

OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILITOL  
A PARTIR DE XILOSE POR *Candida parapsilosis*  
ATRAVÉS DE ANÁLISE POR SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

17192

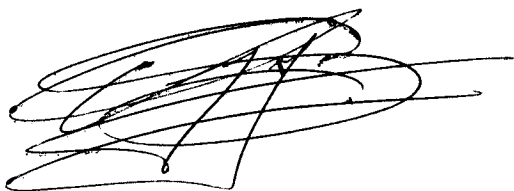
OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILITOL  
A PARTIR DE XILOSE POR *Candida parapsilosis*  
ATRAVÉS DE ANÁLISE POR SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Teresa Cristina, Zangirolami *in* / *no*

ORIENTADOR: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho *t*

Parecer

*Este exemplar corresponde  
a redação final da Tese  
defendida por Teresa Cris-  
tina Zangirolami e apro-  
vada pela comissão julga-  
dora em 11.06.92*

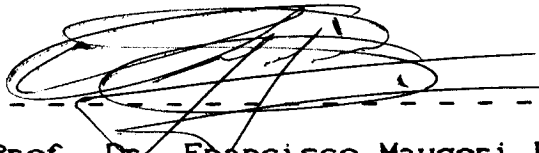


Tese apresentada à  
Faculdade de Engenharia de  
Alimentos da Universidade  
Estadual de Campinas para  
obtenção do grau de Mestre  
em Engenharia de Alimentos.

Campinas

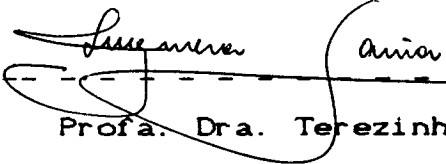
1992

BANCA EXAMINADORA



---

Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho  
(orientador)




---

Profa. Dra. Terezinha de Jesus Garcia Salva  
(membro)



---

Prof. Dr. Roy Edward Bruns  
(membro)



---

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre  
(membro)

Campinas, 11 de Junho de 1992

*A minha mãe e  
ao Pedro*

## AGRADECIMENTOS

\* Ao Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho, pela orientação dedicada e segura durante a realização deste trabalho.

\* À minha irmã Tânia e à Tia Helena, pelo apoio e incentivo.

\* Aos colegas Leda, Maria Lúcia, Hokka, Raquel e Roberto, pelas valiosas sugestões que contribuíram para enriquecer este trabalho.

\* À Maria Lucília, Fátima e Maria, pela colaboração durante a parte experimental deste trabalho.

\* Ao Instituto Zimotécnico da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", à Fundação Oswaldo Cruz e ao Instituto Adolpho Lutz, por terem gentilmente cedido as cepas utilizadas neste estudo.

\* À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio financeiro ao projeto "Síntese de Xilitol a partir de Xilose por Via Microbiológica".

\* Ao Centro de Ciências e Tecnologia da UFSCar, pela cessão da impressora laser utilizada na preparação dos originais deste trabalho.

\* À Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos - ABIA, pelas cópias xerográficas.

\* Aos colegas do Departamento de Engenharia Química - UFSCar, do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP e a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para o êxito deste trabalho.

## ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	viii
NOMENCLATURA	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 - Propriedades Físico-químicas, Fisiológicas e Aplicações do Xilitol	4
2.1.1 - Propriedades físico-químicas do xilitol	4
2.1.2 - Aspectos fisiológicos do xilitol	6
2.1.3 - Considerações sobre as aplicações do xilitol na tecnologia de alimentos	10
2.2 - Obtenção do Xilitol	12
2.2.1 - Fontes para a obtenção de xilose	12
2.2.2 - A síntese química do xilitol	14
2.2.3 - A síntese microbiológica do xilitol	17
2.3 - A Produção de Xilitol por Leveduras	20
2.3.1 - Metabolismo de D-xilose	23
2.3.2 - Influência da temperatura na produção de xilitol	28
2.3.3 - Influência do pH do meio de cultivo na produção de xilitol	29
2.3.4 - Influência da concentração inicial de substrato na produção de xilitol e de biomassa	30
2.3.5 - Influência da composição do meio na produção de xilitol	32

2.3.6 - Influência da concentração inicial de células e da idade do inóculo na formação do xilitol	35
2.3.7 - Influência da aeração na assimilação de xilose e produção de xilitol	38
2.3.8 - Procedimentos alternativos aplicados à produção de xilitol por microrganismos	43
2.4 - Aplicação de Métodos de Planejamento Experimental na Otimização de Processos	46
<b>3 - MATERIAL E MÉTODOS</b>	
3.1 - Ensaio Preliminares	57
3.1.1 - Seleção da linhagem produtora	58
3.1.2 - Seleção do meio de fermentação	60
3.1.3 - Desenvolvimento de procedimento para a preparação do inóculo	62
3.2 - Planejamento Experimental por Análise Superfície de Resposta	64
3.3 - Métodos Analíticos	69
3.3.1 - Análise da concentração de xilose	69
3.3.2 - Análise da concentração de xilitol	69
3.3.3 - Avaliação do crescimento celular	70
3.4 - Reagentes, Material e Equipamentos Utilizados	70
<b>4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
4.1 - Ensaio Preliminares	73
4.1.1 - Seleção de linhagens produtoras	73
4.1.2 - Seleção de meio de fermentação	74

4.1.3 - Desenvolvimento de procedimento para a preparação de inóculo	77
4.2 - Planejamento Experimental por Análise Superfície de Resposta	80
4.2.1 - Análise geral dos resultados	80
4.2.2 - Aplicação do método de análise superfície de resposta	85
a) Modelagem empírica	85
b) Refinamento dos modelos	89
c) Determinação das condições ótimas e construção dos gráficos de superfície de resposta e linhas de contorno	93
d) Discussão	103
5 - CONCLUSÃO E SUGESTÕES	115
6 - BIBLIOGRAFIA	118
ANEXOS	126
- ANEXO A	127
Obtenção da curva de calibração concentração celular versus absorbância	
- ANEXO B	130
Curvas representando o consumo de substrato, formação de produto e crescimento ao longo do tempo para todos os ensaios do planejamento experimental	
- ANEXO C	138
Exemplo do procedimento adotado para calcular os valores experimentais de rendimento e produtividade em xilitol	
- ANEXO D	140
Cálculo do erro experimental e propagação do erro nos parâmetros	
- ANEXO E	146
Listagem das correlações ajustadas por computador, contendo os coeficientes, os erros de regressão e os critérios estatísticos de ajuste	



## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1.1 - Estrutura química do xilitol	1
FIGURA 2.1 - Solubilidade do xilitol e da sacarose em água	5
FIGURA 2.2 - Cariogenicidade de alguns açúcares e adoçantes	6
FIGURA 2.3 - Estudos da Universidade de Turku sobre a incidência de cáries em indivíduos submetidos a dietas com diferentes açúcares	7
FIGURA 2.4 - Estudos da Universidade de Turku sobre o efeito da substituição parcial da sacarose por xilitol na incidência de cáries	8
FIGURA 2.5 - Metabolismo do xilitol no fígado de mamíferos	9
FIGURA 2.6 - Princípio da Produção de xilitol	14
FIGURA 2.7 - Produção de xilitol e xilose	16
FIGURA 2.8 - Metabolismo da xilose	25
FIGURA 2.9 - Influência do pH na produção de xilitol	30
FIGURA 2.10 - Influência de diversas fontes de nitrogênio e de nutrientes orgânicos na produção de xilitol	33
FIGURA 2.11 - Influência da adição de biotina sobre a produção de etanol e xilitol. a) <i>P. tannophilus</i> e b) <i>C. guillermondii</i>	34
FIGURA 2.12 - Efeito da concentração celular e da idade do inóculo no rendimento e na produtividade de xilitol para <i>C. shehatae</i>	36
FIGURA 2.13 - Efeito do aumento de concentração inicial de células no rendimento e na produtividade de xilitol para <i>C. shehatae</i>	36
FIGURA 2.14 - Acúmulo de xilitol e biomassa para <i>Candida guillermondii</i>	37
FIGURA 2.15 - Variação na concentração de xilitol e de células com a taxa de diluição para <i>Candida parapsilosis</i>	37
FIGURA 2.16 - Efeito da aeração nos rendimentos globais de produto e biomassa para <i>C. parapsilosis</i>	40
FIGURA 2.17 - Relação entre a taxa de consumo de O <sub>2</sub> e a fração de carbono da xilose incorporado em diferentes produtos para <i>Candida</i> sp. XF 217	41

FIGURA 2.18	- Fração de carbono da xilose incorporado em diferentes produtos em função da vazão de ar para <i>P. tannophilus</i>	41
FIGURA 2.19	- Relação entre potencial redox (a) e taxa de aeração (b) e os parâmetros fermentativos de rendimento em xilitol, rendimento em biomassa e $k_{1a}$ para <i>P. tannophilus</i>	42
FIGURA 2.20	- Fluxograma de execução e exemplo de aplicação do método de análise por superfície de resposta	50
FIGURA 2.21	- Distribuição das condições experimentais e respostas do planejamento experimental múltiplo variante empregado por <u>Jeffries</u>	51
FIGURA 2.22	- Variação da produção de ácido itacônico com a concentração de xilose, o pH e a concentração de nitrato de amônio	56
FIGURA 2.23	- Variação da produção de ácido itacônico com a taxa de aeração, a concentração de xilose e o tempo de residência	56
FIGURA 3.1	- Representação esquemática das etapas executadas para a otimização da produção de xilitol em fermentação em batelada	58
FIGURA 3.2	- Esquema representando a sequência de ensaios realizados na Etapa de Ensaios Preliminares	62
FIGURA 3.3	- Representação do frasco utilizado nos ensaios de fermentação, destacando-se o sistema de amostragem	67
FIGURA 4.1	- Crescimento de células de <i>C. parapsilosis</i> cultivadas em meios contendo xilose e glicose em diferentes proporções	79
FIGURA 4.2	- Evolução no desempenho de <i>C. parapsilosis</i> IZ 1710 em relação a fermentação de xilose a xilitol	83
FIGURA 4.3	- Comparação entre a produção de xilitol por <i>C. parapsilosis</i> IZ 1710 e os resultados obtidos com <i>C. tropicalis</i> HPX2, <i>Candida sp.</i> B-22 e <i>C. guillermondii</i> 5578	84

FIGURA 4.4	- Comportamento da função $Y_1 = f(X_2, X_3)$ quando são atribuídos diferentes valores para as variáveis $X_1$ e $X_4$	96
FIGURA 4.5	- Linhas de contorno (a) e superfície de resposta (b) representando a variação do rendimento com a temperatura e a velocidade de agitação, para uma concentração inicial de substrato de 144 g/l e um pH inicial de 4,4 (CORRELAÇÃO 1.6)	100
FIGURA 4.6	- Linhas de contorno (a) e superfície de resposta (b) representando a variação da produtividade com a temperatura e a velocidade de agitação, para uma concentração inicial de substrato de 144 g/l e um pH inicial de 6,4 (CORRELAÇÃO 2.7)	105
FIGURA 4.7	- Linhas de contorno (a) e superfície de resposta (b) representando a variação da produtividade com a temperatura e o pH inicial do meio, para uma concentração inicial de xilose de 144 g/l e uma velocidade de agitação de 162 rpm (CORRELAÇÃO 2.8)	106
FIGURA 4.8	- Comparação entre os valores máximos de rendimento (a) e produtividade (b) previstos pelos modelos matemáticos com os melhores valores obtidos experimentalmente	107
FIGURA 4.9	- Gráficos mostrando os resíduos (valor experimental - valor previsto) calculados para cada ensaio do planejamento experimental em função do valor obtido experimentalmente	109
FIGURA 4.10	- Comparação entre as condições ótimas de fermentação estimadas para o rendimento e para a produtividade	113
FIGURA A.1	- Curva de calibração da concentração celular em função da absorbância a 600 nm para <i>Candida parapsilosis</i> IZ 1710	129
FIGURA B.1	- Consumo de substrato, formação de produto e crescimento celular ao longo da fermentação para os 29 ensaios realizados no planejamento experimental	130

FIGURA C.1 - Exemplo de cálculo do rendimento e da  
produtividade (dados do ENSAIO 2)

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
TABELA 2.1 - Poder adoçante relativo de alguns açúcares e adoçantes	4
TABELA 2.2 - Propriedades físico-químicas do xilitol e da sacarose	5
TABELA 2.3 - Composição de resíduos agrícolas em celulose, hemicelulose e lignina e composição da hemicelulose em carboidratos	13
TABELA 2.4 - Condições experimentais utilizadas e resultados obtidos nos trabalhos consultados sobre a produção de xilitol por leveduras	21
TABELA 2.5 - Influência da temperatura na produção de xilitol por <i>S. cerevisiae</i>	29
TABELA 2.6 - Influência da concentração inicial de substrato na concentração final, no rendimento e na produtividade de xilitol e no rendimento em biomassa	31
TABELA 2.7 - Formação de xilitol em diversas leveduras sob diferentes condições de aeração	39
TABELA 2.8 - Condições experimentais e respostas do planejamento experimental múltiplo variante empregado por <u>Jeffries</u>	52
TABELA 2.9 - Valores reais e codificados atribuídos às variáveis no planejamento experimental empregado por <u>Kautola</u>	54
TABELA 2.10 - Matriz do planejamento experimental empregado por <u>Kautola</u>	55
TABELA 3.1 - Valores reais e codificados atribuídos às variáveis	66
TABELA 3.2 - Quadro especificando as condições experimentais de todos os ensaios executados para o planejamento experimental	68
TABELA 4.1 - Concentração final de substrato, concentração máxima de xilitol, rendimento e tempo de fermentação resultantes da assimilação de xilose pelas 18 leveduras testadas	74

TABELA 4.2	- Concentração máxima de xilitol, rendimento máximo e tempo de fermentação obtidos para os 4 microrganismos selecionados quando cultivados em meios contendo diferentes fontes de nitrogênio e diferentes concentrações de extrato de levedura	77
TABELA 4.3	- Consumo de substrato e crescimento celular para <i>C. parapsilosis</i> cultivada em meios contendo xilose e glicose em diferentes proporções	78
TABELA 4.4	- Condições experimentais utilizadas e resultados obtidos em todos os ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental por análise de superfície de resposta	81
TABELA 4.5	- Matriz do Planejamento Experimental	87
TABELA A.1	- Relação entre concentração celular e absorbância para <i>C. parapsilosis</i> IZ 1710	128
TABELA C.1	- Determinação de $\Delta S$ e $\Delta P$ a partir dos dados da fermentação do ENSAIO 2	138

## NOMENCLATURA

- IAC - índice de atividade de cáries
- $X_1$  - variável temperatura na forma codificada
- $X_2$  - variável  $pH_0$  na forma codificada
- $X_3$  - variável concentração inicial de xilose na forma codificada
- $X_4$  - variável velocidade de rotação na forma codificada
- T - temperatura ( $^{\circ}C$ )
- t - tempo (h)
- $pH_0$  - pH inicial da fermentação
- $pH_f$  - pH final da fermentação
- $S_0$  - concentração inicial de xilose (g/l)
- S - concentração de xilose (g/l)
- $S_f$  - concentração final de xilose (g/l)
- $P_0$  - concentração inicial de xilitol (g/l)
- P - concentração de xilitol (g/l)
- $P_m$  - concentração máxima de xilitol atingida em um ensaio (g/l)
- X - concentração de células (g/l)
- $X_0$  - concentração inicial de células (g/l)
- $X_f$  - concentração final de células (g/l)
- N - velocidade de agitação da mesa rotativa (rpm)
- $Y_1$  - rendimento em xilitol, experimental (g/g)
- $Y_1^*$  - rendimento em xilitol, estimado (g/g)
- $Y_2$  - produtividade em xilitol, experimental (g/lh)
- $Y_2^*$  - produtividade em xilitol, estimada (g/lh)

## RESUMO

Após testes com 18 leveduras diferentes, foi selecionada a espécie *Candida parapsilosis* IZ 1710. Cada ensaio de fermentação foi iniciado cultivando-se o inóculo por 24 h, a 30 °C e 250 rpm, em frascos de 500 ml com 100 ml de meio de crescimento, contendo glicose e xilose como fontes de carbono. As células cultivadas foram separadas por centrifugação e transferidas para frascos de 1000 ml com 200 ml de meio de fermentação contendo xilose como fonte de carbono e energia, extrato de levedura como nutriente orgânico e acetato de amônio como fonte de nitrogênio.

Foram realizados 29 ensaios de fermentação sob diversas combinações de condições de temperatura, pH inicial do meio, concentração inicial de substrato e velocidade de agitação externa (variáveis independentes), previamente determinadas segundo o método de planejamento experimental por análise de superfície de resposta. O rendimento e a produtividade em xilitol foram escolhidos como as respostas (variáveis dependentes) a serem otimizadas.

Os resultados obtidos nos 29 ensaios, juntamente com as condições experimentais correspondentes, foram submetidos a uma modelagem empírica, obtendo-se modelos de 2<sup>a</sup> ordem com elevado grau de ajuste aos pontos experimentais. Foram então construídas as figuras correspondentes às superfícies de resposta e linhas de contorno, para representar a variação das respostas em função das variáveis, possibilitando a determinação das condições ótimas para maximizar as respostas.

Assim, 0,818 g de xilitol/g de xilose consumida foi determinado como o valor máximo previsto para o rendimento, nas seguintes condições ótimas: temperatura de 29,2 °C; pH inicial do meio igual a 4,4; concentração inicial de xilose de 144 g/l e velocidade de rotação de 119 rpm. Já para a produtividade em xilitol, foi previsto um valor máximo de 0,828 g/lh em condições ótimas ligeiramente diferentes, sendo: temperatura de 32,5 °C; pH inicial do meio igual a 6,4; concentração inicial de xilose de 144 g/l e velocidade de rotação de 162 rpm.

Os resultados experimentais e previstos obtidos são da mesma ordem de grandeza que os melhores encontrados na literatura, indicando que a aplicação do método de planejamento proposto inicialmente foi bem sucedida, no sentido de identificar as condições fermentativas que favorecem a produção de xilitol.



## ABSTRACT

After running tests using 18 different yeasts, *Candida parapsilosis* IZ 1710 was selected for this study. Each fermentation run was started by growing selected yeast cells for 24 hs at 30 °C and 250 rpm in a 500 ml flask with 100 ml of growth media, containing xylose and glucose as carbon sources. The cultivated cells were harvested by centrifugation and transferred to a 1000 ml flask containing 200 ml of the fermentation media. The main components of fermentation media were xylose as a carbon source and ammonium acetate as a nitrogen source. Yeast extract was also added as a nutrient complement.

Twenty nine fermentation runs were carried out under several combinations of temperature, pH, initial substrate concentration and agitation speed conditions (independent variables) previously determined according to the response surface method for experimental design. Xylitol yield and productivity (dependent variables) were chosen as the responses to be improved.

The results obtained and experimental conditions used to perform 29 runs were submitted to empirical modelling. The second degree polynomials calculated showed an elevated level of fit to the experimental points.

The corresponding response surface and contour levels plots for each response were drawn and the optima conditions to maximize the values of yield and productivity were determined. A maximum yield of 0.818 g of xylitol/g of consumed xylose was estimated for the following conditions: temperature of 29.2 °C, initial pH of 4.4, initial xylose concentration of 144 g/l and 119 rpm of agitation speed. Analogously, 0.828 g of xylitol/l h was the maximum estimated productivity under slightly different conditions, temperature of 32.5 °C, initial pH of 6.4, initial xylose concentration of 144 g/l and 162 rpm for agitation speed.

The estimated and experimental results are similar or even better than most of reported results, showing that the application of response surface method proposed initially was quite successful in identifying fermentations conditions that favour xylitol production by the selected microorganism.



Itália, Alemanha, Japão e principalmente a Comunidade de Estados Independentes (ex- URSS). Mais recentemente, a Finlândia tornou-se um dos maiores produtores mundiais após a instalação da Xirofin Ltd., com uma capacidade de produção de 3000 ton/ano<sup>(1,2)</sup>. No Brasil, entrou em operação há pouco tempo a empresa Agroquímica Rafard Indústria e Comércio Ltda., única produtora de xilitol no território nacional com uma produção de 500 ton/ano em 1989<sup>(75)</sup>.

Embora a síntese química continue sendo até hoje o único processo industrial para a produção de xilitol, problemas como a ocorrência de reações paralelas, formação de subprodutos e principalmente a liberação de outros açúcares além da xilose durante a hidrólise da hemicelulose permanecem sem solução. Consequentemente, para a obtenção de um produto puro e cristalino são empregadas extensivas etapas de separação para remover subprodutos da xilose e para purificar o xilitol. Assim, o alto custo de técnicas e equipamentos sofisticados necessários nestas etapas de purificação e separação juntamente com as perdas inevitáveis nas mesmas, que contribuem para que a conversão de xilanas em xilitol se limite a aproximadamente 50 - 60 %, acabam tornando o xilitol um produto caro<sup>(2)</sup>.

Por outro lado, desde os estudos sobre a assimilação de pentoses em leveduras realizados por Onishi & Suzuki<sup>(74)</sup> em 1966, sabe-se que o xilitol é o principal produto do metabolismo da xilose nas mesmas, mas até recentemente a maioria dos microrganismos testados apresentava rendimentos inferiores a 50 % na transformação de xilose em xilitol. Entretanto, a descoberta de microrganismos naturais ou de mutantes possuindo maior capacidade de produção de xilitol, tornaram cada vez mais reais as perspectivas de se desenvolver um processo microbiológico para a produção de xilitol tão competitivo quanto o de síntese química. O processo microbiológico apresentaria ainda outras vantagens adicionais, como:

- fermentação direta do hidrolisado de hemicelulose utilizando um microrganismo adaptado, sem a necessidade de submeter o hidrolisado a uma sequência de operações de purificação para a remover os subprodutos indesejados<sup>(8)</sup>;
- a fermentação poderia se processar em condições ambientes de pressão e temperatura e sem a necessidade de catalisadores metálicos, que geralmente são de alto custo;

- como os microrganismos são altamente específicos, não haveria formação de tantos subprodutos como na redução química da xilose, pois os diferentes açúcares presentes no caldo hidrolisado poderiam ser totalmente convertidas em xilitol, etanol, massa celular e em pequenas quantidades de arabinitol<sup>(62)</sup>. Isto acarretaria uma redução dos custos do processo relacionados às operações de separação e purificação, pois estas se resumiriam a operações de centrifugação para separar as células do caldo fermentado, de destilação do sobrenadante para remover alguns subprodutos voláteis (como o etanol), de purificação do xilitol para separá-lo de algum outro poliál formado. Finalmente, proceder-se-ia à concentração e cristalização da solução de xilitol resultante, levando à obtenção de xilitol na forma cristalina e pura como produto principal e gerando ainda proteína unicelular como subproduto.

Desta forma, foram definidos como principais objetivos deste trabalho, selecionar um microrganismo com potencial para a produção de xilitol e, através de um estudo sistemático empregando o método de planejamento experimental por análise de superfície de resposta, otimizar as condições fermentativas para que o processo de obtenção de xilitol através do microrganismo se torne mais eficiente, caracterizando-se por altos valores de rendimento e produtividade.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, FISIOLÓGICAS E APLICAÇÕES DO XILITOL

#### 2.1.1 - Propriedades Físico-químicas

Uma das principais características do xilitol é sua doçura. À temperatura ambiente ele é tão doce quanto a sacarose e duas vezes mais doce que o sorbitol ou o manitol, conforme pode ser visto na TABELA 2.1 .

A TABELA 2.2 apresenta outras propriedades do xilitol e mostra a semelhança entre ele e a sacarose em propriedades como a massa específica, valor nutricional e densidade das soluções aquosas. Do ponto de vista da Tecnologia de Alimentos, os produtos preparados com xilitol são potencialmente similares aos equivalentes com sacarose, exceto pelas características associadas à viscosidade, que se necessário poderá ser corrigida no produto com xilitol adicionando-se espessantes. Mais uma propriedade interessante do xilitol é sua alta solubilidade em soluções aquosas, maior ainda que a da sacarose, para temperaturas acima de 30 °C (FIGURA 2.1).

TABELA 2.1 - Poder adoçante relativo de alguns açúcares e adoçantes<sup>(1)</sup>.

Açúcar ou Adoçante	Poder Adoçante Relativo
Frutose	1,2
<u>Sacarose</u>	<u>1,0</u>
<u>Xilitol</u>	<u>1,0</u>
Dextrose	0,7
Sorbitol	0,5
Manitol	0,5
Maltose	0,4
Lactose	0,3
Hidrolisado de amido	0,3 - 0,8

TABELA 2.2 - Algumas propriedades físicas do xilitol e da sacarose<sup>(1)</sup>.

Propriedade	Xilitol	Sacarose
Ponto de fusão (°C)	93-94,5	179-186
Ponto de ebulição (°C/1 atm)	216	decompõe
<u>Massa específica</u> ( a 15 °C)	<u>1,50</u>	<u>1,59</u>
<u>Valor calórico</u> (cal/g)	<u>4,06</u>	<u>4,06</u>
Fermentação	-	+
Caramelização sob aquecimento	-	+
Estabilidade em solução aquosa	+	+
<u>Densidade de solução aquosa</u>	20% <u>1,07</u>	<u>1,08</u>
	40% <u>1,15</u>	<u>1,18</u>
	60% <u>1,23</u>	<u>1,29</u>
<u>Calor de solução</u> (cal/g), endot.	<u>36,6</u>	4,3
<u>Viscosidade</u> (cP) (20 °C)	20% <u>1,67</u>	<u>2,03</u>
	40% <u>4,18</u>	<u>6,17</u>
	60% <u>20,63</u>	<u>58,50</u>

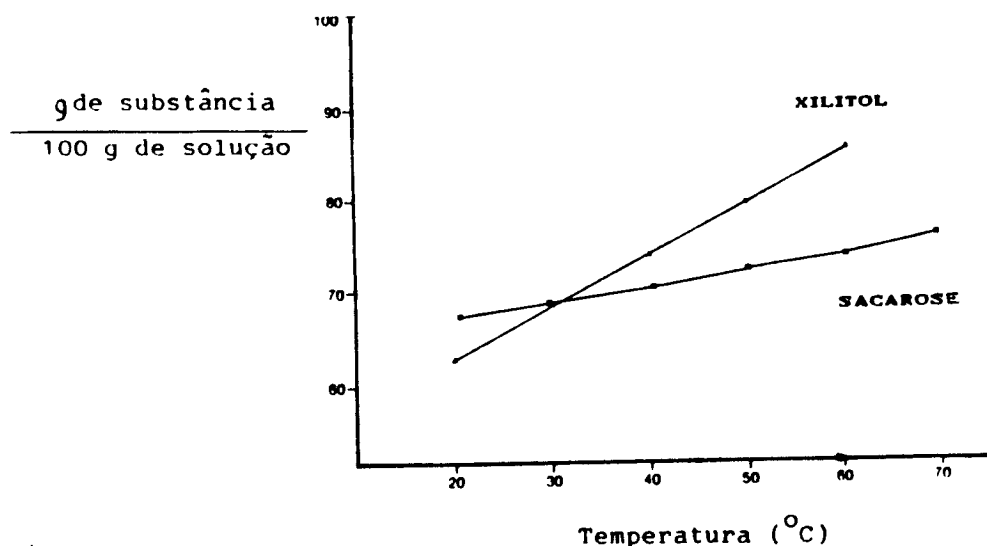


FIGURA 2.1 - Solubilidade do xilitol e da sacarose em água<sup>(1)</sup>

### 2.1.2 - Aspectos Fisiológicos do Xilitol

São as aplicações fisiológicas do xilitol que o transformam num produto especial. Com certeza, sua mais importante característica fisiológica é a **baixa cariogenicidade** (FIGURA 2.2) pelo fato de não ser metabolizado pelos microrganismos produtores de ácido (*Streptococci*), normalmente presentes na flora bacteriana bucal.

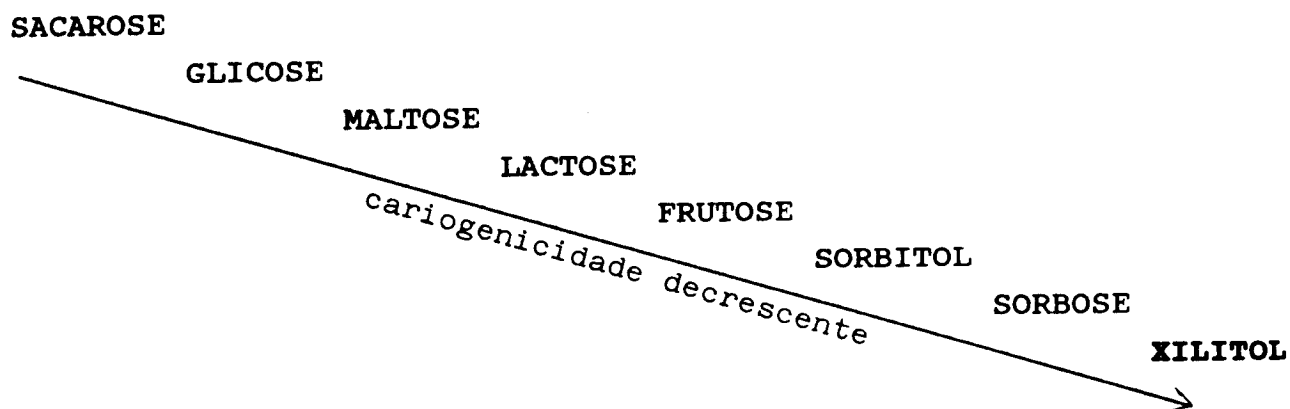


FIGURA 2.2 - Cariogenicidade de alguns açúcares e adoçantes<sup>(1)</sup>

Conforme citam Ylikahri<sup>(72)</sup> e Makinen<sup>(80)</sup>, esta propriedade fisiológica do xilitol chamou a atenção dos cientistas no final dos anos 60 e foi confirmada em meados da década de 70 através dos estudos realizados na Universidade de Turku (Finlândia) por Scheinin e Makinen.

Os estudos preliminares foram realizados analisando o índice de Atividade de Cáries (IAC) em voluntários que receberam dietas contendo exclusivamente um tipo de açúcar (sacarose, frutose ou xilitol) durante 2 anos. Os resultados obtidos, reproduzidos na FIGURA 2.3, provam que o xilitol é essencialmente não cariogênico, pois foi constatada uma estabilização no IAC dos indivíduos que receberam a dieta com xilitol, enquanto que para os outros voluntários que receberam as dietas com sacarose ou frutose, o IAC aumentou continuamente durante o período de estudo. Além disso, Makinen<sup>(80)</sup> verificou a ocorrência de remineralização de cáries já existentes nos indivíduos que se alimentaram exclusivamente de xilitol como açúcar. A FIGURA 2.3 mostra claramente a queda na

curva do IAC destes indivíduos após 20 meses de tratamento.

Makinen<sup>(80)</sup> afirma que há dois fatores contribuindo para que a remineralização possa ocorrer na presença de xilitol:

- Fator 1 : Aumento no fluxo de saliva que o xilitol, como qualquer outro carboidrato doce, provoca;
- Fator 2 : Manutenção do pH da saliva entre 7,2 e 7,8 graças à inabilidade das bactérias da cavidade oral em metabolizarem efetivamente o xilitol, de forma que ele nunca é convertido em ácidos nas placas dentárias.

Estes dois fatores agem simultaneamente, proporcionando as melhores condições para que os mecanismos naturais de defesa da saliva, que está normalmente supersaturada em hidroxiapatita,  $Ca^{2+}$  e fosfato, possam reparar as áreas em princípio de desmineralização.

Dando prosseguimento à pesquisa, Scheinin e Makinen examinaram o efeito da substituição apenas parcial da dieta alimentar com produtos contendo xilitol como adoçante, comparando o IAC de voluntários que consumiram diariamente 4 gomas de mascar contendo sacarose ou xilitol<sup>(80)</sup> (FIGURA 2.4). Os resultados obtidos foram surpreendentes, pois mesmo a substituição **parcial** da sacarose por xilitol reduziu intensamente a incidência de cáries dentárias.

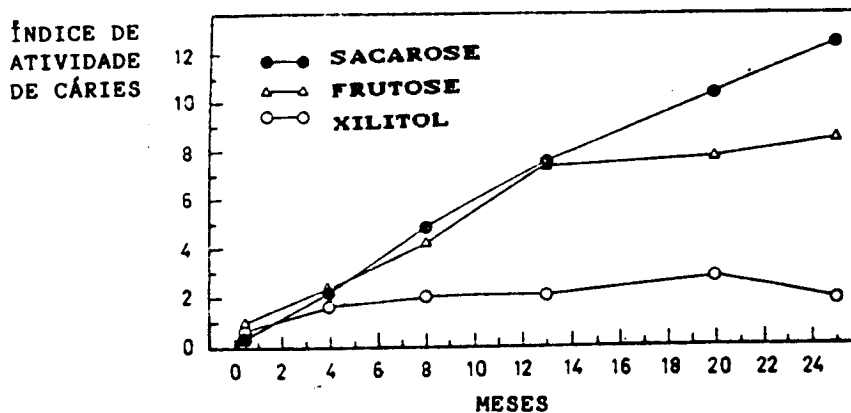


FIGURA 2.3 - Estudos da Universidade de Turku sobre a incidência de cáries em indivíduos submetidos a dietas com diferentes açúcares<sup>(80)</sup>.



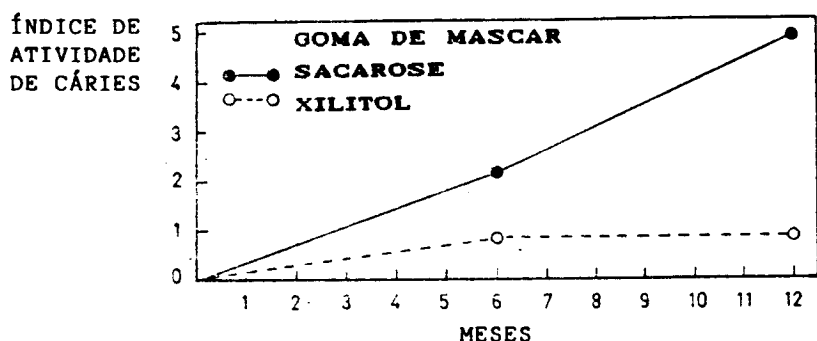


FIGURA 2.4 - Estudos da Universidade de Turku sobre o efeito da substituição parcial da sacarose por xilitol na incidência de cáries<sup>(80)</sup>.

Além desta propriedade anti-cariogênica, o xilitol desempenha outros papéis no organismo humano e tem outras aplicações fisiológicas importantes. Por razões ainda desconhecidas, vários gramas de xilitol são produzidas diariamente no fígado humano, que também é o único órgão que possui o sistema enzimático necessário para metabolizar quantidades consideráveis de xilitol provenientes de fontes externas, transformando-o em energia. Após entrar no fígado, o metabolismo do xilitol está esquematicamente representado na FIGURA 2.5 e é resumido a seguir de acordo com a descrição de Ylikahri<sup>(72)</sup>.

O xilitol é primeiro oxidado a D-xilulose pela enzima poliol desidrogenase dependente de  $\text{NAD}^+$ . A D-xilulose é então rapidamente fosforilada pela enzima D-xilulose quinase a D-xilulose-5-fosfato, que pode ser convertido em frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato através da Via Pentose Fosfato. Estes intermediários são metabolizados normalmente gerando glicose e glicogênio e, menos frequentemente, em piruvato e lactato.

Como consequência do rápido metabolismo do xilitol no fígado, juntamente com a lenta absorção do mesmo pelo intestino, a assimilação do xilitol no organismo humano se processa de forma que toda a glicose formada a partir do xilitol é primeiro estocada

como glicogênio, sendo liberada gradualmente e não causando rápidas mudanças na concentração de glicose no sangue, características que fazem com que o xilitol seja indicado como adoçante para diabéticos<sup>(72)</sup>.

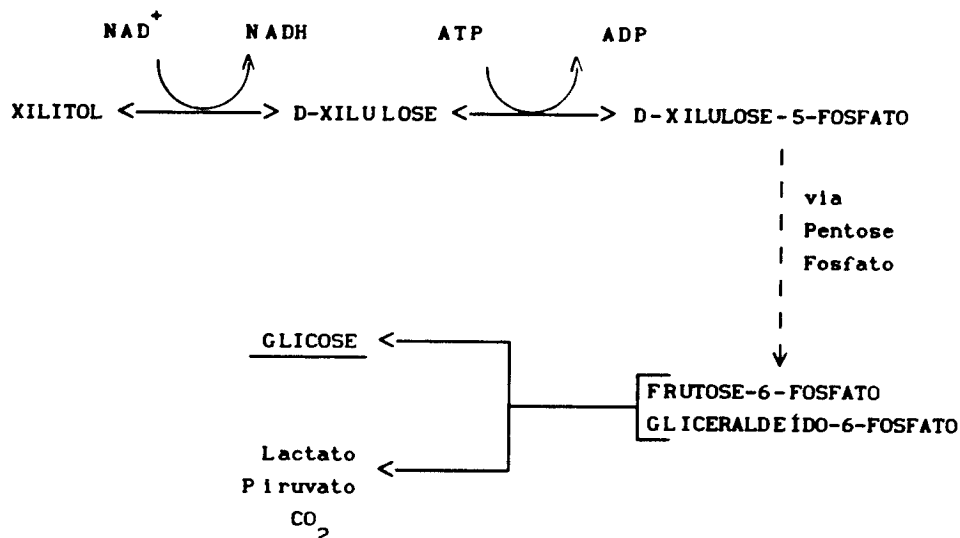


FIGURA 2.5 - Metabolismo do xilitol no fígado de mamíferos

Outra aplicação do xilitol é como substituto do açúcar para indivíduos que sofrem de anemia hemolítica devido a uma deficiência na enzima glicose-6-fosfato desidrogenase dos glóbulos vermelhos, um problema que atinge 1 % da população mundial<sup>(8)</sup>. Entretanto, até o momento esta ação terapêutica do xilitol não foi bem esclarecida.

Apesar de todas estas considerações favoráveis ao xilitol, convém ressaltar que já foram verificadas sérias complicações em pacientes que receberam grandes quantidades dele por via intravenosa, sendo que este procedimento é altamente contra-indicado. Por outro lado, o único efeito colateral do xilitol quando administrado por via oral é a diarreia osmótica, que pode ocorrer quando a quantidade de xilitol ingerida por indivíduos não adaptados

ultrapassa o limite de 20 a 40 g/dia. Entretanto, Ylikahri<sup>(72)</sup> afirma que é possível aumentar a capacidade de absorção do intestino através de um tratamento adaptativo, no qual as doses diárias de xilitol são aumentadas gradativamente durante uma administração prolongada.

### 2.1.3 - Considerações sobre as Aplicações do Xilitol na Tecnologia de Alimentos

As aplicações potenciais do xilitol em alimentos incluem produtos de panificação e condimentos, geléias e compotas, sobremesas e produtos de confeitaria. Entretanto, para se aproveitar integralmente as propriedades não cariogênicas do xilitol, estes produtos devem ser principalmente balas, gomas de mascar, bolos, geléias e outros produtos contendo sacarose, conhecidos como os grandes responsáveis pelas cáries por serem geralmente consumidos em pequenas quantidades entre as refeições<sup>(18)</sup>.

Como o xilitol se cristaliza de uma maneira diferente da sacarose (sacarose = monoclinico, xilitol = rômico), a formulação de alguns produtos pode requerer algumas modificações<sup>(18)</sup>. A textura do produto contendo xilitol pode ser diferente por causa da diferença na dureza dos cristais, mas em geral os produtos preparados com xilitol são tão bons ou até melhores do que aqueles feitos com sacarose<sup>(18)</sup>. É o caso das gomas de mascar, onde o efeito refrescante do xilitol cristalino, devido ao caráter endotérmico do seu calor de solução (ver TABELA 2.2), até realça os sabores hortelã, limão e tutti-frutti. Além disso, embora o manitol e o sorbitol também possam facilmente substituir a sacarose nas gomas de mascar, o xilitol é o único que pode substituí-la na mesma proporção. Como no processo tradicional de produção de gomas de mascar, o xarope de glicose também é um dos principais ingredientes, é importante substituí-lo por um outro produto não cariogênico, como glicerol, goma arábica, soluções aquosas de xilitol ou outras gomas<sup>(18)</sup>.

Chocolates também podem ser prontamente produzidos com xilitol como substituto da sacarose, na base de 1:1. Corrigindo a menor viscosidade do produto preparado com xilitol através da adição de algum aditivo, o sabor e textura do mesmo são idênticos ao do produto original<sup>(2)</sup>. Atualmente, encontram-se nos mercados

da Finlândia, Estados Unidos e Comunidade dos Estados Independentes (ex-URSS) chocolates e gomas de mascar preparados com xilitol<sup>(1,2,18)</sup>.

A substituição da sacarose por xilitol em produtos com alto teor de água como gelatinas, pudins, geléias e compotas de baixas calorias, molhos e cremes e preparações farmacêuticas apresentou excelentes resultados<sup>(2,18)</sup>. No caso de produtos com alto teor de açúcar como ketchup e leite condensado, o escurecimento e a deterioração por microrganismos pode ser evitada com a substituição do açúcar por xilitol<sup>(18)</sup>.

Caramelos e balas duras, produtos de panificação e refrigerantes são produtos que apresentam restrições à substituição do açúcar por xilitol por motivos diferentes. No caso dos caramelos e de balas duras devido à cristalização do xilitol ocorrer logo no início do resfriamento do produto, este se torna quebradiço<sup>(2)</sup>.

O fato de o xilitol não ser fermentado por *Saccharomyces cerevisiae* impede que as massas de panificação adoçadas com xilitol cresçam. Além disso, o aroma característico dos produtos de panificação é resultante de uma série de reações não enzimáticas envolvendo os grupos aldo ou ceto, presentes na sacarose invertida (frutose e glicose), mas não no xilitol<sup>(2)</sup>.

O uso de xilitol como adoçante em refrigerantes não é recomendado, pois o consumo destes pode facilmente exceder à dose recomendada para sua ingestão, podendo causar diarreia<sup>(2)</sup>.

Assim, identificando como requisitos básicos de um produto que pretenda se tornar um adoçante alternativo:

- ser uma substância fisiológica (bem tolerada e natural),
- possuir doçura e sabor tão próximos quanto possível dos da sacarose,
- poder ser consumido por diabéticos,
- não ser cariogênico,
- não apresentar grandes dificuldades tecnológicas na fabricação de produtos alimentícios,

pode-se afirmar que o xilitol preenche satisfatoriamente a maioria destes, transformando-se não apenas em uma valiosa alternativa para a sacarose e seus substitutos, mas principalmente numa das novas descobertas no campo de alimentos hoje em dia<sup>(2)</sup>.

## 2.2 - OBTENÇÃO DO XILITOL

A obtenção do xilitol a partir da extração direta de suas fontes naturais é impraticável e anti-econômica devido à pequena quantidade na qual ele ocorre. No entanto, o xilitol pode ser produzido por síntese química ou microbiológica a partir da xilose encontrada em abundância em vários resíduos agrícolas.

### 2.2.1 - Fontes para a Obtenção de Xilose

Os 3 principais componentes da biomassa vegetal são celulose, lignina e hemicelulose. A celulose é um polímero linear de glicose, insolúvel e de alto peso molecular. Substâncias polifenólicas são as componentes da estrutura tridimensional aleatória da lignina, que também é insolúvel e de alto peso molecular<sup>(7,65)</sup>.

A fração da biomassa correspondente a hemicelulose é composta por heteropolímeros lineares e ramificados de D-xilose, L-arabinose, D-glicose, D-galactose e ácido D-glucorônico<sup>(65)</sup> (são também conhecidos homopolímeros de xilose, manose e galactose). A forma mais abundante de hemicelulose é aquela com um esqueleto de D-xilose e cadeias laterais de L-arabinose, conhecida como xilana, apresentando uma estrutura muito ramificada e menos cristalina que a da celulose. Por isso, as ligações glicosídicas entre os monômeros de D-xilose na hemicelulose são menos estáveis que as ligações glicosídicas entre os monômeros de D-glicose na celulose, sendo mais facilmente hidrolisadas por ácidos. Como consequência, as pentoses podem ser facilmente extraídas de resíduos vegetais através de hidrólise com ácido diluído, apresentando rendimentos que excedem a 80 - 85 %<sup>(37)</sup> (a extração de glicose da celulose ocorre sob condições de hidrólise muito mais severas e normalmente o rendimento não excede 55 a 60 %).

As matérias-primas comercialmente mais utilizadas para a extração da xilose através da hidrólise ácida são polpa de madeira resultante do processamento de papel e de compensados; casca e semente de algodão; bagaço de cana-de-açúcar; casca e farelo de arroz e aveia; sabugos, caules e hastes de milho e outros resíduos agrícolas<sup>(18)</sup> que no Brasil vêm sendo utilizados apenas para

combustão, produção de ração animal ou de adubo orgânico. A TABELA 2.3 mostra as frações de hemicelulose, celulose e lignina de alguns destes subprodutos agrícolas e também a composição da hemicelulose em função dos carboidratos presentes.

TABELA 2.3 - Composição de resíduos agrícolas em celulose, hemicelulose e lignina e composição da hemicelulose em carboidratos.

Resíduo Agrícola	Composição do Vegetal (%) <sup>(73)</sup>			Compos. da Hemicelulose (%) <sup>(4)</sup>			
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Xilose	Arabinose	Glicose	Outros
Milho sabugo	36,5	28,0	—	65,1	9,6	25,3	traços
haste, caule	38,0	26,0	11,0	70,5	9,0	14,5	5,9
palha de trigo	34,0	27,6	18,0	57,9	9,1	28,1	5,0
bagaço de cana	34,0	38,0	11,0	59,5	14,5	26,0	—
folhas, has- tes de soja	—	—	—	59,9	6,6	6,1	27,4
hastes de girassol	—	—	—	60,6	2,2	32,6	4,6
palha de linho	—	—	—	64,6	12,8	1,2	21,4
casca de amendoim	—	—	—	46,3	5,0	46,6	2,1

Certamente, os resíduos do pé de milho são os mais ricos em xilose e como são produzidos em um total de 2 a 3 toneladas de resíduos por acre, constituem uma valiosa fonte de matéria-prima para a produção de xilitol <sup>(73)</sup>.

Embora a hemicelulose do bagaço de cana de açúcar não conte- nha tanta xilose quanto a do milho, o bagaço apresenta a maior fração de hemicelulose entre todos os resíduos relacionados na

TABELA 2.3. Além disso, para cada litro de álcool combustível produzido no Brasil são gerados 4,5 kg de bagaço de cana<sup>(78,79)</sup> (com 50 % de umidade). Como a produção brasileira de etanol é de aproximadamente 13.200 milhões de litros por safra (previsão para a safra 88/89)<sup>(77)</sup>, são produzidos, portanto, 29,7 milhões de kg de bagaço seco. Se toda esta quantidade fosse submetida a um processo de hidrólise ácida com uma eficiência de 80 %, de acordo com os valores da concentração de hemicelulose no bagaço e de concentração de xilose na hemicelulose presentes na TABELA 2.3, poderiam ser obtidas 5,3 milhões de kg de xilose por safra. Desta forma, o bagaço de cana-de-açúcar pode ser considerado uma alternativa muito atraente como fonte de matéria-prima para a produção de xilitol no caso do Brasil.

### 2.2.2 - A Síntese Química do Xilitol

Os princípios básicos do processo de produção de xilitol são a recuperação da xilose a partir de matérias-primas vegetais e sua hidrogenação subsequente, esquematicamente representados na FIGURA 2.6.

A FIGURA 2.7 representa o fluxograma do processo de produção de xilitol por síntese química, que será descrito a seguir.

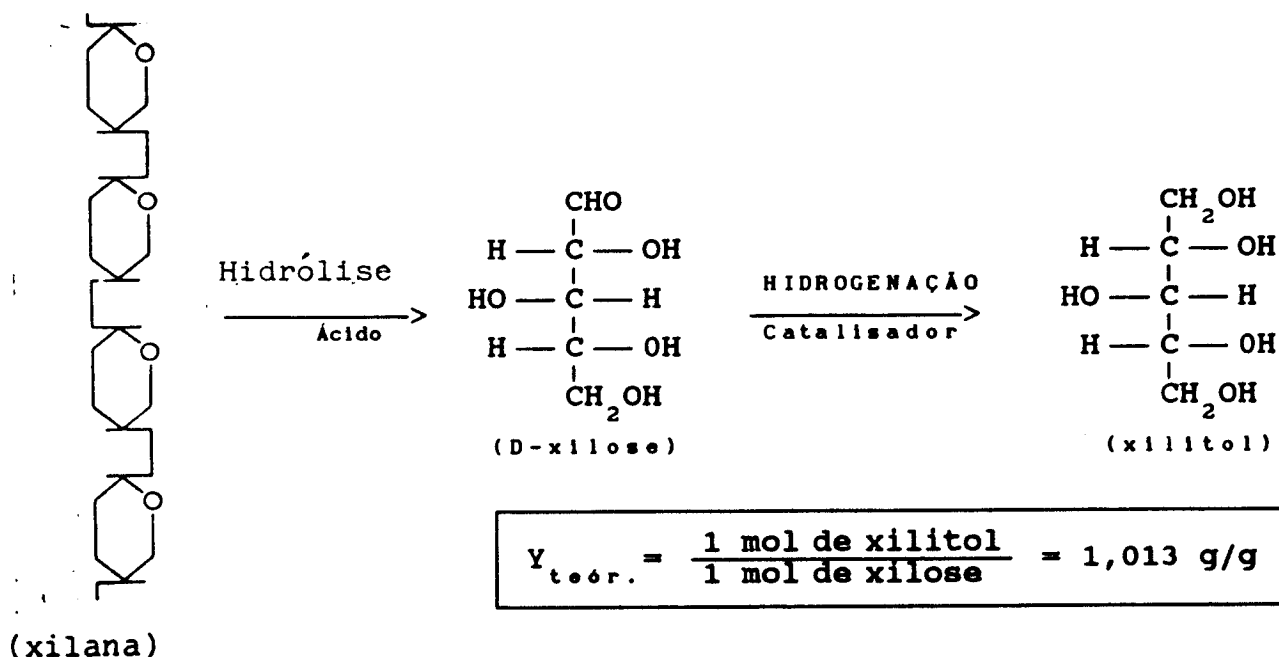


FIGURA 2.6 - Princípio da produção de xilitol<sup>(2)</sup>

## a) Hidrólise

O material vegetal rico em pentosanas é tratado com uma solução de ácido clorídrico ou de ácido sulfúrico diluído, sob pressão e aquecimento para apenas hidrolizar a hemicelulose e precipitar a lignina, sem atacar a celulose. Os açúcares monoméricos se dissolvem no meio de reação, juntamente com outros produtos solúveis. As desvantagens da hidrólise ácida são a ocorrência de reações paralelas indesejadas, provocando a degradação dos açúcares e formação de produtos como furfural, hidroximetilfurfural, ácido acético etc. A dificuldade em controlar as condições de reação compromete a especificidade na hidrólise do material, de forma que a lignina e a celulose acabam sendo atacadas pelo ácido em alguma extensão, liberando compostos como fenóis, ácido tânico e terpenos no meio reacional. Até mesmo a corrosão dos equipamentos pelos ácidos usados na hidrólise contribui para a formação de contaminantes, gerando principalmente ions de ferro, cromo, níquel e cobre<sup>(65)</sup>.

O resíduo da hidrólise química consiste em celulose e lignina, podendo ainda ser utilizado na indústria de processamento de madeira para a produção de compensados, celulose e papelão<sup>(2)</sup>.

Uma alternativa para a obtenção de xilose a partir de materiais hemicelulósicos em condições menos problemáticas seria a hidrólise enzimática, que se caracteriza por grande especificidade e reduzida formação de produtos de degradação, mas é pouco viável para a produção em larga escala devido à lentidão do ataque enzimático e ao grande número de xilanases necessárias para que todas as ligações pudessem ser quebradas<sup>(2,65)</sup>.

## b) Purificação da xilose

Nesta fase do processo, o hidrolizado é submetido a uma série de etapas de purificação complexas para remover os subprodutos indesejados da corrente principal. Existem basicamente duas rotas para efetuar a purificação, que diferem no isolamento ou não da xilose<sup>(2)</sup>.

- Isolamento da xilose (linha tracejada na FIGURA 2.7): A solução rica em pentose obtida após a hidrólise ácida é purificada por filtração mecânica e por técnicas de troca iônica para remoção de



cor e de sais. Esta solução é então submetida a fracionamento cromatográfico para obter uma solução de xilose altamente purificada.

- Não isolamento da xilose (linha contínua na FIGURA 2.7): Neste caso, o hidrolisado é tratado em uma série de processos de troca iônica e descoloração para remover todos os subprodutos da corrente principal contendo xilose, exceto os carboidratos.

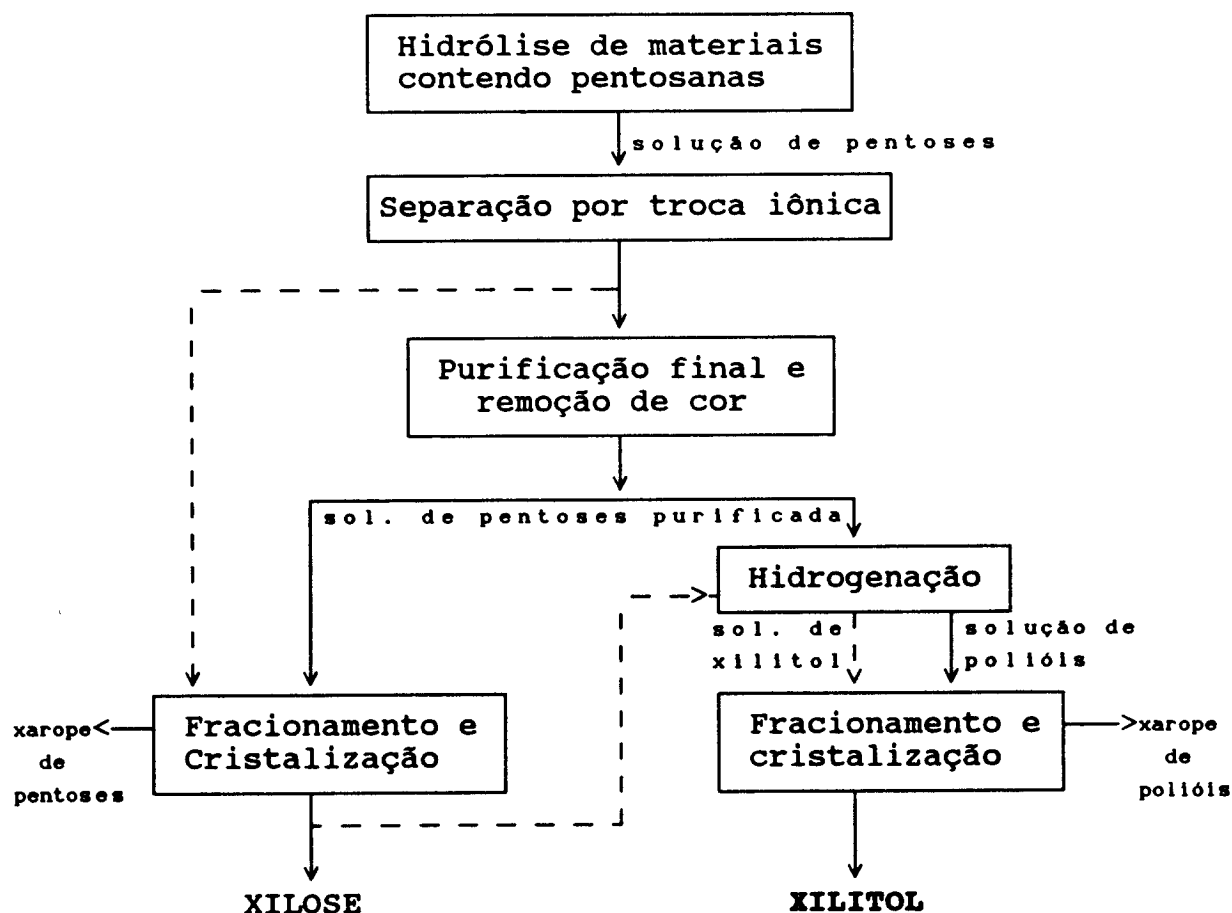


FIGURA 2.7 - Produção de xilitol e xilose<sup>(2)</sup>

### c) Hidrogenação

Para a conversão em xilitol, uma solução de xilose pura ou misturada com outros açúcares é hidrogenada a temperaturas variando de 80 a 140 °C e pressões de até 50 atm, na presença de um catalisador metálico. Partindo da xilose previamente purificada, apenas xilitol é produzido, mas com a solução de pentoses e

outros carboidratos, todos os açúcares presentes são também hidrogenados a seus respectivos polióis.

#### d) Purificação do Xilitol

Após remover o catalisador por filtração e troca iônica, a solução hidrogenada passa ainda por processos de purificação, concentração e cristalização. Na rota de isolamento da xilose, descoloração e cristalização em solventes aquosos ou alcoólicos têm sido usadas para obter o xilitol puro e cristalino<sup>(2)</sup>.

Na outra rota de não isolamento da xilose, a separação do xilitol dos outros polióis deve ser feita antes da cristalização do xilitol. Esta purificação pode ser efetivamente realizada através de fracionamento cromatográfico por troca iônica com resinas de troca catiônica. O xilitol puro é então cristalizado da solução aquosa separada no fracionamento<sup>(2)</sup>.

### 2.2.3 - Síntese Microbiológica de Xilitol

Embora o xilitol venha sendo produzido em larga escala através da hidrólise química de xilose extraída da hemicelulose, são conhecidas muitas espécies de leveduras e alguns fungos miceliais e bactérias capazes de produzir xilitol a partir de xilose.

O microrganismo ideal para a produção de xilitol deve apresentar as seguintes características:

- crescer em xilose,
- excretar xilitol extracelularmente, com rapidez,
- ter alto rendimento (comparável ao da síntese química).

As bactérias e os fungos não preenchem o último requisito, pois embora algumas espécies de bactérias, como *Corynebacterium*<sup>(65)</sup> e *Enterobacter liquefaciens*<sup>(65)</sup>, produzam xilitol, o rendimento é de apenas 33 %. Além disso, os sistemas com bactérias, caracteristicamente, geram múltiplos produtos que incluem álcoois (butanol, etanol, isopropanol, 2,3-butanediol), ácidos orgânicos (ácidos acético, butírico, fórmico e lático), acetona e gases (metano, gás carbônico, hidrogênio), exigindo mais etapas de separação e purificação para a obtenção de um produto

puro. Já para os fungos, apenas pequenas quantidades de xilitol foram detectadas em espécies *Mucor*. Para a maioria destes microrganismos a xilose é preferencialmente fermentada, gerando etanol, ácido acético e ácido lático como principais produtos, e mesmo assim em concentrações e produtividades muito baixas devido às lentas taxas de crescimento e conversão dos fungos.

O primeiro estudo sobre os produtos resultantes do cultivo de 66 espécies de leveduras em meio contendo pentoses foi feito em 1966 por Onishi & Suzuki<sup>(74)</sup> e revelou que xilitol, arabitol e ribitol são imediatamente produzidos a partir de D-xilose, L-arabinose e D-ribose respectivamente, no entanto com um rendimento em pentitol de no máximo 40 % da pentose consumida. Posteriormente, estudos quase tão abrangentes quanto este, efetuados por Gong et al.<sup>(4,19)</sup>, Suihko & Poutanen<sup>(48)</sup>, Suihko & Drazic<sup>(29)</sup> entre outros, confirmaram ser o xilitol o principal produto do cultivo de leveduras em xilose, mas com valores de rendimento ainda se mantendo bem pouco estimulantes. Apenas recentemente, com o isolamento de linhagens de *Candida guilliermondii* por Meyrial et al.<sup>(62)</sup> e de *Candida* sp B-22 por Chen & Gong<sup>(8)</sup>, altamente produtoras de xilitol; o desenvolvimento de linhagens mutantes por Gong et al.<sup>(19)</sup> e os conhecimentos adquiridos sobre o metabolismo de xilose nas leveduras, foi possível encontrar microrganismos mais próximos dos desejados, capazes de converter até 90 % da xilose consumida em xilitol, com alta produtividade.

Todavia, permanecem ainda outros desafios e o papel da síntese microbiológica no futuro da produção de xilitol depende da superação de problemas como:

- Presença de substâncias inibidoras no hidrolisado

Conforme descrito por Hyvonen & Koivistoinen<sup>(2)</sup>, na etapa de hidrólise da hemicelulose, muitas substâncias tóxicas como furfural, fenóis e íons metálicos podem surgir. Há várias alternativas para lidar com problemas de substâncias inibidoras como evitar a sua formação, removê-las antes de utilizar o hidrolisado para a fermentação ou ainda adaptar as linhagens, preservando suas respectivas capacidades produtivas, à presença das substâncias inibidoras<sup>(8)</sup>.

Muitos esforços têm sido feitos no sentido de desenvolver

procedimentos de hidrólise que minimizem a formação destes subprodutos, como por exemplo o método proposto por Limbaugh<sup>(65)</sup> onde o rendimento em furfural foi reduzido a 8 %. Isto contribui para facilitar as etapas de purificação e também torna mais viável a possibilidade de aclimatização de uma levedura. Neste sentido, Gong & Chen<sup>(8)</sup> foram bem sucedidos, conseguindo aclimatizar e manter a capacidade produtiva do microrganismo *Candida* sp B-22, cultivando-o em um hidrolisado sem pré-tratamento e sem diluição.

- Presença de altas concentrações de xilose

Para que a etapa de isolamento de xilitol puro e cristalino seja economicamente viável, é necessário que a concentração final de xilitol alcançada na fermentação seja de no mínimo 100 g/l<sup>(62)</sup>, de forma que a levedura escolhida deve ser capaz de metabolizar eficientemente altas concentrações de xilose, sem sofrer inibição.

Vários microrganismos como *C. guillermondii*<sup>(62)</sup> e *Candida* sp B-22<sup>(8)</sup> já mostraram preencher este requisito.

- Especificidade em relação à xilose

Além da xilose, outros açúcares como arabinose, manose e galactose são frequentemente encontrados em hidrolisados de materiais ricos em hemicelulose. Para a redução dos custos nas etapas de separação e purificação, é fundamental que o microrganismo seja altamente específico em relação a xilose, ou seja, apenas a xilose deve ser significativamente convertida no respectivo poliól. O microrganismo deve ainda ser capaz de metabolizar os outros açúcares preferencialmente em massa celular, sem convertê-los nos respectivos polióis ou outros produtos, que possam ser difíceis de separar.

No estudo realizado por Meyrial et al.<sup>(62)</sup> sobre os produtos da assimilação de pentoses e hexoses por *C. guillermondii*, demonstrou-se a alta especificidade deste microrganismo, pois apenas xilose e arabinose foram convertidas nos respectivos polióis, sendo que somente 1,1 g/l de arabinitol foi obtido após 90 horas de fermentação para um consumo de 23,6 % da arabinose disponível inicialmente. Já as hexoses (glicose, manose e galactose) foram utilizadas totalmente por esta espécie, mas apenas para crescimento e produção de etanol.

### 2.3 - A PRODUÇÃO DE XILITOL POR LEVEDURAS : ASPECTOS FUNDAMENTAIS

Embora muitas leveduras produzam principalmente xilitol como produto do metabolismo da xilose, o nível de formação do mesmo é geralmente baixo. Dos 38 estudos sobre a assimilação de xilose por várias leveduras relacionados na TABELA 2.4, 23 (correspondendo a 60 % do total) apresentam valores de rendimento em xilitol inferiores a 50 %, outros 9 (24% do total) possuem valores entre 50 e 70% e apenas 6 (16 % do total), ultrapassam o valor de 70 % de rendimento na formação de xilitol a partir de xilose e se aproximam mais do rendimento teórico de 1,013 g de xilitol/g de xilose consumida.

Dentre estes últimos, é possível identificar alguns microrganismos altamente produtores de xilitol como a levedura *Candida* sp. B-22 isolada por Chen & Gong<sup>(8)</sup>; os mutantes de *Candida tropicalis* HPX1 e HPX2 obtidos por Gong et al.<sup>(19)</sup> e a levedura *Pachysolen tannophilus* IfGB, isolada por Dellweg et al.<sup>(35)</sup>. Quanto ao trabalho utilizando *Candida pelliculosa* em associação com *Methanobacterium* HU desenvolvido por Kitpreechavanich et al.<sup>(13)</sup>, embora apresente excelente valor de rendimento, trata-se mais de um sistema enzimático para a conversão de xilose em xilitol e será descrito em detalhes no item 2.3.8 deste capítulo.

Além do rendimento, também a produtividade em xilitol é geralmente baixa em consequência da lenta assimilação da xilose pelos microrganismos. Assim, dos estudos relacionados na TABELA 2.4, 30 apresentam produtividades inferiores a 0,5 g/lh; para apenas 4, os valores estão entre 0,5 e 1,0 g/lh e somente 2 conseguem valores acima de 1 g/lh, sendo que destes *Candida* sp B-22<sup>(8)</sup> novamente se destaca por apresentar uma produtividade de 1,56 g/lh, com um rendimento de 86,5 %.

Além da seleção de microrganismos ou obtenção de mutantes com alta capacidade produtiva, a manipulação de vias metabólicas através do estudo e controle das condições de cultivo de um microrganismo também é uma ferramenta útil na tentativa de favorecer a formação dos produtos desejados.

TABELA 2.4 - Condições experimentais utilizadas e resultados obtidos nos trabalhos consultados sobre a produção de xilitol por leveduras.

Microrganismo Classificação	T (°C)	N (rpm)	$\frac{V_{\text{aerolo}}(\text{ml})}{V_{\text{frasco}}(\text{ml})}$	$S_0$ (g/l)	P (g/l)	pH <sub>0</sub>	$X_0$ (g/l)	t (h)	$Y_1$ (g/g)	$Y_2$ (g/lh)	ref.
<i>C. moggii</i> 18364	30	200	1/5	50	28,2	-	—	72	0,595	0,392	3
<i>C. parapsilosis</i> 28474	"	"	"	"	33,2	-	—	"	0,664	0,461	3
<i>C. tropicalis</i> 20240	"	"	"	"	28,0	-	—	"	0,560	0,389	3
<i>S. uvarium</i> 26602	"	"	"	"	21,0	-	—	"	0,434	0,291	3
<i>C. tropicalis</i> 32113	"	140	3/10	55	23,3	-	—	44	0,420	0,529	3
<i>C. tropicalis</i> 32113	"	"	1/2	"	34,4	-	—	96	0,625	0,358	3
<i>Candida</i> sp B-22	"	160	2/5	216	186,8	6,0	4E9*	120	0,865	1,557	8
<i>C. tropicalis</i> 32113	"	"	1/5	50	22,3	-	10	100	0,447	0,223	9
<i>C. tropicalis</i> 32113	"	"	"	"	27,5	-	1,3	"	0,550	0,275	10
<i>C. boidinii</i> 2201	28	100	"	100	36,1	7,0	0,4	144	0,460	0,250	12
<i>C. pelliculosa</i>	35	—	3/10	8,5	7,5	7,5	—	24	1,000	0,313	13
<i>C. didensii</i> 20213	30	200	2/5	50	12,3	-	—	96	0,245	0,128	14
<i>C. tropicalis</i>	"	"	"	"	20,8	-	—	"	0,412	0,217	19
<i>C. tropicalis</i> HPX1	"	"	"	"	43,9	-	—	"	0,877	0,457	19
<i>C. tropicalis</i> HPX2	"	"	"	"	48,0	-	—	"	0,960	0,500	19
<i>K. fragilis</i> 12424	"	"	"	"	3,0	-	—	"	0,078	0,031	19
<i>R. toruloides</i> 26194	"	"	"	"	16,4	-	—	"	0,327	0,171	19
<i>S. carlsbergensis</i> 26602	"	"	"	"	4,0	-	—	"	0,079	0,042	19
<i>S. cerevisiae</i> 24860	"	"	"	"	3,7	-	—	"	0,074	0,038	19
<i>S. diastaticus</i> 28338	"	"	"	"	5,4	-	—	"	0,107	0,056	19
<i>S. rouxii</i> 32901	"	"	"	"	2,0	-	—	"	0,040	0,021	19
<i>S. saki</i> 26421	"	"	"	"	1,0	-	—	"	0,021	0,010	19
<i>S. fibuligera</i> 32693	"	"	"	"	14,8	-	—	"	0,296	0,154	19
<i>S. pombe</i> 16979	"	"	"	"	2,0	-	—	"	0,052	0,021	19
<i>T. candida</i> 20214	"	"	"	"	17,4	-	—	"	0,347	0,181	19

TABELA 2.4 (Continuação)

Microrganismo Classificação	T (°C)	N (rpm)	$\frac{V_{meio}(ml)}{V_{frasco}(ml)}$	$S_0$ (g/l)	P (g/l)	pH <sub>0</sub>	$X_0$ (g/l)	t (h)	$Y_1$ (g/g)	$Y_2$ (g/lh)	ref.
<i>T. melibiosaceum</i> 28580	30	200	2/5	50	21,4	-	—	96	0,429	0,233	19
levedura do sake 104	"	"	1/5	90	10,0	5,6	1E7 a 1E8	"	0,113	0,104	29
<i>S. dastaticus</i> 28338	"	"	"	"	10,4	"	"	"	0,121	0,108	29
<i>S. pombe</i> 16976	"	"	"	"	9,3	"	"	"	0,106	0,097	29
<i>P. tannophilus</i> 2460	"	"	"	"	9,7	"	"	"	0,115	0,101	29
<i>C. tropicalis</i> 29725	"	"	"	"	13,3	"	"	72	0,150	0,185	29
<i>Candida</i> sp C2	"	—	—	65	38,6	"	1E8*	"	0,594	0,536	55
<i>Candida</i> sp C210 (mut. c2)	"	—	—	"	34,3	"	"	24	0,562	1,429	55
<i>P. tannophilus</i> 101	"	—	1/5	30	15,6	5,0	—	—	0,520	—	35
<i>P. tannophilus</i> 1fGB	"	—	"	"	25,5	"	—	—	0,850	—	35
<i>C. guilliermondii</i> 5578	"	150	4/5	300	221,0	6,0	—	406	0,750	0,544	62
<i>C. guilliermondii</i> 20037	"	200	2/5	43,2	25,8	-	—	85	0,598	0,303	63
<i>Candida</i> sp HT8	—	—	—	100	46,9	-	—	96	0,497	0,489	65

\* - concentração celular em número de células/ml

 $Y_1$  - rendimento $Y_2$  - produtividade

T - temperatura

N - velocidade de agitação

P - concentração de xilitol

t - tempo de fermentação

 $V_{meio}$  - volume de meio $V_{frasco}$  - volume do frasco $S_0$  - concentração inicial de xilosepH<sub>0</sub> - pH inicial $X_0$  - concentração inicial de células

Com respeito à influência de parâmetros fermentativos na produção de xilitol, em um estudo sobre a conversão de carboidratos derivados da hemicelulose, Gong et al.<sup>(4)</sup> afirmam que altas tensões de oxigênio, baixas temperaturas e altos valores de pH são condições que favorecem a formação de xilitol.

### 2.3.1 - Metabolismo de D-Xilose

O transporte através da membrana celular é o primeiro passo no metabolismo da D-xilose ou de qualquer outro nutriente. Como acontece frequentemente, o sistema de assimilação de xilose e a regulação da atividade dos transportadores tem um papel importante na utilização global da xilose<sup>(54)</sup>.

Fazendo uma breve revisão sobre os mecanismos de transporte, são conhecidos pelo menos 3 para o transporte de açúcares: difusão passiva, difusão facilitada e transporte ativo, ressaltando-se que estes mecanismos não são mutualmente exclusivos e 2 ou mais podem funcionar num mesmo microrganismo. A difusão passiva é o mais simples e lento de todos os mecanismos, pois se caracteriza pela difusão do soluto através da membrana plasmática em função apenas do gradiente de concentração até que o equilíbrio entre a concentração do açúcar no interior e no exterior da célula seja atingido. A difusão facilitada também utiliza a difusão por gradiente de concentração e não requer energia metabólica, mas o transporte é intermediado por uma proteína transportadora e portanto apresenta especificidade em relação à molécula do substrato. Os mecanismos de transporte ativo são semelhantes à difusão facilitada por possuírem também proteínas carregadoras, mas requerem energia metabólica e podem transportar açúcares mesmo contra um gradiente de concentração<sup>(54)</sup>.

As bactérias geralmente empregam mecanismos de transporte ativo para assimilar açúcares e outros nutrientes, mas para as leveduras e fungos, o transporte de D-xilose pode ocorrer tanto por difusão facilitada como por transporte ativo, sendo que a ocorrência deste último já foi confirmada em *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii*. Em *Rhodotorula*, um microrganismo exaustivamente estudado quanto ao transporte de D-xilose, constatou-se também a presença de transporte ativo e além disso, verificou-se que sob **condições anaeróbicas**, o transporte é **bloqueado**, indicando que a respiração é essencial para o transporte nesta levedura<sup>(54)</sup>.



Uma vez dentro da célula, a D-xilose é primeiro convertida à D-xilulose e então fosforilada. Uma diferença básica existe entre os procariotos e os eucariotos no metabolismo inicial da xilose: as bactérias geralmente utilizam uma isomerase para converter a xilose a xilulose (reação 3 da FIGURA 2.8), enquanto que os fungos e leveduras realizam a mesma conversão através de 2 etapas de redução e oxidação (reações 1 e 2 da FIGURA 2.8). A conversão de D-xilose a D-xilulose é aparentemente uma etapa crítica nas leveduras, embora aproximadamente metade das leveduras conhecidas seja capaz de assimilar xilose aerobicamente. Até recentemente não havia sido encontrada nenhuma que utilizasse D-xilose em condições anaeróbicas<sup>(54)</sup>.

A primeira etapa do metabolismo da xilose em leveduras é a redução de D-xilose a xilitol (reação 1 da FIGURA 2.8). Esta reação é catalisada pela enzima NADPH 1-alditol oxidoreductase, também conhecida como xilose redutase e para a maioria dos fungos e leveduras ela é altamente específica em relação ao cofator NADPH. A reoxidação do xilitol a D-xilulose é feita através da enzima NAD<sup>+</sup> 2-xilitol oxidoreductase ou xilitol desidrogenase, representada pela reação 2 da FIGURA 2.8. Esta reação é prontamente reversível e a oxidação do NADH ocorre com D-xilulose, D-frutose ou D-ribulose como substrato, gerando o respectivo polioliol como produto<sup>(54)</sup>.

Amplas evidências comprovam a existência da via reductiva/oxidativa em leveduras e fungos. Em 1976 Barnett<sup>(66)</sup> verificou a exclusividade desta via em várias linhagens de *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Pichia delftensis*, *Pichia farinosa*, *Pichia membranae-faciens*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula sp*, *Saccharomyces bailii*, *Saccharomyces bisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces uvarum*, *Torulopsis candida* e *Schwanniomyces occidentalis*. Jeffries<sup>(54)</sup> cita ainda espécies de fungos *Aspergillus* e *Penicillium* e linhagens de *Rhizopus nigricans*, *Gliocladium roseum*, *Byssochlamys fulva*, *Myrothecium verrucaria*, *Neurospora crassa*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Oospora lactis* e *Chephalosporium chrysogenus*.

- AP = acetilfosfato
- DHAP = dihidroxiacetona fosfato
- E4P = eritríose-4-fosfato
- FDP = frutose difosfato
- F6P = frutose-6-fosfato
- G3P = gliceraldeído-3-fosfato
- G6P = glicose-6-fosfato
- PEP = fosfoenolpiruvato
- 2PG = 2-fosfoglicerato
- 6PG = 6-fosfoguconato
- PGL = 6-fosfoguconolactona
- 3PGP = fosfoglicerol-fosfato
- R5P = ribose-5-fosfato
- Ru5P = ribulose-5-fosfato
- S7P = sedulose-7-fosfato
- X5P = xilulose-5-fosfato

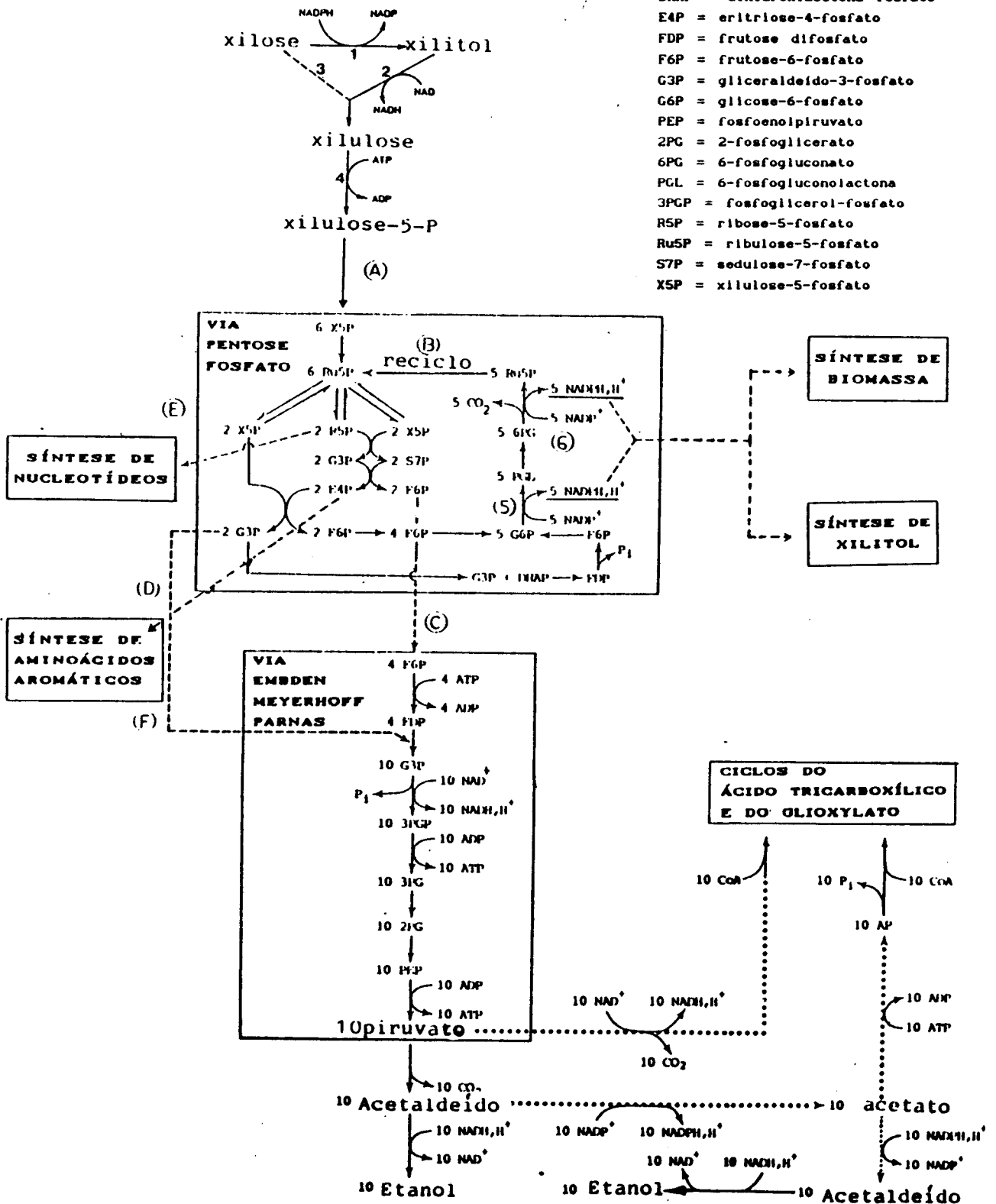


FIGURA 2.8 - Metabolismo da xilose <sup>(53)</sup>

A etapa mais importante no metabolismo de D-xilose é a Via Pentose Fosfato (VPF). Ela ocorre amplamente em células vivas e sua principal função é prover NADPH para as reações biossintéticas e ribose-5- fosfato para a síntese de nucleotídeos. É constituída por uma fase oxidativa que converte hexose-fosfatos em pentose-fosfatos e uma fase não-oxidativa que converte pentose-fosfatos novamente em hexose- fosfatos (ver quadro na parte superior da FIGURA 2.8)<sup>(54)</sup>.

Quando a xilose é a fonte de carbono, a entrada na Via Pentose Fosfato se dá através de D-xilulose-5-fosfato (etapa A da FIGURA 2.8), resultante da fosforilação de D-xilulose catalisada pela enzima D- xilulose quinase (reação 4 da FIGURA 2.8). Quando a fase oxidativa da VPF está operando num ciclo fechado, a entrada ocorre através de D-ribulose-5-fosfato gerada pela decarboxilação de 6-fosfogluconato (etapa B da FIGURA 2.8)<sup>(54)</sup>.

O carbono deixa a VPF por 3 rotas possíveis: D-frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato podem entrar na Via Embden-Meyerhoff-Parnas (etapas C e D, respectivamente, da FIGURA 2.8); D-ribose-5-fosfato pode ser usada para a síntese de nucleotídeos (etapa E da FIGURA 2.8) e através de D-eritrose-4-fosfato como ponto de partida para a síntese de aminoácidos aromáticos (etapa F da FIGURA 2.8)<sup>(54)</sup>.

A regulação da fase oxidativa da VPF ocorre basicamente através da regulação da atividade da enzima D-glucose-6-fosfato desidrogenase, que catalisa a reação de oxidação de D-glucose-6-fosfato a 6- fosfoglucono- $\delta$ -lactona (reação 5 da FIGURA 2.8), sendo esta subsequentemente hidrolisada a 6-fosfogluconato pela enzima lactonase (reação 6 da FIGURA 2.8). Por causa da grande quantidade de energia livre perdida nestas 2 reações, elas são praticamente irreversíveis e poderiam ocorrer até a conversão completa dos substratos em produtos, o que resultaria em grande formação do cofator NADPH e favorecimento da permanência no ciclo fechado da VPF. Entretanto, a enzima D-glucose-6- fosfato desidrogenase é fortemente inibida pelo seu próprio produto NADPH, de forma que a regulação desta etapa vai depender da quantidade de NADPH presente, ou seja, se ele estiver sendo consumido em outra

reação (como produção de xilitol ou de biomassa), a VPF permanece operando praticamente como um ciclo fechado apenas para gerar NADPH<sup>(54)</sup>.

A fase oxidativa da VPF fornece 2 moles de NADPH para cada mol de CO<sub>2</sub> liberado (reações 5 e 6 da FIGURA 2.8). Como a maioria dos fungos e leveduras não possuem a enzima xilose isomerase, o cofator NADPH é necessário para a assimilação de D-xilose através da enzima D-xilose redutase (reação 1 da FIGURA 2.8). Portanto, pelo menos 1/10 do carbono deve ser oxidado a CO<sub>2</sub> para fornecer poder redutor.

Já o cofator NAD<sup>+</sup>, necessário para a conversão de xilitol em xilulose (reação 2 da FIGURA 2.8), depende das reações que levam à formação de etanol (ver quadro correspondente à via Embden-Meyerhoff-Parnas) ou do ciclo do ácido tricarbóxico na mitocôndria, sob presença de oxigênio<sup>(70)</sup>, para ser regenerado.

Após a entrada na Via Embden-Meyerhoff-Parnas (quadro central da FIGURA 2.8), a frutose-6-fosfato ou o gliceraldeído-3-fosfato passam por uma série de etapas, gerando NADH e ATP, até serem transformados em piruvato. Este pode ser então transformado em etanol, através dos ciclos do ácido tricarbóxico e do glioxalato ou diretamente, tendo acetaldeído como intermediário.

A regulação do metabolismo da xilose em leveduras e fungos está intimamente relacionada com a quantidade de oxigênio disponível para o microrganismo. Os fundamentos bioquímicos ou fisiológicos para este requerimento de oxigênio não são completamente entendidos, mas podem estar relacionados tanto com o transporte de pentose, com a via oxidativa/redutiva de assimilação de D-xilose, com a regeneração de cofatores reduzidos ou com o fornecimento de ATP para crescimento através de fosforilação oxidativa<sup>(54)</sup>.

Em uma grande variedade de espécies de leveduras, mas particularmente naquelas pertencentes aos gêneros *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pachysolen*, *Pichia* e *Torulopsis*, a aeração estimula a utilização de açúcar e mais ainda, não há

utilização sob condições anaeróbicas. Este fenômeno é conhecido como efeito Kluyver ou efeito Pasteur negativo<sup>(54)</sup>.

Atualmente, a conversão anaeróbica de D-xilose a etanol é reconhecida para as leveduras *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis* e *Candida shehatae*<sup>(27,31,42,43,68)</sup>. Isto se deve ao fato destes microrganismos possuírem uma dupla especificidade de cofatores para a enzima xilose-redutase, que apresenta atividade tanto com o cofator NADPH como com o cofator NADH.

Para a maioria das leveduras, a enzima D-xilose redutase tem como cofator exclusivamente o NADPH e a xilose é metabolizada através desta enzima (reação 1 da FIGURA 2.8) e da enzima xilitol desidrogenase dependente de  $\text{NAD}^+$  (reação 2 da FIGURA 2.8). Como consequência, a conversão de xilose a xilulose leva a uma superprodução de NADH que bloqueia a atividade metabólica na ausência de oxigênio<sup>(54)</sup>.

No caso das 3 leveduras mencionadas acima, o cofator NADH resultante da conversão de xilitol a xilulose pode ser pelo menos parcialmente utilizado como cofator na reação de redução de xilose a xilitol, ainda regenerando o cofator  $\text{NAD}^+$  para a reação seguinte, permitindo que, mesmo sob condições anaeróbicas, significativas quantidades de xilulose sejam produzidas e conseqüentemente fermentadas a etanol<sup>(68)</sup>. Mesmo assim, como a afinidade e a atividade da enzima xilose redutase pelo cofator NADPH é muito maior do que pelo cofator NADH, um pequeno suprimento de oxigênio é necessário para estimular a eficiência e a produtividade de etanol<sup>(27)</sup>.

### 2.3.2 - Influência da Temperatura na Produção de Xilitol

A afirmação de Gong et al.<sup>(4)</sup> de que a baixas temperaturas a xilose tende a ser convertida em xilitol foi confirmada experimentalmente no trabalho de Chiang et al.<sup>(41)</sup> com levedura de panificação, cultivada num meio contendo 120 g/l de xilose e a pH 4,0, conforme mostram os resultados da TABELA 2.5.

TABELA 2.5 - Influência da temperatura na produção de xilitol por *S. cerevisiae*<sup>(41)</sup>.

T (°C)	P (g/l)
30	11,0
35	8,0
37	7,7
40	7,6
45	4,2

Estes mesmos resultados, embora indiquem o aumento da produção de xilitol com a diminuição da temperatura, não esclarecem quanto a influência da temperatura na produtividade, cujos valores devem se tornar ainda menores, já que a temperaturas mais baixas o metabolismo dos microrganismos se torna mais lento.

### 2.3.3 - Influência do pH do Meio de Cultivo na Produção de Xilitol

As informações contidas na literatura consultada sobre o efeito do pH em diferentes leveduras são apresentados na FIGURA 2.9.

Embora Gong et al.<sup>(4)</sup> tenham concluído que a formação de xilitol é favorecida a altos valores de pH, a análise da FIGURA 2.9 permite verificar que o valor mais adequado para o pH é antes de tudo uma característica do microrganismo, pois mesmo dentro de um mesmo gênero (*Candida boidinii* e *Candida shehatae*) encontram-se valores ótimos do pH para a produção de xilitol completamente diferentes.

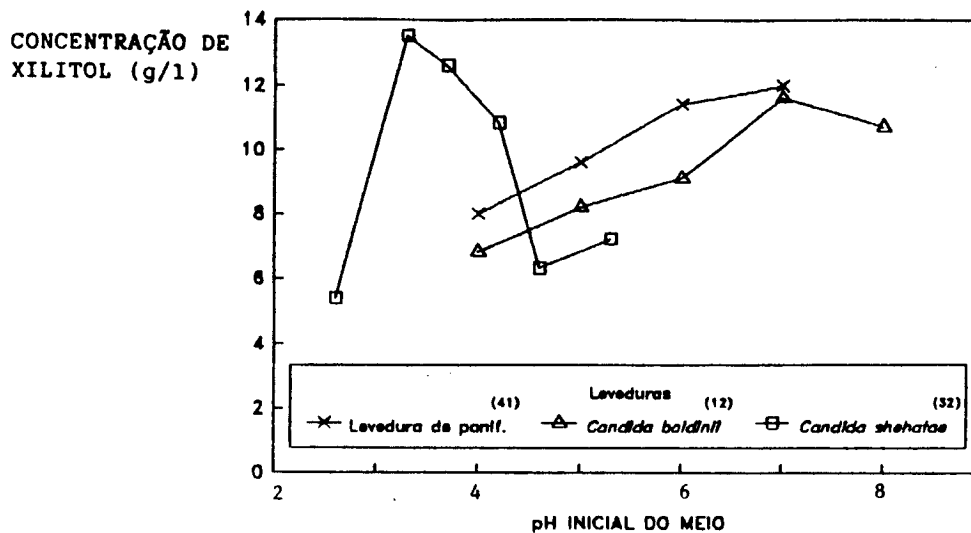


FIGURA 2.9 - Influência do pH na produção de xilitol

#### 2.3.4 - Influência da Concentração Inicial de Substrato na Produção de Xilitol e de Biomassa

A maioria dos trabalhos voltados especificamente para a produção de xilitol a partir de xilose dedicou uma parte de seus estudos para verificar o efeito da concentração inicial de substrato sobre a formação de xilitol<sup>(8,12,19,62)</sup>. Através da análise da TABELA 2.6, é possível constatar que :

- Para as menores concentrações de xilose, os valores de rendimento e produtividade em xilitol são os menores encontrados na TABELA 2.6, para cada microrganismo. Por outro lado, esta mesma situação corresponde aos maiores valores de rendimento em biomassa encontrados na TABELA 2.6 para todos os microrganismos, indicando que estes utilizam preferencialmente o açúcar para a produção de massa celular, quando sujeitos a baixas concentrações de substrato.

- Em geral, os valores de rendimento e produtividade aumentam continuamente com o aumento da concentração inicial de xilose enquanto o rendimento em biomassa decresce, demonstrando a alta sensibilidade do crescimento celular a altas concentrações de xilose. Esta tendência de aumento nos valores de rendimento e produtividade só é alterada quando se atinge um valor de concentração de substrato suficientemente alto para causar inibição pelo

substrato, conforme observado para *C. boidinii* com concentração inicial de xilose igual a 150 g/l e para *C. tropicalis* com concentrações iniciais de xilose acima de 200 g/l.

- A levedura altamente produtora de xilitol, *Candida* sp B-22, tem um comportamento ligeiramente diferente do descrito anteriormente, já que os valores de rendimento e produtividade permanecem praticamente constantes com o aumento de concentração inicial de xilose, embora se observe o correspondente decréscimo nos valores de rendimento em biomassa.

TABELA 2.6 - Influência da concentração inicial de substrato ( $S_0$ ) na concentração final (P), no rendimento ( $Y_1$ ) e na produtividade ( $Y_2$ ) de xilitol e no rendimento em biomassa ( $Y_{x/s}$ ).

Microrganismo e Classificação	$S_0$ (g/l)	P (g/l)	$Y_1$ (g/g)	$Y_2$ (g/lh)	$Y_{x/s}$ (g/g)	Ref.
<i>Candida boidinii</i> 2201	50,0	17,9	0,42	0,25	0,77 <sup>1</sup>	(12)
	100,0	37,1	0,46	0,26	0,52 <sup>1</sup>	
	150,0	16,8	0,21	0,12	0,47 <sup>1</sup>	
<i>Candida tropicalis</i> HXP2 (mutante)	10,0	2,9	0,29	0,18	0,26 <sup>2</sup>	(19)
	50,0	39,2	0,78	1,63	0,06 <sup>2</sup>	
	100,0	104,4	1,01	1,09	ND	
	200,0	140,0	0,70	1,17	ND	
	300,0	127,8	0,43	1,06	ND	
<i>Candida</i> sp B-22	81,0	68,0	0,84	1,13	0,10	(8)
	140,0	115,0	0,88	1,37	0,08	
	216,0	180,0	0,86	1,56	0,05	
	249,0	200,0	0,80	1,18	0,03	
<i>Candida guilliermondii</i> NRC 5578	10,0	6,2	0,46	0,13	0,31	(62)
	20,0	14,2	0,59	0,20	0,15	
	50,0	30,9	0,59	0,19	0,09	
	110,0	68,7	0,60	0,29	0,10	
	150,0	110,3	0,70	0,46	0,04	
	200,0	151,7	0,71	0,52	0,03	
	300,0	221,0	0,75	0,54	0,02	

1 - unidades de absorvância (610nm)/g de xilose consumida

2 - unidades de absorvância (450nm)/g de xilose consumida

ND- não determinado



### 2.3.5 - Influência da Composição do Meio na Produção de Xilitol

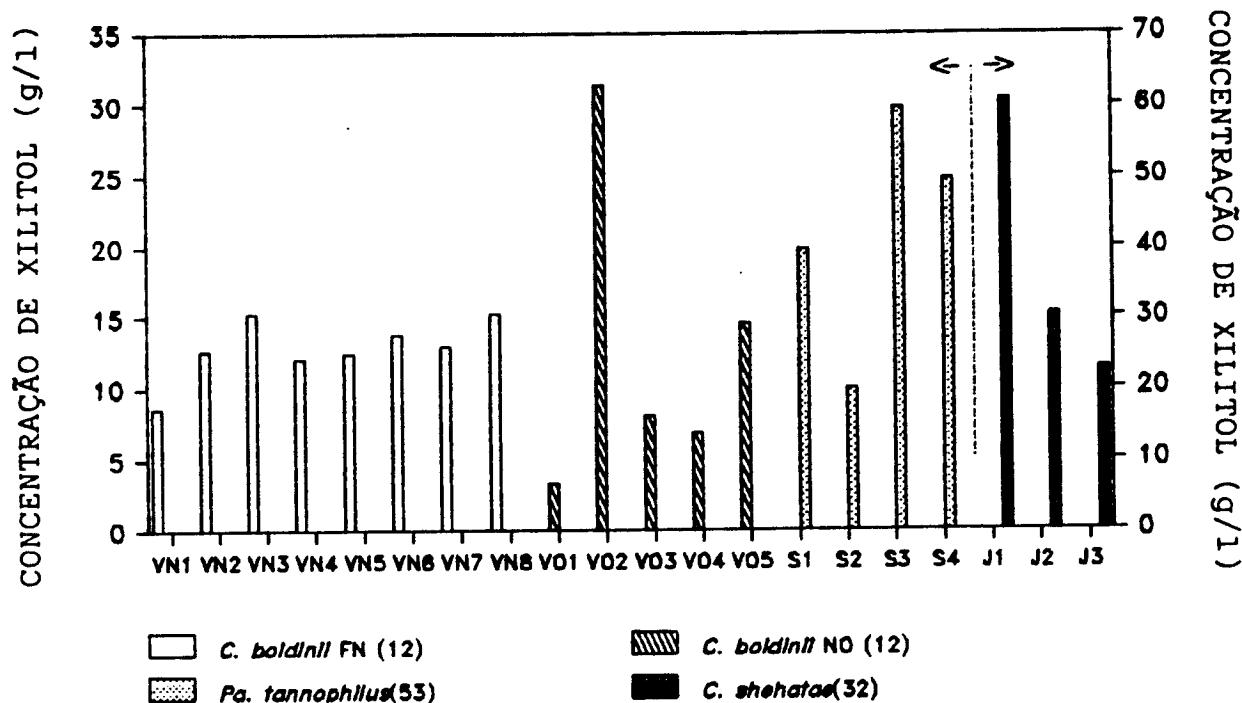
Vongsuvanlert & Tani<sup>(12)</sup> realizaram um estudo completo, testando o efeito de 8 diferentes fontes de nitrogênio e 5 diferentes nutrientes orgânicos na produção de xilitol por *Candida boidinii*, concluindo que a melhor fonte de nitrogênio foi o acetato de amônio (FIGURA 2.10, VN3) e o melhor nutriente orgânico foi o extrato de levedura (FIGURA 2.10, VO2).

Jeffries<sup>(32)</sup> estudou a influência da suplementação do meio contendo apenas extrato de levedura, com 3 fontes diferentes de nitrogênio nos produtos resultantes do metabolismo da xilose em *Candida shehatae*, observando que a maior concentração de xilitol foi encontrada no meio contendo uréia (FIGURA 2.10, J1).

Também Slininger et al.<sup>(53)</sup> verificaram a influência de 4 diferentes fontes de nitrogênio nos produtos de fermentação da xilose por *Pachysolen tannophilus*, escolhendo o sulfato de amônio como a melhor fonte de nitrogênio para a produção de xilitol (FIGURA 2.10, S3).

Portanto, para microrganismos diferentes, foram também encontrados nutrientes diferentes que favorecem a formação de xilitol, indicando que as necessidades de cada microrganismo são específicas.

Atkin et al.<sup>(63)</sup> investigaram a influência da presença de biotina (uma vitamina que muitas leveduras não são capazes de sintetizar) sobre as quantidades relativas de xilitol e etanol acumuladas em cultivos aeróbios, em batelada de *P. tannophilus* e *C. guillermondii*. Constataram que para o primeiro microrganismo, a concentração de ambos os produtos aumenta com o acréscimo na concentração de biotina presente no meio, embora a produção de etanol seja sempre mais favorecida para qualquer concentração de biotina (FIGURA 2.11a).



### FONTES DE NITROGÊNIO (FN) E NUTRIENTES ORGÂNICOS (NO)

VN1 - cloreto de amônio 0,5 X	V01 - malte 0,9 X
VN2 - sulfato de amônio 0,5 X	V02 - extrato de levedura 0,6X
VN3 - acetato de amônio 0,5 X	V03 - levedura seca 0,9 X
VN4 - difosfato de amônio 0,5 X	V04 - peptona 0,9 X
VN5 - bicarbonato de amônio 0,5 X	V05 - polipeptona 1,2 X
VN6 - nitrato de amônio 0,5 X	
VN7 - formiato de amônio 0,5 X	S1 - nitrato de potássio 7,5 g/l
VN8 - citrato de amônio 0,5 X	S2 - cloreto de amônio 7,5 g/l
	S3 - sulfato de amônio 7,5 g/l
J1 - uréia 1,06 g/l	S4 - uréia 7,5 g/l
J2 - amônia 1,06 g/l	
J3 - peptona 1,06 g/l	

FIGURA 2.10 - Influência de diversas fontes de nitrogênio e de nutrientes orgânicos na produção de xilitol<sup>(12,32,53)</sup>.

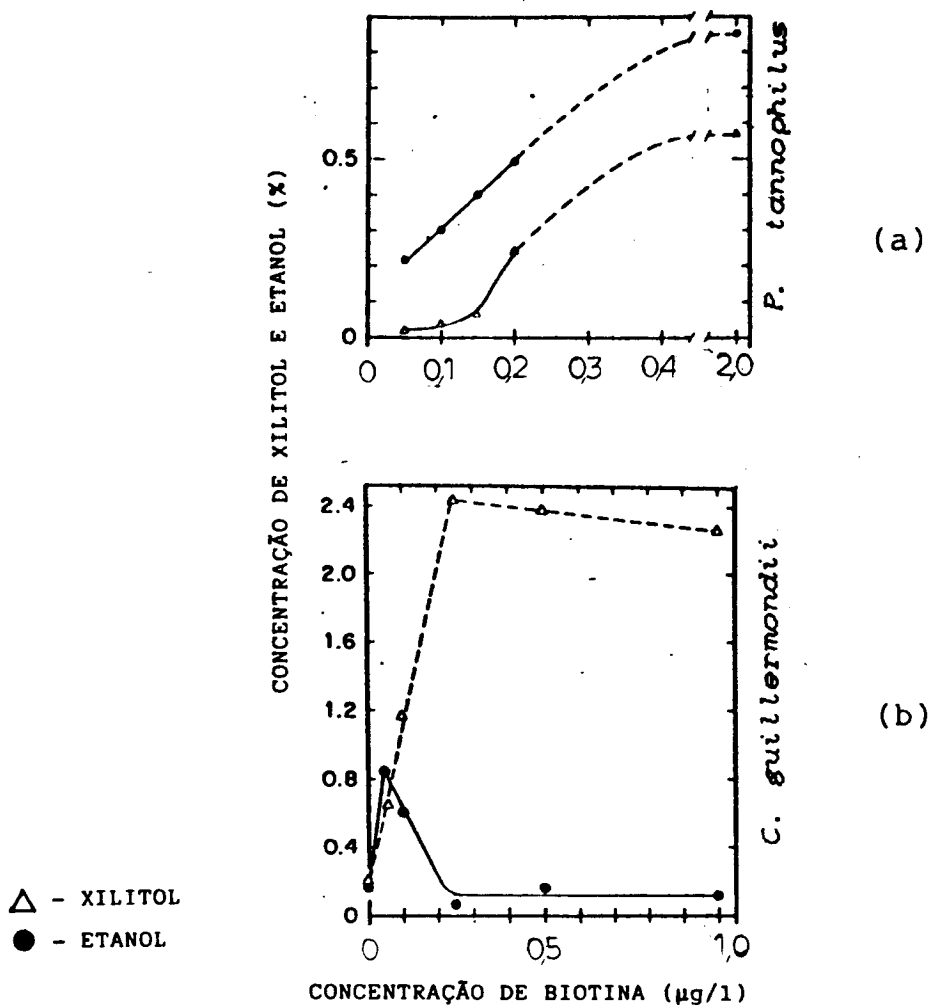


FIGURA 2.11 - Influência da adição de biotina sobre a produção de etanol e de xilitol. a) *P. tannophilus* e b) *C. guillermondii*<sup>(63)</sup>.

Já para *C. guillermondii*, a produção de etanol só é levemente significativa para concentrações de biotina menores que 0,1 μg/l e se torna mínima para valores maiores da mesma. A produção de xilitol é claramente favorecida neste microrganismo para qualquer valor de concentração de biotina maior que 0,1 μg/l, atingindo um valor máximo para a concentração de biotina de aproximadamente 0,25 μg/l (FIGURA 2.11b).

### 2.3.6 - Influência da Concentração Inicial de Células e da Idade do Inóculo na Formação do Xilitol

O efeito da concentração inicial de células na produção de xilitol por *C. shehatae* foi investigada por Sreenath et al.<sup>(67)</sup> e posteriormente por Sreenath & Jeffries<sup>(71)</sup>.

No primeiro estudo, o efeito da idade do inóculo no rendimento em produto e na produtividade também foi incluído e os valores obtidos para diferentes concentrações iniciais de células podem ser analisados com o auxílio da FIGURA 2.12. Verifica-se que para o inóculo cultivado por 24 ou 72 horas, o rendimento em xilitol é favorecido para baixos valores de concentração celular, enquanto que a produtividade cresce com o aumento da concentração celular, mostrando que iniciar a fermentação com altas concentrações celulares é uma forma de melhorar a produtividade<sup>(67)</sup>.

Outro dado importante são os bons resultados apresentados nos ensaios com o inóculo cultivado por 72 horas e portanto constituído por células mais velhas, indicando que sistemas utilizando células imobilizadas, que permitem altas densidades celulares, mas com pouca renovação, são viáveis a princípio. Por razões não discutidas neste trabalho, as células provenientes do inóculo cultivado por 48 horas apresentaram um comportamento bem diferente, com valores ótimos para rendimento e produtividade para uma concentração inicial de células de aproximadamente 3,6 g/l<sup>(67)</sup>.

Na FIGURA 2.13 estão representados os resultados do estudo seguinte, onde foram realizados ensaios em batelada num sistema provido de uma membrana semipermeável para reciclar as células do fim de uma batelada, utilizando-as como inóculo para a batelada seguinte. Observou-se um contínuo aumento de rendimento e produtividade com o aumento na concentração de células presentes nos ensaios em sequência<sup>(71)</sup>.

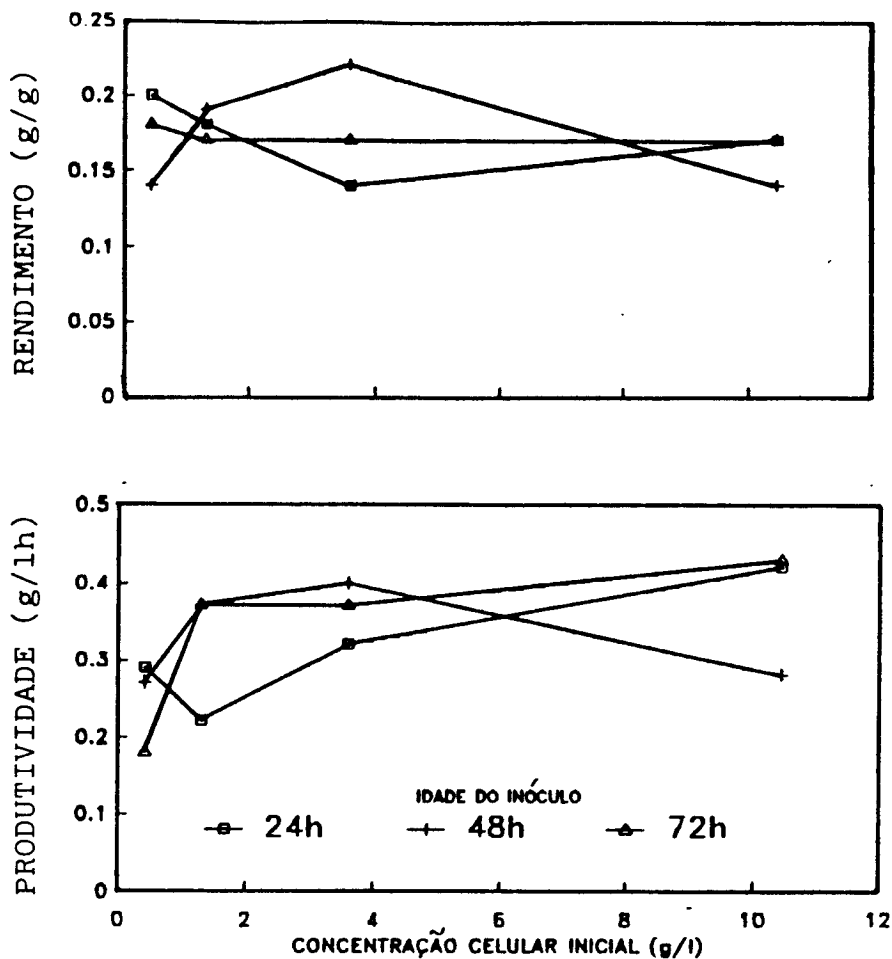


FIGURA 2.12 - Efeito da concentração celular e da idade do inóculo no rendimento e na produtividade de xilitol para *C. shehatae*<sup>(67)</sup>.

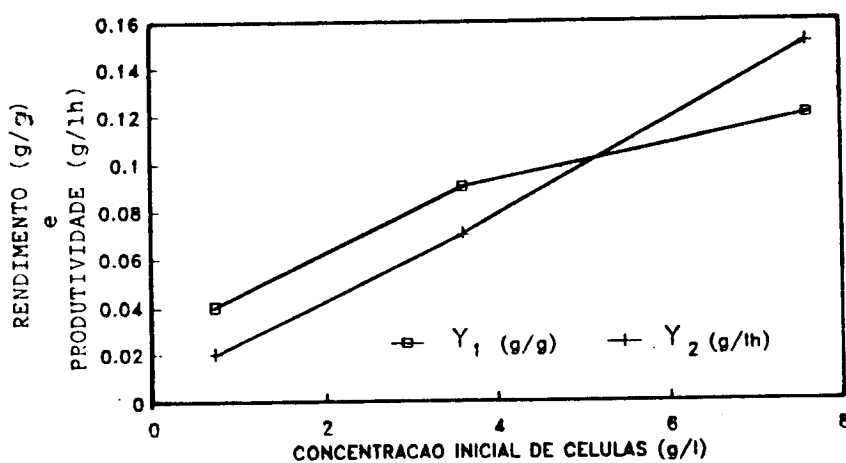


FIGURA 2.13 - Efeito do aumento da concentração inicial de células no rendimento e na produtividade de xilitol para *C. shehatae*<sup>(71)</sup>.

Outro aspecto abordado nos trabalhos sobre a produção de xilitol por leveduras é se a sua formação está ou não associada ao crescimento celular ou, em outras palavras, se o xilitol deve ser considerado um produto primário ou secundário do metabolismo da xilose nas leveduras<sup>(63)</sup>.

Segundo Atkin et al.<sup>(63)</sup> a formação de etanol e xilitol a partir de xilose em várias leveduras parece estar associada com a limitação do crescimento, o que significa que o acúmulo mais significativo destes produtos acontece nos últimos estágios de crescimento das culturas. Nas pesquisas desenvolvidas pelo grupo de Atkin, este tipo de relação entre o acúmulo de produtos e o crescimento celular foi constatado para *C. guilliermondii* (FIGURA 2.13) e para *P. tannophilus* (resultados não mostrados).

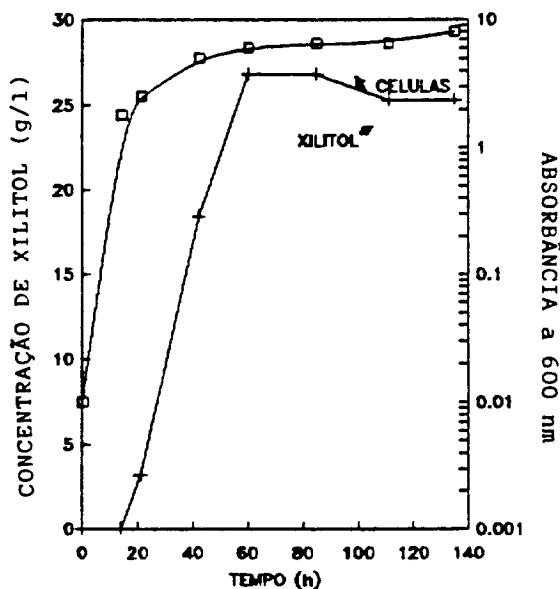


FIGURA 2.14 - Acúmulo de xilitol e biomassa para *Candida guilliermondii*<sup>(63)</sup>.

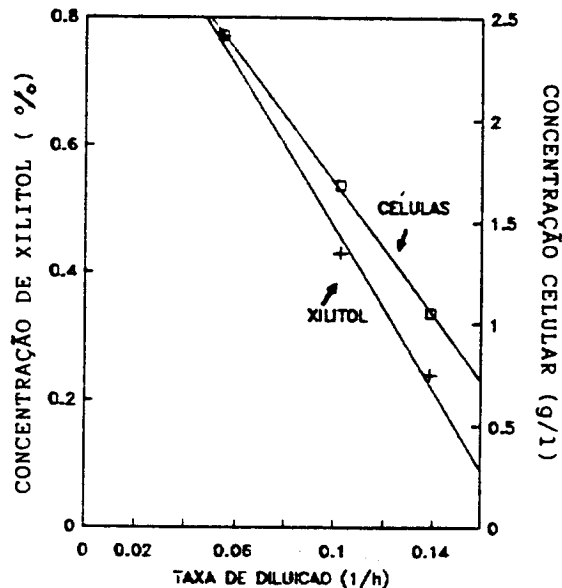


FIGURA 2.15 - Variação na concentração de xilitol e de células com a taxa de diluição para *C. parapsilosus*<sup>(25)</sup>.

Por outro lado, Furlan et al.<sup>(25)</sup> examinaram a variação da concentração de xilitol e de massa celular de *Candida parapsilosis* como função da taxa de diluição em ensaios contínuos, sendo possível visualizar através da FIGURA 2.15 que o crescimento e a produção estão associados. Segundo os autores, isto se justifica pelo fato de a formação de xilitol ser apenas uma consequência de uma via metabólica, que tem como principal função assimilar xilose para gerar energia a ser utilizada pelas células para manutenção e reprodução.

A partir dos trabalhos comentados acima é possível perceber que existe controvérsia sobre a associação ou não entre crescimento e formação de xilitol, e também não está clara a validade de generalizar um tipo de comportamento observado em uma levedura para outras, mesmo que pertencentes a um mesmo gênero. Convém ainda destacar que o estudo detalhado deste assunto é fundamental para a escolha do processo de produção de xilitol mais adequado a um determinado microrganismo, já que para a formação associada um mínimo de crescimento é requerido e para a não associada, é necessário apenas uma grande concentração inicial de células.

#### 2.3.7 - Influência da Aeração na Assimilação de Xilose e Produção de Xilitol

A aeração é um aspecto fundamental de qualquer processo utilizando leveduras, pois o oxigênio é necessário para a síntese de ácidos graxos insaturados, importantes na formação das membranas. Além disso, as leveduras cultivadas em xilose requerem oxigênio para reciclar o cofator NADH, cujo acúmulo leva à interrupção na assimilação da xilose<sup>(54)</sup>.

Embora o xilitol seja o principal produto do metabolismo da xilose em leveduras, outros produtos como etanol, biomassa, gás carbônico e ácido acético também podem ser formados e a quantidade de xilose que será convertida em xilitol ou em outros produtos depende principalmente do nível de aeração no meio. Este nível de aeração pode ser tratado de maneira mais genérica, como nos trabalhos relacionados na TABELA 2.7 ou através de critérios mais precisos para expressar as condições de aeração como taxa de

aeração, porcentagem de oxigênio dissolvido, potencial redox etc, que serão encontrados na análise das FIGURAS 2.16 a 2.19.

TABELA 2.7 - Formação de xilitol em diversas leveduras sob diferentes condições de aeração.

Microorg. e Classif.	Conc. de xilitol (g/l) em diferentes cond. de aeração				Ref.
	Anaeróbico	Microaerófilo ou O <sub>2</sub> limitado	Semiaeróbico	Aeróbico	
<i>C. parapsi- losis</i> 28474	29,6	—	—	33,2	3
<i>C. mogii</i> 18384	10,4	—	—	29,2	3
<i>C. lusita- niae</i> 26287	6,1	—	—	19,6	3
<i>C. blankii</i> 18735	9,2	—	—	18,2	3
<i>C. tropica- lis</i> 20240	17,2	—	—	28,0	3
<i>C. tropica- lis</i> 20215	6,4	—	—	23,1	3
<i>C. utilis</i> 22023	12,0	—	—	12,8	3
<i>C. steato- lytica</i> 18824	8,4	—	—	1,3	3
<i>C. solani</i>	14,4	—	—	2,6	3
<i>S. uvarium</i> 26602	4,4	—	—	21,0	3
<i>S. cerevi- siae</i> 26497	5,2	—	—	6,8	3
<i>P. tanno- phylus</i> 42460	—	84,7	—	35,7	53
<i>C. sheha- tae</i> 4492	—	18,0	2,0	—	51
<i>C. tropica- lis</i> 32113	5,0	29,2	—	25,4	10

Analisando a TABELA 2.7 com respeito aos dados de Gong et al.<sup>(3)</sup>, pode-se observar que a sensibilidade ao oxigênio varia de um microrganismo para outro, mas em geral, para os bons produtores de xilitol (leveduras do gênero *Candida*), as condições aeróbicas levam a melhores rendimentos do que as anaeróbicas. Por outro lado, pelos dados de Slininger et al.<sup>(53)</sup>, du Preez & Van der Walt<sup>(51)</sup> e Vogel & Hagerdal<sup>(10)</sup>, nota-se que as condições microaerófilas ou de oxigênio limitado são ainda mais favoráveis à produção de xilitol do que aquelas onde há um excesso de oxigênio.

Como pode ser visto nas FIGURAS 2.17, 2.18, 2.19 e especial-



mente na FIGURA 2.16, o consumo de xilose é sempre mais direcionado para o crescimento do que para a formação de produto a medida que a disponibilidade de oxigênio aumenta. Este fato pode ser explicado pelo metabolismo da xilose nas leveduras : uma quantidade limitada de oxigênio é necessária para a formação de xilitol, entretanto um excesso do mesmo ativa o Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos, levando a regeneração do cofator  $NAD^+$ , necessário para a transformação de xilitol em xilulose. A xilulose formada é então degradada através da Via Pentose-Fosfato e da Via Embden-Meyerhof-Parnas e assim, a acumulação de xilitol cai com o aumento do oxigênio disponível. Por isso, muitos pesquisadores se referem a um mecanismo de "ajuste fino" quando interpretam o efeito do oxigênio na regulação do metabolismo da xilose em leveduras<sup>(25)</sup>.

Todavia, a quantidade ótima de oxigênio necessária para favorecer a produção de xilitol e minimizar a formação de outros produtos fermentativos, depende muito do microrganismo. Na FIGURA 2.17, para *Candida* sp esta quantidade ótima corresponde a uma taxa de consumo de oxigênio inferior a 5 mmol/lh<sup>(11)</sup> e já para *P. tannophilus* (FIGURA 2.18), corresponde a uma vazão de ar de aproximadamente 0,1 l/lh<sup>(4)</sup>. Entretanto, para ambos os casos estas condições também são favoráveis à formação de etanol.

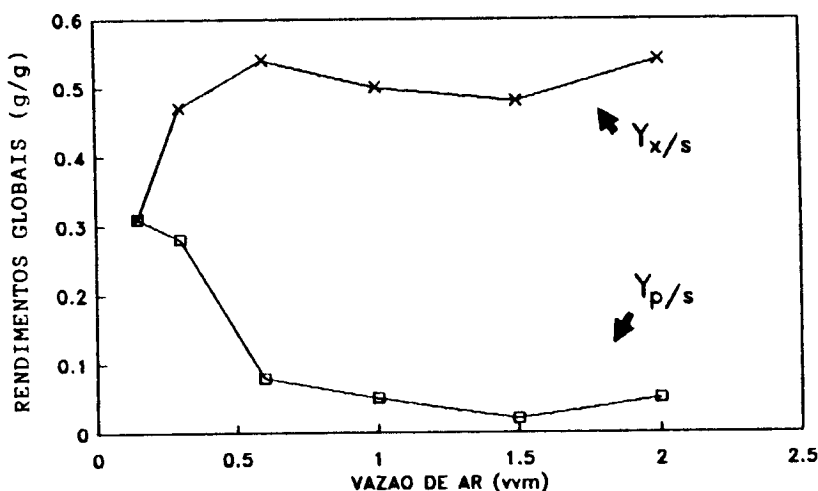


FIGURA 2.16 - Efeito da aeração nos rendimentos globais de produto e biomassa para *C. parapsilosis*<sup>(25)</sup>.

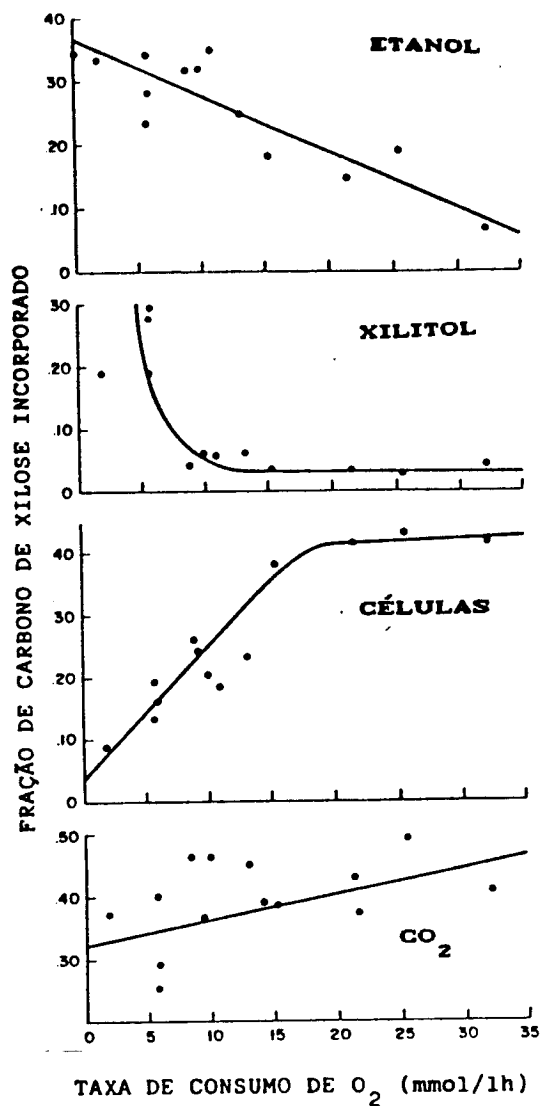


FIGURA 2.17 - Relação entre a taxa de consumo de  $O_2$  e a fração de carbono da xilose incorporado em diferentes produtos para *Candida* sp. XF 217<sup>(11)</sup>.

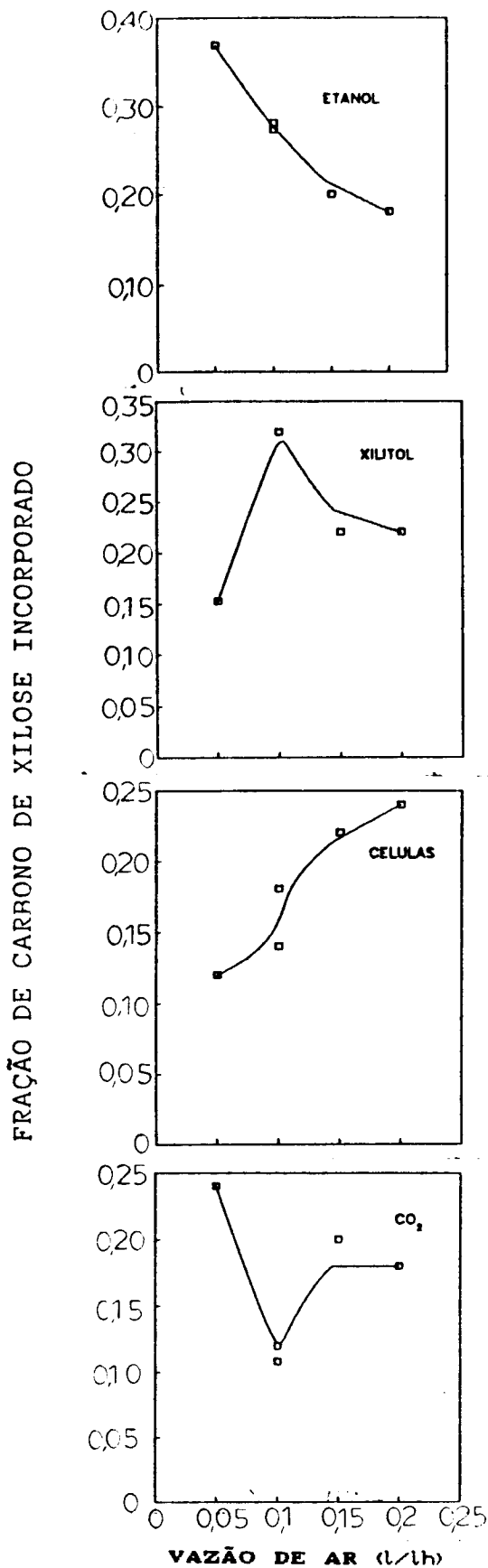
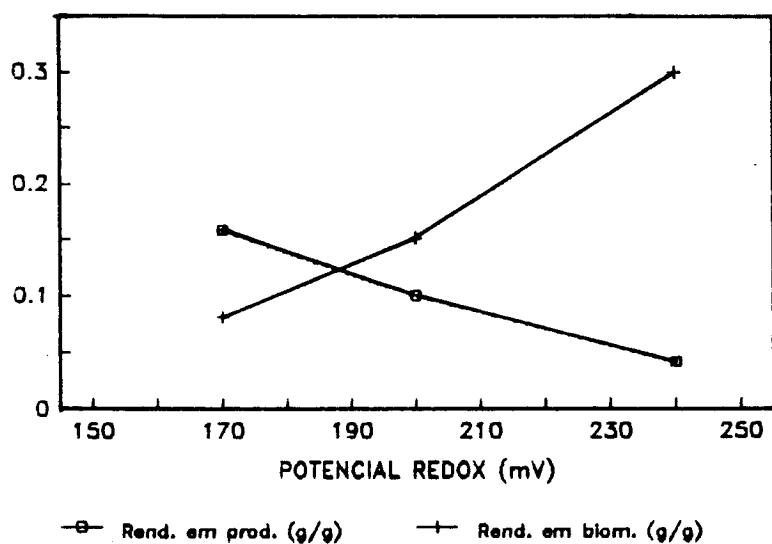


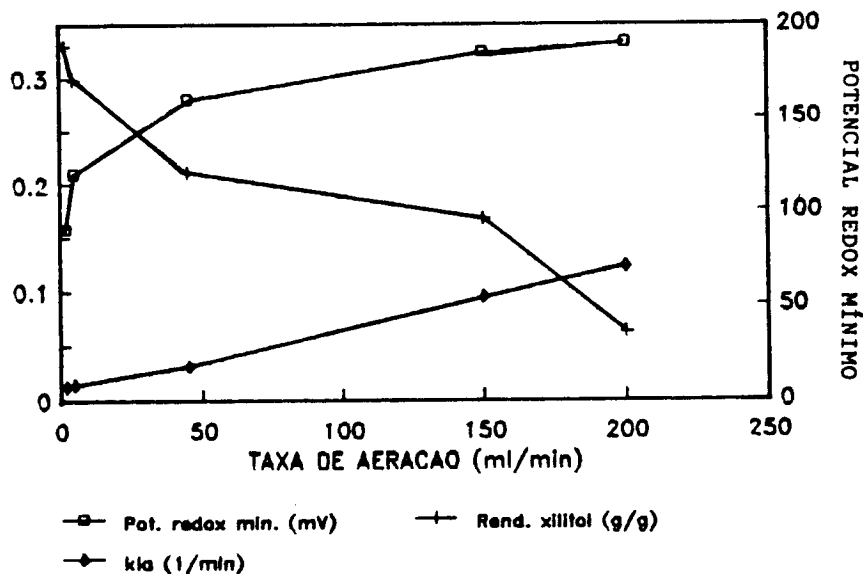
FIGURA 2.18 - Fração de carbono da xilose incorporado em diferentes produtos em função da vazão de ar para *P. tannophilus*<sup>(64)</sup>.

RENDIMENTO EM PRODUTO E BIOMASSA (g/g)



(a)

RENDIMENTO EM XILITOL (g/g) e  $k_{1a}$



(b)

FIGURA 2.19 - Relação entre potencial redox (a) e taxa de aeração (b) e os parâmetros fermentativos de rendimento em xilitol, rendimento em biomassa e  $k_{1a}$  para *P. tannophilus*<sup>(39)</sup>.

Concluindo a discussão da influência da aeração, na FIGURA 2.19a é mostrado o efeito do potencial redox nos parâmetros fermentativos do cultivo de células de *P. tannophilus* em xilose. Foram realizados experimentos mantendo o potencial redox constante em 3 níveis (170, 200 e 240 mV), resultando em um aumento no rendimento em biomassa e uma diminuição do rendimento em produto com o aumento do potencial redox, que é de certa forma equivalente a um aumento do oxigênio dissolvido no meio. Do mesmo modo, o aumento da taxa de aeração (FIGURA 2.19b) contribui para o aumento do potencial redox, do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ( $k_{1a}$ ), o que significa menor resistência à transferência de massa e maior facilidade para o microrganismo ter acesso ao oxigênio, tendo como consequência a diminuição no rendimento de produto<sup>(39)</sup>.

### 2.3.8 - Procedimentos Alternativos Aplicados à Produção de Xilitol por Microrganismos

Ao se adquirir conhecimentos sobre as influências das condições do processo na produção de xilitol, criam-se condições para interferir na mesma, visando aumentar a produtividade e o rendimento. Com o mesmo objetivo, alguns pesquisadores buscaram outros caminhos, como a mutação de microrganismos e a adição de substâncias ou enzimas ao meio de fermentação, procurando estimular a formação de xilitol. Alguns destes trabalhos são resumidos a seguir.

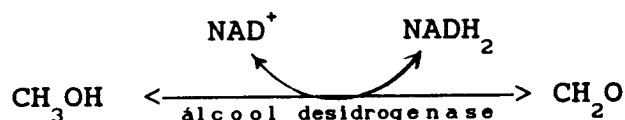
#### a) Utilização de microrganismos mutantes

Submetendo a linhagem-mãe à radiação ultravioleta e em seguida a uma técnica de isolamento de colônias, Gong et al.<sup>(19)</sup> selecionaram dois mutantes de *C. tropicalis* HPX1 e HPX2, que praticamente dobraram a produtividade e o rendimento em relação aos obtidos pela linhagem-mãe, conforme pode ser visto na TABELA 2.4.

## b) Adição de metanol

Vongsuvanlert & Tani<sup>(12)</sup> utilizaram *Candida boidinii* (uma levedura capaz de assimilar metanol) e adicionaram metanol ao meio de fermentação com a intenção de auxiliar a regeneração dos cofatores necessários para a redução da xilose, partindo das seguintes informações sobre esta levedura:

- possui a enzima álcool desidrogenase, responsável pela conversão do metanol em formaldeído através da reação:



- ao contrário da maioria das leveduras, em *C. boidinii* a enzima xilose-redutase é dependente do cofator NADH e não do cofator NADPH.

Os autores<sup>(12)</sup> concluíram que o sistema de regeneração do cofator NADH através da reação de conversão de metanol a formaldeído funcionou eficientemente quando foi adicionado 2% de metanol ao meio, levando a um rendimento de 0,57 g/g e a uma produtividade de xilitol de 0,4 g/lh. Os valores para o ensaio em branco, sem a adição de metanol, foram respectivamente 0,46 g/g e 0,25 g/lh .

## c) Utilização do sistema de oxi-redução de *Methanobacterium*

Partindo do mesmo princípio que Vongsuvanlert & Tani<sup>(12)</sup>, ou seja, melhorar a transformação de xilose em xilitol facilitando a reciclagem dos cofatores enzimáticos envolvidos, Kitpreechavanich et al.<sup>(13)</sup> e posteriormente Nishio et al.<sup>(14)</sup> desenvolveram sistemas sofisticados, associando enzimas e células de *Candida pelliculosa* e *Methanobacterium* sp. HU.

c.1) No primeiro estudo, Kitpreechavanich et al.<sup>(13)</sup> examinaram a conversão enzimática de xilose a xilitol através de duas possibilidades:

I- utilizando a enzima xilose redutase (extraída das células de *C. pelliculosa*), células metanogênicas e H<sub>2</sub> como doador de elétrons para regenerar o NADP<sup>+</sup>

II- utilizando células intactas de *C. pelliculosa*, células metanogênicas e  $H_2$  como doador de elétrons.

Os resultados relatados indicam que em ambos os casos foram conseguidas conversões integrais da xilose em xilitol em apenas 8 horas (I) ou em 24 horas (II).

c.2) Já no trabalho desenvolvido por Nishio et al.<sup>(14)</sup>, a conversão enzimática de xilose em xilitol foi estudada em sistemas contínuos ou em batelada, contendo células de *C. pelliculosa* e células de *Methanobacterium* sp HU imobilizadas separadamente ou co-imobilizadas e tendo  $H_2$  como doador de elétrons.

Os resultados obtidos nos ensaios em batelada com o sistema co-imobilizado foram superiores, pois em quaisquer proporções de células de *C. pelliculosa* para células de *Methanobacterium*, toda a xilose era convertida em xilitol após 50 horas de reação, enquanto que somente a proporção 2:1 chegou a esta conversão no sistema contendo células imobilizadas separadamente.

Para os ensaios contínuos, as células imobilizadas separadamente ou co-imobilizadas foram carregadas numa coluna que operou continuamente durante 16 dias, sendo que para as células co-imobilizadas o sistema se estabilizou num patamar de 35 % de conversão. Não se observou estabilização no ensaio com células imobilizadas separadamente, sendo que a conversão caiu gradativamente ao longo do tempo.

c.3) Outra técnica, elaborada por Kitpreechavanich et al.<sup>(57)</sup>, para a regeneração e retenção *in situ* dos cofatores  $NADP^+$  e  $NADPH_2$ , consistiu na utilização de um reator contendo uma membrana de polisulfona sulfonatada e na utilização da enzima xilose redutase de *C. pelliculosa* associada ao sistema de oxiredução de *Methanobacterium* sp. HU, para a redução de xilose a xilitol na presença do gás hidrogênio. A membrana efetivamente impediu a passagem dos cofatores, de  $F_{420}$  e das enzimas requeridas, mas se mostrou permeável ao xilitol, resultando em uma conversão de 93 % de xilose em xilitol após 4 horas de reação.

#### d) Aclimatização de levedura ao hidrolisado de hemicelulose

Chen & Gong<sup>(8)</sup> conseguiram aclimatizar a levedura *Candida* sp B-22 ao hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar neutralizado, mas sem tratamento de purificação, adotando uma técnica de adaptação-seleção contínua.

Os resultados relatados pelos autores indicam que a levedura mostrou-se capaz de superar os efeitos inibidores das substâncias tóxicas presentes e ainda manteve sua capacidade produtiva, apresentando um rendimento de 90 % e uma produtividade de 0,99 g/lh. A fermentação de um hidrolisado sem diluição contendo 105,3 g/l de xilose, resultou na produção de 94,7 g/l de xilitol após 96 horas de cultivo.

#### 2.4 - APLICAÇÃO DE MÉTODOS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NA OTIMIZAÇÃO DE PROCESSOS

Geralmente, os processos fermentativos envolvem muitas variáveis. Quando o número destas é muito grande, torna-se praticamente inviável realizar todos os experimentos necessários para estudar a influência de todas as variáveis pelos métodos tradicionais. Entretanto, escolhendo um método de planejamento adequado (como o fatorial fracionário), é possível programar os experimentos para estudar um grande número de variáveis de maneira compactada e então selecionar aquelas que realmente são importantes para estudos mais detalhados.

A decisão de adotar um método de planejamento experimental para a realização de um estudo envolvendo muitas variáveis, possibilita o planejamento e execução de forma organizada de um número de ensaios reduzidos ao mínimo necessário. Permite ainda a verificação dos efeitos individuais e de interação de todas as variáveis sobre a resposta, a definição das variáveis mais importantes para o processo, a avaliação dos erros experimentais e de regressão e a modelagem empírica dos resultados em função das variáveis escolhidas, através de programas estatísticos de regressão<sup>(15)</sup>.

É importante ressaltar, entretanto que, por mais sofisticadas que sejam as teorias matemáticas ou estatísticas envolvidas num método de planejamento experimental, estas não podem substituir medidas experimentais precisas e exatas, o bom senso e o conhecimento sobre o problema em estudo.

Os métodos de planejamento experimental mais conhecidos são o simplex, o planejamento fatorial e o método de análise por superfície de resposta. O método simplex e suas derivações são mais adequados para ensaios rápidos, já que a especificação das condições nas quais deve ser realizado o ensaio seguinte depende da resposta do ensaio anterior<sup>(15)</sup>.

O método de planejamento experimental por análise de superfície de resposta tem como base o método de planejamento fatorial. Consiste num grupo de técnicas usadas para o estudo empírico das relações entre uma ou mais respostas medidas analiticamente (como rendimento, produtividade, taxa de transferência de oxigênio etc) e um número de variáveis de entrada que possam ser controladas (como temperatura, concentração, pH, etc) . Estas técnicas são usadas para resolver principalmente as seguintes questões:

- Como uma resposta particular é afetada sobre uma região de interesse por um dado conjunto de variáveis de entrada;
- Quais conjuntos de variáveis de entrada resultarão num produto dentro das especificações desejadas;
- Quais os valores das variáveis de entrada que levarão ao melhor valor para uma resposta específica e como é a superfície de resposta próxima a este ponto<sup>(15)</sup>.

Para realizar um estudo pelo método de análise de superfície de resposta, inicia-se programando os ensaios que devem ser feitos através de um planejamento fatorial, que consiste em selecionar um número fixo de níveis para cada uma das variáveis de entrada e então executar experimentos com todas as possíveis combinações. Como se deseja reduzir o número de ensaios ao mínimo possível, um planejamento fatorial com 2 níveis (nível -1 e nível +1) para cada variável é especialmente eficiente. Se "n" variáveis estão envol-



vidas no estudo de um determinado sistema, o número de experimentos que devem ser realizados para investigar todas as combinações possíveis é portanto  $2^n$ . Acrescentam-se ainda ensaios em triplicata realizados nas condições correspondentes às intermediárias entre as dos 2 níveis atribuídos a cada variável (nível 0 ou ponto central do planejamento) com o objetivo de estimar o erro experimental associado aos ensaios<sup>(15)</sup>.

Neste ponto, pode-se considerar encerrado o método de planejamento fatorial. Com os dados obtidos após a execução dos ensaios é possível calcular os efeitos simples e de interação das variáveis sobre as respostas, determinar quais são os efeitos mais significativos, comparando o valor do efeito com o do erro experimental estimado, e até ajustar um modelo de 1ª ordem para correlacionar variáveis e respostas<sup>(15)</sup>.

Caso se deseje explorar outras condições experimentais não previstas pelo planejamento fatorial ou se o modelo de 1ª ordem proposto não estiver bem correlacionado com os dados experimentais, é necessário recorrer ao método de análise de superfície de resposta<sup>(15)</sup>.

Para avaliar se os modelos empíricos obtidos através de regressão multilinear ou não linear apresentam um grau de ajuste adequado aos dados experimentais, Box, Hunter & Hunter<sup>(15)</sup> sugerem que seja feita uma análise estatística, utilizando como parâmetros o coeficiente de correlação da regressão e principalmente, o valor estimado para o teste F.

O coeficiente de correlação é um parâmetro estatístico que compara a variância dos pontos experimentais em relação ao modelo proposto, com a variância da própria população de pontos experimentais. Quando o valor do coeficiente é 1, a correlação entre os valores previstos pelo modelo e os valores experimentais é perfeita. Quando este valor é zero, não existe correlação. A análise dos valores intermediários não pode ser expresso de forma tão simples, mas em termos qualitativos, quanto mais próximo da unidade estiver o valor do coeficiente de correlação, melhor será o ajuste do modelo aos dados experimentais<sup>(15)</sup>.

Através da realização do teste F, ou seja, comparando o

valor estimado para F a partir dos dados experimentais com o valor tabelado para uma distribuição de referência, é possível verificar a relevância estatística dos fatores experimentais no valor das respostas. O fundamento do teste F consiste em verificar se a hipótese nula é válida, ou, em outras palavras, se as modificações introduzidas nas condições experimentais não tiveram nenhum efeito nos resultados obtidos. Neste caso, a variação nos valores dos resultados foi devida exclusivamente a fatores aleatórios. Assim, consultando uma distribuição de referência relevante para o sistema em estudo, se as variações nas respostas observadas experimentalmente apresentarem alta probabilidade de pertencerem a esta distribuição, não há razão para questionar a hipótese nula. Então, pode-se afirmar que não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa<sup>(15)</sup>.

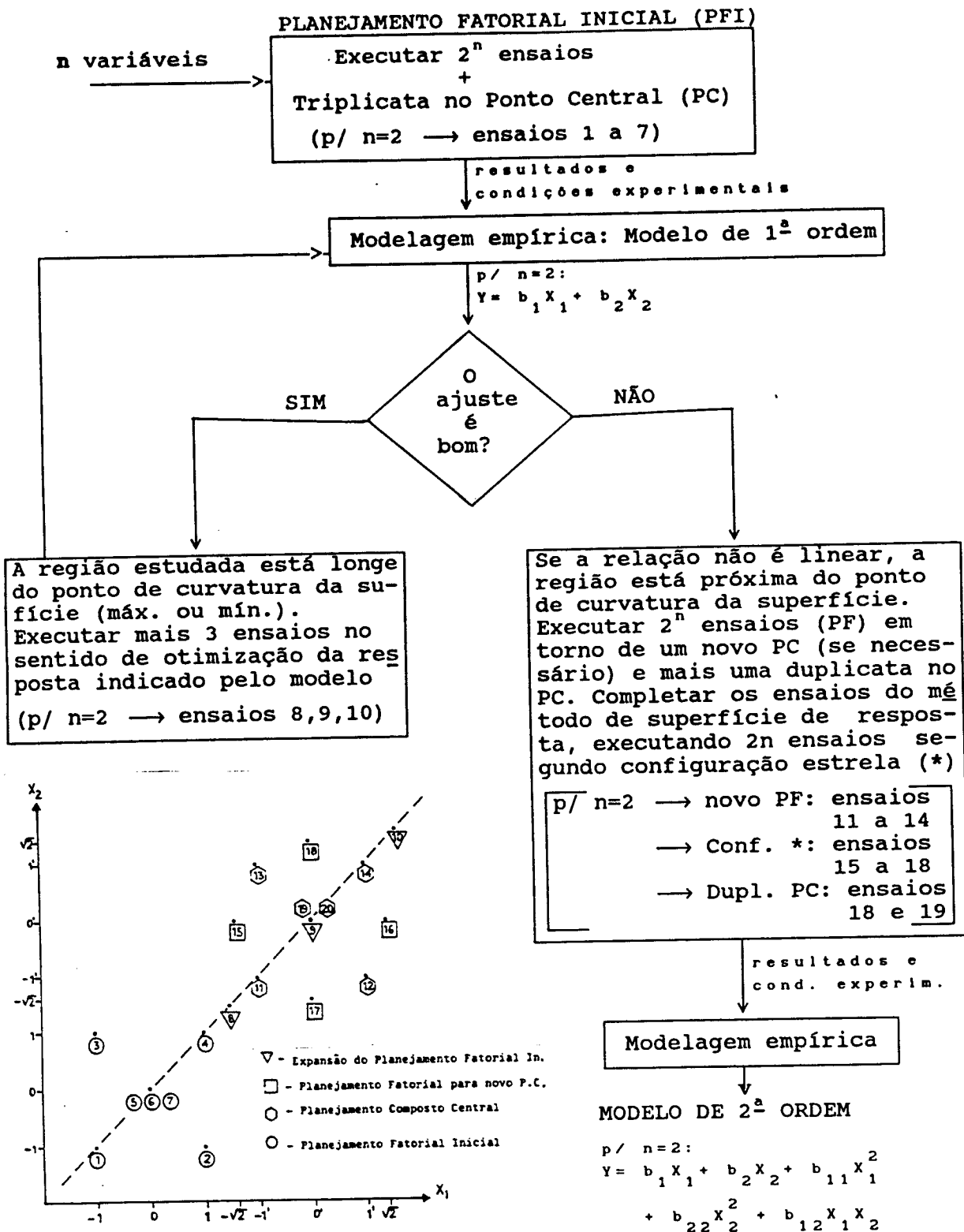
Por outro lado, se as variações observadas experimentalmente nas respostas forem muito grandes, a probabilidade de ocorrerem naturalmente na distribuição de referência será muito pequena. Neste caso, pode-se afirmar que uma diferença estatisticamente significativa foi encontrada e os dados experimentais são representados pelo modelo proposto com um alto nível de confiança.

A FIGURA 2.20 representa esquematicamente as etapas necessárias para o planejamento de ensaios pelo método de análise por superfície de resposta e a manipulação dos resultados obtidos.

#### 2.4.1 - Exemplos de Aplicação de Métodos de Planejamento Experimental na Otimização de Processos Fermentativos

a) Estudo da utilização de xilose em um cultivo de *Candida shehatae*

Jeffries<sup>(32)</sup> empregou um planejamento fatorial múltiplo variante para examinar os efeitos da aeração e da concentração de açúcar nas produtividades específicas e nos rendimentos específicos de etanol, xilitol e glicerol para *Candida shehatae*. Neste planejamento, foram escolhidos 11 diferentes valores para a taxa de aeração e 3 para a concentração de açúcar, levando a realização de 11 experimentos, todos feitos em triplicata, distribuídos conforme está representado na FIGURA 2.21.



▽ - Expansão do Planejamento Fatorial In.  
 □ - Planejamento Fatorial para novo P.C.  
 ○ - Planejamento Composto Central  
 ○ - Planejamento Fatorial Inicial

FIGURA 2.20 - Fluxograma de execução e exemplo de aplicação do método de análise por superfície de resposta.



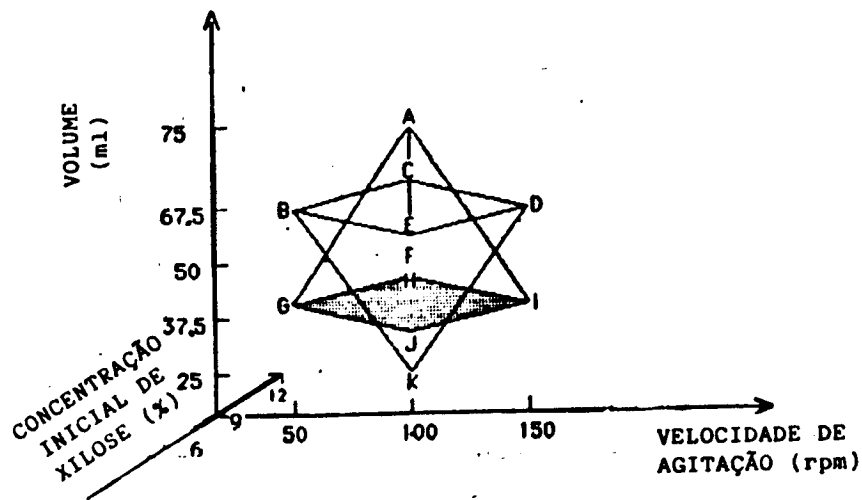


FIGURA 2.21 - Distribuição das condições experimentais empregadas por Jeffries nos 11 ensaios realizados<sup>(32)</sup>.

Na TABELA 2.8, estão representados os valores de rendimento ( $Y_1$ ) e produtividade ( $Y_2$ ) de xilitol obtidos em cada ensaio previsto pelo planejamento proposto.

Em todos os ensaios foram utilizados frascos de 125 ml, a temperatura foi 32 °C e o pH inicial foi ajustado para 4,5.

As observações gerais que podem ser extraídas da TABELA 2.8 são:

- para condições aeróbicas (100 rpm e 37,5 ml), o rendimento e a produtividade sofrem um maior efeito da concentração inicial de substrato, caindo drasticamente a medida que esta diminui;
- para condições semi-anaeróbicas (100 rpm e 67,5 ml), o efeito da concentração inicial de xilose no rendimento e na produtividade não é tão significativo;
- para altas concentrações iniciais de substrato, o rendimento quase não se altera com o aumento da aeração, mas a produtividade aumenta;
- para valores intermediários de concentração inicial de xilose, o rendimento e a produtividade diminuem para condições muito aeradas (150 rpm e 37,5 ml), mas a produtividade aumenta para condições de aeração baixas e intermediárias.

TABELA 2.8 - Condições experimentais e respostas do planejamento experimental múltiplo variante empregado por Jeffries<sup>(32)</sup>.

Ensaio	S <sub>0</sub> (g/l)	N (rpm)	V <sub>meio</sub> (ml)	Y <sub>1</sub> (g/g)	Y <sub>2</sub> (g/lh)
A	90,0	100	75,0	0,13	0,08
B	90,0	50	67,5	0,06	0,04
C	120,0	100	67,5	0,11	0,07
D	90,0	150	67,5	0,23	0,39
E	60,0	100	67,5	0,11	0,11
F	90,0	100	50,0	0,13	0,20
G	90,0	50	37,5	0,06	0,05
H	120,0	100	37,5	0,13	0,25
I	90,0	150	37,5	0,10	0,23
J	60,0	100	37,5	0,03	0,04
K	90,0	100	25,0	—	0,16

S<sub>0</sub> - concentração inicial de xilose

V<sub>meio</sub> - volume de meio

N - velocidade de agitação

Y<sub>1</sub> - rendimento

Y<sub>2</sub> - produtividade

Como conclusão geral, Jeffries<sup>(32)</sup> verificou a existência de interação entre a concentração inicial de substrato e a aeração. Os valores das condições experimentais correspondentes ao ensaio D tornam máximas ambas as respostas.

b) Otimização da produção de ácido itacônico a partir de xilose por *Aspergillus terreus* TTK 200-5-2 imobilizado

A otimização da produção de ácido itacônico em fermentações repetitivas em batelada ou fermentações contínuas em coluna foi proposta por Kautola<sup>(69)</sup>, empregando um planejamento experimental 2<sup>3</sup> com 3 variáveis independentes, seis pontos na configuração estrela e quatro ou seis repetições no ponto central. O número total de experimentos nas fermentações repetitivas em batelada foi 20 e as concentrações de xilose e nitrato de amônio e o pH inicial foram as variáveis independentes escolhidas. Para as fermentações

contínuas em coluna empacotada com células imobilizadas, o número total de experimentos foi 18 e as variáveis independentes foram a concentração de xilose, a taxa de aeração e o tempo de residência. O pacote "Statistical Package for the Social Sciences, SSPS" foi usado para calcular os polinômios de segundo grau para estimar a concentração de ácido itacônico em ambos os sistemas ( $Y_1$  e  $Y_2$ ), como as respostas (variáveis dependentes) escolhidas.

Os valores codificados, os valores reais atribuídos a cada variável e a matriz do planejamento experimental, mostrando as condições nas quais os ensaios foram realizados e as respectivas respostas obtidas, estão representados na TABELA 2.9 e TABELA 2.10, respectivamente.

As concentrações de ácido itacônico atingidas para as diversas fermentações repetitivas em batelada foram correlacionadas com as condições experimentais, resultando em um modelo onde  $Y_1$  é uma função da concentração de xilose ( $X_{1r}$ ), da concentração de nitrato de amônio ( $X_{2r}$ ) e do pH inicial ( $X_{3r}$ ) (EQUAÇÃO 1).

#### EQUAÇÃO 1

$$\begin{aligned}
 Y_1 = & - 5,07275 + 0,199235X_{1r} - 1,96171X_{2r} + 3,41779X_{3r} \\
 & + 0,07941X_{1r}X_{2r} - 0,064087X_{1r}X_{3r} - 0,441386X_{2r}X_{3r} \\
 & - 0,0003154X_{1r}^2 + 0,079762X_{2r}^2 - 0,396252X_{3r}^2
 \end{aligned}$$

Coeficiente de correlação múltiplo (R) = 0,73

As respostas representadas por linhas de contorno na FIGURA 2.22 mostram que, na região investigada, as melhores condições para produção de ácido itacônico em alta concentração correspondem a baixas concentrações de nitrato, altas concentrações de xilose e valor de pH inicial ótimo de aproximadamente 2,5.

TABELA 2.9 - Valores reais e codificados atribuídos às variáveis no planejamento experimental empregado por Kautola<sup>(69)</sup>.

Valores Codificados (x)	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
	Valores Reais				
$X_{1r}$ (%)	5,00	7,52	12,50	17,42	20,00
$X_{1c}$ (%)	5,00	7,20	12,50	17,80	20,00
$X_{2r}$ (%)	0,05	0,16	0,38	0,59	0,70
$X_{2c}$ (vvm)	0,00	0,23	0,80	1,35	1,60
$X_{3r}$	2,25	2,51	3,00	3,49	3,75
$X_{3c}$ (h)	24,00	52,20	120,00	187,80	216,00

$X_{1r}$  e  $X_{1c}$  = concentração de xilose

$X_{2r}$  = concentração de nitrato de amônio /  $X_{2c}$  = taxa de aeração

$X_{3r}$  = pH inicial /  $X_{3c}$  = tempo de residência

$\alpha(r) = 1,525$  /  $\alpha(c) = 1,415$

r - fermentação repetitiva em batelada

c - fermentação em biorreator contínuo.

Os resultados obtidos nos experimentos em bateladas repetitivas foram usados na otimização da produção de ácido itacônico em colunas contínuas de células empacotadas. A EQUAÇÃO 2 dá a concentração de ácido itacônico ( $Y_2$ ) como função da concentração de xilose, da taxa de aeração e do tempo de residência.

#### EQUAÇÃO 2

$$\begin{aligned}
 Y_2 = & 4,57796 - 1,82655X_{1c} + 0,11518X_{2c} + 0,04882X_{3c} \\
 & - 0,00347X_{1c}X_{2c} + 0,00146X_{1c}X_{3c} - 0,00013X_{2c}X_{3c} \\
 & + 0,08061X_{1c}^2 - 0,00042X_{2c}^2 - 0,00018X_{3c}^2
 \end{aligned}$$

Coefficiente múltiplo de correlação = 0,9

TABELA 2.10 - Matriz do Planejamento Experimental empregado por Kautola<sup>(69)</sup>.

Ensaio	Valores codificados			Resultados	
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$Y_1$	$Y_2$
1	-1	-1	-1	0,908	0,335
2	1	-1	-1	1,660	0,199
3	-1	1	-1	0,175	0,203
4	1	1	-1	0,929	0,489
5	-1	-1	1	1,355	0,264
6	1	-1	1	0,099	2,579
7	-1	1	1	1,152	6,548
8	1	1	1	0,569	0,636
9	$-\alpha$	0	0	1,130	6,206
10	$\alpha$	0	0	0,585	7,984
11	0	$-\alpha$	0	1,670	0,278
12	0	$\alpha$	0	0,252	0,161
13	0	0	$-\alpha$	0,061	0,287
14	0	0	$\alpha$	1,247	1,475
15	0	0	0	0,917	0,937
16	0	0	0	0,600	0,757
17	0	0	0	0,789	1,795
18	0	0	0	0,816	1,123
19	0	0	0	1,020	
20	0	0	0	1,324	

Com base na EQUAÇÃO 2, a FIGURA 2.23 mostra que as condições ótimas de taxa de aeração e tempo de residência para a produção de ácido itacônico foram aproximadamente 0,6 vvm e 160 h com 12,5 % de xilose, enquanto que a maior concentração de ácido itacônico (8,1 g/l) foi atingida com a maior concentração de xilose investigada (20 %), quando a taxa de aeração foi de 0,6 v/v min e o tempo de residência de 160 h. A concentração de ácido itacônico mencionada acima também foi a máxima (8,0 g/l) obtida experimentalmente nas condições do ENSAIO 10 (TABELA 2.10).

Kautola<sup>(69)</sup> não faz nenhuma referência ao cálculo do erro experimental através dos ensaios repetidos no ponto central, nem à utilização deste ou de outro critério para selecionar quais os parâmetros mais significativos e verificar quais as variáveis mais importantes. Tampouco discute o ajuste do modelo resultante da regressão aos dados experimentais, apresentando apenas o valor do coeficiente múltiplo de correlação.



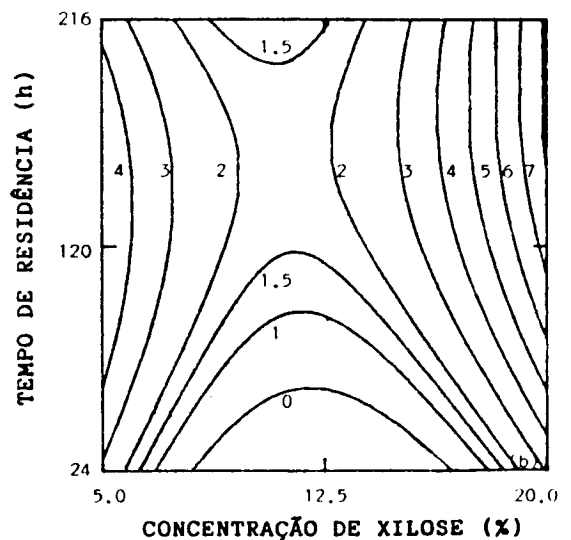
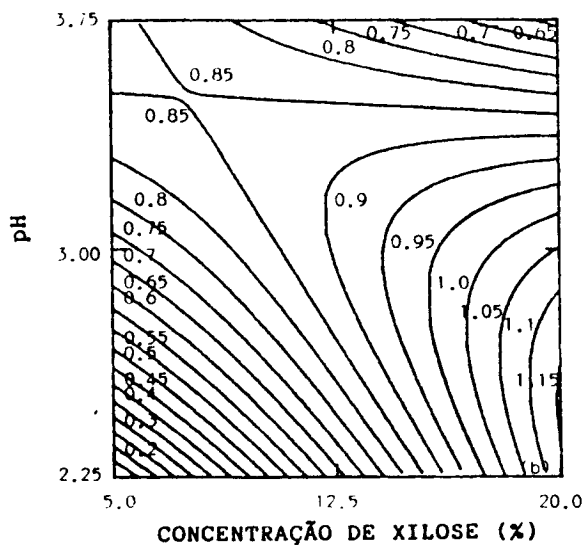
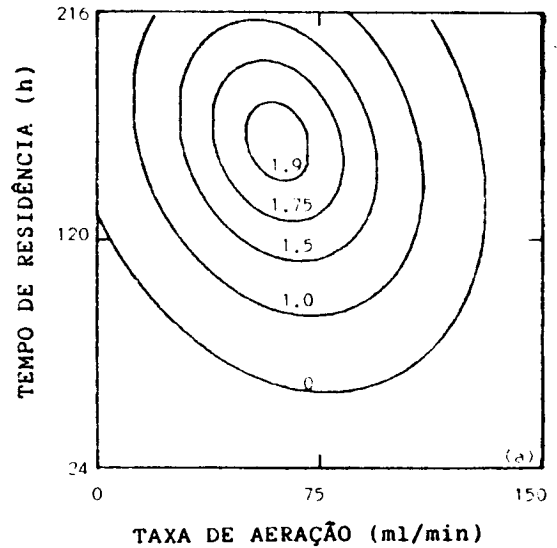
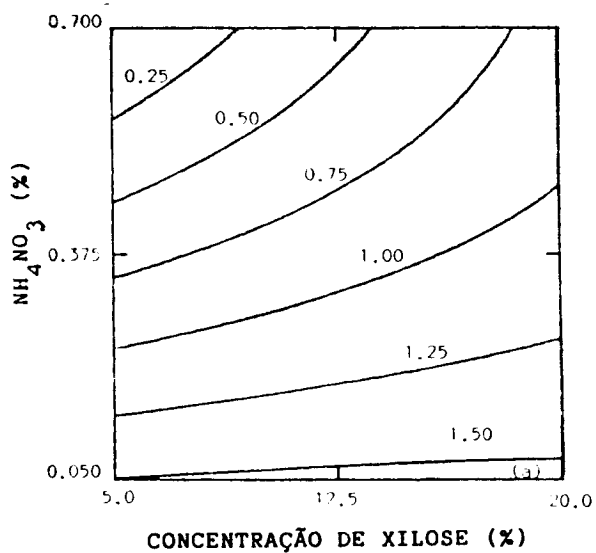


FIGURA 2.22 - Variação da produção de ácido itacônico com a concentração de xilose, o pH e concentração de nitrato de amônio<sup>(69)</sup>.

FIGURA 2.23 - Variação da produção de ácido itacônico com a taxa de aeração, a concentração de xilose e o tempo de residência<sup>(69)</sup>.

### 3 - MATERIAL E MÉTODOS

Para a execução deste trabalho, os experimentos foram agrupados em 2 etapas consecutivas, iniciando-se pelos Ensaio Preliminares e seguindo-se então para os ensaios requeridos pelo método de planejamento experimental por análise de superfície de resposta.

O papel desempenhado por cada uma destas etapas está representado na FIGURA 3.1, enquanto que a descrição detalhada do procedimento experimental adotado nas mesmas, dos métodos de análise empregados e a relação dos equipamentos, reagentes e material utilizados é apresentada nos itens subsequentes.

#### 3.1 - ENSAIOS PRELIMINARES

A etapa de Ensaio Preliminares teve como objetivos:

- selecionar uma espécie de levedura com boa produção de xilitol;
- escolher a composição do meio de fermentação mais adequada;
- desenvolver um procedimento para a preparação de um inóculo apropriado ao processo fermentativo da xilose.

Um esquema representando os ensaios realizados nesta etapa e sua sequência é mostrado na FIGURA 3.2.

Para todos os ensaios desta etapa preliminar, as culturas foram mantidas em tubos estoques contendo ágar de batata dextrosado em superfície inclinada, e recobertas por vaselina líquida estéril para evitar o ressecamento.

Segue-se a relação dos microrganismos e composição dos meios utilizados para a realização destes estudos e a descrição de ensaios típicos.

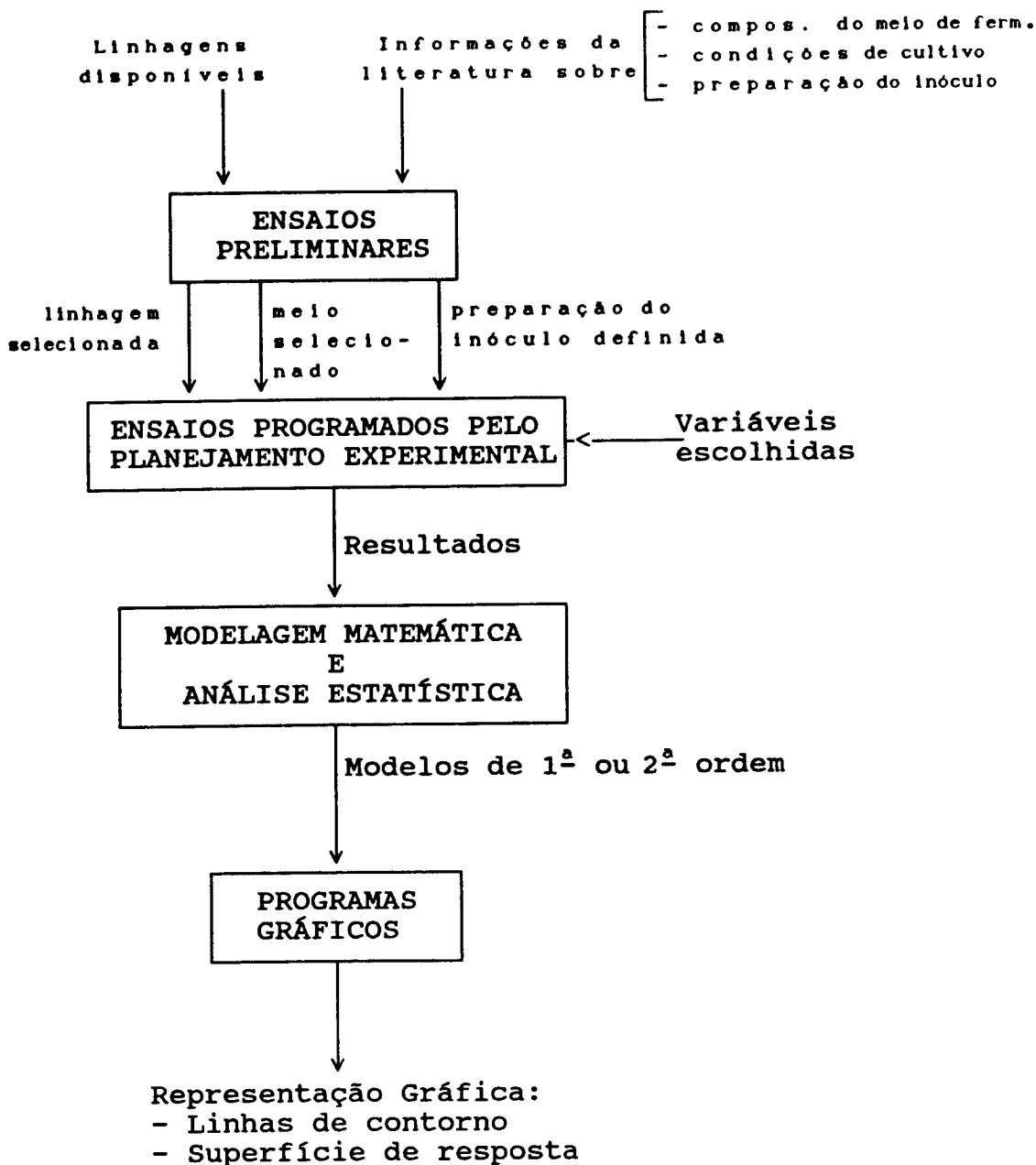


FIGURA 3.1 - Representação esquemática das etapas executadas para a otimização da produção de xilitol em fermentação em batelada.

### 3.1.1. - Seleção da linhagem produtora

Neste estudo pretendeu-se verificar a capacidade de assimilação de xilose e produção de xilitol por algumas culturas de leveduras obtidas de coleções de microrganismos de instituições nacionais, cujas espécies são as recomendadas na literatura

consultada.

### a) Microrganismos

Foram testadas 18 leveduras de diferentes gêneros e espécies, relacionadas abaixo :

*S. cerevisiae* ICBiotech, *Kluyveromyces bulgaricus* ATCC 16045, *Saccharomyces cerevisiae* IZ 888, *Kluyveromyces fragilis* 8635, *Candida utilis* IZ 1840, *Saccharomyces cerevisiae* IZ 1940, *Saccharomyces cerevisiae* IZ 765, *Candida tropicalis* IZ 1824, *Candida tropicalis* IZ 1958, *Candida parapsilosis* IZ 1710, *Saccharomyces uvarum* IZ 185, *Saccharomyces uvarum* IZ 233, *Candida parapsilosis* IAL 28, *Candida parapsilosis* IAL 11, *Candida sp.* DM-FIOCRUZ 2877, *Candida sp.* DM-FIOCRUZ 3585, *Candida parapsilosis* DM-FIOCRUZ 2882, *Candida parapsilosis* DM-FIOCRUZ 778.

### b) Composição dos meios de crescimento do inóculo e de fermentação

Os meios empregados neste estudo são os comumente utilizados para o cultivo de leveduras no Laboratório de Bioengenharia da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP.

Composição do meio de  
crescimento do inóculo

Glicose	20,0 g/l
Extrato de levedura	5,0 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5,0 g/l
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,5 g/l
KCl	1,2 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,7 g/l
pH inicial = 5,0	

Composição do meio de  
fermentação

xilose	20,0 g/l
Extrato de levedura	1,0 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,0 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	3,5 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,0 g/l
pH inicial = 6,0	

Para ambos os meios, os sais e os açúcares foram esterilizados juntos.

### c) Descrição de um ensaio típico

O inóculo foi preparado transferindo-se uma alçada do microrganismo escolhido, retirada assepticamente de um tubo esto-

que cultivado por 24 horas, para um frasco de 100 ml contendo 20 ml de meio de crescimento de inóculo. Após 30 horas de incubação a 30 °C e 200 rpm, o inóculo foi transferido integralmente para um erlenmeyer aletado de 500 ml com 200 ml de meio. Neste instante, coletou-se a primeira amostra correspondente ao instante  $t = 0$  h. Os frascos inoculados com diferentes microrganismos foram colocados em câmara incubadora com mesa rotativa a 30 °C e 150 rpm e outras amostras foram sendo coletadas periodicamente até que a concentração de açúcar se reduzisse a um valor mínimo.

Assim que a amostra era coletada, uma parte era diluída adequadamente e utilizada para a medida de turbidez no espectrofotômetro enquanto que o restante era centrifugado e o sobrenadante congelado para análise posterior da concentração de xilose e de xilitol

### 3.1.2 - Seleção do Meio de Fermentação

Com base nos trabalhos de Vongsuvanlert & Tani<sup>(12)</sup>, decidiu-se investigar a influência da concentração de extrato de levedura e do tipo de fonte de nitrogênio sobre a produção de xilitol, para as leveduras selecionadas no estudo anterior.

#### a) **Microrganismos**

Foram testadas as 2 linhagens de *C. tropicalis* e 2 de *C. parapsilosis* que obtiveram os melhores resultados no estudo anterior, sendo:

A - *C. tropicalis* IZ 1824      B - *C. tropicalis* IZ 1958  
C - *C. parapsilosis* IZ 1710      D - *C. parapsilosis* DM-FIOCRUZ 2882

#### b) **Composição dos meios de crescimento do inóculo e de fermentação**

Foi mantida a mesma composição do meio de crescimento do inóculo apresentada no item 3.1.1c, mas foram testados 4 meios de fermentação com composições diferentes em fonte de nitrogênio

(acetato de amônio ou sulfato de amônio) e em concentração de extrato de levedura (1 g/l ou 6 g/l), de forma que todas as combinações entre as possibilidades acima fossem verificadas experimentalmente. As concentrações dos outros componentes foram mantidas constantes.

#### COMPOSIÇÃO DOS MEIOS DE FERMENTAÇÃO TESTADOS

MEIO I		MEIO II	
Acetato de amônio	5,0 g/l	Acetato de amônio	5,0 g/l
Extrato de levedura	6,0 g/l	Extrato de levedura	1,0 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,0 g/l	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,0 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,0 g/l	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,0 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/l	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/l
Xilose	20,0 g/l	Xilose	20,0 g/l

MEIO III		MEIO IV	
Sulfato de amônio	3,5 g/l	Sulfato de amônio	3,5 g/l
Extrato de levedura	6,0 g/l	Extrato de levedura	1,0 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,0 g/l	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,0 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,0 g/l	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,0 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/l	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/l
Xilose	20,0 g/l	Xilose	20,0 g/l

O pH inicial de todos os meios foi ajustado em 7,0 e o açúcar e os sais foram esterilizados separadamente.

#### c) Descrição de um ensaio típico

Foi adotado o mesmo procedimento experimental descrito em 3.1.1d.

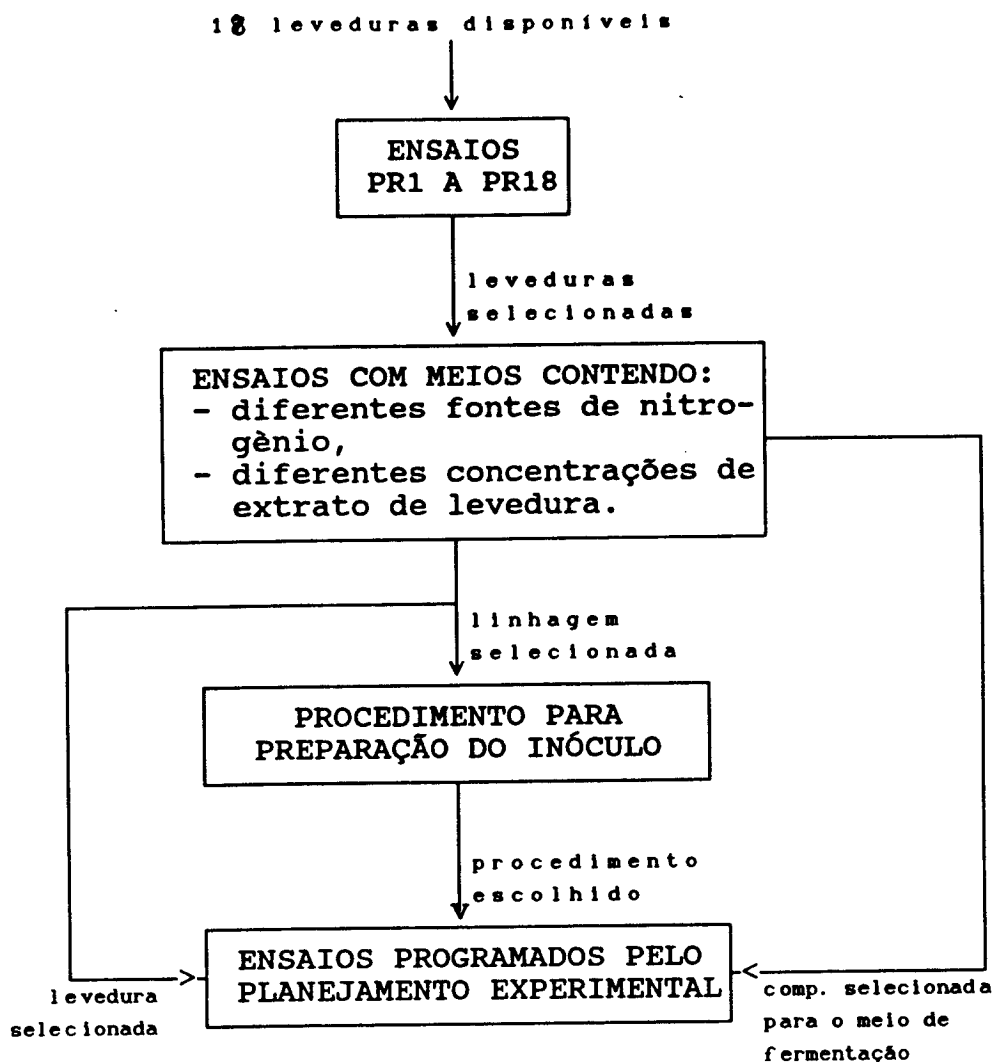


FIGURA 3.2 - Esquema representando a sequência de ensaios realizados na etapa de Ensaio Preliminares - Seleção do microrganismo.

### 3.1.3 - Desenvolvimento de Procedimento para a Preparação de um Inóculo para a Fermentação de Xilose

#### a) Microrganismo

O microrganismo utilizado foi *Candida parapsilosis* IZ 1710, selecionado no item 3.1.2.

## b) Composição do meio de crescimento do inóculo

A composição dos 4 meios testados foi:

MEIO A		MEIO B	
Glicose	20,0 g/l	Glicose	15,0 g/l
Extrato de levedura	5,0 g/l	Xilose	5,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,0 g/l	Extrato de levedura	5,0 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	1,5 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,0 g/l
KCl	1,2 g/l	NH <sub>4</sub> Cl	1,5 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,7 g/l	KCl	1,2 g/l
		MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,7 g/l

MEIO C		MEIO D	
Glicose	10,0 g/l	Xilose	20,0 g/l
Xilose	10,0 g/l	Extrato de levedura	5,0 g/l
Extrato de levedura	5,0 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,0 g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5,0 g/l	NH <sub>4</sub> Cl	1,5 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	1,5 g/l	KCl	1,2 g/l
KCl	1,2 g/l	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,7 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,7 g/l		

Todos os meios foram preparados com um pH inicial igual a 5,0 e os sais e açúcares foram esterilizados separadamente.

## c) Descrição de um ensaio típico

Iniciou-se o cultivo inoculando cada um dos 4 frascos de 500 ml contendo 100 ml de meio de crescimento do inóculo A, B, C e D, com uma suspensão celular resultante da adição de 5 ml de solução salina estéril a um tubo estoque incubado por 24 horas a 30 °C. Imediatamente após a inoculação, foram coletadas as primeiras amostras de cada um dos frascos, correspondentes ao início da fermentação (t = 0 h) e os frascos foram colocados em câmara incubadora com mesa rotativa, sendo cultivados a 30 °C e 250 rpm. Mais amostras foram sendo coletadas periodicamente até o momento no qual a concentração de açúcar(es) se tornou mínima. Parte da amostra recolhida foi diluída e destinada a leitura de turbidez no



espectrofotômetro para avaliar o crescimento celular. O restante da amostra foi centrifugado e o sobrenadante guardado na geladeira para análise posterior da concentração de açúcares.

### 3.2 - ENSAIOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL POR ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

#### a) Microrganismo

Foi utilizado o mesmo microrganismo do item 3.1.3, *Candida parapsilosis* IZ - 1710.

#### b) Manutenção

Para todos os ensaios do planejamento experimental, as culturas foram mantidas em tubos estoques contendo ágar de batata dextrosado em superfície inclinada, e recobertas por vaselina líquida estéril para evitar o ressecamento.

#### c) Composição dos meios de crescimento de inóculo e de fermentação e condições de cultivo

O meio de crescimento do inóculo, cuja composição e condições de cultivo estão representadas abaixo, foram as selecionadas no item 3.1.3.

Da mesma forma, a composição do meio de fermentação descrito abaixo foi a selecionado em 3.1.2.

#### Composição do meio de crescimento do inóculo

Glicose	10,0 g/l
Xilose	10,0 g/l
Extrato de levedura	5,0 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	5,0 g/l
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1,5 g/l
KCl	1,2 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,7 g/l

pH inicial = 5,0

Os sais e açúcares foram esterilizados separadamente.

As condições de cultivo empregadas foram:

- temperatura de incubação = 30 °C
- tempo de incubação = 24 horas
- velocidade de agitação = 250 rpm

#### Composição do meio de Fermentação

Acetato de amônio	5,0 g/l
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,0 g/l
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	1,0 g/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 g/l
Extrato de levedura	1,0 g/l

O valor do pH inicial, a concentração inicial de xilose no meio e as condições de cultivo (temperatura e velocidade de agitação) foram ajustadas de acordo com os valores propostos para estas variáveis pelo planejamento experimental (TABELA 3.1)

#### d) Planejamento dos Experimentos

Conforme determina a metodologia do planejamento por superfície de resposta, deve-se iniciar o estudo através de um Planejamento Fatorial, onde o número de experimentos é  $2^n$  (n é o número de variáveis) e mais uma triplicata no ponto central.

A partir das informações obtidas na literatura consultada, escolheram-se 4 variáveis para serem estudadas :

- temperatura (T)
- pH inicial ( $\text{pH}_0$ )
- Concentração inicial de xilose ( $S_0$ )
- Velocidade de rotação da mesa rotativa (N)

Portanto, foram necessários  $2^4 = 16$  experimentos para o planejamento fatorial inicial (ENSAIOS 1 a 16) e mais 3 experimentos no ponto central (ENSAIOS 17,18 e 19).

Para o planejamento composto central (configuração "estrela") foram realizados  $2n = 8$  ensaios (ENSAIOS 20 a 27) e mais

uma duplicata no Ponto Central (ENSAIOS 28 e 29).

Após atribuir valores para todos os níveis de cada variável (TABELA 3.1), pôde ser construído um quadro representando todos os ensaios de fermentação realizados com as respectivas condições experimentais (TABELA 3.2).

TABELA 3.1 - Valores reais e codificados atribuídos às variáveis

Nível	pH <sub>o</sub>	T (°C)	S <sub>o</sub> (g/l)	N (rpm)
-1,0	5,0	25	40	100
+1,0	7,0	35	120	200
PC	6,0	30	80	150
-1,6	4,4	22	16	70
+1,6	7,6	38	144	230

$$\text{Codificação das variáveis: } VC = \frac{VR(+)-VR(PC)}{\Delta VR}$$

onde,

$$VC - \text{variável codificada, } VR - \text{variável real e } \Delta VR = \frac{VR(+)-VR(-)}{2}$$

Assim,

$$X_1 = \frac{T - 30}{5}$$

$$X_2 = \frac{\text{pH}_o - 6,0}{1,0}$$

$$X_3 = \frac{S_o - 80}{40}$$

$$X_4 = \frac{N - 150}{50}$$

### e) Descrição de um ensaio típico

Para a preparação de cada ensaio nas condições previstas pelo planejamento experimental foi adotado o seguinte procedimento:

Para cada ensaio de fermentação, foi preparado um volume de 100 ml de meio de crescimento de inóculo, que foi cultivado em

frasco de 500 ml, a 250 rpm e 30 °C. Após 24 h de incubação, o inóculo resultante foi transferido para tubos de centrifuga estéreis, cada um com 50 ml de volume útil. Após a centrifugação, separou-se assepticamente o sobrenadante e as células centrifugadas foram ressuspensas em 10 ml de solução salina estéril, obtendo-se soluções concentradas. Para tornar homogêneo os inóculos destinados aos vários frascos de fermentação, transferiram-se todas estas suspensões obtidas para um frasco comum, previamente esterilizado. A partir deste frasco contendo a suspensão celular concentrada e homogênea, cada frasco de 1000 ml destinado à fermentação, contendo 200 ml de meio de fermentação, foi inoculado assepticamente com 20 ml desta suspensão celular através de pipetas de 25 ml estéreis.

Imediatamente após a inoculação foi coletada a primeira amostra ( $t = 0$  h) através do sistema de amostragem montado em cada frasco de fermentação, conforme esquematizado na FIGURA 3.3. O processo de fermentação foi acompanhado coletando-se outras amostras a intervalos de tempos regulares até que a concentração de substrato atingisse um valor mínimo.

Logo após a coleta, uma parte da amostra foi diluída convenientemente e a turbidez da solução resultante foi medida no espectrofotômetro para avaliar o crescimento celular com o auxílio de uma curva de calibração. O restante da amostra foi centrifugado e o sobrenadante congelado para análises posteriores de concentração de xilose e xilitol.

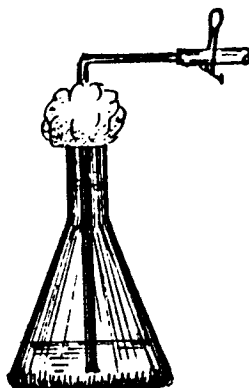


FIGURA 3.3 - Representação do frasco utilizado nos ensaios de fermentação, destacando-se o sistema de amostragem.

TABELA 3.2 - Quadro especificando as condições experimentais de todos os ensaios executados para o Planejamento Experimental

ENSAIO	X <sub>1</sub>	T (°C)	X <sub>2</sub>	pH <sub>o</sub>	X <sub>3</sub>	S <sub>o</sub> (g/l)	X <sub>4</sub>	N(rpm)
1	-1,0	25	-1,0	5,0	-1,0	40	-1,0	100
2	+1,0	35	-1,0	5,0	-1,0	40	-1,0	100
3	-1,0	25	+1,0	7,0	-1,0	40	-1,0	100
4	+1,0	35	+1,0	7,0	-1,0	40	-1,0	100
5	-1,0	25	-1,0	5,0	+1,0	120	-1,0	100
6	+1,0	35	-1,0	5,0	+1,0	120	-1,0	100
7	-1,0	25	+1,0	7,0	+1,0	120	-1,0	100
8	+1,0	35	+1,0	7,0	+1,0	120	-1,0	100
9	-1,0	25	-1,0	5,0	-1,0	40	+1,0	200
10	+1,0	35	-1,0	5,0	-1,0	40	+1,0	200
11	-1,0	25	+1,0	7,0	-1,0	40	+1,0	200
12	+1,0	35	+1,0	7,0	-1,0	40	+1,0	200
13	-1,0	25	-1,0	5,0	+1,0	120	+1,0	200
14	+1,0	35	-1,0	5,0	+1,0	120	+1,0	200
15	-1,0	25	+1,0	7,0	+1,0	120	+1,0	200
16	+1,0	35	+1,0	7,0	+1,0	120	+1,0	200
17	0,0	30	0,0	6,0	0,0	80	0,0	150
18	0,0	30	0,0	6,0	0,0	80	0,0	150
19	0,0	30	0,0	6,0	0,0	80	0,0	150
20	-1,6	22	0,0	6,0	0,0	80	0,0	150
21	+1,6	38	0,0	6,0	0,0	80	0,0	150
22	0,0	30	-1,6	4,4	0,0	80	0,0	150
23	0,0	30	+1,6	7,6	0,0	80	0,0	150
24	0,0	30	0,0	6,0	-1,6	16	0,0	150
25	0,0	30	0,0	6,0	+1,6	144	0,0	150
26	0,0	30	0,0	6,0	0,0	80	-1,6	70
27	0,0	30	0,0	6,0	0,0	80	+1,6	230
28	0,0	30	0,0	6,0	0,0	80	0,0	150
29	0,0	30	0,0	6,0	0,0	80	0,0	150

### 3.3 - MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 3.3.1 - Análise da Concentração de Xilose

A concentração de xilose em diferentes amostras foi avaliada através do método de determinação do açúcar redutor pelo reagente DNS<sup>(16)</sup>.

Para a preparação do reagente DNS, inicialmente misturam-se 1416 ml de água destilada, 10,6 g de 3,5-ácido dinitrossalicílico e 19,8 g de NaOH. Após dissolver tudo a quente, adicionam-se 7,6 ml de fenol (fundido a 50 °C) e 8,3 g de metabissulfito de sódio.

Para efetuar a análise do açúcar redutor, mistura-se 1 ml da amostra convenientemente diluída com 1 ml do reagente DNS e leva-se ao banho-maria a 100 °C por 5 minutos. Resfria-se imediatamente em gelo e se adiciona 16 ml de solução de tartarato duplo de sódio e potássio anidro a 11,25 g/l. O branco é feito substituindo a amostra por 1 ml de água destilada. Mede-se a absorvância a 540 nm em espectrofotômetro, na faixa de 0,1 a 1,0 g/l de açúcar redutor.

A curva de calibração foi feita com xilose.

#### 3.3.2 - Análise da Concentração de Xilitol

Para determinar a concentração de xilitol em diferentes amostras foi utilizado o método de análise colorimétrica para polióis<sup>(17)</sup>

A 1 ml de amostra contendo o poliól convenientemente diluído, adicionar 1 ml de metaperiodato de sódio 0,015 M dissolvido em HCl 0,12 M. Depois de agitar os tubos de ensaio e deixar em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente, adicionar 2 ml de solução de ramnose 0,1 % a cada tubo, para remover o excesso de íon periodato. Após agitar mais uma vez os tubos, são adicionados 4 ml do reagente de Nash (ver preparação abaixo). Para o aparecimento de cor, os tubos de ensaio são deixados num banho a 53 °C por 15 minutos. Depois de resfriados, a absorvância é lida em espectrofotômetro a 412 nm.

As curvas de calibração com soluções padrão para polióis são feitas na faixa de 0 - 70 mg/l

Preparação do reagente de Nash:

Deve ser preparado com pouca antecedência antes do uso, misturando-se 150 g de acetato de amônio, 2 ml de ácido acético glacial e 2 ml de acetilacetona, acrescentando água destilada até completar 1.000 ml de volume total.

### 3.3.3 - Avaliação do Crescimento Celular

A determinação da concentração de celular de *C. parapsilosis* IZ 1710 foi feita através da leitura da densidade ótica de amostras convenientemente diluídas no espectrofotômetro a 600 nm e com o auxílio da curva de calibração descrita abaixo, estimava-se a concentração celular em g de massa seca/l de meio para cada amostra, a partir do valor de absorvância medido e da diluição correspondente.

#### CURVA DE CALIBRAÇÃO

$$X \text{ (g/l)} = (-3,1829 \times 10^{-3} + 0,2992 \times \text{ABS}_{\text{dil.}}) \times \text{DIL.}$$

onde, X = concentração celular

$\text{ABS}_{\text{dil.}}$  = absorvância da amostra diluída medida a  
600 nm

DIL. = diluição correspondente da amostra

O procedimento envolvido na determinação desta curva de calibração está detalhado no ANEXO A.

### 3.4 - REAGENTES, MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

#### 3.4.1 - Reagentes

Os açúcares, as fontes de nitrogênio e o nutriente orgânico empregados na preparação dos meios de crescimento do inóculo e de fermentação, acompanhados pelo respectivo fornecedor estão relacionados abaixo.

Componente	Fornecedor
Glicose P.A.	Difco
Xilose P.A.	Sigma
Extrato de levedura	Biobrás
Agar de batata dextrosado (PDA)	Difco
Acetato de amônio	Reagen

Os demais sais que constituíram os meios foram adquiridos de diversos fornecedores.

É importante ressaltar que todos os componentes dos meios pertenciam respectivamente a um único lote do mesmo fornecedor, desde o primeiro ensaio da etapa de Ensaio Preliminares até o último experimento do Planejamento Experimental.

Os reagentes utilizados nos métodos analíticos eram todos de alto grau de pureza, tendo sido adquiridos dos seguintes fornecedores:

Reagente	Fornecedor
Ácido dinitrossalicílico	Merck
Hidróxido de sódio	Merck
Metabissulfito de sódio	Merck
Tartarato duplo de sódio e potássio	Merck
Metaperiodato de sódio	Reagen
Ácido clorídrico	Merck
Ramnose	Riedel-deHaen
Acetato de amônio	Reagen
Ácido acético glacial	Merck
Acetilacetona	Riedel-deHaen
Xilitol	Wako Pure Chemical Ind.
(p/ preparar curvas de calibração)	

#### 3.4.2 - Material

Foi utilizada vidraria de uso comum em laboratório, como erlenmeyers, beakers, funis, tubos de ensaio, provetas, balões de diluição, pipetas etc e ainda outros materiais de uso diverso como bicos de Bunsen, algodão, tubos de centrífuga, papel alumínio,



mangueiras de silicone, seringas, além de outros.

Pipetas automáticas de volume variável de 200  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l e 5000  $\mu$ l (marca Gilson) e de volume fixo de 1 ml e 2 ml (marca Cacil) foram utilizadas na preparação de amostras para a análise de xilose, xilitol e de concentração celular.

### 3.4.3 - Equipamentos

Os equipamentos utilizados, com suas especificações estão relacionados abaixo:

Equipamento	Especificação
Balança analítica	Mettler A260 Delta Range
Balança semi-analítica	Mettler P1210
Autoclaves	Fabbe, Modelo 103 2000 W e 7000 W
Estufa de cultura	Fanen, Modelo 002CB
Câmara de fluxo laminar	VECO, Modelo VLFS-09
Agitador magnético	Fisatom, Modelo 702
Agitador de tubos	Phoenix, Modelo AT 56
pHmetro	Micronal, Modelo B271
Eletrodo de pH	Ingold, combinado
Centrífuga	
-tubos de 10 ml	Fanen, Excelsa Baby, Mod. 206
-tubos de 50 ml	Budapesti Vegyipari Gép Gyár Type LSZ, 49112207
Banho termostaticado	Fauvel
Estufa de secagem	Fanen, Circ. Mecânica, Mod.320
Espectrofotômetro	Bausch & Lomb, Spectronic 70
Câmara de incubação com mesa rotativa	Superohm, Modelo G-25

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - ENSAIOS PRELIMINARES

#### 4.1.1 - Seleção de linhagens produtoras

Os resultados obtidos nos ensaios realizados com diversos microrganismos (PR1 a PR 18) estão resumidos na TABELA 4.1.

As condições de cultivo foram semelhantes em todos os ensaios, sendo:

- temperatura = 30 °C
- pH inicial = 6,0
- velocidade de agitação = 150 rpm
- $\frac{\text{Volume de meio}}{\text{Volume do frasco}} = \frac{2}{5}$
- concentração inicial de xilose = 20 g/l

Observando a TABELA 4.1, verifica-se que dos 18 microrganismos investigados, apenas 5 não conseguiram assimilar xilose (as 4 espécies de *S. cerevisiae* e *K. fragilis*), entretanto das 13 que metabolizaram xilose, somente 6 produziram xilitol numa concentração acima de 1 g/l.

Dentre estas destacam-se, pela concentração e rendimento de xilitol atingidos, *C. parapsilosis* DM-FIOCRUZ 2882, *C. parapsilosis* IZ 1710, *C. tropicalis* IZ 1824 e *C. tropicalis* IZ 1958, tendo sido portanto as 4 leveduras escolhidas para dar continuidade aos estudos. Convém ressaltar ainda que as linhagens IZ 1710 e IZ 1958 foram aquelas que assimilaram mais rapidamente o substrato entre todas as testadas.

Comparando os valores de rendimento alcançados nestes experimentos com os mencionados na literatura (ver TABELA 2.4), verifica-se que os valores obtidos para os microrganismos selecionados aproximam-se dos obtidos pelas espécies menos produtivas. Além disso, o tempo gasto para consumir apenas 20 g/l de xilose foi comparativamente muito maior, mostrando a necessidade de explorar outras condições de fermentação para tentar melhorar estes resultados.

TABELA 4.1 - Concentração final de xilose ( $S_f$ ), concentração máxima de xilitol ( $P_m$ ), rendimento ( $Y_1$ ) e tempo de fermentação ( $t$ ) resultantes da assimilação de xilose pelas 18 leveduras testadas.

ENSAIO	Microorganismo e Especificação	$S_f$ (g/l)	$P_m$ (g/l)	$Y_1$ (g/g)	$t$ (h)
PR 1	<i>S. cerevisiae</i> ICBiotech	15,5	—	—	97
PR 2	<i>K. bulgaricus</i> ATCC 16045	4,4	0,5	0,03	45
PR 3	<i>S. cerevisiae</i> IZ 888	14,4	—	—	116
PR 4	<i>K. fragilis</i> ATCC 8635	18,0	—	—	92
PR 5	<i>C. utilis</i> IZ 1840	0,7	0,7	0,03	67
PR 6	<i>S. cerevisiae</i> IZ 1904	18,2	—	—	92
PR 7	<u><i>C. tropicalis</i></u> IZ 1824	0,4	<u>5,2</u>	<u>0,34</u>	88
PR 8	<u><i>C. tropicalis</i></u> IZ 1958	0,2	<u>4,3</u>	<u>0,26</u>	43
PR 9	<u><i>C. parapsilosis</i></u> IZ 1710	0,4	<u>4,6</u>	<u>0,31</u>	42
PR 10	<i>S. uvarum</i> IZ 185	0,7	3,7	0,22	87
PR 11	<i>S. uvarum</i> IZ 233	3,7	0,7	0,04	63
PR 12	<i>C. parapsilosis</i> IAL 28	0,3	0,3	0,02	47
PR 13	<i>C. tropicalis</i> IAL 11	0,3	0,3	0,03	47
PR 14	<i>S. cerevisiae</i> IZ 765	17,4	—	—	94
PR 15	<i>C. sp.</i> DM-FIOCRUZ 2877	0,2	2,9	0,22	54
PR 16	<i>C. sp.</i> DM-FIOCRUZ 3585	3,1	0,9	0,10	64
PR 17	<u><i>C. parapsilosis</i></u> DM-FIOCRUZ 2882	0,2	<u>6,5</u>	<u>0,39</u>	54
PR 18	<i>C. parapsilosis</i> DM-FIOCRUZ 778	2,6	1,3	0,11	64

#### 4.1.2 - Seleção do meio de fermentação

Na TABELA 4.2 estão relacionados os resultados obtidos nos Experimentos de PR 19 a PR 34 da Etapa de Ensaios Preliminares.

As condições de cultivo comuns adotadas foram:

- temperatura = 30 °C
- pH inicial = 7,0

- velocidade de agitação = 150 rpm

$$- \frac{\text{Volume de meio}}{\text{Volume do frasco}} = \frac{2}{5}$$

- concentração inicial de xilose = 20 g/l

Na interpretação dos resultados obtidos nos ENSAIOS PR 19 a PR 34, relacionados na TABELA 4.2 e realizados para definir a composição do meio de fermentação mais adequada à produção de xilitol e selecionar o melhor produtor, levou-se em consideração não somente o tempo de fermentação, a concentração e o rendimento máximos em xilitol, como também fatores considerados importantes na análise dos resultados, entre eles a estabilidade do pH durante o cultivo e a quantidade relativa de extrato de levedura requerida por cada microrganismo.

Como para ensaios realizados em frascos submetidos à agitação externa, (todos os ensaios deste trabalho) não é possível controlar e manter um determinado valor do pH, procurou-se identificar condições de cultivo que favorecessem a estabilidade do pH durante o experimento. A TABELA 4.2 mostra que o pH se mantém relativamente estável em torno do valor inicial quando acetato de amônio é a fonte de nitrogênio, enquanto que com o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, o pH no final da fermentação é geralmente inferior ao valor inicial.

Esta queda no pH ao longo da fermentação na presença de sulfato de amônio ocorre principalmente quando a concentração de extrato de levedura é baixa, pois nesta circunstância o microrganismo é obrigado a consumir mais nitrogênio na forma de amônia para suprir suas necessidades e acaba liberando mais íons sulfato no meio. Por outro lado, como o íon acetato age como tampão, ele contribui para a manutenção do pH em torno de 7 à medida que vai sendo liberado para o meio.

Retornando à análise dos resultados, existem dois valores de rendimento em xilitol (e de concentração máxima) que se destacam na TABELA 4.2 por ultrapassarem o valor de 0,4 g/g (8,0 g/l de xilitol), sendo respectivamente 0,45 g/g para *C. tropicalis*

IZ 1824 cultivada no MEIO IV e 0,43 g/g para *C. parapsilosis*  
IZ 1710 cultivada no MEIO II.

Com exceção do valor de rendimento ligeiramente superior para a *C. tropicalis* IZ 1824, todos os outros aspectos favorecem a levedura *C. parapsilosis*, pois ela se mostrou capaz de metabolizar mais rapidamente a xilose, em um meio contendo acetato de amônio e com baixa concentração de extrato de levedura. Este último fator pode ser encarado como uma vantagem adicional, pois como o extrato de levedura é o mais caro de todos os componentes do meio, quanto menor for a quantidade requerida pelo microrganismo, menor será o custo do processo.

Portanto, após todas estas considerações decidiu-se optar pela composição de meio de fermentação correspondente ao MEIO II e pelo microrganismo *C. parapsilosis* IZ 1710 para dar continuidade ao trabalho.

Convem ainda ressaltar que:

- os resultados obtidos com *C. parapsilosis* IZ 1710 em relação a fonte de nitrogênio mais adequada, foram semelhantes aos obtidos por Vongsuvanlert & Tani<sup>(12)</sup> com *C. boidinii* (item 2.3.5), entretanto para *C. parapsilosis*, uma concentração de extrato de levedura de apenas 1 g/l foi suficiente para manter as condições apropriadas para o crescimento e manutenção das células, enquanto que nos ensaios com *C. boidinii* foram utilizados 6 g/l de extrato de levedura.

- as pequenas modificações introduzidas na composição do meio de fermentação foram suficientes para provocar um aumento de mais de 60 % nos valores de concentração e de rendimento em xilitol, para as linhagens IZ 1710, IZ 1824 e IZ 1958 (TABELA 4.2), em relação aos valores originais (TABELA 4.1), tornando-os assim da mesma ordem de grandeza dos valores intermediários relacionados na TABELA 2.4.

TABELA 4.2 - Concentração máxima de xilitol ( $P_m$ ), rendimento máximo ( $Y_1$ ), pH final ( $pH_f$ ) e tempo de fermentação (t) obtidos para os 4 microrganismos selecionados quando cultivados em meios contendo diferentes fontes de nitrogênio e diferentes concentrações de extrato de levedura

ENSAIO	Microrganismo e Especificação	$P_m$ (g/l)	$pH_f$	$Y_1$ (g/g)	t (h)	Meio de fermentação
PR 19	<i>C. tropicalis</i> IZ 1824	7,8	7,4	0,40	49	MEIO I
PR 20	<i>C. tropicalis</i> IZ 1958	5,8	7,3	0,34	37	Acetato de amônio
PR 21	<i>C. parapsilosis</i> IZ 1710	7,8	7,6	0,39	49	Extr. de levedura
PR 22	<i>C. parapsilosis</i> DM-FIOCRUZ 2882	3,4	7,4	0,18	84	6 g/l
PR 23	<i>C. tropicalis</i> IZ 1824	6,5	7,5	0,33	70	MEIO II
PR 24	<i>C. tropicalis</i> IZ 1958	7,0	7,1	0,35	47	Acetato de amônio
PR 25	<i>C. parapsilosis</i> IZ 1710	<u>8,1</u>	7,6	<u>0,43</u>	<u>58</u>	Extr. de levedura
PR 26	<i>C. parapsilosis</i> DM-FIOCRUZ 2882	6,9	7,9	0,39	81	1 g/l
PR 27	<i>C. tropicalis</i> IZ 1824	4,1	2,4	0,23	41	MEIO III
PR 28	<i>C. tropicalis</i> IZ 1958	7,2	2,6	0,36	41	Sulfato de amônio
PR 29	<i>C. parapsilosis</i> IZ 1710	5,3	2,8	0,33	65	Extr. de levedura
PR 30	<i>C. parapsilosis</i> DM-FIOCRUZ 2882	7,1	2,7	0,38	65	1 g/l
PR 31	<i>C. tropicalis</i> IZ 1824	8,7	6,9	0,45	87	MEIO IV
PR 32	<i>C. tropicalis</i> IZ 1958	7,2	6,2	0,38	63	Sulfato de amônio
PR 33	<i>C. parapsilosis</i> IZ 1710	6,0	6,5	0,36	63	Extr. de levedura
PR 34	<i>C. parapsilosis</i> DM-FIOCRUZ 2882	6,2	6,4	0,36	74	6 g/l

#### 4.1.3 - Desenvolvimento de Procedimento para a Preparação de Inóculo

Como as enzimas necessárias para o metabolismo da xilose só são induzidas na presença da mesma ou de outra pentose, é possível acelerar o processo fermentativo através da diminuição do período de adaptação das células (fase lag) a um meio contendo exclusiva-

mente xilose, caso o inóculo transferido para o meio de fermentação já contenha células adaptadas.

Assim, visando obter células com sistema enzimático já preparado para metabolizar a xilose como substrato e simultaneamente desenvolver uma forma de cultivo que permita um crescimento rápido e intenso da massa celular, foram testadas na fase de crescimento do inóculo 4 diferentes combinações de glicose e xilose como substratos, incluindo misturas de ambos açúcares.

Os resultados obtidos são apresentados na TABELA 4.3 e na FIGURA 4.1

As condições de cultivo foram comuns a todos os ensaios, sendo:

- temperatura = 30 °C
- pH inicial = 6,0
- velocidade de agitação = 250 rpm
- $\frac{\text{Volume de meio}}{\text{Volume do frasco}} = \frac{1}{5}$
- concentração inicial total de açúcares = 20 g/l

TABELA 4.3 - Consumo de substrato e crescimento celular para *C. parapsilosis* IZ 1710, cultivada em meios contendo xilose e glicose em diferentes proporções.

Meio	Substrato	Absorbância		Concentração final de xilose	Tempo (h)
		inicial	final		
A	Glicose 20 g/l	0,37	31,9	0,2 g/l	29
B	Glicose 15 g/l Xilose 5 g/l	0,41	31,5	0,1 g/l*	29
C	Glicose 10 g/l Xilose 10 g/l	0,32	35,5	0,1 g/l*	29
D	Xilose 20 g/l	0,48	19,9	2,3 g/l	52

\* concentração de açúcares dos meios com substratos mistos no final da fermentação foi estimada através da curva de calibração da xilose.

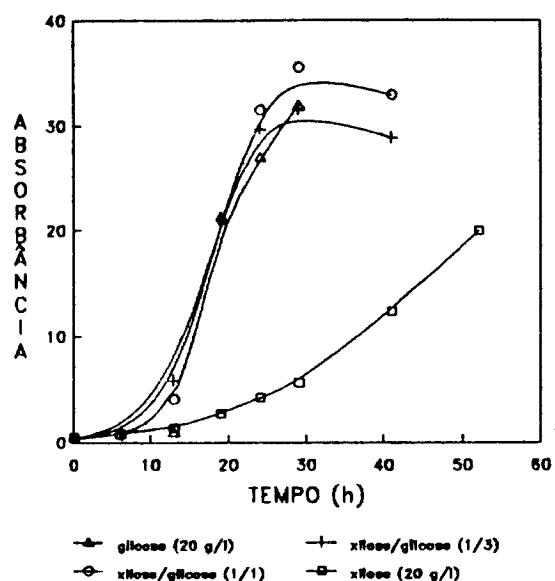


FIGURA 4.1 - Crescimento de células de *C. parapsilosis* cultivada em meios contendo xilose e glicose em diferentes proporções, para uma concentração inicial total de açúcares de 20 g/l.

Pode-se concluir a partir da TABELA 4.3 que os substratos mistos são consumidos tão eficientemente quanto a glicose pura, enquanto que a xilose pura é consumida muito lentamente.

Da mesma forma, constata-se através da FIGURA 4.1, que o microrganismo cresce rápida e intensamente em todos os meios contendo glicose pura ou glicose + xilose em qualquer proporção, sendo que as células podem ser recolhidas na fase exponencial do crescimento e em altas concentrações, interrompendo o cultivo após 24 horas. Por outro lado, o lento crescimento celular observado no meio contendo exclusivamente xilose como substrato, torna a etapa de preparação do inóculo longa demais e inadequada do ponto de vista prático.

Uma vez que a intenção deste estudo foi tentar acelerar o processo de fermentação através da inoculação do mesmo com um microrganismo já adaptado à xilose, a melhor opção é o meio C, pois ele apresenta a maior relação xilose/glicose (1/1) e após 24 horas de cultivo foi o que obteve maior densidade celular.



## 4.2 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL POR ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

### 4.2.1 - Análise Geral dos Resultados

Os resultados mais importantes obtidos nos 29 ensaios do planejamento experimental (constituído por: planejamento fatorial inicial - ENSAIOS 1 a 16; planejamento composto central - ENSAIOS 20 a 27 e replicatas no ponto central - ENSAIOS 17, 18, 19, 28 e 29), juntamente com as condições experimentais nas quais foram realizados, são apresentados na TABELA 4.4. A descrição completa do consumo de substrato, formação de produto e crescimento celular ao longo do tempo para cada ensaio está representada na forma de gráficos S, P e X versus t, incluídos no ANEXO B.

Os valores de rendimento ( $Y_1$ ) e produtividade ( $Y_2$ ) presentes na TABELA 4.4 foram calculados de acordo com o procedimento descrito no ANEXO C.

Considerando-se os diferentes aspectos do processo fermentativo apresentados na TABELA 4.4, é possível fazer alguns comentários quanto:

- Estabilidade do pH durante os ensaios.

Somente nos ensaios realizados a 30 °C e pH inicial igual a 6,0, o pH se manteve relativamente estável, mostrando que o efeito tampão do íon acetato não é tão eficiente sob outras condições de cultivo.

- Influência da temperatura no crescimento celular.

O microrganismo apresentou os maiores valores de concentração final de biomassa, aumentando em até mais de 10 vezes a concentração inicial, sob as condições experimentais dos ENSAIOS 7, 13, 18, 19, 20 e 27 enquanto que os ensaios de menor crescimento foram ENSAIOS 4, 12 e 21. Como os 4 primeiros ensaios foram realizados a baixas temperaturas (22, 25 ou 30 °C) e os 2 últimos a temperaturas elevadas (35 ou 38 °C), parece razoável admitir que o crescimento é favorecido na incubação do microrganismo em temperaturas mais baixas.

TABELA 4.4 - Condições experimentais utilizadas e resultados obtidos em todos os ensaios realizados de acordo com o planejamento experimental por análise de superfície de resposta.

Condições Experimentais					R E S U L T A D O S						
ENSAIO	T (°C)	pH <sub>0</sub>	S <sub>0</sub> (g/l)	N (rpm)	S <sub>f</sub> (g/l)	pH <sub>f</sub>	X <sub>f</sub> (g/l)	P <sub>m</sub> (g/l)	t (h)	Y <sub>1</sub> (g/g)	Y <sub>2</sub> (g/lh)
1	25	5,0	40	100	2,0	6,7	10,2	20,5	90	0,531	0,247
2	35	5,0	40	100	8,0	7,9	3,3	13,7	290	0,429	0,047
3	25	7,0	40	100	1,0	6,9	9,9	21,7	90	0,559	0,241
4	35	7,0	40	100	13,0	8,3	1,8	16,9	290	0,710	0,178
5	25	5,0	120	100	3,1	4,3	17,7	81,6	188	0,624	0,434
6	35	5,0	120	100	0,6	3,4	17,0	62,1	290	0,564	0,261
7	25	7,0	120	100	4,6	4,4	25,7	30,7	326	0,251	0,075
8	35	7,0	120	100	10,2	6,7	11,2	82,5	189	0,718	0,491
9	25	5,0	40	200	3,6	7,1	11,6	9,1	95	0,370	0,154
10	35	5,0	40	200	1,3	7,3	7,3	22,3	72	0,567	0,309
11	25	7,0	40	200	8,5	8,6	7,5	7,2	254	0,377	0,122
12	35	7,0	40	200	9,6	8,9	3,6	17,7	238	0,586	0,295
13	25	5,0	120	200	4,5	3,1	24,5	65,9	155	0,497	0,454
14	35	5,0	120	200	1,9	3,8	18,6	72,1	156	0,606	0,462
15	25	7,0	120	200	88,5	7,9	10,7	6,3	326	0,169	0,019
16	35	7,0	120	200	2,7	6,6	11,9	77,5	133	0,647	0,583
17	30	6,0	80	150	1,5	6,8	18,2	48,6	101	0,602	0,517
18	30	6,0	80	150	2,7	6,3	22,7	34,5	101	0,407	0,342
19	30	6,0	80	150	1,2	6,6	20,6	47,3	101	0,596	0,503
20	22	6,0	80	150	19,1	7,3	20,4	19,1	207	0,376	0,103
21	38	6,0	80	150	56,7	8,1	2,6	20,6	207	0,871	0,111
22	30	4,4	80	150	0,9	5,5	18,8	45,8	177	0,726	0,322
23	30	7,6	80	150	1,3	7,3	12,9	51,2	132	0,714	0,485
24	30	6,0	16	150	0,3	7,5	5,8	9,0	31	0,644	0,419
25	30	6,0	144	150	4,1	6,3	16,0	123,0	142	0,839	0,936
26	30	6,0	80	70	0,6	6,4	8,5	64,3	151	0,863	0,495
27	30	6,0	80	230	3,0	6,7	20,6	25,6	112	0,387	0,246
28	30	6,0	80	150	1,4	6,7	11,0	53,9	105	0,719	0,511
29	30	6,0	80	150	1,4	6,7	10,8	55,2	105	0,716	0,523

T - temperatura                      N - velocidade de agitação                      t - tempo  
 pH - pH do meio de fermentação                      S - concentração de xilose  
 X - concentração celular                      P<sub>m</sub> - concentração máxima de xilitol  
 Y<sub>1</sub> - rendimento                      Y<sub>2</sub> - produtividade

Obs.: A concentração inicial de células foi, em média, 2,3 g/l.

- Formação de xilitol.

Indiscutivelmente, a situação que mais favoreceu a formação de xilitol no meio, atingindo uma concentração de 123,0 g/l, foi a correspondente ao ENSAIO 25, caracterizado pela mais alta concentração inicial de xilose (144 g/l) de todos os ensaios. Entretanto, os dois melhores valores de rendimento correspondem aos ENSAIOS 21 (0,871 g/g) e 26 (0,863 g/g), vindo a seguir o do ENSAIO 25 (0,839 g/g). No entanto, os baixos valores de produtividade (apenas 0,111 g/lh para o ENSAIO 21 e 0,495 g/lh para o ENSAIO 26), indicam que se as condições de alta temperatura e baixa aeração são vantajosas para a formação de xilitol, por outro lado comprometem a velocidade de metabolismo do microrganismo e só seria interessante realizar o processo fermentativo sob estas condições se fosse possível superar o efeito negativo na produtividade através da utilização de alta concentração inicial de células, por exemplo.

Analisando o ENSAIO 25 sob o ponto de vista da formação de xilitol ao longo do tempo através da FIGURA B.25 do ANEXO B, observa-se claramente a ocorrência de re-assimilação de xilitol, pois no final da fermentação, quando a concentração de xilose já estava muito baixa, ocorreu uma queda na concentração de xilitol, indicando que o microrganismo passou a utilizar xilitol à medida em que a xilose se tornou menos disponível. Observando as outras figuras presentes no ANEXO B, constata-se que a re-assimilação de xilitol ocorre em 8 ensaios realizados sob diferentes condições experimentais (FIGURAS B.1, B.6, B.8, B.13, B.22, B.23, B.25 e B.26), o que corresponde a quase 30 % do total de ensaios realizados.

A importância de se evitar a ocorrência de re-assimilação é vital, pois ela implica em perdas de rendimento e produtividade do processo. A solução mais imediata para o problema poderia ser a interrupção da fermentação justamente quando a concentração de xilitol atingisse o máximo e antes que começasse a ser re-assimilado. Entretanto, a presença da xilose que não foi consumida pelo microrganismo acarretaria dificuldades nas etapas posteriores para a eliminação desta xilose residual e obtenção do xilitol como

Uma outra alternativa seria identificar as condições de cultivo que não favoreçam a re-assimilação, como às correspondentes à FIGURA B.5 do ANEXO B. No entanto, como no ENSAIO 5 (TABE-

LA 4.4) o rendimento foi de 0,62 g/g e a produtividade foi de apenas 0,43 g/lh, verifica-se a necessidade de adotar uma estratégia de compromisso para minimizar a ocorrência da re-assimilação, que não afete muito os valores de rendimento e produtividade nem acrescente custos às etapas de separação e purificação.

Levando em consideração todos os aspectos discutidos anteriormente, pode-se afirmar que as condições experimentais do ENSAIO 25 são as mais favoráveis ao processo de produção de xilitol, pois promovem a formação do produto com alta concentração, bom rendimento e excelente produtividade, pelo menos duas vezes maior do que qualquer outra obtida nos ensaios relacionados na TABELA 4.4. Por isso, os resultados do ENSAIO 25 foram escolhidos para servirem como parâmetros de comparação entre este trabalho e aqueles da TABELA 2.4, que apresentaram os melhores resultados (FIGURA 4.3) e também para ilustrarem a evolução no desempenho da fermentação de xilose a xilitol desde a etapa de Ensaios Preliminares até a conclusão de todos os ensaios previstos pelo Planejamento Experimental (FIGURA 4.2).

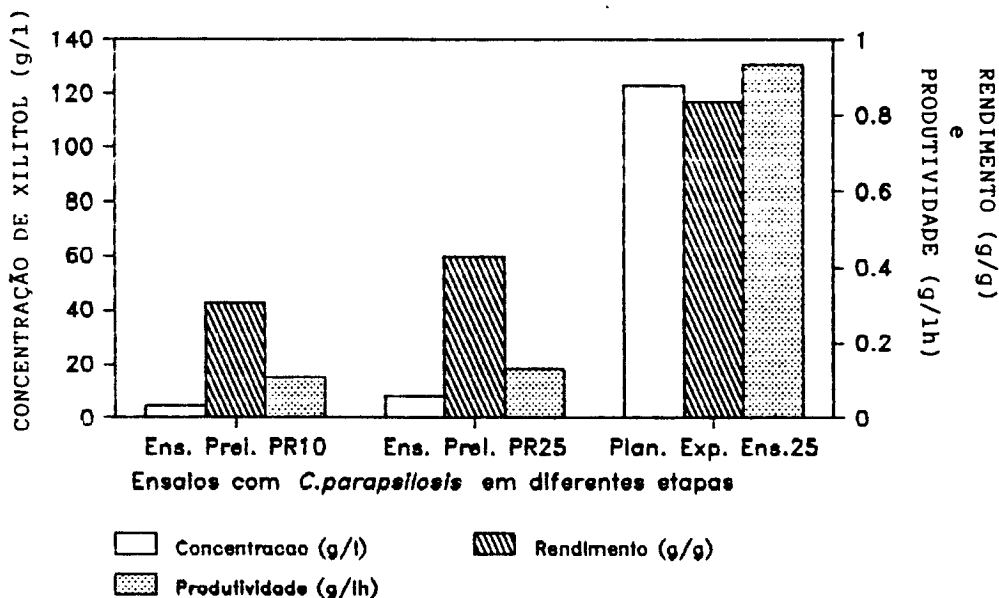


FIGURA 4.2 - Evolução no desempenho *C. parapsilosis* IZ 1710 em relação a fermentação de xilose a xilitol.

A FIGURA 4.2, representando a evolução nos valores de concentração, rendimento e produtividade de xilitol à medida que condições experimentais mais adequadas foram sendo desenvolvidas, comprova que alterações nas condições de cultivo, desde que acompanhadas por um planejamento cuidadoso, são recursos eficientes para aprimorar um processo fermentativo e podem às vezes dispensar outros estudos mais complexos, envolvendo mutação genética ou a adição de substâncias para estimular a formação de um determinado produto.

Além disso, se o método tradicional de estudo de processos fermentativos, consistindo em análises individuais da influência de cada variável no rendimento e na produtividade, tivesse sido adotado, um número muito maior de ensaios teria sido empregado e mesmo assim, a possibilidade de serem descobertas as condições experimentais que levariam aos altos valores de rendimento e produtividade encontrados, seria determinada praticamente pelo acaso.

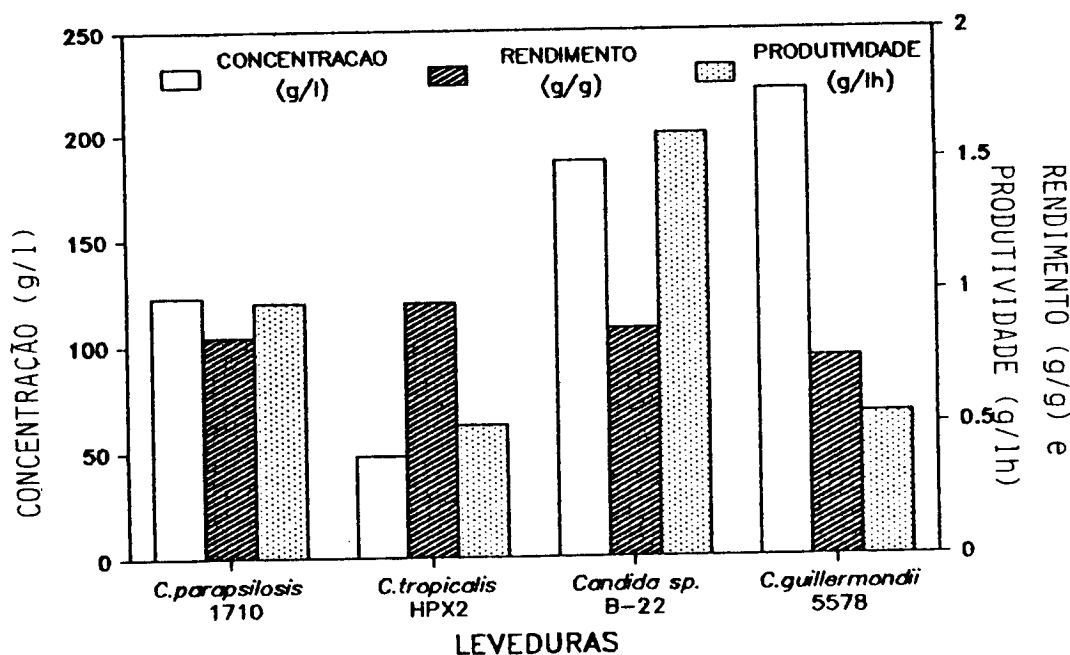


FIGURA 4.3 - Comparação entre a produção de xilitol por *C. parapsilosis* IZ 1710 e os resultados obtidos com *C. tropicalis* HPX2, *Candida sp.* B-22 e *C. guillermondii* 5578, extraídos da TABELA 2.4.

Através da FIGURA 4.3, os parâmetros fermentativos obtidos neste trabalho (ENSAIO 25) podem ser comparados com os obtidos por diferentes microrganismos bons produtores de xilitol, extraídos da TABELA 2.4. O rendimento obtido no ENSAIO 25 é comparável aos obtidos pelo mutante HPX2 de *C. tropicalis* e por *Candida* sp. B-22, sendo superior ao obtido por *C. guilliermondii*. Já para a produtividade de xilitol, é visível a superioridade do valor obtido no ENSAIO 25 em relação ao mutante HPX2 e a *C. guilliermondii*, mas este valor ainda permanece muito abaixo do obtido por *Candida* sp. B-22. Convém ressaltar, entretanto, que de acordo com os dados da TABELA 2.4, o cultivo de *Candida* sp B-22 iniciou-se com uma concentração de células pelo menos 10 vezes superior à normalmente usada nas outras referências e isto poderia ser uma justificativa para tão alto valor de produtividade.

Os excelentes resultados obtidos sob as condições experimentais do ENSAIO 25 podem ainda se tornarem melhores após a modelagem das respostas obtidas como uma função das variáveis do processo, seguida pela definição das condições ótimas e construção das superfícies de resposta.

#### 4.2.2 - Aplicação do Método de Análise por Superfície de Resposta : Modelagem Empírica, Refinamento dos Modelos e Construção das Superfícies de Resposta

##### a) Modelagem Empírica

A matriz de entrada contendo as condições experimentais na forma de variáveis codificadas e as respostas escolhidas, rendimento de xilitol ( $Y_1$ ) e produtividade em xilitol ( $Y_2$ ), está representada na TABELA 4.5.

O primeiro passo para iniciar a otimização foi introduzir os dados relativos aos ENSAIOS 1 a 19 (planejamento fatorial inicial) da TABELA 4.5 no programa TREND para efetuar a primeira regressão multilinear.

Foram obtidos os modelos de 1ª ordem para o rendimento e a produtividade que estão descritos abaixo, acompanhados pelo erro experimental associado a cada parâmetro (entre parênteses).

### CORRELAÇÃO 1.1

$$Y_1^* = 0,5163 + 0,0906X_1 - 0,0107X_2 - 0,0033X_3 - 0,0354X_4$$

(±0,0147)
(±0,0160)
(±0,0160)
(±0,0160)
(±0,0160)

Parâmetros Estatísticos  
para Avaliação do Ajuste

Teste F(4,14) = 2,2472

Coefficiente de Correlação = 0,6253

Valor tabelado de F	Nível de Confiança
F(4,14)=2,39	90 %

### CORRELAÇÃO 2.1

$$Y_2^* = 0,3018 + 0,0550X_1 - 0,0228X_2 + 0,0741X_3 + 0,0265X_4$$

(±0,0129)
(±0,0140)
(±0,0140)
(±0,0140)
(±0,0140)

Parâmetros Estatísticos  
para Avaliação do Ajuste

Teste F(4,14) = 1,4055

Coefficiente de Correlação = 0,5353

Valor tabelado de F	Nível de Confiança
F(4,14)=1,52	75 %

*Observação:* O cálculo do erro experimental correspondente a cada parâmetro está detalhado no ANEXO D e no ANEXO E, estão as cópias das listagens contendo os valores dos coeficientes do modelo e dos parâmetros estatísticos relacionados anteriormente.

A comparação dos valores de F estimados com os valores tabelados<sup>(15)</sup>, mostra que os modelos de 1ª ordem obtidos para o rendimento e a produtividade não são estatisticamente significativos, pois os níveis de confiança da CORRELAÇÃO 1.1 e da CORRELAÇÃO 2.1 são relativamente baixos. Além disso, os valores estimados para o coeficiente de correlação são muito diferentes de 1, em ambos os casos.

TABELA 4.5 - Matriz do Planejamento Experimental

VARIÁVEIS CODIFICADAS					RESULTADOS	
ENSAIO	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$Y_1$ (g/g)	$Y_2$ (g/lh)
1	-1,0	-1,0	-1,0	-1,0	0,531	0,247
2	+1,0	-1,0	-1,0	-1,0	0,429	0,047
3	-1,0	+1,0	-1,0	-1,0	0,559	0,241
4	+1,0	+1,0	-1,0	-1,0	0,710	0,178
5	-1,0	-1,0	+1,0	-1,0	0,624	0,434
6	+1,0	-1,0	+1,0	-1,0	0,564	0,261
7	-1,0	+1,0	+1,0	-1,0	0,251	0,075
8	+1,0	+1,0	+1,0	-1,0	0,781	0,491
9	-1,0	-1,0	-1,0	+1,0	0,370	0,154
10	+1,0	-1,0	-1,0	+1,0	0,567	0,309
11	-1,0	+1,0	-1,0	+1,0	0,377	0,122
12	+1,0	+1,0	-1,0	+1,0	0,586	0,295
13	-1,0	-1,0	+1,0	+1,0	0,497	0,454
14	+1,0	-1,0	+1,0	+1,0	0,606	0,462
15	-1,0	+1,0	+1,0	+1,0	0,169	0,019
16	+1,0	+1,0	+1,0	+1,0	0,647	0,583
17	0,0	0,0	0,0	0,0	0,602	0,517
18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,407	0,342
19	0,0	0,0	0,0	0,0	0,596	0,503
20	-1,6	0,0	0,0	0,0	0,376	0,103
21	+1,6	0,0	0,0	0,0	0,871	0,111
22	0,0	-1,6	0,0	0,0	0,726	0,322
23	0,0	+1,6	0,0	0,0	0,714	0,485
24	0,0	0,0	-1,6	0,0	0,644	0,419
25	0,0	0,0	+1,6	0,0	0,839	0,936
26	0,0	0,0	0,0	-1,6	0,863	0,495
27	0,0	0,0	0,0	+1,6	0,387	0,246
28	0,0	0,0	0,0	0,0	0,719	0,511
29	0,0	0,0	0,0	0,0	0,717	0,523

$x_1$  - temperatura (forma codificada)

$x_2$  - pH inicial (forma codificada)

$x_3$  - concentração inicial de xilose (forma codificada)

$x_4$  - velocidade de agitação (forma codificada)

$Y_1$  - rendimento

$Y_2$  - produtividade



Isto significa que a região submetida à investigação experimental se encontra próxima da região de curvatura da superfície, que só pode ser representada por um modelo de ordem maior que 1.

Para que um modelo de 2ª ordem pudesse ser ajustado através de uma regressão não linear, o planejamento fatorial inicial foi complementado com os ensaios correspondentes ao planejamento composto central (ENSAIOS 20 a 27) e com mais uma duplicata no ponto central (ENSAIOS 28 e 29). A matriz completa do planejamento experimental representada na TABELA 4.5 foi então introduzida no programa TREND, resultando nos modelos de 2ª ordem para o rendimento e a produtividade, que estão descritos abaixo, acompanhados pelo erro experimental associado a cada parâmetro (entre parênteses).

#### CORRELAÇÃO 1.2

$$\begin{aligned}
 Y_1^* = & 0,6612 + 0,1061X_1 - \underline{0,0090X_2} + \underline{0,0123X_3} + 0,0629X_4 \\
 & (\pm 0,0332) \quad (\pm 0,0175) \quad (\pm \underline{0,0175}) \quad (\pm \underline{0,0175}) \quad (\pm 0,0175) \\
 & - 0,0508X_1^2 - \underline{0,0131X_2^2} - \underline{0,0047X_3^2} - 0,0502X_4^2 + 0,0726X_1X_2 \\
 & (\pm 0,0218) \quad (\pm \underline{0,0218}) \quad (\pm \underline{0,0128}) \quad (\pm 0,0218) \quad (\pm 0,0201) \\
 & + 0,0337X_1X_3 + 0,0336X_1X_4 - 0,0526X_2X_3 - 0,0219X_2X_4 + \underline{0,0057X_3X_4} \\
 & (\pm 0,0201) \quad (\pm 0,0201) \quad (\pm 0,0201) \quad (\pm 0,0201) \quad (\pm \underline{0,0201})
 \end{aligned}$$

Parâmetros Estatísticos  
para Avaliação do Ajuste

Teste F(14,14) = 2,0399

Coef. de Correlação = 0,8192

Valor tabe- lado de F	Nível de Confiança
F(15,14)=2,01	90 %

#### CORRELAÇÃO 2.2

$$\begin{aligned}
 Y_2^* = & 0,4964 + 0,0423X_1 - \underline{0,0049X_2} + 0,0953X_3 + \underline{0,0012X_4} \\
 & (\pm 0,0201) \quad (\pm 0,0106) \quad (\pm \underline{0,0106}) \quad (\pm 0,0106) \quad (\pm \underline{0,0106}) \\
 & - 0,1638X_1^2 - 0,0480X_2^2 + 0,0590X_3^2 - 0,0609X_4^2 + 0,0812X_1X_2 \\
 & (\pm 0,0132) \quad (\pm 0,0132) \quad (\pm 0,0132) \quad (\pm 0,0132) \quad (\pm 0,0122) \\
 & + 0,0469X_1X_3 + 0,0575X_1X_4 - 0,0326X_2X_3 - 0,0223X_2X_4 + \underline{0,0056X_3X_4} \\
 & (\pm 0,0122) \quad (\pm 0,0122) \quad (\pm 0,0122) \quad (\pm 0,0122) \quad (\pm \underline{0,0122})
 \end{aligned}$$

Parâmetros Estatísticos  
para Avaliação do Ajuste

Teste  $F(14,14) = 4,6537$

Coef. de Correlação = 0,9073

Valor tabe- lado de F	Nível de Confiança
$F(15,14)=3,66$	99 %

*Observação:* O cálculo do erro experimental correspondente a cada parâmetro está detalhado no ANEXO D e no ANEXO E, estão as cópias das listagens contendo os valores dos coeficientes do modelo e dos parâmetros estatísticos relacionados anteriormente.

Analisando os valores obtidos para os critérios estatísticos de ajuste dos modelos de 2<sup>a</sup> ordem propostos, verifica-se que a CORRELAÇÃO 2.2, ajustada aos valores experimentais de produtividade, pode ser considerada bastante significativa, pois apresentou um nível de confiança de 99 %. Já o modelo ajustado aos dados de rendimento (CORRELAÇÃO 1.2), apresentou nível de confiança de apenas 90 %. Entretanto, como o valor do coeficiente de correlação está bem próximo da unidade, a CORRELAÇÃO 1.2 pode ser considerada adequada.

b) Refinamento dos Modelos

Para tornar possível a representação da CORRELAÇÃO 1.2 e da CORRELAÇÃO 2.2 na forma de superfícies de resposta ou de linhas de contorno, é recomendável o refinamento destas expressões, de modo que apenas os parâmetros mais importantes permaneçam.

Um critério para eliminar os parâmetros menos significativos consiste na comparação do valor do coeficiente de um determinado parâmetro com o valor do erro padrão associado ao mesmo. Se o valor deste erro for maior ou aproximadamente igual ao valor do coeficiente do parâmetro, então este parâmetro não é significativo e pode ser desprezado.

A adoção deste critério, permitiu a eliminação de 5 termos da CORRELAÇÃO 1.2 (os termos sublinhados  $X_2$ ,  $X_3$ ,  $X_2^2$ ,  $X_3^2$  e  $X_3X_4$ ) e de 3 termos da CORRELAÇÃO 2.2 (os termos sublinhados  $X_2$ ,  $X_4$  e  $X_3X_4$ ).

Para obter os modelos refinados, através da exclusão dos termos eliminados anteriormente do novo ajuste, recorreu-se ao pacote estatístico STATGRAPHICS. Assim, fazendo uma nova regressão não linear após a eliminação dos parâmetros não significativos, foram correlacionados os seguintes modelos de 2ª ordem (o erro de regressão estimado para cada parâmetro está entre parênteses):

### CORRELAÇÃO 1.3

$$\begin{aligned}
 Y_1^* = & 0,6502 + 0,1090X_1 - 0,0658X_4 - 0,0506X_1^2 - 0,0500X_4^2 \\
 & (\pm 0,0406) \quad (\pm 0,0268) \quad (\pm 0,0268) \quad (\pm 0,0333) \quad (\pm 0,0333) \\
 & + 0,0764X_1X_2 + 0,0375X_1X_3 + \underline{0,0296X_1X_4} - 0,0487X_2X_3 \\
 & \quad (\pm 0,0308) \quad (\pm 0,0308) \quad (\pm \underline{0,0308}) \quad (\pm 0,0308) \\
 & - \underline{0,0258X_2X_4} \\
 & \quad (\pm \underline{0,0308})
 \end{aligned}$$

Parâmetros Estatísticos  
para Avaliação do Ajuste

Teste F( 9,19) = 4,3482

Coef. de Correlação = 0,6732

Valor tabelado de F	Nível de Confiança
F( 9,19)=3,52	99 %

### CORRELAÇÃO 2.3

$$\begin{aligned}
 Y_2^* = & 0,4964 + 0,0423X_1 + 0,0953X_3 - 0,1638X_1^2 - 0,0480X_2^2 \\
 & (\pm 0,0455) \quad (\pm 0,0239) \quad (\pm 0,0239) \quad (\pm 0,0298) \quad (\pm 0,0298) \\
 & + 0,0591X_3^2 - 0,0608X_4^2 + 0,0812X_1X_2 + 0,0469X_1X_3 \\
 & \quad (\pm 0,0298) \quad (\pm 0,0298) \quad (\pm 0,0275) \quad (\pm 0,0275) \\
 & + 0,0575X_1X_4 - \underline{0,0326X_2X_3} - \underline{0,0222X_2X_4} \\
 & \quad (\pm 0,0275) \quad (\pm \underline{0,0275}) \quad (\pm \underline{0,0275})
 \end{aligned}$$

Parâmetros Estatísticos  
para Avaliação do Ajuste

Teste F(11,17) = 7,1479

Coef. de Correlação = 0,8222

Valor tabe- lado de F	Nível de Confiança
F(12,17)=5,32	99,9 %

Observação: No ANEXO E, estão as cópias das listagens con-  
tendo os valores dos coeficientes, os erros de regressão estimados  
para cada coeficiente e os parâmetros estatísticos relacionados  
anteriormente.

Assim, após a eliminação dos termos sublinhados na  
CORRELAÇÃO 1.3 e na CORRELAÇÃO 2.3, nova regressão foi efetuada  
para obter as correlações definitivas, nestas o rendimento e a  
produtividade aparecem como função apenas dos parâmetros mais  
significativos (erro de regressão entre parênteses).

#### CORRELAÇÃO 1.4

$$\begin{aligned}
 Y_1^* = & 0,6499 + 0,1090X_1 - 0,0658X_4 - 0,0504X_1^2 - 0,0498X_4^2 \\
 & (\pm 0,0407) \quad (\pm 0,0269) \quad (\pm 0,0269) \quad (\pm 0,0334) \quad (\pm 0,0334) \\
 & + 0,0765X_1X_2 - 0,0487X_2X_3 \\
 & (\pm 0,0309) \quad (\pm 0,0309)
 \end{aligned}$$

Parâmetros Estatísticos  
para Avaliação do Ajuste

Teste F(6,22) = 5,9685

Coef. de Correlação = 0,6195

Valor tabe- lado de F	Nível de Confiança
F( 6,22)=5,76	99,9 %

## CORRELAÇÃO 2.4

$$\begin{aligned}
Y_2^* = & 0,4964 + 0,0423X_1 + 0,0953X_3 - 0,1638X_1^2 - 0,0480X_2^2 \\
& (\pm 0,0455) \quad (\pm 0,0240) \quad (\pm 0,0240) \quad (\pm 0,0298) \quad (\pm 0,0298) \\
& + 0,0591X_3^2 - 0,0608X_4^2 + 0,0812X_1X_2 + 0,00469X_1X_3 \\
& (\pm 0,0298) \quad (\pm 0,0298) \quad (\pm 0,0276) \quad (\pm 0,0276) \\
& + 0,0575X_1X_4 \\
& (\pm 0,0276)
\end{aligned}$$

Parâmetros Estatísticos  
para Avaliação do Ajuste

Teste F(9,19) = 8,4808

Coef. de Correlação = 0,8007

Valor tabelado de F	Nível de Confiança
F( 9,19)=5,39	99,9 %

*Observação:* No ANEXO E, estão as cópias das listagens contendo os valores dos coeficientes, os erros de regressão estimados para cada coeficiente e os parâmetros estatísticos relacionados anteriormente.

Os modelos definitivos obtidos após o refinamento (CORRELAÇÃO 1.4 e CORRELAÇÃO 2.4), apresentaram níveis de confiança de 99,9 %. Portanto, pode-se garantir que os modelos propostos são estatisticamente bastante representativos. Como os valores obtidos para o coeficiente de correlação para as duas correlações estão próximos da unidade, conclui-se que estas expressões representam bem a variação observada no rendimento e na produtividade em função das variáveis estudadas.

Todas as correlações anteriores representavam a variação das respostas como função das variáveis codificadas. Para obter quaisquer destas expressões como função das variáveis reais, basta substituir as variáveis codificadas por:

$$X_1 = \frac{T - 30}{5} ; X_2 = \text{pH}_0 - 6,0 ; X_3 = \frac{S_0 - 80}{40} \quad \text{e} \quad X_4 = \frac{N - 150}{50}$$

Escolhendo os modelos definitivos, CORRELAÇÃO 1.4 e CORRELAÇÃO 2.4, e substituindo as expressões acima nas mesmas, são obtidas respectivamente a CORRELAÇÃO 1.5 e a CORRELAÇÃO 2.5, representando a variação das respostas (rendimento e produtividade) como função direta das variáveis reais.

#### CORRELAÇÃO 1.5

$$Y_1^* = - 0,0378 + 0,0531T - 0,34pH_0 + 0,0083S_0 + 0,0048N - 0,002036T^2 - 0,00002012N^2 + 0,015T.pH_0 - 0,001375pH_0S_0$$

#### CORRELAÇÃO 2.5

$$Y_2^* = - 3,3633 + 0,2508T + 0,0888pH_0 - 0,01055S_0 + 0,000408N - 0,006552T^2 - 0,048pH_0^2 + 0,000036875S_0^2 - 0,00002436N^2 + 0,01624T.pH + 0,0002345T.S + 0,00023T.N$$

c) Determinação das condições ótimas para a produção de xilitol e construção dos gráficos de superfície de resposta e linhas de contorno

Uma vez que só é possível representar cada uma das respostas em função de apenas 2 variáveis em gráficos como o de superfície de resposta ou o de linhas de contorno, precisa-se atribuir valores constantes para as outras 2 variáveis restantes. No entanto, já que se deseja reproduzir através destas figuras o comportamento do sistema em estudo nas vizinhanças da região de resposta máxima, os valores a serem atribuídos a estas variáveis devem ser os determinados para a condição ótima de operação do sistema.

Uma técnica algébrica para determinar os valores ótimos das variáveis que tornam máxima uma função, consiste em igualar a zero as derivadas parciais desta função.

A aplicação desta técnica para encontrar as condições fermentativas ótimas para que o rendimento e a produtividade sejam otimizados será discutida a seguir.

# I) RENDIMENTO

Aplicando a técnica acima à CORRELAÇÃO 1.4 :

$$\begin{aligned} \frac{\delta Y_1^*}{\delta X_1} &= 0,1090 - 0,1080X_1 + 0,0765X_2 &= 0 \\ \frac{\delta Y_1^*}{\delta X_2} &= + 0,0765X_1 - 0,0487X_3 &= 0 \\ \frac{\delta Y_1^*}{\delta X_3} &= - 0,0487X_2 &= 0 \\ \frac{\delta Y_1^*}{\delta X_4} &= - 0,0658 - 0,0996X_4 &= 0 \end{aligned}$$

Resolvendo o sistema acima formado por 4 equações e 4 incógnitas, tem-se:

$$\begin{aligned} X_1 &= 1,009 \left[ \frac{\delta^2 Y_1^*}{\delta X_1^2} < 0 \longrightarrow \text{ponto de} \right. \\ & \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{máximo} \\ & \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{local} \left. \right] \\ X_2 &= 0,000 \left[ \frac{\delta^2 Y_1^*}{\delta X_2^2} = 0 \longrightarrow \text{ponto de} \right. \\ & \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{inflexão} \left. \right] \\ X_3 &= 1,585 \left[ \frac{\delta^2 Y_1^*}{\delta X_3^2} = 0 \longrightarrow \text{ponto de} \right. \\ & \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{inflexão} \left. \right] \\ X_4 &= -0,661 \left[ \frac{\delta^2 Y_1^*}{\delta X_4^2} < 0 \longrightarrow \text{Ponto de} \right. \\ & \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{máximo} \\ & \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \qquad \text{local} \left. \right] \end{aligned}$$

A resolução do sistema acima e a análise da segunda derivada revelou a existência de pontos de inflexão da função em relação a  $X_2$  e  $X_3$ . Portanto, é importante conhecer como a função se comporta nas regiões vizinhas a estes pontos de inflexão para poder definir os valores ótimos de  $X_2$  e  $X_3$ .

Para tanto, foram construídas as FIGURAS 4.4 a, b, c, d, e, mostrando a variação de  $Y_1^* = f(X_2, X_3)$  ao se atribuir diferentes valores para  $X_1$  e  $X_4$  na CORRELAÇÃO 1.4, representando as seguintes funções:

FIGURA	$X_1$	$X_4$	$Y_1^* = f(X_2, X_3)$
4.1a	-1	+1	$0,3749 - 0,0765X_2 - 0,0487X_2X_3$
4.1b	+1	+1	$0,5929 + 0,0765X_2 - 0,0487X_2X_3$
4.1c	-1	-1	$0,6046 - 0,0765X_2 - 0,0487X_2X_3$
4.1d	+1	-1	$0,7245 + 0,0765X_2 - 0,0487X_2X_3$
4.1e	0	0	$- 0,0487X_2X_3$

Verifica-se, através da FIGURAS 4.4a à FIGURA 4.4e, que independentemente dos valores de  $X_1$  e  $X_4$  atribuídos, sempre é possível identificar duas regiões de maximização da resposta  $Y_1^*$  :

-Região  $\alpha$  : localizada na extremidade correspondente a valores positivos de  $X_2$  (equivalentes a altos valores de pH inicial) e negativos de  $X_3$  (equivalentes a baixos valores de concentração inicial de substrato).

- Região  $\beta$  : localizada no extremo oposto, caracterizado por valores negativos de  $X_2$  (baixos valores de pH inicial) e valores positivos de  $X_3$  (altos valores de concentração inicial de xilose).

Percebe-se que o valor do rendimento aumenta continuamente a medida que se caminha para posições mais afastadas nestas duas regiões extremas, concluindo-se portanto, ser impossível estabelecer limites matemáticos para  $X_2$  e  $X_3$ . Estas variáveis devem ser limitadas por critérios de viabilidade física do sistema em estudo e então, consideradas estas restrições, precisam ser determinados novos valores ótimos para as variáveis  $X_1$  e  $X_4$  restantes.



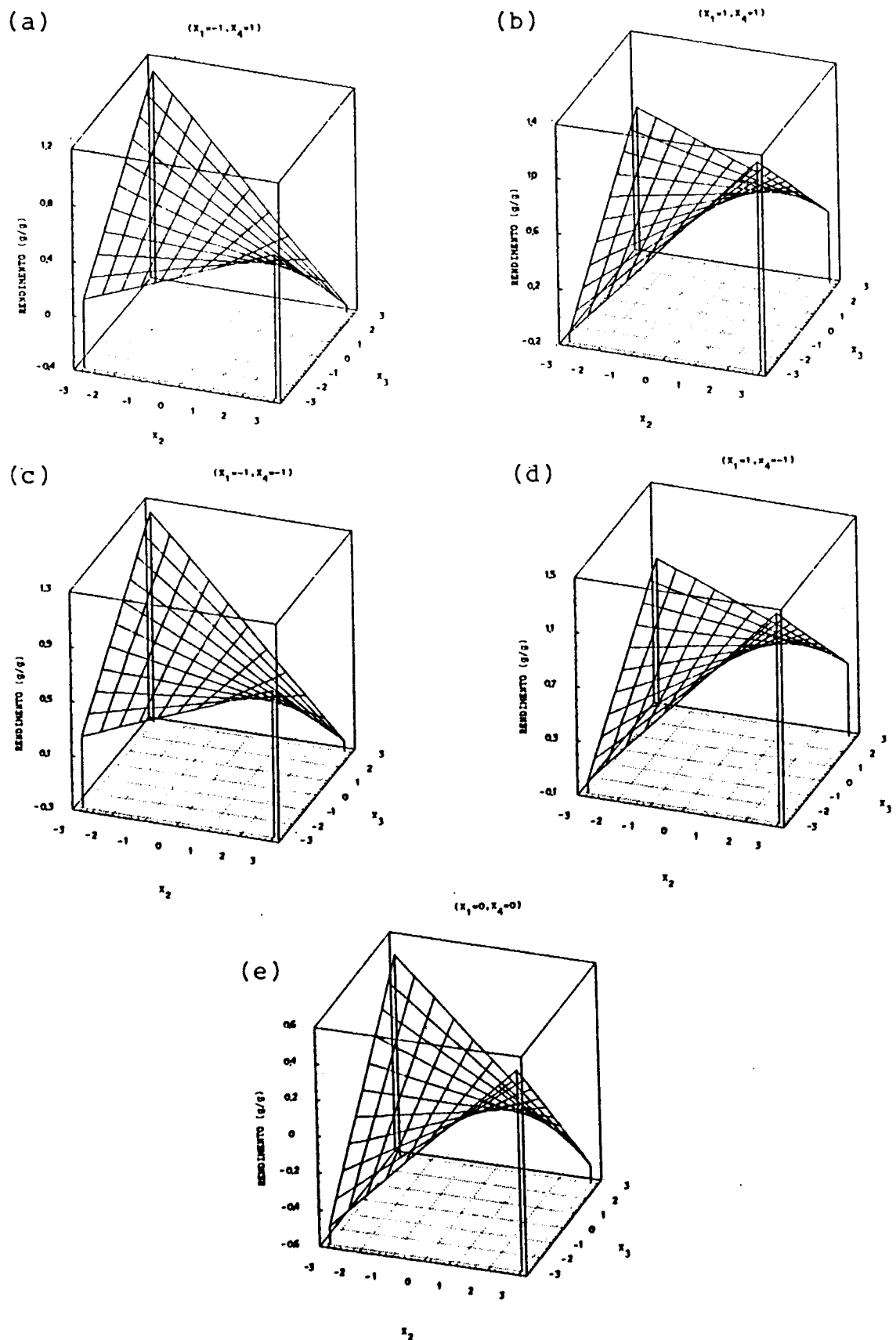


FIGURA 4.4 - Comportamento da função  $Y_1 = f(X_2, X_3)$  quando são atribuídos diferentes valores para as variáveis  $X_1$  e  $X_4$ .

Escolhendo como limites físicos, os menores e maiores valores de  $pH_0$  ( $X_2$ ) e  $S_0$  ( $X_3$ ) examinados experimentalmente, foram definidas as seguintes condições restritivas:

$$\longrightarrow pH_0 = 4,4 \quad (X_2 = -1,6) \quad \text{e} \quad S_0 = 144 \text{ g/l} \quad (X_3 = 1,6)$$

Substituindo na CORRELAÇÃO 1.5,

#### CORRELAÇÃO 1.6

$$Y_1^* = -1,2098 + 0,1191T + 0,0048N - 0,002036T^2 - 0,00002012N^2$$

Derivando e igualando a zero para determinar os valores ótimos de temperatura e velocidade de agitação,

$$\frac{\delta Y_1^*}{\delta T} = 0,1191 - 0,004072T = 0 \longrightarrow T = 29,2 \text{ } ^\circ\text{C} \quad \left[ \frac{\delta^2 Y_1^*}{\delta T} < 0 \longrightarrow \text{ponto de máximo local} \right]$$

$$\frac{\delta Y_1^*}{\delta N} = 0,0048 - 0,004024N = 0 \longrightarrow N = 119 \text{ rpm} \quad \left[ \frac{\delta^2 Y_1^*}{\delta N} < 0 \longrightarrow \text{ponto de máximo local} \right]$$

Nestas condições, o rendimento máximo estimado pela CORRELAÇÃO 1.5 é de 0,818 g/g.

$$\longrightarrow pH_0 = 7,6 \quad (X_2 = +1,6) \quad \text{e} \quad S_0 = 16 \text{ g/l} \quad (X_3 = -1,6)$$

Substituindo na CORRELAÇÃO 1.5,

#### CORRELAÇÃO 1.7

$$Y_1 = -2,6562 + 0,1671T + 0,0048N - 0,002036T^2 - 0,00002012N^2$$

Derivando e igualando a zero para determinar os valores ótimos de temperatura e velocidade de agitação,

$$\frac{\delta Y_1^*}{\delta T} = 0,1671 - 0,004072T = 0 \rightarrow \boxed{T = 41,4 \text{ } ^\circ\text{C}} \quad \left[ \frac{\delta^2 Y_1^*}{\delta T} < 0 \rightarrow \text{ponto de m\u00e1ximo local} \right]$$

$$\frac{\delta Y_1^*}{\delta N} = 0,0048 - 0,004024N = 0 \rightarrow \boxed{N = 119 \text{ rpm}} \quad \left[ \frac{\delta^2 Y_1^*}{\delta N} < 0 \rightarrow \text{ponto de m\u00e1ximo local} \right]$$

Nestas condi\u00e7\u00f5es, o rendimento m\u00e1ximo estimado pela CORRELA\u00c7\u00c3O 1.5 \u00e9 1,058 g/g.

A regi\u00e3o  $\alpha$ , onde matematicamente podem ocorrer altos valores de rendimento, apresentou como valor \u00f3timo de temperatura 41,4  $^\circ\text{C}$  para as condi\u00e7\u00f5es restritivas correspondentes a pH inicial de 7,6 e concentra\u00e7\u00e3o inicial de substrato de 16 g/l. Esta regi\u00e3o \u00e9 altamente invi\u00e1vel do ponto de vista experimental por exigir condi\u00e7\u00f5es bastante adversas para o crescimento e manuten\u00e7\u00e3o de c\u00e9lulas de leveduras como altas temperaturas e altos valores de pH inicial. Al\u00e9m disso, se a concentra\u00e7\u00e3o inicial de substrato for baixa, baixas concentra\u00e7\u00f5es de produto ser\u00e3o atingidas no final da fermenta\u00e7\u00e3o, o que n\u00e3o \u00e9 interessante para o processo do ponto de vista pr\u00e1tico e econ\u00f4mico.

Por outro lado, antes de se decidir pela inviabilidade da regi\u00e3o  $\alpha$ ., deve-se considerar que o rendimento m\u00e1ximo estimado para esta regi\u00e3o nas condi\u00e7\u00f5es da CORRELA\u00c7\u00c3O 1.7 foi 20 % superior ao valor m\u00e1ximo estimado para a regi\u00e3o  $\beta$  nas condi\u00e7\u00f5es da CORRELA\u00c7\u00c3O 1.6. \u00c9 aconselh\u00e1vel, portanto, averiguar se o valor do rendimento para a regi\u00e3o  $\alpha$ , em condi\u00e7\u00f5es diferentes das \u00f3timas e mais vi\u00e1veis para processos microbiol\u00f3gicos, n\u00e3o permanece maior que o da regi\u00e3o  $\beta$ . Assim, reavaliando o rendimento atrav\u00e9s da CORRELA\u00c7\u00c3O 1.5 para as seguintes condi\u00e7\u00f5es fermentativas:

temperatura = 35  $^\circ\text{C}$

pH inicial = 7,0

concentra\u00e7\u00e3o inicial de substrato = 100 g/l

velocidade de agita\u00e7\u00e3o = 119 rpm

foi estimado um valor para o rendimento de 0,775 g/g (inferior ao valor de rendimento máximo obtido para a região  $\beta$ ). Um outro problema de se operar o processo em condições próximas às requeridas pela região  $\alpha$  seria o impacto na produtividade. Por exemplo, substituindo as condições acima na CORRELAÇÃO 2.5, a produtividade cairia para 0,43 g/lh.

Após todas estas considerações, decidiu-se desprezar a região  $\alpha$ , e estabelecer como condições ótimas para a maximização do rendimento àquelas determinadas para a região  $\beta$  através da CORRELAÇÃO 1.6, tendo-se como

- condições restritivas:

- pH inicial igual a 4,4

- concentração inicial de xilose igual a 144 g/l

- condições ótimas:

- Temperatura = 29,2 °C

- Velocidade de agitação = 119 rpm

As linhas de contorno e a superfície de resposta correspondentes à CORRELAÇÃO 1.6 estão representadas em FIGURA 4.5a e FIGURA 4.5b, respectivamente.

## II) PRODUTIVIDADE

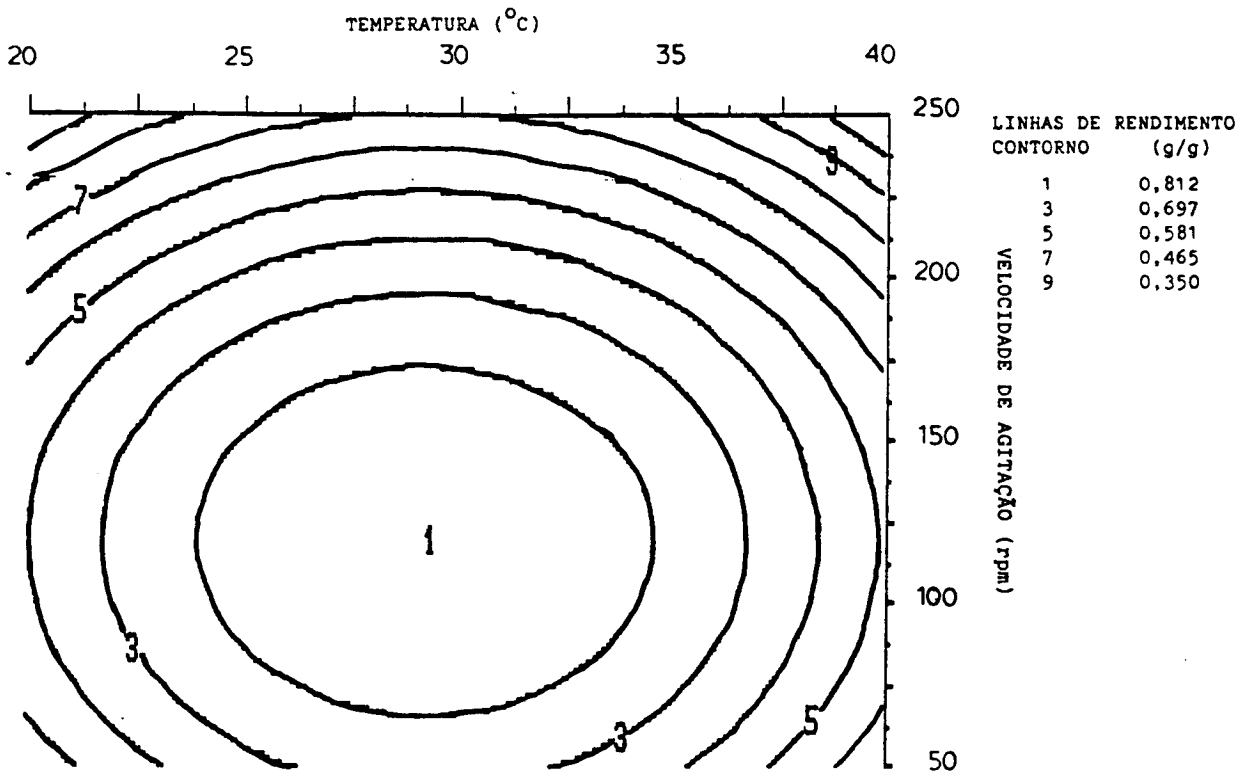
Tomando as derivadas parciais da CORRELAÇÃO 2.5 e igualando a zero, tem-se:

$$\frac{\delta Y_2^*}{\delta T} = 0,251 - 0,01310T + 0,01624pH_0 + 0,0002345S_0 + 0,0002300N = 0$$

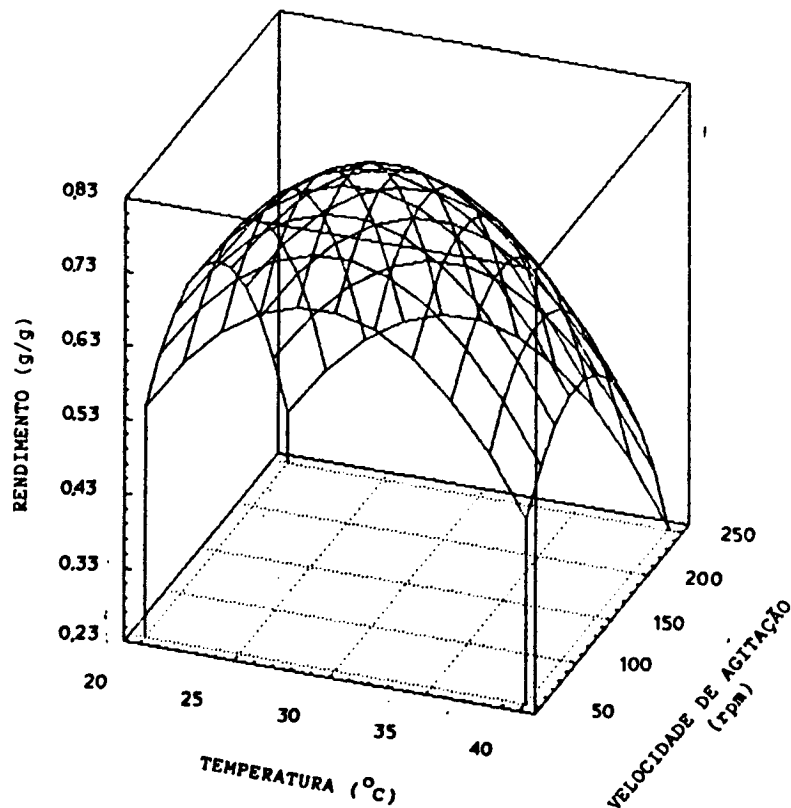
$$\frac{\delta Y_2^*}{\delta pH_0} = 0,089 + 0,01624T - 0,09600pH_0 = 0$$

$$\frac{\delta Y_2^*}{\delta S_0} = -0,0105 + 0,0002345T + 0,00007375S_0 = 0$$

$$\frac{\delta Y_2^*}{\delta N} = 0,000408 + 0,0002300T - 0,00004872N = 0$$



(a)



(b)

FIGURA 4.5 - Linhas de contorno (a) e superfície de resposta (b) representando a variação do rendimento com a temperatura e a velocidade de agitação, para uma concentração inicial de substrato de 144 g/l e um pH inicial de 4,4 (CORRELAÇÃO 1.6).

Resolvendo o sistema de equações acima,

$$T = 30,1 \text{ } ^\circ\text{C} \left[ \frac{\delta^2 Y_2^*}{\delta T^2} < 0 \longrightarrow \begin{array}{l} \text{ponto de} \\ \text{máximo} \\ \text{local} \end{array} \right]$$

$$\text{pH}_o = 6,0 \left[ \frac{\delta^2 Y_2^*}{\delta \text{pH}_o^2} = 0 \longrightarrow \begin{array}{l} \text{ponto de} \\ \text{máximo} \\ \text{local} \end{array} \right]$$

$$S_o = 47 \text{ g/l} \left[ \frac{\delta^2 Y_2^*}{\delta S_o^2} = 0 \longrightarrow \begin{array}{l} \text{ponto de} \\ \text{mínimo} \\ \text{local} \end{array} \right]$$

$$N = 150 \text{ rpm} \left[ \frac{\delta^2 Y_2^*}{\delta N^2} < 0 \longrightarrow \begin{array}{l} \text{ponto de} \\ \text{máximo} \\ \text{local} \end{array} \right]$$

Os resultados mostram que a CORRELAÇÃO 2.5 possui pontos de máximo em relação às variáveis T, pH<sub>o</sub> e N, mas não em relação à variável S<sub>o</sub>, para qual foi determinado um ponto de mínimo. Isto significa que, matematicamente, quanto maior for a concentração inicial de xilose, maior será o valor da produtividade. Portanto, é necessário adotar o mesmo procedimento anteriormente aplicado para o rendimento e estabelecer como limite físico o mais alto valor de concentração de xilose examinado experimentalmente (S<sub>o</sub> = 144 g/l).

Reavaliando a CORRELAÇÃO 2.5 ao substituir esta condição restritiva, tem-se

#### CORRELAÇÃO 2.6

$$Y_2 = - 4,1186 + 0,2846T + 0,08880\text{pH}_o + 0,0004080N - 0,006552T^2 \\ - 0,048\text{pH}_o^2 - 0,00002436N^2 + 0,01624T.\text{pH}_o + 0,0002300T.N$$

Para encontrar as condições ótimas da expressão acima, sob a nova condição de restrição atribuída a  $S_0$ :

$$\frac{\delta Y^*}{\delta T^2} = 0,2846 - 0,01310T + 0,01262pH_0 + 0,0002345S_0 + 0,0002300N = 0$$

$$\frac{\delta Y_2^*}{\delta pH^2} = 0,0888 + 0,01624T - 0,09600pH_0 = 0$$

$$\frac{\delta Y^*}{\delta N^2} = 0,0004080 + 0,0002300T - 0,00004872N = 0$$

Resolvendo este sistema de 3 equações e 3 incógnitas, são determinados os valores de temperatura, o pH inicial e de velocidade de agitação que matematicamente correspondem às condições ideais para maximizar a produtividade. Assim, para

- condição restritiva:

- concentração inicial de xilose igual a 144 g/l

- condições ótimas:

- Temperatura = 32,5 °C

- pH inicial = 6,4

- velocidade de agitação = 162 rpm

Substituindo os valores acima na CORRELAÇÃO 2.6, pode-se estimar um valor máximo previsto para a produtividade em xilitol de 0,828 g/lh.

Para representar a variação da produtividade com a temperatura, o pH inicial e a velocidade de agitação, para uma concentração inicial de xilose de 144 g/l, foram construídas as superfícies de resposta e linhas de contorno correspondentes às seguintes situações:

FIGURA 4.6a  $(pH_0)_{ot} = 6,4$   
e na

FIGURA 4.6b CORRELAÇÃO 2.6

CORRELAÇÃO 2.7

$$Y_2^* = - 5,5164 + 0,3885T + 0,004080N - 0,006552T^2 - 0,00002436N^2 + 0,0002300T.N$$

FIGURA 4.7a	$N_{ot} = 162 \text{ rpm}$	CORRELAÇÃO 2.8
e	na	$Y_2^* = -4,6918 + 0,3219T + 0,08880pH_0$
FIGURA 4.7b	CORRELAÇÃO 2.6	$- 0,006552T^2 - 0,04800pH_0^2$
		$+ 0,01624TpH_0$

#### d) Discussão

##### - Análise dos erros experimentais

Quanto a confiabilidade dos resultados obtidos experimentalmente, pode-se afirmar que um erro experimental da ordem de 10 % para a produtividade e de 13 % para o rendimento pode ser considerado baixo, levando-se em consideração a complexidade do processo fermentativo em estudo e ainda outras limitações experimentais, tais como:

- a realização dos ensaios em frascos submetidos a agitação externa, impossibilitando o controle do pH e da taxa de aeração durante a fermentação;

- a não uniformidade dos tampões de algodão utilizados nos diversos frascos, resultando em diferentes permeabilidades para a transferência de oxigênio e de gás carbônico,

- as pequenas variações na concentração inicial de células inoculadas nos diversos frascos.

- Comparação entre os valores previstos e os valores obtidos experimentalmente

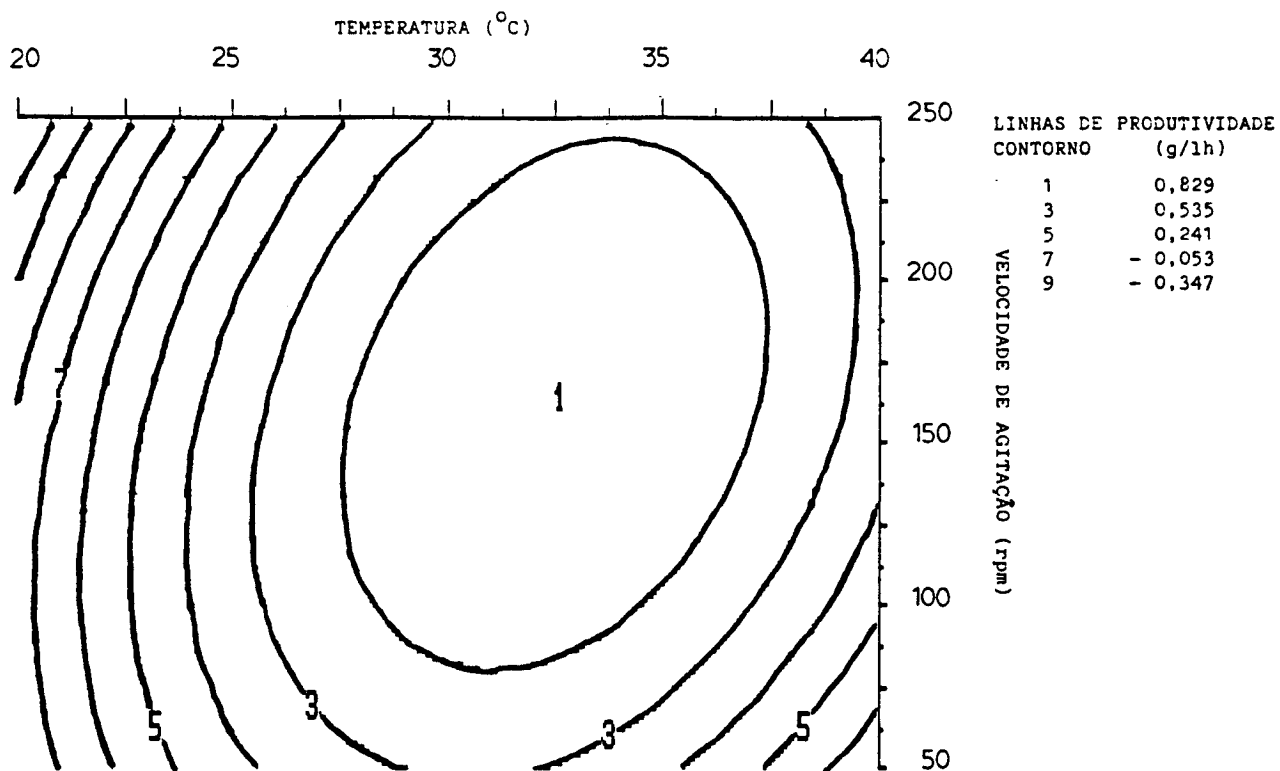


Para facilitar a comparação dos valores máximos de rendimento e produtividade previstos pelas correlações com os valores obtidos experimentalmente, pode-se recorrer à FIGURA 4.8. Nesta figura, os valores de rendimento (FIGURA 4.8a) estimados pelo modelo de 2<sup>a</sup> ordem obtido originalmente (CORRELAÇÃO 1.2), ou pelo modelo de 2<sup>a</sup> ordem obtido após o refinamento (CORRELAÇÃO 1.4), são colocados lado a lado com os melhores valores de rendimento obtidos nos 29 ensaios executados para o planejamento experimental, correspondendo respectivamente aos obtidos no ENSAIO 21, ENSAIO 27 e ENSAIO 25.

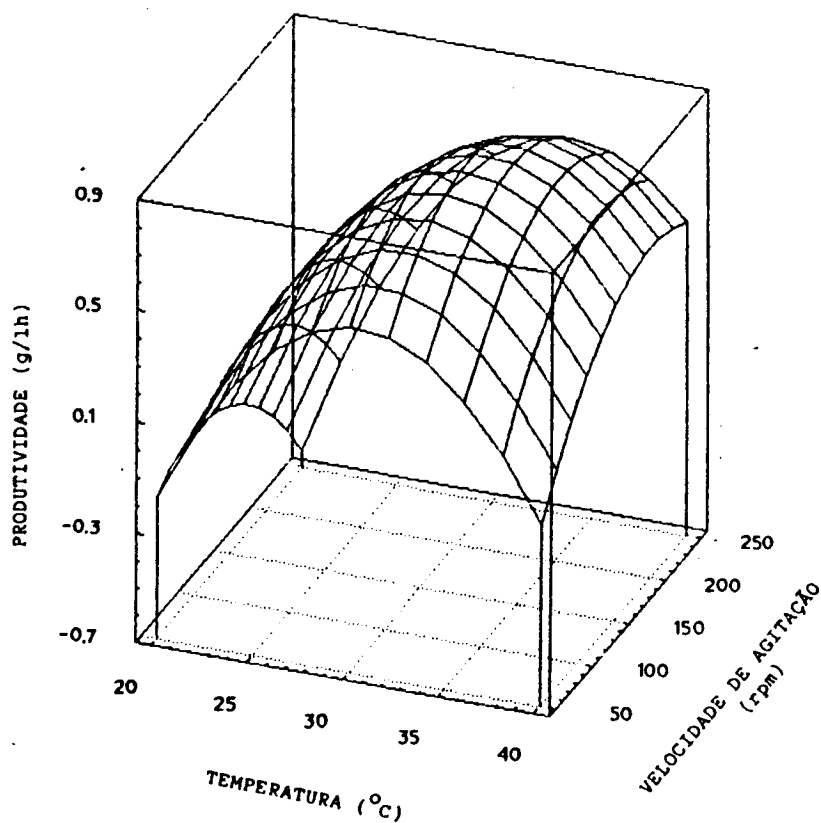
Da mesma forma, através da FIGURA 4.8b, os valores da produtividade estimados pelo modelo de 2<sup>a</sup> ordem obtido originalmente (CORRELAÇÃO 2.2), ou pelo modelo de 2<sup>a</sup> ordem resultante do refinamento (CORRELAÇÃO 2.4), podem ser comparados com o melhor valor de produtividade alcançado experimentalmente no ENSAIO 25.

A análise da FIGURA 4.8, permite constatar que, surpreendentemente, os valores estimados através dos modelos propostos para o rendimento e produtividade são inferiores aos valores experimentais, obtidos em ensaios cujas condições de fermentação diferiam consideravelmente daquelas determinadas como ótimas no item 4.2.2c.

Muitos fatores, como o uso de um modelo refinado para realizar as estimativas, a determinação do erro experimental através de replicatas apenas nas condições do ponto central do planejamento ou a falta de flexibilidade de um modelo de 2<sup>a</sup> ordem para se ajustar a flutuações mais acentuadas da superfície, entre outros, poderiam ter causado esta discrepância. Averiguando cada uma das possibilidades separadamente, já se pode desconsiderar o primeiro fator, visto que na FIGURA 4.8 os valores estimados pela CORRELAÇÃO 1.4 e pela CORRELAÇÃO 2.4 estão mais próximos dos valores experimentais do que aqueles estimados pelas correlações correspondentes aos modelos originais (CORRELAÇÃO 1.2 e CORRELAÇÃO 1.4).

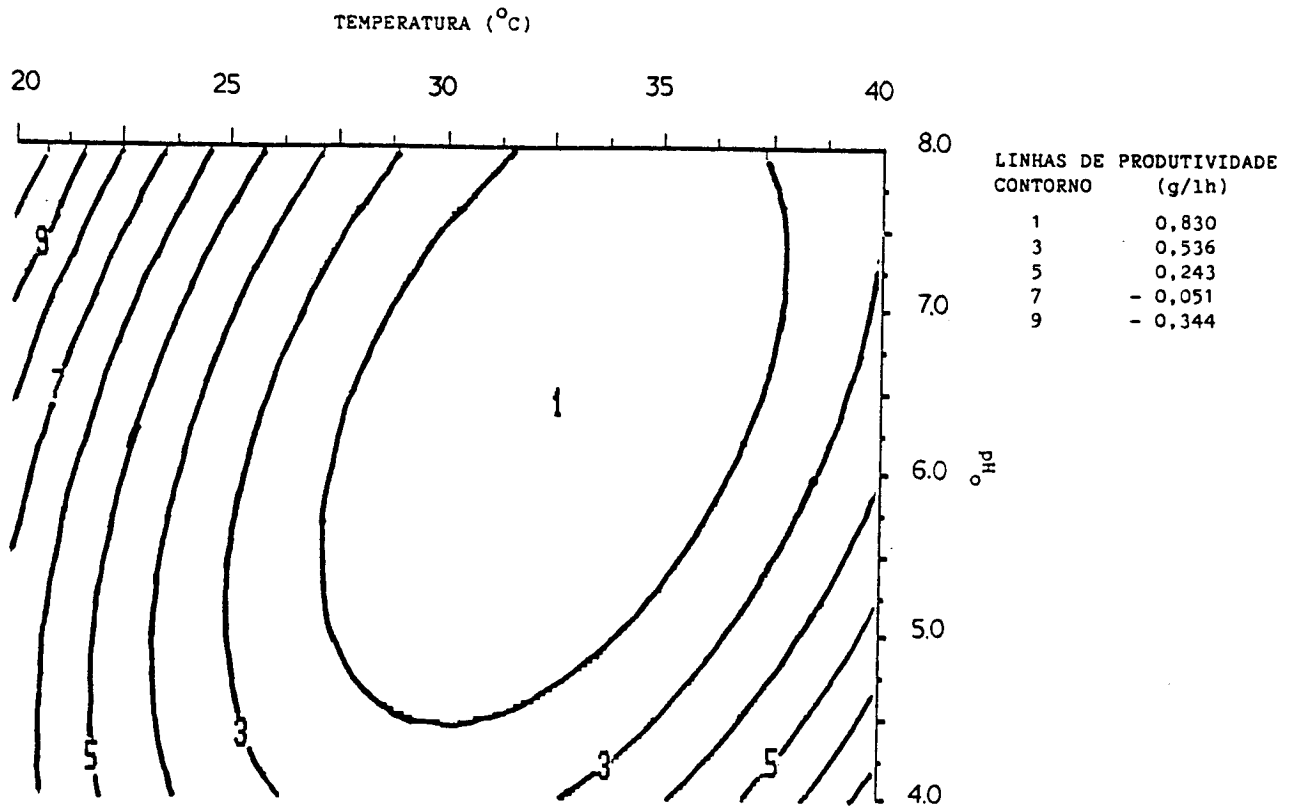


(a)

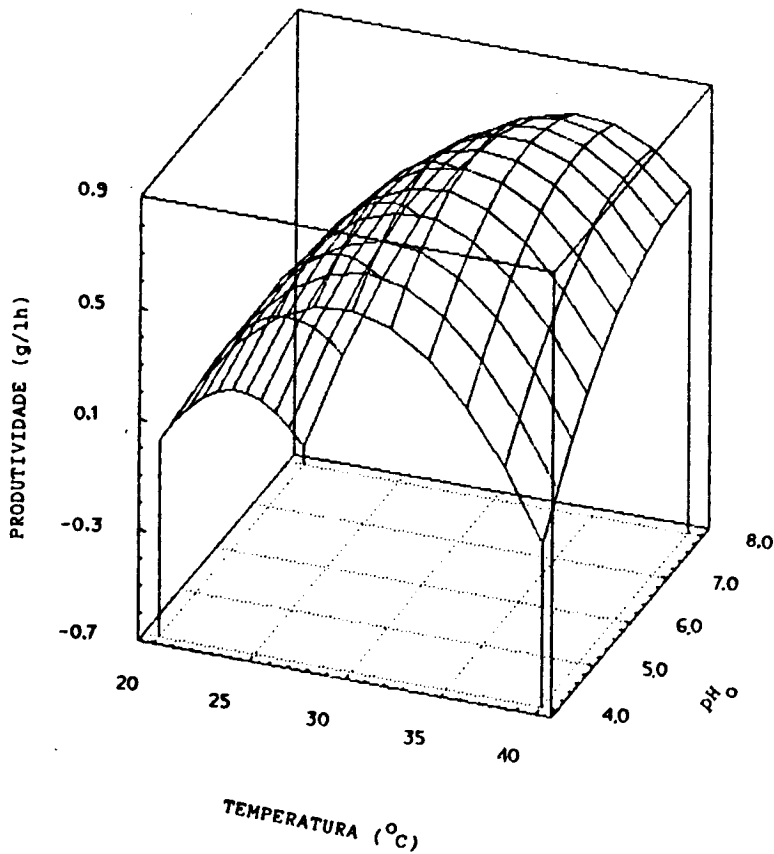


(b)

FIGURA 4.6 - Linhas de contorno (a) e superfície de resposta (b) representando a variação da produtividade com a temperatura e a velocidade de agitação, para uma concentração inicial de substrato de 144 g/l e um pH inicial de 6,4 (CORRELAÇÃO 2.7).

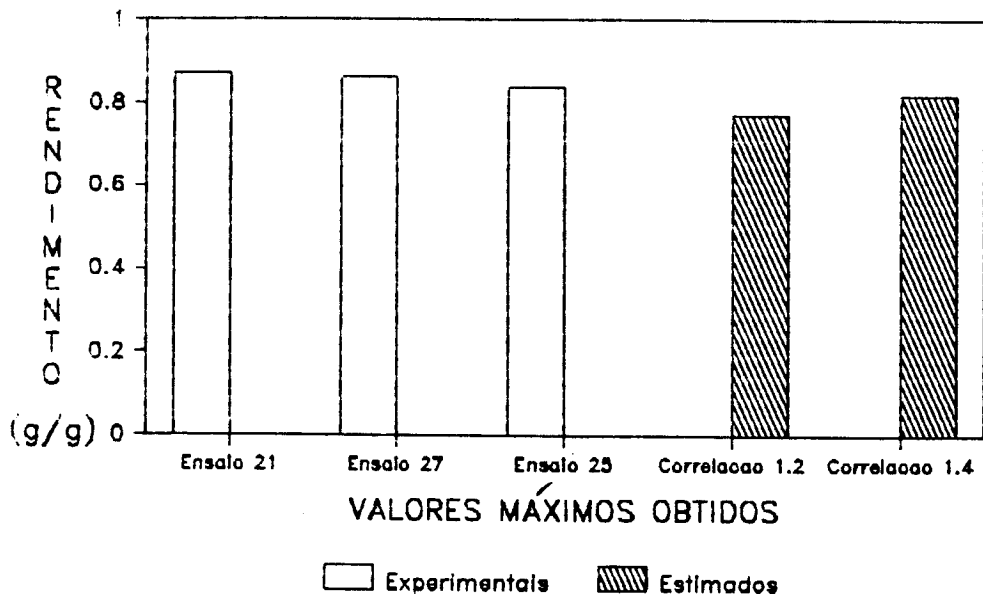


(a)

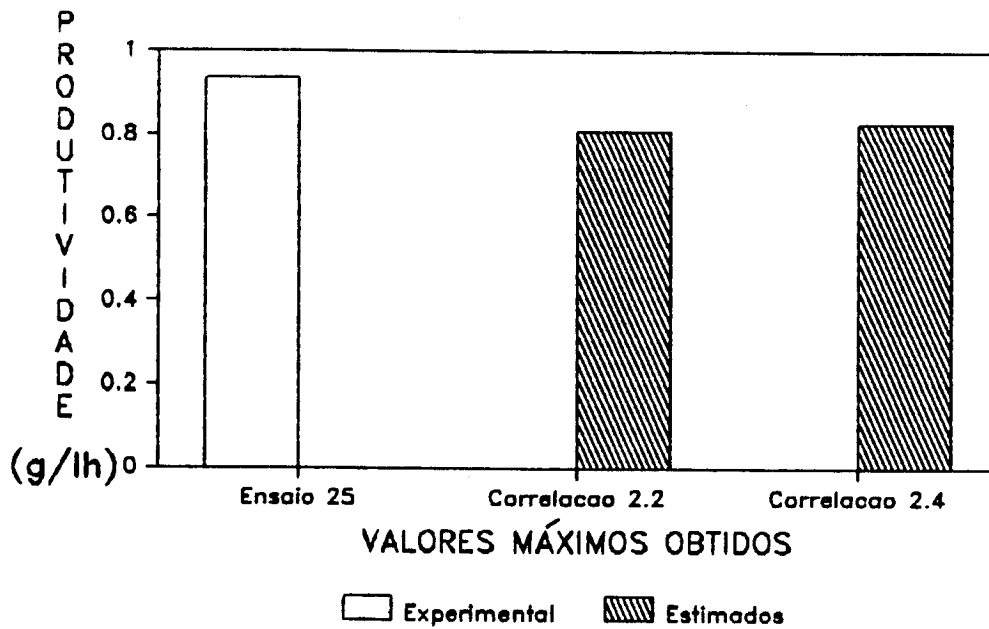


(b)

FIGURA 4.7 - Linhas de contorno (a) e superfície de resposta (b) representando a variação da produtividade com a temperatura e o pH inicial do meio, para uma concentração inicial de xilose de 144 g/l e uma velocidade de agitação de 162 rpm (CORRELAÇÃO 2.8).



(a)



(b)

FIGURA 4.8 - Comparação entre os valores máximos de rendimento (a) e produtividade (b) previstos pelos modelos matemáticos com os melhores valores obtidos experimentalmente.

Para auxiliar na análise das outras possibilidades, foram construídos os diagramas de resíduos em função dos valores experimentais para o rendimento e para a produtividade (FIGURA 4.9).

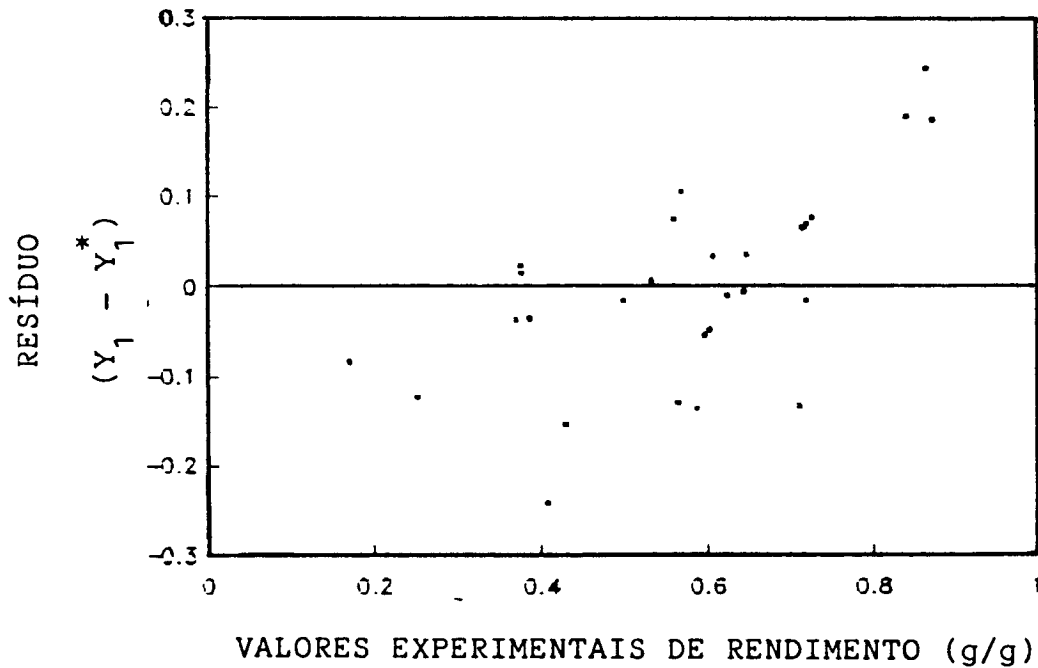
A FIGURA 4.9a parece indicar que o valor do resíduo passa de mais negativo para mais positivo à medida que o valor do rendimento aumenta. Em outras palavras, o modelo representado pela CORRELAÇÃO 1.4 está superestimando os valores baixos do rendimento e atenuando os valores mais altos. Esta observação é especialmente válida para os 3 maiores valores experimentais de rendimento, os quais apresentam os resíduos mais positivos.

A análise da FIGURA 4.9b sugere uma interpretação um pouco diferente, pois os resíduos parecem estar bem distribuídos na faixa de valores experimentais de produtividade que vai de 0 a 0,6 g/lh. No entanto, de maneira semelhante ao que ocorreu com o rendimento, para o maior valor de produtividade também correspondeu um resíduo significativamente positivo.

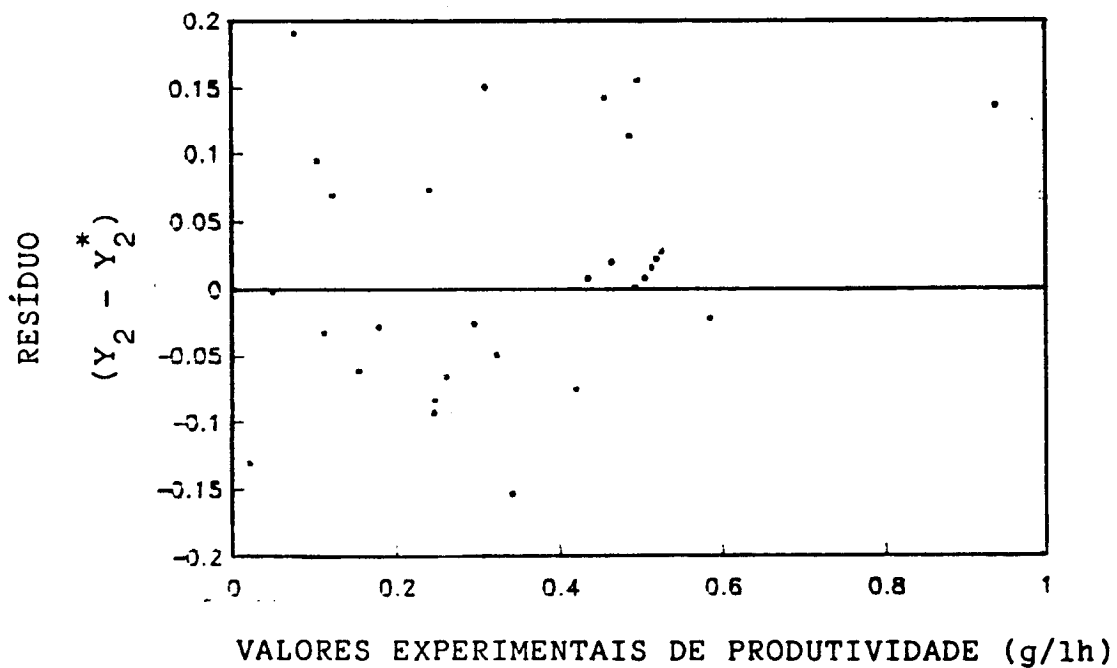
Apesar de a discussão anterior ter revelado fatos importantes, seria prematuro atribuir as discrepâncias observadas a uma não homogeneidade do erro experimental ou a uma falta de flexibilidade dos modelos de 2<sup>a</sup> ordem. Na realidade, uma avaliação mais completa destes fatores só poderá ser feita quando forem realizados os ensaios nas condições determinadas como ótimas para maximizar o rendimento e a produtividade, e então, os valores experimentais e estimados para as mesmas condições experimentais poderão ser comparados efetivamente.

- Análise dos efeitos das variáveis no rendimento e na produtividade

Recordando o procedimento adotado para obter as condições ótimas efetuado anteriormente, observa-se que a concentração inicial de substrato ( $S_0$ ) se destaca como uma das variáveis que mais afetam o rendimento e a produtividade, já que os valores de ambos aumentam diretamente com o aumento da concentração inicial de substrato, para a região investigada experimentalmente.



(a)



(b)

FIGURA 4.9 - Gráficos mostrando os resíduos (valor experimental - valor previsto) calculados para cada ensaio do Planejamento Experimental em função do valor obtido experimentalmente.

Retornando agora à discussão do metabolismo da xilose (Capítulo 2, item 2.1) e analisando cuidadosamente a FIGURA 2.8, verifica-se que à medida que a concentração de substrato aumenta, também aumenta a demanda por NADPH para que a xilose possa ser reduzida a xilitol pela enzima xilose redutase. Assim, todo o NADPH regenerado através das reações enzimáticas da Via Pentose Fosfato poderia ser potencialmente consumido, o que reduziria o efeito inibidor do produto NADPH sobre a enzima D-glucose-6-fosfato desidrogenase e forçaria a Via Pentose Fosfato a funcionar como um ciclo fechado, praticamente só para produzir NADPH. Isto explicaria porque são encontrados altos valores de rendimento e produtividade nos ensaios com meios contendo altas concentrações iniciais de xilose.

Outro fator que pode estar contribuindo indiretamente para os altos valores de rendimento e produtividade na presença de altas concentrações de xilose, é a ocorrência de inibição do crescimento celular pelo substrato. Este fato já foi constatado em trabalhos sobre a assimilação de diferentes concentrações de xilose por leveduras<sup>(8,12,19,62)</sup>.

Examinando novamente a FIGURA 2.8, nota-se que o cofator NADPH também é requerido para a formação de novas células. Examinando agora as figuras que descrevem o consumo de xilose, a formação de xilitol e o crescimento celular ao longo da fermentação para os 29 ensaios realizados, observa-se que geralmente as condições que favorecem a formação do produto também são adequadas para a formação de biomassa. Reunindo estas duas informações, pode-se concluir que existe uma disputa pelo cofator NADPH e caso a capacidade de regeneração deste cofator pela Via Pentose Fosfato não fosse suficiente para atender à demanda, a formação de xilitol, o crescimento celular ou ambos acabariam limitados pela escassez de NADPH.

Por outro lado, como altas concentrações de substrato podem inibir o crescimento celular, naturalmente a demanda pelo cofator NADPH para a formação de novas células diminuiria e a possibilidade de esgotamento deste cofator seria mínima, já que a enzima xilose redutase e a Via Pentose Fosfato agem de maneira complementar; a primeira consumindo NADPH e produzindo  $\text{NADP}^+$  e a segunda regenerando o NADPH. Conseqüentemente, nestas circunstâncias, a

formação de xilitol seria grandemente favorecida.

Um melhor entendimento sobre a assimilação da xilose por *C. parapsilosis* IZ 1710, seria possível se uma análise mais completa das amostras quanto à presença de outros produtos, como xilulose ou etanol, tivesse sido realizada. Isto implicaria no emprego de um cromatógrafo líquido de alta performance, na determinação das concentrações de xilitol, xilose e xilulose e de um cromatógrafo gasoso, na determinação da concentração de etanol e outros voláteis. Seria recomendável também que fosse adotado um método mais preciso para medir o crescimento celular, através da determinação direta da massa seca de cada amostra, para que a fração de xilose utilizada na formação de xilitol ou na formação de biomassa, em cada condição experimental, pudesse ser definida com mais clareza.

É ainda importante ressaltar que a dependência observada entre o rendimento, a produtividade e a concentração inicial de xilose concorda plenamente com os dados experimentais obtidos em estudos sobre este assunto<sup>(8,12,19,62)</sup>.

O mesmo pode ser dito quanto à influência da aeração, pois o rendimento previsto foi maximizado para uma velocidade de agitação de 119 rpm, o que corresponde aproximadamente a uma condição de oxigênio limitado. Este dado está de acordo com os trabalhos consultados sobre a influência da aeração na produção de xilitol<sup>(10,11,25,51,53,64)</sup>.

Devido à falta de informações na literatura, não foi possível incluir na Revisão Bibliográfica uma discussão semelhante sobre a influência da intensidade da aeração sobre a produtividade em xilitol, mas o fato de a produtividade ser otimizada em condições de aeração mais intensas ( $N_{ot} = 162$  rpm), concorda com o resultado obtido por Jeffries<sup>(32)</sup> ( $N_{ot} = 150$  rpm), no estudo sobre a utilização de xilose por *Candida shehatae*.

Já para as outras variáveis, pH inicial e temperatura, a comparação com as análises presentes na Revisão Bibliográfica está limitada pela própria escassez de informações da literatura sobre estes aspectos da produção de xilitol. Entretanto, pode se afirmar, de maneira geral, que o fato do rendimento previsto ser máximo para baixos valores de pH inicial e valores intermediários de temperatura, está de acordo com o comportamento previsto na literatura<sup>(41,32)</sup>.



Além da concentração inicial de xilose, outra variável que exerce forte influência sobre o rendimento e a produtividade é a temperatura, conforme fica evidente ao se verificar que o efeito da variável  $X_1$  (forma codificada da temperatura) na CORRELAÇÃO 1.4 e na CORRELAÇÃO 2.4, é o mais significativo de todos os efeitos simples. De acordo com os valores dos efeitos da variável  $X_4$  (forma codificada da velocidade de agitação) observados na CORRELAÇÃO 1.4 e na CORRELAÇÃO 2.4, pode-se afirmar que a influência da velocidade de agitação sobre o rendimento é bastante significativa, mas não é tão importante para a produtividade.

Quanto aos efeitos de interação das variáveis sobre a resposta, o mais importante é sem dúvida o efeito resultante da interação entre as variáveis  $X_1$  (forma codificada da temperatura) e  $X_2$  (forma codificada do pH inicial), para ambas as respostas, conforme pode ser visto nas correlações mencionadas anteriormente.

Observando-se a FIGURA 4.5b, nota-se que o rendimento é bastante sensível a alterações tanto na temperatura quanto na velocidade de agitação, pois qualquer pequeno deslocamento para fora do ponto ótimo implica em queda apreciável do mesmo.

De maneira semelhante, através da FIGURA 4.6b e FIGURA 4.7b, observa-se que a produtividade também é muito sensível a quaisquer alterações na temperatura, mas não é tão influenciada por variações na velocidade de agitação ou no pH inicial.

Além das diferentes condições ótimas determinadas para o rendimento e a produtividade, o fato de o rendimento ser muito sensível a mudanças na temperatura e na velocidade de agitação, e da produtividade ser sensível principalmente a variações na temperatura, é uma dificuldade adicional para que sejam encontradas condições experimentais intermediárias que favoreçam simultaneamente o rendimento e a produtividade em xilitol.

A FIGURA 4.10, constituída por uma sobreposição das linhas de contorno correspondentes a  $Y_1^* = f(T, N)$  e  $Y_1^* = f(T, pH_0)$  sobre as linhas de contorno correspondentes a  $Y_2^* = f(T, N)$  e  $Y_2^* = f(T, pH_0)$ , mostra isso claramente e pode-se observar que embora seja possível encontrar uma condição intermediária, não muito distante dos valores ótimos estabelecidos para a temperatura e a velocidade de agitação, fica muito difícil fazer o mesmo para o pH inicial.

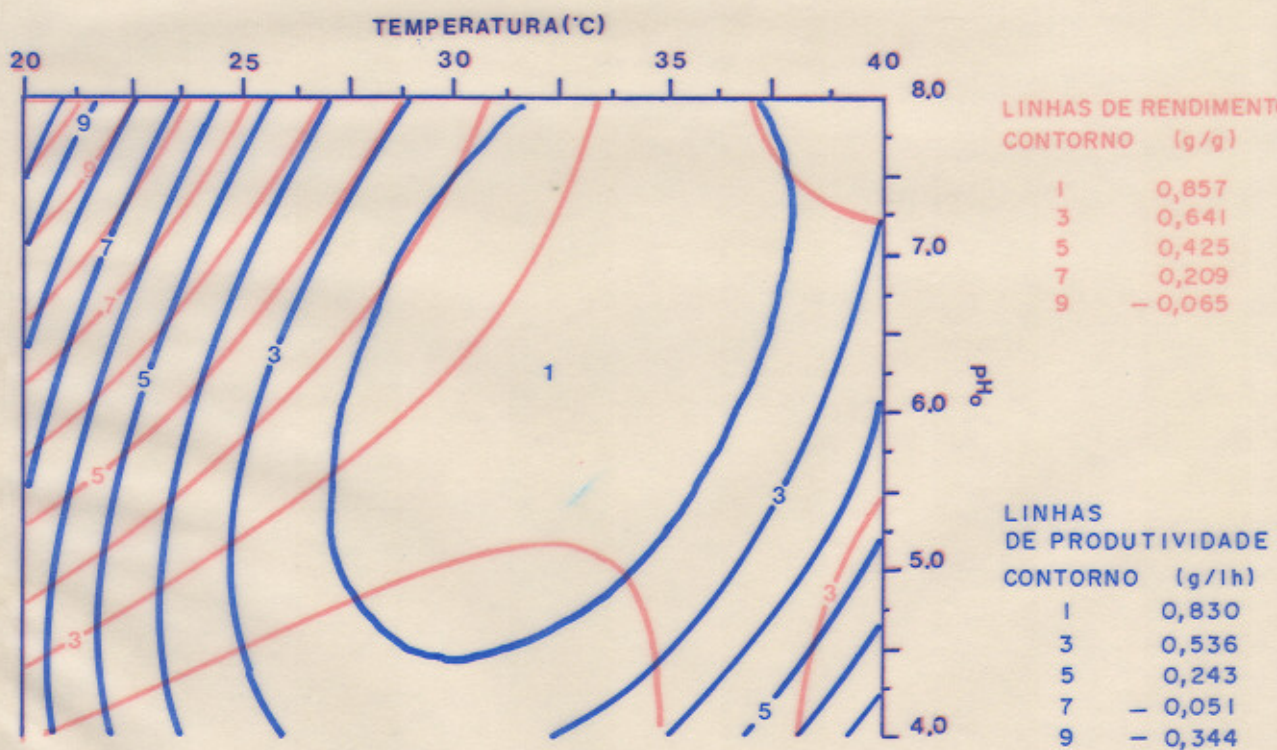
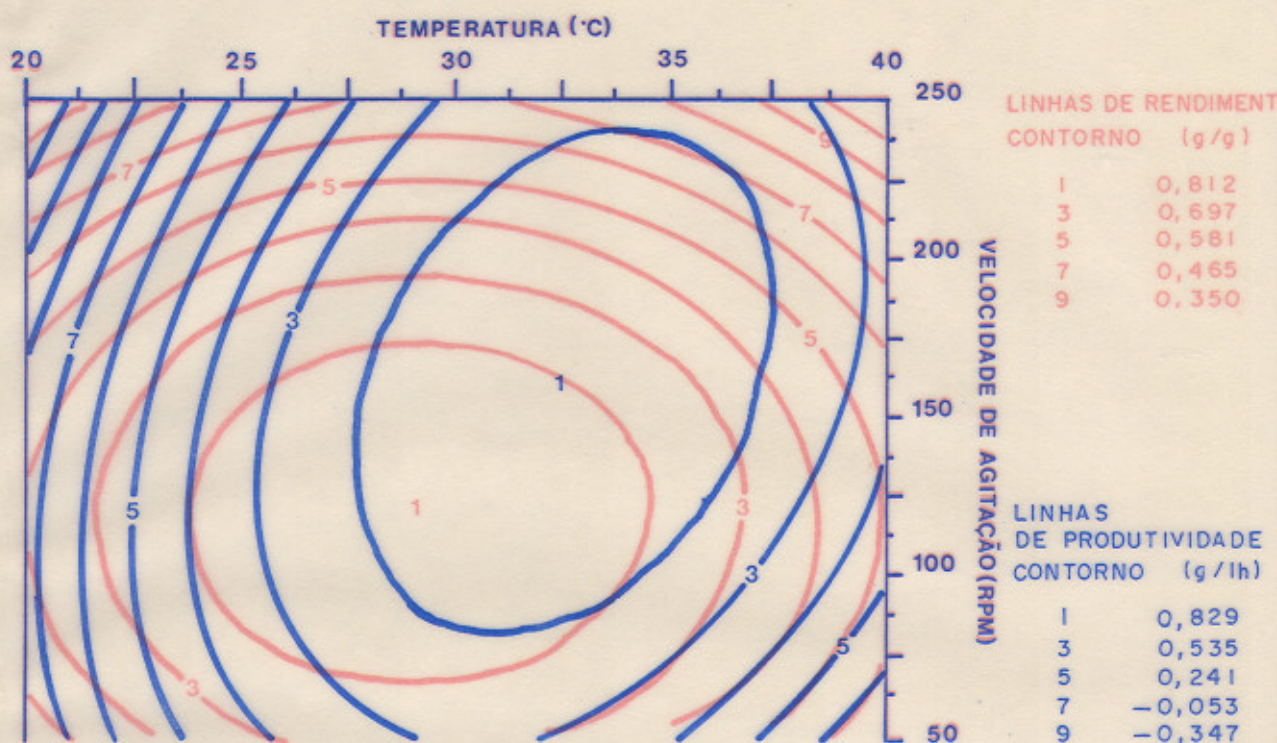


FIGURA 4.10 - Comparação das condições ótimas de fermentação estimadas para o rendimento e para a produtividade.

Para se ter uma idéia das perdas no rendimento e na produtividade caso a fermentação ocorra em condições intermediárias entre as ótimas determinadas para o rendimento e produtividade, pode-se reavaliar estas respostas para a nova situação, substituindo os seguintes valores de:

temperatura = 30,8 °C

pH inicial = 5,4

concentração inicial de xilose = 144 g/l

velocidade de agitação = 140 rpm

nas correlações apropriadas. Assim, através da CORRELAÇÃO 1.5, o valor do rendimento seria de 0,729 g/g e através da CORRELAÇÃO 2.5, o da produtividade seria de 0,784 g/lh, ambos aproximadamente 10 % inferiores aos máximos previstos nas condições ótimas.

No caso da produção de xilitol, onde o produto possui alto valor comercial e a matéria-prima, sendo constituída por hidrolizados de resíduos agrícolas, apresenta um custo baixo, geralmente recomenda-se que as condições do processo sejam escolhidas de forma a favorecer a produtividade. A xilose não convertida pode ser simplesmente descartada sem grandes prejuízos.

Entretanto, os mais pesados custos envolvidos no processo de produção de xilitol são aqueles associados às etapas de separação e purificação. Assim, quanto maior for o rendimento, menor seria a quantidade de xilose residual no caldo fermentado e os custos para purificar o xilitol também seriam menores, reduzindo o custo do processo.

Dessa forma, é mais aconselhável encontrar uma condição de compromisso para operar o processo. A escolha desta condição envolve um estudo mais aprofundado dos aspectos discutidos acima e também de outros, destacando-se uma avaliação detalhada da influência do aumento da concentração inicial de células na produtividade, um aspecto que não foi explorado neste trabalho.

## 5 - CONCLUSÃO E SUGESTÕES

Pode-se concluir que:

- Das 18 cepas de leveduras testadas inicialmente, apenas *C. tropicalis* IZ 1824, *C. tropicalis* IZ 1958, *C. parapsilosis* IZ 1710 e *C. parapsilosis* DM-FIOCRUZ 2882 se destacaram na produção de xilitol, atingindo mais de 4,0 g/l de xilitol, com consumo integral da xilose inicialmente presente no meio (20 g/l).
- Dentre estas 4 cepas, *C. parapsilosis* IZ 1710 foi escolhida como a mais adequada para os estudos sobre a produção de xilitol pelo método de análise de superfície de resposta, por apresentar uma concentração final de xilitol de 8,0 g/l, após apenas 58 horas de cultivo em meio contendo somente 1 g/l de extrato de levedura, na presença de acetato de amônio como fonte de nitrogênio. Nesta etapa, o microrganismo apresentou um rendimento em xilitol de 0,43 g/g e uma produtividade de 0,14 g/lh.
- Através de estudos sobre a melhor forma de preparação do inóculo, verificou-se que as células de *C. parapsilosis* IZ 1710 cultivadas em meio contendo 10 g/l de xilose e 10 g/l de glicose, foram capazes de assimilar este substrato misto tão eficientemente quanto a glicose pura e apresentando ainda o mesmo crescimento celular.
- Após a realização de apenas 29 ensaios propostos pelo planejamento experimental por análise de superfície de resposta, foram encontradas condições experimentais que permitiram ao microrganismo atingir valores de rendimento de até 0,87 g/g, com uma concentração final de produto acima de 120 g/l, para uma produtividade de mais de 0,9 g/lh. Estes resultados indicam que o emprego do método de planejamento experimental foi bem sucedido no sentido de promover um aumento expressivo na capacidade produtiva da levedura *C. parapsilosis* IZ 1710.
- O procedimento de modelagem empírica, seguida pelo refinamento dos modelos completos de 2ª ordem obtidos para o rendimento e para a produtividade, resultou em correlações práticas, com menos de 10

parâmetros, tornando possível a otimização das variáveis e determinação dos valores das mesmas que tornam máximos os valores de rendimento e produtividade. Verificou-se também que os modelos propostos representaram adequadamente os dados experimentais, por apresentarem um nível de confiança de mais de 99,9 % para ambas as respostas.

- Os modelos matemáticos empíricos obtidos mostraram limitações quanto à sua aplicação, devido ao fato de considerarem os erros de medida constantes para todas as respostas e não levarem em conta a ocorrência de erros sistemáticos. Verificou-se também uma falta de flexibilidade do modelo de 2<sup>a</sup> ordem, levando à atenuação dos valores máximos de rendimento e produtividade previstos para as condições ótimas, que foram aproximadamente 20 % inferiores aos melhores obtidos experimentalmente.

Este trabalho resultou no desenvolvimento de um processo fermentativo com perspectivas de preencher todos os requisitos básicos para se tornar uma alternativa ao processo tradicional de síntese química para a produção de xilitol.

#### **SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS**

Ficam como sugestões para dar continuidade e complementar este trabalho, a realização de estudos visando verificar:

- Os resultados experimentais dos ensaios realizados sob as condições ótimas determinadas na otimização do rendimento e da produtividade;

- A influência de concentrações iniciais de xilose maiores que 144 g/l no rendimento, na produtividade e na concentração final de xilitol;

- A influência da concentração inicial de células na produtividade em xilitol;
- O efeito real do pH e da taxa de aeração no rendimento e na produtividade, quando controlados durante a fermentação através da realização de ensaios em fermentador de bancada;
- A possibilidade de utilização do hidrolizado de bagaço de cana-de-açúcar como substrato e os reflexos nos resultados obtidos.

Pode-se ainda fazer o estudo cinético da produção de xilitol a fim de determinar os parâmetros cinéticos de consumo de substrato, formação de produto e crescimento celular. Os resultados poderiam ser utilizados na simulação do processo e também para iniciar a investigação da produção contínua ou em batelada de xilitol, utilizando células de levedura imobilizadas (para fornecer grandes densidades celulares), em biorreatores convencionais ou em biorreatores tipo torre.

## 6 - BIBLIOGRAFIA

- 1 - COUSELL, J. N. **Xylitol**. Applied Science Publisher, London, 1977.
- 2 - HYVÖNEN, L. & KOIVISTOINEN, P. Food Technological Evaluation of xylitol. **Advances in Food Research**, vol. 28, 373-403, 1982.
- 3 - GONG, C. S., CLAYPOOL, T. A., MCCRACKEN, L. D., MAUN, C. M., UENG, P. P. & TSAO, G. T. Conversion of Pentoses by Yeasts. **Biotechnol. and Bioeng.**, vol. XXV, 85-102, 1983.
- 4 - GONG, C. S., CHEN, L. F., FLICKINGER, M. C. & TSAO, G. T. Conversion of Hemicellulose Carbohydrates. **Advances in Bioch. Eng./Biotechnol.**, no. 20, 93 - 118, 1981.
- 5 - SKOOG, K. & HAHN-HAGERDAL, B. Xylose Fermentation. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 10, 66-80, 1988.
- 6 - MALEZKA, R. & SCHNEIDER, H. Fermentation of D-xylose, Xylitol and D-xylulose by Yeasts. **Canadian J. Microbiol.**, vol. 28, 360 - 363, 1982.
- 7 - ROSENBERG, S. L. Fermentation of Pentose Sugar to Ethanol and other Neutral Products by Microorganisms. **Enzyme Microbiol. Technol.**, vol. 2, July, 185-193, 1980.
- 8 - CHEN, L.F. & GONG, C. S. Fermentation of Sugarcane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate to Xylitol by Hydrolysate Acclimatized Yeast. **Journal of Food Science**, vol. 50, 226 - 228, 1985.
- 9 - HAHN-HAGERDAL, B., JONSSON, B. & VOGEL, E. Shifting Product Formation from Xylitol to Ethanol in Pentose Fermentations using *Candida tropicalis* by Adding Polyethylene Glycol (PEG). **Appl. Microbiol. and Biotechnol.**, no. 21, 173-175, 1985.
- 10 - VOGEL, E. & HAHN-HAGERDAL, H. B. The Utilization of Metabolic Inhibitors for Shifting Product Formation from Xylitol to Ethanol in Pentose Fermentations Using *Candida tropicalis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, no. 21, 167 - 172, 1985.
- 11 - BAILLARGEON, M. W., JANSEN, N. B., GONG, C. S., TSAO, G. T. Effect of Oxygen Uptake Rate on Ethanol Production by a Xylose-fermentating Yeast Mutant, *Candida sp.* XF 217. **Biotechnol. Letters**, vol. 5, no. 5, 339 - 44, 1983.

- 12 - VONGSUVANLERT, V. e TANI, Y. Xylitol Production by a Methanol Yeast, *Candida boidinii* n<sup>o</sup> 2201. **Journal of Ferm. and Bioeng.**, vol. 67, no. 1, 35-39, 1989.
- 13 - KITPREECHAVANICH, V.; HAYASHI, M. & NAGAI, S. Conversion of D-xylose into Xylitol by Xylose-reductase from *Candida pelliculosa* Coupled with the Oxido-reductase System of Methanogen Strain HU. **Biotechnol. Letters**, vol. 6, no. 10, 651 - 656, 1984.
- 14 - NISHIO, N., SUGAWA, K., HAYASE, N. & NAGAI, S. Conversion of D-xylose into Xylitol by Immobilized Cells of *Candida pelliculosa* and *Methanobacterium sp.* HU. **J. of Ferm. and Bioeng.**, vol. 67, no. 3, 356-360, 1989
- 15 - BOX, G. E. P., HUNTER, W. G. & HUNTER, J. S. **Statistics for Experimenters**. Wiley-Interscience, 1978.
- 16 - MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, vol 31, no. 3, March, 426 - 428, 1959.
- 17 - SONG, H. B. & DEMAINE, A. L. An Improved Colorimetric Assay for Polyols. **Anal. Bioch.**, vol. 81, 18-20, 1977.
- 18 - EMODI, A. Xylitol, Its Properties and Food Applications. **Food Technology**, January, 28-32, 1978.
- 19 - GONG, C. S., CHEN, L. F. & TSAO, G. T. Quantitative Production of Xylitol from D-Xylose by a High-Xylitol Producing Yeast Mutant *Candida tropicalis* HXP2. **Biotechnol. Letters**, vol.3, no. 3, 130-135, 1981.
- 20 - BOUILLOUD P., BUCHERT, J. & POUTANEN, K. Study Xylose Assimilation under Oxygen Limiting Conditions. **Biotechnol. Letters**, vol. 15, no. 7, 230-234, 1984.
- 21 - DELGENES, J. P., MOLETTA, R. & NAVARRO, J. M. Fermentation of D-Xylose, D-Glucose, L-Arabinose Mixture by *Pichia stipitis*: Effect of the Oxygen Transfer Rate on Fermentation Performance. **Biotechnol. Bioeng.**, vol. 34, 398 - 402, 1989.
- 22 - VANCAUWENBERGE, J. E., BOLEN, P. L., MCCRACKEN, D. A. & BOTHAST, R. J. Effect of Growth Conditions on Cofactor-linked Xylose Reductase Activity in *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 11, October, 662 - 667, 1989.



- 23 - RIZZI, M., KLEIN, C., SCHULZE, C., NGOC-ANH, B. T. & DELLWEG, H. Xylose Fermentation by Yeasts. 5. Use of ATP Balances for Modeling Oxygen-Limited Growth and Fermentation of Yeast *Pichia stipitis* with Xylose as Carbon Source. **Biotechnol. Bioeng.**, vol. 34, 509 - 514, 1989.
- 24 - SLININGER, P. J., BRANSTRATOR, L. E., BOTHAST, R. J., OKOS, M. R. & LADISCH, M. R. Growth, Death and Oxygen Uptake Kinetics of *Pichia stipitis* on Xylose. **Biotechnol. Bioeng.**, vol. 37, 973 - 980, 1991.
- 25 - FURLAN, S. A., BOUILLOUD, P., STREHAIANO, P. & RIBA, J. P. Study of Xylitol Formation from Xylose under Oxygen Limiting Conditions. **Biotechnol. Letters**, vol. 13, no. 3, 203 - 206, 1991.
- 26 - LIGTHELM, M. E., PRIOR, B. A. & DU PREEZ, J. C. Effect of Hydrogen Acceptors on D-Xylose Fermentation by Anaerobic Culture of Immobilized *Pachysolen tannophilus* Cells. **Biotechnol. Bioeng.**, vol. 32, 839 - 844, 1989.
- 27 - DU PREEZ, J. C., VAN DRIESSEL, B., PRIOR, B. A. D-Xylose Fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* at Low Dissolved Oxygen Levels in Fed-Batch Cultures. **Biotechnol. Letters**, vol. 11, no. 2, 131 - 136, 1989.
- 28 - OLIVIER, S. P. & DU TOIT, P. J. Sugar Cane Bagasse as a Possible Source of Fermentable Carbohydrates. **Biotechnol. Bioeng.**, vol. XXVIII, 684 - 699, 1986.
- 29 - SUIHKO, M. L. & DRAZIC, M. Pentose Fermentation by Yeasts. **Biotechnol. Letters**, vol. 5, no. 2, 107 - 112, 1983.
- 30 - BOLEN, P. L. & DETROY, R. W. Induction of NADPH-Linked D-Xylose Reductase and NAD-Linked Xylitol Dehydrogenase Activities in *Pachysolen tannophilus* by D-Xylose, L-Arabinose or D-Galactose. **Biotechnol. Bioeng.**, vol. XXVII, 302 - 307, 1985.
- 31 - WAYMAN, M. & TSUYUKI, S. Fermentation of Xylose to Ethanol by *Candida shehatae*. **Biotechnol. Bioeng. Symp.**, no. 15, 167 - 177, 1985.
- 32 - JEFFRIES, T. Effects of Culture Conditions on the Fermentation of Xylose to Ethanol by *Candida shehatae*. **Biotechnol. Bioeng. Symp.**, no. 15, 149 - 166, 1985.

- 33 - IZUMORI, K. & TUZAKI, K. Production of Xylitol from D-Xylulose by *Mycobacterium smegmatis*. **J. Ferment. Technol.**, vol. 66, no. 1, 33 - 36, 1988.
- 34 - DITZELMULLER, G., KUBICEK, C. P., WOHRER, W. & ROHR, M. Xylose Metabolism in *Pachysolen tannophilus*: Purification and Properties of Xylose Reductase. **Canadian J. Microbiol.**, vol. 30, July, 1330 - 1336, 1984.
- 35 - DELLWEG, H., RIZZI, M., METHNER, H. & DEBUS, D. Xylose Fermentation by Yeasts. **Biotechnol. Letters**, vol. 6, no. 6, 395 - 400, 1984.
- 36 - DELGENES, J. P., MOLETTA, R. & NAVARRO, J. M. The Effect of Aeration on D-Xylose Fermentation by *Pachysolen tannophilus*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* and *Candida shehatae*. **Biotechnol. Letters**, vol. 8, no. 12, 897 - 900, 1986.
- 37 - JEFFRIES, T. W., FADY, J. H. & LIGHTFOOT, E. N. Effect of Glucose Supplements on the Xylose Fermentation by *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnol. Bioeng.**, vol. XXVII, 171 - 176, 1985.
- 38 - JEFFRIES, T. W. Mutants of *Pachysolen tannophilus* Showing Enhanced Rates of Growth and Ethanol Formation from D-Xylose. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 6, June, 254 - 258, 1984.
- 39 - CHUNG, I. S. & LEE, Y. Y. Effect of Oxygen and Redox Potential on D-Xylose Fermentation by Non-Growing Cells of *Pachysolen tannophilus*. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 8, August, 503 - 507, 1986.
- 40 - GONG, C. S., CHEN, L. F., FLICKINGER, M. C., CHIANG, L. C. & TSAO, G. T. Production of Ethanol from D-Xylose by Using D-Xylose Isomerase and Yeasts. **Appl. Environ. Microbiol.**, February, 430 - 436, 1981.
- 41 - CHIANG, L. C., GONG, C. S., CHEN, L. F. & TSAO, G. T. D-Xylulose Fermentation to Ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Environ. Microbiol.**, August, 284 - 289, 1981.
- 42 - RIZZI, M., ERLEMAN, P., NGOC-ANH, BUI-THANH, DELLWEG, H. Xylose Fermentation by Yeasts. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, no. 29, 148 - 154, 1988.

- 43 - DOES, A. L. & BISSON, L. F. Characterization of Xylose Uptake in the Yeasts *Pichia heedii* and *Pichia stipitis*. **Appl. Environ. Microbiol.**, January, 159 - 164, 1989.
- 44 - LIGHTHELM, M. E., PRIOR, B. A. & DU PREEZ, J. C. The Effect of Respiratory Inhibitors on the Fermentative Ability of *Pichia stipitis*, *Pachysolen tannophilus* and *Saccharomyces cerevisiae* under Various Conditions of Aerobiosis. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, vol. 29, 67 - 71, 1988.
- 45 - LACHKE, A. H. & JEFFRIES, T. W. Levels of Enzymes of Pentose Phosphate Pathway in *Pachysolen tannophilus* Y-2460 and Selected Mutants. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 8, June, 353 - 359, 1986.
- 46 - CHIANG, L. C., HSIAO, H. Y., UENG, P. P., CHEN, L. F. & TSAO, G. T. Ethanol Production from Xylose by Enzymatic Isomerization and Yeast Fermentation. **Biotechnol. Bioeng. Symp.**, no. 11, 263 - 274, 1981.
- 47 - UENG, P. P. & GONG, C. S. Ethanol Production from Pentoses and Sugar-Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate by *Mucor* and *Fusarium* Species. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 4, May, 169 - 172, 1982.
- 48 - SUIHKO, M. L. & POUTANEN, K. D-Xylulose Fermentation by Free and Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells. **Biotechnol. Letters**, vol. 6, no. 3, 189 - 194, 1984.
- 49 - SLININGER, P. J. & BOTHAST, R. J. Continuous Fermentation of Feed Streams Containing D-Glucose and D-Xylose in a Two-Stage Process Utilizing Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnol. Bioeng.**, vol. 32, 1104 - 1112, 1988.
- 50 - HSIAO, H. Y., CHIANG, L. C., CHEN, L. F. & TSAO, G. T. Effects of Borate on Isomerization and Yeast Fermentation of High Xylulose Solution and Acid Hydrolysate of Hemicellulose. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 4, January, 25 - 31, 1982.
- 51 - DU PREEZ, J. C. & VAN DER WALT, J. P. Fermentation of D-Xylose to Ethanol by a Strain of *Candida Shehatae*. **Biotechnol. Letters**, vol. 5, no. 5, 357 - 362, 1983.
- 52 - SLININGER, P. J., BOTHAST, R. J., OKOS, M. R. & LADISCH, M. R. Comparative Evaluation of Ethanol Production by Xylose-Fermenting Yeasts Presented High Xylose

- Concentrations. *Biotechnol. Letters*, vol. 7, no. 6, 431 - 436, 1985.
- 53 - SLININGER, P. J., BOLEN, P. L., KURTZMAN, C. P. *Pachysolen tannophilus*: Properties and Process Considerations for Ethanol Production from D-Xylose. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 9, January, 5 - 15, 1987.
- 54 - JEFFRIES, T. W. Utilization of Xylose by Bacteria, Yeasts and Fungi. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, vol. 27, 1 - 32, 1983.
- 55 - MCCrackEN, L. & GONG, C. S. D-Xylose Metabolism by Mutant Strains of *Candida* sp. *Adv. Biochem Eng./Biotechnol.*, vol. 27, 33 - 35, 1983.
- 56 - DU TOIT, P. J., OLIVIER, S. P. & VAN BILJON, P. L. Sugar Cane Bagasse as a Possible Source of Fermentable Carbohydrates (I). *Biotechnol. Bioeng.*, vol. XXVI, 1071 - 1078, 1984.
- 57 - KITPREECHAVANICH, V., NISHIO, N., HAYASHI, M. & NAGAI, S. Regeneration and Retention of NADP(H) for Xylitol Production in an Ionized Membrane Reactor. *Biotechnol. Letters*, vol. 7, no. 9, 657 - 662, 1985.
- 58 - KRULL, L. H. & INGLETT, G. E. Analysis of Neutral Carbohydrates in Agricultural Residues by Gas-Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, no. 28, 917 - 919, 1980.
- 59 - MORIKAWA, S., TAKASAWA, S., MASUNAGA, I., TAKAYAMA, K. Ethanol Productions from D-Xylose and Cellobiose by *Kluyveromyces cellobiovorus*. *Biotechnol. Bioeng.*, vol. XXVII, 509 - 513, 1985.
- 60 - BUCHERT, J. & VIKARI, L. Oxidative D-Xylose Metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, no. 29, 375 - 379, 1988.
- 61 - PATURAU, J. M. *By-Products of the Cane Sugar Industry*. Elsevier Publishing Company, 1969.
- 62 - MEYRIAL, V., DELGENES, J. P., MOLETTA, R. & NAVARRO, J. M. Xylitol Production from D-Xylose by *Candida guilliermondii*: Fermentation Behaviour. *Biotechnol. Letters*, vol. 13, no. 4, 281 - 286, 1991.
- 63 - LEE, H., ATKIN, A. L., BARBOSA, M. F. S., DELBERT, R. D. & SCHNEIDER, H. Effect of Biotin Limitation on the

- Conversion of Xylose to Ethanol and Xylitol by *Pachysolen tannophilus* and *Candida guilliermondii*. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 10, February, 81 - 84, 1988.
- 64 - MUTZE, B. & WANDREY, C. Continuous Fermentation of Xylose with *Pachysolen tannophilus*. **Biotechnol. Letters**, vol. 5, no. 9, 633 - 638, 1983.
- 65 - MAGEE, R. J. & KOSARIC, N. Bioconversion of Hemicelluloses. **Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.**, vol. 27, 61 - 94, 1983.
- 66 - BARNETT, J. A. The Utilization of Sugars by Yeasts. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, vol. 32, 125 - 234, 1976.
- 67 - SREENATH, H. K., CHAPMAN, T. W. & JEFFRIES, T. W. Ethanol Production from D-Xylose in Batch Fermentations with *Candida shehatae*: Process Variables. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, no. 24, 294 - 299, 1986.
- 68 - BRUINENBERG, P. M., DE BOT, P. H. M., VAN DIJKEN, J. P. & SCHEFFERS, W. A. NADH-linked Aldose Reductase: The Key to Anaerobic Alcoholic Fermentation of Xylose by Yeasts. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, no. 19, 256 - 260, 1984.
- 69 - KAUTOLA, H. Itaconic Acid Production from Xylose in Repeated-Batch and Continuous Bioreactors. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, no. 33, 7 - 11, 1990.
- 70 - BRUINENBERG, P. M., VAN DIJKEN, J. P., KUENEN, J. G. & SCHEFFERS, A. Oxidation of NADH and NADPH by Mitochondria from the Yeast *Candida utilis*. **J. Gen. Microbiol.**, vol. 131, 1043 - 1051, 1985.
- 71 - SREENATH, H. K. & JEFFRIES, T. W. Batch and Membrane-Assisted Cell Recycling in Ethanol Production by *Candida shehatae*. **Biotechnol. Letters**, vol. 9, no. 4, 293 - 298, 1987.
- 72 - YLIKAHRI, R. Metabolic and Nutritional Aspects of Xylitol. **Adv. in Food Research**, vol. 25, 159 - 177, 1979.
- 73 - LADISCH, M. R., LIN, K. W., VOLOCH, M. & TSAO, G. T. Process Considerations in the Enzymatic Hydrolysis of Biomass. **Enzyme Microb. Technol.**, vol. 5, March, 82 - 102, 1983.
- 74 - ONISHI, Y. & SUZUKI, O. The Production of Xylitol, L-Arabinitol and Ribitol by Yeasts. **Agric. Biol. Chem.**, vol. 30, 1139 - 1153, 1966.
- 75 - ABIQUIM. **Anuário da Indústria Química Brasileira**. 1989

- 76 - BAILEY, J. E. & OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals.** McGraw-Hill Book Company, 2<sup>nd</sup> Edition, 1986.
- 77 - **Álcool e Açúcar**, vol. 7, no. 4, 8 - 12, 1987.78 - PIMENTEL, L. S. **The Brazilian Ethanol Program.** **Biotechnol. Bioeng.**, vol. XXII, 1989 - 2012, 1980.
- 79 - CUNHA, B. **Tecnologia do Açúcar: Da Matéria-Prima à Evaporação.** 1974.
- 80 - MAKINEN, K. K. **Xylitol and Oral Health.** **Adv. in Food Research**, vol. 25, 137 - 157, 1979.

**ANEXOS**

## ANEXO A

### Procedimento para a Obtenção da Curva de Calibração de Concentração Celular versus Absorbância

Ao final dos ENSAIOS 17, 18 e 19 (triplicata no ponto central do planejamento fatorial inicial), misturou-se os caldos fermentados obtidos em um único frasco e retirou-se um volume de 10 ml, que foi centrifugado.

Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e procedeu-se à lavagem das células (corpo de fundo), adicionando-se 20 ml de solução salina. Depois de agitar bem, realizou-se nova centrifugação.

Novamente, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se solução salina até que o volume total atingisse 20 ml. Após tornar bem homogênea a suspensão resultante, com o auxílio de uma pipeta de 2 ml foram retiradas 5 alíquotas desta suspensão, para serem filtradas em membranas Millipore e posteriormente colocadas na estufa de secagem a 100 °C por 24 horas.

Após a secagem, as membranas (previamente taradas) contendo as células secas foram pesadas em balança analítica, apresentando os seguintes resultados:

Membrana n <sup>o</sup>	Massa de Células Secas (g)
1	0,0775
2	0,0780
3	0,0780
4	0,0777
5	0,0771

Média = 0,07766

Portanto, a concentração de células na suspensão original era de 0,07766 g de células secas/2 ml ou 38,83 g de células secas/l.



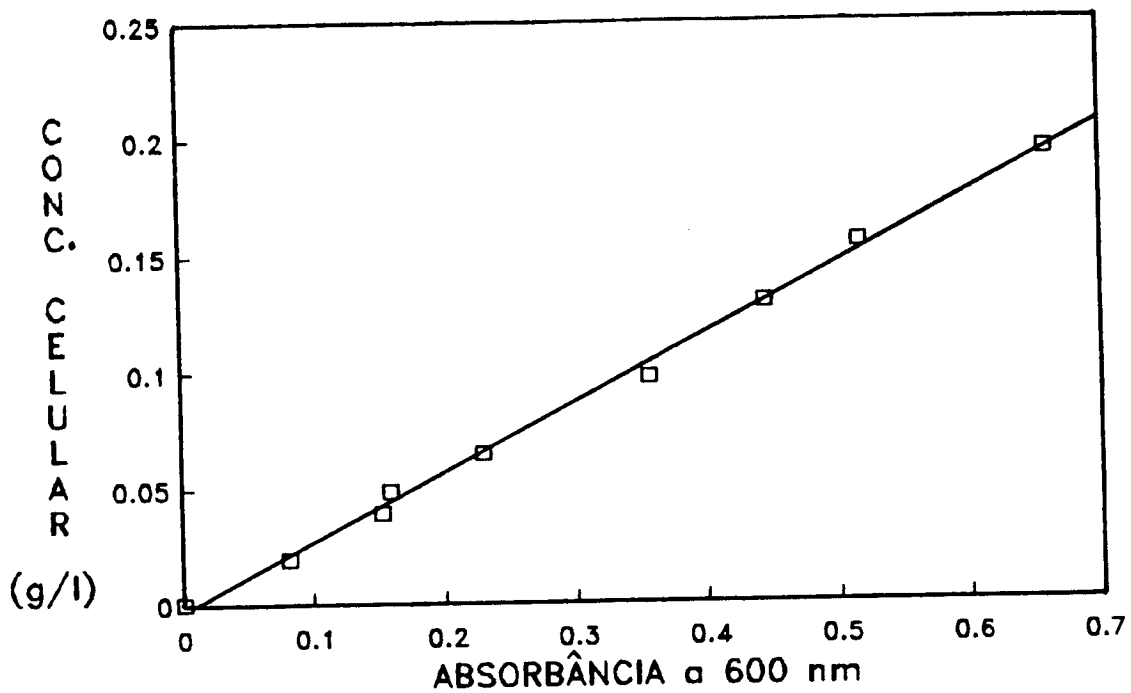
Do restante da suspensão original, foram retiradas outras alíquotas destinadas à preparação de suspensões com diversas diluições. Cada uma destas suspensões diluídas foi submetida à leitura de transmitância em espectrofotômetro a 600 nm, montando-se a TABELA A.1.

TABELA A.1 - Relação entre concentração celular e absorvância para *C. parapsilosis* IZ 1710

Diluição ( $\frac{\text{vol. de susp. concentr.}}{\text{volume total}}$ )	Concentração de células na susp. diluída (g/l)	Absorvância a 600 nm
Infinita	0,0000	0,000
1/200	0,1941	0,658
1/250	0,1553	0,516
1/300	0,1294	0,444
1/400	0,0971	0,356
1/600	0,0647	0,229
1/800	0,0485	0,158
1/1000	0,0388	0,152
1/2000	0,0194	0,081

Observação: A concentração de células na suspensão diluída é igual a concentração de células na suspensão original dividida pela diluição correspondente.

Os dados de Concentração celular e absorvância foram correlacionados através de uma regressão linear (FIGURA A.1), resultando



$$\text{CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS (g/l)} = - 3,1829 \times 10^{-3} + 0,2992 \times \text{ABSORBÂNCIA}$$

$$r = 0,998$$

FIGURA A.1 - Curva de calibração da concentração celular em função da absorbância a 600 nm para *C. parapsilosis* IZ 1710.

ANEXO B

Curvas representando o consumo de substrato, a formação de produto e o crescimento celular ao longo do tempo para os 29 ensaios do Planejamento Experimental.

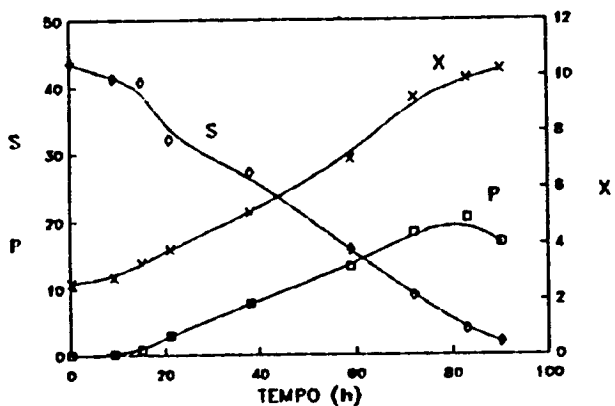


FIGURA B.1 - Dados do ENSAIO 1

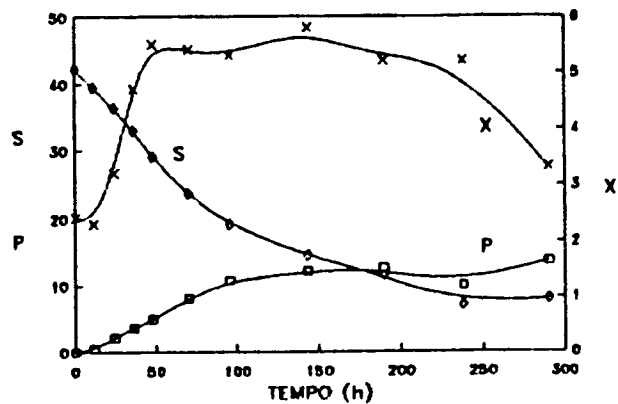


FIGURA B.2 - Dados do ENSAIO 2

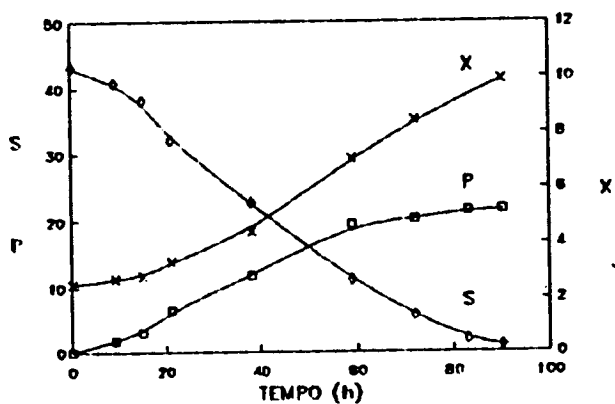


FIGURA B.3 - Dados do ENSAIO 3

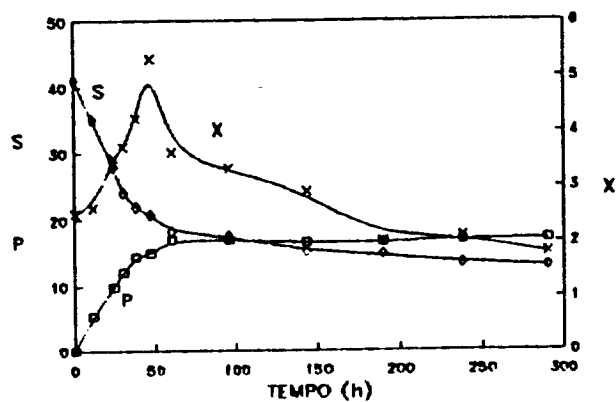


FIGURA B.4 - Dados do ENSAIO 4

ANEXO B (Continuação)

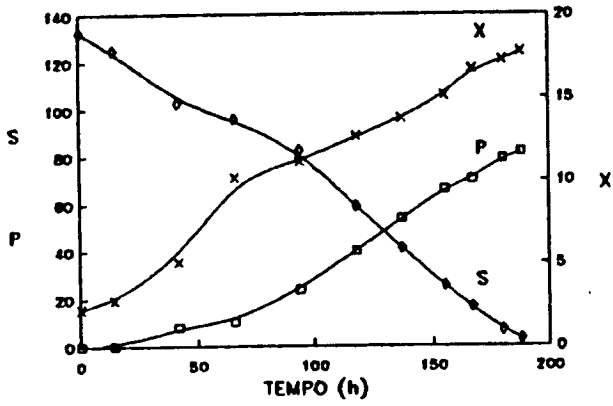


FIGURA B.5 - Dados do ENSAIO 5

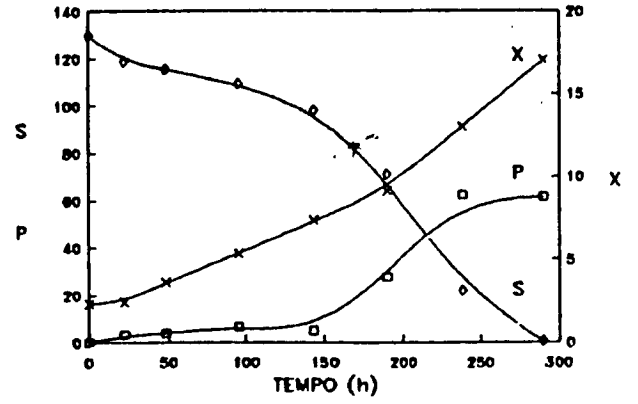


FIGURA B.6 - Dados do ENSAIO 6

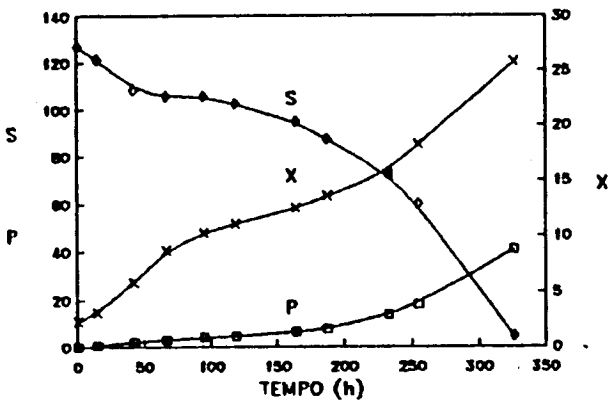


FIGURA B.7 - Dados do ENSAIO 7

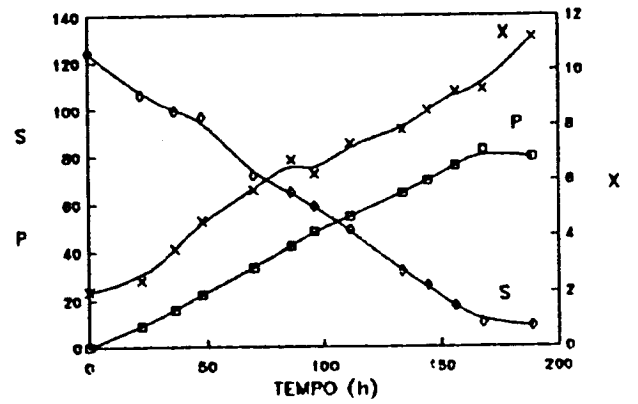


FIGURA B.8 - Dados do ENSAIO 8

ANEXO B (Continuação)

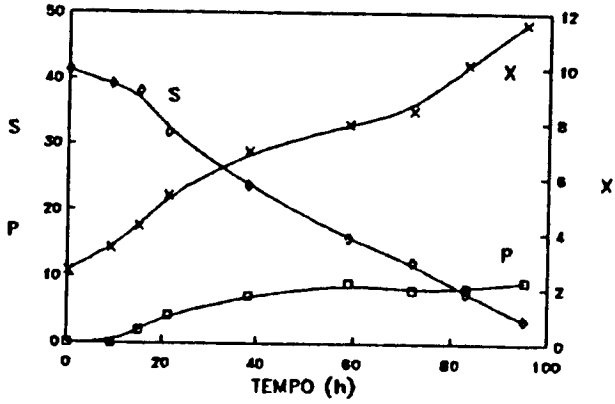


FIGURA B.9 - Dados do ENSAIO 9

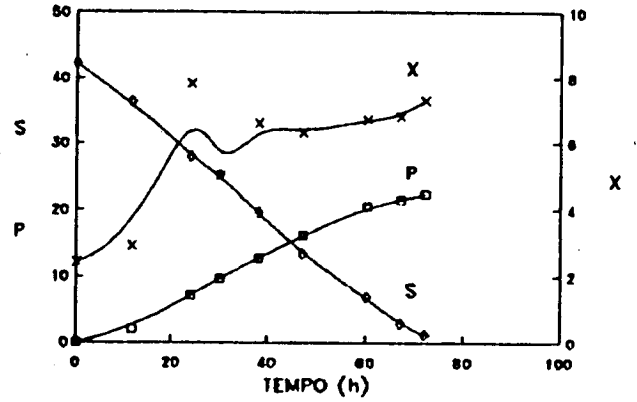


FIGURA B.10 - Dados do ENSAIO 10

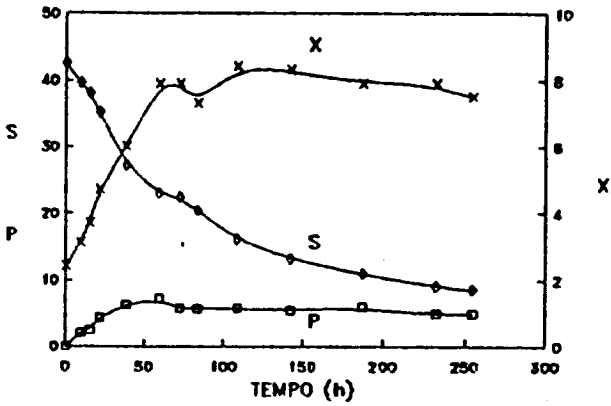


FIGURA B.11 - Dados do ENSAIO 11

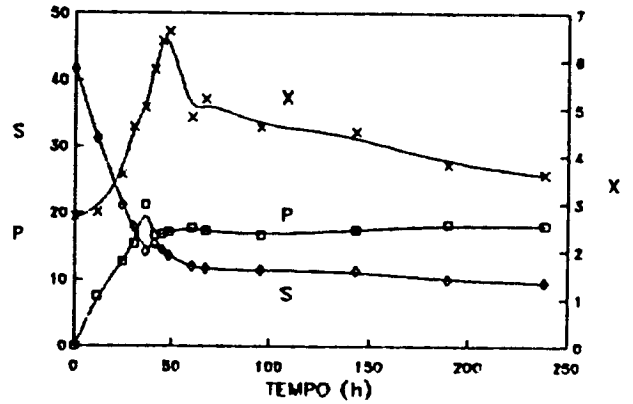


FIGURA B.12 - Dados do ENSAIO 12

ANEXO B (Continuação)

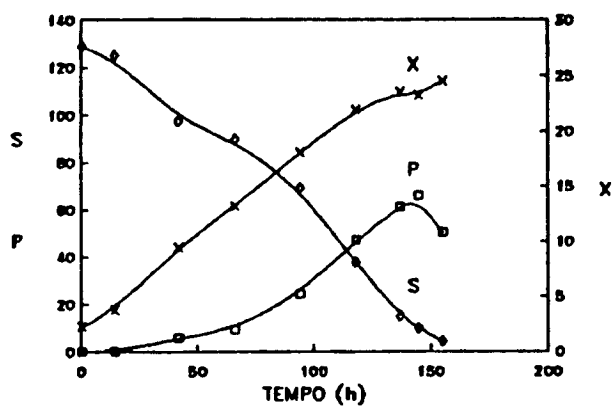


FIGURA B.13 - Dados do ENSAIO 13

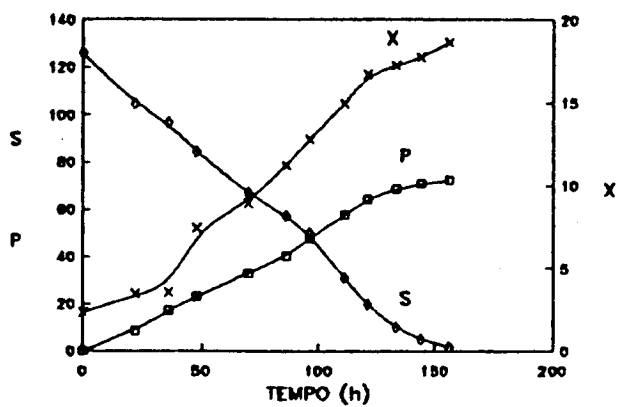


FIGURA B.14 - Dados do ENSAIO 14

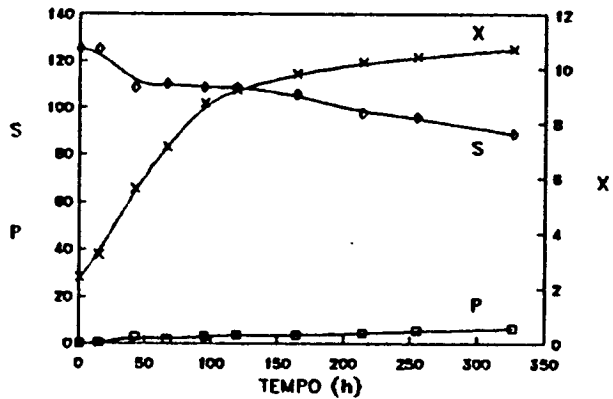


FIGURA B.15 - Dados do ENSAIO 15

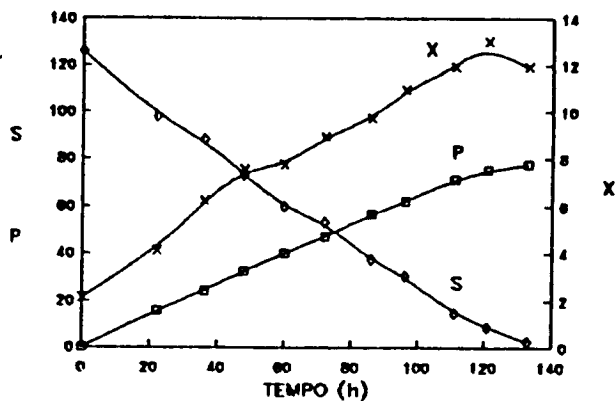


FIGURA B.16 - Dados do ENSAIO 16

ANEXO B (Continuação)

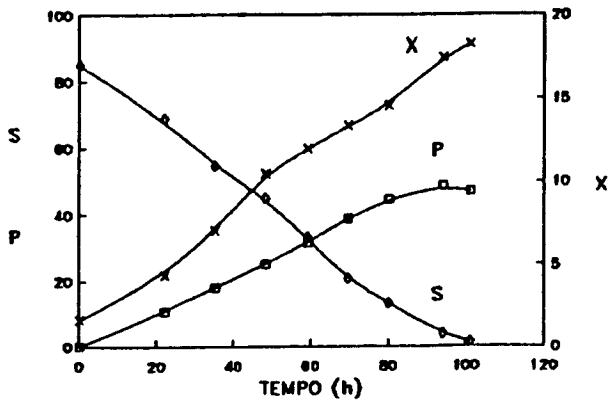


FIGURA B.17 - Dados do ENSAIO 17

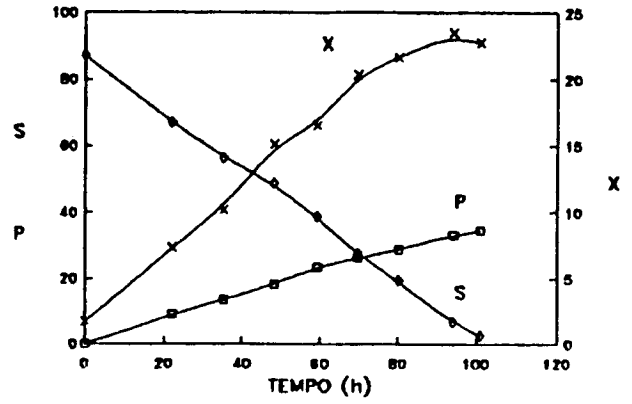


FIGURA B.18 - Dados do ENSAIO 18

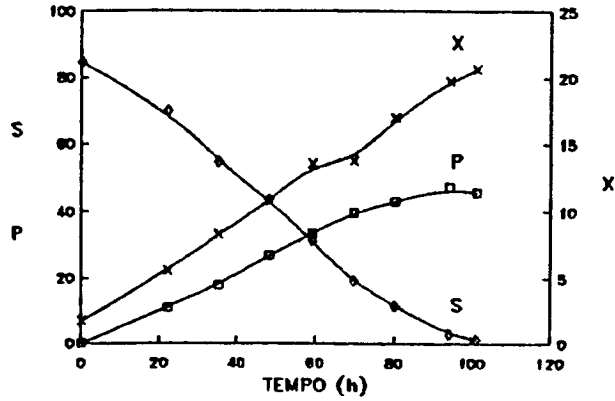


FIGURA B.19 - Dados do ENSAIO 19

ANEXO B (Continuação)

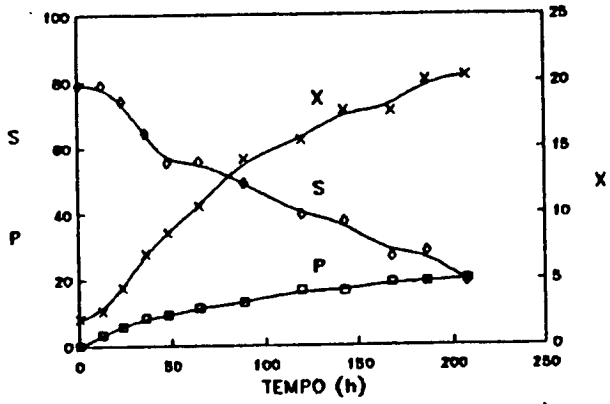


FIGURA B.20 - Dados do ENSAIO 20

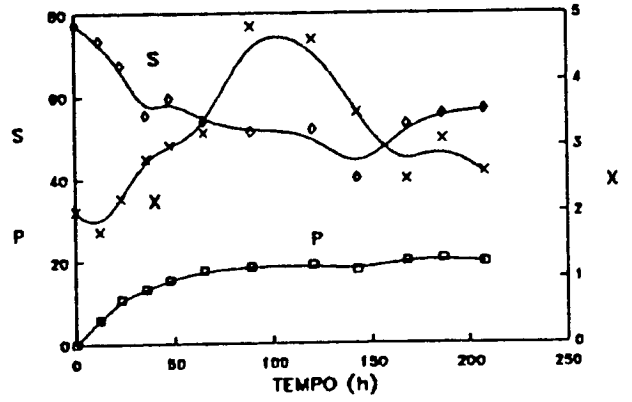


FIGURA B.21 - Dados do ENSAIO 21

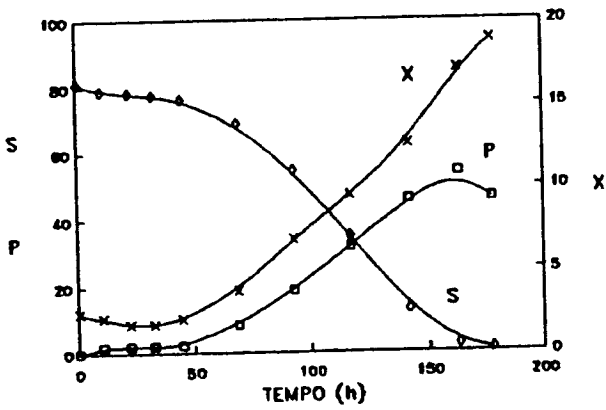


FIGURA B.22 - Dados do ENSAIO 22

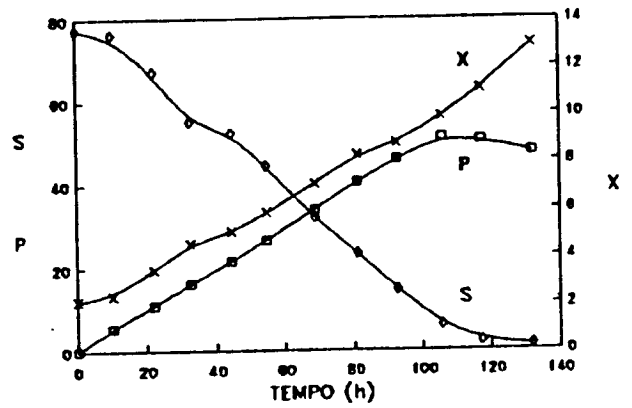


FIGURA B.23 - Dados do ENSAIO 23



ANEXO B (Continuação)

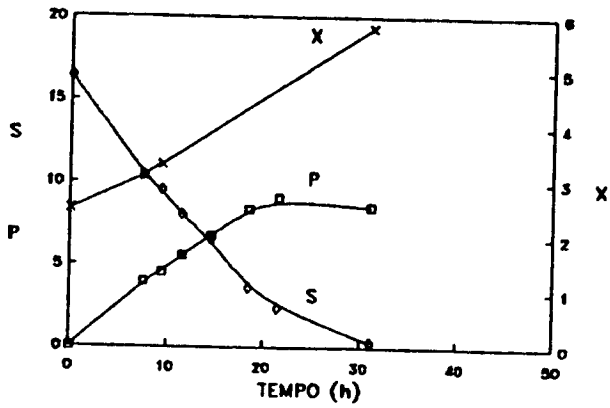


FIGURA B.24 - Dados do ENSAIO 24

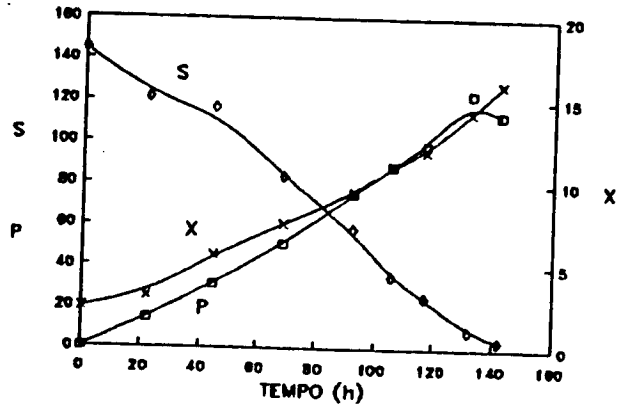


FIGURA B.25 - Dados do ENSAIO 25

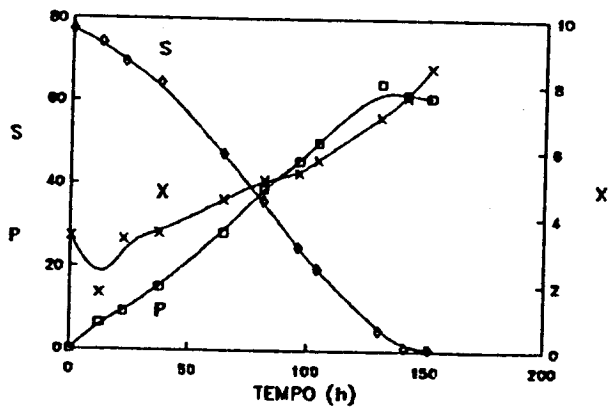


FIGURA B.26 - Dados do ENSAIO 26

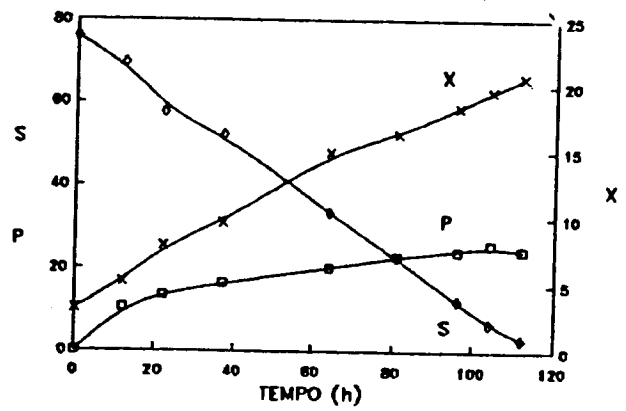


FIGURA B.27 - Dados do ENSAIO 27

ANEXO B (Continuação)

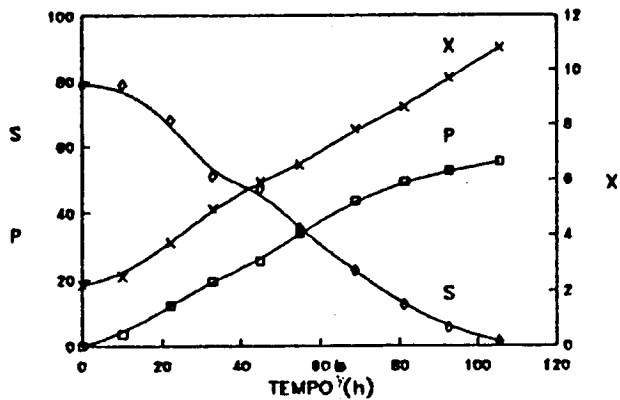


FIGURA B.28 - Dados do ENSAIO 28

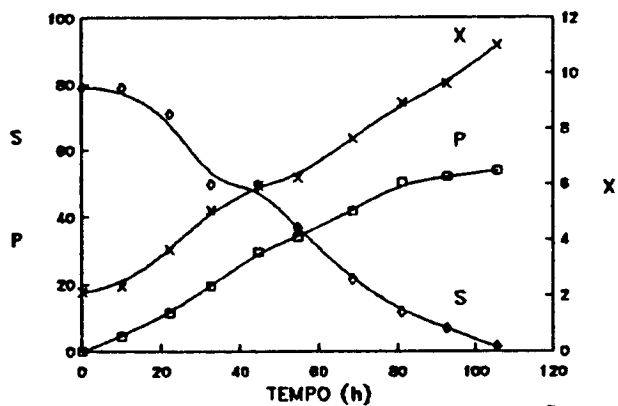


FIGURA B.29 - Dados do ENSAIO 29

ANEXO C

Exemplo do Procedimento Adotado para Calcular os Valores Experimentais de Rendimento e Produtividade em Xilitol

- Cálculo do rendimento em xilitol ( $Y_1$ )

Este cálculo foi realizado para cada ensaio, montando-se inicialmente uma tabela relacionando a concentração de xilose consumida ( $\Delta S = S_0 - S$ ) e a concentração de produto formado ( $\Delta P = P - P_0$ ), para cada amostra coletada.

Em seguida, os dados foram colocados em um gráfico de  $\Delta P$  versus  $\Delta S$  e correlacionados através de uma regressão linear, sendo que o valor do rendimento era igual ao coeficiente angular da equação obtida.

Exemplificando com os dados do ENSAIO 2,

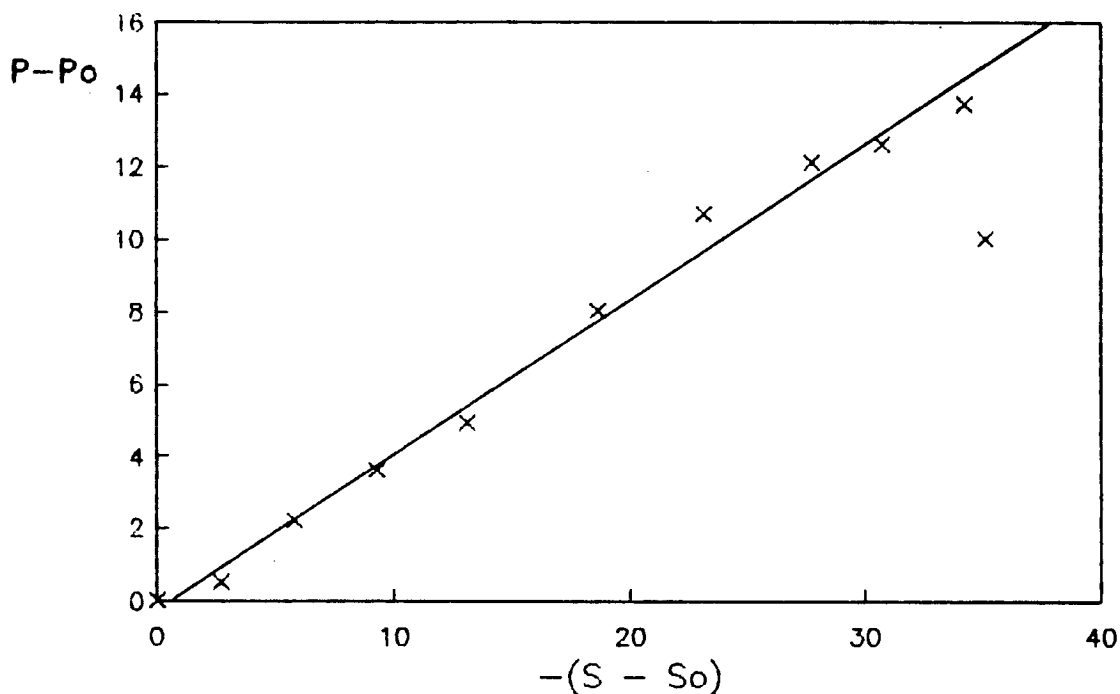
TABELA C.1 - Determinação de  $\Delta S$  e  $\Delta P$  a partir dos dados da fermentação para os dados do ENSAIO 2.

Amostra	S (g/l)	P (g/l)	$\Delta S$ (g/l)	$\Delta P$ (g/l)
t (h)				
0	42,2 ( $S_0$ )	0,0 ( $P_0$ )	0,0	0,0
11	39,5	0,5	2,7	0,5
24	36,4	2,2	5,8	2,2
36	33,0	3,6	9,2	3,6
48	29,1	4,9	13,1	4,9
70	23,6	8,0	18,6	8,0
95	19,1	10,7	23,1	10,7
143	14,5	12,1	27,7	12,1
189	11,5	12,6	30,7	12,6
238	7,1	10,0	35,1	10,0*
290	8,0	13,6	34,2	13,6

\* - ponto descartado

Observação: Antes de fazer a regressão, tomou-se o cuidado de eliminar os pontos finais onde a concentração de xilitol apresentou uma queda devido a re-assimilação do mesmo ou quaisquer outros pontos suspeitos de serem resultados de erros experimentais.

Construiu-se então a FIGURA C.1, obtendo-se a equação abaixo através de regressão linear de todos os dados de  $\Delta P$  versus  $\Delta S$  presentes na TABELA C.1, com exceção do ponto assinalado:



$$\Delta P = -0,247 + 0,429\Delta S \longrightarrow Y_1 = 0,429 \text{ g/g}$$

$$r = 0,995$$

FIGURA C.1 - Exemplo de cálculo do rendimento (dados do ENSAIO 2)

- Cálculo da produtividade em xilitol ( $Y_2$ )

Este cálculo foi feito diretamente, dividindo-se a concentração máxima de xilitol alcançada em cada ensaio pelo tempo de fermentação correspondente.

Assim, para o ENSAIO 2,

$$Y_2 = \frac{13,7 \text{ g/l}}{290 \text{ h}} = 0,047 \text{ g/lh}$$

## Cálculo do Erro Experimental e

## Propagação do Erro nos Parâmetros

a) Cálculo do erro experimental para o rendimento e para a produtividade

I - Ensaios do Planejamento Fatorial Inicial (Replicatas = ENSAIO 17, 18 e 19)

Ensaio em replicata	$Y_1$ (g/g)	$S_{11}^2$	$Y_2$ (g/lh)	$S_{12}^2$
17	0,602	0,002245	0,517	0,001985
18	0,407	0,008192	0,342	0,006272
19	0,596	0,001861	0,503	0,001201
Média	0,535	0,004099	0,454	0,003153

Erro Exper. (Desvio padrão)	0,064026	0,056149
--------------------------------	----------	----------

Dados:

$$S_1^2 = \frac{(Y_1 - \bar{Y})^2}{2} \quad \text{e} \quad S_p = (S_p^2)^{1/2}$$

onde,

$S_1^2$  = variância

$Y_1$  = valor da variável em cada replicata

$\bar{Y}$  = média das replicatas

$S_p^2$  = média das variâncias

$S_p$  = desvio padrão (erro experimental)

II - Ensaio do Planejamento Experimental Completo (Replicatas = ENSAIO 17, 18, 19, 28 e 29)

Ensaio em replicata	$Y_1$ (g/g)	$S_{11}^2$	$Y_2$ (g/lh)	$S_{12}^2$
17	0,602	0,000018	0,517	0,000722
18	0,407	0,020201	0,342	0,009385
19	0,596	0,000072	0,503	0,000288
28	0,719	0,006161	0,511	0,000512
29	0,717	0,005941	0,523	0,000968
Média	0,608	0,006479	0,479	0,002375

Erro Exper. (Desvio padrão)	0,080490	0,048734
--------------------------------	----------	----------

b) Propagação dos Erros Experimentais: Cálculo dos Erros nos Parâmetros

O cálculo do erro associado a cada parâmetro das CORRELAÇÕES 1.1, 1.2, 2.1 e 2.2 é realizado multiplicando-se o erro experimental correspondente à correlação por uma matriz de fatores de propagação obtida introduzindo as condições experimentais na forma de variáveis codificadas no Programa REGERR.

I - Para a CORRELAÇÃO 1.1 e a CORRELAÇÃO 2.1

Matriz dos Fatores de Propagação calculada pelo Progr. REGERR

THE INVERSE MATRIX IS

.052632	.000000	.000000	.000000	.000000
.000000	.062500	.000000	.000000	.000000
.000000	.000000	.062500	.000000	.000000
.000000	.000000	.000000	.062500	.000000
.000000	.000000	.000000	.000000	.062500

- CORRELAÇÃO 1.1

Erro Experimental nos Parâmetros	Matriz dos fat. de propagação	Variância (P.F.I.)	Extraindo as raízes
$\begin{bmatrix} E_{b_0} \\ E_{b_1} \\ E_{b_2} \\ E_{b_3} \\ E_{b_4} \end{bmatrix}$	$= \begin{bmatrix} 0,052632 \\ 0,062500 \\ 0,062500 \\ 0,062500 \\ 0,062500 \end{bmatrix}$	$\times 0,004099 =$	$\begin{bmatrix} 0,014689 \\ 0,016006 \\ 0,016006 \\ 0,016006 \\ 0,016006 \end{bmatrix}$

- Para a CORRELAÇÃO 2.1 :

Erro Experimental nos Parâmetros	Matriz dos fat. de propagação	Variância (P.F.I.)	Extraindo as raízes
$\begin{bmatrix} E_{b_0} \\ E_{b_1} \\ E_{b_2} \\ E_{b_3} \\ E_{b_4} \end{bmatrix}$	$= \begin{bmatrix} 0,052632 \\ 0,062500 \\ 0,062500 \\ 0,062500 \\ 0,062500 \end{bmatrix}$	$\times 0,003153 =$	$\begin{bmatrix} 0,012882 \\ 0,014038 \\ 0,014038 \\ 0,014038 \\ 0,014038 \end{bmatrix}$

II - Para a CORRELAÇÃO 1.2 e a CORRELAÇÃO 2.2





- CORRELAÇÃO 1.2

Erro Experimental nos Parâmetros	Matriz dos fat. de propagação	Variância (M.S.R.)	Extraindo raízes
E <sub>b0</sub>	0,170632		0,033249
E <sub>b1</sub>	0,047348		0,017515
E <sub>b2</sub>	0,047348		0,017515
E <sub>b3</sub>	0,047348		0,017515
E <sub>b4</sub>	0,047348		0,017515
E <sub>b11</sub>	0,073264		0,021787
E <sub>b22</sub>	0,073264		0,021787
E <sub>b33</sub>	0,073264	X 0,006479 =	0,021787
E <sub>b44</sub>	0,073264		0,021787
E <sub>b12</sub>	0,062500		0,020123
E <sub>b13</sub>	0,062500		0,020123
E <sub>b14</sub>	0,062500		0,020123
E <sub>b23</sub>	0,062500		0,020123
E <sub>b24</sub>	0,062500		0,020123
E <sub>b34</sub>	0,062500		0,020123

- CORRELAÇÃO 2.2

Erro Experimental nos Parâmetros	Matriz dos fat. de propagação	Variância (M.S.R.)	Extraíndo as raízes
E <sub>b0</sub>	0,170632	X 0,002375 =	0,020131
E <sub>b1</sub>	0,047348		0,010604
E <sub>b2</sub>	0,047348		0,010604
E <sub>b3</sub>	0,047348		0,010604
E <sub>b4</sub>	0,047348		0,010604
E <sub>b11</sub>	0,073264		0,013191
E <sub>b22</sub>	0,073264		0,013191
E <sub>b33</sub>	0,073264		0,013191
E <sub>b44</sub>	0,073264		0,013191
E <sub>b12</sub>	0,062500		0,012183
E <sub>b13</sub>	0,062500		0,012183
E <sub>b14</sub>	0,062500		0,012183
E <sub>b23</sub>	0,062500		0,012183
E <sub>b24</sub>	0,062500		0,012183
E <sub>b34</sub>	0,062500		0,012183

ANEXO E

Listagens finais das correlações obtidas através de regressão multilinear e não linear, utilizando recursos computacionais.

Valores dos coeficientes, dos erros de regressão e dos parâmetros estatísticos de ajuste.

I) Rendimento

- CORRELAÇÃO 1.1 : Valores dos coeficientes ajustados e parâmetros estatísticos ajustados pelo programa TREND.

COLUMN 1 = Y, COLUMN 2 = ESTIMATED Y, COLUMN 3 = DEVIATION

	1
1	.5163
2	.0906
3	-.0107
4	-.0033
5	-.0354

TREND SURFACE COEFFICIENTS 1 = CONSTANT TERM

SOURCE OF VARIATION	SUM OF SQUARES	DEGREES OF FREEDOM	MEAN, SQUARES	F-TEST,
REGRESSION	.15	4	.04	2.2472
DEVIATION	.24	14	.02	
TOTAL VARIATION	.39	18		
GOODNESS OF FIT =	.3910			
CORRELATION COEFFICIENT =		.6253		

Stop - Program terminated.

- CORRELAÇÃO 1.2 : Valores dos coeficientes ajustados e dos parâmetros estatísticos estimados pelo programa TREND.

```

      1
1      .6612
2      .1061
3      =.0090 ----
4      .0123
5      =.0629
6      =.0508
7      =.0131
8      =.0047
9      =.0502
10     .0726
11     .0337
12     .0336
13     =.0526
14     =.0219
15     .0057

```

TREND SURFACE COEFFICIENTS 1 = CONSTANT TERM

SOURCE OF VARIATION	SUM OF SQUARES	DEGREES OF FREEDOM	MEAN, SQUARES	F-TEST,
REGRESSION	.58	14	.04	2.0399
DEVIATION	.28	14	.02	
TOTAL VARIATION	.86	28		
GOODNESS OF FIT =	.6710			
CORRELATION COEFFICIENT =		.8192		
Stop - Program terminated.				

- CORRELAÇÃO 1.3 : Valores dos coeficientes ajustados, com os respectivos erros de regressão e parâmetros estatísticos de ajuste estimados pelo pacote estatístico STATGRAPHICS.

Como este programa não fornece diretamente o valor do Teste F, este foi determinado através da seguinte sequência de cálculos:

$$SCQM = STQM - SQD$$

$$MSQM = \frac{SCQM}{(NP - 1)}$$

$$MSQD = \frac{SQD}{(NE - NP)}$$

$$F = \frac{MSQM}{MSQD}$$

onde,

- STQM = soma total dos quadrados do modelo
- SQD = soma dos quadrados do desvio
- SCQM = soma corrigida dos quadrados do desvio
- NP = número de parâmetros
- NE = número de ensaios
- MSQM = média da soma dos quadrados do modelo
- MSQD = média da soma dos quadrados do desvio
- F = valor do teste F

-----  
 Model Fitting Results  
 -----

	estimate	stnd.error	ratio
Coefficient 1	.65017166	.04056949	16.0261
Coefficient 2	.10904050	.02680873	4.0674
Coefficient 3	-.06584173	.02680873	-2.4560
Coefficient 4	-.05056091	.03328839	-1.5189
Coefficient 5	-.04996598	.03328839	-1.5010
Coefficient 6	.07648515	.03080089	2.4832
Coefficient 7	.03758911	.03080089	1.2204
Coefficient 8	.02966832	.03080089	.9632
Coefficient 9	-.04866832	.03080089	-1.5801
Coefficient 10	-.02583663	.03080089	-.8388

Total iterations = 2

Total function evaluations = 23

-----  
 Analysis of Variance for the Full Regression  
 -----

source	sum of squares	df	mean square	ratio
Model	10.244346	10	1.024435	67.489735
Error	.288403	19	.015179	
Total	10.532749	29		
Total (corr.)	.882423	28		

R-squared = 0.673169

SCQM = 0,594020  
 MSQM = 0,066002  
 MSQD = 0,015179  
 F(9,19) = 4,348229

- CORRELAÇÃO 1.4 :Valores dos coeficientes ajustados, com os respectivos erros de regressão e os critérios estatísticos de ajuste estimados pelo programa STATGRAPHICS.

	estimate	std.error	ratio
Coefficient 1	.64989569	.04068271	15.9747
Coefficient 2	.10904347	.02688355	4.0561
Coefficient 3	-.06584272	.02688355	-2.4492
Coefficient 4	-.05043523	.03338130	-1.5109
Coefficient 5	-.04984899	.03338130	-1.4933
Coefficient 6	.07648515	.03088685	2.4763
Coefficient 7	-.04868812	.03088685	-1.5763

Total iterations = 2

Total function evaluations = 17

Analysis of Variance for the Full Regression

source	sum of squares	df	mean square	ratio
Model	10.196942	7	1.456706	95.434329
Error	.335807	22	.015264	

Total 10.532749 29 SCQM = 0,546616

Total (corr.) .882423 28 MSQM = 0,091103

R-squared = 0.619449

MSQD = 0,015264

F(6,22) = 5,968484

II) PRODUTIVIDADE

- CORRELAÇÃO 2.1 : Valores dos coeficientes ajustados e dos parâmetros estatísticos de ajuste estimados pelo programa TREND.

	1
1	.3018
2	.0550
3	-.0228
4	.0741
5	.0265

TREND SURFACE COEFFICIENTS 1 = CONSTANT TERM

SOURCE OF VARIATION	SUM OF SQUARES	DEGREES OF FREEDOM	MEAN SQUARES	F-TEST,
REGRESSION	.16	4	.04	1.4055
DEVIATION	.39	14	.03	
TOTAL VARIATION	.54	18		

GOODNESS OF FIT = .2865

CORRELATION COEFFICIENT = .5353

- CORRELAÇÃO 2.2 : Valores dos coeficientes ajustados e parâmetros estatísticos estimados pelo programa TREND.

	1
1	.4964
2	.0423
3	-.0049
4	.0953
5	.0012
6	-.1638
7	-.0480
8	.0590
9	-.0609
10	.0812
11	.0469
12	.0575
13	-.0326
14	-.0223
15	.0056

TREND SURFACE COEFFICIENTS 1 = CONSTANT TERM

SOURCE OF VARIATION	SUM OF SQUARES	DEGREES OF FREEDOM	MEAN SQUARES	F-TEST.
REGRESSION	.95	14	.07	4.6537
DEVIATION	.20	14	.01	
TOTAL VARIATION	1.16	28		
GOODNESS OF FIT =	.8231			
CORRELATION COEFFICIENT =		.9073		

Stop - Program terminated.

- CORRELAÇÃO 2.3 - Valores dos coeficientes ajustados, com os respectivos erros de regressão e dos parâmetros estatísticos de ajuste estimados pelo programa STATGRAPHICS.

Model Fitting Results

	estimate	std.error	ratio
Coefficient 1	.49638597	.04546844	10.9172
Coefficient 2	.04227003	.02395149	1.7648
Coefficient 3	.09531878	.02395149	3.9797
Coefficient 4	-.16380245	.02979376	-5.4979
Coefficient 5	-.04797823	.02979376	-1.6103
Coefficient 6	.05907407	.02979376	1.9828
Coefficient 7	-.06084951	.02979376	-2.0424
Coefficient 8	.08123762	.02751817	2.9521
Coefficient 9	.04687624	.02751817	1.7035
Coefficient 10	.05749505	.02751817	2.0893
Coefficient 11	-.03262871	.02751817	-1.1857
Coefficient 12	-.02224752	.02751817	-.8085

Total iterations = 2

Total function evaluations = 27

Analysis of Variance for the Full Regression

source	sum of squares	df	mean square	ratio
Model	4.322059	12	.360172	29.726949
Error	.205972	17	.012116	
Total	4.528031	29		
Total (corr.)	1.158609	28		

R-squared = 0.822225

SCQM = 0,952637

MSQM = 0,086603

MSQD = 0,012116

F(11,17) = 7,147851

- CORRELAÇÃO 2.4 : Valores dos coeficientes ajustados, com os respectivos erros de regressão e dos parâmetros estatísticos de ajuste estimados pelo programa STATGRAPHICS.

Model Fitting Results				
		estimate	stnd.error	ratio
Coefficient	1	.49638597	.04553942	10.9001
Coefficient	2	.04227003	.02398888	1.7621
Coefficient	3	.09531878	.02398888	3.9735
Coefficient	4	-.16380245	.02984027	-5.4893
Coefficient	5	-.04797823	.02984027	-1.6078
Coefficient	6	.05907407	.02984027	1.9797
Coefficient	7	-.06084951	.02984027	-2.0392
Coefficient	8	.08123762	.02756113	2.9475
Coefficient	9	.04687624	.02756113	1.7008
Coefficient	10	.05749505	.02756113	2.0861

Total iterations = 2

Total function evaluations = 23

Analysis of Variance for the Full Regression				
source	sum of squares	df	mean square	ratio
Model	4.297108	10	.429711	35.355935
Error	.230923	19	.012154	
Total	4.528031	29		
Total (corr.)	1.158609	28		

R-squared = 0.800689

SCQM = 0,927686

MSQM = 0,103076

MSQD = 0,012154

F(9,19) = 8,480848