

ORLANDO DE OLIVEIRA SILVA

**APROVEITAMENTO DO BAGAÇO DE ABACAXI (*Ananas
comosus* L. Merrill) PARA PRODUÇÃO
BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586a

Silva, Orlando de Oliveira, 1971-

Aproveitamento do bagaço de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) para produção de biotecnologia de xilitol / Orlando de Oliveira Silva. – Viçosa, MG, 2011.
xix, 121f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Inclui apêndices.

Orientador: Frederico José Vieira Passos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 105-117.

1. Abacaxi - Processamento. 2. Resíduos industriais. 3. Xilitol.
4. Biomassa vegetal. 5. Cristalização. 6. *Beব্যomyces hansenii*.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

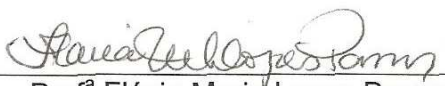
CDD 22. Ed. 664.804774

ORLANDO DE OLIVEIRA SILVA

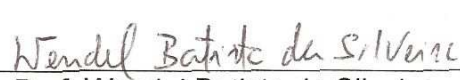
**APROVEITAMENTO DO BAGAÇO DE ABACAXI (*Ananas
comosus L. Merrill*) PARA PRODUÇÃO
BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL**

Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos, para obtenção do
título de *Doctor Scientiae*.

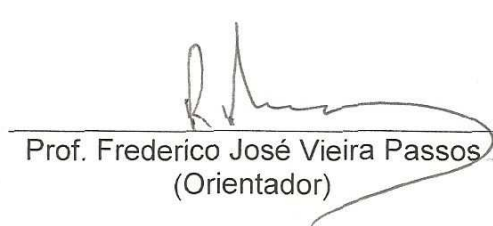
APROVADA: 28 de janeiro de 2011.


Prof.^a Flávia Maria Lopes Passos
(Coorientadora)


Prof. Ismael Maciel de Mancilha
(Coorientador)


Prof. Wendel Batista da Silveira


Prof.^a Maria das Graças de A. Felipe


Prof. Frederico José Vieira Passos
(Orientador)

Aos meus pais,

Onofre e Eulália.

À minha esposa, Aline.

Às minhas irmãs, Elizabete, Elisete e Eliane.

Às minhas sobrinhas, Natália e Sofia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À Universidade Federal de Viçosa, por intermédio do Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade oferecida para realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por intermédio do Programa Institucional de Capacitação de Docentes e Técnicos (PICDTEC), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Instituto Federal de Alagoas (IFAL), em especial ao *campus* Satuba, pela oportunidade concedida.

Ao professor Frederico José Vieira Passos, pela orientação, amizade, confiança no decorrer do curso e na realização desta pesquisa.

Ao professor Ismael Maciel de Mancilha, pela coorientação, pela amizade, pelo incentivo e pelas valiosas sugestões na realização desta pesquisa.

À professora Flávia Maria Lopes Passos, pela coorientação, disponibilidade do microrganismo e dos equipamentos.

Aos professores Jane Coimbra, Luís Minin e Paulo Henrique, pelos empréstimos de equipamentos.

À professora Maria das Graças de Almeida Felipe, do Departamento de Biotecnologia (EEL/USP), ao apoio e devidos esclarecimentos no início da pesquisa.

Ao professor George Rocha, do Laboratório de Conversão de Biomassa Vegetal, do Departamento de Biotecnologia (EEL-USP), por esclarecer e facilitar a realização das análises de caracterização da matéria-prima e hidrólise.

Ao professor José Ivo, do Departamento de Informática, pelo auxílio no planejamento experimental e análise dos dados.

À professora Heloísa Moraes, pela revisão do texto.

Ao Prof. Lincoln Vilas Boas pela amizade e incentivo.

Aos técnicos Rita, Nicanor, Ângelo, Jussara, Cibele e José Carlos, do Departamento de Biotecnologia (EEL-USP), pelas ajudas nas análises químicas.

Ao técnico do DTA/UFV, vulgo “Perereca”, pelas manutenções de equipamentos.

Aos colegas de pós-graduação Danilo, Silvane, Solange (DTA-UFV), Priscila Vaz e Juan (EEL-USP), pelo companheirismo.

À Cooperativa Pindorama, Coruripe-AL, por permitir as devidas visitas técnicas, que instigaram o desenvolvimento desta pesquisa.

À Agroindústria Multi-frutas, Anadia-AL, pelo fornecimento do bagaço de abacaxi.

A todos aqueles que cooperaram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

ORLANDO DE OLIVEIRA SILVA, filho de Onofre Jovino da Silva e Eulália Virgílio de Oliveira Silva, nasceu em Arapiraca-AL, em 4 de junho de 1971.

Em 1997, graduou-se em Engenharia Química pela Universidade Federal de Alagoas. Nesse mesmo ano, atuou como Engenheiro Químico na Agroindústria Laginha de Açúcar e Alcool, situada em União dos Palmares-AL, e em 1998, na Indústria de Fertilizantes Manah, em Maceió-AL.

Em 2001, foi contratado pela Universidade Estadual de Alagoas para lecionar as disciplinas Química Analítica e Bioquímica, nos cursos de graduação de Química (Licenciatura) e Zootécnica.

Em 2002, obteve o título de Mestre em Química e Biotecnologia pela Universidade Federal de Alagoas. Nesse mesmo ano, foi aprovado em concurso para Professor de Ensino Técnico e Tecnológico do IFAL-AL para lecionar a disciplina Agroindústria.

Em 2006, iniciou o curso de Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos na Universidade Federal de Viçosa-MG, na área de concentração de Biotecnologia e Fermentações Industriais.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Biomassa vegetal.....	4
2.2. Obtenção de etanol e xitol por fermentação de hidrolisados de biomassa vegetal	5
2.2.1. Qualidade e abundância da biomassa vegetal	6
2.2.2. Resíduo do processamento de abacaxi	8
2.2.3. Moagem	10
2.2.4. Pré-hidrólise ou hidrólise ácido diluída da biomassa	10
2.2.5. Hidrolise	11
2.2.6. Cálculo de rendimento na sacarificação de biomassa vegetal	13
2.2.7. Concentração do hidrolisado	15
2.2.8. Destoxificação do hidrolisado	16
2.2.9. Operações unitárias alternativas à evaporação e destoxifi- cação	17
2.2.10. Fermentação de hidrolisados de biomassa vegetal	18

	Página
2.2.11. Rendimento da fermentação de hidrolisados a etanol e xilitol	22
2.3 Xilitol: propriedades e usos	23
2.3.1. Vias de obtenção de xilitol	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1. Obtenção, preparo e caracterização físico-química do bagaço de abacaxi	29
3.2. Hidrólise do bagaço de abacaxi	31
3.2.1. Determinação dos parâmetros de hidrólise ácido diluído do bagaço de abacaxi	31
3.2.2. Obtenção, concentração e caracterização físico-química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi (HHBA)	33
3.3. Determinação das condições de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado (HHBAC)	36
3.3.1. Destoxificação por alcalinização	37
3.3.2. Destoxificação por adsorção com carvão ativado	39
3.4. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi	39
3.4.1. Microrganismo, preparo do inóculo e condições de cultivo..	39
3.4.2. Seleção da concentração de inóculo	42
3.5. Análises físico-químicas.....	42
3.5.1. Matéria seca do bagaço de abacaxi.....	43
3.5.2. Cinzas do bagaço de abacaxi	43
3.5.3. Extrativos do bagaço de abacaxi	44
3.5.4. Composição do bagaço de abacaxi	45
3.5.5. Açúcares, ácido fórmico e produtos de fermentação	48
3.5.6. Furaldeídos e compostos fenólicos totais	49
3.5.7. Açúcares redutores totais (ART)	50
3.5.8. Densidade do hidrolisado.....	50
3.5.9. Densidade celular em meio de fermentação.....	51
3.5.10. Massa celular seca (MCS)	51
3.5.11. pH e sólidos totais solúveis (Brix)	51
3.6. Análise dos resultados.....	52
3.6.1. Determinação dos parâmetros de hidrólise.....	52

	Página
3.6.2. Determinação dos parâmetros de fermentação	53
3.6.3. Tratamento estatístico dos dados	54
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1. Caracterização físico-química do bagaço de abacaxi	55
4.2. Hidrólise do bagaço de abacaxi	57
4.2.1. Determinação das condições de hidrólise ácido diluído do bagaço de abacaxi (BA)	64
4.2.2. Obtenção, concentração e caracterização físico-química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi (HHBA) ...	73
4.2.3. Determinação das condições de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico concentrado	76
4.3. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi	81
4.3.1. Crescimento e parâmetros fermentativos de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170 em meios semidefinido e complexo	81
4.3.2. Avaliação de dois níveis de inóculo na fermentação do HHBAC por <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170	87
4.3.3. Avaliação da destoxificação do HHBAC sobre a produção de xilitol por <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170	91
4.3.4. Avaliação da temperatura de destoxificação e do pH inicial do HHBAC sobre a produção de xilitol por <i>D. hansenii</i> UFV-170	94
5. CONCLUSÕES	102
6. RECOMENDAÇÕES	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
APÊNDICES	118
APÊNDICE A	119
APÊNDICE B	121

LISTA DE TABELAS

		Página
1	Produção de restos de colheita e de resíduos agroindustriais (10^6 t) e os respectivos volumes de etanol (10^6 m ³) potencialmente produzidos por bioconversão nos sete continentes	7
2	Propriedades físico-químicas do xitol.....	24
3	Matriz de planejamento experimental ($2^3 + 1$) esférico da hidrólise ácido diluído da fração hemicelulósica de bagaço de abacaxi realizada em reator de bancada	32
4	Matriz de planejamento experimental completo ($2^2 + 1$), tipo estrela, com três repetições do ponto central da destoxificação por alcalinização de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado.....	38
5	Composição centesimal do bagaço de abacaxi.....	55
6	Comparação da composição de bagaço de abacaxi obtido por método de sacarificação quantitativa com dados da literatura obtido por fracionamento com detergentes.....	56
7	Matriz de planejamento experimental ($2^3 + 1$) esférico de hidrólise ácido diluído da fração hemicelulósica de bagaço de abacaxi, realizada em reator de bancada e valores das respostas eficiência de extração de <i>xilose</i> [Φ (%)], seletividade ($[xi]/[gli]$) e rendimentos em <i>xilose</i> (Y_{xil}), em ácido acético (Y_{HAc}), em furfural ($Y_{furfural}$) e em fenóis ($Y_{fenóis}$).....	59

8	Comparação dos parâmetros seletividade ($[xilose]/[glicose]$) e rendimento em xilose (Y_{xil}) de hidrólise ácido diluído de bagaço de abacaxi com os de outros materiais lignocelulósicos.....	63
9	Equações normais de regressão das respostas rendimento em xilose, em ácido acético, em furfural, em fenóis e de seletividade da hidrólise ácido diluído de bagaço de abacaxi.....	64
10	Valores de rendimento em xilose preditos pela equação empírica e erros, obtidos por hidrólise ácida diluída de bagaço de abacaxi em reator-piloto, munido de sistema de agitação e usando uma relação sólidos para líquido de 1:10.....	72
11	Composição do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi (HHBA) bruto e concentrado (HHBAC) quatro vezes ...	74
12	Concentração de açúcares monoméricos, xilitol e de massa celular seca ([MCS]), provenientes da destoxificação com CaO e da fermentação de amostras de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado, seguindo planejamento experimental completo ($2^2 + 1$) tipo estrela com três repetições de ponto central	78
13	Estimativas dos efeitos, erro padrão, teste t de Student e níveis de significância da produção de xilitol na fermentação de hidrolisado destoxificado seguindo planejamento completo ($2^2 + 1$) com seis pontos estrela e três repetições de ponto central	79
14	Parâmetros da fermentação em meio semidefinido (KH_2PO_4 6,8 g L ⁻¹ ; K_2HPO_4 3,4 g L ⁻¹ ; $(NH_4)_2SO_4$ 1,0 g L ⁻¹ ; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,1 g L ⁻¹ ; extrato de levedura 5 g L ⁻¹ ; xilose 52 g L ⁻¹), contendo xilose como fonte de carbono, por <i>Debaryomyces hansenii</i> UVF-170 em frascos agitados (30 °C e 200 rpm)	86
15	Parâmetros fermentativos da bioconversão de xilose a xilitol por leveduras do presente trabalho e de registros da literatura.	86
16	Efeito da concentração de inóculo na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi por <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170 em 96 horas.....	88
17	Parâmetros da fermentação de amostras de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e tratadas CaO ou cinza, por método simples de neutralização ou combinado com adsorção, usando <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170 em frascos agitados (30 °C e 200 rpm).....	92

18	Parâmetros fermentativos da fermentação em batelada em biorreator de hidrolisado hemicelulósico de abacaxi concentrado e destoxificado, por <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170.....	97
1A	Análise de variância para o ajuste a uma equação polinomial de segunda ordem da resposta rendimento em xilose (Y_{xil}) com os dados da Tabela (4.2), a 95% de confiança	119
2A	Análise de variância para o ajuste a uma equação polinomial de segunda ordem da resposta rendimento em ácido acético (Y_{HAc}) com os dados da Tabela (4.2), a 95% de confiança.....	119
3A	Análise de variância para o ajuste a uma equação polinomial de segunda ordem da resposta rendimento em furfural ($Y_{furfural}$) com os dados da Tabela (4.2), a 95% de confiança	119
4A	Análise de variância para o ajuste a uma equação polinomial de segunda ordem da resposta rendimento em fenóis ($Y_{fenóis}$) com os dados da Tabela (4.2), a 95% de confiança	120
5A	Análise de variância para o ajuste a uma equação polinomial de segunda ordem da resposta seletividade ($Y_{[xij]}/[glij]$) com os dados da Tabela (4.2), a 95% de confiança.....	120

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Fluxograma de obtenção de etanol e, ou, xilitol por fermentação de hidrolisados de biomassa vegetal	5
2 Produção estimada de suco de abacaxi e geração de resíduos	9
3 Bagaço de abacaxi da produção de suco	10
4 Mecanismo de hidrólise ácida da celulose.....	12
5 Metabolismo de xilose existente em hidrolisados hemicelulósicos por leveduras, resultando em xilitol.....	19
6 Tecnologias para produção de xilitol.....	26
7 Fluxograma das principais etapas experimentais da presente pesquisa.....	29
8 Etapas de preparo do bagaço de abacaxi	30
9 Unidade de hidrólise ácida de biomassa (EEL/USP): 1. reator-piloto; e 2. caldeira de geração de vapor	34
10 Fluxograma das operações do processo de hidrólise ácido diluído de bagaço de abacaxi em reator-piloto	35
11 Evaporador a vácuo de 30 L de capacidade (EEL/USP)	36

12	Peneiramento e aspecto físico da cinza de eucalipto usada como agente alcalinizante alternativo	37
13	Destoxificação de hidrolisado por alcalinização, pela da adição de CaO (1) ou cinza de madeira de eucalipto (2)	38
14	Fermentação de HHBAC destoxificado, por <i>D. hansenii</i> UFV-170, em frascos Erlenmeyer incubados em <i>shaker</i> (30 °C, 200 rpm por 120 h)	41
15	Fermentação de HHBAC destoxificado, por <i>D. hansenii</i> UFV-170, em biorreator (pH 5,5 ou 6,0; 30°C, 2,5 vvm e 200 rpm) ...	41
16	Superfícies de resposta do rendimento em <i>xilose</i> . (I) A <i>versus</i> B e C igual a 140 °C; (II) A <i>versus</i> C e B igual a 30 min; (III) B <i>versus</i> A e C igual a 3% (m/m)	66
17	Superfícies de resposta do rendimento em ácido acético. (I) A <i>versus</i> B e C igual a 140 °C; (II) A <i>versus</i> C e B igual a 30 min; (III) B <i>versus</i> A e C igual a 3 % (m/m).....	68
18	Superfícies de resposta do rendimento em fenóis. (I) – A <i>versus</i> B e C igual a 140 °C; (II) – A <i>versus</i> C e B igual a 30 min; (III) – B <i>versus</i> A e C igual a 3 % (m/m)	70
19	Superfície de resposta da seletividade ([<i>xilose</i>]/[glicose]), com tempo de hidrólise igual a 20 minutos.....	71
20	Região otimizada pela superposição das curvas de contornos das respostas rendimento em <i>xilose</i> (Y_{xil}), em fenóis ($Y_{fenóis}$) e da seletividade ([<i>xilose</i>]/[glicose]), fixado o valor de B em 20 minutos	72
21	Curvas de titulação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado. Titulantes: CaO (Δ), Ca(OH) ₂ ($\circ$) e cinza ($\times$)	76
22	Teores de compostos fenólicos ($\times$) e de ART ($\square$) em amostras de hidrolisado concentrado neutralizadas e tratadas com carvão ativado.....	80
23	Aspecto visual de amostras de hidrolisado hemicelulósico concentrado tratadas: 1. Neutralização (pH = 6,4) com CaO ou cinza; 2, 3 e 4. Neutralização (pH = 6,4) com CaO ou cinza antes e após adsorção com carvão ativado (5% m/v) a 30 °C (ADS – frio) ou a 60 °C (ADS – quente).....	82

24	Crescimento (A) e variação da velocidade de crescimento (B) de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170 ($X_0 = 0,6 \text{ g L}^{-1}$) em meio semidefinido (KH_2PO_4 $6,8 \text{ g L}^{-1}$; K_2HPO_4 $3,4 \text{ g L}^{-1}$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $1,0 \text{ g L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1,1 \text{ g L}^{-1}$; extrato de levedura 5 g L^{-1} ; xilose 20 g L^{-1}), durante 30 horas de cultivo em frascos agitados ($\text{pH} = 6,0$; 30°C e 200 rpm)	83
25	Crescimento (A) e variação da velocidade de crescimento (B) de <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170 ($X_0 = 0,6 \text{ g L}^{-1}$) em frascos agitados ($\text{pH} = 6,0$; 30°C e 200 rpm), usando meio complexo (peptona 5 g L^{-1} ; extrato de levedura 5 g L^{-1} ; e como substratos glicose 20 g L^{-1} , xilose 20 g L^{-1} ou mistura de glicose 5 g L^{-1} mais xilose 15 g L^{-1}) açúcares. (B) Variação da taxa específica de crescimento (μ) ao longo de 21 h de cultivo .	85
26	Perfil de consumo de xilose ($-\triangle-$), produção de xilitol ($-\diamond-$), massa celular seca ($-\circ-$) e variação de pH ($-\ast-$), durante a fermentação em meio semidefinido, contendo xilose (52 g L^{-1}) por <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170, em frascos agitados (30°C e 200 rpm)	87
27	Efeito da concentração de inóculo [1 g L^{-1} ($-\circ-$) e 3 g L^{-1} ($-\bullet-$)] no consumo de glicose (A) e xilose (B), na produção de massa celular (C) e de xilitol (D), durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado, por <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170 em frascos agitados (30°C e 200 rpm).....	89
28	Efeito da concentração de inóculo [1 g L^{-1} ($-\circ-$) e 3 g L^{-1} ($-\bullet-$)] na produção de ácido acético [HAc] (A), etanol (B) e variação de pH (C), durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado, por <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170 em frascos agitados (30°C e 200 rpm).....	90
29	Densidade celular durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado com CaO ($-\square-$), CaO e carvão ($-\blacksquare-$), cinza ($-\triangle-$) e cinza e carvão ($-\blacktriangle-$), por <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170, em frascos agitados (30°C e 200 rpm).....	92
30	Perfis de consumo de glicose (A) e xilose (B), formação de massa celular (C) e xilitol (D), durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado com CaO ($-\square-$), CaO e carvão ($-\blacksquare-$), cinza ($-\triangle-$) e cinza e carvão ($-\blacktriangle-$), por <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170 em frascos agitados (30°C e 200 rpm).....	95

31	Perfis de formação ácido acético [HAc] (A) e etanol (B) e variação de pH (C), durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado com CaO (-□-), CaO e carvão (-■-), cinza (-△-) e cinza e carvão (-▲-), por <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170 em frascos agitados (30 °C e 200 rpm).....	96
32	Perfis de consumo de glicose (A) e xilose (B), formação de massa celular [MCS] (C) e xilitol (D), durante a fermentação em batelada de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado por neutralização (pH = 6,4) com CaO e adsorção com carvão ativado (5% m/v) a 30 °C (-☆-) ou a 60 °C (-★-), em biorreator tipo tanque agitado (30 °C, 2,5 vvm e 200 rpm) por <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170	98
33	Perfis de formação de ácido acético [HAc] (A), etanol (B) e variação de pH (C), durante a fermentação em batelada de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado por neutralização (pH = 6,4) com CaO e adsorção com carvão ativado (5% m/v) a 30 °C (-☆-) ou a 60 °C (-★-), em biorreator tipo tanque agitado (30 °C, 2,5 vvm e 200 rpm) por <i>Debaryomyces hansenii</i> UFV-170	99
1B	Intensa formação de espuma no início da adição de cinza de eucalipto durante o tratamento por alcalinização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi	121
2B	Precipitado gelatinoso formado após tratamento térmico (110 °C/15 min) de amostras de hidrolisado alcalinizadas com CaO	121

RESUMO

SILVA, Orlando de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2011. **Aproveitamento do bagaço de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merrill) para produção biotecnológica de xilitol.** Orientador: Frederico José Vieira Passos. Coorientadores: Ismael Maciel de Mancilha e Flávia Lopes Maria Lopes Passos.

Bagaço de abacaxi proveniente de uma agroindústria de sucos foi coletado e caracterizado por sacarificação quantitativa quanto aos teores dos açúcares monoméricos glicose (29,9%), xilose (27,63%), arabinose (5,48%) e de lignina (15,1%), que compõem a fibra. O bagaço foi usado para obtenção de hidrolisado hemicelulósico por hidrólise ácido diluído. A determinação das condições de hidrólise foi feita por superfície de resposta, com dados levantados por ensaios em reator de bancada, seguindo planejamento experimental ($2^3 + 1$) esférico, considerando os fatores temperatura (120 a 160 °C), tempo de reação (20 a 40 minutos) e concentração de H_2SO_4 (2 a 4%). A condição de hidrólise a 140 °C, 20 minutos e 2% de ácido foi selecionada como uma das melhores para executar a hidrólise do bagaço em reator-piloto (100 L). O hidrolisado hemicelulósico foi concentrado quatro vezes em relação ao seu teor inicial de açúcares, destoxificado pela combinação de neutralização com CaO e adsorção com carvão ativado. O hidrolisado foi caracterizado quanto aos teores de glicose (21,3 g L⁻¹) e xilose mais frutose (64,01 g L⁻¹), tratado por aquecimento a 60 °C por 120 minutos,

suplementado com nutrientes ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g L⁻¹, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,1 g L⁻¹ e extrato de levedura 5 g L⁻¹), e fermentado em biorreator ($V_{\text{meio}} = 1,0$ L; $X_0 = 1$ g L⁻¹; pH = 6,0; 30 °C; 2,5 vvm; 200 rpm por 120 h), por *Debaryomyces hansenii* UFV-170, resultando em 28 g L⁻¹ de xilitol, produtividade volumetrica de 0,24 g L⁻¹ h⁻¹ e $\mu_{\text{máx}}$ igual a 0,034 h⁻¹. O bagaço de abacaxi proveniente de agroindústria de sucos é uma possível matéria-prima para obtenção de hidrolisado hemicelulósico por hidrólise ácido diluído e excelente substrato para produção de xilitol por fermentação com *Debaryomyces hansenii* UFV-170.

ABSTRACT

SILVA, Orlando de Oliveira, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2011. **Improvement of pineapple bran (*Ananas comosus* L. Merrill) for biotechnological production of xylitol.** Adviser: Frederico José Vieira Passos. Co-advisers: Ismael Macielde Mancilha and Flávia Lopes Maria Lopes Passos.

Pineapple bran from a juice agribusiness was collected and characterized by quantitative saccharification for the monomeric sugar contents, glucose (29.9%), xylose (27.63%), arabinose (5.48%), and lignin (15.1%), making up the fiber. Then it was used to obtain hemicellulosic hydrolyzate by dilute-acid hydrolysis. The condition of hydrolysis was determined by surface methodology, with collected data from tests in batch reactor, following spherical experimental design ($2^3 + 13$), considering the factors temperature (120 to 160 °C), reaction time (20 to 40 minutes), and H₂SO₄ concentration (2 to 4%). The hydrolysis condition at 140 °C, 20 minutes, and acid 2% was selected as one of the best way to perform the pineapple bran hydrolysis in a pilot reactor (100 L). The hemicellulosic hydrolyzate was concentrated four times relative to its sugars initial content, detoxified by combined method with CaO and adsorption with activated charcoal. It was then characterized for the glucose contents (21.3 g L⁻¹) and xylose plus fructose (64 g L⁻¹), heat treated at 60°C for 120 minutes, supplemented with nutrients ((NH₄)₂SO₄ 1 g L⁻¹, MgSO₄ 7H₂O 1.1 g L⁻¹ and

yeast extract 5 g L⁻¹), and fermented in a bioreactor ($V_{\text{meio}} = 1.0$ L, $X_0 = 1$ g L⁻¹, pH = 6.0, 30°C, 2.5 vvm, 200 rpm for 120 h) by *Debaryomyces hansenii* UFV-170, resulting in 28 g L⁻¹ of xylitol, volumetric productivity of 0.24 g L⁻¹ h⁻¹, and $\mu_{\text{máx}}$ equal to 0.034 h⁻¹. Pineapple bran from juice agribusiness is a potential raw material for obtaining hemicellulosic hydrolyzate by dilute-acid hydrolysis and excellent substrate for xylitol production by fermentation with *Debaryomyces hansenii* UFV-170.

1. INTRODUÇÃO

A produção de biomassa vegetal ou de materiais lignocelulósicos pela fotossíntese é a principal fonte de geração de energia renovável em nosso planeta, sendo produzidas cerca de 200 bilhões de toneladas anualmente. Menos de 10% desse material é usado na produção de biocombustíveis e de papel e celulose, e seu excedente se decompõe diretamente no solo como cobertura morta ou é queimado.

A estrutura lignocelulósica da biomassa vegetal refere-se à sua parede celular, composta por fibras, constituída basicamente de 70 a 80% (em base seca) de polímeros de hexoses e, ou, pentoses (45 a 50% de celulose e 20 a 30% de hemicelulose), interligados a uma estrutura macromolecular contendo substâncias aromáticas, a lignina (15 a 30%).

Resíduos lignocelulósicos da industrialização de plantios agrícolas são considerados matérias-primas viáveis para obtenção de hidrolisados, por estarem facilmente disponíveis em pátios de agroindústrias. Os resíduos sólidos do processamento de frutas tropicais, por exemplo, são abundantes e de baixo custo para obtenção de hidrolisados, potenciais substratos para processos fermentativos.

Entretanto, grandes quantidades desses materiais são acumuladas anualmente, gerando problemas de ordem socioambiental. A necessidade de agregar valor e de aumentar as opções de aproveitamento destes

materiais, que na maioria dos casos são usados como ração animal ou adubo, representa a subutilização desses recursos passíveis de bioconversão em compostos de elevado valor agregado, como, por exemplo, biocombustíveis, enzimas, antibióticos, polissacarídeos, ácidos orgânicos e alditóis, o que tem estimulado o interesse no desenvolvimento de processos biotecnológicos.

A conversão de resíduos agroindustriais por via biotecnológica incrementa o avanço tecno-científico de países em desenvolvimento, por serem grandes produtores de commodities agrícolas, e modestos fabricantes de produtos industrializados. Vale destacar que nos últimos trinta anos as publicações científicas que registram o aproveitamento desses resíduos são provenientes de grupos de pesquisa regionais, como, por exemplo, grupos asiáticos e norte-americanos que trabalham com restos de plantio ou do processamento de arroz e de milho, respectivamente; grupos europeus que trabalham com madeira; e grupos latinos que trabalham com bagaço de cana-de-açúcar.

Nesse campo, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de abacaxi, com uma área plantada em cerca de setenta mil hectares, situada principalmente nos Estados da Paraíba, Minas-Gerais e Pará, sendo boa parte da produção destinada ao processamento de suco, gerando em média 50% do peso total da matéria-prima em resíduos sólidos, que equivale a cerca de um milhão de toneladas de bagaço seco por ano, comumente usados como ração animal ou descartados sem tratamento.

Para fazer uso dos açúcares monoméricos (xilose, arabinose, manose) da fração hemicelulósica em processos biotecnológicos, separa-se esse heteropolímero da celulose, usando hidrólise com ácido diluído, uma vez que suas cadeias não formam estruturas cristalinas, sendo, portanto, mais suscetível à hidrólise química sob condições brandas de temperatura, tempo de reação e concentração de ácido, formando hidrolisados hemicelulósicos com teor alto de xilose para bioconversão a diversos produtos.

Dentre tais produtos, o xilitol é um alditol de elevado poder adoçante, cariostático, bastante usado em alimentos, bebidas e em fármacos. Sua obtenção por via biotecnológica a partir de hidrolisados hemicelulósicos, proveniente de resíduos agroindustriais, representa uma forma de agregar

valor a esses resíduos, além de uma alternativa de baixo custo, em relação à sua produção por via química, uma vez que seu custo de produção é cerca de dez vezes maior que o de obtenção de sacarose ou de sorbitol, devido às operações de purificação do hidrolisado na etapa inicial do processo e à separação do catalisador na fase de acabamento.

Com base nas informações precedentes foram propostos como objetivos principais deste trabalho:

- a) analisar os efeitos dos fatores temperatura, tempo de reação e concentração de ácido sobre a hidrólise ácida diluído de bagaço de abacaxi;
- b) obter hidrolisado hemicelulósico com alto teor de açúcares fermentescíveis e baixo de compostos tóxicos; e
- c) testar o hidrolisado como substrato para produção de xilitol por fermentação em batelada com *Debaryomyces hansenii* UFV-170.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biomassa vegetal

As plantas usam a energia solar, CO₂ e água para formar seus carboidratos estruturais e amido, por meio da equação química $n\text{CO}_2 + n\text{H}_2\text{O} \xrightarrow{h\nu} (\text{CH}_2\text{O})_n + n\text{O}_2$ (ZHANG, 2008).

A biomassa vegetal é constituída por uma mistura quimicamente entrelaçada, por meio de ligações químicas fracas (pontes de hidrogênio e forças de van der Waals) e fortes (covalentes) entre os polímeros de celulose (C₆H₁₀O₅)_p, hemicelulose (C₅H₈O₄)_q, lignina e pectina, dependendo da espécie de planta, do clima, solo e do cultivo (SJÖSTROM, 1993).

A celulose é um homopolímero de moléculas de glicose com ligações covalentes β (1 → 4), formando cadeias com alto grau de polimerização (DP > 1.000), entrelaçadas por ligações fracas (pontes de hidrogênio), constituindo as fibras elementares com alta cristalinidade (SJÖSTROM, 1993).

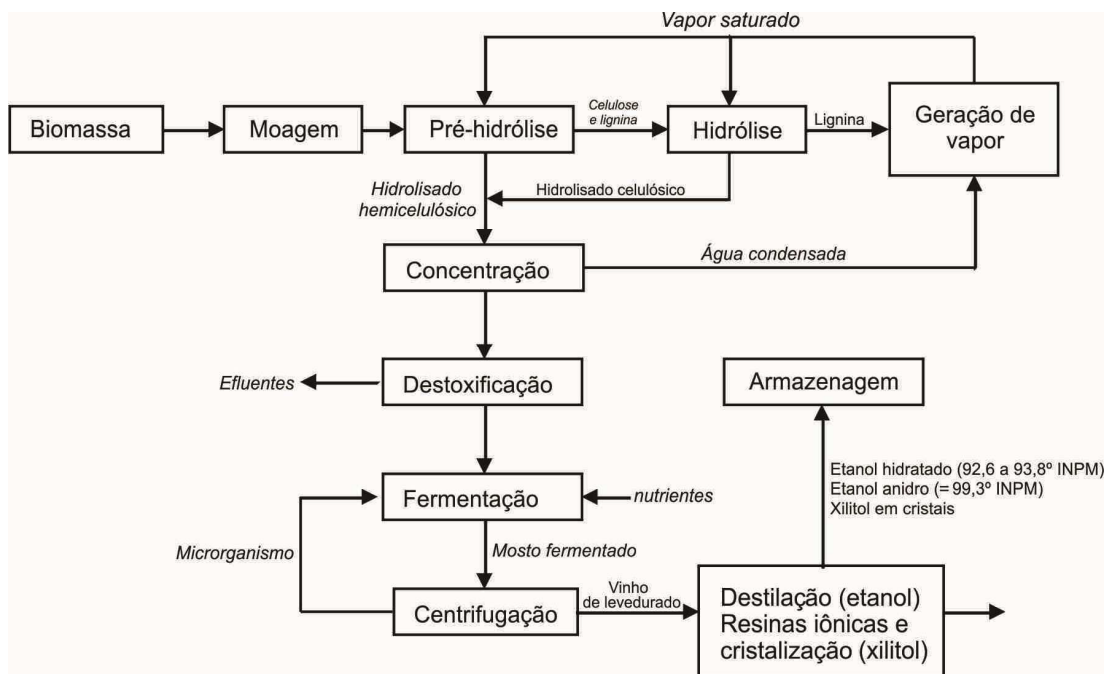
A hemicelulose é um heteropolímero ramificado formado por longas cadeias de xilanas; funciona como material de cimentação entre as fibras de celulose e a lignina. As moléculas de xilose são unidas por ligações covalentes β (1 → 4) com alta densidade de grupos substituintes laterais (resíduos de hexoses, ácidos urônicos e arabinose) (SJÖSTROM, 1993).

A lignina é um polímero aromático, formado por álcoois aromáticos (*trans-p*-coumaril, álcool *trans-p*-coniferil e álcool *trans-p*-sinapil) derivados do ácido *p*-cinnâmico, que age como um selo de proteção da biomassa ao ataque de microrganismos e oferece resistência às intempéries do ambiente (SJÖSTROM, 1993).

O uso dos principais açúcares monoméricos (glicose, xilose e arabinose) da biomassa (vegetação nativa, madeira, sobras de florestas, restos de plantios, resíduos sólidos agroindustriais) como substrato de processos fermentativos só é possível pelo pré-tratamento, que reduz ou elimina os interferentes (lignina e a cristalinidade da celulose) à sacarificação da hemicelulose e da celulose por hidrólise (GÍRIO *et al.*, 2010).

2.2. Obtenção de etanol e xilitol por fermentação de hidrolisados de biomassa vegetal

A Figura 1 apresenta o fluxograma com as etapas de aproveitamento de biomassa vegetal em bioprocessos.



Fonte: adaptado de OLSSON; HAHN-HÄGERDAL (1996).

Figura1 – Fluxograma de obtenção de etanol e, ou, xilitol por fermentação de hidrolisados de biomassa vegetal.

2.2.1. Qualidade e abundância da biomassa vegetal

A atratividade da biomassa vegetal como matéria-prima na produção de biocombustíveis e de derivados químicos deve-se ao seu custo mínimo ou irrisório, porque é oriunda de restos de plantios ou de colheitas, de vegetação nativa ou de resíduos agroindustriais, amplamente distribuída e abundante em todo globo terrestre, não concorrendo por terras férteis destinadas à produção de alimentos ou de ração animal (HAHN-HÄGERDAL *et al.*, 2006).

A abundância e qualidade de uma determinada biomassa com alto teor de celulose, teores baixos de lignina e cinza, além de umidade compatível com o método de pré-hidrólise ou hidrólise adotado na sacarificação, são características desejáveis para ela ser usada como matéria-prima para produção de hidrolisados com teor de açúcares elevado, que servirão de substratos em processos fermentativos (SUN; CHENG, 2002).

A concentração alta de lignina em biomassas vegetais é inconveniente, uma vez que, ao ser tratada, libera diversos compostos fenólicos tóxicos aos microrganismos da fermentação e reduz a eficiência de hidrólise enzimática, adsorvendo nas enzimas, reduzindo ou inativando de forma irreversível sua atividade (BELKACEMI *et al.*, 1998).

Biomassa com teores de cinza e de umidade altos desgasta os equipamentos e reduz a eficiência de hidrólise nos processos que usam ácido diluído, ou oneram os custos de recuperação do ácido concentrado, por diluí-lo. A hidrólise com ácido diluído pode usar biomassa com até 50% de umidade, como, por exemplo, bagaço e palha de cana-de-açúcar e restos de colheita de milho. Para os que adotam a hidrólise com ácido concentrado, o teor de umidade máxima deve ser de 5%, sendo necessária uma secagem prévia desses materiais na própria indústria (SUN; CHENG, 2002).

Kim e Dale (2004) estimaram a produção de etanol dos restos de plantio (palhas e talos) e resíduos gerados do beneficiamento agroindustrial das principais culturas (milho, cevada, aveia, arroz, trigo, sorgo e cana-de-açúcar) cultivadas nos sete continentes (Tabela 1).

Tabela 1 – Produção de restos de colheita e de resíduos agroindustriais (10^6 t) e os respectivos volumes de etanol (10^6 m³) potencialmente produzidos por bioconversão nos sete continentes

Continente	África	Ásia	Europa	América Norte	América Central	Oceania	América Sul	Subtotal
<i>Restos de colheita</i>								
Milho	3,12	9,82	1,57	0,30	1,74	0,01	4,13	20,70
Cevada	0,17	1,23	2,01	0,01	0,01	0,19	0,04	3,66
Aveia	0,004	0,06	0,43	0,01	0,001	0,001	0,05	0,55
Arroz	1,08	21,86	0,02	0,96	0,08	0,02	1,41	25,44
Trigo	0,83	10,28	4,09	0,02	0,24	0,82	0,91	17,20
Sorgo	2,27	0,54	0,004	0,00	0,13	0,001	0,18	3,12
Cana	0,46	1,64	0,00	0,00	0,36	0,00	0,74	3,20
Subtotal	7,94	45,43	8,13	1,30	2,56	1,05	7,45	73,86
Etanol (10^6 m ³)	5,33	30,10	5,45	0,87	1,70	0,70	4,95	49,10
<i>Resíduo Agroindustrial</i>								
Fibra de Milho	0,00	33,90	28,61	133,66	0,00	0,24	7,20	203,62
Palha de cevada	0,00	1,97	44,24	9,85	0,16	1,93	0,29	58,45
Palha de aveia	0,00	0,27	6,83	2,80	0,03	0,47	0,21	10,62
Palha de arroz	20,93	667,59	3,92	10,95	2,77	1,68	23,51	731,34
Palha de sorgo	5,34	145,20	132,59	50,05	2,79	8,57	9,80	354,35
Palha de trigo	0,00	0,00	0,35	6,97	1,16	0,32	1,52	10,32
Bagaço de cana	11,73	74,88	0,01	4,62	19,23	6,49	63,77	180,73
Subtotal	38,00	923,82	216,56	218,90	26,14	19,70	106,30	1.549,42
Etanol (10^6 m ³)	10,8	261,0	63,8	63,2	7,42	5,70	30,2	442,00
Total Etanol	16,1	291,1	69,2	64,0	9,12	6,39	35,1	491,10

Fonte: Kim e Dale (2004).

Entre todos os resíduos apresentados na Tabela 1, o de arroz foi a matéria-prima mais viável, seguido dos resíduos de trigo, milho e bagaço de cana-de-açúcar. Essas quatro matérias-primas podem produzir 418 milhões de metros cúbicos de etanol por ano. Sendo o continente asiático a região mais propícia por sua maior disponibilidade de biomassa, ela fica com uma produção estimada de 291 milhões de metros cúbicos. Kim e Dale (2004) destacam também que os resíduos do beneficiamento agroindustrial possuem um maior potencial de uso que a biomassa do campo, por sua pronta disponibilidade e custo irrisório ou zero, uma vez que são considerados como dejetos.

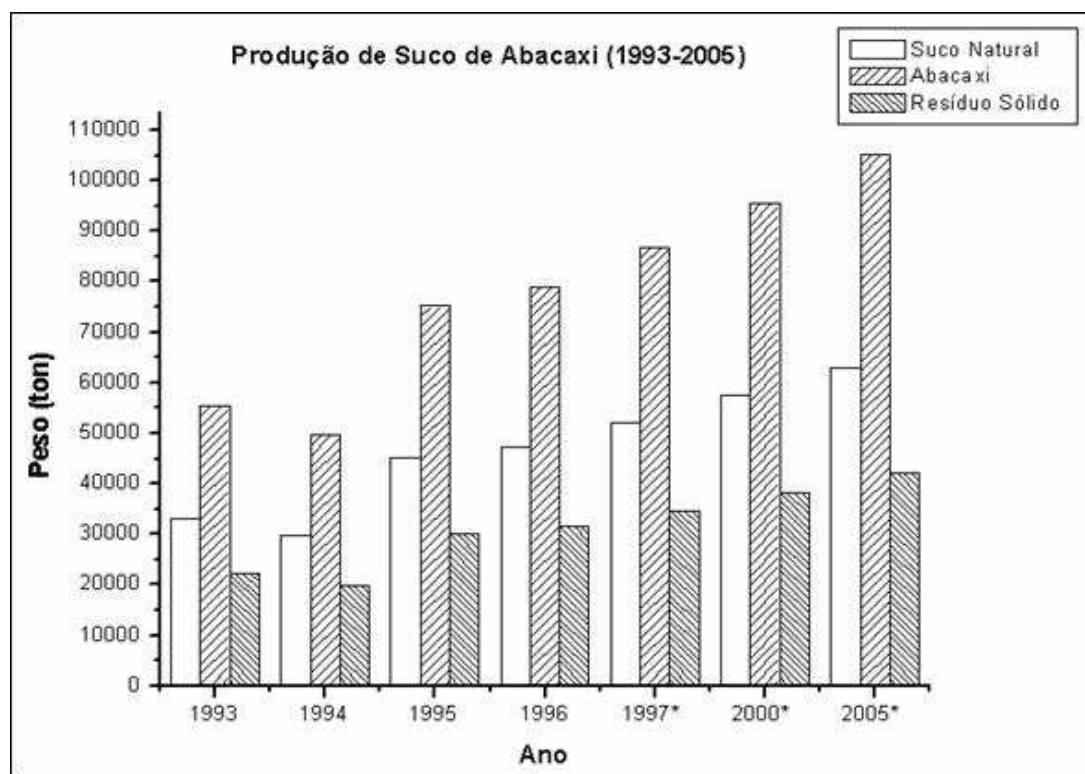
O bagaço de cana-de-açúcar, por sua abundância e fácil disponibilidade nos pátios das usinas e destilarias de álcool do Brasil, se torna uma possível matéria-prima para produção de etanol. O uso do excedente da queima de bagaço incrementaria a produção de etanol nessas unidades fabris, passando de uma produção atual média de etanol de 6.000 L ha⁻¹ para 8.200 L ha⁻¹. Considerando apenas a conversão de 50% do excedente da queima de bagaço e o uso dos restos de colheita (palhada), a produção seria de 9.700 a 10.000 L ha⁻¹, proporcionando uma redução de 30% na área plantada (SOCCOL *et al.*, 2010).

2.2.2. Resíduo do processamento de abacaxi

Com uma área plantada de 68.495 hectares e uma produção média de 25.538 frutos ha⁻¹, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de abacaxi, ficando atrás da Tailândia e Filipinas. Em torno de 97% da produção nacional da fruta é consumida fresca, o restante é destinado à produção de sucos, xaropes, compotas, doces em calda e cristalizados, e em casos isolados para vinificação, vinagre e aguardente, resultando em uma geração 30 a 40% de resíduos sólidos (talos, casca e coroa) em relação ao peso da fruta (GIACOMELLI; PY, 1981; MORETTI; HINOJOSA, 1982; RUGGIERO, 1982; LIMA, 1998; MANICA, 1999).

Segundo dados de produção de sucos disponíveis no site TODA FRUTA (2007), a demanda por suco de abacaxi é crescente no mercado interno e no externo, por ser uma excelente fonte de vitaminas e ter sabor

diferenciado, estimulado também pelas mudanças de hábitos alimentares da população brasileira por alimentos mais saudáveis. Arelado ao aumento da industrialização da matéria-prima crescem também os resíduos gerados, conforme mostra a Figura 2.



Fonte: Toda Fruta (2007).

Figura 2 – Produção estimada de suco de abacaxi e geração de resíduos.

O bagaço de abacaxi, resíduo sólido proveniente do beneficiamento industrial da fruta, é rico em sacarose e outros açúcares fermentescíveis, com aspecto visual tipo farelo (Figura 3). Quando esgotado por prensagem é chamado de “torta”, apresenta baixa umidade, sendo rico em material ligno-celulósico com alta fração de hemicelulose (40%), lignina (5%) e celulose (30%), além do baixo teor de cinzas (0,1%) (MANICA, 1999; LOUSADA JR. *et al.*, 2006).

No aproveitamento de resíduos do abacaxi, diversas alternativas são testadas em escala de bancada e, ou, piloto, como, por exemplo, a produção de ácido cítrico, etanol e vinagre por fermentação, obtenção de bromelina por extração. No entanto, poucas alternativas são efetivas, tendo como



Fonte: Manica (1999).

Figura 3 – Bagaço de abacaxi da produção de suco.

destino mais nobre o arraçãoamento de animais (BEN-GERA; KRAMER, 1969; CARVALHO; ABREU; GONÇALVES, 1998).

Resíduos lignocelulósicos com alto teor de hemicelulose, depois de hidrolisados por via química e, ou, enzimática, podem ser usados como substrato de processos fermentativos para produção de xilitol, etanol, biomassa, ácido láctico e 2,3-butanediol (SAHA, 2003).

2.2.3. Moagem

A moagem tem por objetivo aumentar a área de superfície específica, a densidade, facilitar o manejo e melhorar as taxas de transferências de massa e calor entre a biomassa e a solução catalítica (ácido ou enzima). Uma combinação de operações unitárias como trituração, moagem e peneiramento é usada para reduzir o tamanho das partículas e a cristalinidade da celulose, aumentando a eficiência das outras etapas do pré-tratamento (SUN; SHENG, 2002).

2.2.4. Pré-hidrólise ou hidrólise ácido diluída da biomassa

Essa operação consiste em eliminar ou reduzir os efeitos de proteção da hemicelulose e lignina à celulose, além de diminuir sua cristalinidade.

A parcial ou completa solubilização dos açúcares que compõem o heteropolímero hemicelulose e a desestruturação da lignina são catalisadas por ácidos minerais (H_2SO_4 ou HCl) e calor em reatores, operando em batelada ou contínuo. A pré-hidrólise com H_2SO_4 na concentração de 1 a 10% (m/m) e temperaturas de 120 a 160 °C é um dos métodos mais usados, por resultar em rendimentos altos de solubilização de xilose, atingindo até 90%. No entanto, apresenta como desvantagens a formação de diversos compostos tóxicos, necessidade de lavagem dos sólidos remanescentes do processo para eliminar o excesso de ácidos e compostos de lignina, que reduzem a atividade das enzimas sacarolíticas na hidrólise enzimática (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

2.2.5. Hidrólise

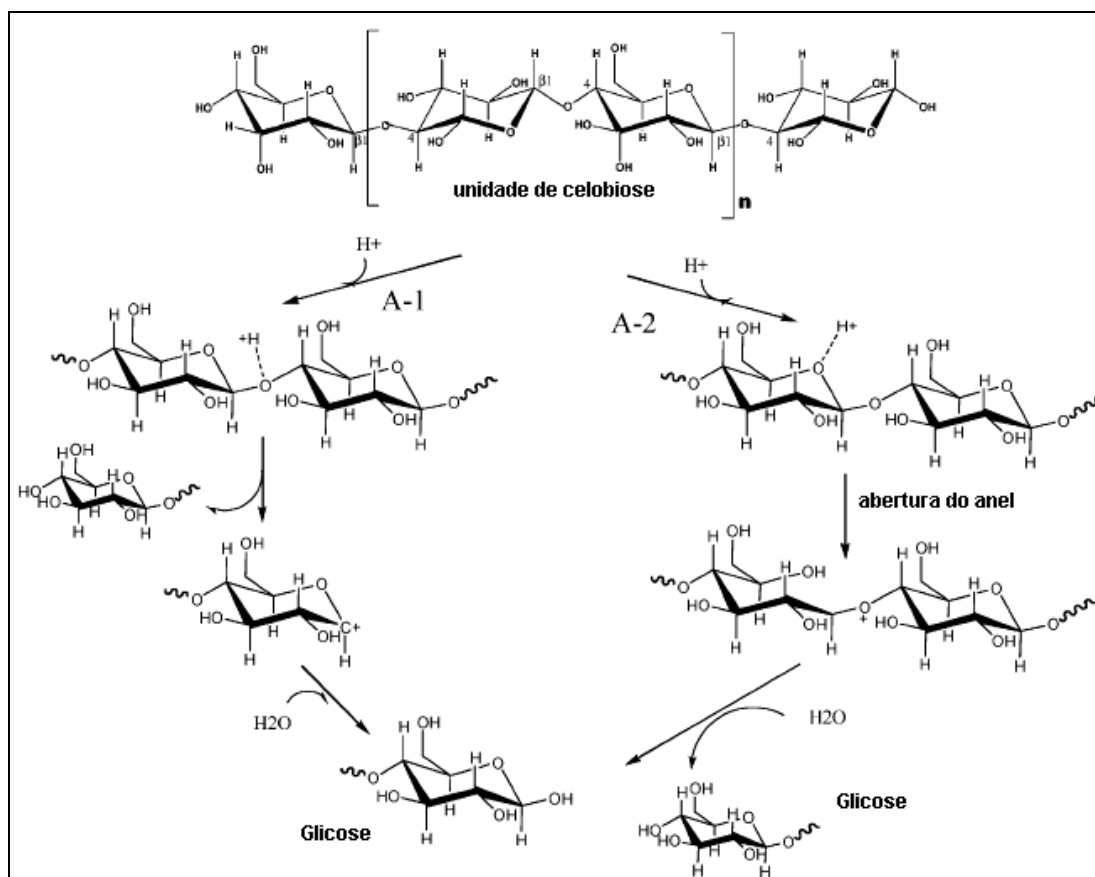
Consiste em decompor a celulose em suas unidades monoméricas (glicose), com o acréscimo de uma molécula de água, catalisada por reagente químico (ácido diluído ou concentrado) ou por enzimas.

A hidrólise ácida da celulose pode ser realizada com uma solução de ácido diluído nas mesmas concentrações da pré-hidrólise (1 a 3% m/m), com temperatura entre 160 a 220 °C e tempo de residência de 3 a 10 minutos. Quando se usa H_2SO_4 concentrado (40 a 50% m/m), a temperatura é mantida a 100 °C por 50 minutos (SUN; CHENG, 2002).

A Figura 4 mostra duas propostas de mecanismos químicos de hidrólise ácida da celulose, válidas também para a hidrólise das cadeias de xilanas da hemicelulose. Na primeira proposta (A1), o próton H^+ aproxima-se do oxigênio da ligação glicosídica β (1 $\rightarrow$ 4), forma um composto intermediário instável que se rompe, liberando o próton e dois resíduos de glicose, um carbocátion (C1, deficiente em elétrons) e um nucleófilo. Em seguida, o nucleófilo remove um H^+ de uma molécula de H_2O e a hidroxila residual (OH^-) se liga ao carbocátion, produzindo duas moléculas de glicose (HUBER; IBORRA; CORMA, 2006).

A segunda proposta (A2) considera que o H^+ se aproxima do heteroátomo oxigênio no radical glicosídico que forma com o C1 a ligação β (1 $\rightarrow$ 4), ocorrendo uma polarização de cargas no oxigênio, com a

remoção do par de elétrons da ligação (-O-C1-) e a abertura do anel β - glucopiranosose, formando um intermediário instável, que sofrerá ataque nucleófilo da H_2O , liberando a glicose (HUBER; IBORRA; CORMA, 2006).



Fonte: HUBER, IBORRA; CORMA (2006).

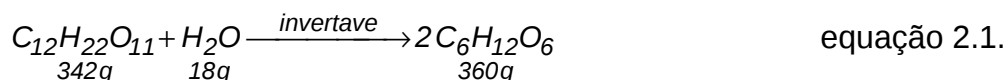
Figura 4 – Mecanismo de hidrólise ácida da celulose.

Na hidrólise enzimática as condições de operação são mais brandas, a reação ocorre em meio tamponado com pH de 4,5 a 5,0, temperatura entre 40 a 50 °C por até 196 horas. Para obtenção de um rendimento alto de sacarificação é preciso que a celulose tenha uma baixa cristalinidade e que a concentração de compostos fenólicos seja mínima. Logo, quanto mais eficientes as operações de moagem e pré-hidrólise, maior será o rendimento do processo. Ou seja, mais glicose será despolimerizada por massa inicial de celulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2007).

2.2.6. Cálculo de rendimento na sacarificação de biomassa vegetal

O cálculo do rendimento consiste em determinar o quanto se pode obter de um determinado produto a partir de certa massa ou quantidade de matéria de reagente inicial, considerando ou não a formação de produtos secundários. Quando o cálculo do rendimento é feito considerando a estequiometria de uma única reação química com o consumo de todo reagente limitante, o rendimento é tido como teórico (ROCHA-FILHO; SILVA, 2006).

A determinação do rendimento em açúcares na hidrólise de biomassa vegetal é análoga ao cálculo do rendimento na hidrólise da sacarose, catalisada pela enzima invertase nas células de leveduras da fermentação alcoólica de mostos de sacarose, obedecendo a uma reação química com uma relação molar estequiométrica entre reagentes e produtos, conforme apresenta a equação 2.1,



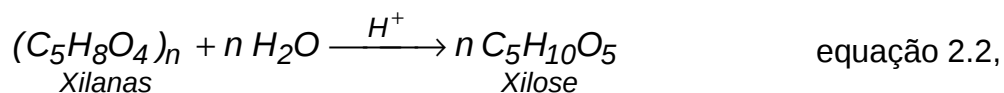
O rendimento teórico ou ideal de hidrólise da sacarose é

$$\mathfrak{R} = \frac{360 \text{ g hexoses}}{342 \text{ g sacarose}} = 1,0526 \text{ g hexoses/g sacarose}.$$

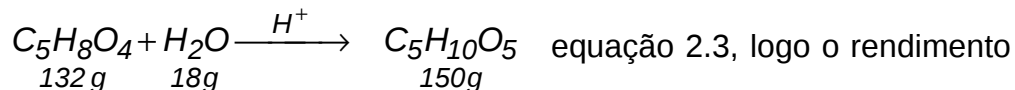
Ou seja, 1,0526 g de hexoses (frutose e glicose) são formadas na hidrólise de 1 g de sacarose (LOPES; BORGES, 2009).

Na sacarificação dos carboidratos hemicelulose e celulose que compõem a parede celular da biomassa vegetal não é diferente, apenas as condições de hidrólise são mais severas e o catalisador pode ser um ácido ou uma mistura de enzimas.

A equação química equação 2.2, representa a hidrólise ácida das cadeias de xilanas que compõem o heteropolímero hemicelulose.



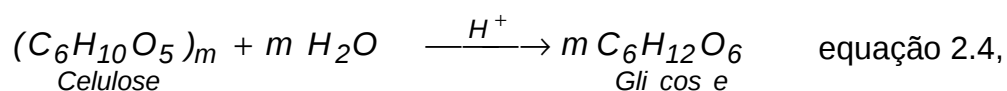
fazendo $n = 1$, tem-se



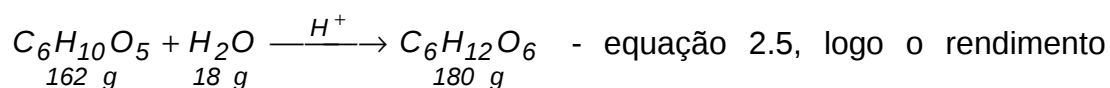
$$\text{teórico é } \mathfrak{R} = \frac{150\text{ g xilose}}{132\text{ g xilanas}} = 1,1364\text{ g xilose/g xilanas.}$$

Então, 1,1364 g de xilose são produzidos na hidrólise de 1 g de xilanas do heteropolímero hemicelulose (GOLDSTEIN, 1975).

Na hidrólise da celulose, a equação química Equação 2.4, representa a sua sacarificação ácida:



fazendo $m = 1$,



$$\text{teórico é de } \mathfrak{R} = \frac{180\text{ g glicose}}{162\text{ g celulose}} = 1,1111\text{ g glicose/g celulose.}$$

Então, para cada 1 g de celulose hidrolisada produz 1,1111 g de glicose (GOLDSTEIN, 1975).

Na operação prática de hidrólise é impossível obter quantidades estequiométricas, porque ocorre formação de produtos secundários da degradação dos açúcares solubilizados (furfural e hidroximetilfurfural), além de liberação de ácidos alifáticos (acético e fórmico), metanol, acetonas que estão ligados à cadeia principal do polímero na forma de grupos substituintes, como é o caso da hemicelulose (SLUITER *et al.*, 2006).

Portanto, o cálculo de rendimento de açúcares solubilizados deve ser realizado considerando a concentração do açúcar solúvel no hidrolisado, dividido pela sua maior concentração, quando é feita a caracterização da composição química do material, conforme a equação 2.6 (SLUITER *et al.*, 2006).

$$\therefore \mathfrak{R} = \frac{[açúcar](g\ L^{-1})}{[açúcar]_0(g\ L^{-1})} \times 100 \quad \text{equação 2.6,}$$

em que

[açúcar] é a concentração de açúcar (glicose, xilose) existente no hidrolisado expresso em g L⁻¹; e

[açúcar]₀ é a concentração de açúcar(glicose, xilose) determinado na caracterização da biomassa expresso em g L⁻¹.

De acordo com Lynd (1990), é possível estimar os teores de açúcares totais na hidrólise de biomassa vegetal pela equação 2.7, expressão matemática que relaciona os rendimentos teóricos de sacarificação das frações hemicelulósica (150/132) e celulósica (180/162) multiplicada pelas respectivas concentrações desses polímeros no material, em termos de massa seca (% ou g/100 g MS).

$$\therefore \mathfrak{R} = \left(\frac{180}{162}\right) \times [celulose] + \left(\frac{150}{132}\right) \times [hemicelulose] \quad \text{equação 2.7}$$

em que

[celulose] e [hemicelulose] são as concentrações dos respectivos polímeros que compõem a biomassa.

2.2.7. Concentração do hidrolisado

Esta etapa tem por objetivo aumentar o teor dos açúcares e remover alguns compostos tóxicos (ácido acético e furfural) existentes no hidrolisado, pela evaporação da água por aquecimento a vácuo da solução.

A operação de evaporação é realizada numa faixa de temperatura entre 40 a 80 °C, resultando numa melhor fermentação de meios de hidrolisados de biomassa vegetal (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998b; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a; RODRIGUES *et al.*, 2003).

O inconveniente dessa operação unitária é o alto consumo energético necessário para aumentar a concentração de açúcares no hidrolisado em cerca de quatro a cinco vezes a concentração inicial (ZACCHI; AXELSSON,

1989; MURTHY *et al.*, 2005).

2.2.8. Destoxificação do hidrolisado

A destoxificação tem por objetivo remover compostos tóxicos existentes em hidrolisados obtidos por hidrólise com ácidos minerais (H_2SO_4 ou HCl). Os compostos tóxicos furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico e compostos da degradação de lignina, ácido p-hidroxibenzóico e vanilina agem sobre os microrganismos da fermentação, inibindo o crescimento e a formação de etanol ou xilitol (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b; KLINKE; THOMSEN; AHRING, 2004).

Vários métodos de destoxificação são usados na remoção de compostos tóxicos de hidrolisados de biomassa vegetal, como, por exemplo, tratamento biológico com enzima (lacase) ou com fungo (*Trichoderma reesei*), tratamento físico, evaporação e extração, tratamento químico com agentes alcalinizantes (NaOH , CaO , $\text{Ca}(\text{OH})_2$) e tratamento físico-químico por adsorção com carvão ativado e resinas de troca de íons (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

O método de destoxificação por tratamento químico com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ou CaO , que consiste em adicionar álcali ao hidrolisado bruto, aumentando seu pH acima de 10, em condições controladas de temperatura e tempo de reação, é conhecido por *overliming* (alcalinização). No final do processo o pH da mistura é ajustado ao valor de cultivo do microrganismo com H_2SO_4 e o precipitado formado é removido por filtração ou centrifugação. As vantagens desse método são: baixo custo, remoção parcial de ácido acético e compostos fenólicos, precipitação de íons metálicos tóxicos de Fe, Ni, Cr, e conversão de furfural a compostos menos tóxicos (ácido furfurílico), metabolizável pelo microrganismo da fermentação. Como desvantagens estão as perdas de açúcares do hidrolisado causadas por conversão a compostos tóxicos (ácido láctico), por arraste na precipitação do sal e problemas de incrustações dos sais de cálcio formados nos equipamentos de separação, fermentação e purificação (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998b; MARTINEZ *et al.*, 2001; MOHAGHEGHI; RUTH; SHELL, 2006).

A destoxificação por adsorção com carvão ativado é bastante usada por tratamento simples ou combinada com alcalinização. O carvão ativado é acrescentado ao hidrolisado e mantido sob agitação por determinado tempo e temperatura. A operação pode ser também realizada em colunas, em que o carvão forma o leito fixo e o hidrolisado a fase móvel, que é forçada a percolar o adsorvente, havendo a remoção de ácido acético, compostos fenólicos derivados de lignina, furanos (furfural e HMF) e clarificação. A principal desvantagem desse método é o limitado reuso do carvão, uma vez que sua capacidade de adsorção se esgota de forma irreversível em poucos ciclos de operação (CHOU, 2000; MUSSATO; ROBERTO, 2004).

2.2.9. Operações unitárias alternativas à evaporação e destoxificação

As operações de evaporação e destoxificação do hidrolisado, usadas para aumentar os teores de açúcares e descontaminação, são as que mais oneram os custos de obtenção de hidrolisados de biomassa vegetal. Essas operações demandam um consumo alto de energia e de água, além de gerar efluentes indesejáveis que poderiam ser recuperados como co-produtos de valor agregado, reduzindo os custos de produção.

A introdução de sistemas de membranas filtrantes é uma alternativa em substituição à operação de evaporação convencional, na concentração de hidrolisados, porque apresenta um baixo custo de investimento; oferece uma área grande de separação, por unidade de volume (m^2/m^3); é de fácil expansão; necessita de pouco espaço físico; apresenta baixo consumo energético; e possibilita o reuso de água (SCHLESINGER *et al.*, 2006; SJÖMAM *et al.*, 2006; 2007; NABARLATZ *et al.*, 2007; JEVONS; AWE 2010; MADAENI; ZERESHKI, 2010).

Na destoxificação, evitar-se-ia a geração de efluentes, como, por exemplo, a formação de gesso no tratamento por alcalinização; proporcionaria o fracionamento e posterior purificação dos compostos tóxicos, resultando em coprodutos, como, por exemplo, os compostos fenólicos, furaldeídos e ácidos alifáticos permeados seriam separados, purificados e comercializados ou empregados com fins diversos em outras linhas de produção da própria indústria (HANA *et al.*, 2006; WICKRAMASINGHE; GRZENIA, 2008;

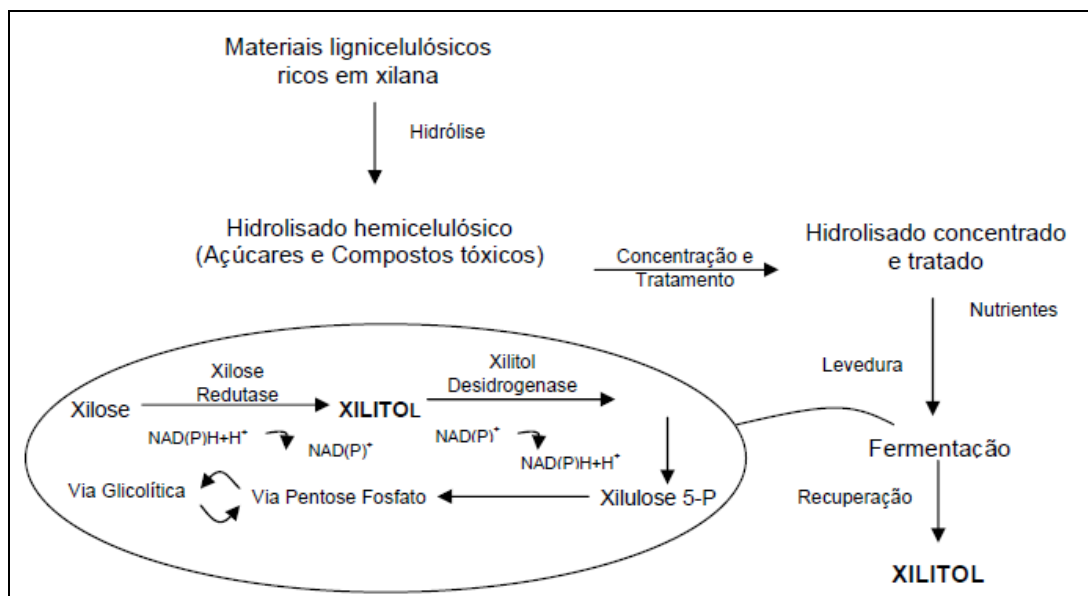
RESTOLHO *et al.*, 2009; WENG *et al.*, 2009; 2010; GRZENIA; SCHELL; WICKRAMSINGHE, 2010).

2.2.10. Fermentação de hidrolisados de biomassa vegetal

O hidrolisado de biomassa vegetal é uma mistura de vários monossacarídeos (hexoses e pentoses) e diversos compostos inibidores. As hexoses são prontamente fermentescíveis por *Saccharomyces cerevisiae*; as pentoses, como, por exemplo, a xilose, são de difícil assimilação por essas espécies de leveduras, por falta da enzima xilose isomerase (E.C. 5.3.15), que converte a xilose em xilulose (VAN MARIS *et al.*, 2006).

De acordo com Hahn-Hägerdal *et al.* (1994) e Felipe (2004), o metabolismo de xilose, por leveduras (*Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus*), consiste inicialmente no transporte da xilose através da membrana celular, em seguida a xilose é reduzida a xilitol, reação catalisada pela enzima xilose redutase (aldose redutase EC 1.1.1.21), que usa como cofatores NADPH/NADH. O xilitol formado é parcialmente excretado da célula ou oxidado a xilulose pela enzima xilitol desidrogenase (EC 1.1.1.9) dependente da NAD/NADP, que é substrato da enzima xilulose-quinase, formando xilulose-5-fosfato, podendo ser catabolizado pelas vias fosfopentose, Embden-Meyerhof-Parnas ou fosfocetolase, resultando em outros produtos, como, por exemplo, dióxido de carbono, ácido acético e polissacarídeos (Figura 5).

Diversas pesquisas quanto ao metabolismo de xilose em leveduras e fungos mostram que a conversão a D-xilulose é feita em duas etapas, pelas enzimas xilose redutase (EC 1.1.1.21) e pela xilitol desidrogenase (EC 1.1.1.9), enquanto em bactérias a mesma conversão é feita em apenas uma etapa, catalisada pela enzima xilose isomerase (EC 5.3.1.5), embora, a enzimas xilose isomerase tenha sido detectada nas leveduras *Rhodotorula* e *Candida boidinii* 2201 (PRAKASHAM; SREENIVAS; HOBBS, 2009).



Fonte: Silva *et al.* (2004).

Figura 5 – Metabolismo de xilose existente em hidrolisados hemicelulósicos por leveduras, resultando em xilitol.

Leveduras silvestres, como, por exemplo, *Candida guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii*, *Pachysolen tannophilus*, apresentam satisfatória conversão dos hidrolisados a etanol e xilitol. Um rendimento médio de 0,28 a 0,48 g g⁻¹ e uma produtividade (0,02 a 0,66 g L⁻¹ h⁻¹) fazem delas as espécies mais estudadas, embora o rendimento em etanol seja inferior ao teórico, uma vez que produzem xilitol e reassimilam o etanol, como é o caso da *Pachysolen tannophilus* (LEE *et al.*, 1986; PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998b).

Algumas espécies de bactérias silvestres apresentam alto rendimento em etanol, como, por exemplo, a *Clostridium thermohydrosulfuricum*, que não apresenta diauxia no consumo de glicose e xilose, além de satisfatório rendimento em etanol por grama de xilose metabolizada (0,39 gg⁻¹) (PATEL *et al.*, 1988).

Modificações genéticas em bactérias é uma ferramenta viável por proporcionar aumentos de rendimento (0,44 a 0,57 g g⁻¹ xilose) e produtividade (0,18 a 0,96 g L⁻¹ h⁻¹) em etanol na fermentação de hidrolisados de biomassa (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

A *Zymomonas mobilis* é um bom exemplo da aplicação dessa técnica, por proporcionar altos rendimento e produtividade em etanol, porém suas

fontes de carbono são resumidas a glicose, frutose e sacarose. Modificações genéticas nesta bactéria, pela introdução de dois operons de assimilação de xilose (xilose isomerase e xiluloquinase) e enzimas da via fosfopentose (transaldolase e transcetolase), resultaram em expressivo aumento de produtividade ($0,57 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) e rendimento de $0,44 \text{ g g}^{-1}$ em etanol (ZHANG *et al.*, 1995).

O uso de bactérias modificadas é restrito à escala de laboratório. Os fatores que limitam sua adoção em escala industrial são as condições de pouca assepsia em que é conduzido o processo fermentativo, fazendo-as alvo fácil de bacteriófagos e por sua baixa tolerância a teores alcoólicos elevados (VAN MARIS *et al.*, 2006).

A fermentação de meios de hidrolisados de biomassa vegetal pode ser conduzida em batelada, batelada-alimentada ou contínua. A escolha mais adequada dependerá das propriedades cinéticas do agente fermentativo sobre o substrato e da viabilidade econômica do produto que se deseja obter (OLSSON; HAHN-HÄGERDA, 1996).

No projeto de uma unidade de fermentação alcoólica usando hidrolisado de biomassa vegetal como substrato, a concentração de compostos inibidores deve ser adotada como parâmetro de projeto, além da concentração, rendimento e produtividade específica em etanol, considerados de regra. A existência de compostos tóxicos no substrato provoca fermentações incompletas e prolongadas. Para superar esse ponto crítico, o aumento da densidade celular, pela implementação de um sistema de retenção ou de recirculação de células é uma ação eficaz (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

O sistema de fermentação alcoólica de hidrolisados de biomassa vegetal em batelada apresenta uma baixa viabilidade celular. O uso de uma concentração alta de inóculo é uma alternativa para superar a toxidez do meio (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

A adoção de sistema de fermentação alcoólica operando em modo batelada alimentada é uma estratégia para reduzir os efeitos dos compostos inibidores dos mostos de hidrolisados de biomassa. A alimentação do fermentador em fluxo baixo reduz os teores de compostos tóxicos do meio, proporcionando o consumo ou a conversão dos inibidores em produtos

menos tóxicos, como, por exemplo, o metabolismo do furfural e hidroximetil-furfural (HMF) a alcoóis, por *Saccharomyces cerevisiae* (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

A fermentação contínua de hidrolisados é mais vulnerável a contaminações que a de substratos convencionais, porque o meio em fermentação tem um menor teor alcoólico e necessita de pH mais próximo da neutralidade para haver uma boa conversão dos açúcares fermentescíveis, quando bactérias recombinantes, leveduras que fermentam pentoses, são os agentes fermentativos, ou a própria *Saccharomyces cerevisiae* em combinação com a enzima xilose isomerase (OLSSON; HAHN-HÄGERDAL, 1996).

Segundo Prakasham *et al.* (2009), o processo de produção de xilitol por bioconversão em escala de laboratório é comumente feito em modo à batelada, em frascos agitados ou em reatores tipo tanque agitado, usando células livres ou imobilizadas meios à base de xilose ou de hidrolisados hemicelulósicos, resultando em valores de produtividade variando entre 0,55 a 0,78 g L⁻¹ h⁻¹. A adoção desse processo em escala industrial é considerada antieconômica, por exigir uma alta demanda de mão de obra para assepsia dos equipamentos e preparo do inóculo, além de resultar numa baixa produtividade volumétrica.

O uso de cultura contínua fornece melhor produtividade e rendimento, embora a velocidade de produção de xilitol diminua com o aumento da taxa de diluição (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

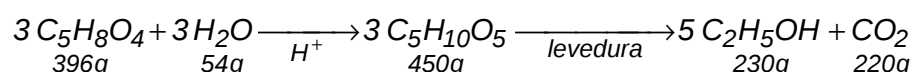
O processo em batelada alimentada, por trabalhar com uma densidade celular alta e vazão de alimentação de substrato em níveis baixos, proporciona ganhos maiores de produtividade volumétrica em xilitol e reduz os efeitos de inibição de compostos tóxicos sobre a levedura (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

A toxidez dos hidrolisados hemicelulósicos pode ser superada usando, além dos métodos convencionais de destoxificação, o aumento da densidade celular no meio de cultivo, que resulta em maiores rendimento e produtividade volumétrica em produto. Parajó; Dominguez e Dominguez (1996) verificaram que, aumentando em cerca de três vezes o teor de inóculo (*Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426) na fermentação de

hidrolisado hemicelulósico de eucalipto tratado com carvão ativado, a produtividade volumétrica aumentou em cerca de dez vezes e o rendimento em xilitol em 1,3 vez. No entanto, Roberto, Sato e Mancilha (1996) verificaram que um aumento de 3,6 vezes na concentração de inóculo (0,67 para 2,41 g L⁻¹) na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz reduziu a produtividade volumétrica de 0,55 para 0,32 g L⁻¹ h⁻¹ e o rendimento em xilitol, de 0,71 para 0,47 g g⁻¹. Sreenath e Jeffries (1987) constataram que na fermentação alcoólica em batelada com reciclo de células (*Candida shehatae* ATCC 22984) de meios semidefinidos com xilose, o aumento da concentração celular em dez vezes (0,72 para 7,6 g L⁻¹) resultou num aumento de 2,5 vezes (0,28 para 0,69 g L⁻¹ h⁻¹) na produtividade volumétrica.

2.2.11. Rendimento da fermentação de hidrolisados a etanol e xilitol

Os cálculos de rendimento de produção de etanol na fermentação da xilose a etanol não obedecem à equação química de Gay-Lussac. A equação química estequiométrica, equação 2.8, representa o processo global de hidrólise de polímeros de pentose e a fermentação alcoólica da xilose.



equação 2.8, logo o rendimento é de

$$\therefore \mathfrak{R} = \frac{230 \text{ g etanol}}{450 \text{ g xilose}} = 0,511 \text{ g etanol/g xilose}.$$

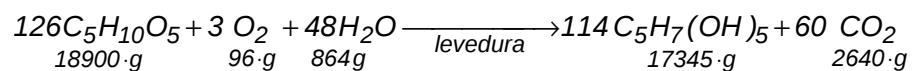
Então, 1 g de xilose fermentada rende 0,511 g de etanol (DEMIRBAS 2005; ZHANG et al., 1995).

Na determinação do rendimento em termos de massa inicial de matéria-prima usada, considera-se a equação 2.8, então

$$\therefore \mathfrak{R} = \frac{230 \text{ g etanol}}{396 \text{ g xilanas}} = 0,581 \text{ g etanol / g xilanas}.$$

Logo, cada 1 g de polímeros de xilose (xilanas) hidrolisada e fermentada resulta em 0,581 g de etanol.

No cálculo de rendimento da bioconversão de xilose a xilitol, Barbosa *et al.* (1988) consideraram as condições microaerobiose e anaerobiose de cultivo da levedura para obtenção do poliol. Portanto, em condições de microaerobiose a equação química equação 2.9, a seguir, representa esse fenômeno.

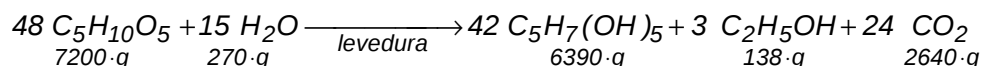


equação 2.9, logo o rendimento de xilitol em termos de xilose fermentada é de:

$$\therefore \Re = \frac{17.345 \text{ g xilitol}}{18.900 \text{ g xilose}} = 0,917 \text{ g xilitol/g xilose} \equiv 0,905 \text{ mol xilitol / mol xilose}$$

Então, cada 1 g de xilose fermentada resulta em 0,917 g de xilitol, em condições de microaerobiose.

Em condições de anaerobiose a Equação 2.10 representa a transformação de xilose a xilitol.



equação 2.10, logo o rendimento de xilitol em termos de xilose fermentada é de:

$$\therefore \Re = \frac{6.390 \text{ g xilitol}}{7.200 \text{ g xilose}} = 0,888 \text{ g xilitol/g xilose} \equiv 0,875 \text{ mol xilitol / mol xilose}$$

Então, cada 1 g de xilose fermentada resulta em 0,888 g de xilitol, em condições de anaerobiose.

2.3 Xilitol: propriedades e usos

O xilitol foi descoberto no início de 1890 pelos químicos Emil Herman Fisher (alemão, 1852-1919) e M. G. Bertrand (francês, 1867-1962), na forma de xarope, a partir da reação da xilose existente em cavacos de madeira

com amálgama sódica (liga Hg-Na). Esta descoberta contribuiu para Fisherser ser premiado com o Nobel de química em 1902 (MÄKINEN, 2000).

O xilitol pode ser encontrado em várias frutas, vegetais, cereais e cogumelos, em quantidades inferiores a 900 mg/10 g, o que torna sua extração inviável. É formado no metabolismo humano de 5 a 15 g por dia, como um composto intermediário do ciclo do ácido urônico para produção de ácido glucurônico (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998a).

As propriedades físico-químicas do xilitol (Tabela 2) tornam propício seu uso na indústria de alimentos, por ter uma alta estabilidade química e microbiológica mesmo em baixas concentrações, sendo usado como conservante e adoçante na formulação de alimentos infantis, em produtos de panificação e na fabricação de chocolates (PEPPER; OLINGER, 1988).

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do xilitol

Propriedades	Valor
Fórmula empírica	$C_5H_7(OH)_5$
Massa molar	152,15 g/mol
Aparência	Pó cristalino
Cor	Branca
Odor	Nenhum
Ponto de fusão	92 a 96 °C
Ponto de ebulição	216 °C
pH	5 a 7 (solução aquosa a 10%)
Densidade	1,03 g/mL (solução aquosa a 10%)
Solubilidade	63 g/100 g de água a 20 °C
Viscosidade	1,23 cP a 20 °C (solução aquosa a 10%)
Calor de solução	+ 34,8 cal/g
Valor calórico	2,4 kcal/g
Poder adoçante	Igual ao da sacarose, superior ao do manitol e sorbitol
Índice de refração	1,3471 (solução aquosa a 10%)
Estabilidade térmica	Estável a 120 °C (não carameliza)

Fonte: Mussato e Roberto (2002).

Diversas pesquisas com animais e humanos demonstram que o xilitol, além de poder ser usado como um ingrediente alimentar possui várias aplicações clínicas.

A anticariogênica do xilitol se deve por ser um açúcar fermentescível pelas bactérias da flora bucal, reduzindo o crescimento de *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus*; por estimular a formação da saliva (sem aumentar a produção de ácidos na placa dentária), estabilizando os íons cálcio e fosfato e, consequentemente remineralizando os dentes, além de estabilizar as cáries já formadas; e controlar o pH da placa e a capacidade tamponante da saliva, após o consumo de sacarose (MUSSATO; ROBERTO, 2002).

Em pessoas portadoras de *Diabetes mellitus* tipo I ou tipo II, o xilitol por ser consumido sem causar transtornos comumente detectados no metabolismo dos açúcares convencionais (sacarose, glicose e frutose), que são a hiperglicemia, distúrbios no metabolismo de lipídeos e sintomas como sede e fome exageradas. Porque seu metabolismo no organismo humano, indiferente de onde seja absorvido (intestinos ou fígado), independe da insulina (PEPPER; OLINGER, 1988).

O uso de xilitol na alimentação parental de pacientes em estados pós-traumático ou pós-operatório é possível por ser inerte aos aminoácidos da mistura nutritiva, facilitando a produção de infusões e devido aos tecidos poderem consumir o xilitol (YLIKAHRI, 1979).

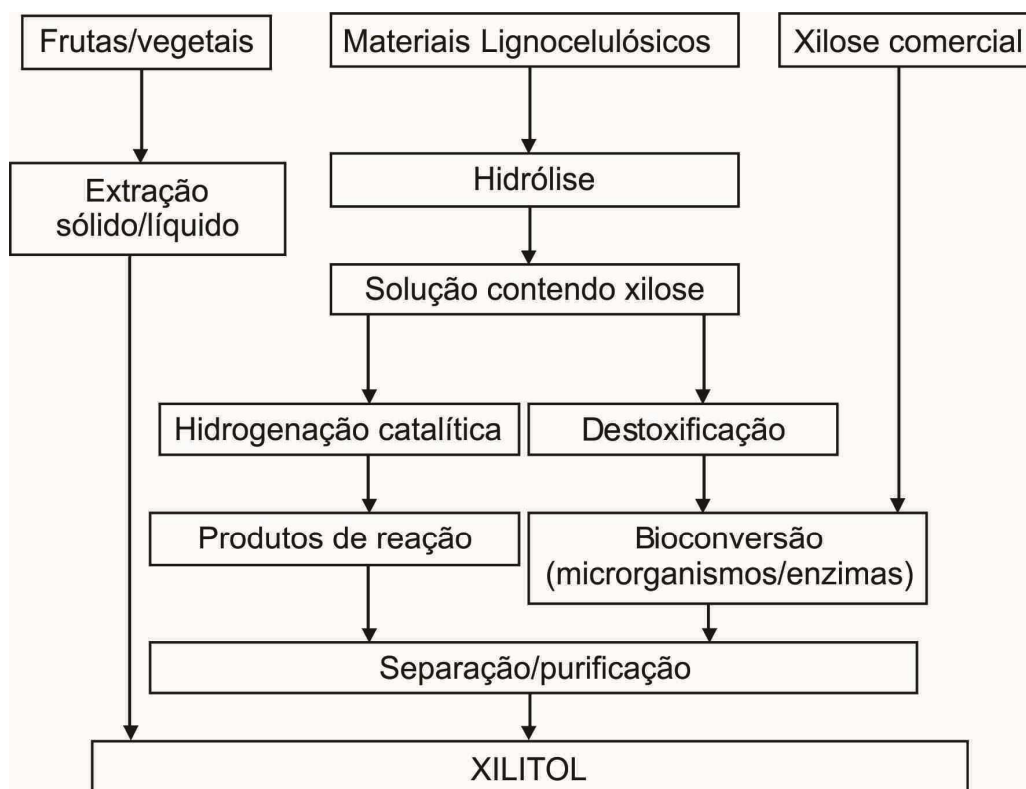
A administração diária de dosagens contendo de 8,4 g a 10,0 g de xilitol na forma de xarope a crianças foi eficaz na prevenção de otite média aguda (infecção aguda do ouvido médio) por inibir o crescimento e a adesão de espécies de *Pneumococcus* e de *Haemophilus influenzae* em células da nasofaringe (UHARI; TAPIAINEN; KONTIOKAR, 2000).

De acordo com Mattila *et al.* (1999) o xilitol é eficaz no combate à osteoporose, uma vez que estimula a absorção de cálcio pelo intestino, facilitando sua passagem do sangue para os ossos, além de preservar os minerais neles existentes, evitando o enfraquecimento de suas propriedades biomecânicas.

2.3.1. Vias de obtenção de xilitol

A Figura 6 resume as tecnologias disponíveis para obtenção de xilitol. A produção por via química é usada em escala industrial pela redução

(hidrogenação) de xilose existente em hidrolisados hemicelulósicos de madeira ou materiais lignocelulósicos agrícolas (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998a).



Fonte: Parajó; Dominguez e Dominguez (1998a).

Figura 6 – Tecnologias para produção de xilitol.

O custo de produção do xilitol por via química é cerca de 10 vezes maior que o da sacarose ou sorbitol. A purificação da xilose é a etapa crítica do processo, uma vez que o hidrolisado é submetido a uma série de operações de purificação com resinas de troca de íons, para remover impurezas indesejáveis, principalmente as ligninas, que envenenam a catálise e paralisam a hidrogenação (JAFPE; SZKRYBALO; WEINERT, 1974). No entanto, o mercado é atrativo, com um crescimento anual de 2 a 3% (GRANSTRÖM; IZUMIRI; LEISOLA, 2007b).

Cerca de 1,4 milhão de toneladas de polióis foi comercializado no ano 2000/2001, equivalendo a um faturamento da ordem de 1,3 bilhão de dólares, sendo o xilitol a segunda maior parcela (12%) desse mercado, perdendo apenas para o sorbitol com 48%. Estima-se que a produção

mundial por ano de xilitol esteja compreendida entre 20.000 a 40.000 de toneladas, com um valor de mercado estimado em 40 a 80 milhões de libras (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998a; GRANSTRÖM; IZUMIRI; LEISOLA, 2007a; BUSINESS COMMUNICATIONS, 2008).

Como um processo alternativo ao convencional, o xilitol pode ser obtido por via biotecnológica, através de microrganismos, a partir da fermentação de soluções de hidrolisados lignocelulósicos agrícolas (bagaço de cana-de-açúcar, palhas e cascas de trigo, arroz e sobras de eucalipto) com alto teor de xilose, sem a necessidade de purificação prévia do substrato (GRANSTRÖM; IZUMIRI; LEISOLA, 2007a).

As principais vantagens da via biotecnológica é a alta especificidade dos microrganismos na conversão da xilose a xilitol, sendo desnecessária a purificação do hidrolisado, proporcionando maiores rendimentos de produto, facilidade de purificação e, conseqüentemente, menor custo de produção. No entanto, esse processo é limitado pela capacidade do microrganismo em sintetizar algumas enzimas-chave para ocorrer a transformação.

A enzima xilose redutase (XR – aldolase redutase, EC 1.1.1.21) executa a redução da xilose a xilitol, tendo como cofator NADPH ou NADH. Uma alta atividade dessa proteína ou baixa atividade da enzima xilitol desidrogenase (XHD – EC 1.1.1.9) é usada como critério na seleção de microrganismos bons produtores de xilitol. Alguns gêneros de leveduras são considerados os melhores produtores (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998a; SAHA, 2003; GRANSTRÖM; IZUMIRI; LEISOLA, 2007a, b).

3. MATERIAL E MÉTODOS

A presente investigação foi realizada no Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa e contou com a colaboração da infraestrutura dos seguintes laboratórios: Laboratório de Processamento de Frutas e Vegetais: IFAL, *campus* Satuba, AL; Laboratório de Conversão de Biomassa Vegetal, Modelagem Matemática e Simulação: Departamento de Biotecnologia, EEL-USP; Laboratório de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos: Departamento de Biotecnologia, EEL-USP; Laboratório de Engenharia Bioquímica e Processos Fermentativos: Departamento de Tecnologia de Alimentos, UFV; e Laboratório de Fisiologia de Microrganismos (BIOAGRO): Departamento de Microbiologia, UFV.

O trabalho foi dividido em três etapas. A primeira constou de obtenção, preparo e caracterização físico-química do bagaço de abacaxi. A segunda constou da obtenção e concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi. A terceira envolveu a destoxificação e avaliação do hidrolisado como matéria-prima para produção de xilitol por fermentação, empregando como agente fermentativo levedura produtora de xilitol.

A Figura 7 mostra um diagrama com as atividades experimentais ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

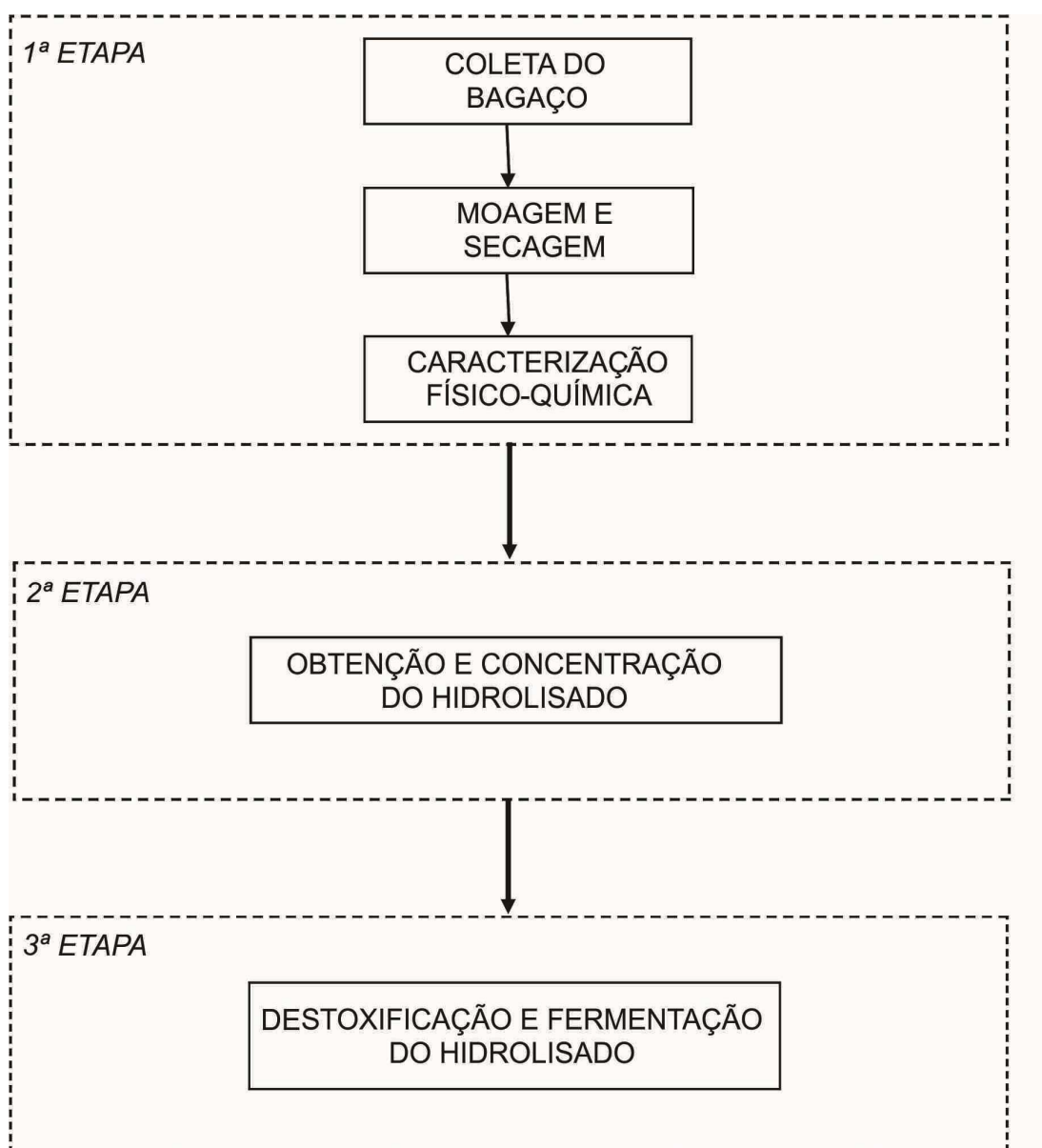


Figura 7 – Fluxograma das principais etapas experimentais da presente pesquisa.

3.1. Obtenção, preparo e caracterização físico-química do bagaço de abacaxi

O bagaço de abacaxi foi obtido do processo não tradicional de produção de suco. As frutas, depois de removidas a coroa, foram submetidas a uma lavagem com água clorada e em seguida trituradas em moinho de faca ou de martelos e prensado. A polpa prensada junto com as coroas forma o bagaço de abacaxi.

O bagaço de abacaxi usado no presente trabalho foi fornecido pela agroindústria de sucos e polpa de frutas MULTI-FRUTAS, situada no município de Anadia, zona da mata do Estado de Alagoas.

O bagaço foi coletado logo após o processamento da fruta, transportado até o setor de beneficiamento de frutas e vegetais do IFAL campus Satuba-AL, e picado em picador Nogueira modelo DPM 4, sem peneira e seco ao sol (Figura 8). Em seguida foi acondicionado em sacos plásticos de 25 kg e transportado até o Departamento de Biotecnologia/EEL-USP, na cidade de Lorena, São Paulo, onde foi armazenado a 5 °C em câmara de resfriamento, até o uso.

A caracterização físico-química do bagaço de abacaxi foi feita de acordo com os métodos descritos no item 3.5.



Figura 8 – Etapas de preparo do bagaço de abacaxi.

3.2. Hidrólise do bagaço de abacaxi

A hidrólise foi conduzida em condições brandas, usando H_2SO_4 diluído, para maximizar a despolimerização da fração hemicelulósica do bagaço de abacaxi e minimizar a formação de compostos inibidores.

3.2.1. Determinação dos parâmetros de hidrólise ácido diluído do bagaço de abacaxi

Inicialmente foram feitos diversos ensaios de hidrólise para seleção dos fatores temperatura ($^{\circ}\text{C}$), tempo de reação (minutos) e concentração de H_2SO_4 [% (m/m)] em reator de bancada, seguindo planejamento experimental completo tipo esférico, mostrado na Tabela 3. Com esses ensaios foram obtidas relações empíricas quantitativas das influências dos fatores sobre as respostas do rendimento em xilose, em ácido acético, em furfural, em fenóis e seletividade ([xilose]/[glicose]), determinadas conforme descrito em análise de resultados, item 3.6.1.

Os dados foram ajustados a equações polinomiais de segunda ordem, pela análise de regressão, e usados os testes t e F na avaliação dos efeitos e na qualidade do ajuste. A equação polinomial adotada como padrão é descrita pela equação 3.1:

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \left(\sum_{i=1}^3 \beta_i x_i \right)^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=2}^3 \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad \text{equação 3.1,}$$

em que $\hat{y}$ = resposta estimada; x_i = fatores codificados; β_0 = constante; β_i = coeficientes lineares; β_{ij} = coeficientes de interação; β_{ii} = coeficientes quadráticos; e ε = erro

As relações empíricas das respostas estatisticamente significativas foram otimizadas pela superposição de suas curvas de contorno, resultando nos valores ótimos dos fatores que serviram de parâmetros operacionais básicos para o reator-piloto de 100 litros de capacidade.

Os ensaios de hidrólise seguindo o planejamento experimental da Tabela 3 foram feitos em quatro reatores cilíndricos de aço inoxidável de volume de 200 mL, com tampas rosqueáveis, aquecimentos por banho de

Tabela 3 – Matriz de planejamento experimental ($2^3 + 1$) esférico da hidrólise ácido diluído da fração hemicelulósica de bagaço de abacaxi realizada em reator de bancada

Tratamento	Fatores*					
	X ₁	X ₂	X ₃	A	B	C
1	-1	-1	-1	120	20	2,0
2	1	-1	-1	160	20	2,0
3	-1	1	-1	120	40	2,0
4	1	1	-1	160	40	2,0
5	-1	-1	1	120	20	4,0
6	1	-1	1	160	20	4,0
7	-1	1	1	120	40	4,0
8	1	1	1	160	40	4,0
9	$-(3)^{1/2}$	0	0	105	30	3,0
10	$(3)^{1/2}$	0	0	175	30	3,0
11	0	$-(3)^{1/2}$	0	140	13	3,0
12	0	$(3)^{1/2}$	0	140	47	3,0
13	0	0	$-(3)^{1/2}$	140	30	1,3
14	0	0	$(3)^{1/2}$	140	30	4,7
15	0	0	0	140	30	3,0
16	0	0	0	140	30	3,0
17	0	0	0	140	30	3,0

*X₁ = valor codificado da temperatura [A (°C)]: X₁ = (A - 140)/20; X₂ = valor codificado do tempo [B (minutos)]: X₂ = (B - 30)/10; e X₃ = valor codificado da concentração de H₂SO₄ [C (% m/m)]: X₃ = (C - 3,0)/1,0.

óleo vegetal, por meio de resistência elétrica, com controle externo de temperatura (CANETTIERI *et al.*, 2007b). Os reatores foram carregados com bagaço de abacaxi e solução ácida, e a relação de sólido para líquido (S/L) adotada foi de 1/10. Durante os ensaios, os reatores foram carregados com 15,0000 g de bagaço seco moído em moinho tipo Wiley, com peneira de 1 mm, vertidos 100 mL de água destilada aquecida a 80 °C, homogeneizado; em seguida foi adicionada solução de H₂SO₄, preparada com o restante da água e H₂SO₄ seguindo cada tratamento (Tabela 3), para avolumar 150 mL e colocados no banho de óleo previamente aquecido na temperatura de hidrólise. Vencido o tempo de reação, os reatores foram retirados do banho de óleo, imersos em banho de água contendo gelo para resfriamento rápido, abertos e a mistura separada em sistema de filtração a vácuo, usando como meio filtrante tela de aço inoxidável. A fração líquida foi usada para as determinações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, HMF, furfural e

compostos fenólicos, conforme descrito em “Análises físico-químicas”, itens 3.5.5 e 3.5.6.

3.2.2. Obtenção, concentração e caracterização físico-química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi (HHBA)

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi foi obtido em reator-piloto (100 L), conforme mostra a Figura 9. Sua operação seguiu o fluxograma mostrado na Figura 10, que consistiu em carregar o reator com 45 L de água e 5,0 kg de massa seca de bagaço de abacaxi e aquecer a mistura a 80 °C sob agitação; em seguida acrescentou-se 4,5 L de solução de H₂SO₄ fechado e aquecido sob temperatura e tempo, conforme foi definido no item 3.2.1. Vencido o tempo de reação, o reator foi descarregado a quente, e o hidrolisado filtrado em tela plástica, numa temperatura próxima a 60 °C, para facilitar a filtração e assegurar a esterilidade do material. O hidrolisado filtrado foi recolhido em bombonas de 50 L e armazenado a 5 °C.

O hidrolisado foi caracterizado quanto aos teores de glicose, xilose e arabinose, furaldeídos ácido acético, fenóis, Brix, massa específica e pH, conforme “Análises físico-químicas”, item 3.5.

O hidrolisado foi concentrado quatro vezes em relação ao seu teor inicial de xilose, uma vez que concentrações de xilose em torno de 50 g L⁻¹, em hidrolisados hemicelulósicos favorecem a produção de xilitol (FELIPE, 2004).

O equipamento usado nessa operação foi um evaporador a vácuo de trinta litros de capacidade, operando à temperatura de 70 ± 5 °C (Figura 11).

A composição do hidrolisado concentrado foi determinada de acordo com “Análises físico-químicas”, item 3.5.

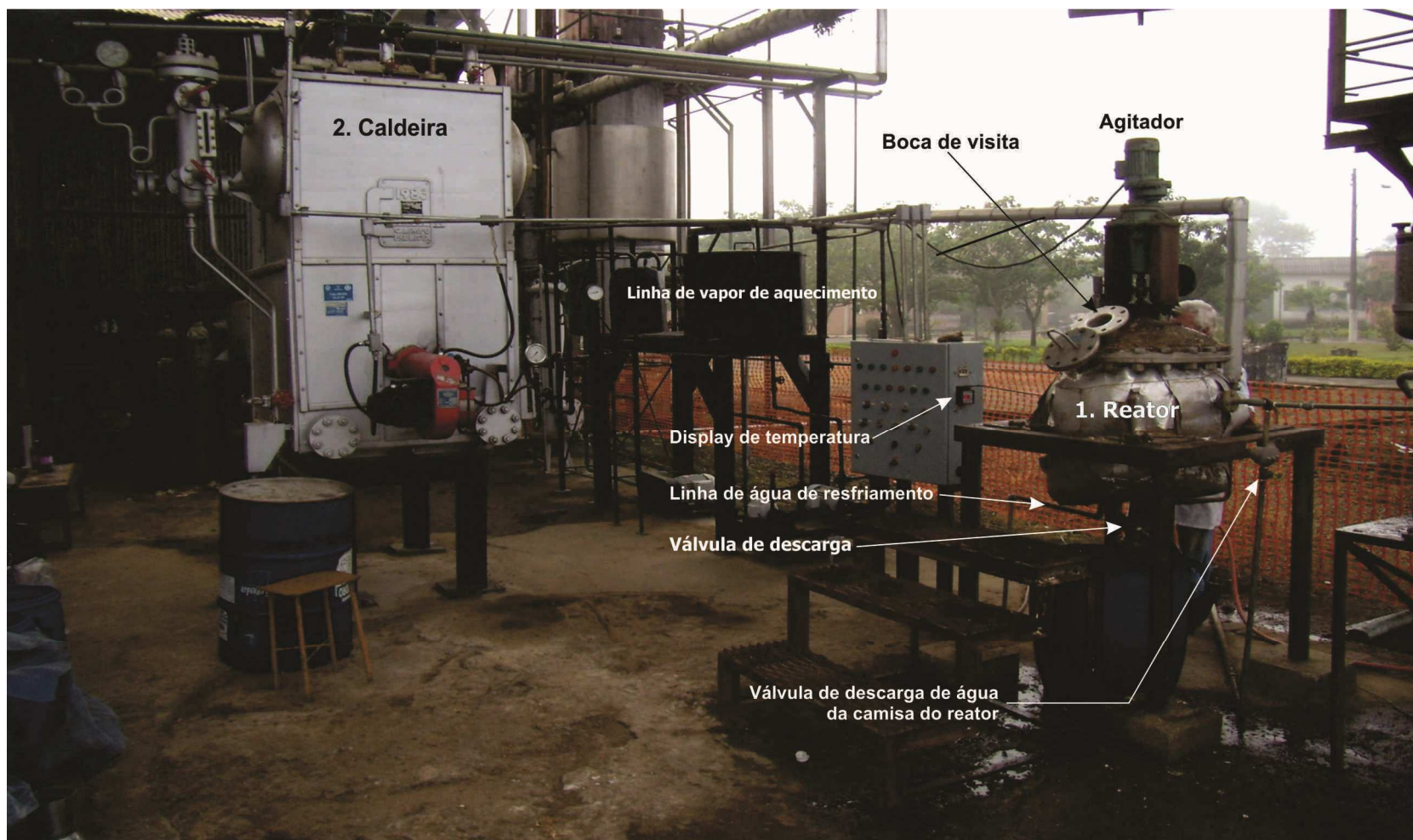


Figura 9 – Unidade de hidrólise ácida de biomassa (EEL/USP): 1. reator-piloto; e 2. caldeira de geração de vapor.



1. Medição de água para carga do reator



2. Carga do reator com água



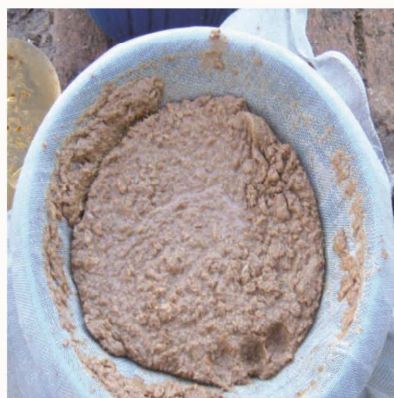
3. Adição de bagaço ao reator



4. agente catalisador H_2SO_4 .



8. Aspecto do bagaço antes e depois da hidrólise.



7. Filtração do hidrolisado em tela plástica



6. Descarga do reator



5. Reator carregado

Figura 10 – Fluxograma das operações do processo de hidrólise ácido diluído de bagaço de abacaxi em reator-piloto.

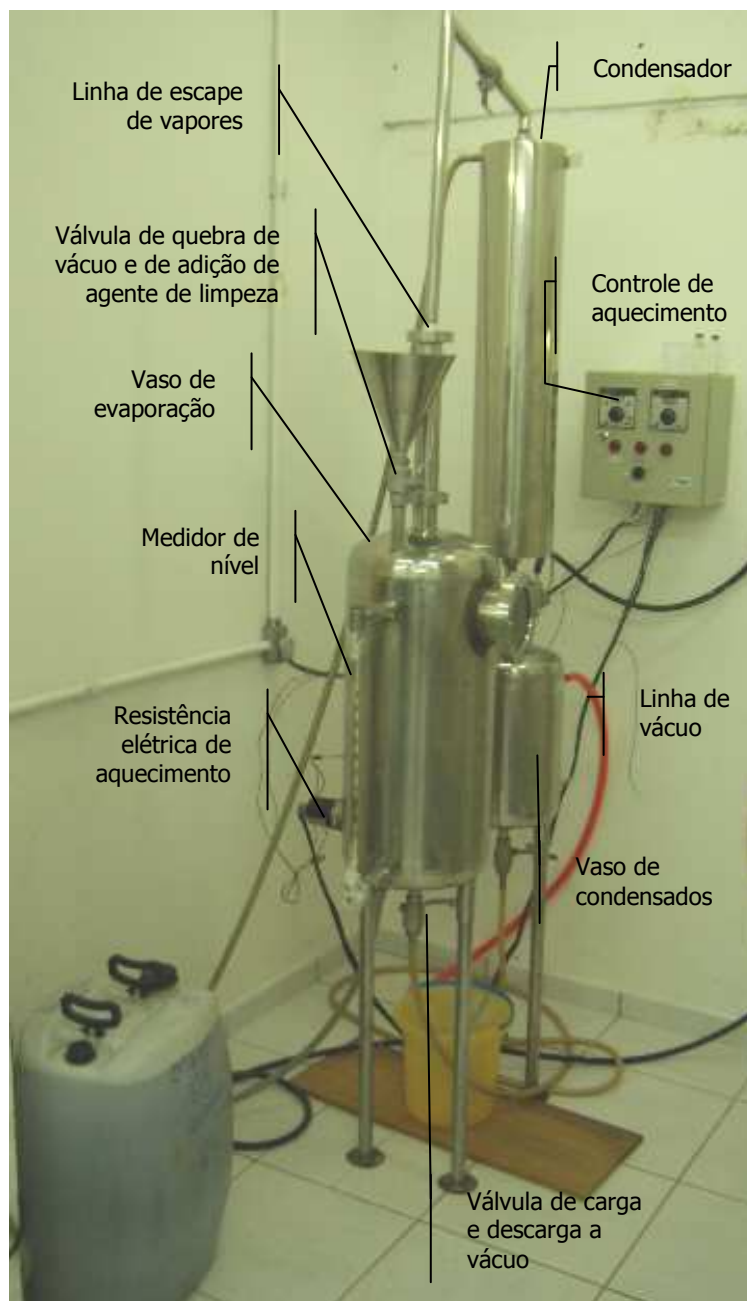


Figura 11 – Evaporador a vácuo de 30 L de capacidade (EEL/USP).

3.3. Determinação das condições de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado (HHBAC)

Uma triagem do agente alcalinizante foi feita pela titulação de amostras de hidrolisado concentrado com os álcalis CaO , Ca(OH)_2 ou cinza de madeira de eucalipto como agente alternativo. A seleção do alcalinizante foi baseada no menor consumo do álcali para se atingir um mesmo valor de pH e quanto ao grau de solubilidade à temperatura ambiente.

Em béqueres de 300 mL foram pesadas amostras de 100,0000g de hidrolisado e acrescentadas alíquotas dos álcalis sob constante agitação, previamente pesadas e os valores de pH monitorado com pHmêtro Hanna HI 9321. Os respectivos valores estabilizados de pH foram anotados a cada acréscimo da alíquota do álcali para posterior plote das curvas de titulação.

A cinza de eucalipto foi obtida no setor de geração de vapor da Usina de Beneficiamento de Leite situada no Campus da UFV. A coleta da cinza foi feita diretamente do cinzeiro da caldeira, resfriada a temperatura ambiente, peneirada em peneira de 60 meshes e acondicionada em saco de plástico, conforme mostra a Figura 12.



Figura 12 – Peneiramento e aspecto físico da cinza de eucalipto usada como agente alcalinizante alternativo.

3.3.1. Destoxificação por alcalinização

O tratamento de destoxificação do hidrolisado concentrado foi feito pelo método de alcalinização (caleação), elevando o pH das amostras a valores próximos ou acima da neutralidade, adicionando o álcali à amostra sob contínua homogeneização com agitador magnético por determinado período de tempo, conforme mostra a Figura 13. Vencido o tempo de reação, o pH das amostras foi corrigido para 5,5 ou 6,0 com H_3PO_4 concentrado, o precipitado removido por centrifugação (3.000 g por 20 min), filtrado a vácuo, e o refinado usado para análise de composição e testes de fermentação, conforme será descrito no item 3.3.4. Como testemunha (branco) da destoxificação e fermentação, foi usada uma amostra de hidrolisado com o pH ajustado para 6,0 com CaO .



1. Tratamento com CaO



2. Tratamento com cinza

Figura 13 – Destoxificação de hidrolisado por alcalinização, pela da adição de CaO (1) ou cinza de madeira de eucalipto (2).

Os ensaios de destoxificação seguiram um planejamento experimental fatorial completo ($2^2 + 1$), tipo estrela, com três repetições do ponto central, que considera os fatores pH e tempo de reação (T_R). A Tabela 4 apresenta a matriz de planejamento da destoxificação.

Tabela 4 – Matriz de planejamento experimental completo ($2^2 + 1$), tipo estrela, com três repetições do ponto central da destoxificação por alcalinização de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado

Fator*	Ensaio										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
X_1	-1	1	-1	1	0	0	0	$-\alpha$	α	0	0
X_2	-1	-1	1	1	0	0	0	0	0	$-\alpha$	α

* x_1 = valor codificado do pH - $X_1 = (\text{pH} - 8,5)/1,5$; X_2 = valor codificado do tempo de reação (T_R) - $X_2 = (T_R - 60)/30$; $\alpha = (2)^{1/2}$.

Os valores das respostas concentração de açúcares (glicose, xilose, arabinose), fenóis e produtos de fermentação foram usados para construir equações empíricas, usando análise de regressão dos dados a uma equação polinomial de segunda ordem, para um nível de significância de 5% pelo teste t de Student, conforme descrita pela equação 3.2:

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \beta_2 \cdot x_2 + \beta_{12} \cdot x_1 x_2 + \beta_{11} \cdot x_1^2 + \beta_{22} \cdot x_2^2 + \varepsilon \quad \text{equação 3.2,}$$

em que $\hat{y}$ = valor da resposta estimada; x_1 e x_2 = valores dos fatores codificados; β_0 = constante; β_1 e β_2 = coeficientes lineares; β_{12} , β_{11} e β_{22} = coeficientes de interação de primeira e segunda ordem; e ε = erro

Usando a metodologia de superfície de resposta como ferramenta, foram obtidos os valores dos parâmetros pH e tempo de reação que maximizassem a remoção de compostos tóxicos (ácido acético, furaldeídos e fenóis) e produção de xilitol e minimizassem as perdas de açúcares.

3.3.2. Destoxificação por adsorção com carvão ativado

Estabelecidos os parâmetros ótimos da operação de destoxificação por alcalinização, foram feitos ensaios de adsorção com carvão ativado para reduzir os teores de fenóis. Amostras de 150 mL de hidrolisado tratadas por alcalinização nas condições estabelecidas no item 3.3.1 foram vertidas em frascos Erlenmeyer (300 mL), acrescentado carvão ativado nas concentrações de 2,0, 3,5 e 5,0% (m/v) e homogeneizadas durante uma hora em shaker (30 ou 60 °C e 200 rpm); em seguida, foram centrifugadas (3.000 g por 20 min), filtradas e verificados os teores de compostos fenólicos e de açúcares redutores (ART), conforme descrito em “Análises físico-químicas” item 3.5.6.

3.4. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi

3.4.1. Microrganismo, preparo do inóculo e condições de cultivo

Foi usada a levedura *Debaryomyces hansenii* UFV-170 isolada de ambiente de laticínios e selecionada por Sampaio (2001) como boa produtora de xilitol em meio sintético.

A curva padrão para monitoramento do crescimento celular e preparo do inóculo foi obtida por regressão linear entre a densidade ótica (DO) versus massa celular seca (g L^{-1}), conforme Neder (1992).

As células da levedura obtidas no Laboratório de Fisiologia de Microrganismo do Departamento de Microbiologia da UFV foram ativadas em meio semidefinido contendo: KH_2PO_4 6,8 g L⁻¹; K_2HPO_4 3,4 g L⁻¹; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,1 g L⁻¹; extrato de levedura 5 g L⁻¹ e glicose 20 g L⁻¹ (SAMPAIO *et al.*, 2008). No preparo do meio, as soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e glicose foram esterilizadas a 111 °C por 15 minutos, para evitar a formação de precipitado e, ou, de compostos tóxicos. As soluções formuladas com os sais restantes e a de extrato de levedura foram esterilizadas a 121 °C por 20 minutos. Para a manutenção da cultura estoque foi acrescentado ao meio completo 2% de ágar-ágar, vertidos 15 mL em placas de Petri, inoculada às células, e o material incubado em estufa a 30 °C por 24 horas. Essas culturas foram mantidas em geladeira e utilizadas ao longo do trabalho para preparo de inóculo.

O preparo do inóculo foi feito colhendo uma alçada de células das placas de cultura estoque, inoculando-as em frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio semidefinido, incubado em *shaker New Brunswick Scientific* (modelo G 76 D) a 30 °C, 200 rpm por 18 h. Vencido esse período, as células foram separadas por centrifugação a 4000g, a 5 °C por 5 minutos, ressuspensas em água destilada esterilizada e usadas como inóculo.

Meios complexos (YPX, YPD e YPXD) contendo extrato de levedura 5 g L⁻¹, peptona 5 g L⁻¹ e como fonte de carbono xilose 20 g L⁻¹, glicose 20 g L⁻¹ e mistura de glicose 5 g L⁻¹ e xilose 15 g L⁻¹ foram formulados para avaliar o perfil de crescimento de *Debaryomyces hansenii* UFV-170 nesses açúcares.

Ensaio de cultivo com meio semidefinido (KH_2PO_4 6,8 g L⁻¹; K_2HPO_4 3,4 g L⁻¹; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,1 g L⁻¹; extrato de levedura 5 g L⁻¹), contendo 20 e 50 g L⁻¹ de xilose foram conduzidos para avaliar capacidade de a levedura produzir xilitol em frascos agitados.

Os ensaios de fermentação foram desenvolvidos em frascos Erlenmeyer de 50 mL, ou de 125 mL, sendo mantida a mesma relação de volume ocupado para volume total de 0,4. Os ensaios foram feitos em duplicata, incubados em *shaker (Shaker New Brunswick Scientific)* a 30 °C, 200 rpm, durante 120 horas (Figura 14).



Figura 14 – Fermentação de HHBAC destoxificado, por *D. hansenii* UFV-170, em frascos Erlenmeyer incubados em *shaker* (30 °C, 200 rpm por 120 h).

Ensaio em fermentador foram feitos em biorreator B. BRAU BIOTECH, modelo BIOSTAT B, operando em batelada, com cuba de 1,5 L, provida com agitador, eletrodo de pH, sondas de oxigênio e de temperatura (Figura 15). Quatro ensaios foram executados, usando 1,0 L de hidrolisado cada, suplementado com nutrientes, pH inicial de 5,5 ou 6,0, inoculados com células de levedura num nível de inóculo definido no item 3.4.2 e taxa de aeração de $2,5 \text{ L min}^{-1}$ (2,5 vvm).

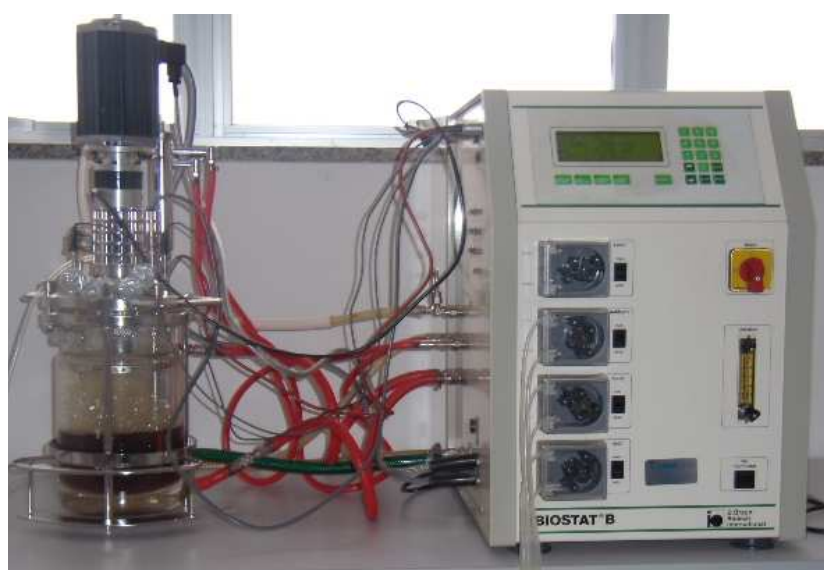


Figura 15 – Fermentação de HHBAC destoxificado, por *D. hansenii* UFV-170, em biorreator (pH 5,5 ou 6,0; 30 °C, 2,5 vvm e 200 rpm).

Os cultivos em meios à base de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado foram desenvolvidos depois de tratamento térmico a 60 °C por 120 min em banho-maria (LEE et al., 1999), e suplementado com alíquotas de soluções de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (250,00 g L⁻¹), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (275,00 g L⁻¹) e de extrato de levedura (500,00 g L⁻¹), resultando numa concentração final no meio de 1 g L⁻¹, 1,1 g L⁻¹ e 5 g L⁻¹ respectivamente, e inoculados com a levedura (SAMPAIO et al., 2008).

O acompanhamento da fermentação em shaker ou no fermentador foi realizado com a remoção de dois frascos ou a coleta de alíquotas de 25 mL de meio a cada 24 horas de incubação, determinados o pH e a massa celular. Em seguida as amostras foram centrifugadas (3.500 rpm por 10 minutos) e o sobrenadante armazenado sob congelamento para posterior determinação dos teores de açúcares residuais e produtos de fermentação, conforme descrito em “Análises físico-químicas” item 3.5.5.

3.4.2. Seleção da concentração de inóculo

Foi feita uma seleção da concentração de inóculo em frascos agitados, que proporcionasse meios fermentados à base de hidrolisado com alta produtividade volumétrica em xilitol, testando-se, para esse procedimento, as concentrações de células de 0,1 e 0,3% (m/v) durante 120 horas de fermentação, considerando a existência de compostos inibidores no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado, embora seja destoxificado.

3.5. Análises físico-químicas

A caracterização do bagaço de abacaxi foi feita por análises físico-químicas, determinando os teores de celulose, hemicelulose, lignina, cinzas, matéria seca, açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose) e extrativos.

A caracterização do hidrolisado bruto e concentrado foi feita por determinação de pH, densidade, Brix, teores de açúcares (glicose, xilose, arabinose), ácido acético, produtos de decomposição de açúcares (hidroximetilfurfural e furfural) e de compostos fenólicos. Para o hidrolisado

destoxificado, foram determinados os teores de açúcares (glicose, xilose e arabinose), ácido acético e compostos fenólicos.

Os meios de cultivo foram caracterizados quanto ao pH, teores de açúcares (glicose, xilose e arabinose) e ácido acético; e os meios em fermentação foram monitorados periodicamente quanto ao pH, concentração de massa celular seca (MCS), açúcares residuais (glicose, xilose, arabinose), xilitol, ácido acético e etanol. Os resultados foram apresentados em tabelas e, ou, descritos na forma de gráficos.

3.5.1. Matéria seca do bagaço de abacaxi

A análise fundamenta-se na eliminação da umidade da amostra previamente seca ao sol, empregando estufa com circulação de ar numa temperatura de 105 °C por 16 horas. A matéria seca é determinada gravimetricamente com o resíduo remanescente após a secagem, descrito por Silva e Queiroz (2002).

O cálculo para a determinação do teor de matéria seca foi realizado dividindo a massa da amostra seca pela massa inicial e multiplicando o resultado por 100, obtendo-se o resultado expresso em percentagem [% (g/100 g)].

3.5.2. Cinzas do bagaço de abacaxi

O teor de cinzas de uma amostra corresponde à concentração de sais minerais ou matéria inorgânica nela contida. O procedimento tem como princípio o aquecimento da amostra à temperatura não superior a 600 °C, por um período de quatro horas ou até a combustão completa da matéria orgânica. Temperaturas superiores a 600 °C acarretam volatilização parcial ou total de alguns cátions e ânions (SILVA; QUEIROZ, 2002).

O cálculo para determinação do teor de cinzas em termos de massa seca do bagaço de abacaxi consistiu em dividir a diferença entre os valores inicial e final da massa do cadinho antes e depois da incineração, pelo valor inicial, multiplicando o resultado por cem, o resultado final sendo expresso em percentagem [% (massa de cinzas/100 g de massa seca)].

3.5.3. Extrativos do bagaço de abacaxi

Foram pesadas três amostras de 6,0000 g de bagaço de abacaxi base seca, moídas em peneira de 1 mm, colocadas em cartuchos extratores feitos de papel de filtro e previamente determinado seu peso seco. Os cartuchos cheios, lacrados, foram postos na corneta do aparelho Soxhlet e conectados aos seus respectivos balões (1.000 mL) secos a 105 °C e pesados, contendo pérolas de vidro e 600 mL do solvente extrator água deionizada ou etanol 95% (v/v).

A extração foi feita em duas etapas, a primeira usando como solvente água deionizada, para remoção dos açúcares solúveis, durante oito horas de extração, com uma taxa de refluxo de quatro ciclos por hora. Em seguida, os cartuchos foram removidos das cornetas e secos em estufa a 105 °C por cinco horas, esfriados em dessecador à temperatura ambiente e pesados. A segunda extração foi feita por dezesseis horas, usando as amostras da primeira extração, etanol como solvente, e taxa de refluxo de oito ciclos por hora.

A solução aquosa da primeira extração foi usada para a determinação dos açúcares solúveis sacarose, glicose e frutose por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme consta no item 3.5.5. A solução alcoólica da segunda extração contida nos balões foi evaporada em rotava por para remover o excesso de etanol, e o resíduo seco em estufa a 105 °C por 16 horas, esfriado em dessecador e pesado em balança analítica.

O cálculo da concentração dos açúcares solúveis na amostra foi feito considerando a concentração do açúcar determinado em HPLC vezes o volume da solução aquosa da primeira extração, dividido pela massa inicial da amostra, e esse resultado multiplicado por cem, sendo expresso em percentagem [% (g/100 g MS)].

O cálculo para determinação do teor de extrativos em etanol (95%) nas amostras foi obtido pela diferença entre a massa do balão do extrator com o resíduo evaporado e seco em estufa e a massa do balão vazio, dividido pela massa seca da amostra no cartucho, e o resultado multiplicado por cem, sendo expresso em percentagem [% (g/100 g MS)].

3.5.4. Composição do bagaço de abacaxi

A análise de composição do bagaço de abacaxi, foi conduzida segundo metodologia descrita por Gouveia *et al.* (2009), que se fundamenta na sacarificação quantitativa dos polissacarídeos que compõem a fibra de biomassas vegetais, principalmente gramíneas.

Três amostras de 2,0000 g de bagaço de abacaxi base seca, previamente moídas e livres de extrativos, foram pesadas em béqueres de 100 mL e acrescentados 10 mL de H₂SO₄ 72% (m/m) e mantidas sob agitação em banho-maria a 50 °C por 7 minutos, para rompimento dos polissacarídeos da fibra em oligossacarídeos. Completado os 7 minutos de hidrólise, a reação foi paralisada, acrescentando-se 50 mL de água deionizada; transferido quantitativamente a mistura para frasco Erlenmeyer (500 mL) com auxílio de 225 mL de água deionizada, autoclavada a 121 °C por 30 minutos para quebra dos oligossacarídeos em seus monômeros, etapa denominada “pós-hidrólise”.

A mistura hidrolisada foi separada por filtração, usando papel de filtro para sólidos gelatinosos (Whatman 40: WH 1440-180), previamente seco e pesado. A fração líquida foi recolhida quantitativamente em balão volumétrico (500 mL) e avolumada até o menisco, pela lavagem dos sólidos retidos no papel, com água deionizada. O conteúdo do balão foi transferido para frasco de polietileno, armazenado sob congelamento e, posteriormente, determinados os teores dos açúcares, ácido acético e furaldeídos, conforme descrito nos itens 3.5.5 e 3.5.6.

Os teores dos açúcares, ácido acético e furaldeídos foram usados para determinar as concentrações de celulose e hemicelulose pelas equações 3.3 e 3.4, estabelecidas por Gouveia *et al.* (2009):

$$\frac{[Celulose]}{[Ácido fórmico]} = 0,95 [Celobiose] + 0,90 [Glicose] + 1,20 [HMF] + 3,09$$

equação 3.3,

em que:

0,95, 0,90, 1,20 e 3,09 = são os respectivos fatores de conversão de celobiose; glicose, HMF e ácido fórmico para celulose;

[Celulose] = concentração de celulose em [% (g/100g MS)];
 [Celobiose] = concentração de celobiose em [% (g/100g MS)];
 [Glicose] = concentração de glicose em [% (g/100g MS)];
 [HMF] = concentração de hidroximetilfurfural em [% (g/100g MS)]; e
 [Ácido fórmico] = concentração de ácido fórmico em [% (g/100g MS)].

O cálculo para determinação do teor de hemicelulose segue a equação 3.4:

$$[Hemicelulose] = 0,88 ([Xilose] + [Arabinose]) + 0,72 [\text{Ácido acético}] + 1,37 [Furfural]$$

equação 3.4,

em que

0,88, 0,72 e 1,37 = são os respectivos fatores de conversão de xilose, arabinose, ácido acético e furfural a hemicelulose;

[Hemicelulose] = concentração de hemicelulose em [% (g/100g MS)];
 [Xilose] = concentração de xilose em [% (g/100g MS)];
 [Arabinose] = concentração de arabinose em [% (g/100g MS)];
 [Ácido acético] = concentração de ácido acético em [% (g/100g MS)]; e
 [Furfural] = concentração de furfural em [% (g/100g MS)].

A determinação da concentração de lignina ácido solúvel ([Lignina]_{AS}) foi feita por método espectrofotométrico, com intervalo de tempo de no máximo 6 horas após a hidrólise, e consistiu em medir a absorbância de amostras do hidrolisado, em comprimento de onda na região do ultravioleta visível (280 nm), depois de solubilizados os compostos da degradação da lignina, através da dosagem de alíquotas de solução de NaOH 6 M, até atingir pH 12,0. Esta amostra alcalinizada foi diluída com água deionizada para o valor da absorbância ficar no limite de 0,7 a 1,0, de acordo com Hyman *et al.* (2007) e Gouveia *et al.* (2009).

O cálculo da concentração de lignina ácido solúvel ([Lignina]_{AS}) foi feito usando a Equação 3.5, de Gouveia *et al.* (2009).

$$[Lignina]_{AS} = 4,187 \times 10^{-2} (Abs)_{amostra}^{280nm} - 6,149 \times [Furfural] - 4,773 \times [HMF] - 3,279 \times 10^{-4}$$

equação 3.5,

em que

$[Lignina]_{AS}$ = concentração de lignina ácido solúvel ($g\ L^{-1}$);

$(Abs)_{amostra}^{280nm}$ = valor absorvância da amostra medido em espectrofotômetro;

$[Furfural]$ = concentração de furfural na amostra, medido em HPLC a 280 nm; e

$[HMF]$ = concentração de HMF na amostra, medido em HPLC a 280 nm.

Os sólidos retidos no papel de filtro foram lavados com água deionizada (1500 mL), colocados em pesa-filtro e secos em estufa a 105 °C até massa constante, tendo esse valor sido usado para cálculo da lignina insolúvel (Klason), pela equação 3.6 em termos de massa seca (MS):

$$[Lignina]_{Klason} = \left(\frac{M_{insolúveis} - M_{cinzas}}{MSB} \right) \times 100 \quad \text{equação 3.6,}$$

em que

$[Lignina]_{Klason}$ = concentração de lignina Klason em [% (g/100 g MS)];

$M_{insol.}$ = massa de sólidos insolúvel retido no papel de filtro da hidrólise ácida;

M_{cinzas} = massa de cinzas da amostra; e

$M_{amostra}$ = massa seca de bagaço usada na hidrólise em gramas.

A concentração de lignina foi determinada pela soma das concentrações de lignina Klason (insolúvel) mais a lignina ácido solúvel ($[Lignina]_{AS}$), de acordo com Gouveia *et al.* (2009).

A concentração de lignina na biomassa foi determinada pela equação 3.7:

$$[Lignina] = [Lignina]_{Klason} + 50 \cdot ([Lignina]_{AS} / MSB) \quad \text{Equação 3.7,}$$

em que

$[Lignina]$ = concentração de lignina na biomassa em [% (g/100g MS)];

$[Lignina]_{Klason}$ = concentração de lignina Klason em [% (g/100g MS)];

$[Lignina]_{AS}$ = concentração de lignina ácido solúvel em ($g\ L^{-1}$); e

MSB = massa seca de bagaço usada na hidrólise em gramas.

3.5.5. Açúcares, ácido fórmico e produtos de fermentação

As determinações das concentrações dos açúcares celobiose, glicose, xilose, arabinose e dos ácidos fórmico e acético para caracterização da composição da fibra do bagaço de abacaxi e do hidrolisado bruto foram feitas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em equipamento Shimadzu-LC-10AD, usando as seguintes condições de operação: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (370 x 7,8 mm) mantida a 45 °C; detector de índice de refração RID 6A; eluente H₂SO₄ (5 mM) com fluxo de 0,6 mL min⁻¹. O volume injetado das amostras foi de 20 µL, depois de previamente diluídas com água deionizada e filtradas em cartuchos de extração SEP-PAK C18 (Waters).

As determinações das concentrações dos açúcares sacarose, glicose e frutose, que compõem a fração solúvel (extrativos solúveis em água) do bagaço de abacaxi, foram feitas por HPLC em equipamento Waters (Milford, MA), usando as seguintes condições de operação: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (370 x 7,8 mm) mantida a 45 °C; detector de índice de refração (Waters 410); e eluente H₂SO₄ (5 mM) com fluxo de 0,6 mL min⁻¹. O volume injetado das amostras foi de 20 µL, depois de previamente diluídas com água deionizada e filtradas em membrana de 0,45 µm (Millipore).

Nas determinações das concentrações dos açúcares existentes no hidrolisado concentrado, destoxificado e dos produtos de fermentação (xilitol, ácido acético, glicerol e etanol) foi usado HPLC com equipamento Hewlett Packard-1050, usando as seguintes condições de operação: coluna BIO-RAD Aminex HPX-87H (370 x 7,8 mm) mantida a 60 °C; detector de índice de refração (HP 1047A); e eluente H₂SO₄ (5 mM) com fluxo de 0,7 mL min⁻¹. O volume injetado das amostras foi de 20 µL, depois de previamente diluídas com água deionizada e filtradas em cartuchos de extração SEP-PAK C18 (Waters).

As concentrações de todos os compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão com as concentrações no limite entre 2,5 a 20,0 mM para os açúcares (glicose, frutose, xilose, arabinose e xilitol) para ácido acético, etanol e glicerol, de 0,01 a 0,1 mM;

para celobiose e sacarose, de 0,64 a 6,4 mM e para ácido fórmico, de 0,064 a 0,64 M. Todas as curvas foram ajustadas com cinco pontos.

3.5.6. Furaldeídos e compostos fenólicos totais

As determinações das concentrações dos produtos de degradação de açúcares (furfural e hidroximetilfurfural) foram feitas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em equipamento Shimadzu-LC-10AD, usando as seguintes condições de operação: coluna Hewlett Packard RP 18 (200 mm) mantida a 25 °C; detector de ultravioleta SPD-10A; e eluente solução de acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético, fluxo de 0,8 mL min⁻¹. O volume injetado das amostras foi de 20 µL, depois de previamente diluídas com água deionizada e filtradas em membrana de 0,45 µm (Millipore).

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão com concentrações de zero a 10,4 mM para furfural e de zero até 6,35 mM para o hidroximetilfurfural.

A determinação da concentração dos compostos fenólicos totais das amostras de hidrolisado foi realizada usando o método colorimétrico com reagente Folin-Ciocalteu, adaptado de Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999). Em tubos de ensaio com tampa, revestidos com papel alumínio, foram vertidos 0,5 mL da amostra diluída, 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, 2 mL de solução de Na₂CO₃ (20%) e 5 mL de água deionizada. Esta mistura foi homogeneizada ao abrigo da luz em agitador rotatório (25 °C, 200 rpm por 120 minutos). Após a homogeneização da amostra, efetuou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro (λ = 760 nm), usando cubeta de vidro de caminho ótico de 1 cm. A concentração do analítico foi obtida substituindo o valor da absorbância na curva padrão de vanilina (0,33 a 0,66 mM), multiplicando o valor obtido pelo fator de diluição.

3.5.7. Açúcares redutores totais (ART)

Em tubos de ensaio, foram adicionadas alíquotas de 1,5 mL de reagente DNS a 1 mL da amostra diluída do hidrolisado. Em seguida a mistura foi aquecida em banho de água fervente por cinco minutos, resfriada à temperatura ambiente em banho de água fria por dez minutos e completado o volume para 10 mL com água destilada. A solução de referência foi preparada misturando 1,5 mL de DNS com 8,5 mL de água destilada. A leitura da absorbância da amostra foi feita em espectrofotômetro ($\lambda = 540 \text{ nm}$), usando cubeta de vidro de caminho ótico de 1 cm, após o aparelho ser zerado com a solução de referência. O valor da absorbância foi substituído na equação da curva padrão de glicose e determinada a concentração equivalente de açúcares redutores da amostra diluída; multiplicando pelo fator de diluição, foi obtido o teor correspondente de ART na amostra original (HU *et al.*, 2008).

A curva padrão foi preparada a partir da diluição de uma solução estoque de glicose 10 mM, preparando soluções com concentrações de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mM.

O reagente DNS foi preparado dissolvendo 6,3 g de $(\text{O}_2\text{N})_2\text{C}_6\text{H}_2\text{-2-(OH)CO}_2\text{H}$ em 262 mL de solução de NaOH 2 M; em seguida, foi vertida a solução alcalina de DNS em 500 mL de solução de $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (370 g L^{-1}), adicionando 5 g de $\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ e 5 g de Na_2SO_3 . Esta mistura foi mantida sob constante agitação e aquecimento até que todos os componentes se dissolvessem, sendo então resfriada à temperatura ambiente e completado o volume quantitativamente para 1.000 mL com água destilada.

3.5.8. Densidade do hidrolisado

O método usado na determinação da densidade do hidrolisado bruto foi o do picnômetro, que consiste em determinar a massa de um líquido que ocupa um volume conhecido.

Picnômetros de 25 mL previamente lavados e rinsados com acetona foram pesados vazios (m_0) em balança analítica, em seguida cheios com água deionizada e pesados ($m_{\text{água}}$) após todas as bolhas serem eliminadas.

O mesmo procedimento foi realizado usando o hidrolisado, tendo a perícia de anotar todas as medidas (m_0 , $m_{\text{água}}$, $m_{\text{hidrolisado}}$,) inclusive a temperatura ambiente, necessária para a determinação da densidade da água por meio da tabela de Régnault. O cálculo da densidade do hidrolisado bruto foi feito por intermédio da Equação 3.8:

$$\rho = \frac{m_{\text{hidrolisado}} - m_0}{m_{\text{H}_2\text{O}} - m_0} \times 0,998743 (\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}) \quad \text{Equação 3.8,}$$

em que

$m_{\text{hidrolisado}}$ = massa do picnômetro cheio de hidrolisado;

m_0 = massa do picnômetro vazio;

$m_{\text{H}_2\text{O}}$ = massa do picnômetro cheio de água deionizada; e

0,998743 g cm⁻³ = massa específica da água a 20 °C (PERRY; GREEN, 1997).

3.5.9. Densidade celular em meio de fermentação

A determinação do número de células nos ensaios de fermentação foi realizada usando um microscópio de contraste de fase (Olympus BX 41, Japão) e um hemocitômetro, modelo Neubauer (1/400 mm² x 1/10 mm²), e como mordente, solução de azul de metileno 0,01% (m/v).

3.5.10. Massa celular seca (MCS)

O crescimento celular foi estimado por medida de turbidez em espectrofotômetro (Pharmacia LKB-Novaspec II), com λ igual a 600 nm, após a conversão dos valores de densidade ótica em massa celular seca (1 DO_{600nm} = 0,84 g L⁻¹).

3.5.11. pH e sólidos totais solúveis (Brix)

O pH foi determinado diretamente com pHmêtro Hanna HI 9321 nos ensaios de fermentação. As determinações nas amostras de hidrolisado

bruto e, ou, destoxificado com valor de pH menor que um ou acima de 12 foram feitas usando papel indicador (Sigma).

A determinação do teor de sólidos totais solúveis (Brix) foi feita com refratômetro de Abbé (Optech, modelo - RMT) de acordo com IAL (2005).

3.6. Análise dos resultados

3.6.1. Determinação dos parâmetros de hidrólise

A equação usada para os cálculos de rendimento da operação de hidrólise foi a adotada por Neureiter *et al.* (2002), equação 3.9.

$$Y_i = 100 \times \frac{C_i \cdot V}{M} \quad \text{equação 3.9,}$$

em que

Y_i = rendimento em *xilose* (Y_{xil}), em ácido acético (Y_{HAC}), em furfural (Y_{furf}) ou em fenóis ($Y_{fenóis}$), expresso em % ou (g/100 g MSB), que significa a quantidade de xilose, ácido acético, furfural ou fenóis obtida em gramas por cem gramas de massa seca de bagaço (MSB) hidrolisado;

C_i = concentração de xilose (C_{xil}), de ácido acético (C_{HAC}), de furfural ($C_{furf.}$) ou fenóis ($Y_{fenóis}$) no hidrolisado em (g L⁻¹) determinado em HPLC;

M = quantidade de massa seca de bagaço usado na hidrólise; e

V = volume da fase líquida (L), ou seja, de solução ácida.

A eficiência de extração de xilose foi calculada de acordo com Canettieri *et al.* (2007 b):

$$\Phi(\%) = \frac{Y_{xil}}{[xil]_{bagaço}^0} \times 100 \quad \text{equação 3.10,}$$

em que

Φ (%) = eficiência de extração de *xilose* expressa em %;

Y_{xil} = rendimento em xilose (g/100 g MSB); e

$[xil]_{bagaço}^0$ = concentração inicial de *xilose* no bagaço (g/100g MSB).

O parâmetro seletividade foi adotado o usado por Roberto, Mussato e Rodrigues (2003), descrito pela Equação 3.11:

$$\frac{[xil]}{[gli]} = \frac{[xilose]}{[gli\ cosine]} \quad \text{equação 3.11,}$$

em que

$[xil]/[gli]$ = seletividade expressa em gramas de xilose por gramas de glicose;

$[xilose]$ = concentração de xilose (g L^{-1}) no hidrolisado; e

$[glicose]$ = concentração de glicose (g L^{-1}) no hidrolisado.

3.6.2. Determinação dos parâmetros de fermentação

Os parâmetros fermentativos usados para monitorar o crescimento da levedura *Debaryomyces Hansenii* UFV-170 e a formação de produtos de fermentação em meio sintético, no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi, e a comparação com dados da literatura referentes a outras matérias-primas foram determinados pelas Equações 3.12, 3.13, 3.14 e 3.15, conforme descritas abaixo:

Velocidade específica de crescimento (h^{-1}): $\mu = \frac{\ln\left(\frac{DO}{DO_0}\right)}{(t - t_0)}$ equação 3.12;

Produtividade volumétrica ($\text{g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$): $Q_P = \frac{[Xilitol]}{T_F}$ equação 3.13;

Rendimento (g xilitol/g xilose): $Y_{P/S} = \frac{\Delta[Xilitol]}{\Delta[Xilose]}$ equação 3.14; e

Eficiência de conversão de xilose (η %): $\eta = \frac{Y_{P/S}}{Y_{teórico}} \times 100$ equação 3.15,

em que

μ = velocidade específica de crescimento (h^{-1});

DO = densidade ótica determinada em um tempo t (h);

DO₀ = densidade ótica no início do cultivo;

t = tempo (h);

t_0 = tempo inicial de incubação ou cultivo (h);

T_F = tempo de fermentação (h);

$[Xilitol]$ = concentração de xilitol ($g\ L^{-1}$);

$\Delta[Xilitol]$ = variação da concentração de xilitol ($g\ L^{-1}$);

$\Delta[Xilose]$ = variação da concentração de xilose ($g\ L^{-1}$);

$Y_{P/S}$ = rendimento em produto (xilitol) em $g\ g^{-1}$; e

$Y_{teórico}$ = rendimento máximo em xilitol, $0,917\ g\ g^{-1}$ (BARBOSA *et al.*, 1988).

3.6.3. Tratamento estatístico dos dados

Os dados experimentais de hidrólise e destoxificação foram analisados estatisticamente com auxílio do *software* “Minitab 16”, segundo planejamento pré-estabelecido, para verificar o nível de significância dos efeitos dos fatores sobre as variáveis respostas em estudo, conforme metodologia descrita por Barros Neto, Scarminio e Bruns (2007) e Box, Hunter e Hunter (1978). Os resultados são apresentados em tabelas e figuras, mostrando os gráficos descritos pelas equações matemáticas empíricas obtidas pela utilização da metodologia de superfície de resposta.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização físico-química do bagaço de abacaxi

A Tabela 5 apresenta a composição do bagaço de abacaxi quanto aos teores de celulose, hemicelulose, lignina, açúcares, cinzas, matéria seca e extrativos.

Tabela 5 – Composição centesimal do bagaço de abacaxi

Componentes	Teor (% ou g /100 g MSB)
Celulose	31,69 ± 2,50
Glicose	29,9 ± 5,40
Hemicelulose	38,18 ± 0,72
Xilose	27,63 ± 0,69
Arabinose	5,48 ± 0,31
Ácido acético	5,37 ± 0,15
Lignina	15,1 ± 0,72
Klason	8,25 ± 0,36
Ácido solúvel	6,85 ± 0,52
Cinzas	1,61 ± 0,08
Matéria Seca (MS)	90,36 ± 0,18
Extrativos em Etanol (95% v/v)	20,26 ± 0,47
Açúcares solúveis	Sacarose: 0,172 ± 0,005
	Glicose: 1,39 ± 0,06
	Frutose: 4,33 ± 0,14

As concentrações de celulose, hemicelulose e de lignina do bagaço de abacaxi apresentadas na Tabela 5, determinadas por método de sacarificação quantitativa, são semelhantes a dados registrados na literatura, conforme apresenta a Tabela 6, em que os componentes da fibra foram determinados por método de fracionamento com reagentes específicos, detergentes ácidos e neutros.

Tabela 6 – Comparação da composição de bagaço de abacaxi obtido por método de sacarificação quantitativa com dados da literatura obtido por fracionamento com detergentes

Componente (g/100 g MS)	Presente Trabalho	Valadares Filho (2006)	van Soest (1994)
Celulose	31,69 ± 2,50	31,82 ± 8,37	30,0
Hemicelulose	38,18 ± 0,72	36,19 ± 6,31	36,0
Lignina	-	-	-
Klason	8,25 ± 0,36	7,69 ± 3,37	7,0
Cinzas	1,61 ± 0,08	7,99 ± 1,71	3,0
Matéria seca	90,36 ± 0,18	86,59 ± 2,72	---

O baixo teor de cinzas obtido no presente trabalho se deve à coleta do bagaço ter sido feita de imediato ao processamento da fruta, evitando a contaminação de resíduos do ambiente (solos, restos de vegetação e insetos).

Os teores altos de celulose, hemicelulose e baixo de lignina, além da existência de açúcares solúveis (sacarose, glicose e frutose), fazem do bagaço de abacaxi (*pineapple bran*) uma excelente ração para ruminantes, por sua fácil digestão (VANSOEST, 1994) e um substrato ideal para obtenção de bioprodutos (enzimas, aromas e ácidos orgânicos) por fermentação em estado sólido (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000; SCHIEBER; STINTZING; CARLE, 2001; LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003).

O teor de xilose (27%) da fração hemicelulósica do bagaço de abacaxi é semelhante ao de outros resíduos, como, por exemplo, o de bagaço de cana-de-açúcar (22%) determinado por Pessoa Jr. e Mancilha e Sato (1997) e Neureiter *et al.* (2002) e, ao de palha de arroz (20,2%) determinado por Roberto *et al.* (2003), porém o teor de glicose da fração celulósica é cerca de 30% menor, em relação ao existente nesses resíduos.

O teor baixo de lignina (8%) existente no bagaço de abacaxi faz dele uma potencial matéria-prima para extração dos açúcares monoméricos das frações hemicelulósica e celulósica por hidrólise enzimática, que, segundo Belkacemi *et al.* (1998), a alta eficiência de extração de açúcares de materiais lignocelulósicos por enzimas celulolíticas é inversamente proporcional ao teor de lignina, uma vez que os compostos fenólicos adsorvem nos sítios catalíticos das enzimas, reduzindo ou desativando-as de forma irreversível, havendo a necessidade de aumentar as concentrações ou adicionar agentes surfactantes, onerando os custos do processo.

É possível estimar um rendimento teórico em etanol de $0,333 \text{ kg kg}^{-1}$ de bagaço de abacaxi, considerando os teores de celulose (32 g /100 g MS) e hemicelulose (38 g/100 g MS) determinados no bagaço de abacaxi (Tabela 5), ao aplicar a equação de Lynd (1990), que prevê o potencial de um determinado resíduo lignocelulósico como matéria-prima para fermentação alcoólica. Comparando este valor ($Y_{\text{etanol/bagaço}} = 0,333 \text{ kg kg}^{-1}$) com os valores estimados por Chandel *et al.* (2007) para alguns resíduos lignocelulósicos, como, por exemplo, para o bagaço de cana ($0,279 \text{ kg kg}^{-1}$), para a palha de arroz ($0,248 \text{ kg kg}^{-1}$) ou para restos de eucalipto ($0,225 \text{ kg kg}^{-1}$), observa-se que o bagaço de abacaxi rende em cerca de 20% de etanol a mais que o bagaço de cana-de-açúcar, 30% a mais que a palha de arroz e 50% que os restos de eucalipto.

Considerando apenas o teor de xilose (28 g/100 g MS) da fração hemicelulósica do bagaço de abacaxi e tomando por base de cálculo o rendimento em xilitol na bioconversão da xilose em microaerobiose, determinada por Barbosa *et al.* (1988), que é de $0,917 \text{ g g}^{-1}$, estima-se que teoricamente 0,256 kg de xilitol seja produzido para cada quilo de bagaço de abacaxi.

Então, o bagaço de abacaxi é uma possível matéria-prima para produção de etanol, xilitol, produtos de processos fermentativos.

4.2. Hidrólise do bagaço de abacaxi

A Tabela 7 apresenta os valores da eficiência de extração de xilose, seletividade e rendimentos em xilose, em ácido acético, em furfural e em

fenóis da hidrólise ácido diluído do bagaço de abacaxi. De acordo com as condições usadas na hidrólise ácido diluído do bagaço, a eficiência de extração de xilose variou entre 24 a 65%, a seletividade de 1,721 a 3,483 (g g^{-1}), o rendimento em xilose de 7,777 a 20,734%, o rendimento em ácido acético entre 1,66 a 4,88%, o rendimento em furfural de zero a 1,567% e o rendimento em fenóis entre 0,828 a 8,429%. Os pontos centrais para as respostas apresentaram uma variação pequena, indicando uma boa repetibilidade dos ensaios.

Ao comparar os valores das severidades impostas pelos efeitos da temperatura (A), tempo (B) e concentração de ácido (C) entre os tratamentos (1 e 2), (1 e 3) e (1 e 5) da Tabela 7 calculados pela equação de severidade combinada (M_0) de Lloyd e Wyman (2003), verifica-se que a severidade imposta pela temperatura foi 14 vezes maior que as severidades impostas pelo tempo e pela concentração de ácido. No entanto, entre os tratamentos (7 e 8), (6 e 8) e (4 e 8), a severidade foi duas vezes maior (Tabela 7).

A temperatura aumenta a severidade da hidrólise mais que o tempo, intensificando as velocidades das reações de despolimerização da hemicelulose e as de formação de compostos inibidores, como, por exemplo, a despolimerização da lignina, as reações de desidratação da xilose a furfural e de formação de ácido acético, proveniente da ruptura das ligações dos radicais acetila com as cadeias de xilanas (CHUM *et al.*, 1985).

Logo, o efeito da variação da temperatura de 120 para 160 °C, quando feita com os valores de tempo de hidrólise e concentração de ácido em seus níveis inferiores (20 min e 2%) aumentou a severidade da hidrólise proporcionando os maiores aumentos no rendimento em xilose e na formação de compostos inibidores (ácido acético, furfural e fenóis).

Lenihan *et al.* (2010) constataram o mesmo efeito da temperatura sobre os rendimentos em açúcares (glicose e arabinose) e formação de compostos inibidores (furaldeídos), durante a hidrólise de casca de batata com ácido diluído.

Tabela 7 – Matriz de planejamento experimental ($2^3 + 1$) esférico de hidrólise ácido diluído da fração hemicelulósica de bagaço de abacaxi, realizada em reator de bancada e valores das respostas eficiência de extração de *xilose* [Φ (%)], seletividade($[xi]/[gli]$) e rendimentos em *xilose* (Y_{xil}), em ácido acético (Y_{HAc}), em furfural ($Y_{furfural}$) e em fenóis ($Y_{fenóis}$)

Tratamento	Fatores*						Φ_{xil} (%)	([<i>xi</i>]/[<i>gli</i>]) (g/g)	Y [% (g/100 g MSB)]			
	X ₁	X ₂	X ₃	A	B	C			Xil	HAc	Furfural	Fenóis
1	-1	-1	-1	120	20	2,0	24	3,304	7,777	1,66	0,000	0,828
2	1	-1	-1	160	20	2,0	56	2,950	17,786	3,73	0,137	3,073
3	-1	1	-1	120	40	2,0	52	2,523	16,634	3,15	0,011	1,019
4	1	1	-1	160	40	2,0	35	3,477	11,304	2,61	0,028	4,781
5	-1	-1	1	120	20	4,0	40	3,483	12,645	2,85	0,010	1,128
6	1	-1	1	160	20	4,0	62	2,816	19,692	4,63	0,379	4,470
7	-1	1	1	120	40	4,0	55	3,396	17,707	4,36	0,434	1,717
8	1	1	1	160	40	4,0	54	2,082	17,420	4,72	1,567	7,048
9	$-(3)^{1/2}$	0	0	105	30	3,0	28	3,051	8,987	2,03	0,017	0,990
10	$(3)^{1/2}$	0	0	175	30	3,0	50	1,721	15,933	4,88	1,012	8,429
11	0	$-(3)^{1/2}$	0	140	13	3,0	49	3,166	15,694	3,67	0,031	1,452
12	0	$(3)^{1/2}$	0	140	47	3,0	62	2,937	19,949	4,85	0,207	2,508
13	0	0	$-(3)^{1/2}$	140	30	1,3	49	2,947	15,833	3,24	0,031	1,695
14	0	0	$(3)^{1/2}$	140	30	4,7	65	2,960	20,734	4,86	0,223	3,222
15	0	0	0	140	30	3,0	58	3,087	18,619	4,13	0,140	2,556
16	0	0	0	140	30	3,0	62	2,941	19,692	4,81	0,136	2,946
17	0	0	0	140	30	3,0	55	3,085	17,642	4,83	0,123	2,508

*X₁ = valor codificado da temperatura [A (°C)]: X₁ = (A - 140)/20; X₂ = valor codificado do tempo [B (minutos)]: X₂ = (B - 30)/10; e X₃ = valor codificado da concentração de H₂SO₄[C (% m/m)]: X₃ = (C - 3,0)/1,0; Xil – xilose mais frutose; gli – glicose; MSB – massa seca de bagaço.

O efeito da variação do tempo de 20 minutos para 40 minutos favoreceu em maior extensão a quebra das ligações glicosídicas da fração amorfa da celulose, resultando em maior concentração de glicose no hidrolisado e a consequente redução da seletividade. De acordo com Tunc e van Heiningen (2008), a velocidade de ruptura das ligações glicosídicas β (1 $\rightarrow$ 4) da celulose é cerca de 1.500 vezes menor do que a velocidade de ruptura das ligações glicosídicas da hemicelulose. Portanto, o aumento do tempo de hidrólise favoreceu o aumento da concentração de glicose no hidrolisado, reduzindo a seletividade.

É possível constatar na Tabela 7 que o efeito da concentração de ácido (C) aumentou a seletividade e formou menos compostos inibidores, quando a variação do valor desse fator foi realizada com os valores dos fatores temperatura (A) e o tempo de hidrólise (B) em seus níveis inferiores (tratamentos 1 e 5). Quando o ajuste foi realizado com a temperatura e o tempo de hidrólise em seus níveis superiores, houve um ganho de rendimento em *xilose* e se formou nove vezes menos furfural (tratamentos 4 e 6) do que os efeitos causados pela variação da temperatura (tratamentos 7 e 8) e do tempo (tratamentos 6 e 8). Então, o aumento da concentração de ácido mantendo a temperatura e o tempo em níveis baixos favorece a solubilização da *xilose*, formando poucos compostos inibidores.

Segundo Liao *et al.* (2007), o aumento da concentração de ácido favorece a solubilização da hemicelulose e o rendimento em *xilose*. No entanto, a força do ácido e os efeitos de interação com os fatores temperatura e tempo devem ser considerados. Além disso, quanto maior a concentração de ácido usada, maior será o consumo de álcali e a formação de resíduo sólido, como, por exemplo, gesso (CaSO_4), que acarreta perdas de açúcares por retenção no precipitado durante as operações de separação e problemas de deposição (TUCKER *et al.*, 2003).

Em relação ao rendimento em ácido acético, os efeitos das variações dos fatores temperatura, tempo e concentração de H_2SO_4 não causaram redução, indício de que o ácido acético não sofreu decomposição com o aumento da severidade de hidrólise. Fato também constatado por Gámez *et al.* (2004) na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar.

Quanto ao rendimento em fenóis, observar-se na Tabela 7 que o efeito da temperatura foi o que mais contribuiu com a despolimerização da lignina, ao comparar os tratamentos 10, 12 e 14. Entretanto, não houve diferença nos valores de rendimento ao comparar o efeito da variação da temperatura entre os tratamentos 1 e 2 com os tratamentos 7 e 8. Apesar de a severidade entre os tratamentos 7 e 8 ter sido quatro vezes maior que entre os tratamentos 1 e 2, provavelmente ocorreu uma limitação na formação de fenóis proporcionada pelo aumento da acidez. Ocorrência também verificada por Mussato e Roberto (2005) e Silverstein *et al.* (2007), durante a hidrólise com ácido diluído de resíduo lignocelulósico de cervejaria (BSG) e talos de algodão, respectivamente.

De acordo com Allen, Cousin e Pierce (1980) e Fengel e Wegener (1989), na hidrólise com ácido diluído de materiais lignocelulósicos, a solubilidade da lignina se reduz com o aumento da concentração de ácido e do tempo de hidrólise. As reações de condensação das unidades fenólicas oriundas da lignina despolimerizada passam a prevalecer sobre as de decomposição da fração polimérica, formando estruturas recalcitrantes com o resíduo sólido remanescente.

Portanto, aumentando a concentração de ácido ou o tempo de reação, ou então, o efeito combinado desses dois fatores, reduz-se o teor de fenóis no hidrolisado.

Avaliando os efeitos dos fatores temperatura, tempo de hidrólise e concentração de ácido em torno do ponto central (140 °C, 30 min e 3% de ácido) na Tabela 7, observa-se que o rendimento maior em xilose ($Y_{\text{xilose}} = 20,734$) foi obtido no tratamento com maior concentração de ácido (4,7 % de H_2SO_4), ou seja, o tratamento 14 (Tabela 7). Observa-se também que o tratamento de temperatura maior (175 °C), ou seja, o tratamento 10 favoreceu mais a formação de compostos tóxicos (furfural: $Y_{\text{furfural}} = 1,012$ e fenóis: $Y_{\text{fenóis}} = 8,429$), que o rendimento em xilose ($Y_{\text{xilose}} = 15,933$). No entanto, o rendimento em ácido acético manteve-se constante nos dois tratamentos.

Segundo Neureiter *et al.* (2002), a concentração de ácido na hidrólise ácido diluído favorece o rendimento em açúcares, enquanto a temperatura favorece a degradação de açúcares.

Portanto, o efeito da temperatura favoreceu mais a formação de compostos tóxicos, ou seja, os produtos de degradação de xilose e de lignina. Enquanto o efeito do ácido favoreceu mais a despolimerização da xilose do que a formação de produtos de degradação de açúcares.

Os valores dos parâmetros seletividade e rendimento em xilose (Y_{xil}) da hidrólise ácido diluído do bagaço de abacaxi (Tabela 7) são comparados com os valores de outros materiais lignocelulósicos registrados na literatura, conforme mostra a Tabela 8.

Os limites dos valores da seletividade e do rendimento em xilose obtidos no presente trabalho estão compreendidos entre os valores dos limites de talos de algodão e da palha de arroz (AKPINAR *et al.*, 2010; HSU *et al.*, 2010). Entretanto, inferiores aos valores dos limites do resíduo de cervejaria (BSG) (MUSSATO; ROBERTO, 2005).

Estas diferenças nos valores dos parâmetros de hidrólise ácido diluído dos diversos materiais lignocelulósicos com os valores do bagaço de abacaxi apresentados na Tabela 8 mostram que cada biomassa possui um perfil de despolimerização dos componentes de suas frações celulósica e hemicelulósica. Quanto maior a organização estrutural proporcionada pelo maior número de ligações covalentes e por pontes de hidrogênio entre os componentes da fibra, mais recalcitrante é o material ao ataque hidrolítico (CHUM *et al.*, 1985).

De acordo com Carrasco, Rivières e Roy (1992) as diferenças existentes na hidrólise ácido diluído da fração hemicelulósica de materiais lignocelulósicos distintos se devem a fatores intrínsecos, como, por exemplo, constituintes químicos, massa molecular e localização da hemicelulose na fibra, além da alta concentração de grupos acetila que durante a hidrólise são liberados e intensificam a catálise. Os pesquisadores destacam também que efeitos de difusão dos prótons H^+ dependem do tamanho das partículas e da relação volume de solução ácida para sólidos, além da contribuição dos fatores não controláveis, como, por exemplo, as taxas de transferência de calor durante o pré-aquecimento, a formação de sedimentos sólidos oriundos dos produtos de condensação do furfural ou dos fenóis.

Assim sendo cada material lignocelulósico apresenta uma natureza de degradação de sua fração hemicelulósica, necessitando de uma avaliação

Tabela 8 – Comparação dos parâmetros seletividade ([xilose]/[glicose]) e rendimento em xilose (Y_{xil}) de hidrólise ácido diluído de bagaço de abacaxi com os de outros materiais lignocelulósicos

Material	Reator	Condições de Hidrólise			[xil]/[gli] (g g ⁻¹)	Y_{xil} (%)	Referência
		T (°C)	Tempo (mín)	mg H ₂ SO ₄ g ⁻¹ MS			
Bagaço de abacaxi	Cilindro de aço s/ agitação	120 - 140	20 - 40	200 - 400	1,7 – 3,5	8 – 21 [#]	Presente trabalho
Talos de algodão	Cilindro de aço s/ agitação	100 - 140	15 - 45	200 - 600	1,2 – 2,2	0,5 - 10	Akpinar <i>et al.</i> (2010)
Restos de milho (DDGS)	Parr	110 - 130	30 - 90	130 - 260	---	14 – 32	Xu e Hanna (2010)
Palha de arroz	Parr	160 - 190	1 - 10	50 - 100	1 - 5,6	9 - 14	Hsu <i>et al.</i> (2010)
Bagaço de cana	Cilindro de aço s/ agitação	112,5 - 157,5	5 - 35	0 - 200	---	10 - 13	Canilha <i>et al.</i> (2008)
Restos de eucalipto	Cilindro de aço c/ agitação	150 - 170	20	10 - 60	---	0,4 – 12,2	Canettieri <i>et al.</i> (2007 a)
Restos do coco da palma	Erlenmeyer	100 - 130	30 - 90	160 - 480	0,6 - 37,6	4 - 31	Rahman <i>et al.</i> (2007)
Resíduo de cervejaria (BSG)	Cilindro de aço s/ agitação	120	17 - 37	100 - 140	12 - 25	28 - 30	Mussato e Roberto (2005)

* % = [g/100 g MS]; MS = massa seca de resíduo lignocelulósico; # rendimento em xilose mais frutose; xil = xilose; e gli = glicose.

prévia quanto às influências dos fatores temperatura, tempo e concentração de ácido, sobre os parâmetros da hidrólise ácida, como, por exemplo, seletividade e rendimentos em açúcares.

4.2.1. Determinação das condições de hidrólise ácido diluído do bagaço de abacaxi (BA)

Os valores das respostas seletividade ([xilose]/[glicose]), rendimento em *xilose* (Y_{XIL}), em ácido acético (Y_{HAC}), em furfural ($Y_{furfural}$) e em fenóis ($Y_{fenóis}$) apresentados na Tabela 7 foram ajustados a equações polinomiais de segunda ordem, conforme descrito em materiais e métodos no item 3.2.1, resultando nas equações reparametrizadas descritas na Tabela 9.

Tabela 9 – Equações normais de regressão das respostas rendimento em *xilose*, em ácido acético, em furfural, em fenóis e de seletividade da hidrólise ácido diluído de bagaço de abacaxi

Equação de Regressão	R ² (%)	CV (%)
[<i>Xilose</i>]* $\hat{Y}_{Xil} = -164,29 + 1,98 A + 2,07 B + 1,68 C - 1,42 \cdot 10^{-2} AB - 5,3 \cdot 10^{-3} A^2$	91,3	5,73
[Ácido acético]* $\hat{Y}_{HAC} = -30,65 + 0,35 A + 0,38 B^{ns} + 0,59 C - 2,5 \cdot 10^{-3} AB - 9 \cdot 10^{-4} A^2$	82,9	9,69
[Furfural]* $\hat{Y}_{furfural} = 9,64 - 0,11 A - 5,11 \cdot 10^{-2} B - 1,64 C + 8,4 \cdot 10^{-3} AC + 2,14 \cdot 10^{-2} BC + 3 \cdot 10^{-4} A^2$	84,9	7,57
[Fenóis]* $\hat{Y}_{fenóis} = 38,43 - 0,54 A - 0,26 B - 1,82 C + 2,2 \cdot 10^{-3} AB + 1,67 \cdot 10^{-2} AC + 1,9 \cdot 10^{-3} A^2$	97,5	10,26
Seletividade ([<i>xil</i>]/[<i>gli</i>])* $\hat{Y}_{[xil/gli]} = -11,12 + 0,17 A + 2,23 C^{ns} - 1,61 \cdot 10^{-2} AC - 5 \cdot 10^{-4} A^2$	68,2	9,94

* Efeitos significativos pelo teste *t* de Student ($p < 0,05$); A = temperatura (°C); e B = tempo (minutos).

C = concentração de H₂SO₄ (% m/m); e ns = efeito não significativo pelo teste *t* de Student ($p > 0,05$).

As condições para obtenção do máximo rendimento em xilose considerando a equação $\hat{y}_{xil}$ (Tabela 9) foi de 124,26 °C, 47,32 min e 4,73% de ácido, resultando num rendimento máximo em xilose de 23,41 %.

As condições de hidrólise para minimizarem a formação de compostos inibidores (ácido acético e fenóis), considerando as equações $\hat{y}_{HAc}$ e $\hat{y}_{fenóis}$ (Tabela 9) foram de 105 °C, 12,7 min e 1,27% de ácido, e de 131,3 °C, 12,7 min e 1,27% de ácido, respectivamente.

Para maximizar a seletividade as condições foram de 105,4 °C, e 4,7% de ácido, resultando num valor da resposta de 4 g g⁻¹.

Observa-se na Tabela 9 que a equação da resposta rendimento em *xilose* ($\hat{y}_{xil}$) possui todos os termos lineares dos fatores A, B e C e os termos de interação AB e A², significativos para α igual a 5%, além de um coeficiente de determinação R², que explica 91,3% das variações dos dados experimentais e um baixo coeficiente de variação (CV = 5,73%). A análise de variância da regressão apresentada na Tabela A.1 do Apêndice A mostra que a regressão foi significativa e que não houve falta de ajuste.

A Figura 16 (I) apresenta a superfície de resposta do efeito do tempo (B) e da concentração de ácido (C), ao manter a temperatura (A) igual a 140 °C, sobre o rendimento em *xilose*. Rendimentos maiores que 20% [g/100 MSB] podem ser obtidos quando B e C assumiram valores maiores que 40 minutos e 4% de ácido.

A Figura 16 (II) mostra a existência de uma região de máximo rendimento em *xilose*, em torno de 140 °C. Acima ou abaixo dessa temperatura o valor da resposta diminuiu, ou seja, um ponto de inflexão. Nota-se também que, mantendo A constante e variando C de 2 para 4%, ocorreu aumento de rendimento.

Verifica-se na Figura 16 (III) que altas temperaturas e curtos tempos de hidrólise favoreceram o rendimento em xilose mais que temperaturas baixas e longos tempos, ou longos tempos e temperaturas altas.

Dessa forma, o efeito de interação entre altas concentrações de ácido (C) e alto tempo (B) favorece mais o rendimento em xilose (> 21%) que o efeito de interação entre temperatura *versus* concentração de ácido (AC) ou temperatura *versus* tempo (AB), porque o efeito do ácido favorece mais a

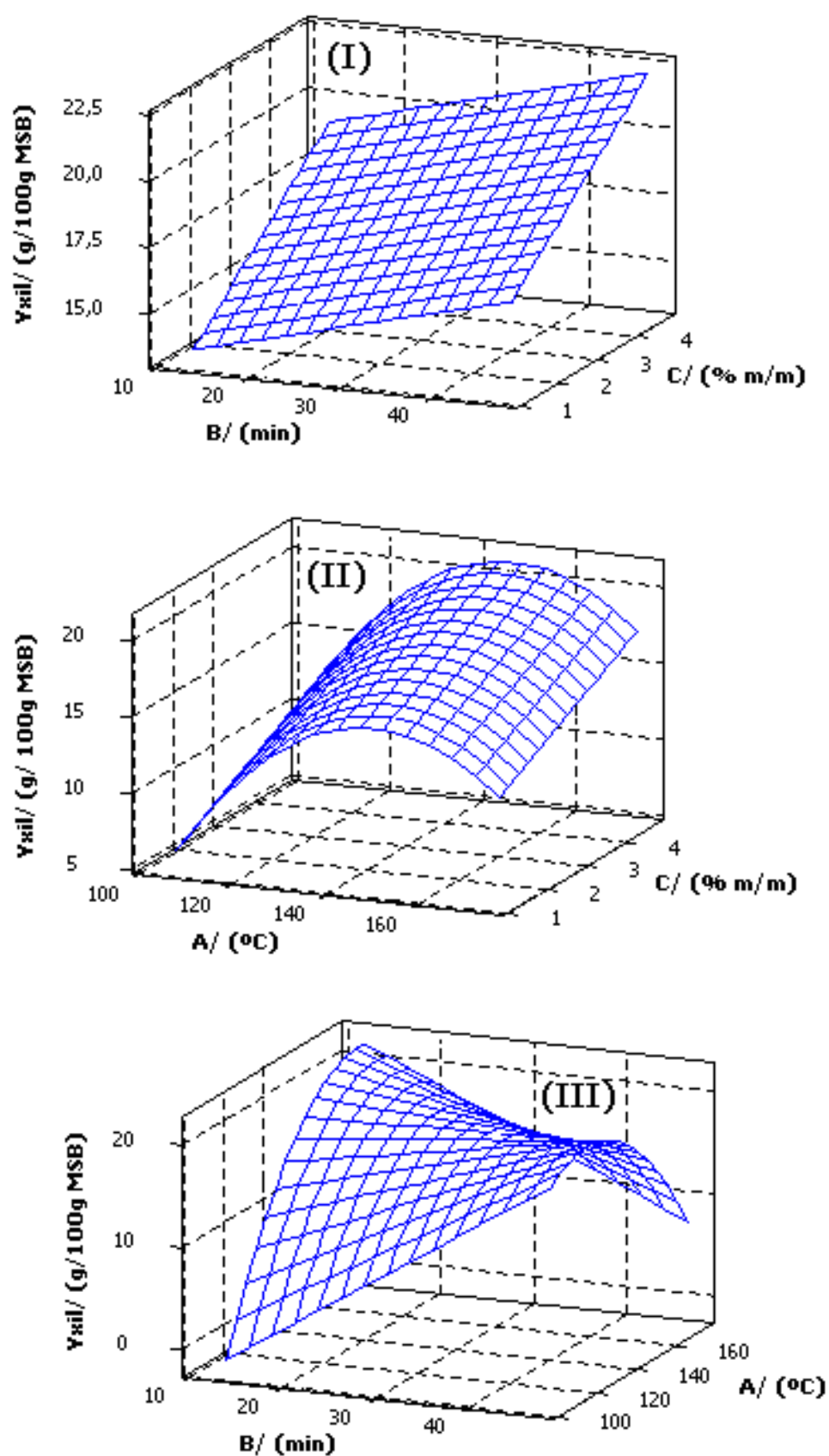


Figura 16 – Superfícies de resposta do rendimento em *xilose*. (I) A versus B e C igual à 140 °C; (II) A versus C e B igual a 30 min; (III) B versus A e C igual a 3% (m/m).

solubilização da xilose existente na hemicelulose que a sua desidratação a furfural. Já as temperaturas altas favorecem mais a desidratação da xilose a furfural, uma vez que a energia de ativação necessária para converter a xilose existente na fase líquida é menor que a energia de ativação necessária para romper as ligações glicosídicas entre as unidades monoméricas de xilose que compõem a hemicelulose. Além da crescente resistência à transferência de massa com o andamento da reação, entre o catalisador (H_3O^+) na fase líquida e o substrato, impregnado na fibra do bagaço de abacaxi.

Resultados semelhantes quanto ao efeito favorável da concentração de ácido e do tempo de hidrólise sobre o rendimento em xilose foram constatados por Akpinar *et al.* (2010) e por Xu e Hanna (2010).

A equação de regressão do rendimento em ácido acético ($\hat{y}_{HAC}$) possui os termos lineares dos fatores A e C, e os de interação AB e A^2 , significativos para α igual a 5%, porém, o termo linear do fator B foi não significativo. Quanto à qualidade da regressão, o coeficiente de determinação R^2 explica 82,9% das variações dos dados experimentais e o valor do coeficiente de variação foi de 9,69% (Tabela 9).

A análise de variância apresentada na Tabela 2A, do Apêndice A mostra que a regressão dos dados experimentais foi significativa e que não houve falta de ajuste.

As superfícies de resposta da Figura 17 mostram que os efeitos dos fatores temperatura (A) e concentração de ácido (C) favoreceram mais o rendimento em ácido acético do que o fator tempo (B).

De acordo com a Figura 17 (I), o rendimento em ácido acético aumenta de forma linear quando o fator A foi fixado em 140 °C, e os fatores B e C assumiram os valores entre 20 a 40 minutos e entre 2 a 4%, enquanto o rendimento mínimo foi obtido quando B e C assumiram os valores de seus limites inferiores (20 minutos e 2%).

Variando A entre 120 a 140 °C e C entre 2 a 4%, houve um aumento de rendimento, no entanto, acima de 140 °C ocorreu uma redução leve no valor da resposta, conforme a Figura 17 (II).

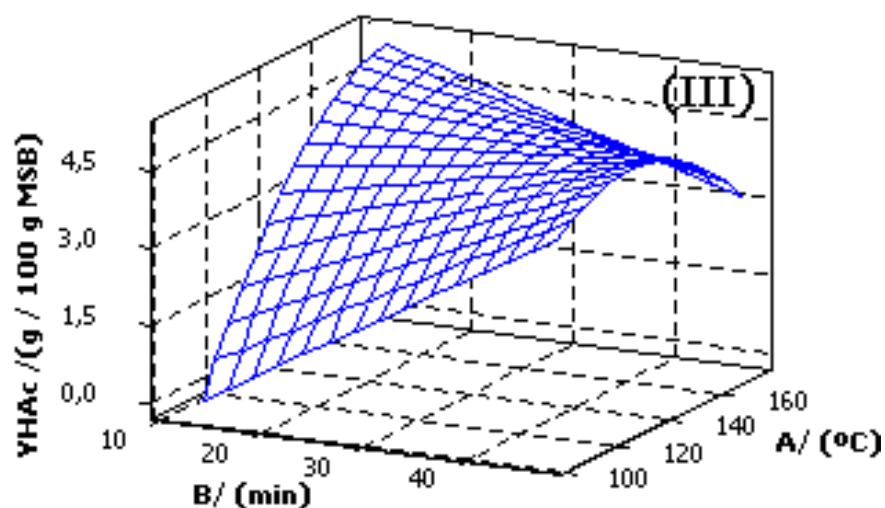
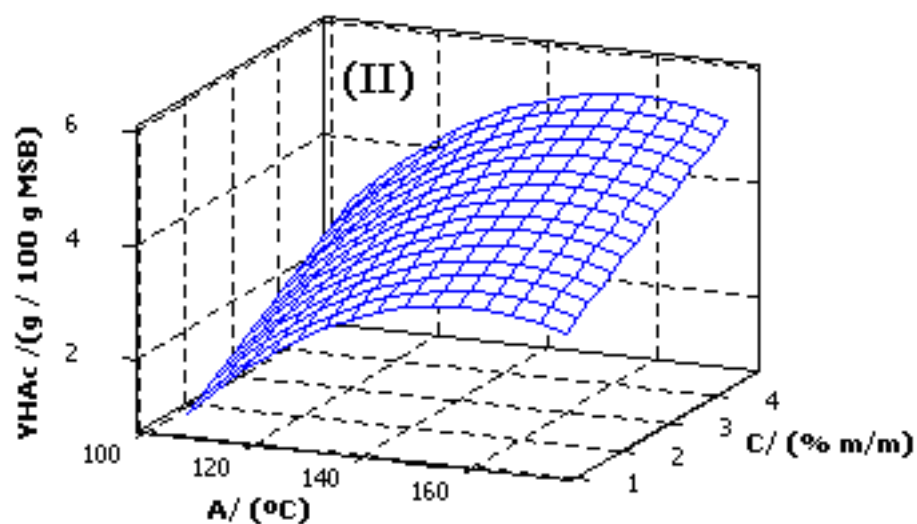
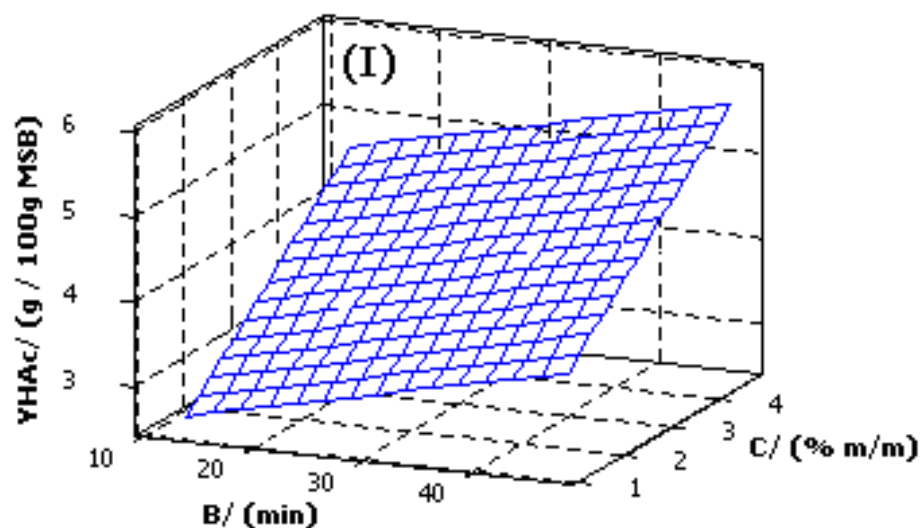


Figura 17 – Superfícies de resposta do rendimento em ácido acético. (I) A versus B e C igual à 140 °C; (II) A versus C e B igual à 30 min; (III) B versus A e C igual à 3% (m/m).

Conforme a Figura 17 (III), valores de A e B elevados reduziram o rendimento em ácido acético. Enquanto valores altos de A e reduzidos de B favoreceram a produção do ácido acético.

A discreta redução no rendimento em ácido acético ($\hat{y}_{HAC}$) mostrada na Figura 17 (II) acima de 140 °C foi devida à sua evaporação, uma vez que seu ponto de ebulição é de 118 °C (MORRISON; BOYD, 1993).

A equação empírica da resposta rendimento em furfural ($\hat{y}_{furfural}$) possui todos os termos lineares dos fatores e os de interação AC, AB e A^2 significativos para α igual a 5% (Tabela 9). Apesar de apresentar um coeficiente de determinação que explica 84,9% das variações dos dados experimentais e um coeficiente de variação pequeno (CV = 7,57%), a análise de variância apresentada na Tabela A.3 do Apêndice A mostrou que a significância da regressão foi baixa e que houve uma evidente falta de ajuste ($F_{calc} >> F_{tab}$), sendo inadequada para representar os dados.

O ajuste dos dados da resposta fenóis resultou em uma equação que tem todos os termos lineares dos fatores e os de interação AB, AC e A^2 significativos para α igual a 5% (Tabela 9), além da equação ($\hat{y}_{fenóis}$) explicar 97,5% da variação dos dados experimentais seu coeficiente de variação foi de 10,26%. A análise de variância apresentada na Tabela A.4 do Apêndice A mostrou que a regressão foi significativa e que não houve falta de ajuste.

As superfícies de resposta da Figura 18 mostram os efeitos dos fatores sobre o rendimento em fenóis.

De acordo com a Figura 18 (I), a formação de fenóis aumentou de forma linear até atingir valor máximo de 4% na região em torno de 40 minutos e 4% de ácido, e valor mínimo na região próximo de 20 minutos e 2% de ácido. A interação dos fatores AC [Figura 18 (II)] ou AB [Figura 18 (III)] proporcionou rendimentos maiores em fenóis que a interação BC [Figura 18 (I)].

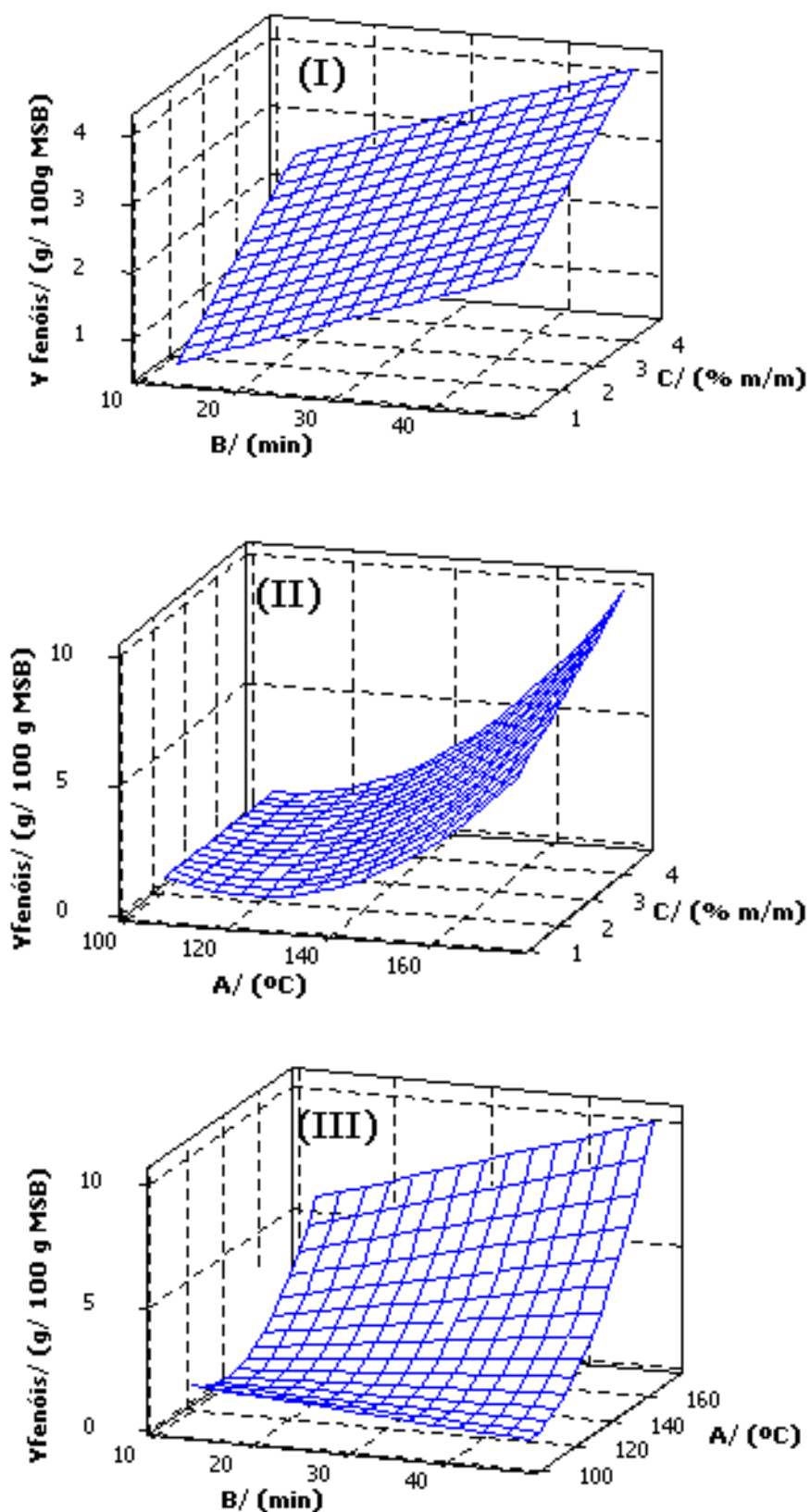


Figura 18 – Superfícies de resposta do rendimento em fenóis. (I) – A versus B e C igual a 140 °C; (II) – A versus C e B igual a 30 min; (III) - B versus A e C igual a 3 % (m/m).

A equação de regressão da seletividade ($\hat{Y}_{[xilose]/[glicose]}$) mostrada na Tabela 9 tem o termo linear do fator A e os de interação AC e A^2 significativos para α igual a 5%; o termo linear do fator C foi não significativo. O coeficiente de determinação desta equação explica 68,2% da variação dos dados e o valor do coeficiente de variação foi de 9,94%. A análise de variância apresentada na Tabela A.5 do Apêndice A mostra que a regressão foi significativa e que não houve falta de ajuste.

A superfície de resposta apresentada na Figura 19 mostra que a seletividade ($[xilose]/[glicose]$) foi favorecida em temperaturas (A) baixas e concentrações de ácido (C) elevadas.

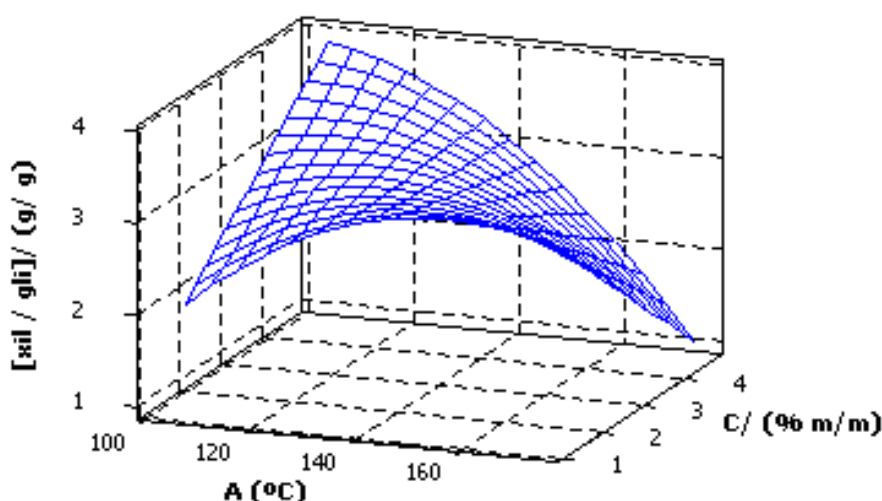


Figura 19 – Superfície de resposta da seletividade ($[xilose]/[glicose]$), com tempo de hidrólise igual a 20 minutos.

As condições iniciais de operação do reator-piloto foram determinadas por método gráfico, através da sobreposição das curvas de contorno das equações das respostas rendimento em xilose, em fenóis e a seletividade, usando como critério de restrição um rendimento mínimo em xilose de 15%, máximo em fenóis de 1,5% e seletividade mínima de 3 (g/g), fixando o tempo de hidrólise em 20 minutos.

A Figura 20 mostra a região que satisfaz as condições de restrição impostas ($Y_{Xil} \geq 15\%$, $Y_{Fenóis} \leq 1,5\%$ e seletividade $\geq 3 \text{ g g}^{-1}$) e destaca o ponto correspondente a 140 °C, 2% de ácido, como um dos pontos que foi adotado como parâmetro operacional de partida do reator-piloto.

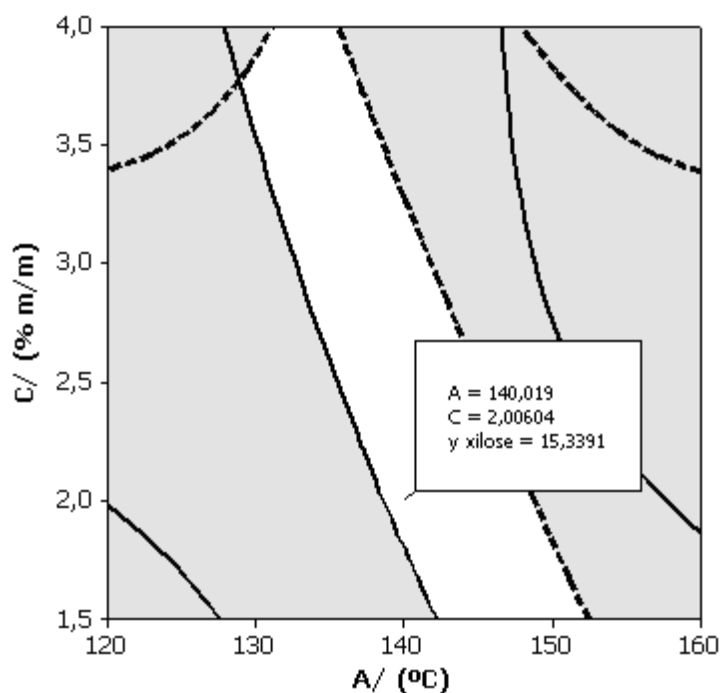


Figura 20 – Região otimizada pela superposição das curvas de contornos das respostas rendimento em xilose (Y_{xil}), em fenóis ($Y_{fenóis}$) e da seletividade ($[xilose]/[glicose]$), fixado o valor de B em 20 minutos.

A validação da equação que descreve o rendimento em *xilose* ($\hat{y}_{xil}$) e a confirmação da correta preleção da condição operacional inicial do reator-piloto foi feita pela execução de alguns experimentos no próprio equipamento. A Tabela 10 apresenta os valores do rendimento em *xilose*, predito, experimental e o erro. Observa-se que o erro relativo foi alto no ensaio a 120 °C, 30 min e 2% de ácido, em relação aos outros ensaios.

Tabela 10 – Valores de rendimento em *xilose* preditos pela equação empírica e erros, obtidos por hidrólise ácida diluída de bagaço de abacaxi em reator-piloto, munido de sistema de agitação e usando uma relação sólidos para líquido de 1:10

Fator*			Y_{xIL} [% (g/100 g MSB)]		Erro [‡]	
A	B	C	Experimental	Predito	Ajuste	Relativo (%)
120	30	2	17,39	11,83	5,56	31,98
140	20	2	15,14	14,55	0,59	3,91
160	30	2	14,78	14,75	0,03	0,22

* A – temperatura (°C); B – tempo de reação (minutos); C – Concentração de H_2SO_4 [% (m/m)]; [‡]Erro de ajuste ($Y_{exp.} - Y_{predito}$); Erro relativo = $[(Y_{exp.} - Y_{predito})/Y_{exp.}] \times 100$; MSB – massa seca de bagaço.

Conforme a Tabela 10, o erro relativo da hidrólise feita a 120 °C no reator-piloto foi cerca de 10 vezes maior que o erro obtido quando a hidrólise foi feita a 140 °C, e cerca de 100 vezes maior em relação à hidrólise realizada a 160 °C. Esta discrepância elevada provavelmente foi devido à existência de homogeneização no reator-piloto.

De acordo com Pessoa Jr. e Mancilha e Sato (1997), a existência de sistema de agitação em reator de hidrólise evita a degradação de xilose e glicose, uma vez que a homogeneização evita a formação de regiões de alta acidez, formada pela falta ou deficiência dessa operação unitária.

Embora o teor de *xilose* seja superestimado pela interferência da frutose, devido ao método analítico adotado (item 3.5.5 de “Análises físico-químicas”) não separar a frutose da xilose, o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi obtido sob as condições de hidrólise de 140 °C, 20 minutos e 2% de H₂SO₄, em reator-piloto é um substrato em potencial para processos fermentativos, como por exemplo, produção de etanol e xilitol.

4.2.2. Obtenção, concentração e caracterização físico-química do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi (HHBA)

O processo de hidrólise da fração hemicelulósica do bagaço de abacaxi foi realizado em cinco bateladas em reator-piloto, seguindo as condições pré-estabelecidas no item 4.2.1. Cada batelada foi realizada seguindo o procedimento descrito em “Material e métodos”, item 3.2.2, resultando em 260 L de hidrolisado depois de filtrado.

A Tabela 11 apresenta a composição físico-química do HHBA bruto e concentrado quatro vezes em relação a sua concentração inicial de *xilose*.

Conforme mostra a Tabela 11, a existência de glicerol no HHBAC foi porque se acrescentou antiespumante à base desse álcool durante a operação de evaporação para se evitar o arraste de hidrolisado na tubulação de vapores do evaporador.

Tabela 11 – Composição do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi (HHBA) bruto e concentrado (HHBAC) quatro vezes

Componente	Concentração (g L ⁻¹)	
	HHBA	HHBAC
Glicose	4,828 ± 0,216	17,365 ± 0,505
<i>Xilose</i> [†]	15,1195 ± 0,028	62,835 ± 0,435
Arabinose	2,977 ± 0,018	11,481 ± 0,369
Ácido acético	1,995 ± 0,133	3,51 ± 0,06
Glicerol	---	3,165 ± 0,195
Furfural	0,1113 ± 0,0079	---
Hidroximetilfurfural	0,5385 ± 0,0267	---
Compostos fenólicos	3,7933 ± 0,1844	2,412 ± 0,001
pH [‡]	0,92 ± 0,04	0,47 ± 0,04
	1,0	0,5
Brix	6,0	21,25
ART	---	138,94 ± 0,45
Densidade (20 °C) (g cm ⁻³)	1,02768 ± 0,00021	---
Condutividade (mS cm ⁻¹)	---	74,42

† ([xilose]+[frutose]); e ‡ determinado em pHômetro e papel indicador.

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi apresenta uma alta concentração de xilose e de frutose expressa como *xilose* (Tabela 11), devido ao bagaço ser oriundo da extração de suco da fruta e não ter sofrido posterior lavagem para eliminação do excedente desses carboidratos, que foram solubilizados por infusão durante a hidrólise. Fato similar ocorreu com Silva (2006), ao usar bagaço de cana-de-açúcar proveniente de moagem artesanal como matéria-prima para obtenção de hidrolisado hemicelulósico.

A presença de frutose no hidrolisado dificultou quantificar com precisão a concentração de xilose, porque o método analítico usava coluna cromatográfica (HPX-87 H), que não separa a cetose (frutose) da aldose (xilose), por terem tempos de retenção similares, resultando em sobreposição de sinal no detector e como consequência, picos sobrepostos. Tentativa infrutífera foi feita com kit enzimático (Sigma FA-20) para determinação de frutose, devido à interferência de outros açúcares, como, por exemplo, glicose em altas concentrações.

As concentrações reais de frutose e xilose existentes no hidrolisado podem ser estimadas considerando que toda a frutose existente inicialmente

no bagaço (Tabela 5) foi solubilizada por infusão durante a hidrólise e não desidratou a hidroximetilfurfural, resultando numa concentração em cerca de 4 g L^{-1} para frutose, fazendo a diferença com a concentração de *xilose* (frutose mais xilose) apresentada na Tabela 11, logo a concentração real de xilose no hidrolisado seria de 11 g L^{-1} . Então, a concentração estimada de xilose no hidrolisado seria de 11 g L^{-1} e a de frutose de 4 g L^{-1} .

Comparando os teores de açúcares no hidrolisado antes e depois do processo de concentração (Tabela 11), observa-se que o aumento nos valores foi proporcional ao fator de concentração ($FC = 4$) e que a relação da *xilose* para glicose se manteve constante (em cerca de 3). Logo, não houve degradação de açúcares durante a evaporação.

Considerando as estimativas das concentrações reais de xilose e de frutose feitas para o hidrolisado no penúltimo parágrafo, é possível aplicar a mesma lógica de raciocínio ao hidrolisado concentrado. Logo, o teor de xilose no hidrolisado concentrado seria de cerca de 40 g L^{-1} e o de hexoses (glicose mais frutose) de cerca de 30 g L^{-1} , resultando numa relação xilose para hexoses de $1,3 \text{ g g}^{-1}$. Relação compatível com a encontrada por Schirmer-Michel *et al.* (2008) na concentração de hidrolisado hemicelulósico de casca de grãos de soja por um fator de quatro vezes, que foi de $1,6 \text{ g g}^{-1}$ e bastante inferior às obtidas por Mussato e Roberto (2005) na concentração de hidrolisado hemicelulósico de resíduo lignocelulósico de cervejaria (BSG) 14 g g^{-1} , e a obtida por Rodrigues *et al.* (1998) na concentração de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, que foi de 18 g g^{-1} .

O alto teor de hexoses no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado provavelmente proporciona uma alta formação de biomassa e de etanol, em detrimento da produtividade volumétrica de xilitol por fermentação.

A presença de hexoses em meios de fermentação sintéticos ou à base de hidrolisados hemicelulósicos reprime, inicialmente, o consumo de xilose, reduzindo a produtividade e o rendimento em xilitol, no entanto os resultados registrados são conflitantes (NIGAM; SINGH, 1995; PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998b; SILVA; FELIPE; MANCILHA, 1998; WINKELHAUSEN; KUZMANOZA; 1998; FELIPE, 2004).

4.2.3. Determinação das condições de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico concentrado

O processo de destoxificação foi avaliado usando agente alcalinizante e carvão ativado.

A Figura 21 mostra as curvas de titulação de amostras de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado, usando como agentes titulantes os álcalis CaO, Ca(OH)₂ e cinza de eucalipto. Observa-se um pequeno consumo dos álcalis CaO e Ca(OH)₂ na região compreendida entre os valores de pH (4 a 10). Na titulação com cinza, o consumo foi alto com rápida saturação da solução em torno de pH 7,0 e intensa formação de espuma (Figura B.1 no Apêndice B).

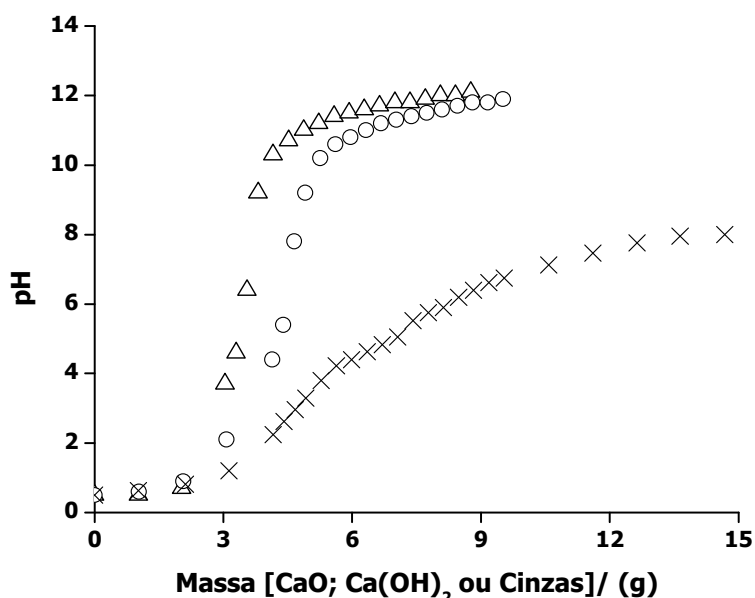


Figura 21 – Curvas de titulação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado. Titulantes: CaO (Δ), Ca(OH)₂($\circ$) e cinza ($\times$).

O consumo dos álcalis CaO, Ca(OH)₂ e de cinza de eucalipto para se ajustar o pH de HHBAC a um mesmo valor seguiu a seguinte ordem: Cinza > Ca(OH)₂> CaO, conforme apresentado na Figura 21.

Logo, o CaO foi escolhido como agente alcalinizante para dar prosseguimento à destoxificação do hidrolisado.

No intervalo de pH compreendido entre 2 a 10, o consumo de CaO foi menor que o de Ca(OH)₂, devido ser mais solúvel, todavia foi mínimo em

comparação ao da cinza. O ajuste de pH a valores acima de 10 acarreta maior consumo de álcali, como, por exemplo, para ajustar o pH do hidrolisado para 12, o consumo de CaO foi de cerca de 9,0 g, enquanto para ajustar para 10 foi em torno de 4 g.

O aumento no consumo de álcali tem implicações de ordem econômica, principalmente em escala industrial, uma vez que aumenta o consumo de ácido e a geração de gesso, além de acentuar as perdas de açúcar por degradação e por retenção no precipitado (CaSO₄).

Desta forma, na fase de otimização da destoxificação por alcalinização, devem ser confrontadas as implicações técnicas e econômicas ao se adotar alcalinização em pH com valor elevado.

A rápida saturação e a intensa formação de espuma nas amostras tituladas com cinza a pH acima de 7 foram causadas pelo baixo teor de óxidos de metais alcalinos na cinza e ao forte desprendimento de gases, como, por exemplo, CO₂ e SO₂, provenientes das reações entre os componentes da cinza com os íons livres (H₃O⁺, HSO₄⁻ e SO₄⁻²) do hidrolisado (Figura B.1 do Apêndice B).

De acordo com Holmberg e Claesson (2001) e Borlini *et al.* (2005), a cinza da queima de eucalipto possui em sua composição uma gama de óxidos dos metais alcalinos e de outros grupos, como por exemplo, CaO (30 %), SiO₂ (17%), K₂O (7%), MgO (7%), Al₂O₃ (3%), P₂O₅ (4%).

Logo, a cinza de madeira de eucalipto é um potencial agente alcalinizante para o tratamento de hidrolisados hemicelulósico por neutralização (pH ≤ 7).

As concentrações de açúcares, ácido acético, fenóis, ART e produtos de fermentação, em amostras de hidrolisado destoxificadas com CaO, seguindo planejamento experimental (material e métodos, item 3.3.1), fermentadas por *Debaryomyces hansenii* UFV-170 são mostradas na Tabela 12. Observa-se que em todos os tratamentos não houve diferenças significativas pelo teste *t* de Student, a 5% de significância, na remoção de compostos tóxicos (ácido acético e fenóis) e na formação de massa celular, produto de fermentação, em relação à testemunha.

Tabela 12 – Concentração de açúcares monoméricos, xilitol e de massa celular seca ([MCS]), provenientes da destoxificação com CaO e da fermentação de amostras de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado, seguindo planejamento experimental completo ($2^2 + 1$) tipo estrela com três repetições de ponto central

Tratamento	Fator		Concentração (g L ⁻¹)												
			HCD						HCD – Fermentado (120 horas)						
	pH	T _R	Gli	Xil	Ara	HAc ^a	Fenóis ^b	ART	ART	Gli	Xil	Ara	HAc ^c	Xilitol ^d	[MCS] ^e
1	7,0	30	20,81	64,53	12,22	3,23	2,27	138,54	59,32	0,00	22,32	11,45	3,41	14,80	5,44
2	10,0	30	20,70	62,85	12,03	3,15	2,23	133,54	53,05	0,00	26,64	11,04	3,24	17,56	5,58
3	7,0	90	21,34	64,44	12,41	3,03	2,26	138,84	46,27	0,00	29,13	10,77	3,92	16,65	5,25
4	10,0	90	21,38	64,83	12,57	3,43	2,32	139,00	44,70	0,00	27,78	9,96	3,67	16,02	5,75
5	8,5	60	19,16	58,63	12,75	3,68	2,27	137,43	49,92	0,00	28,26	10,54	3,45	15,92	5,19
6	8,5	60	19,34	59,25	12,63	3,95	2,29	129,52	48,10	0,00	28,87	12,11	3,86	15,16	5,83
7	8,5	60	18,79	59,12	12,70	3,33	2,33	128,62	49,49	0,00	29,81	11,30	3,53	16,55	5,26
8	6,4	60	22,33	64,60	12,97	3,23	2,33	141,86	44,80	0,00	24,00	11,25	3,66	16,65	5,67
9	10,6	60	20,90	61,02	12,78	3,18	2,25	139,30	47,90	0,00	29,28	10,65	3,65	16,68	5,79
10	8,5	18	21,13	64,53	12,43	3,63	2,23	138,29	52,89	0,00	24,03	11,73	3,53	13,65	5,47
11	8,5	102	19,95	58,82	12,15	3,03	2,23	133,51	55,58	0,00	28,38	12,73	3,88	15,53	5,55
testemunha [†]			21,36	65,32	12,74	3,54	2,31	145,43	67,36	6,97	38,06	12,65	3,30	11,10	5,7

T_R = tempo de reação em minutos; † = pH do hidrolisado ajustado para 6,0; Gli = glicose; Xil = xilose mais frutose; Ara = arabinose; HAc = ácido acético; HCD = hidrolisado concentrado e destoxificado; e a, b, c, e = concentrações estatisticamente não diferentes da testemunha, segundo teste *t* de Student, a 5% de significância.

A Tabela 13 mostra a estimativa dos efeitos, erros padrão, valor de t e níveis de significância para a fermentação e produção de xilitol nas amostras destoxificadas, seguindo planejamento experimental descrito em material e métodos, item 3.3.1. Observa-se que os fatores pH e tempo de reação (T_R) não apresentaram efeitos significativos ao nível de 95% de confiança na faixa de valores estudados.

Tabela 13 – Estimativas dos efeitos, erro padrão, teste t de Student e níveis de significância da produção de xilitol na fermentação de hidrolisado destoxificado seguindo planejamento completo ($2^2 + 1$) com seis pontos estrela e três repetições de ponto central

Fatores e Interações	Estimativa	Erro-Padrão	t	p-valor
Média	15,8767	0,4470	35,519	0,000
pH	0,2716	0,2737	0,992	0,367 ^{ns}
T_R	0,3711	0,2737	1,356	0,233 ^{ns}
pH x pH	0,5517	0,3258	1,693	0,151 ^{ns}
$T_R \times T_R$	-0,4858	0,3258	-1,491	0,196 ^{ns}
pH x T_R	-0,8475	0,3871	-2,189	0,080 ^{ns}

ns = não significativo ($p > 0,05$), a 95% de confiança.

As variações dos fatores pH e tempo de reação (T_R) do processo de destoxificação por alcalinização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado não provocaram efeitos significativos para melhorar as respostas analisadas (Tabela 12), porém foram eficientes na elevação do pH, tornando o hidrolisado fermentescível.

A destoxificação por método de alcalinização elevando o pH do hidrolisado a valores altos (9 a 12) acarreta modificações químicas nos inibidores a compostos pouco tóxicos ou atóxicos, precipitação de íons metálicos, porém acentua as perdas de açúcares por degradação, como, por exemplo, formação de ácido láctico, além de o gesso remanescente da reacidificação do hidrolisado proporcionar problemas nos equipamentos e interferências no monitoramento do processo fermentativo (BRUIJN; KIEBOOM; VAN BEKKUM, 1986; MOHAGHEGHI; RUTH; SHELL, 2006; HODGE *et al.*, 2009).

Assim sendo, a alcalinização do hidrolisado, elevando o pH para 6,4 com CaO e homogeneizando durante 60 minutos (tratamento 8 da Tabela 12), foi selecionada como o tratamento padrão para tornar o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado fermentescível.

O tratamento por alcalinização ou neutralização com CaO ou Ca(OH)_2 é um método químico de destoxificação eficiente na remoção dos furaldeídos e metais (MARTINEZ *et al.*, 2000; RANATUNGA *et al.*, 2000), enquanto o tratamento por adsorção com carvão ativado é um método físico eficiente na remoção dos fenóis e boa parte dos ácidos orgânicos (BUHNER; AGBLEVOR, 2004). Logo, a combinação destes dois tratamentos resulta em uma melhor remoção dos compostos inibidores de hidrolisados (HODGE *et al.*, 2009).

A Figura 22 apresenta o resultado do tratamento combinado de neutralização e adsorção com carvão (2 a 5% m/v) de amostras de hidrolisado hemicelulósico concentrado. O tratamento usando 5% de carvão foi mais eficiente na remoção dos compostos fenólicos (60 %) e acarretou pouca perda de açúcares redutores totais (10%).

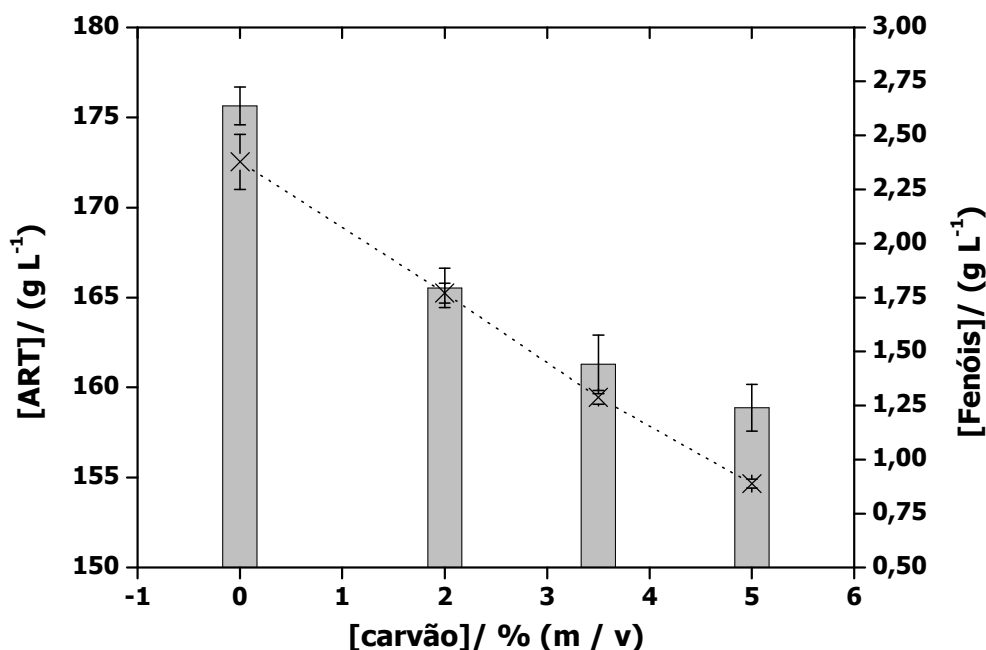


Figura 22 – Teores de compostos fenólicos (×) e de ART (□) em amostras de hidrolisado concentrado neutralizadas e tratadas com carvão ativado.

A Figura 23 apresenta o aspecto visual de amostras de hidrolisado concentrado tratadas por método combinado de neutralização com adsorção, usando CaO ou cinza e carvão ativado como adsorvente. Observa-se que a coloração das amostras tratadas com CaO ou cinza ficaram mais escuras [Figura 23 (1)] do que o branco (HHBAC), porém não diferem entre si. Quando tratadas com carvão ativado a 60 °C a clarificação foi maior [Figuras 23(2), (3) e (4)].

A Figura 23 mostra que a adsorção feita a 60 °C melhora a clarificação do hidrolisado.

Hodge *et al.* (2009) empregaram o mesmo método e obtiveram uma remoção dos compostos fenólicos compreendida entre 86 a 98 % em hidrolisado hemicelulósico de madeira. Mussato e Roberto (2001) obtiveram remoções menores, em cerca de 30% na destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, provavelmente devido à temperatura de adsorção (30 °C).

Então, o tratamento combinado de alcalinização com CaO (pH = 6,4; 200 rpm/1h a 30 °C), seguido por ajuste do pH ao de fermentação (5,5 ou 6,0) com H₃PO₄ concentrado e adsorção com carvão ativado (5% m/v, 200 rpm, 60 °C por 1 h) foi selecionado como método padrão de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado.

4.3. Fermentação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi

Os ensaios de fermentação foram realizados em meiossemidefinido e complexo, contendo xilose, glicose ou uma mistura deles, além de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado (HHBAC).

4.3.1. Crescimento e parâmetros fermentativos de *Debaryomyces hansenii* UFV-170 em meios semidefinido e complexo

A Figura 24 apresenta a curva (Figura 24 A) e a variação da velocidade específica de crescimento (μ) (Figura 24 B), ao longo de 30 h de cultivo de *D. hansenii* UFV-170 em meio semidefinido, usando xilose (20 g L⁻¹) como fonte de carbono, formulado conforme descrito no item 3.4 de “Material e métodos”.



Figura 23 – Aspecto visual de amostras de hidrolisado hemicelulósico concentrado tratadas: 1. Neutralização ($\text{pH} = 6,4$) com CaO ou cinza; 2, 3 e 4. Neutralização ($\text{pH} = 6,4$) com CaO ou cinza antes e após adsorção com carvão ativado (5% m/v) a 30°C (ADS – frio) ou a 60°C (ADS – quente).

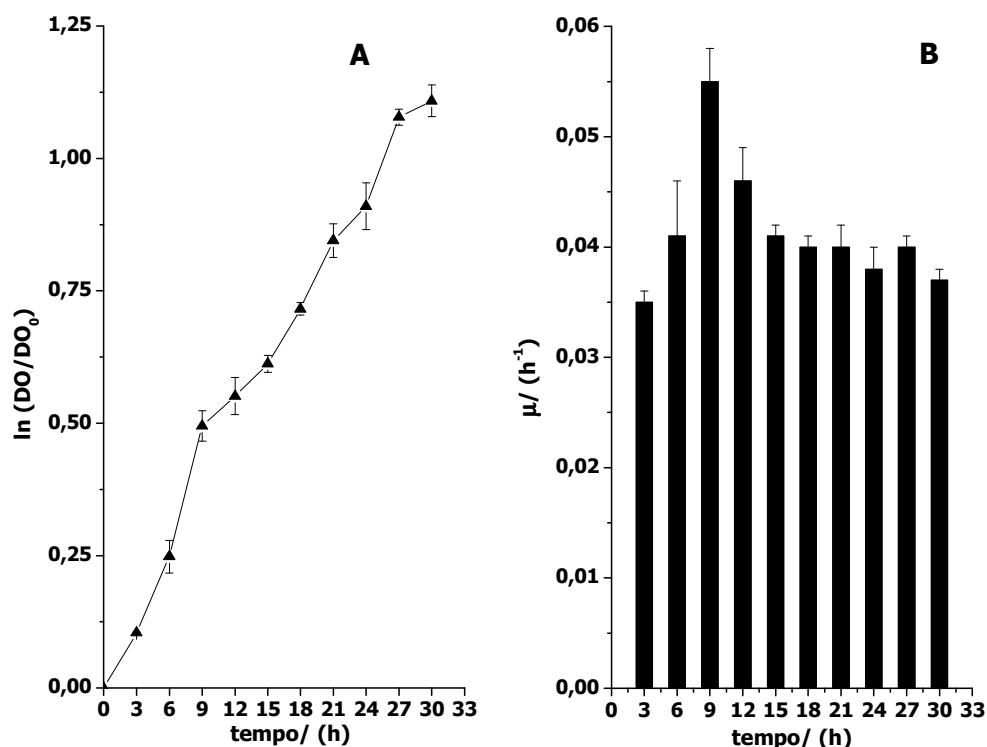


Figura 24 – Crescimento (A) e variação da velocidade de crescimento (B) de *Debaryomyces hansenii* UFV-170 ($X_0 = 0,6 \text{ g L}^{-1}$) em meio semidefinido (KH_2PO_4 $6,8 \text{ g L}^{-1}$; K_2HPO_4 $3,4 \text{ g L}^{-1}$; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ $1,0 \text{ g L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $1,1 \text{ g L}^{-1}$; extrato de levedura 5 g L^{-1} ; xilose 20 g L^{-1}), durante 30 horas de cultivo em frascos agitados (pH = 6,0; 30 °C e 200 rpm).

A velocidade específica de crescimento foi de $0,04 \text{ h}^{-1}$ até 27 h, quando se iniciou a fase de desaceleração de crescimento (Figura 24 A).

Na avaliação do crescimento de *Debaryomyces hansenii* UFV-170 em meio semidefinido (Figura 24), o valor da velocidade específica máxima de crescimento ($0,055 \text{ h}^{-1}$) foi cerca de cinco vezes menor que o valor determinado por Sampaio *et al.* (2005) nas primeiras 5 horas de cultivo e próximo ao compreendido entre 15 e 24 horas ($0,07 \text{ h}^{-1}$), em que constatarem maiores consumo de xilose e produção de xilitol. Sampaio e colaboradores (2005) trabalharam com uma concentração celular cerca de dez vezes menor, maior concentração de xilose (50 g L^{-1}) e nas mesmas condições de cultivo do presente trabalho.

Testes de crescimento foram feitos em meios YPX, YPD e YPDX. A Figura 25 apresenta as curvas de crescimento de *Debaryomyces hansenii* UFV-170 em meios complexos com peptona (5 g L^{-1}), extrato de levedura

(5 g L⁻¹) e como substrato glicose (20 g L⁻¹), mistura de glicose (5 g L⁻¹) mais xilose (15 g L⁻¹) e apenas xilose (20 g L⁻¹).

Conforme a Figura 25 (B), nas três primeiras horas de cultivo, as velocidades específicas de crescimento em xilose e em glicose atingiu seus valores máximos 0,253 e 0,207 h⁻¹, respectivamente. Nesse mesmo intervalo as velocidades específicas em xilose e na mistura de açúcares foram similares, no entanto, acima desse período a velocidade no meio misto prevaleceu e atingiu seu valor máximo (0,238 h⁻¹) em 6 horas. Acima desses intervalos ocorreram desacelerações em todos os cultivos e uma aparente estabilidade depois de 18 horas.

A Figura 25 mostra que o crescimento em meio complexo com fontes diferentes de carbono e sua mistura resultou em velocidades específicas maiores que as do meio semidefinido (Figura 24). Fato que corrobora a carência de algum nutriente essencial ao crescimento das células no meio semidefinido.

Os valores das velocidades específicas máximas de crescimento determinados no meio complexo com glicose (0,253 h⁻¹), xilose (0,207 h⁻¹) e na mistura desses açúcares (0,238 h⁻¹) são um pouco semelhantes aos valores encontrados por Govindaswamy e Vane (2007), que foram de 0,291, 0,206 e de 0,263 h⁻¹, respectivamente, ao avaliarem a cinética de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST), em meio complexo, contendo 20 g L⁻¹ de glicose, 20 g L⁻¹ de xilose e na mistura de 4 g L⁻¹ glicose com 16 g L⁻¹ de xilose.

O motivo de a velocidade específica máxima de crescimento em glicose (0,253 h⁻¹) ser maior que em xilose (0,207 h⁻¹) deve-se ao mais rápido metabolismo da hexose, devido às enzimas serem constitutivas, sendo mantidas sempre em níveis altos na célula e à maior afinidade do sistema transportador de açúcares pela glicose (WHITE, 2000).

O fato de o crescimento no meio misto não apresentar comportamento diáuxico e prevalecer sobre o crescimento em xilose após três horas de cultivo deve-se ao consumo simultâneo das duas fontes de carbono e ao metabolismo favorável da glicose na célula. Uma vez que a concentração de glicose no meio misto ([glicose]/[xilose] = 1/3) não foi suficiente para causar completa inibição nas enzimas do metabolismo inicial da xilose (xilose

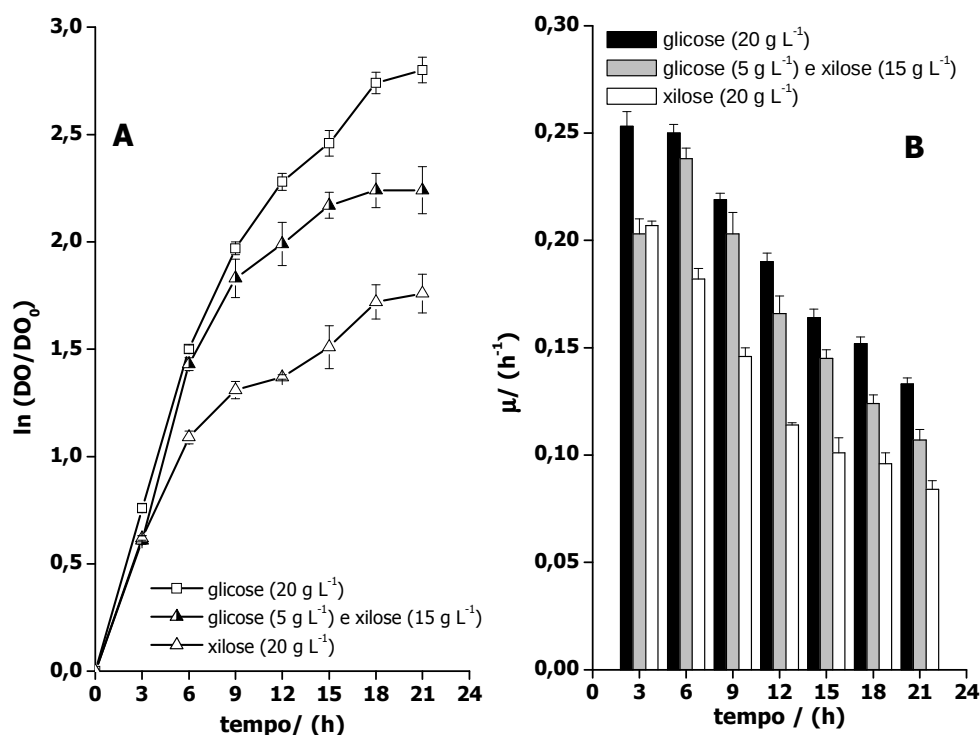


Figura 25 – Crescimento (A) e variação da velocidade de crescimento (B) de *Debaryomyces hansenii* UFV-170 ($X_0 = 0,6 \text{ g L}^{-1}$) em frascos agitados (pH = 6,0; 30 °C e 200 rpm), usando meio complexo (peptona 5 g L⁻¹; extrato de levedura 5 g L⁻¹; e como substratos glicose 20 g L⁻¹, xilose 20 g L⁻¹ ou mistura de glicose 5 g L⁻¹ mais xilose 15 g L⁻¹) açúcares. (B) Variação da taxa específica de crescimento (μ) ao longo de 21 h de cultivo.

redutase e xilitol desidrogenase), e a rápida cinética enzimática de conversão da glicose em energia e produtos intermediários para a multiplicação celular incrementou a taxa de crescimento.

A Tabela 14 mostra os parâmetros fermentativos de culturas de *Debaryomyces hansenii* UFV-170 em frascos agitados (30 °C e 200 rpm), contendo meio semidefinido, usando xilose (52 g L⁻¹) como fonte de carbono.

Quanto ao aspecto de produção de xilitol em meio semidefinido, a *Debaryomyces hansenii* UFV-170 mostrou-se uma boa produtora de xilitol de xilose, por apresentar um alto rendimento em xilitol, ao comparar com alguns trabalhos desenvolvidos em condições semelhantes, conforme Tabela 15.

A Figura 26 apresenta os perfis de consumo de xilose, produção de xilitol e de biomassa em meio semidefinido (KH₂PO₄ 6,8 g L⁻¹; K₂HPO₄

Tabela 14 – Parâmetros da fermentação em meio semidefinido (KH_2PO_4 6,8 g L⁻¹; K_2HPO_4 3,4 g L⁻¹; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,1 g L⁻¹; extrato de levedura 5 g L⁻¹; xilose 52 g L⁻¹), contendo xilose como fonte de carbono, por *Debaryomyces hansenii* UVF-170 em frascos agitados (30 °C e 200 rpm)

Parâmetro	Valor
S_0 (g L ⁻¹)	52,21 ± 0,03
T_f (h)	96
% $S_{\text{consumido}}$	95,11 ± 0,20
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0,062 ± 0,001
$Y_{X/S}$ (g g ⁻¹)	0,22 ± 0,01
$P_{\text{máx}}$ (g L ⁻¹)	36,96 ± 0,02
Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,38 ± 0,01
q_P (g g ⁻¹ h ⁻¹)	0,06
$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	0,74 ± 0,01
η (%)	81 ± 1

Tabela 15 – Parâmetros fermentativos da bioconversão de xilose a xilitol por leveduras do presente trabalho e de registros da literatura

Parâmetro	Presente Pesquisa	Sampaio <i>et al.</i> (2008)	Gírio <i>et al.</i> (2000)	Meyrial <i>et al.</i> (1991)
	<i>D. hansenii</i> ^a UVF-170	<i>D. hansenii</i> UVF-170	<i>D. hansenii</i>	<i>C. guilliermondii</i> ^b
S_0 (g L ⁻¹)	52,21	53	37	50
T_f (h)	96	72	160	165
% $S_{\text{consumido}}$	95,11	100	---	98,3
$\mu_{\text{máx}}$ (h ⁻¹)	0,062	---	0,25	0,11
$Y_{X/S}$ (g g ⁻¹)	0,22	---	0,31	0,09
P (g L ⁻¹)	36,96	37	---	30,9
Q_P (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,38	1,0	0,28	---
q_P (g g ⁻¹ h ⁻¹)	0,06	0,22	0,06	0,10
$Y_{P/S}$ (g g ⁻¹)	0,74	0,76	0,59	0,59
η (%)	81	---	---	---

a = *Debaryomyces hansenii*; e b = *Candida guilliermondii*.

3,4 g L⁻¹; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 g L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,1 g L⁻¹; extrato de levedura 5 g L⁻¹; e xilose 52 g L⁻¹). Observa-se que no período compreendido entre 24 a 72 horas o consumo de xilose foi acelerado, ocorrendo o acúmulo máximo de xilitol em 96 h de cultivo. Acima desse período, a produção de xilitol declinou, porque as células passaram a consumi-lo; no entanto, a produção de massa celular continuou aumentando.

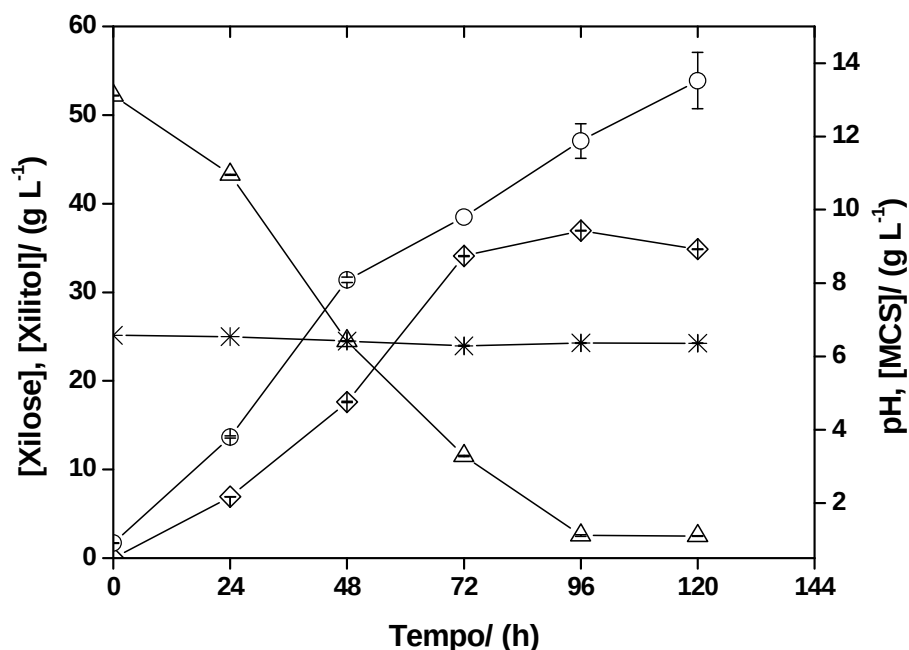


Figura 26 – Perfil de consumo de xilose (-△-), produção de xilitol (-◇-), massa celular seca (-○-) e variação de pH (-*-), durante a fermentação em meio semidefinido, contendo xilose (52 gL⁻¹) por *Debaryomyces hansenii* UFV-170, em frascos agitados(30°C e 200 rpm).

O consumo de xilitol pela levedura foi também constatado por Barbosa *et al.* (1988) na fermentação de meio semidefinido com xilose por *Candida guilliermondii*.

Em relação ao maior crescimento das células ao consumirem o xilitol, Sampaio *et al.* (2009) constataram que a *Debaryomyces hansenii* UFV-170 em meio semidefinido, contendo xilitol como fonte de carbono, apresentou crescimento específico maior que em xilose.

Logo, como o xilitol é o produto desejado, a fermentação deve ser interrompida antes que a xilose seja exaurida do meio, preservando o alditol.

4.3.2. Avaliação de dois níveis de inóculo na fermentação do HHBAC por *Debaryomyces hansenii* UFV-170

A Tabela 16 apresenta o efeito da concentração inicial de inóculo nos parâmetros da fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi, por *Debaryomyces hansenii* UFV-170.

Tabela 16 – Efeito da concentração de inóculo na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi por *Debaryomyces hansenii* UFV-170 em 96 horas

Parâmetro	Concentração de Inóculo (g L ⁻¹)	
	0,98	3,02
T _f (h)	96	96
% [Xilose] _{consumida}	75	67
[Xilitol] _{máx} (g L ⁻¹)	17,3	15,1
Q _{Xilitol} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,18	0,16
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,038	0,02

O aumento no teor de inóculo de 0,98 g L⁻¹ para 3 g L⁻¹ reduziu a produtividade volumétrica de xilitol em cerca de 10%, a velocidade específica máxima de crescimento em 2,33 vezes, e a sobra de *xilose* aumentou em 8%.

As Figuras 27 e 28 apresentam o efeito da concentração de inóculo no consumo de açúcares, formação de produtos, variação de pH, durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi, por *Debaryomyces hansenii* UFV-170.

Observa-se na Figura 27(A) que a glicose foi exaurida do meio com 48 h de cultivo, e que a *xilose* foi parcialmente consumida em ambos os cultivos, porém, em maior quantidade no cultivo com teor de inóculo menor (Figura 27(B)).

Quanto à formação de produtos, houve um crescimento celular maior no meio inoculado com 1 g L⁻¹ (Figura 27 C). A produção de xilitol foi maior no cultivo com 3 g L⁻¹ de inóculo até 48 h de fermentação, e acima desse período ocorreu uma inversão (Figura 27 D), comportamento semelhante na formação de etanol (Figura 28 B). Ocorreram também formação de ácido acético e variação de pH em ambos os cultivos (Figura 28 A e C).

A alta concentração de hexoses (glicose e frutose) no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi favoreceu mais o crescimento celular na fermentação com menor teor de inóculo (1 g L⁻¹), gerando células resistentes à toxidez do meio, resultando em melhores parâmetros fermentativos. Por outro lado, na fermentação com alto teor de inóculo (3 g L⁻¹) as condições do meio não foram suficientes para dar suporte a um

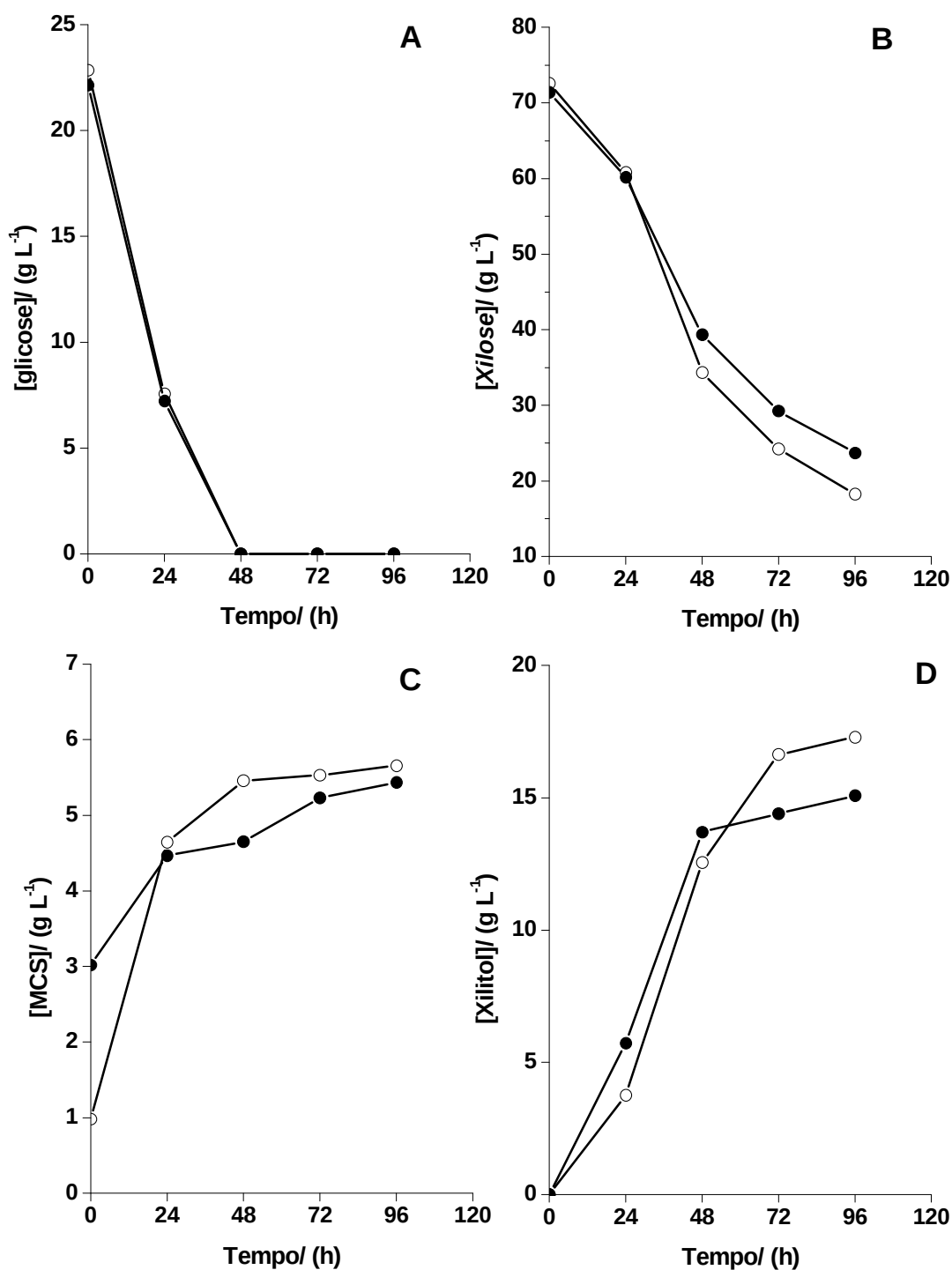


Figura 27 – Efeito da concentração de inóculo [1 g L⁻¹ (○) e 3 g L⁻¹ (●)] no consumo de glicose (A) e xilose (B), na produção de massa celular (C) e de xilitol (D), durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado, por *Debaryomyces hansenii* UFV-170 em frascos agitados (30 °C e 200 rpm).

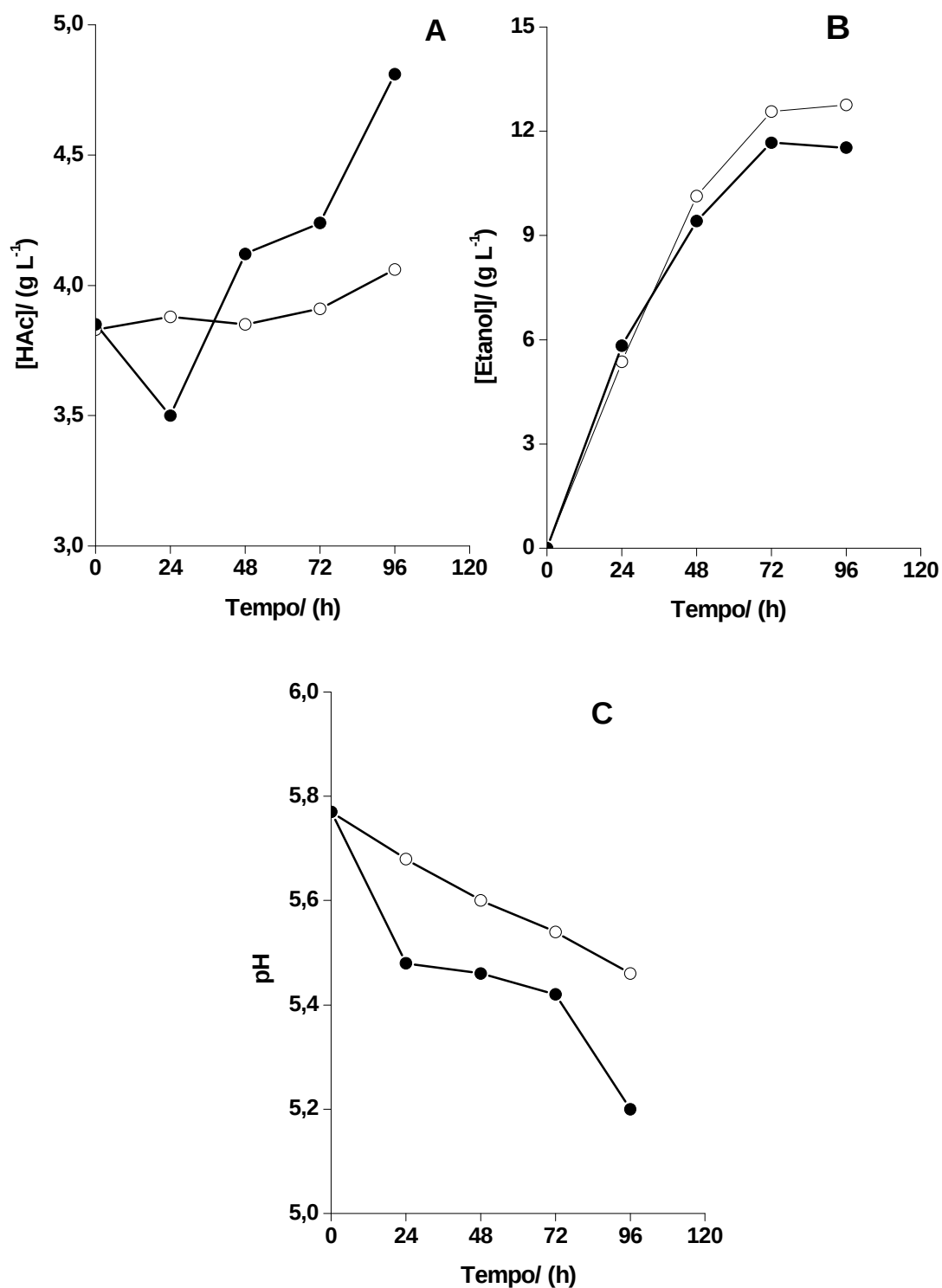


Figura 28 – Efeito da concentração de inóculo [1 g L^{-1} (-○-) e 3 g L^{-1} (-●-)] na produção de ácido acético [HAc] (A), etanol (B) e variação de pH (C), durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado, por *Debaryomyces hansenii* UFV-170 em frascos agitados (30°C e 200 rpm).

alto crescimento celular e produtividade, embora o aumento da demanda de O₂ ou de algum nutriente essencial no decorrer do processo possa ser responsável pelos valores baixos dos parâmetros fermentativos.

Desta maneira, o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi, quando inoculado com baixo teor de inóculo (1 g L⁻¹), favoreceu mais o crescimento celular, gerando células adaptadas à toxidez do meio, que resultaram em melhores parâmetros fermentativos. Embora seja registrado na literatura que a alta concentração de hexoses em hidrolisados hemicelulósicos reduza a produtividade e o rendimento em xilitol, de forma que na otimização da operação de hidrólise ácido diluído de resíduos lignocelulósicos para obtenção de hidrolisados hemicelulósicos uma das metas é maximizar a solubilização de xilose e minimizar a de glicose, ou seja, conseguir uma alta seletividade ([xilose]/[glicose]) (CARRASCO; RIVIERES; ROY, 1992; ROBERTO; MUSSATO; RODRIGUES, 2003).

4.3.3. Avaliação da destoxificação do HHBAC sobre a produção de xilitol por *Debaryomyces hansenii* UFV-170

A Figura 29 mostra a densidade celular (n^o células/mL) de *Debaryomyces hansenii* UFV-170, no início e final da fermentação de amostras de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado por método simples de neutralização com CaO ou cinza (pH = 6,4 por 1 hora de agitação), ou combinado neutralização e adsorção com carvão ativado (5%, 60 °C, 200 rpm/1h).

Observa-se que, no final da fermentação (120 horas), a densidade foi maior nos meios tratados com cinza; além do mais, o uso de tratamento combinado de destoxificação favoreceu o crescimento.

A Tabela 17 apresenta os parâmetros da fermentação de amostras de hidrolisado hemicelulósico destoxificadas por tratamentos simples de neutralização ou combinado com adsorção com carvão ativado.

Observa-se na Tabela 17 que a cinza aumentou em cerca de 20 % a produção e a produtividade volumétrica em xilitol, por disponibilizar nutrientes minerais durante o tratamento do hidrolisado, melhorando a produção de xilitol e o crescimento celular, enquanto o uso do carvão ativado

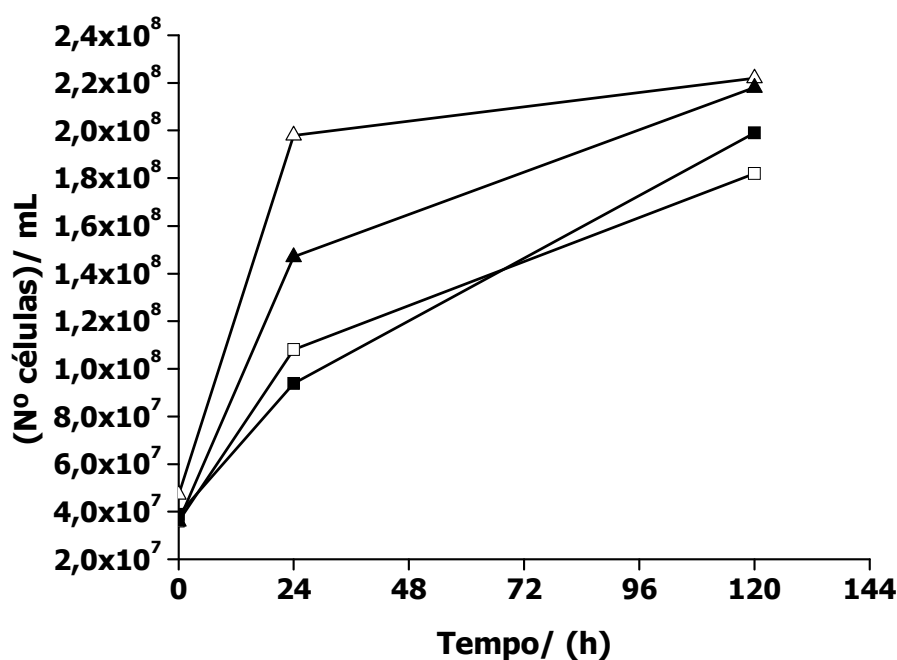


Figura 29 – Densidade celular durante a fermentação de hidrolisado hemice-lulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado com CaO (□-), CaO e carvão (■-), cinza (△-) e cinza e carvão (▲-), por *Debaryomyces hansenii* UFV-170, em frascos agitados (30 °C e 200 rpm).

Tabela 17 – Parâmetros da fermentação de amostras de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e tratadas CaO ou cinza, por método simples de neutralização ou combinado com adsorção, usando *Debaryomyces hansenii* UFV-170 em frascos agitados (30 °C e 200 rpm)

Parâmetro	Tratamento			
	CaO	Cinza	CaO + CA [†]	Cinza + CA
T _f (h)	120	120	72	96
% [Xilose] _{consumida}	80	80	75	78
[Xilitol] _{máx} (g L ⁻¹)	13,44	16,11	17,66	18,79
Q _{Xilitol} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,112	0,134	0,245	0,196
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,045	0,040	0,041	0,056

† CA = carvão ativado.

removeu de forma parcial esses nutrientes, além dos compostos tóxicos. O uso do tratamento combinado CaO e carvão proporcionou aumento na produção e na produtividade volumétrica em relação ao tratamento simples com CaO, embora a cal não seja fonte de nutrientes.

Logo, o tratamento combinado de cinza de eucalipto com carvão ativado é um método possível de destoxificação de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de abacaxi, porque a cinza age como alcalinizante e suplementa o hidrolisado com minerais, e o carvão ativado remove os compostos tóxicos, resultando em ganhos de produção e redução de custos, uma vez que a cinza é um insumo de valor irrisório, proveniente da queima de lenha em caldeiras ou em fornos de indústrias.

O efeito do tratamento de alcalinização com cinza de madeira Abeto na remoção de compostos tóxicos e na melhoria da fermentação alcoólica de hidrolisado hemicelulósico foi investigada por Miyafuji *et al.* (2003). Os pesquisadores constataram que o tratamento feito com cinza foi mais eficiente que usando CaO, por ter removido mais furaldeídos (cerca de 20%) e compostos derivados de lignina (cerca de 80% de ácido p-hidroxi-benzóico e aldeído coniferil), enquanto o tratamento com CaO não foi eficaz na remoção dos furaldeídos e aumentou o teor de ácido vanílico por conversão da vanilina. Nos testes de fermentação houve um expressivo aumento na produtividade em etanol. Concluíram que a cinza de madeira é mais eficiente na remoção de furaldeídos e dos compostos fenólicos, além de ser excelente fonte de nutrientes.

De acordo com Borlini *et al.* (2005), a cinza de eucalipto possui em sua composição 7,2% de MgO e 3,7 % de P₂O₅, que são fontes de Mg e P, macronutrientes essenciais na atividade de enzimas e na síntese de ácidos nucleicos e fosfolipídios (BROCK *et al.*, 1994).

Em análise de custos de produção de etanol a partir de hidrolisado de madeira, von Sivers *et al.* (1994) verificaram que a operação de destoxificação por tratamento químico onera em 22 % o total dos custos, sendo que 7% são gastos com álcali (CaO). Os gastos com nutrientes para fermentação, relativos ao óxido de magnésio (MgO) e H₃PO₄, compõem 3% do total.

As Figuras 30 e 31 apresentam os perfis de consumo de açúcares e produtos da fermentação das amostras do hidrolisado destoxificado.

Os tratamentos usando cinza com ou sem carvão ativado favoreceram a produção de massa celular e de xilitol, em comparação com CaO (Figura 30 C e D). Quanto aos teores de ácido acético, ocorreu nas

primeiras 24 h de fermentação uma redução nos níveis, porém, acima desse período, a concentração aumentou e o pH se reduziu (Figura 31(A) e (C)).

4.3.4. Avaliação da temperatura de destoxificação e do pH inicial do HHBAC sobre a produção de xilitol por *D. hansenii* UFV-170

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado foi fermentado em biorreator, para avaliar os efeitos de dois tratamentos de adsorção com carvão ativado (30 e 60 °C) e a interferência do pH inicial do meio (5,5 e 6,0) sobre a produção de xilitol, conforme descrito em “Material e método” item 3.4.1.

A Tabela 18 apresenta os parâmetros cinéticos da fermentação em batelada de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi, por *Debaryomyces hansenii* UFV-170 em biorreator.

O tratamento de destoxificação com carvão ativado a 60 °C e pH₀ do meio de 5,95 aumentou a produção e a produtividade volumétrica em xilitol em 140% em relação ao tratamento com carvão a 30° C e pH₀ de 5,47 (Tabela 18).

A Figura 32 apresenta os perfis de consumo de açúcares e formação de produtos da fermentação em batelada de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado, destoxificado por neutralização com CaO e adsorção com carvão ativado (30 ou a 60 °C), por *Debaryomyces hansenii* UFV-170, em biorreator tipo tanque agitado (pH 5,5 ou 6,0; 30 °C; 2,5 vvm e 200 rpm).

Conforme a Figura 32 (A), a glicose foi exaurida do meio tratado por neutralização e por adsorção a 60 °C em 48 horas de fermentação e em 72 horas do meio tratado a 30 °C. O consumo da *xilose* foi incompleto, porém maior no cultivo com meio tratado a 60 °C (Figura 32 (B)).

As concentrações de massa celular, xilitol e etanol foram cerca de duas vezes maiores no meio tratado por adsorção a 60 °C, que as concentrações no meio tratado a 30 °C no final da fermentação (120 horas) (Figuras 32(C, D) e 33(B)). Quanto à concentração de ácido acético, houve variação em ambos os cultivos e redução de pH (Figura 33 A e C).

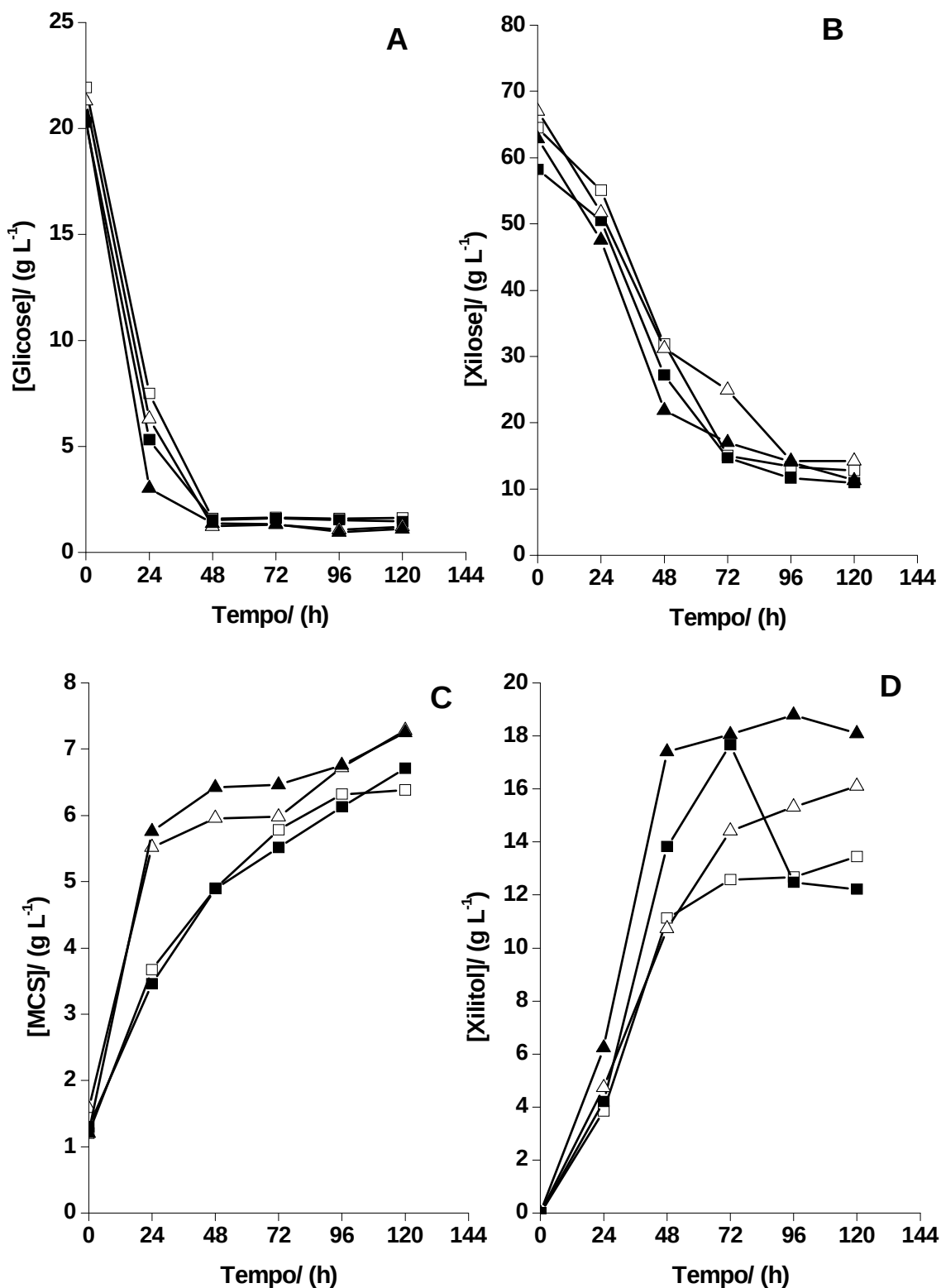


Figura 30 – Perfis de consumo de glicose (A) e xilose (B), formação de massa celular (C) e xilitol (D), durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado com CaO (-□-), CaO e carvão (-■-), cinza (-△-) e cinza e carvão (-▲-), por *Debaryomyces hansenii* UFV-170 em frascos agitados (30 °C e 200 rpm).

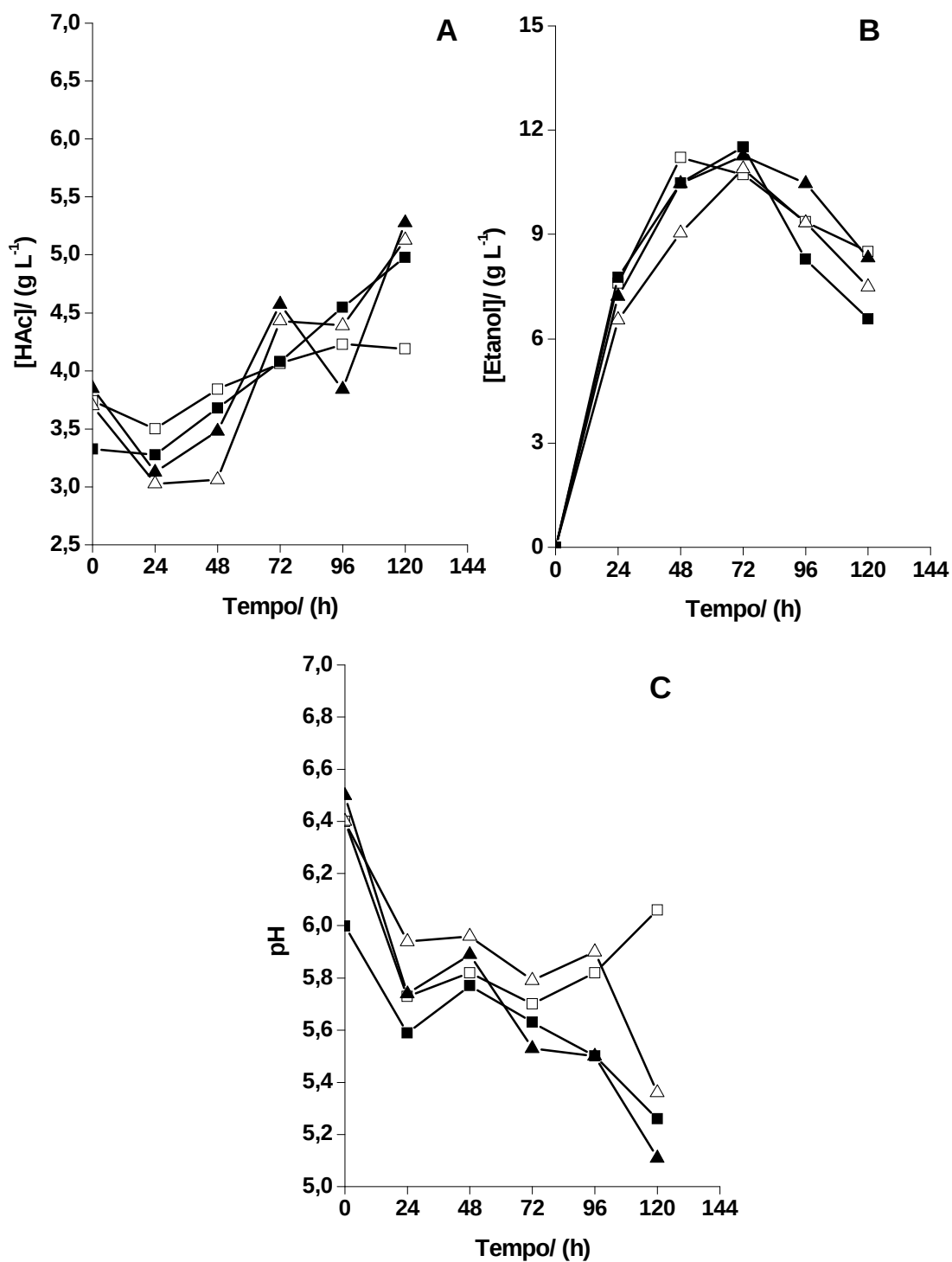


Figura 31 – Perfis de formação ácido acético [HAc] (A) e etanol (B) e variação de pH (C), durante a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado com CaO (-□-), CaO e carvão (-■-), cinza (-△-) e cinza e carvão (-▲-), por *Debaryomyces hansenii* UFV-170 em frascos agitados (30 °C e 200 rpm).

Tabela 18 – Parâmetros fermentativos da fermentação em batelada em biorreator de hidrolisado hemicelulósico de abacaxi concentrado e destoxificado, por *Debaryomyces hansenii* UFV-170

Parâmetro	Condição	
	I [☆]	II [★]
V ₀ (L)	1,0	1,0
Agitação (rpm)	200	200
Aeração (vvm)	2,5	2,5
T _f (h)	120	120
pH ₀	5,47	5,95
% [Xilose] _{consumida}	60	86
[Xilitol] _{máx} (g L ⁻¹)	11,89	28,38
Q _{Xilitol} (g L ⁻¹ h ⁻¹)	0,1	0,24
μ _{máx} (h ⁻¹)	0,029	0,032

☆ = hidrolisado destoxificado por tratamento combinado, neutralização com CaO.

(pH = 6,4 por 1 hora) e adsorção com carvão ativado (5 % m/v, 30 °C, 200 rpm/1 hora).

★ = hidrolisado destoxificado por tratamento combinado, neutralização com CaO.

(pH = 6,4 por 1 hora) e adsorção com carvão ativado (5 % m/v, 60 °C, 200 rpm/1 hora).

As Figuras 32(D) e 33(B) mostram que nas primeiras 24 horas de fermentação houve produção de xilitol e etanol, porque o consumo das hexoses (glicose e frutose) e da xilose foi simultâneo. Fato também constatado por Mussato e Roberto (2003) na fermentação em batelada em biorreator de hidrolisado hemicelulósico concentrado de palha de arroz, por *Candida guilliermondii* FTI 20037, e também por Preziosi-Belloy, Nolleau; Navarro (2000) na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de madeira de álamo. Mussato e Roberto (2003) justificaram que o consumo simultâneo dos açúcares (glicose e xilose) foi porque o inóculo cresceu em meio semidefinido com xilose.

O menor consumo de açúcares e produção de xilitol na fermentação do hidrolisado destoxificado com carvão 30 °C e pH inicial do meio de 5,5 (Figura 32) mostra que a destoxificação com carvão não é eficiente na remoção dos compostos tóxicos e que o pH inicial de fermentação (pH = 5,5) acentuou a toxidez do meio.

O aumento da concentração de íons H⁺ no meio de fermentação reduz a dissociação do ácido acético, ocorrendo uma maior difusão do ácido na membrana celular da levedura, reduzindo o pH citoplasmático, que desestabiliza o equilíbrio fisiológico da célula, proporcionando maiores gastos de energia (ATP) para manter a concentração de H⁺ próximo a 10⁻⁷ M, em

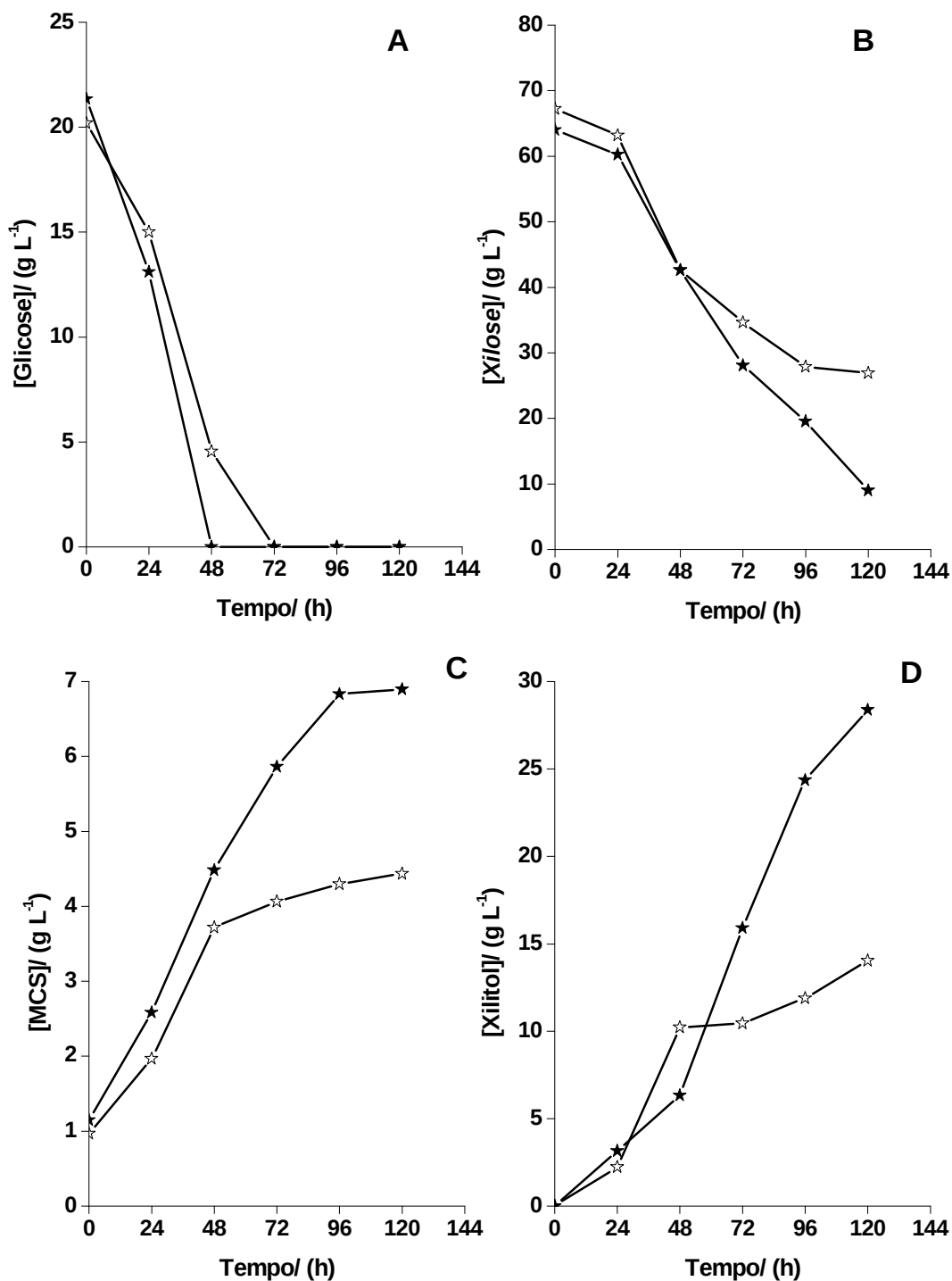


Figura 32 – Perfis de consumo de glicose (A) e xilose (B), formação de massa celular [MCS] (C) e xilitol (D), durante a fermentação em batelada de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado por neutralização (pH = 6,4) com CaO e adsorção com carvão ativado (5% m/v) a 30 °C (-☆-) ou a 60 °C (-★-), em biorreator tipo tanque agitado (30 °C, 2,5 vvm e 200 rpm) por *Debaryomyces hansenii* UFV-170.

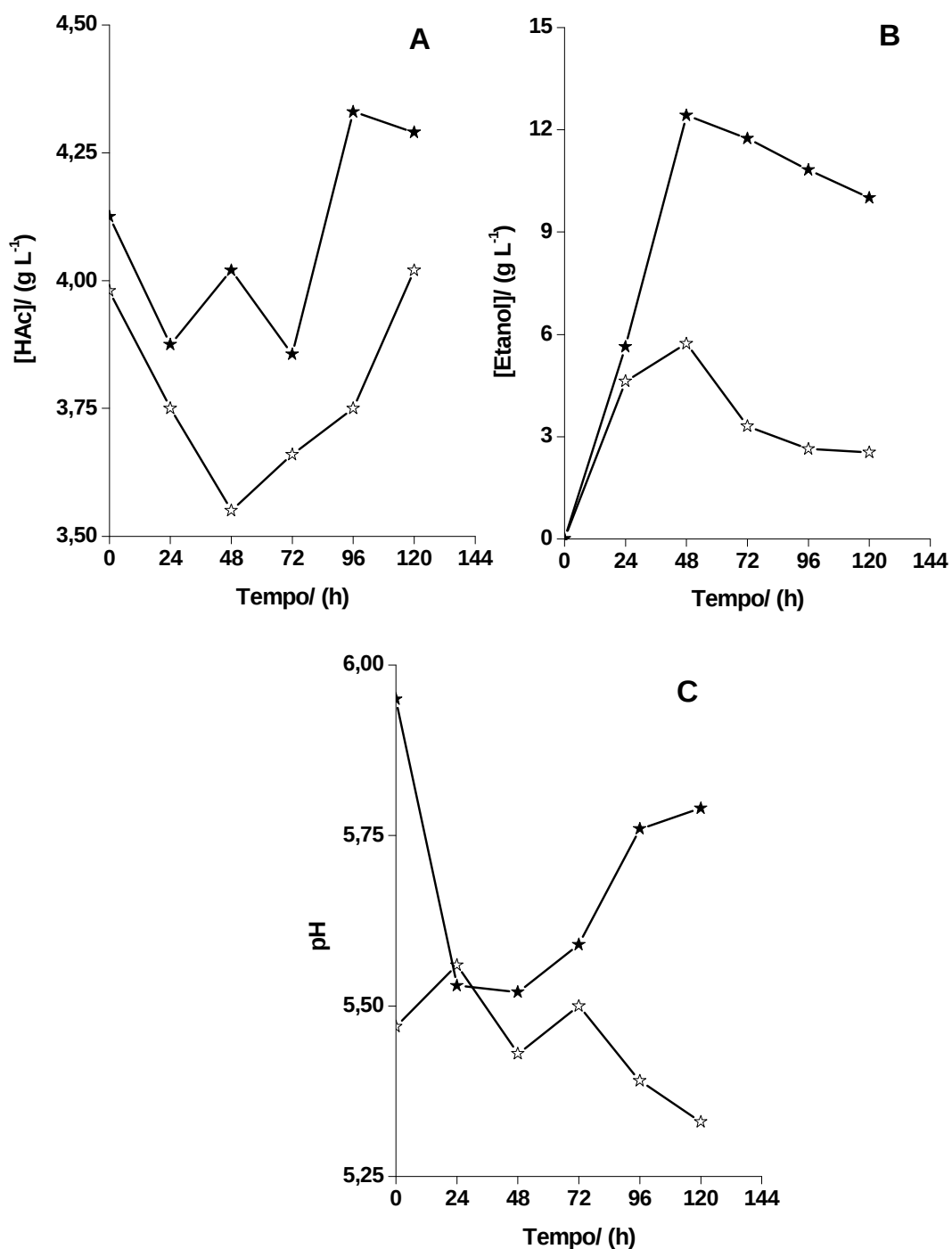


Figura 33 – Perfis de formação de ácido acético [HAc] (A), etanol (B) e variação de pH (C), durante a fermentação em batelada de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi concentrado e destoxificado por neutralização (pH = 6,4) com CaO e adsorção com carvão ativado (5% m/v) a 30 °C (-☆-) ou a 60 °C (-★-), em biorreator tipo tanque agitado (30 °C, 2,5 vvm e 200 rpm) por *Debaryomyces hansenii* UFV-170.

detrimento dos processos essenciais de manutenção e crescimento (PALMQVIST; HANH-HÄGERDAL, 2000b).

Aplicando a equação de Henderson-Hasselbach aos valores de pH e concentração de ácido acético dos dois meios de fermentação testados (-☆- $\text{pH}_0 = 5,47$, $[\text{CH}_3\text{COOH}]_0 = 3,98 \text{ g L}^{-1}$) e (-★- $\text{pH}_0 = 5,95$, $[\text{CH}_3\text{COOH}]_0 = 4,13 \text{ g L}^{-1}$), verifica-se que a concentração da forma não dissociada do ácido acético foi três vezes maior no meio fermentado com pH inicial igual a 5,47 que a do meio com pH inicial igual a 5,95. Logo, estaria explicada a baixa fermentabilidade do meio com pH_0 igual de 5,5. No entanto, as células consumiram CH_3COOH nas primeiras 48 h de fermentação (Figura 33(A), -☆-), comportamento comumente registrado na literatura (LIMA *et al.*, 2004; AGBOGBO; WENGER, 2007), e acima desse período passaram a produzi-lo atingindo teores iguais ou maiores que a inicial (Figura 33(A)).

Uma possível explicação para essa incomum produção de ácido acético é que no início da fermentação as células estão consumindo as hexoses (glicose e frutose) e o ácido acético, resultando em alta produção de etanol e de biomassa. Quando o teor de hexoses está se exaurindo do meio, o consumo de xilose aumenta, de modo que a demanda de NADPH passa a ser bastante alta e a regeneração do cofator (NADP^+) pela via fosfopentose é insuficiente, ocorrendo a partir desse instante a formação de ácido acético pela oxidação do piruvato, para suprir a alta demanda de NADPH.

Granström, Ojamo e Leisola (2001); Granström; Izumori e Leisola (2007b), ao estudarem a bioconversão de xilose a xilitol por *Candida guilliermondii* VTT-C-71006 em cultura contínua, explicaram que a produção de acetato obtida em baixos níveis de O_2 foi proveniente da insuficiência da via fosfopentose em atender à demanda da xilose redutase (XR) por NADPH.

De acordo com Felipe *et al.* (1997), os efeitos do pH sobre a fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii* FT 20037 variam com a composição e origem do meio, uma vez que hidrolisados hemicelulósicos possuem concentrações distintas de ácido acético. Casey *et al.* (2010) mostram que a forma não dissociada do ácido acético é a que causa a inibição em *Saccharomyces cerevisiae*, podendo ser amenizada elevando-se o pH do meio.

O tratamento de destoxificação por adsorção a 60 °C, além de ser mais eficiente na clarificação do hidrolisado, torna-o mais fermentescível, fato também constatado por Marton *et al.* (2006) na destoxificação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

Assim sendo, a fermentação no biorreator conduzida em batelada com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi destoxificado por método combinado de neutralização com CaO e adsorção a 60 °C favoreceu a bioconversão da xilose a xilitol por *Debaryomyces hansenii* UFV-170, devido a uma melhor taxa de transferência de oxigênio (k_{La}) proporcionada pelo equipamento, em relação aos ensaios realizados em frascos agitados (Figuras 31 a 33), além de mais eficaz remoção de compostos no tratamento com carvão ativado a 60 °C.

5. CONCLUSÕES

O bagaço de abacaxi é um resíduo lignocelulósico com alto teor de carboidratos estruturais (celulose = 32% e hemicelulose = 38% m/m) e baixo teor de cinzas (1,60% m/m), matéria-prima em potencial para produção de hidrolisados ricos em açúcares (glicose e xilose).

O uso da metodologia de superfície de resposta (MSR) permitiu obter a equação empírica, com valor de R^2 igual a 91,3%, que correlaciona o rendimento em xilose ($\hat{y}_{xil}$) com os fatores temperatura (A), tempo (B) e concentração de H_2SO_4 (C) da hidrólise ácido diluído da fração hemicelulósica do bagaço de abacaxi, representado pela seguinte equação matemática:

$$\hat{y}_{xil} = -164,29 + 1,98 A + 2,07 B + 1,68 C - 1,42 \cdot 10^{-2} AB - 5,3 \cdot 10^{-3} A^2.$$

As melhores condições de hidrólise ácido diluído da fração hemicelulósica do bagaço de abacaxi foram à temperatura de 140 °C, tempo de reação de 20 minutos, concentração de H_2SO_4 de 2% (m/m) e relação de sólidos para líquido de 1/10 (m/m).

O método efetivo na destoxificação do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi é um tratamento combinado de neutralização com CaO (pH = 6,4; 200 rpm/1 hora à 30 °C), seguido por ajuste do pH ao de fermentação (5,5 ou 6,0) com H_3PO_4 e adsorção com carvão ativado (5% m/v, 200 rpm, 60 °C por 1 hora).

A cinza de eucalipto é um potencial agente alcalinizante para o tratamento de hidrolisados hemicelulósicos por neutralização ($\text{pH} \leq 7$) e fonte de macronutrientes minerais favoráveis ao crescimento e produção de xilitol na fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi por *Debaryomyces hansenii* UFV-170.

O alto teor de hexoses (glicose e frutose) no hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi favorece o crescimento celular de *Debaryomyces hansenii* UFV-170, gerando células adaptadas à toxidez do meio, permitindo o uso de inóculo com baixa densidade celular (1 g L^{-1}), resultando em melhores parâmetros fermentativos.

O hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi é um possível substrato para produção de xilitol por fermentação em batelada por *Debaryomyces hansenii* UFV-170 em biorreator ($\text{pH} = 6,0$; 30°C ; $2,5 \text{ vvm}$; 200 rpm e por 120 horas), resultando em 28 g L^{-1} (xilitol), e produtividade volumétrica de $0,24 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

6. RECOMENDAÇÕES

- Determinar a exata concentração de xilose no hidrolisado hemice-lulósico de bagaço de abacaxi por um método cromatográfico que separe a frutose da xilose e quantifique as frações.

- Avaliar os efeitos da cinza de eucalipto sobre a produtividade volumétrica e o rendimento em xilitol de amostras de hidrolisado tratadas e fermentadas em biorreator, por *Debaryomyces hansenii* UFV-170.

- Testar o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi como substrato para fermentação alcoólica, usando um microrganismo que converta os açúcares glicose e xilose a etanol.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGBOGBO, F. K.; WENGER, K. Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using *Pichia stipitis*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol**, v. 34, p. 723-727, 2007.

AKPINAR, O.; LEVENT, O.; BOSTANCI, S.; BAKIR, U.; YILMAZ, L. The optimization of dilute acid hydrolysis of cotton stalk in xylose production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 163, p. 313-325, 2010.

ALLEN, B. R.; COUSIN, M. J.; PIERCE, G. E. **Pretreatment methods for the degradation of lignin**. Columbus, OH: Battelle Columbus Laboratories, 1980.

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

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e indústria**. 3. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2007. 480 p.

BELKACEMI, K.; TURCOITE, G.; HALLEUX, D.; SAVOIE, P. Ethanol production from afex-treated forages and agricultural residues. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, p. 441-462, 1998.

BORLINI, M. C.; SALES, H. F.; VIEIRA, C. M. F.; CONTE, R. A.; PINATTI, D. G.; MONTEIRO, S. N. Cinza da lenha para aplicação em cerâmica vermelha. Parte I: características da cinza. **Cerâmica**, v. 51, p. 192-196, 2005.

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

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of Microorganisms**. 7. ed. London: Prentice-Hall International. 1994, 909 p.

BRUIJN, J. M.; KIEBOOM, A. P. G.; VAN BEKKUM, H. Reactions of monosaccharides in aqueous alkaline solutions. **Sugar Technology Reviews**, v. 13, p. 21-52, 1986.

BUHNER, J.; AGBLEVOR, F. A. Effect of Detoxification of dilute-acid corn hydrolysate on xylitol production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 119, p. 13-30, 2004.

BUSINESS COMMUNICATIONS COMPANY INC. The global market for polyols. Disponível em: <http://www.the-infoshop.com/study/bc8013_toc.html>. Acesso em: 25 set. 2008.

CANETTIERI, E. V.; ROCHA, G. J. M.; CARVALHO JR., J. A.; SILVA, J. B. A. Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 422-428, 2007 a.

CANETTIERI, E. V.; ROCHA, G. J. M.; CARVALHO JR., J. A.; SILVA, J. B. A. Evaluation of the kinetics of xilose formation from dilute sulfuric acid hydrolysis of forest residues of *Eucalyptus grandis*. **Ind. Eng. Chem. Res.** v.46, p. 1938-1944, 2007 b.

CANILHA, W. C.; SILVA, J. B. A.; FELIPE, M. G. A.; GIULIETTI, M. Empirical modeling as an experimental approach to optimize the hydrolysis of sugarcane bagasse hemicellulose with dilute H₂SO₄. **Journal of Biotechnology**, v. 136 S, 2008.

CARRASCO, F.; RIVIÈRES, T.; ROY, C. Kinetics study of dilute-acid prehydrolysis of xylan-containing biomass. **Wood Sci. Technol.**, v. 26, p. 189-208, 1992.

CARVALHO, V. D.; ABREU, C. M. P.; GONÇALVES, N. B. Qualidade e industrialização do abacaxi. **Informativo Agropecuário**, v. 19, n. 195, p. 67-69, 1998.

CASEY, E.; SEDLAK, M.; HO, N. W. Y.; MOSIER, N. S. Effect of acetic acid and pH on the fermentation of glucose and xilose to ethanol by a genetically engineering strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Res**, v. 10, p. 385-393, 2010.

CHANDEL, A. K.; CHAN, E. S.; RUDRAVARAM, R.; NARASU, M. L.; RAU, L. V.; RAVINDRA, P. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 2, p. 14-32, 2007.

CHOU, C. C. **Handbook of sugar refining**: a manual for design and operation of sugar refining facilities. Wiley: Louisiana, 2000. 756 p.

CHUM, H. L.; DOUGLAS, L. J.; FEINBERG, D. A.; SCHROEDER, H. A. (1985). **Evaluation of pretreatments of biomass for enzymatic hydrolysis of cellulose**. NREL, 1985. 77 p.

DEMIRBAS, A. Bioethanol from cellulosic materials: a renewable fuel from Biomass. **Energy Sources**, v. 27, p. 327-337, 2005.

FELIPE, M. G. A. biotechnology production of xylitol from lignocellulosic materials. In: SAHA, B. S. A.; HAYASHI, K. (Ed.). **Lignocellulosic biodegradation**, Washington: ACS, 2004, p. 300-315.

FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate for xylitol production: effect of pH. **Biomass and Bioenergy**, v. 13, n.1-2, p. 11-14, 1997.

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

GÁMEZ, S.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Manufacture of fermentable sugar solutions from sugar cane bagasse hydrolyzed with phosphoric acid at atmospheric pressure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4172-4177, 2004.

GIACOMELLI, E. J.; PY, C. **O abacaxi no Brasil**. Campinas: Fundação Cargill, 1981. 101 p.

GÍRIO, F. M.; FONSECA, C.; CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; MARQUES, S.; BOGEL-ŁUKASIK, R. Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4775-4800, 2010.

GÍRIO, F. M.; AMARO, C.; AZINHEIRA, H.; PELICA, F.; COLAÇO, M. T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations in *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v. 71, p. 245-251, 2000.

GOLDSTEIN, I. S. Potential for Converting Wood into Plastics: Chemicals from wood may regain importance as the cost of petroleum continues to rise. **Science**, v. 189, n. 4206, p. 847-852, sept. 1975.

GOUVEIA, E. R.; NASCIMENTO, R. T.; SOUTO-MAIOR, A. M.; ROCHA, G. J. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1500-1503, 2009.

GOVINDASWAMY, S.; VANE, L. M. Kinetics of growth and ethanol production on different carbon substrates using genetically engineering xylose-fermenting yeast. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 677-685, 2007.

GRANSTRÖM, T. B.; IZUMORI, K.; LEISOLA, M. A rare sugar xylitol. Part II: biotechnological production and future applications of xylitol. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74, p. 273-276, 2007a.

GRANSTRÖM, T. B.; IZUMORI, K.; LEISOLA, M. A rare sugar xylitol. Part I: the biochemistry and biosynthesis of xylitol. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 74, p. 277-281, 2007b.

GRANSTRÖM, T. B.; OJAMO, H.; LEISOLA, M. Chemostat study of xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 55, p. 36-42, 2001.

GRZENIA, D. L.; SCHELL, D. J.; WICKRAMSINGHE, S. R. Detoxification of biomass hydrolysates by reactive membrane extraction. **Journal of Membrane at Science**, v. 348, p. 6-12, 2010.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 549-556, 2006.

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

HANA, B.; CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S.; SILVA, J. B. A.; MCMILLAN, J. D.; WICKRAMASINGHEA, S. R. Adsorptive membranes vs. resins for acetic acid removal from biomass hydrolysates. **Desalination**, v. 193, p. 361-366, 2006.

HODGE, D. B.; ANDERSSON, C.; BERGLUND, K. A.; ROVA, U. Detoxification requirements for bioconversion of softwood dilute acid hydrolysates to succinic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, p. 309-316, 2009.

HOLMBERG, L. S.; CLAEISSON, T. Mineralogy of granulated wood ash from heating plant in Kalmar, Sweden. **Environmental Geology**, v. 40, n. 7, p. 820-828, 2001.

HSU, T. C.; GUO, G. L.; CHEN, W. H.; HWANG, W. S. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis **Bioresource Technology**, v 101, p. 4907-4913, 2010.

HUBER, G. W.; IBORRA, S.; CORMA, A. Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering. **Chem. Rev.**, v. 106, p. 4044-4098, 2006.

HU, R.; LIN, L.; LIU, T.; OUYANG, P.; HE, B.; LIU, S. Reducing sugar content in hemicellulose hydrolysate by DNS method: a revisit. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 2, p. 156-161, 2008.

HYMAN, D.; SLUITER, A.; CROCKER, D.; JOHNSON, D.; SLUITER, J.; BLACK, S.; SCARLATA, C. **Determination of acid soluble lignin concentration curve by UV-Vis spectroscopy**. Laboratory Analytical Procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory, 2007.

IAL – INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2005. 1018 p.

JAFFE, G. M., SZKRYBALO, W., WEINERT, P. H. **Process for producing xylose**. United States, Patent 3784408, 1974.

JEVONS, K.; AWE, M. Economic benefits of membrane technology vs. evaporator. **Desalination**, v. 250, p. 961-963, 2010.

KLINKE, H. B.; THOMSEN, A. B.; AHRING, B. K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 66, p. 10-26, 2004.

KIM, S. E.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass Bioenergy**, v. 26, p. 361-375, 2004.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROEM, N. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) the upgrading concept; (B) practical implementations. **Bioresource Technology**, v. 87, p. 167-98, 2003.

LEE, W. G.; LEE, J. S.; SHIN, C. S.; PARK, S. C.; CHANG, H. N.; CHANG, Y. K. Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 547-559, 1999.

LEE, H.; JAMES, A. P.; ZAHAB, D. M.; MAHMOURIDES, G.; MALESZKA, R.; SCHNEIDER, H. Mutants of *Pachysolen tannophilus* with improved production of ethanol from D-xylose. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1252-1258, 1986.

LENIHAN, P.; OROZCO, A.; O'NEILL, E.; AHMAD, M. N. M.; ROONEY, D. W.; WALKER, G. M. Dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Chemical Engineering Journal**, v. 156, p. 395-403, 2010.

LIAO, W.; LIU, Y.; WEN, Z.; FREAR, C.; CHEN, S. Studing the effects of reaction conditions on components of dairy manure and cellulose accumulation using dilute acid treatment. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1992-1999, 2007.

LIMA, L. H. A.; FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; TORRES, F. A. G. Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 65, p. 734-738, 2004.

LIMA, U. A. **Agroindustrialização de Frutas**. Piracicaba: FEALQ, 1998. 151 p.

LLOYD, T.; WYMAN, C. E. Application of a depolymerization model for predicting thermochemical hydrolysis of hemicellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 53-67, 2003.

LOPES, C. H.; BORGES, M. T. M. R. **Controle na fabricação de álcool**. São Carlos: EdUFSCAR, 2009. 95 p.

LOUSADA JR., J. E.; COSTA, J. M. C.; NEIVA, J. N. M.; RODRIGUEZ, N. M. Physical-chemical characterization of tropical fruit by-products for use in animal feed. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, p. 70-76, 2006.

LYND, L. R. Large-scale fuel ethanol from lignocellulose. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 24-25, p. 695-719, 1990.

MADAENI, S. S.; ZERESHKI, S. Energy consumption for sugar manufacturing. Part I: Evaporation versus reverse osmosis. **Energy Conversion and Management**, v. 51, p. 1270-1276, 2010.

MÄKINEN, K. K. The rocky road of xylitol to its clinical application. **Journal Dental Research**, v. 79, n. 6, p. 1352-1355, 2000.

MANICA, I. **Fruticultura tropical** - Abacaxi. Porto Alegre: Ed. Cinco Continentes, v. 5, 1999. 501 p.

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M. E.; WELLS, M. L.; YORK, S. W.; PRESTON, J. F.; INGRAM, L. O. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. **Biotechnol. Prog.** v. 17, p. 287-293, 2001.

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M. E.; YORK, S. W.; PRESTON, J. F.; INGRAM, L. O. Effects of Ca(OH)_2 treatments ("Overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 5, p. 526-536, 2000.

MARTON, J. M.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; PESSOA Jr., A. Evaluation of the activated charcoals and adsorption conditions used in the treatment of sugarcane bagasse hydrolysate for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 1, p. 9-21, 2006.

MATTILA, P.; KNUUTTILA, M.; KOVANEN, V.; SVANBERG, M. Improved bone biomechanical properties in rats after oral xylitol administration. **Calcified Tissue International**, v. 64, n. 4, p. 340-344, 1999.

MEYRIAL, V.; DELGENES, J. P.; MOLETA, R.; NAVARRO, J. M. Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*: fermentation behaviour. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 4, p. 281-286, 1991.

MIYAFUJI, H.; DANNER, H.; NEUREITER, M.; THOMASSER, C.; BRAUN, R. Effect of wood ash treatment on improving the fermentability of wood hydrolysate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 48, n. 3, p. 390-393, 2003.

MOHAGHEGHI, A.; RUTH, M, SHELL, D, J. Conditioning hemicelulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1806-1811, 2006.

MORETTI, R. H.; HINOJOSA, R. Industrialização do Abacaxi. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE ABACAXICULTURA DE JABOTICABAL, 1., 1982. **Anais...** Jaboticabal: FCAV, 1982. p. 301-319.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Química orgânica**. 10. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1993. 1639 p.

MURTHY, G. S.; SRIDHAR, S.; SUNDER, M. S.; SHANKARAIAH, B.; RAMAKRISHNA, M.; Concentration of xilose reaction liquor by nanofiltration for the production of xylitol sugar alcohol. **Separation and Purification Technology**, v. 44, p. 221-228, 2005.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, p. 2453-2460, 2005.

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

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xylitol production from high xylose concentration: evaluation of the fermentation in bioreactor under different stirring rates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 331-337, 2003.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Xilitol: Edulcorante com efeitos benéficos para a saúde humana. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 4, p. 401-413, 2002.

MUSSATO, S. I.; ROBERTO, I. C. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 23, p. 1681-1684, 2001.

NABARLATZ, D.; TORRAS, C.; GARCIA-VALLS, R.; MONTANÉ, D. Purification of xylo-oligosaccharides from almond shells by ultrafiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 53, p. 235-243, 2007.

NEDER, R. N. **Microbiologia**: manual de laboratório. São Paulo: Nobel, 1992. 138 p.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; THOMASSER, C.; SAIDI, B.; BRAU, R. Dilute-acid hydrolysis of sugarcane bagasse at varying conditions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 49-58, 2002.

NIGAM, P.; SINGH, D. Process for Fermentative Production of Xylitol – a Sugar Substitute. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 2, p. 117-124, 1995.

OLSSON, L.; HANH-HÄGERDEL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 18, p. 312-331, 1996.

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

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

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; MITCHELL D. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Biotechnology 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.; DOMINGUEZ, J. M. Biotechnology production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulosic hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 25-40, 1998b.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Production of xylitol from concentrated wood hydrolysates by *Debaryomyces hansenii*: Effect of the initial cell concentration. **Biotechnology Letters**, v. 18, n. 5, p. 593-598, 1996.

PATEL, B. K. C.; HUDSON, J. A.; MORGAN, H. W.; DANIEL, R. M. Non-diauxic fermentation of acid hydrolysed pine by a strain of *Clostridium thermohydrosulfuricum* isolated from a New Zealand hot spring. **FEMS Microbiology Letters**, v. 56, p. 285-288, 1988.

PEPPER, T.; OLINGER, P.M. Xylitol in Sugar- Free Confections. **Food Technology**, v.42, n.10, p. 98-106, 1988.

PERRY, R. H.; GREEN, D. W. **Perry's chemical engineer's handbook**. 7. ed. New York: MacGrall-Hill, 1997.

PESSOA JR., A.; MANCILHA, I. M.; SATO, S. Acid hydrolysis of hemicellulose from sugarcane bagasse. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 14, n. 3, sept. 1997.

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

PREZIOSI-BELLOY, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J. M. Xylitol production from aspenwood hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 239-243, 2000.

RAHMAN, S. H.A.; CHOUDHURY, J. P.; AHMAD, A. L.; KAMARUDDIN, A. H. Optimization studies on acid hydrolysis of oil palm fruit bunch fiber for production of xylose. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 554-559, 2007

RANATUNGA, T. D.; JERVIS, J.; HELM, R. F.; McMILLAN, J. D.; WOOLEY, R. J. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 240-247, 2000.

RESTOLHO, J. A.; PRATES, A.; PINHO, M. N.; AFONSO, M. D. Sugars and lignosulphonates recovery from eucalyptus spent sulphite liquor by membrane. **Biomass and Bioenergy**, v. 33, p. 1558-1566, 2009.

ROBERTO, I. C.; MUSSATO, S. I; RODRIGUES, R. C. L. B. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 17, p. 171-176, 2003,

ROBERTO, I. C.; SATO, S.; MANCILHA, I. M. Effect of inoculum level on xylitol production from rice straw hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 16, p. 348-350, 1996.

ROCHA-FILHO, R. C.; SILVA, R. R. **Cálculos básicos da química**. São Carlos: EDUFSCAR, 2006. 277 p.

RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; VITOLO, M. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables. **Process Biochemistry**, v. 38, p. 1231-1237, 2003.

RODRIGUES, D. C. G. A.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Using response-surface methodology to evaluate xylitol production by *Candida guilliermondii* by fed-batch process with exponential feeding rate. **Journal of Biotechnology**, v. 62, p. 73-77, 1998.

RUGGIERO, C. **Anais do 1º Simpósio Brasileiro sobre Abacaxicultura**. Jabotical, 1982. 359 p.

SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 30, p. 279-291, 2003.

SAMPAIO, F. C.; FARIA, J. T.; COIMBRA, J. S. R.; PASSOS, F. M. L.; CONVERTI, A.; MININ, L. A. Xylose reductase activity in *Debaryomyces hansenii* UFV-170 cultivated in semi-synthetic medium and cotton husk hemicellulose hydrolyzate. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 32, p. 747-754, 2009.

SAMPAIO, F. C.; ALVES, V. M. C.; CONVERTI, A.; PASSOS, F. M. L.; COELHO, J. L. C. Influence of cultivation conditions on xylose-to-xylitol bioconversion by a new isolate of *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 502-508, 2008.

SAMPAIO, F. C.; MANTOVANI, H. C.; PASSOS, F. J. V.; MORAES, C. A.; CONVERTI, A.; PASSOS, F. M. L. Bioconversion of D-xylose to xylitol by *Debaryomyces hansenii* UFV-170: Product formation versus growth. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3600-3606, 2005.

SAMPAIO, F.C. **Seleção de microrganismo para a conversão de xilose em xilitol**. 2001. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds - recent developments. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 401-413, 2001.

SCHLESINGER, R.; GÖTZINGER, G.; SIXTA, H.; FRIEDLC, A.; HARASEK, M. Evaluation of alkali resistant nanofiltration membranes for the separation of hemicellulose from concentrated alkaline process liquors. **Desalination**, v. 192, p. 303-314, 2006.

SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ, P. F.; MATOS, G. S.; ZÁCHIA, M. A. A. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2898-2904, 2008.

SILVA, T. F. M. **Avaliação de polímeros de origem vegetal na destoxificação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar para obtenção de xilitol**. 2006. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Conversão de biomassa. Escola de Engenharia de Lorena. Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 2006.

SILVA, D. D. V.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; LUCHESE, R. H.; SILVA, S. S. Inhibitory effect of acetic acid on biocoverion of xylose in xylitol by *Candida guilliermondii* in sugarcane bagasse hydrolysate. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 248-254, 2004.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2002. 235 p.

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

SILVERSTEIN, R. A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R. R.; BOYETTE, M. D.; OSBORNE, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource technology**, v. 98, p. 3000-3011, 2007.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidations substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SJÖMAN, E.; MÄNTTÄRI, M.; NYSTRÖM, M.; KOIVIKKO, H.; HEIKKILÄ, H. Separation of xilose from glucose by nanofiltration from concentrated monosaccharide solutions. **Journal of Membrane Science**, v. 292, p. 106-115, 2007.

SJÖMAN, E.; MÄNTTÄRI, M.; NYSTRÖM, M.; KOIVIKKO, H.; HEIKKILÄ, H. Nanofiltration of monosaccharide containing solution to recover xilose. **Desalination**, v. 199, p. 348-349, 2006.

SJÖSTROM, E. **Wood chemistry: Fundamentals and applications**. 2. ed. New York: Academic Press, 1993. 293 p.

SLUITER, A.; HAMES, B.; RUIZ, R.; SCARLATA, C.; SLUITER, J.; TEMPLETON, D. **Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples**. USA: National Renewable Energy Laboratory, 2006.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; MEDEIROS, A. B. P.; SUSAN GRACE KARP, S. G.; BUCKERIDGE, M.; RAMOS, L. P.; PITARELO, A. P.; LEITÃO, V. F.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA, M. A.; BON, E. P. S.; MORAES, L. M. P.; ARAÚJO, J. A.; TORRES, F. A. G. Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4820-4825, 2010.

SREENATH, H. K.; JEFFRIES, T. W. Batch and membrane-assisted cell recycling in ethanol production by *Candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, v. 9, n. 4, p. 293-298, 1987.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. **Bioresources**, v. 2, n. 4, p. 707-738, 2007.

TODA FRUTA. Disponível em: <<http://www.todafruta.com.br>>. Acesso em: 14 abr. 2007.

TUCKER, M. P.; KIM, K. H.; NEWMAN, M. M.; NGUYEN, Q. A. Effects of temperature and moisture on dilute-acid steam explosion pretreatment of corn stover and cellulose enzyme digestibility. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 105-108, p. 165-177, 2003.

TUNC, M.S.; VAN HEININGEN, A. R. P. Hemicellulose extraction of mixed southern hardwood with water at 150 °C: effect of time. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 47, p. 7037-7301, 2008.

UHARI, M.; TAPIAINEN, T.; KONTIOKAR, T. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, v. 19, p. 144S- 147S, 2000.

VALADARES FILHO, S. C.; ROCHA, V. R. J.; CAPELLE, E. R. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. 2. ed. Viçosa: UFV, DZO, 2006. 329 p.

VAN-MARIS, A. J. A.; ABBOTT, D. A.; BELLISSIMI, E.; VAN DEN BRINK, J.; KUYPER, M.; LUTTIK, M. A. H.; WISSELINK, H. W.; SHEFFERS, W. A.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 391-418, 2006.

VAN-SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. New York: Cornell University Press, 1994. 446 p.

VON-SIVERS, M.; ZACCHI, G.; OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnol. Prog.** v. 10, n. 5, p. 555-560, 1994.

WENG, Y. H.; WEI, H. J.; TSAI, T. Y.; LIN, T. H.; WEI, T. Y.; GUO, G. L.; HUANG, C. P. Separation of furans and carboxylic acids from sugars in dilute acid rice straw hydrolyzates by nanofiltration. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4889-4894, 2010.

WENG, Y. H.; WEI, H. J.; TSAI, T. Y.; CHEN, W. H.; WEI, T. Y.; HWANG, W. S.; WANG, C. P.; HUANG, C. P. Separation of acetic acid from xylose by nanofiltration. **Separation and Purification Technology**, v. 67, p. 95-102, 2009.

WHITE, D. **The physiology and biochemistry of prokaryotes**. 2. ed. New York: Oxford University Press, Inc., 2000.

WICKRAMASINGHE, S. R.; GRZENIA, D. L. Adsorptive membranes and resins for acetic acid removal from biomass hydrolysates. **Desalination**, v. 234, p. 144-151, 2008.

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

XU, Y.; HANNA, M. A. Optimum conditions for dilute acid hydrolysis of hemicellulose in dried distillers grains with solubles. **Industrial Crops and Products**, v. 32, p. 511-517, 2010.

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

ZACCHI, G.; AXELSSON, A. Economic evaluation of preconcentration in production of ethanol from dilute sugar solutions. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 34, p. 223-233, 1989.

ZHANG, M.; EDDY, C.; DEANDA, K.; FINKELSTEIN, M.; PICATAGGIO, S. Metabolic engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. **Science**, v. 267, p. 240-243, 1995.

ZHANG, Y. H. P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 367-375, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabelas das análises de variância das equações de regressão dos rendimentos em xilose, ácido acético, furfural, fenóis e seletividade.

Tabela 1A – Análise de variância para o ajuste a uma equação polinomial de segunda ordem da resposta rendimento em xilose (Y_{xil}) com os dados da Tabela (4.2), a 95% de confiança

FV	SQ	GL	MQ	F _{calc.}	F _{tab.} *	p
Regressão [†]	218,579	5	43,716	23,03	3,20	0,000
Resíduos	20,883	11	1,898	---	---	---
F. ajuste [‡]	18,780	9	2,087	1,98	19,38	0,380
Erro puro	2,103	2	1,051	---	---	---
Total	239,462	16	---	---	---	---

[†] se $F_{cal} > F_{tab}$ indica que a regressão é significativa, a 95% de confiança.

[‡] se $F_{cal} > F_{tab}$ indica que há falta de ajuste e é significativa, a 95% de confiança, ou seja, a equação de regressão não se ajusta bem aos dados experimentais.

Tabela 2A – Análise de variância para o ajuste a uma equação polinomial de segunda ordem da resposta rendimento em ácido acético (Y_{HAC}) com os dados da Tabela (4.2), a 95% de confiança

FV	SQ	GL	MQ	F _{calc.}	F _{tab.}	p
Regressão [†]	15,0889	5	3,0178	10,63	3,20	0,001
Resíduos	3,1215	11	0,2838	---	---	---
F. ajuste [‡]	2,8039	9	0,3115	1,96	19,38	0,383
Erro puro	0,3176	2	0,1588	---	---	---
Total	18,2104	16	---	---	---	---

[†] se $F_{cal} > F_{tab}$ indica que a regressão é significativa, a 95% de confiança.

[‡] se $F_{cal} > F_{tab}$ indica que há falta de ajuste e é significativa, a 95% de confiança, ou seja, a equação de regressão não se ajusta bem aos dados experimentais.

Tabela 3A – Análise de variância para o ajuste a uma equação polinomial de segunda ordem da resposta rendimento em furfural ($Y_{furfural}$) com os dados da Tabela (4.2), a 95% de confiança

FV	SQ	GL	MQ	F _{calc.}	F _{tab.}	p
Regressão [†]	2,3753	6	0,3959	9,38	3,22	0,001
Resíduos	0,4221	10	0,04221	---	---	---
F. ajuste [‡]	0,4218	8	2,087	395,46	19,37	0,003
Erro puro	0,00027	2	0,000133	---	---	---
Total	2,7974	16	---	---	---	---

[†] se $F_{cal} > F_{tab}$ indica que a regressão é significativa, a 95% de confiança.

[‡] se $F_{cal} > F_{tab}$ indica que há falta de ajuste e é significativa, a 95% de confiança, ou seja, a equação de regressão não se ajusta bem aos dados experimentais.

Tabela 4A – Análise de variância para o ajuste a uma equação polinomial de segunda ordem da resposta rendimento em fenóis ($Y_{fenóis}$) com os dados da Tabela (4.2), a 95% de confiança

FV	SQ	GL	MQ	F _{calc.}	F _{tab.}	p
Regressão [†]	71,9956	6	11,9993	65,71	3,22	0,000
Resíduos	1,8260	10	0,1826	---	---	---
F. ajuste [‡]	1,7100	8	0,2137	3,68	19,37	0,231
Erro puro	0,1161	2	0,0580	---	---	---
Total	73,8216	16	---	---	---	---

[†] se $F_{cal} > F_{tab}$ indica que a regressão é significativa, a 95% de confiança.

[‡] se $F_{cal} > F_{tab}$ indica que há falta de ajuste e é significativa, a 95% de confiança, ou seja, a equação de regressão não se ajusta bem aos dados experimentais.

Tabela 5A – Análise de variância para o ajuste a uma equação polinomial de segunda ordem da resposta seletividade ($Y_{[xij]/[glij]}$) com os dados da Tabela (4.2), a 95% de confiança

FV	SQ	GL	MQ	F _{calc.}	F _{tab.}	p
Regressão [†]	2,3469	4	0,58671	6,43	3,26	0,005
Resíduos	1,0946	12	0,09122	---	---	---
F. ajuste [‡]	0,3371	4	0,08428	0,89	3,84	0,512
Erro puro	0,7575	8	0,09468	---	---	---
Total	3,4415	16	---	---	---	---

[†] se $F_{cal} > F_{tab}$ indica que a regressão é significativa, a 95% de confiança.

[‡] se $F_{cal} > F_{tab}$ indica que há falta de ajuste e é significativa, a 95% de confiança, ou seja, a equação de regressão não se ajusta bem aos dados experimentais.

APÊNDICE B

Figuras de ensaios de alcalinização e tratamento térmico do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi.



Figura 1B – Intensa formação de espuma no início da adição de cinza de eucalipto durante o tratamento por alcalinização do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de abacaxi.

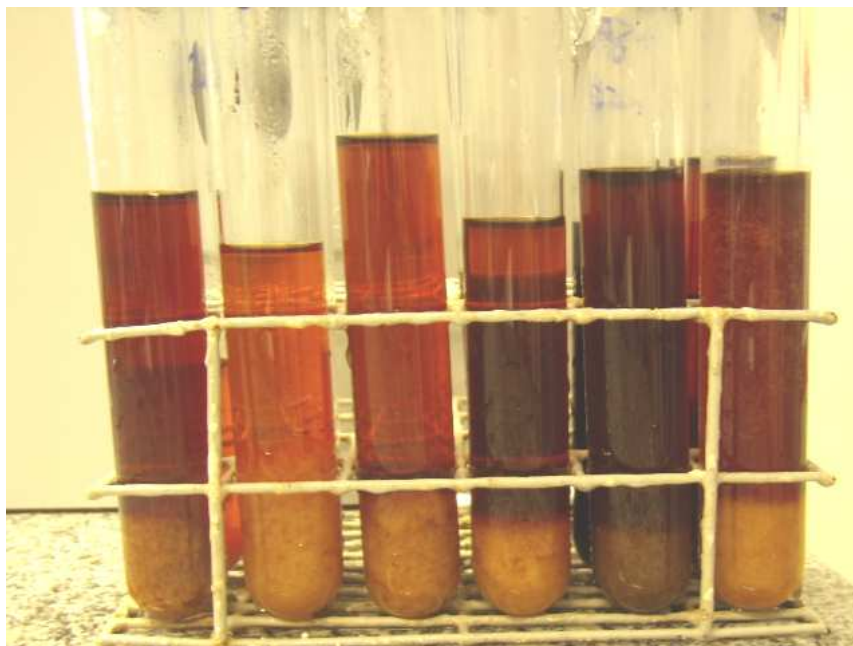


Figura 2B – Precipitado gelatinoso formado após tratamento térmico (110 °C/15 min) de amostras de hidrolisado alcalinizadas com CaO.