resulta em diversos produtos de interesse econômico como etanol, acetona, ácido acético e xilitol, dentre outros.

A produção de xilitol destaca-se devido a sua grande aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica. O xilitol é um poliálcool que tem propriedades anticariogênicas, alto poder adoçante e metabolismo insulina-independente. Atualmente o xilitol é obtido por processo químico que envolve as etapas de hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos ricos em xilana, separação da xilose do hidrolisado por cromatografia, hidrogenação catalítica da xilose pura a xilitol e a cristalização e purificação do xilitol. Entretanto, as extensivas operações envolvidas no processo químico tornam a obtenção do xilitol muito onerosa. O processo microbiológico de obtenção do xilitol é uma alternativa ao processo químico, apresentando como principais vantagens a não formação de compostos tóxicos e menor custo, já que não requer obtenção prévia de xilose pura.

Fungos filamentosos, algumas bactérias e a maioria das leveduras são capazes de converter D-xilose em xilitol. As leveduras são consideradas, dentre os microrganismos, os melhores produtores de xilitol. Nas leveduras prevalece a via de redução de xilose a xilitol pelas enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase. Na maioria das bactérias, xilose é isomerizada diretamente a xilulose por ação da enzima xilose isomerase não havendo, portanto, produção de xilitol. Apesar dos fungos filamentosos possuírem as enzimas xilose redutase (XR-E.C.1.1.1.21) e xilitol desidrogenase (XDH-E.C.1.1.1.9), há poucos estudos investigando a produção de xilitol por fungos. Alguns trabalhos

indicam que fungos filamentosos consomem xilose durante o seu crescimento para produção de massa celular, o que resulta em baixo rendimento de xilitol.

Este trabalho teve como objetivo a utilização da casca de semente de algodão para obtenção de hidrolisado hemicelulósico a ser utilizado como substrato para a produção microbológica de xilitol. Como parte deste estudo foram avaliados os efeitos da concentração de D-xilose no hidrolisado e da taxa de aeração nos principais parâmetros de produção de xilitol.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Resíduos Lignocelulósicos

Materiais lignocelulósicos na forma de resíduos agrícolas e florestais são acumulados em grandes quantidades no mundo todo, inclusive no Brasil. A disponibilidade e a possibilidade de conversão desses materiais em diferentes produtos (como etanol, ácidos orgânicos e xilitol) por processos biotecnológicos, com a utilização dos componentes da biomassa, tem chamado a atenção de muitos pesquisadores (ROBERTO *et al.*, 1996).

Materiais lignocelulósicos são compostos principalmente de celulose, hemicelulose e lignina (OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996). Celulose é um homopolissacarídeo linear formado por unidades de D-glicose unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4) (KUHAD e SINGH, 1993). Lignina é uma macromolécula polifenólica constituída por unidades básicas de 3-5-dimetoxi-4-hidroxi-fenilpropano, 3-metoxi-4-hidroxifenilpropano e 4-hidroxi-fenilpropano (TSAO, 1986). Hemicelulose é composta de heteropolímeros lineares e ramificados de L-arabinose, D-galactose, D-glicose, D-manose e D-xilose (OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996). As hemiceluloses podem ser classificadas

como xilanas, mananas, arabinoxilanas, arabinogalactanas e arabinanas, de acordo com o tipo de material lignocelulósico (AGUIAR *et al.*, 1999a).

Dentre os componentes de materiais lignocelulósicos, a fração hemicelulósica é de grande importância por constituir matéria-prima de baixo custo para bioconversão em produtos de interesse para o homem (SIRISANSANEEYAKUL *et al.*, 1995). Entretanto, para serem utilizados como fonte de carbono fermentáveis, os polissacarídeos da matéria-prima precisam ser hidrolisados em seus açúcares constituintes (PARAJÓ *et al.*, 1998).

Embora a hidrólise possa ser realizada enzimaticamente, a maioria dos estudos utiliza hidrolisados derivados de hidrólise ácida (MAGEE e KOSARIC, 1985), sendo H_2SO_4 e HCl os catalisadores mais comumente empregados (PARAJÓ *et al.*, 1998). As principais desvantagens da hidrólise enzimática são sua grande especificidade, reduzida eficiência de degradação e alto custo.

Em madeiras duras e em vários resíduos agroindustriais, o componente hemicelulósico apresenta alto conteúdo de xilanas, que são constituídas por unidades xilanopiranosídicas unidas por ligações β -1,4 com ramificações variáveis de outros monossacarídeos (AGUIAR *et al.*, 1999a).

D-xilose, o principal produto da hidrólise de xilanas, pode ser convertida biologicamente em diversos produtos de elevado valor comercial, como etanol, acetona, ácido acético, butanol e ácido butírico (SADDLER *et al.*, 1983; OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996; PALMQVIST, E. *et al.*, 1996; LATIF, F. e RAJOKA, M.I., 2001); proteína microbiana (PESSOA, 1996); butanodiol (GROVER *et al.*, 1990); ácido láctico (SILVA, *et al.*, 1990) e xilitol (RODRIGUES *et al.*, 1998; DOMÍNGUEZ, 1999; LEATHERS *et al.*, 2000; SAMPAIO, 2001).

Diferentes materiais lignocelulósicos podem ser utilizados para a produção de combustíveis e outros produtos químicos e a sua composição pode variar dependendo da fonte da biomassa (TABELA I).

TABELA I – Composição de alguns materiais lignocelulósicos (adaptado de LEE, J., 1997)

	Sabugo de milho	Palha de Trigo	Palha de arroz	Casca de arroz	Bagaço de cana	Caroço de algodão
Carboidrato (%)						
Glicose	39,0	36,6	41,0	36,1	38,1	20,0
Manose	0,3	0,8	1,8	3,0	ND	2,1
Galactose	0,8	2,4	0,4	0,1	1,1	0,1
Xilose	14,8	19,2	14,8	14,0	23,3	4,6
Arabinose	3,2	2,4	4,5	2,6	2,5	2,3
Não-carboidrato (%)						
Lignina	15,1	14,5	9,9	19,4	18,4	17,6
Cinzas	4,3	9,6	12,4	20,1	2,8	14,8
Proteína	4,0	3,0	ND	ND	3,0	3,0

ND - Não detectado

Embora não existam relatos do uso da casca de semente de algodão para bioconversões de interesse industrial, a composição química do hidrolisado de casca de semente de algodão sugere que este resíduo agroindustrial possa ser utilizado como substrato para produção microbiológica de xilitol. A semente (caroço) do algodão, proveniente da retirada da pluma, compreende o grão e as cascas. Quando a semente é aberta para liberar o grão que será esmagado, sobram as cascas. A casca de semente de algodão é constituída de 44% de alfa celulose, 30% de pentosanas, 22% de lignina, 8,7% de água, 2% de cinzas, 3% de proteína bruta, 49% de fibra bruta e 1% de óleos (José Xavier de Faria, Maeda, comunicação pessoal). Internamente a casca é envolvida por uma membrana que a separa do embrião da semente. Além de seu uso como combustível, a casca da semente de algodão também é utilizada na formulação de rações para alimentação animal e em adubos (EMBRAPA, 2002).

Atualmente, o cultivo do algodoeiro no Brasil ocupa uma área de aproximadamente 750,4 mil hectares com produção de 786,5 mil toneladas de pluma, o que equivale a 1.280 mil toneladas de caroço de algodão, correspondendo a 3,7% da produção mundial. No mundo, a produção estimada de pluma é de 21.327 mil toneladas (EMBRAPA, 2002). A produção nacional de casca de semente de algodão é de 100.000 toneladas/ano (José Xavier de Faria, Maeda, comunicação pessoal). Considerando o volume de resíduos gerados pela indústria algodoeira no Brasil e a falta de processos apropriados para o aproveitamento destes resíduos, o desenvolvimento de tecnologias para a utilização dos carboidratos presentes na casca de semente de algodão apresenta-se como alternativa para a produção de compostos de interesse industrial. Para isso, é necessária a obtenção do hidrolisado hemicelulósico a ser utilizado como substrato em processos de bioconversão. Dentre os muitos produtos que podem ser obtidos da bioconversão de hidrolisados hemicelulósicos, o xilitol tornou-se opção atrativa devido às suas aplicações importantes nas indústrias de alimentos e farmacêutica (ROBERTO *et al.*, 1994).

2.2. Xilitol: Propriedades e Aplicações

Xilitol é um poliálcool com cinco carbonos, apresenta como fórmula empírica, $C_5H_{12}O_5$ e como fórmula estrutural, $HOCH_2COH_2COH_2COH_2CH_2OH$. Possui peso molecular de 152,15 g, tem aparência de pó branco cristalino e inodoro. Apresenta ponto de fusão de 93,4-94,7 °C e ponto de ebulição de 216 °C, tem solubilidade em água (20 °C) de 64,2 g/100 mL, solubilidade em etanol de 1,2 g/100 mL e solubilidade em metanol de 6,0 g/100 mL (HYVÖNEN, *et al.* 1982).

O sabor do xilitol é doce e refrescante, semelhante ao mentol. Esta peculiaridade é devida ao calor específico negativo da solução (-34,8 cal/g), característica também notada em outros polióis, embora em menor grau. Quanto ao poder edulcorante, o xilitol é comparado à sacarose, sendo 2,4

vezes mais doce que o manitol e 2 vezes mais doce que o sorbitol, podendo variar com o pH, concentração de sais e temperatura (EMODI, 1978).

Xilitol não pode ser considerado um adoçante não calórico, pois seu conteúdo energético (4 Kcal/mol) é similar ao da glicose, frutose ou sacarose. Contudo, contribui pouco na formação de tecidos gordurosos quando comparado a outros açúcares, sendo então, indicado na dieta de obesos (MANZ *et al.*, 1973; van EYS *et al.*, 1974). Além disso, seu uso por diabéticos é de grande importância já que o xilitol é metabolizado por vias independentes de insulina (PEPPER e OLINGER, 1988; YLIKAHRI, 1979; AGUIAR, *et al.*, 1999b). Como produz apenas um leve aumento nos níveis de glicose e insulina na corrente sanguínea, quando comparado às alterações causadas por glicose ou sacarose, o xilitol é aplicável em estados pós-traumáticos e pós-operatórios. Nesses estados, há excessiva secreção de hormônios do estresse como cortisol, catecolaminas, glucagon entre outros, que causam resistência à insulina e impedem a utilização eficiente da D-glicose (PARAJÓ *et al.*, 1998a; YLIKAHRI, 1979). Também pode ser utilizado no tratamento de outras desordens metabólicas como a deficiência da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (MANZ *et al.*, 1973).

Vários autores observaram efeitos positivos do xilitol na redução de cáries dentárias (GRUNBERG *et al.*, 1973; GRENBY *et al.*, 1983; ASSEV *et al.*, 1983). Testes realizados por GRUNBERG *et al.*, 1973, indicaram redução de 30% na incidência de cáries em ratos alimentados com sorbitol e manitol, e completa eliminação da formação de cáries nos animais cuja dieta continha xilitol. O benefício clínico do xilitol para a prevenção de cáries tem sido relatado em diversos estudos com crianças e adultos voluntários, nos quais o consumo de xilitol foi associado à significativa redução de cáries. Dependendo da dose e frequência da administração de xilitol, esta redução varia entre 45 e 90% (KANDELMAN e GAGNON, 1988). A propriedade anticariogênica do xilitol é explicada pelo fato desta substância não ser fermentada pelos microrganismos da microbiota bucal – principalmente *Streptococcus mutans* – evitando a

formação de ácidos que atacam o esmalte dos dentes (MÄKINEN, 1979; EMODI, 1978).

SCHEININ *et al.* 1975, realizando estudos com humanos, sugeriram que além da redução de cáries, o uso de xilitol leva a remineralização das lesões cariogênicas iniciais do dente, já que a saliva secretada durante e após o consumo de xilitol contém níveis mais elevados de íons cálcio e fósforo.

Xilitol também vem sendo utilizado em nutrição parenteral, onde utilizam-se soluções nutritivas que fornecem energia (à base de glicose ou lipídios), aminoácidos e sais minerais (TOUSTER, 1974; YLIKAHRI, 1979). Entretanto, a administração de quantidades excessivas de glicose ao paciente, pode resultar em hiperglicemia, coma hiperosmolar, diurese osmótica e desidratação. Portanto, seria necessária a administração de insulina juntamente com a glicose e monitoramento constante do nível de glicose sanguínea do paciente, pois seu excesso acarretaria supressão da gliconeogênese. Para solucionar este problema, frutose e xilitol vem sendo sugeridos como substitutos da glicose na nutrição parenteral. No Japão, Alemanha, e em outros países europeus, a utilização do xilitol na nutrição parenteral tem sido amplamente aceita (TOUSTER, 1974).

O consumo de xilitol na forma de xarope ou goma de mascar por crianças, foi considerado efetivo na prevenção de otites, diminuindo a necessidade de tratamentos com antimicrobianos (UHARI *et al.*, 2001). Xilitol inibiu o crescimento de *Streptococcus pneumoniae* e impediu a ligação de pneumococos e *Haemophilus influenzae* nas células nasofaríngeas em estudo realizado por UHARI *et al.*, 2001. Em dois tratamentos clínicos, xilitol foi eficiente na prevenção de otite média aguda com uma dose diária de 8,4 a 10 g divididas em cinco doses.

MATILLA *et al.* (1998) demonstraram que dietas suplementadas com 10% de xilitol foram eficientes para manter a constituição mineral dos ossos de ratas cujos ovários foram retirados. O resultado sugere que o xilitol protege contra osteoporose causada pela ausência de produção de estrógeno pelos ovários, situação semelhante à que ocorre em mulheres na menopausa.

Xilitol também é utilizado na prevenção de infecção pulmonar em pacientes com fibrose cística, uma vez que pode reforçar o sistema de defesa natural do organismo, atrasando ou prevenindo o estabelecimento das infecções bacterianas (ZABNER *et al.*, 2000).

Na indústria de alimentos, o xilitol é utilizado no processamento de balas, caramelos, confeitos, chocolates, sorvetes, geléias, marmeladas, bebidas, etc. Devido à ausência de grupos aldeídos ou cetônicos em sua molécula, o xilitol não participa das reações do tipo Maillard. Essas reações são responsáveis pelo escurecimento do produto e redução do valor nutricional de proteínas o que é indesejável em alguns produtos processados a elevadas temperaturas. O xilitol pode também substituir a lactose em alguns alimentos, podendo ser utilizado por indivíduos intolerantes à lactose (SILVA *et al.*, 1993).

2.3. Obtenção do Xilitol

Xilitol ocorre amplamente na natureza, sendo encontrado em plantas, frutas e sementes ou como intermediário normal do metabolismo de carboidratos em mamíferos, entretanto a extração de xilitol a partir de tais fontes não é econômica devido ao alto custo do processo e ao baixo rendimento (EMODI, 1978). Em grande escala, xilitol é geralmente produzido por redução química da xilose derivada principalmente de hidrolisados de madeiras (FIGURA 1). O processo convencional de produção de xilitol inclui quatro etapas: hidrólise ácida do material da planta, purificação do hidrolisado, hidrogenação da xilose a xilitol e cristalização do xilitol. A pioneira na produção comercial de xilitol por processo químico foi a Finnish Sugar Co. Ltd., em Helsinque, Finlândia, com capacidade de produção acima de 3.000 toneladas de xilitol por ano (HYVÖNEN *et al.*, 1982).

A produção microbiana de xilitol é mais vantajosa quando comparada à obtenção por processo químico por ser conduzida em condições de temperatura e pressão mais brandas além de apresentar custos de separação e purificação mais baixos e menor impacto ambiental (AGUIAR *et al.*, 1999a). A conversão

biotecnológica de xilose em xilitol pode ser realizada por diferentes bactérias, fungos, leveduras ou enzimas purificadas desses microrganismos. Os estudos indicam que as leveduras são melhores produtoras de xilitol do que os fungos e as bactérias (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998). Dentre as leveduras já estudadas, as espécies *Candida guilliermondii*, *Pachysolen tannophilus* e *Debaryomyces hansenii* destacam-se como as melhores produtoras de xilitol (CONVERTI *et al.*, 1999).

Existem duas rotas metabólicas para a utilização de xilose por microrganismos. Em procaríotos, a primeira etapa do metabolismo envolve a indução da enzima responsável pela isomerização de xilose em xilulose (FIGURA 2). A seguir, xilulose é fosforilada a xilulose-5-fosfato entrando na via das fosfopentoses (GONG *et al.*, 1983).

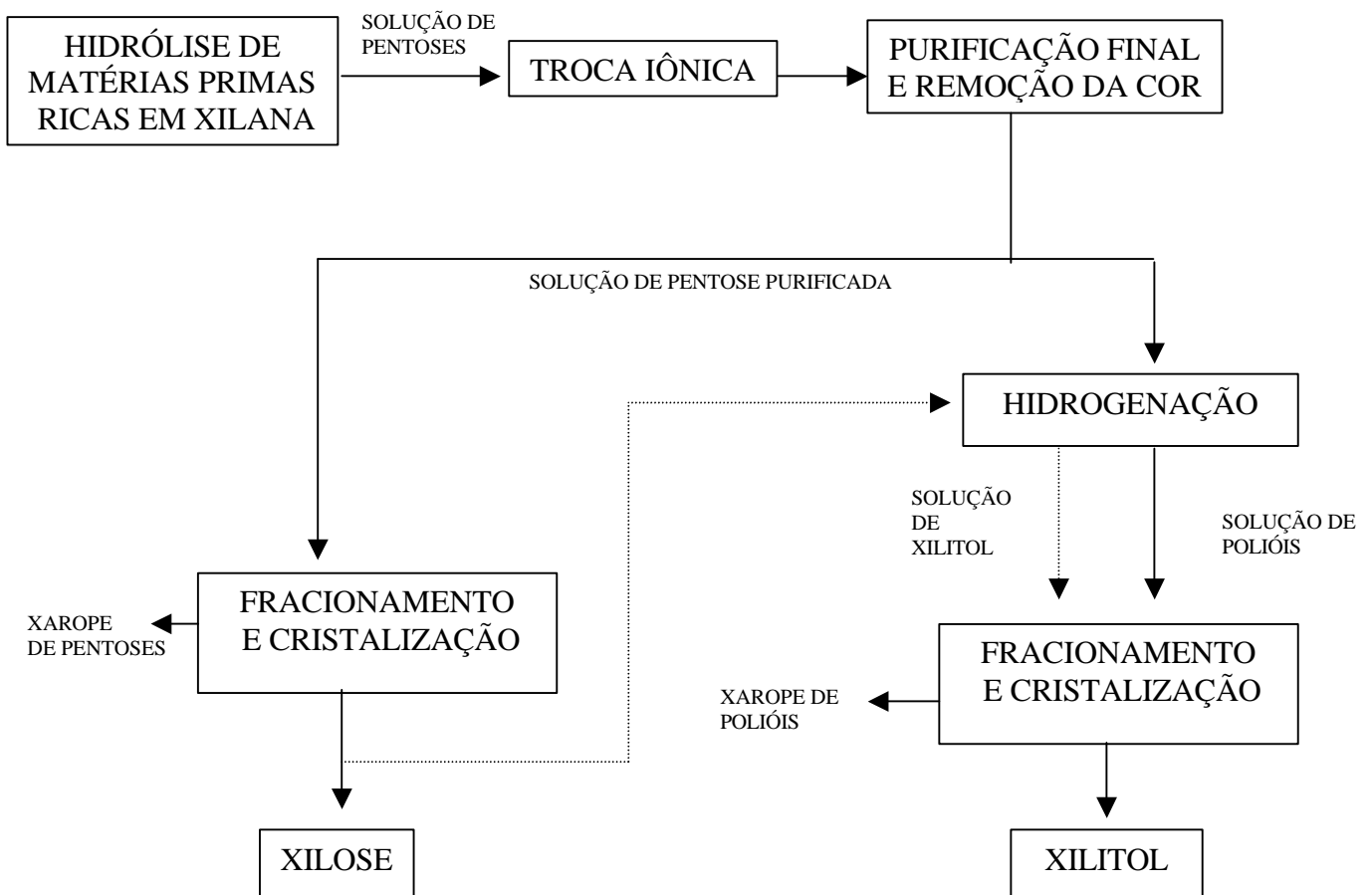


FIGURA 1 – Produção de xilose e xilitol (adaptado de HYVÖNEN *et al.*, 1982).

Em leveduras, prevalece a via de oxidação-redução de xilose a xilitol (FIGURA 2).

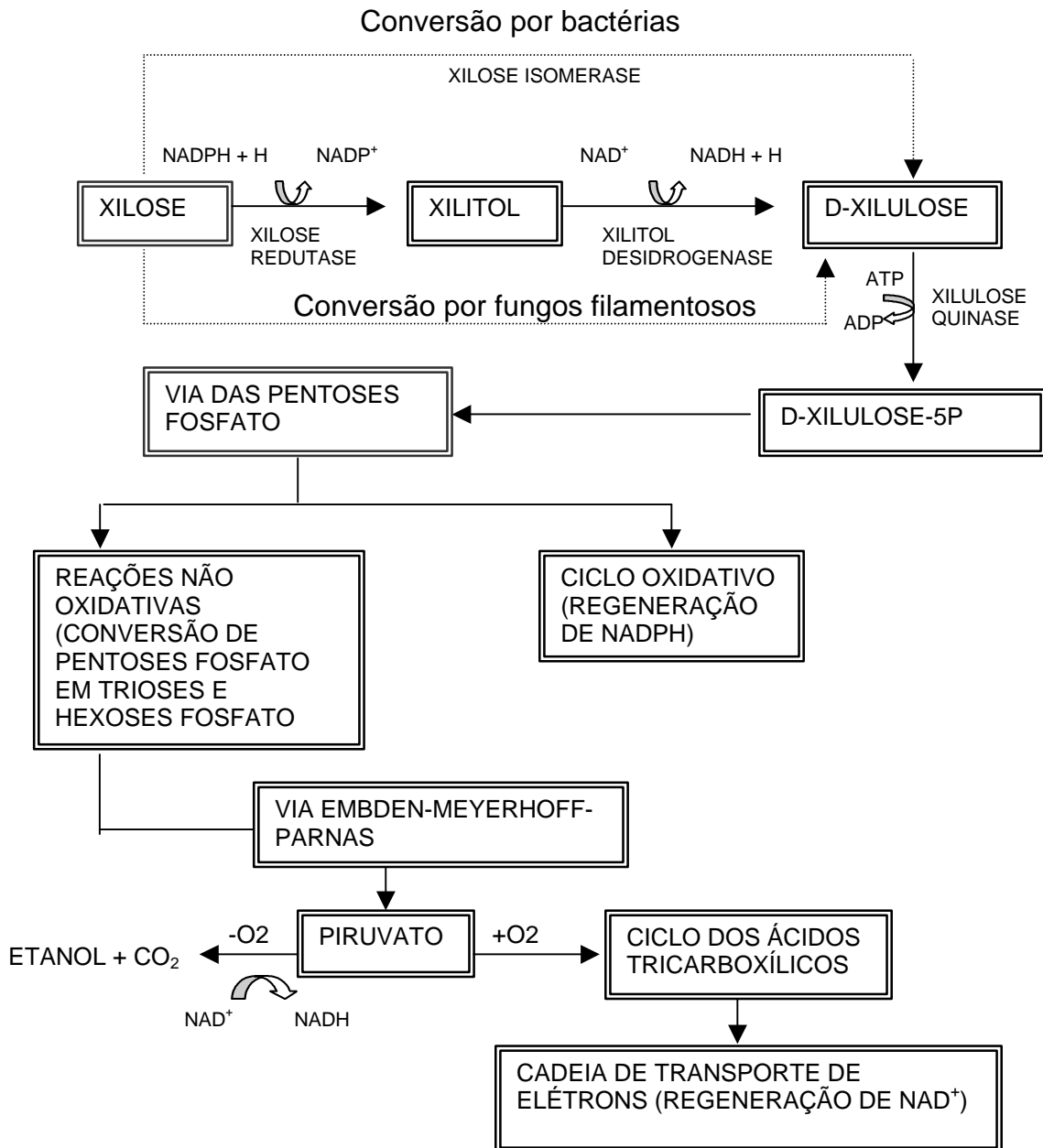


Figura 2 – Metabolismo de xilose em leveduras (adaptado de PARAJÓ *et al.*, 1998a).

Nessas reações, a xilose é reduzida a xilitol pela enzima xilose redutase (E.C.1.1.1.21) NAD(P)H.H⁺ dependente. A seguir o xilitol é oxidado a xilulose

pela enzima xilitol desidrogenase (E.C.1.1.1.9) NAD(P)⁺ dependente. A xilulose formada é fosforilada a xilulose 5-fosfato, que pode ser convertida em piruvato através da conexão da via das fosfopentoses com a via Embden-Meyerhof-Parnas (HAHN-HAGERDAL *et al.*, 1994).

O acúmulo de xilitol na célula e sua posterior excreção para o meio, estão relacionados à regeneração de NAD(P)H (BARBOSA *et al.*, 1988). Naquele estudo, BARBOSA *et al.* (1988) verificaram que através da via da pentose fosfato ocorre oxidação completa de 1 mol de glicose-6-fosfato a CO₂ gerando 12 moles de NAD(P)H a partir de NAD(P)⁺. Assim, o metabolismo da xilose em leveduras atua em ciclo, assegurando a regeneração do NAD(P)H necessário à conversão de xilose em xilitol. A levedura cataboliza apenas quantidade de xilitol suficiente para a produção de glicose-6-fosfato necessária à manutenção do ciclo (BARBOSA *et al.*, 1998; SILVA *et al.*, 1998).

2.4. Fatores que Afetam a Bioconversão de Xilose em Xilitol

Diversos fatores afetam a produção de xilitol por processos microbiológicos destacando-se a concentração de xilose, aeração, pH, temperatura, fonte de nitrogênio, presença de açúcares, metanol e biotina (NIGAM e SINGH, 1995).

Altas concentrações de xilose favorecem a sua utilização pelas leveduras e conseqüentemente, aumentam a produção de xilitol (SILVA *et al.*, 1998; NIGAM e SINGH, 1995). Para a maioria das leveduras, a concentração inicial de D-xilose entre 100 e 200 g L⁻¹ aumenta o rendimento de xilitol (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998). Entretanto, esses valores variam de acordo com a espécie de levedura utilizada. Quando IKEUCHI *et al.* (1999), variaram a concentração inicial de D-xilose de 50 a 300 g L⁻¹, a produção máxima de xilitol (173 g L⁻¹) foi obtida com 200 g L⁻¹ de D-xilose. Entretanto, para *Candida tropicalis* KFCC-10960, concentrações de D-xilose acima de 150 g L⁻¹, inibiram a produção de xilitol havendo aumento na fase lag de crescimento e redução na produtividade volumétrica de xilitol (OH e KIM, 1998).

A aeração também é condição experimental importante para a determinação do acúmulo de xilitol na cultura, embora sua influência ainda não seja bem compreendida (WINKELHAUSEN e KUZMANOVA, 1998). Sob condições totalmente aeróbias, xilitol não é produzido. Por outro lado, as respostas das leveduras em condições anaeróbias indicaram que o oxigênio é requerido para o metabolismo de xilose. NOLLEAU *et al.*, 1995, investigaram a habilidade de *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* em converter xilose a xilitol sob diferentes taxas de transferência de oxigênio. Naquelas condições o oxigênio foi importante para otimizar a produção de xilitol, sendo essencial para assimilação de xilose: quando as culturas de *C. guilliermondii* e *C. parapsilosis* cultivadas aerobicamente foram trocadas por condições anaeróbias, a concentração de xilose permaneceu em nível constante e todas as atividades metabólicas pararam imediatamente.

O valor ótimo do pH inicial depende da levedura e do meio empregado no processo (PARAJÓ, *et al.*, 1998a). Em condições não controladas, o pH diminui durante a fermentação e, portanto sob tais condições os valores do pH inicial têm de ser mais altos do que sob condições controladas. Quando *C. boidinii* foi cultivada em condições não controladas, o pH inicial que resultou no maior rendimento de xilitol foi 7 (VANDESKA *et al.*, 1995; VONGSUVANLERT e TANI, 1989). Entretanto, sob condições controladas, o melhor pH para a bioconversão foi 5,5 (VANDESKA *et al.*, 1995). FELIPE (1994) cultivou *C. guilliermondii* FT20037 em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar e não constatou produção de xilitol em pH inferior a 4,6, obtendo melhor rendimento em pH 5,3. Entretanto, quando SILVA (1994) cultivou a levedura FT 20037 em meio semi-sintético houve a produção de xilitol mesmo quando o pH foi inferior a 4,6.

A temperatura tem efeito significativo no crescimento, metabolismo, viabilidade e capacidade fermentativa de leveduras (GONG *et al.*, 1983). As temperaturas ótimas de crescimento para leveduras estão entre 20 e 30 °C, embora algumas espécies cresçam dentro de uma faixa de 0 a 47 °C. A conversão de xilose a xilitol parece ser estimulada pelo aumento da

temperatura (BARBOSA *et al.*, 1988). Du PREEZ *et al.*, 1986, verificaram maior produção de xilitol por *C. shehatae* quando a temperatura foi aumentada de 22 para 36 °C. Esse efeito foi também observado em *C. guilliermondii*, onde a concentração máxima acumulada de xilitol (23 g L⁻¹) e a maior velocidade específica de crescimento (0,78/h) ocorreram em temperaturas de 30 ou 35 °C, respectivamente (BARBOSA *et al.*, 1988).

A presença de glicose pode reprimir a atividade da xilose redutase (XR) que é a enzima envolvida na conversão de xilose a xilitol, resultando conseqüentemente em baixa produção de xilitol (PARAJÓ *et al.*, 1998). Quando WALTHER *et al.* (2000) estudaram a influência de açúcares hemicelulósicos na conversão de xilose a xilitol por *C. tropicalis*, verificaram que a presença de glicose no meio levou a intenso crescimento da levedura sem que houvesse o consumo de xilose e formação de xilitol. O transporte de xilose em *C. tropicalis* foi reprimido e a produção de etanol inibiu a formação de xilitol.

ROBERTO *et al.* (1994) observaram aumento nas taxas de transporte de xilose em ensaios de bioconversão de hidrolisados realizados com inóculos que proporcionaram altas concentrações de células. O uso de alta densidade de células aumentou a produtividade volumétrica (Q_p) e superou (pelo menos em parte) o efeito tóxico de inibidores presentes no hidrolisado. Quando FELIPE *et al.*, 1996, utilizaram uma concentração inicial de células de 3 g L⁻¹, o efeito inibitório do ácido acético presente no hidrolisado de *Eucalyptus* em *C. guilliermondii* foi superado e houve aumentos na produtividade volumétrica (0,1 a 0,16 g L h⁻¹) de xilitol e no consumo de xilose.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia de Microrganismos/BIOAGRO, Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa.

3.1 – Obtenção e Preparo do Hidrolisado Hemicelulósico de Casca de Semente de Algodão

A casca de semente de algodão foi fornecida pela Indústria de Óleos Vegetais do Grupo Maeda (Itumbiara, GO), que possui capacidade de processamento de 120 mil toneladas de caroço de algodão por ano.

Antes de proceder a hidrólise ácida, a casca de semente de algodão foi mantida em estufa a 70 °C/24h, para remoção do excesso de umidade, facilitando a moagem. A casca de semente de algodão foi submetida a moagem com malha de 1 mm. Tanto as cascas de algodão moídas quanto as cascas sem moer (controle) foram submetidas à hidrólise, na proporção de 1 g de casca para 10 mL de HCl 0,3 N, em frascos erlenmeyers, sendo então submetidas a pressão de vapor de 1 Kgf/cm², por 20 minutos, a 121 °C. Após a realização da hidrólise ácida, foi adicionado carvão ativado na proporção de 0,5 g para cada

10 mL de hidrolisado. A seguir, os hidrolisados foram filtrados a vácuo, em filtro de porcelana, com papel Whatman nº 42, armazenados em frascos escuros e congelados (-20 °C). O pH dos hidrolisados foram ajustados para 6,0 com solução 1 N de KOH.

Na etapa de avaliação da concentração de xilose foi utilizado apenas o hidrolisado de casca de semente de algodão moída. O hidrolisado foi concentrado cerca de 5 vezes em rotavapor a 70 °C, sendo em seguida tratado com carvão ativado, conforme descrito acima.

3.2 – Triagem das Leveduras

3.2.1 - Microrganismos

Foram utilizadas as leveduras 1.55; 1.71; 2.64; 2.80 e *Debaryomyces hansenii* UFV-170 isoladas de ambiente de laticínios e selecionadas como boas produtoras de xilitol em meio sintético por SAMPAIO (2001), na Universidade Federal de Viçosa. A levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170 foi identificada no Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Yeast Identification Service, Utrecht, Holanda.

3.2.2 - Manutenção da Cultura

As leveduras foram mantidas em estoque a – 80 °C em meio YPD com a seguinte composição em gramas por litro: extrato de levedura 10; peptona 20; glicose 20. Ao meio YPD foram acrescentados 20% de glicerol. A cultura estocada foi ativada em meio mineral (MM) com a seguinte composição em gramas por litro: KH_2PO_4 6,8; K_2HPO_4 3,4; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,1. A este meio foi adicionado extrato de levedura na concentração final de 0,06% (p/v) e xilose a 1% como fonte de carbono (meio completo). Para estoque, foi adicionado ao meio completo 2% de ágar-ágar. As culturas foram incubadas a 30 °C por 24 h. As culturas estoques foram mantidas a 4 °C. Esse estoque foi repicado semanalmente e utilizado para padronização do inóculo.

3.2.3 – Produção e Padronização do Inóculo

Para a produção do inóculo de leveduras, as culturas estocadas nas placas foram ativadas em meio completo. As culturas foram incubadas a 30 °C por 24 h a 200 rpm. Após esse período, as células foram separadas por centrifugação a 4000 g, por 5 minutos, a 15 °C e ressuspensas em 5 mL de água peptonada. Essa suspensão foi utilizada para padronização do inóculo (densidade óptica entre 0,08 e 0,1).

3.2.4 - Meio de Cultivo

Os microrganismos foram cultivados em meio completo adicionado de 50% de hidrolisado de casca de semente de algodão como fonte de carbono em substituição à xilose. O meio de cultura foi esterilizado a 121 °C por 20 minutos. O hidrolisado de casca de semente de algodão, extrato de levedura e sulfato de magnésio foram autoclavados separadamente. O cultivo das leveduras foi feito em frascos erlenmeyers contendo 25 mL do meio a 200 rpm, 30 °C por 96 h. Aliquotas de 1 mL foram retiradas a cada 24 h durante 96 h. As amostras foram centrifugadas a 8176 g durante 2 minutos em microcentrífuga (SORVAL MC 12V). Após centrifugação, o sobrenadante foi congelado para posterior análise em CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC). O pellet foi transferido para cadinhos de papel alumínio e levados à estufa a 105 °C até peso constante para determinação da massa celular.

3.3 – Avaliação dos Parâmetros Reguladores da Bioconversão de D-Xilose a Xilitol

3.3.1 – Determinação da Relação Massa Celular Seca Versus Densidade Óptica

A levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170 foi inoculada em 50 mL do meio completo. Após 16 h de cultivo a 30 °C, 200 rpm, as células foram

separadas por centrifugação a 4000 *g*, por 5 minutos a 4 °C e ressuspendidas em 5 mL de água peptonada. Dessa suspensão foram retiradas quatro alíquotas de 1 mL para a determinação da massa seca a 105 °C até peso constante. Uma amostra de 1 mL da suspensão foi utilizada para a realização das seguintes diluições: 1×10^{-2} ; 2×10^{-2} ; 3×10^{-2} ; 4×10^{-2} , 5×10^{-2} e 6×10^{-2} em triplicata. A regressão linear entre densidade óptica e massa celular seca (g L^{-1}) foi utilizada para determinar a massa celular seca correspondente a uma unidade de densidade óptica.

3.3.2 – Avaliação da Concentração de D-Xilose e Aeração por Controle da Agitação

Foram avaliadas duas concentrações de D-xilose, utilizando o hidrolisado concentrado três e cinco vezes. Também foi utilizado o hidrolisado não concentrado como controle. Para o cultivo da levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170 foi utilizado o meio de cultura completo variando-se a concentração do hidrolisado de casca de semente de algodão, sendo que para o hidrolisado cinco vezes concentrado, os componentes minerais foram adicionados diretamente na solução. Concomitantemente foram avaliadas três agitações diferentes, 100, 200 e 300 rpm, com cultivo em *shaker* a 30 °C. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

3.4 - Métodos Analíticos

As amostras foram descongeladas e centrifugadas a 9893 *g* durante 5 minutos em microcentrífuga (SORVAL MC 12V). Alíquotas dos hidrolisados de casca de semente de algodão foram centrifugadas duas vezes. Após centrifugação, o sobrenadante foi filtrado em membrana 0,45 μm . As análises foram feitas por CLAE, utilizando as seguintes condições: coluna BIO-RAD aminex HPX-87H (370 x 7,8 mm), eluente H_2SO_4 0,01 N, fluxo de 0,7 mL min^{-1} , temperatura da coluna de 60 °C. As amostras foram diluídas quando

necessário e foram injetados 20 μL da amostra para a análise cromatográfica. Foram avaliadas as concentrações de D-xilose, D-glicose, ácido galacturônico, D-arabinose, xilitol, ácido acético e etanol.

O crescimento foi estimado por medida da densidade óptica em espectrofotômetro (BECKMAN DU série 600) no comprimento de onda de 600 nm após conversão da massa celular seca ($1 \text{ DO}=0,550 \text{ g L}^{-1}$ de massa celular seca). As amostras foram diluídas quando a densidade óptica ultrapassava o valor de 0,6.

3.5 – Determinação dos Parâmetros de Produção de Xilitol

Com base na concentração dos açúcares e massa celular, foram calculados os parâmetros do processo de produção de xilitol descritos a seguir:

- Produtividade Volumétrica (Q_p) = quantidade de xilitol produzido (g L h^{-1});
- Produtividade Específica (q_p) = quantidade de xilitol produzido (g L^{-1}) / massa celular (g L^{-1}) h^{-1} ;
- Rendimento ($Y_{p/s}$) = quantidade de xilitol produzido (g) / quantidade de D-xilose consumida (g).

3.6 – Delineamento Experimental

Os experimentos foram realizados com três repetições sendo cada repetição analisada em duplicata. Os resultados apresentados correspondem à média dos valores experimentais. Cada parâmetro de produção de xilitol foi avaliado estatisticamente por análise de variância no nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção e Caracterização do Hidrolisado Hemicelulósico.

Quando a casca de semente de algodão foi submetida a um processo de hidrólise ácida, o hidrolisado hemicelulósico obtido apresentou concentrações variadas de glicose, xilose, arabinose e ácido acético. O aspecto físico da casca de semente de algodão antes e após a moagem é apresentado na FIGURA 1A. A FIGURA 1B mostra o efeito do tratamento do hidrolisado de casca de semente de algodão (HCA) com carvão ativado.

Xilose foi o açúcar predominante nos HCA, sendo que a concentração obtida foi de 3,77 g L⁻¹ no hidrolisado de casca de semente de algodão sem moer (HCASM) e 5,26 g L⁻¹ no hidrolisado de casca de semente de algodão moída (HCAM) (TABELA I).

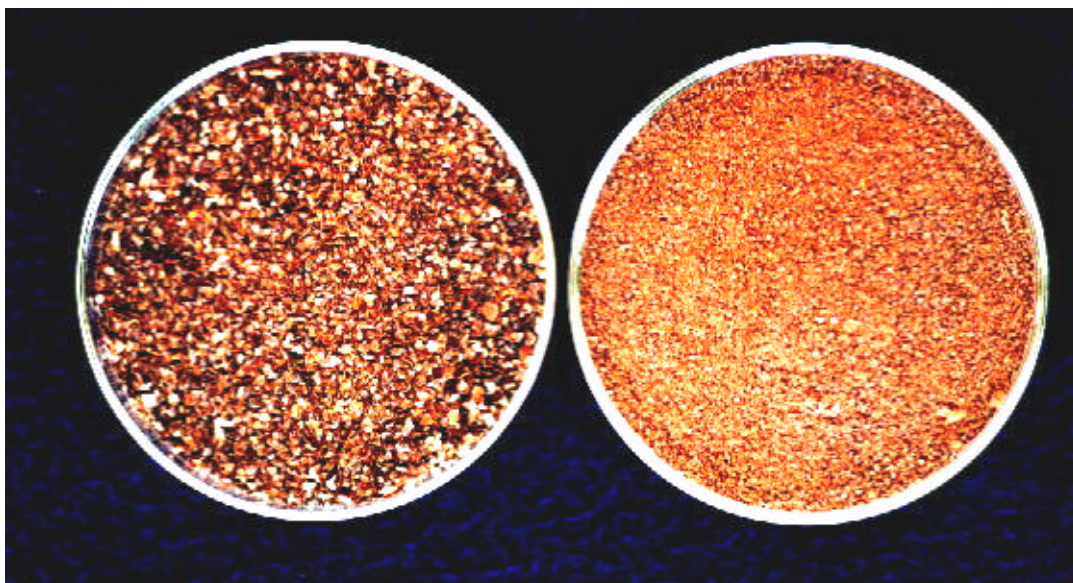


FIGURA 1 A – Casca de semente de algodão sem moer e casca de semente de algodão moída

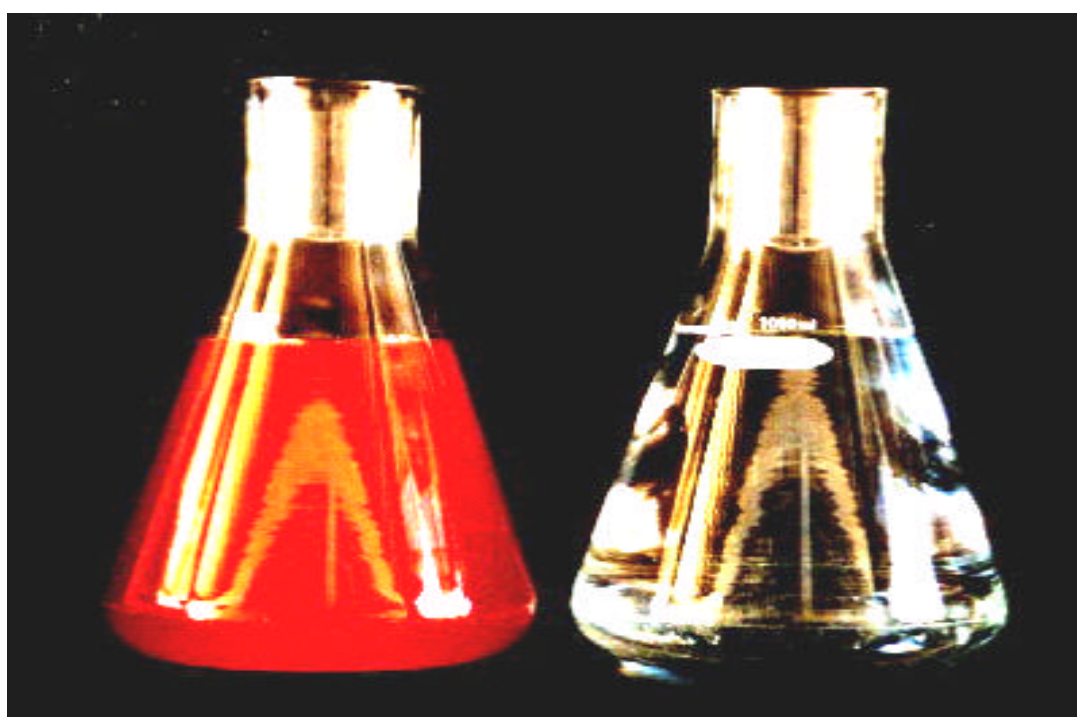


FIGURA 1B– Hidrolisado de casca de semente de algodão antes e após tratamento com carvão ativado

TABELA I – Caracterização do hidrolisado hemicelulósico da casca de semente algodão

COMPONENTES	CONCENTRAÇÃO (g L ⁻¹)	
	HCASM	HCAM
Ácido galacturônico	ND	ND
Glicose	0,11	0,072
Xilose	3,77	5,26
Arabinose	0,30	0,26
Ácido acético	0,59	0,53

HCASM – hidrolisado obtido da casca de semente de algodão sem moer

HCAM – hidrolisado obtido da casca de semente de algodão moída

ND - Não detectado

A concentração de xilose no HCAM foi 28,32% maior do que no HCASM. Os açúcares glicose e arabinose e o ácido acético apresentaram baixas concentrações nos dois tipos de hidrolisados. Porém, as concentrações desses componentes no HCASM foram maiores (glicose 34,54%; arabinose 13,3%; ácido acético 10,16%) do que as concentrações encontradas no HCAM. O ácido galacturônico não foi detectado em nenhum dos dois tipos de hidrolisados.

4.2- Triagem das Leveduras para Produção de Xilitol a partir do Hidrolisado de Casca de Semente de Algodão

Para a triagem foram utilizadas cinco leveduras 1.55 ; *Debaryomyces hansenii* UFV-170 ; 1.71 ; 2.64 e 2.80 isoladas de ambiente de laticínios, consideradas boas produtoras de xilitol em meio sintético (SAMPAIO, 2001). Todas as leveduras que produziram xilitol apresentaram pico de produção máxima de xilitol após 24 horas de cultivo em meio completo. Culturas incubadas por mais de 24 h consumiram completamente a xilose e passaram a metabolizar o xilitol. A levedura 2.80 cresceu em meio completo, mas não produziu xilitol em concentrações significativas (TABELA II).

TABELA II – Produtividade volumétrica (Q_p), produtividade específica (q_p) e rendimento ($Y_{p/s}$) após 24 h de cultivo em hidrolisado de casca de semente de algodão e meio completo a 200 rpm e 30 °C.

Levedura	Xilitol		Q_p		q_p		$Y_{p/s}$	
	(g L ⁻¹)		(g L ⁻¹ h ⁻¹)		(g g ⁻¹ h ⁻¹)		(g g ⁻¹)	
	HCAM	HCASM	HCAM	HCASM	HCAM	HCASM	HCAM	HCASM
1.55	1,78	1,11	0,07	0,05	0,02	0,01	0,40	0,17
UFV-170*	1,86	1,79	0,07	0,05	0,02	0,01	0,43	0,28
1.71	1,97	1,30	0,07	0,04	0,02	0,02	0,49	0,19
2.64	1,59	1,23	0,06	0,04	0,01	0,01	0,36	0,22
2.80	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

- HCAM – Hidrolisado de casca de semente de algodão moída
- HCASM – Hidrolisado de casca de semente de algodão sem moer
- ND - Não detectado

* *Debaryomyces hansenii* UFV-170

De acordo com as análises estatísticas não houve diferenças significativas entre os resultados no nível de 5% de probabilidade pelo teste F.

Os valores apresentados na TABELA II indicam que a maior produção de xilitol foi obtida com o HCAM. As produtividades volumétricas (Q_p) no HCAM foram aproximadamente 42% (levedura 1.71), 33% (levedura 2.64) e 28% (leveduras 1.55 e *Debaryomyces hansenii* UFV-170) superiores aos valores encontrados no HCASM. A produtividade específica (q_p) do HCAM foi 50% superior à produtividade específica do HCASM, exceto para a levedura 1.71 que apresentou a mesma produtividade específica para os dois tipos de HCA. O rendimento ($Y_{p/s}$) foi superior no HCAM para todas as leveduras, sendo aproximadamente 57% (levedura 1.55); 35% (levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170); 61% (levedura 1.71) e 39% (levedura 2.64) maior em relação ao HCASM.

Não houve diferenças significativas nos valores de produtividade volumétrica (Q_p) tanto no HCAM quanto no HCASM para as leveduras testadas. A levedura 2.64 crescendo no HCAM apresentou valores de produtividade volumétrica (Q_p) e de

produtividade específica (q_p) inferiores aos das demais leveduras. No HCASM, a produtividade volumétrica das leveduras 1.71 e 2.64 foi inferior à produtividade volumétrica (Q_p) das demais leveduras, entretanto, a produtividade específica (q_p) da levedura 1.71 foi superior àquela observada para as outras leveduras testadas. A levedura 1.71 foi a que apresentou melhor rendimento ($0,49 \text{ g g}^{-1}$), seguida pela levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170 ($0,43 \text{ g g}^{-1}$). Quando os valores de produtividade volumétrica e rendimento ($Y_{p/s}$) foram comparados ao estudo realizado por SAMPAIO (2001), no qual as leveduras foram cultivadas em meio sintético, observou-se uma redução nos valores de xilitol produzido, produtividade volumétrica (Q_p) e rendimento ($Y_{p/s}$). No entanto, a levedura 1.71 apresentou maior rendimento no HCA do que no estudo realizado por SAMPAIO, 2001 (TABELA III).

Tabela III – Comparação dos parâmetros de produção de xilitol para leveduras cultivadas em meio sintético e no hidrolisado de casca de semente de algodão.

Levedura	Xilitol (g L^{-1})		Q_p ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)		$Y_{p/s}$ (g g^{-1})	
	SAMPAIO (2001)	Este trabalho	SAMPAIO (2001)	Este trabalho	SAMPAIO (2001)	Este trabalho
1.55	4,26	1,78	0,18	0,07	0,40	0,40
UFV-170*	5,84	1,86	0,24	0,07	0,54	0,43
1.71	4,94	1,97	0,21	0,07	0,47	0,49
2.64	4,70	1,59	0,20	0,06	0,44	0,36
2.80	5,01	ND	0,21	ND	0,47	ND

• ND - Não detectado

* *Debaryomyces hansenii* UFV-170

A levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170, que apresentou melhor produção de xilitol em meio sintético (SAMPAIO, 2001), foi selecionada para avaliar-se os efeitos da concentração de D-xilose do HCA e da aeração na produção microbiológica de xilitol.

4.3 – Efeito da Concentração de D-Xilose e do Nível de Aeração pelo Controle de Agitação

A concentração de D-xilose e aeração foram avaliadas no hidrolisado de casca de semente de algodão moída, já que este substrato resultou nos melhores parâmetros de xilitol na etapa de triagem. A levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170 cresceu no HCA cinco vezes concentrado, embora não tenha sido observada a produção de xilitol. Os resultados médios de produtividade volumétrica, produtividade específica e rendimento estão apresentados na TABELA IV.

No HCA não concentrado, os melhores resultados de produção de xilitol foram obtidos após 24 h de cultivo da levedura, quando observaram-se valores 45% maiores de produtividade volumétrica (Q_p), 86% maiores de produtividade específica (q_p) e 44% maiores de rendimento ($Y_{p/s}$) do que aqueles encontrados após 48 h de cultivo. Após 72 h de incubação a levedura já havia consumido todo o xilitol produzido. A agitação de 100 rpm proporcionou melhores resultados do que as agitações de 200 e 300 rpm. As produtividades volumétrica e específica na agitação de 100 rpm foram 36% e 28% maiores, respectivamente, do que os valores máximos obtidos na agitação de 300 rpm. O rendimento na agitação de 100 rpm foi 32% superior ao maior rendimento obtido na agitação de 300 rpm.

No HCA três vezes concentrado a xilose somente foi completamente consumida após 72 h de cultivo, coincidindo com o pico de produção máxima de xilitol. A produtividade volumétrica (Q_p) aumentou 266% entre os cultivos de 24 e 48 h e 245% entre os cultivos de 48 e 72 h. Após 96 h de cultivo, a produtividade volumétrica (Q_p) diminuiu 39%. A produtividade específica (q_p) foi a mesma para os tempos de 24 e 48 h, aumentando após 72 horas de cultivo.

TABELA IV – Valores dos parâmetros de produção de xilitol apresentados pela levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170, cultivada em HCA com diferentes concentrações de xilose e níveis de agitação, a 30 °C.

	HCA não concentrado			HCA três vezes concentrado		
Q_p (g L ⁻¹ h ⁻¹)	100 rpm	200 rpm	300 rpm	100 rpm	200 rpm	300 rpm
24 h	0,11	0,09	0,07	0,03	0,01	0
48 h	0,06	0,05	0,04	0,11	0,18	0,23
72 h	<0,01	<0,01	<0,01	0,38	0,28	0,15
96 h	0	0	0	0,23	0,15	0,06
q_p (g g ⁻¹ h ⁻¹)						
24 h	0,07	0,06	0,05	0,01	<0,01	0
48 h	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
72 h	<0,01	<0,01	<0,01	0,02	0,01	<0,01
96 h	0	0	0	<0,01	<0,01	<0,01
$Y_{p/s}$ (g g ⁻¹)						
24 h	0,52	0,44	0,35	0,06	0,03	0
48 h	0,29	0,26	0,19	0,21	0,28	0,35
72 h	0,03	<0,01	0,01	0,56	0,39	0,14
96 h	0	0	0	0,32	0,21	0,09

O rendimento de xilitol ($Y_{p/s}$) obtido com HCA três vezes concentrado aumentou 250% entre os cultivos de 24 e 48 h e 166% entre os cultivos de 48 e 72 h. Após 96 h de cultivo, o rendimento ($Y_{p/s}$) diminuiu 57%. Os maiores valores de produção de xilitol foram obtidos com a agitação de 100 rpm e os menores foram na agitação de 300 rpm. Comparando-se os valores máximos de produtividade volumétrica (Q_p), verificou-se que há uma diferença de 153% entre os valores obtidos nas agitações de 100 e 300 rpm. A produtividade específica (q_p) e o rendimento ($Y_{p/s}$) também foram maiores na agitação de 100 rpm.

As análises estatísticas foram realizadas por análise de variância através do teste F no nível de 5% de probabilidade (APÊNDICE B). Não foram observadas diferenças significativas entre as repetições de cada experimento. Entre as

concentrações há uma diferença significativa no nível de 5% de probabilidade, sendo que os melhores resultados de rendimento e produtividade volumétrica foram obtidos com HCA três vezes concentrado. Os melhores resultados de produtividade específica foram obtidos com HCA não concentrado. Houve diferença significativa no nível de 5% de probabilidade para combinação concentração e tempo, verificando-se melhor resultado no intervalo de 72 horas para HCA três vezes concentrado e no intervalo de 24 horas para HCA não concentrado. Não houve diferença significativa no nível de 5% de probabilidade entre as agitações, nem entre os intervalos de tempo. Não houve diferença significativa no nível de 5% de probabilidade entre a combinação de concentração e agitação e nem entre a combinação de agitação e tempo. Em valores absolutos observa-se que a agitação de 100 rpm proporcionou melhores resultados tanto no HCA não concentrado quanto no HCA três vezes concentrado.

A TABELA VI mostra comparação entre os resultados obtidos com diferentes tipos de substratos e os valores ótimos obtidos com hidrolisado de casca de semente de algodão. A casca de semente de algodão apresentou valores inferiores àqueles obtidos com outros tipos de resíduos, sendo 33% menor do que a maior produtividade volumétrica (Q_p) obtida com a palha de arroz e 29% menor do que o maior rendimento ($Y_{p/s}$) obtido com o bagaço de cana utilizado por ALVES, *et al.* (1998). A produtividade volumétrica (Q_p) do HCA foi superior aos substratos bagaço de cana e bagaço de sorgo avaliados por ROBERTO *et al.* (1991) e HEIKKILA *et al.* (1992), respectivamente.

A análise do consumo de xilose, produção de xilitol e massa celular da levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170 cultivada em hidrolisado de casca de semente de algodão não concentrado e concentrado três vezes sob diferentes níveis de agitações é apresentada nas FIGURAS 1 e 2. Observou-se que no hidrolisado não concentrado, o pico máximo de produção de xilitol coincidiu com a completa depleção de xilose após 24 horas de cultivo. A produção de xilitol acompanhou o aumento da massa celular, porém o pico máximo de crescimento foi atingido quando o xilitol havia sido parcialmente consumido pelas células.

Tabela VI - Produtividade volumétrica (Q_p) e rendimento ($Y_{p/s}$) na obtenção de xilitol a partir de diferentes substratos

Matéria-prima	Código da levedura	Xilose (g L⁻¹)	Q_p (g L⁻¹ h⁻¹)	Y_{p/s} (g g⁻¹)	Referências
Bagaço de cana-de-açúcar	A	48	0,52	0,79	Alves <i>et al.</i> , 1998
Bagaço de cana-de-açúcar	A	45	0,23	0,48	Roberto <i>et al.</i> , 1991
Palha de arroz	A	117,39	0,57	0,72	Mussato <i>et al.</i> , 2002
Palha de arroz	A	45	0,56	0,69	Roberto <i>et al.</i> , 1994
Bagaço de sorgo	B	50	0,20	0,72	Heikkila <i>et al.</i> , 1992 (citado por Roberto <i>et al.</i> , 1994)
Farelo de cevada	C	30	0,41	0,66	Cruz <i>et al.</i> , 2000
Casca de semente de algodão	D	17,6	0,38	0,56	Presente trabalho

A= *Candida guilliermondii* FTI 20037

B= *Candida parapsilosis* ATCC 28474

C= *Debaryomyces hansenii*

D= *Debaryomyces hansenii* UFV-170

No HCA três vezes concentrado o pico máximo de produção de xilitol coincidiu com a depleção quase completa de xilose, todavia a produção máxima de xilitol ocorreu somente após 72 horas de cultivo, e a massa celular foi aproximadamente 365% maior do que aquela obtida com o hidrolisado não concentrado (FIGURA 2).

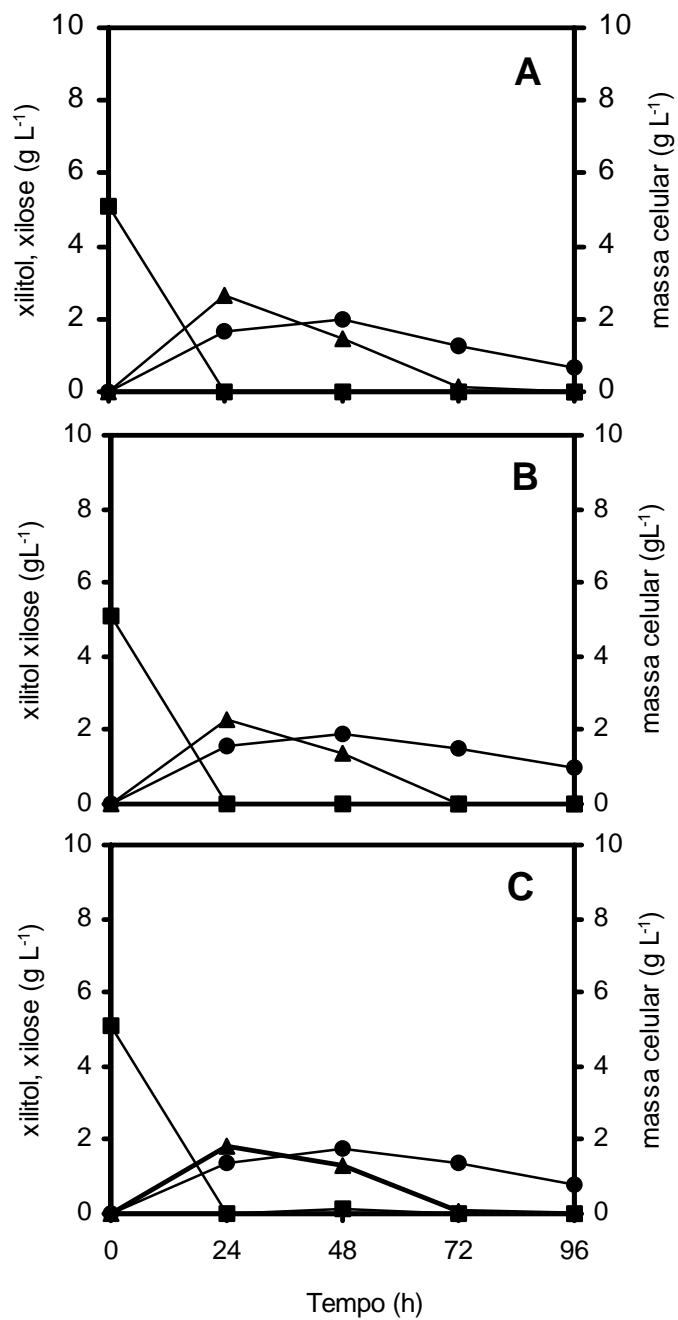


Figura 1 – Massa celular (●), consumo de D-xilose (■) e produção de xilitol (▲) da levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170 cultivada em hidrolisado de casca de semente de algodão sem concentrar, adicionado de meio mineral e extrato de levedura. O microrganismo foi cultivado com agitações de 100 (A), 200 (B) e 300 rpm (C).

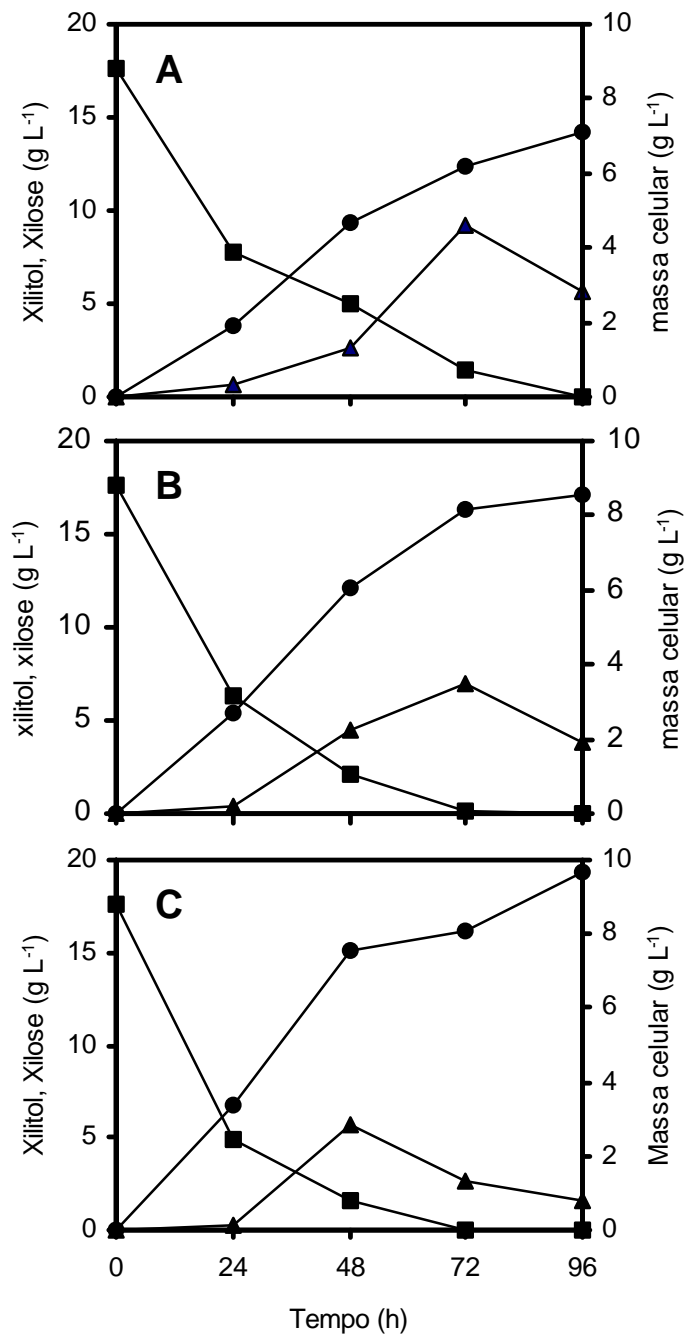


Figura 2 – Massa celular (●), consumo de D-xilose (■) e produção de xilitol (▲) da levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170 cultivada em hidrolisado de casca de semente de algodão três vezes concentrado, adicionado de meio mineral e extrato de levedura. O microrganismo foi cultivado com agitações de 100 (A), 200 (B) e 300 rpm (C).

5 – DISCUSSÃO

A obtenção de D-xilose a baixo custo é fator determinante para a viabilidade econômica da produção de xilitol e de outros produtos de interesse industrial. A xilana sendo o principal componente da fração hemicelulósica de madeiras duras e resíduos agrícolas, pode ser hidrolisada enzimaticamente ou quimicamente, fornecendo como principal produto D-xilose (AGUIAR, *et al.*, 1999a).

A casca de semente de algodão, resíduo da indústria algodoeira, ao ser submetida à hidrólise ácida, apresentou como principal componente D-xilose. Outros hidrolisados de resíduos como o bagaço de cana-de-açúcar (SILVA, 2001), palha de arroz (MUSSATO *et al.*, 2002) e farelo de cevada (CRUZ *et al.*, 2000) também apresentaram D-xilose como principal componente após hidrólise ácida.

A eficiência de obtenção de D-xilose a partir da hidrólise ácida da casca de semente de algodão foi em torno de 5%. A eficiência da hidrólise pode ser melhorada levando-se em consideração que a casca de semente de algodão possui 30% de pentosanas e que a hidrólise foi realizada apenas com ácido clorídrico. Testes de hidrólise utilizando diferentes concentrações de ácido clorídrico ou de ácido sulfúrico poderiam definir quais as melhores condições de hidrólise para maior obtenção de D-xilose. Considerando-se o maior rendimento de xilitol obtido neste trabalho (0,56 g g⁻¹) a quantidade de D-xilose obtida e a produção anual estimada de

casca de semente de algodão no Brasil (100.000 toneladas), poderia-se obter cerca de 2.950 toneladas/ano de xilitol.

O maior conteúdo de D-xilose encontrado no hidrolisado de casca de semente de algodão moída (HCAM) em relação ao hidrolisado de casca de semente de algodão sem moer (HCASM), pode ser atribuído à etapa de moagem. O processo de moagem proporciona a redução do tamanho das partículas da casca de semente de algodão, aumentando a área superficial para a hidrólise, resultando na melhor degradação dos componentes da casca e conseqüente liberação de D-xilose.

As baixas concentrações de D-glicose encontradas nos dois tipos de hidrolisados de casca de semente de algodão podem favorecer o processo de obtenção de xilitol. Glicose parece reprimir xilose redutase (XR) e xilitol desidrogenase (XDH), as principais enzimas envolvidas no processo de conversão de xilose a xilitol. As atividades das enzimas XR e XDR aumentaram quando GÍRIO *et al.* (2000) cultivando *Debaryomyces hansenii*, substituíram glicose por xilose, como fonte de carbono, no meio de cultivo. Entretanto, os relatos dos efeitos da presença de glicose nos hidrolisados hemicelulósicos são conflitantes (SILVA *et al.*, 1998). Quando YAHASHI *et al.* (1996) testaram o efeito da D-glicose na produção de xilitol em *Candida tropicalis*, os melhores resultados foram obtidos com a utilização simultânea de xilose e glicose no meio de cultura. Naquele estudo observou-se que a glicose estimulou o acúmulo de massa celular e aumentou o rendimento de xilitol.

Os melhores resultados de produção de xilitol obtidos com o HCAM podem estar associados à maior concentração de D-xilose e menores concentrações de D-glicose quando comparados ao HCASM.

Na etapa de triagem, a levedura 2.80 cresceu no meio completo, atingindo valores de massa celular comparáveis às demais leveduras testadas, mas a produção de xilitol por esta levedura foi insignificante. Explicação possível seria a utilização do xilitol para o crescimento da levedura num intervalo de tempo menor do que 24 h. Estes dados indicam que a composição do HCA (hidrolisado de casca de semente de algodão) não afetou o crescimento da levedura 2.80, mas interferiu com o metabolismo de xilitol na célula. É importante notar que a levedura 2.80 foi considerada boa produtora de xilitol em meio sintético por SAMPAIO, 2001.

As demais leveduras da triagem cresceram no HCA e produziram concentrações semelhantes de xilitol. Embora a produção de xilitol tenha sido inferior àquela obtida com outros resíduos agroindustriais, as leveduras foram capazes de se adaptar ao HCA e metabolizar a xilose presente. Todas as leveduras testadas apresentaram menor produção de xilitol quando comparadas ao trabalho de SAMPAIO (2001), que utilizou meio de cultura sintético (TABELA III). As maiores diferenças relativas às produtividades, refletem a menor produção de xilitol por hora. Tal fato pode ser explicado pela diferença na composição dos meios. SAMPAIO, 2001 obteve seus resultados em meio sintético contendo $10,73 \text{ g L}^{-1}$ de D-xilose. O HCAM continha apenas $5,26 \text{ g L}^{-1}$ de D-xilose, além da possibilidade da presença de outros produtos de hidrólise que podem comprometer a bioconversão. Entretanto, os valores de rendimento obtidos foram bastante semelhantes àqueles obtidos em meio sintético indicando a boa adaptação das leveduras ao HCA bem como a manutenção da capacidade destes microrganismos de converter xilose em xilitol. A levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170 produziu mais xilitol no HCA três vezes concentrado ($17,6 \text{ g L}^{-1}$ de D-xilose) do que no HCA não concentrado ($5,26 \text{ g L}^{-1}$) indicando que o aumento na concentração inicial de D-xilose favoreceu a bioconversão.

MEYRIAL *et al.*, 1991, avaliaram a fermentação em *C. guilliermondii* com concentrações de D-xilose variando de 10 g L^{-1} a 300 g L^{-1} . O aumento na concentração inicial de D-xilose resultou no aumento correspondente da produção de xilitol, sendo que os melhores resultados foram obtidos com 300 g L^{-1} . Resultados semelhantes foram obtidos por IKEUCHI *et al.*, 1999, trabalhando com *Candida* sp 559-9, onde observou-se máxima produção de xilitol quando a concentração de xilose foi de 200 g L^{-1} . Entretanto, SILVA *et al.*, 1999, demonstraram que aumentos na concentração de D-xilose de 60 para 120 g L^{-1} reduziram drasticamente a produção de xilitol em *C. guilliermondii*. Tal redução foi atribuída a efeitos osmofílicos, repressão das enzimas que metabolizam D-xilose e à presença de substâncias inibitórias no hidrolisado hemicelulósico. A pressão osmótica exercida por concentrações de xilose acima de 300 g L^{-1} pode interferir com a produção de xilitol (SILVA *et al.*, 1998).

Neste trabalho observou-se aumento no tempo de cultivo para produção máxima de xilitol quando o HCA foi concentrado. Entretanto, a concentração de xilose no HCA três vezes concentrado e cinco vezes concentrado ficou abaixo daquelas consideradas inibitórias por outros autores. Quando SAMPAIO (2001) aumentou a concentração inicial de D-xilose para $98,4 \text{ g L}^{-1}$, foi observado um aumento de 60 horas no tempo de consumo total de D-xilose pela levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170. IKEUCHI *et al.* (1999) também observaram aumento no período de fermentação para obter produção máxima de xilitol quando cultivaram *Candida* sp 559-9 com 300 g L^{-1} de D-xilose.

O incremento da massa celular com o aumento do inóculo inicial poderia reduzir o tempo de cultivo de 72 horas para produção máxima de xilitol no HCA três vezes concentrado. Efeito semelhante poderia ser obtido com a utilização de células adaptadas ao hidrolisado. Segundo PARAJÓ *et al.* (1998) essas estratégias podem melhorar a bioconversão de hidrolisados hemicelulósicos por leveduras.

Nos dois tipos de HCA utilizados neste trabalho, o processo de conversão de xilose a xilitol foi associado ao crescimento, indicando que a produção de xilitol e o crescimento celular ocorreram simultaneamente (FIGURAS 4 e 5).

Os resultados dos parâmetros de produção de xilitol analisados estatisticamente demonstraram que a maior produtividade volumétrica (Q_p) e o melhor rendimento ($Y_{p/s}$) foram obtidos com HCA três vezes concentrado após 72 horas de cultivo, sendo novamente compatível com o favorecimento da conversão de xilitol pelo aumento na concentração de D-xilose.

O valor de produtividade específica foi melhor no HCA não concentrado, onde ocorreu uma menor produção de massa celular em relação ao HCA três vezes concentrado. Esse resultado difere de estudos que demonstram uma correlação entre o acúmulo de xilitol como consequência da redução de oxigênio provocada por altas densidades de células em substratos concentrados (SILVA *et al.*, 1998). A partir do mesmo número de células no inóculo inicial, pode-se observar um maior incremento de massa celular no HCA três vezes concentrado e menor eficiência de conversão. A presença de outros compostos no HCA três vezes concentrado podem ter exercido efeitos osmofílicos, interferindo negativamente no metabolismo

microbiano. As enzimas responsáveis pelo metabolismo da D-xilose também podem ter sofrido repressão por concentração de produtos indesejáveis presentes no HCA três vezes concentrado.

Um dos maiores problemas na fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos é a presença de compostos tóxicos liberados da estrutura lignocelulósica durante o processo hidrolítico ou resultantes da degradação de açúcar. Esses compostos tóxicos são na maioria das vezes furfural, 5-hidroximetilfurfural, ácido acético, ácido siríngico, ácido p-hidroxibenzóico, vanilina que inibem o crescimento microbiano e a atividade fermentativa das leveduras (SILVA *et al.*, 1998; OLSSON e HAHN-HÄGERDAL, 1996).

A ausência de produção de xilitol pelo uso do substrato (HCA) cinco vezes concentrado sugere aumento substancial de compostos que afetaram a bioconversão. Quando a concentração de D-xilose é aumentada por evaporação, ocorre aumento simultâneo na concentração de outros compostos não-voláteis, alguns deles causando inibição do metabolismo microbiano e redução no crescimento celular e rendimento dos produtos (WATSON *et al.*, 1984; PALMQVIST *et al.*, 1996; OLSSON E HAHN-HÄGERDAL, 1996). Os efeitos osmofílicos causados pelo aumento da concentração de açúcares no hidrolisado podem ter contribuído para a inibição da produção de xilitol no hidrolisado cinco vezes concentrado, já que a levedura foi capaz de crescer neste substrato.

O ácido acético é comumente encontrado em hidrolisados hemicelulósicos, originados de grupos acetil da xilana, sendo considerado inibidor importante do processo da bioconversão dos açúcares. Sua ação inibitória depende da concentração e da forma não dissociada, que é pH dependente. Em pH acidificado, o ácido acético pode difundir-se no citoplasma da célula, onde ele se dissocia e reduz o pH intracelular, resultando em desacoplamento da produção de energia e impedindo o transporte de vários nutrientes, aumentando os requerimentos de ATP. O efeito do ácido acético depende do microrganismo e os dados disponíveis dificultam comparações devido às diferentes condições em que os estudos são realizados (PARAJÓ *et al.*, 1998). O ácido acético foi o principal composto inibitório do metabolismo de D-xilose por *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de

cana-de-açúcar (FELIPE *et al.*, 1994). A quantidade de ácido acético ($0,59 \text{ g L}^{-1}$) detectada no HCA foi inferior aos valores encontrados por outros autores utilizando hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana onde foram detectadas concentrações variáveis de ácido acético sendo: $2,62 \text{ g L}^{-1}$ (SILVA, 2001); $3,9 \text{ g L}^{-1}$ (ALVES *et al.*, 1998); $2,68 \text{ g L}^{-1}$ (SENE, 2000) e $3,38 \text{ g L}^{-1}$ (RODRIGUES, *et al.*, 2001). Os valores iniciais de ácido acético do HCA aumentaram após concentração em rotavapor, correspondendo a $3,47 \text{ g L}^{-1}$ no HCA concentrado cinco vezes e $1,15 \text{ g L}^{-1}$ para o HCA concentrado três vezes. FELIPE *et al.*, 1995, constataram que a produção de xilitol por *C. guilliermondii* em meio semi-sintético foi maior quando o ácido acético se encontrava em baixa concentração ($1,0 \text{ g L}^{-1}$) enquanto que em concentrações superiores a $3,0 \text{ g L}^{-1}$ a produção foi inibida. SILVA, 2001, observou que o efeito tóxico do ácido acético em *C. guilliermondii* cultivada em hidrolisado de bagaço de cana parece ser potencializado pela presença de outros compostos tóxicos como furfural, hidroximetilfurfural e fenóis.

Comparando a casca de semente de algodão com outros tipos de substratos (TABELA VI), observa-se que, apesar dos valores de produção de xilitol obtidos neste trabalho terem sido inferiores àqueles observados com outros resíduos agroindustriais, a casca de semente de algodão é um substrato promissor. Todos os substratos citados na tabela apresentaram concentrações de D-xilose maiores do que o HCA. Além disso, os resíduos foram submetidos a tratamentos específicos para reduzir ou mesmo eliminar os produtos tóxicos formados. Por exemplo, no estudo de ALVES *et al.* (1998), que apresenta o melhor rendimento de xilitol, o hidrolisado foi primeiramente tratado com CaO para ajustar o pH para 7,0 e subseqüentemente tratado com H_3PO_4 para baixar o pH para 5,5, adicionando-se 2,4% de carvão ativado.

Várias estratégias têm sido propostas para minimizar o efeito dos produtos tóxicos de hidrolisados hemicelulósicos (SILVA *et al.*, 1998). CHEN e GONG (1985), utilizaram a técnica de adaptação da levedura *Candida* sp B22 ao hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar e obtiveram um rendimento em torno de 85%. GURGEL *et al.* (1998) avaliaram mudanças de pH do hidrolisado de bagaço de cana com uso de ácidos e bases e obtiveram melhores resultados com adição de 20 g L^{-1} de

$\text{Al}(\text{OH})_3$ e aumento do pH para 10 com uso de NaOH e posterior redução do pH para 6,5 com H_2SO_4 . O emprego de altas concentrações do inóculo inicial (3 g L^{-1}) por FELIPE (1994) também resultou em aumento na produtividade de xilitol em hidrolisado hemicelulósico. Portanto, a otimização do processo de bioconversão pode ser obtida por tratamento mais específico do HCA e por adaptação da levedura ao hidrolisado.

A aeração dos erlenmeyers pelo controle de agitação (100, 200 e 300 rpm) não afetou a produção de xilitol pela levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170. Tanto no HCA não concentrado quanto no HCA três vezes concentrado, o consumo de D-xilose apresentou o mesmo comportamento com as três agitações. Entretanto, em valores absolutos, observa-se melhores resultados na quantidade de xilitol produzida na agitação de 100 rpm. A rotação difere do resultado apresentado por SAMPAIO, 2001, onde a mesma levedura cultivada em meio sintético, apresentou maior produção de xilitol a 200 rpm. De acordo com a literatura, o efeito do oxigênio na produção de xilitol não é completamente entendido e parece estar relacionado às etapas iniciais do metabolismo de D-xilose e ao "pool" de NAD/NADH (SILVA *et al.*, 1997). Os estudos diferem quanto às condições de oxigenação em diferentes espécies, por exemplo, *C. shehatae* não produziu xilitol em aerobiose (du PREEZ *et al.*, 1989) e *C. guilliermondii* apresentou maior tolerância à elevada concentração de D-xilose no meio e aumento do rendimento em xilitol em condições de microaerobiose (NOLLEAU *et al.*, 1993).

Considerando o volume de algodão produzido anualmente no Brasil, cuja estimativa para ano de 2003 é de 2.240.024 toneladas, segundo dados do IBGE, e os resultados obtidos neste trabalho de bioconversão, são necessários outros estudos para otimizar as condições de obtenção do hidrolisado hemicelulósico e minimizar o efeito inibitório de compostos tóxicos formados durante a hidrólise ácida no crescimento e metabolismo microbiano.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O uso de resíduos agrícolas em processos biotecnológicos para obtenção de produtos úteis é de grande relevância tanto para as indústrias quanto para o ambiente. A demanda de xilitol pelas indústrias de alimentos e farmacêutica tem resultado no desenvolvimento de processos alternativos que proporcionem maiores rendimentos e custos mais baixos do que o processo químico empregado atualmente na obtenção de xilitol. Neste contexto, o hidrolisado de casca de semente de algodão foi avaliado como substrato para a produção de xilitol por leveduras anteriormente caracterizadas como boas produtoras de xilitol em meio sintético. Neste estudo preliminar, concluiu-se que o hidrolisado de casca de semente de algodão moída apresenta uma composição mais favorável ao processo de bioconversão do que o hidrolisado de casca de semente de algodão sem moer.

Das cinco leveduras testadas (leveduras 1.55; *Debaryomyces hansenii* UFV-170; 1.71; 2.64 e 2.80) apenas a levedura 2.80 não produziu xilitol em quantidades significantes, embora tenha crescido no hidrolisado de casca de semente de algodão. As demais leveduras produziram níveis semelhantes de xilitol após 24 h de cultivo.

A avaliação da concentração de D-xilose do hidrolisado de casca de semente de algodão e diferentes níveis de agitação (100, 200 e 300 rpm), indicou que os melhores resultados de produção de xilitol, produtividade volumétrica (Q_p) e

rendimento ($Y_{p/s}$) foram obtidos com hidrolisado de casca de semente de algodão três vezes concentrado ($17,6 \text{ g L}^{-1}$ de D-xilose). Entretanto, houve aumento no tempo de produção máxima de xilitol que passou de 24 h (hidrolisado de casca de semente de algodão não concentrado) para 72 h (hidrolisado de casca de semente de algodão três vezes concentrado). Os melhores valores de produtividade específica foram obtidos no hidrolisado não concentrado. Embora não tenha havido diferença significativa no nível de 5% de probabilidade pelo teste F entre as agitações, a maior produção de xilitol foi obtida com a agitação de 100 rpm nos dois tipos de hidrolisados.

Não houve produção de xilitol quando o HCA cinco vezes concentrado foi utilizado como substrato, sugerindo a presença no hidrolisado de inibidores do metabolismo da levedura ou de repressores das enzimas que metabolizam D-xilose, ou ainda efeitos osmofílicos devido à concentração de açúcares no hidrolisado.

Os resultados indicam que o hidrolisado obtido da casca de semente de algodão é substrato com potencial biotecnológico para produção de xilitol. Além de favorecer a obtenção de produto de grande interesse industrial, a utilização da casca de semente de algodão traz enorme benefício ambiental, reduzindo o impacto causado pela queima ou liberação do resíduo no ambiente. O processo pode ser ainda otimizado, já que este estudo não enfocou os demais componentes químicos do hidrolisado e nem testou diferentes condições de hidrólise ácida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, L. A., FELIPE, M. G. A., SILVA, J. B. A. E.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70-72, p.89-98, 1998.
- AGUIAR, W. B.; ANDRADE, C.M.M.; ANTUNES, J.G.; ARAÚJO, Q. F.; BRITO, F. H. X.; DAMACO, M. C. T.; FARIA, L. F.; FONSECA, M. C. C.; GIMENES, M. A. P.; GUERRANTE, M. F.; LEAL, M. L. M.; LEMOS, R. P. A.; MOTTA, R. P. A.; NÓBREGA, R.; SÁ, M. C. A.; SILVA, M. L. A.; PEREIRA, N. J. Biotecnologia de hemicelulose . **Enzitec**, VII – VII5, 1999a.
- AGUIAR, C. L. ; OETTERER, M.; MENEZES, T. J. B. Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia. **BOLETIM da SBCTA**, 33(2), 184 - 193, 1999 b.
- ASSEV, S.; WÄLER, S. M.; ROLLA, G. Further studies on the growth inhibition of some oral bacteria by xylitol. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 91, p. 261-265, 1983.
- 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.
- CONVERTI, A.; PEREGO, P.; DOMÍNGUEZ, J. M.; Xylitol production from hardwood hemicellulose hydrolysates by *Pachysolen tannophilus*, *Debaryomyces hansenii*, and *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.82, p.141-151, 1999.
- CHEN, L.; GONG, C. Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate to xylitol by a hydrolysate-acclimatized yeast. **Journal of Food Science**, v. 50, p.226-227, 1985.
- CRUZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, J. M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J. C. Xylitol production from barley bran hydrolysates by continuous fermentation with *Debaryomyces hansenii*. **Biotechnology Letters**, v.22, p. 1895-1898, 2000.
- DOMÍNGUEZ, J. M. ; CRUZ, J. M.; ROCA, E.; DOMÍNGUEZ, H; PARAJÓ, J. C. Xylitol production from wood hydrolysates by entrapped *Debaryomyces hansenii* and *Candida guilliermondii* cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 81, p. 119-131, 1999.
- du PREEZ, J. C. van DRIESSEL, B.; PRIOR, B. A. Effect of aerobiosis on fermentation and key enzyme levels during growth of *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* and *Candida tenuis* on D-xylose. **Archives. Microbiology**, v.152, p.143-147, 1989.
- EMBRAPA, **Serviço de Atendimento ao Cidadão**. sac@cnpa.embrapa.br.
- EMODI, A. Xylitol: its properties and food applications. **Food Technology**, p.28-32, jan, 1978.

- FELIPE, M. G. A. Obtenção de xilitol por fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. **Dissertação de Doutorado em Tecnologia das Fermentações**. Universidade de São Paulo, 141p., 1994.
- 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 xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, v. 35, p. 171-177, 1995.
- 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 Biotechnology**, v.16, p.73-79, 1996.
- 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 Biotechnology**, v.16, p.73-79, 1996.
- GÍRIO, F. M.; AZINHEIRA, A. H.; PELICA, F.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaromyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v.71, p. 245-251, 2000.
- GONG, C. H.; GLAYPOOL, T. A.; McCracken, L. D. ; MAUN, C. M.; UENG, P. P. TSAO, G. T. Conversion Pentoses by Yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p85-102, 1983.
- GRENBY, T. H.; COOLLEY, J. Dental effects of xylitol compared with others carbohydrates and polyols in the diet of laboratory rats. **Archives of Oral Biology**, v. 28, p. 745-758, 1983.

GROVER, B. P.; GARG, S. K.; VERMA, J. Production of 2,3 butanediol from wood hydrolysate by *Klebsiella pneumoniae*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 6, p. 328-332, 1990.

GRUMBERG, E.; BESKID, G.; BRIN, M. Xylitol and dental caries – efficacy of xylitol in reducing dental caries in rats. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 43, p. 227-232, 1973.

GURGEL, P. V.; FURLAN, S. A.; MARTINEZ, S. E. R.; MANCILHA, I. M. Evaluation of sugarcane bagasse acid hydrolysate treatments for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.15, n°3, 1998.

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p.933-943, 1994.

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

IKEUCHI, T.; AZUMA, M. KATO, J.; OOSHIMA, H. Screening of microorganisms for xylitol production and fermentation behaviors in high concentration of xylose. **Biomass and Bioenergy**, v.16, p.333-339, 1999.

JUNIOR, W. B. A.; FARIA, L. F. F.; COUTO, M. A. P. G.; ARAÚJO, O. Q. F., JUNIOR, N. P. Growth model and prediction of oxygen transfer rate for xylitol production from D-xylose by *C. guilliermondii*. **Biochemical Engineering Journal**, v.12, p.49-59, 2002.

- KANDELMAN, D.; GAGNON, G. Effect on dental caries of xylitol chewing gum, two years results. **Journal of Dental Research**, v.67, p.172, 1988.
- KUHAD, R. C., SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: currente and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p.151-172, 1993.
- LATIF, F.; RAJOKA, M. I.; Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 77, p. 57-63, 2001.
- LEATHERS, T. D.; DIEN, B. S. Xylitol production from corn fibre hydrolysates by a two-stage fermentation process. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 765-769, 2000.
- LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, v. 56, n° 1, p. 1-24, 1997.
- MAGEE, R. J.; KOSARIC, N. Bioconversion of hemicelluloses. **Advance Biochemical Eng. Biotechnology**, v.32, p.61-93, 1985.
- MÄKNINEN, K. K. Xylitol and oral health. **Advances in Food Research**, v.25, p. 137-158, 1979.
- 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**. Oct., 1973.
- MATILLA, P. T.; SVANBERG, M. J.; PÖKKÄ, P.; KNUUTTILA, M. L. E. Dietary xylitol protects against weakening of bone biomechanical properties in ovariectomized rats. **The Journal of Nutrition**, v. 128, n° 10, p 1811-1814, 1998.

- MEYRIAL, V.; DELGENES, J. P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J. M. Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii* fermentation behaviour. **Biotechnology Letters**, v. 3, n° 4, p.281-282, 1991.
- MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Produção biotecnológica de xilitol a partir da palha de arroz. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n° 28, p.34-39, 2002.
- NIGAM, P.; SINGH, D. Processes for fermentative production of xylitol. A sugar substitute. **Process Biochemistry**, v.30, n.2, p,117-124, 1995.
- NOLLEAU, V.; PREZIOSI-BELLOY, L.; DELGENES, J. P.; NAVARRO, J. M. Production from D-xylose by to yeast strains: sugar tolerance. **Current Microbiology**, v. 27, p. 191-197, 1993.
- NOLLEAU, V.; PREZIOSI-BELLOY, L.; NAVARRO, J. M. Reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis*: incidence of oxygen and pH. **Biotechnology Letters**, v. 17, p. 417-422, 1995.
- OH, D. K.; KIM, S. Y. Increase of xylitol yield by feeding xylose and glucose in *Candida tropicalis*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.50, p.419-425, 1998.
- OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.312-331, 1996.
- PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; ZACCHI, G. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p.470- 476, 1996.

- PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v.65. p.191-201, 1998a.
- PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v.66. p.25-40, 1998.
- PEPPER, T.; OLINGER, P. M. Xylitol in sugar-free confections. **Food Technology**, p.98-106, 1988.
- ROBERTO, I. C.; LACIS, L. S.; BARBOSA, M. F. S.; MANCILHA, I. M. Utilization of sugar cane hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis* for the production of ethanol. **Process biochem.** v.26, p.15-21, 1991.
- ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M., SOUZA, C. A.; FELIPE, S. S.; CASTRO, H. F. Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v.16, p.1211-1216, 1994.
- ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate for the production of xylitol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v.57/58, p.339-347, 1996.
- RODRIGUES, D. C. G. A; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R.; FELIPE, M. G. A. Biotechnological production of xylitol from agroindustrial residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 869-875, 1998.

- RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; VITOLO, M.; GOMES, P. V. Influence of the vacuum evaporation process associated with activated charcoal on sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 2001.
- SADDLER, J. N.; YU, E. K. C.; MES-HARTREE, M.; LEVITIN, N.; BROWNELL, H. H. Utilization of enzymatically hydrolyzed wood hemicelluloses by microorganisms for production of liquid fuels. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 45, p. 153-160, 1983.
- SAMPAIO, F. C. Seleção de microrganismos para a conversão de xilose em xilitol. **Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola**, Universidade Federal de Viçosa, M.G., 69p., 2001.
- SENE, L.; Adaptação e reciclagem da levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de xilitol. **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Industrial**, Faculdade de Engenharia Química de Lorena, S.P., 69p., 1996.
- SCHEININ, A.; MÄKINEN, K. K.; YLITALO, K. Turku sugar studies V – Final report on the effect of sucrose, fructose and xylitol diets on the caries incidence in man. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.33, nº 70, p. 67-104, 1975.
- SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M.; VANETTI, M. C. D.; BARBOSA, M. F. S. Use of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate for lactic acid production. **Elsevier Applied Science**, v.2, p.1005-1009, 1990.
- SILVA, S. S.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A. Xilitol: um adoçante alternativo para a indústria de alimentos. **Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v.5, p.109-117, 1993-1994.

- SILVA, S. S. Produção de xilitol por via biotecnológica: estudo de sistemas de biorreatores e parâmetros fermentativos. **Dissertação de Doutorado em Tecnologia das Fermentações**. Universidade de São Paulo, 219p., 1994.
- SILVA, S. S.; RIBEIRO, J. D.; FELIPE, M. G. A.; VITOLLO, M. Maximizing the xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate by controlling the aeration rate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.63-65, p.557-565.
- SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. MANCILHA, I. M. Factors that affect the biosynthesis of xylitol by xylose-fermenting yeasts. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.70-72, p.331-342, 1998.
- SILVA, C. J. S. M.; ROBERTO, I. C. Statistical screening method for selection of important variables on xylitol biosynthesis from rice straw hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. **Biotechnology Techniques**, v. 13, p. 743-747, 1999.
- SILVA, D. D. V. Bioconversão de xilose em xilitol por *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana: estudo do efeito do ácido acético. **Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Industrial**. Faculdade de Engenharia Química de Lorena, São Paulo, 73p., 2001.
- SIRISANSANEYAKUL, S. S.; STANISZEWSKI, M.; RIZZI, M. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.80, n°6, p.565-570, 1995.
- TOUSTER, O. The metabolism of polyols. In: SIPPLE, H. L.; McNUTT, K. W. (Eds.) **Sugars in Nutrition**. New York: Academic Press, p.229-258, 1974.

- TSAO, G. T. Structures of cellulosic material and their hydrolysis by enzymes. In: ALANI, D. I., MOO-YOUNG, M. eds. **Biotechnologic and Applied Microbiology**. New York: Elsevier Applied Science Publishers, p. 205-212, 1986.
- UHARI, M.; TAPIAINEM, T.; KONTIOKARI, T.; Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, v.19, p.144-147, 2001.
- VANDESKA, E.; AMARTEY, S.; KUZMANOVA, S.; JEFFRIES, T. Effects of environmental conditions on production of xylitol by *Candida boidinii*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p.213-218, 1995.
- Van EYS, J.; WANG, Y.; CHAN, S.; TANPHAICHITR, V. S.; KING, M. Xylitol as a therapeutic agent on glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: Sipple, h. I., McNutt, K. W. **Sugar in Nutrition**, Academic Press, p. 613, 1974.
- VONGSUVANLERT, V.; TANI, Y. Xylitol production by methanol yeasts, *Candida boidinii* (*Kloeckera* sp) No. 2201. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.67, n°1, p.35-39, 1989.
- YAHASHI, Y.; HORITSU, H.; KAWAI, K.; SUZUKI, T.; TAMIZAWA, K. Production of xylitol from the xylose by *Candida tropicalis*: the effect of D-glucose feeding. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.81, n°2, p. 148-152, 1996.
- YLIKAHRI, R. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. **Advances in Food Research**, v.25, p.159-177, 1979.
- WALTHER, T.; HENSIRISAK, P.; AGBLEVOR, F. A. The influence of aeration and hemicellulose sugars on xylitol production by *Candida tropicalis*. **Bioresource Technology**, v.76, p.213-220, 2001.

WATSON, N. E.; PRIOR, B. A.; du PREEZ , J. C.; LATEGAN, P. M. Oxigen requirements for D-xylose fermentation to ethanol and polyols by *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v.6, p.447-450, 1984.

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

ZABNER, J.; SEILER, M. P.; LAUNPACH, J. L.; KARP, P. H.; KEARNEY, W. R.; LOOK, D. C.; SMITH, J. J.; WELSH, M. J. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 97, n° 21, p.11614 –11619, 2000.

APÊNDICE

APÊNDICE A

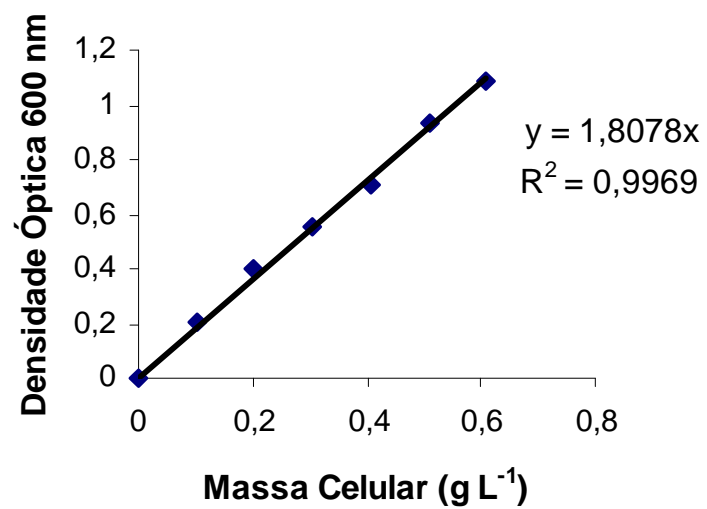


FIGURA 1 A – Curva de calibração utilizada na definição da massa celular correspondente a uma unidade de densidade óptica (DO)

APÊNDICE B

Resultados das análises estatísticas para produtividade volumétrica - análise de variância pelo teste F.

Sumário de todos os efeitos:

1-CONCENTRAÇÃO, 2-AGITAÇÃO, 3-REPETIÇÃO

df	MS	Df	MS			
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2	,225832	81	,005899	38,28122	,000000
2	2	,010901	81	,005899	1,84786	,164155
3	2	,000093	81	,005899	,01585	,984282
12	4	,006155	81	,005899	1,04331	,390136
13	4	,000328	81	,005899	,05554	,994148
23	4	,000047	81	,005899	,00805	,999869
123	8	,000051	81	,005899	,00860	1,000000

Sumário de todos os efeitos:

1-CONCENTRAÇÃO, 2-TEMPO

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	1	,232153	64	,003035	76,48599	,000000
2	3	,022893	64	,003035	7,54247	,000213
12	3	,087807	64	,003035	28,92932	,000000

Sumário de todos os efeitos:

1-AGITAÇÃO, 2-TEMPO

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2	,010901	96	,009081	1,200366	,305562
2	3	,015262	96	,009081	1,680582	,176305
12	6	,006435	96	,009081	,708637	,643408

Resultados das análises estatísticas para produtividade específica - análise de variância pelo teste F.

Sumário de todos os efeitos:

1-CONCENTRAÇÃO, 2-AGITAÇÃO, 3-REPETIÇÃO

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2	,157983	81	,015328	10,30683	,000103
2	2	,008520	81	,015328	,55584	,575762
3	2	,005128	81	,015328	,33456	,716638
12	4	,002345	81	,015328	,15301	,961132
13	4	,002394	81	,015328	,15620	,959668
23	4	,001087	81	,015328	,07092	,990660
123	8	,000924	81	,015328	,06031	,999868

Sumário de todos os efeitos:

1-CONCENTRAÇÃO, 2-TEMPO

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2	,157983	96	,001775	89,01337	,000000
2	3	,117892	96	,001775	66,42439	,000000
12	6	,129251	96	,001775	72,82484	0,000000

Sumário de todos os efeitos:

1-AGITAÇÃO, 2-TEMPO

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2	,008520	96	,012839	,663591	,517345
2	3	,117892	96	,012839	9,182225	,000021
12	6	,002044	96	,012839	,159180	,986724

Resultados das análises estatísticas para rendimento - análise de variância pelo teste F.

Sumário de todos os efeitos:

1-CONCENTRAÇÃO, 2-AGITAÇÃO, 3-REPETIÇÃO

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2	,473754	81	,023725	19,96846	,000000
2	2	,032723	81	,023725	1,37927	,257610
3	2	,005144	81	,023725	,21680	,805553
12	4	,009567	81	,023725	,40325	,805785
13	4	,003284	81	,023725	,13840	,967564
23	4	,001603	81	,023725	,06758	,991480
123	8	,001971	81	,023725	,08308	,999560

Sumário de todos os efeitos:

1-CONCENTRAÇÃO, 2-TEMPO

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2	,473754	96	,004638	102,1452	,000000
2	3	,064599	96	,004638	13,9281	,000000
12	6	,238668	96	,004638	51,4586	,000000

Sumário de todos os efeitos:

1-AGITAÇÃO, 2-TEMPO

	df	MS	df	MS		
	Effect	Effect	Error	Error	F	p-level
1	2	,032723	96	,028323	1,155354	,319286
2	3	,064599	96	,028323	2,280775	,084169
12	6	,006713	96	,028323	,237011	,963329