

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

***“ESTUDO DA RECUPERAÇÃO DO XILITOL PRODUZIDO POR
FERMENTAÇÃO DO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR
UTILIZANDO ZEÓLITAS”***

Autor: Tihany Morita Antero dos Santos
Orientador: Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Unicamp para obtenção do título de
Doutor em Engenharia de Alimentos

Campinas-2004

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

Sa59e Santos, Tihany Morita Antero dos
Estudo da recuperação do xilitol produzido por fermentação
do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando zeólitas /
Tihany Morita Antero dos Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Francisco Maugeri Filho
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Xilitol. 2.Fermentação. 3.Separação (Tecnologia).
4.Zeólitas. I.Maugeri Filho, Francisco. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.
III.Título.

CARS-FEA

BANCA EXAMINADORA

Francisco Maugeri Filho
DEA/FEA/UNICAMP

César Costapinto Santana
DPB/FEQ/UNICAMP

Eliana Setsuko Kamimura
ZEA/FZEA/USP

Hélia Harumi Sato
DCA/FEA/UNICAMP

Maria Lúcia Gonsales da Costa Araújo
DBTQ/IQ/UNESP

Maria das Graças de Almeida Felipe
DEBIQ/FAENQUIL

Maria Isabel Rodrigues
DEA/FEA/UNICAMP

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de diferentes maneiras, contribuíram para a conclusão desta tese:

A Deus pelo dom da sabedoria. À Nilza e Morita pela vida. Ao Renato pelo apoio contínuo e ao professor Francisco pela firme condução nesta jornada.

Ao professor Silvio pelo constante apoio e à banca examinadora pelas sugestões e correções.

À minha família campineira, Lú, Mauro e José Otávio, pelas inúmeras doces hospedagens.

Aos queridos amigos dos laboratórios LEB e GPF, pelos momentos de alegria e de partilha.

À FAENQUIL por disponibilizar os recursos ali existentes.

À FAPESP pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1- Xilitol	3
2.1.1- Propriedades e aplicações	3
2.1.2- Métodos de obtenção	5
2.2- Hidrolisados como matéria-prima para a obtenção de xilitol	7
2.3- Zeólitas	10
2.3.1- Definição e propriedades	10
2.3.2- Estrutura	10
2.3.3- Zeólitas A, X e Y	12
2.3.4- Aplicações	13
2.4- Separação de açúcares e polióis	14
2.4.1- Métodos de separação	14
2.4.2- Variáveis que influenciam a separação	18
2.4.3- Princípio da separação em zeólitas	19
3- MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1- Zeólitas	21
3.2- Troca Iônica	22
3.3- Ensaios iniciais para seleção da zeólita	22
3.4- Caracterização das zeólitas	23
3.5- Metodologia de resposta a pulsos cromatográficos	23

3.6- Ensaios preliminares em coluna de leito fixo com as zeólitas NaWE e BaWE	24
3.7- Influência da granulometria de partícula na separação do xilitol	25
3.8- Determinação da constante de equilíbrio	25
3.9- Curva de ruptura	26
3.10- Planejamento experimental	26
3.11- Determinação da velocidade ótima da fase móvel	27
3.12- Análise estatística dos dados	28
3.13- Ensaios utilizando etanol e acetona como eluente	28
3.14- Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	29
3.14.1- Obtenção	29
3.14.2 – Concentração	29
3.15- Métodos de tratamento do hidrolisado	29
3.15.1- Variação de pH/adição de carvão ativo:	29
3.15.2- Emprego da resina aniônica A-103S	30
3.15.3- Emprego de carvão ativo	30
3.15.4- Emprego de resinas de troca iônica	30
3.16- Microrganismo e preparação do inóculo	31
3.17- Fermentação dos hidrolisados de bagaço de cana em frascos agitados	31
3.18- Obtenção de xilitol a partir do hidrolisado de bagaço de cana em reator de bancada	31
3.19- Separação do xilitol obtido por fermentação	32
3.20- Métodos analíticos	33
3.20.1- Análise de xilitol e carboidratos	33
3.20.2- Análise de furfural e hidroximetilfurfural	35
3.20.3- Análise de fenóis	35
3.20.4- Análise de celobiose e dos ácidos acético, glucurônico, fórmico e levulínico	35
3.20.5- Análise de manose, manitol e arabitól	36
3.20.6- Análise de íons metálicos	36
3.20.7- Análise de proteínas	36
3.20.8- Análise da massa celular	36
3.20.9- Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio	37

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1- Ensaios iniciais para seleção da zeólita	39
4.2- Caracterização das zeólitas	40
4.3- Ensaios preliminares em coluna de leito fixo com as zeólitas NaWE e BaWE	42
4.4- Influência da granulometria de partícula na separação do xilitol	46
4.5- Determinação da constante de equilíbrio	48
4.6- Curva de ruptura	53
4.7- Planejamento experimental	54
4.8- Determinação da velocidade ótima da fase móvel	60
4.9- Avaliação da influência de diferentes eluentes na separação do xilitol	62
4.9.1- Etanol	62
4.9.2- Acetona	64
4.10- Caracterização do hidrolisado de bagaço natural e concentrado	66
4.11- Tratamento e fermentação dos hidrolisados	67
4.12- Fermentação em reator de bancada do hidrolisado tratado com resinas de troca iônica	71
4.13- Separação do xilitol obtido por fermentação em reator de bancada	74
5- CONCLUSÕES	83
6- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	85
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Unidades de construção primária das zeólitas	11
Figura 2- Estrutura das zeólitas do tipo A	12
Figura 3- Estrutura das zeólitas do tipo X e Y	13
Figura 4- Perfil de eluição de xilitol, xilose e arabinose em coluna empacotada com a zeólita NaWE com granulometria entre 53-125 μm a 30 $^{\circ}\text{C}$ (A) e 50 $^{\circ}\text{C}$ (B)	44
Figura 5- Perfil de eluição de xilitol, xilose e arabinose em coluna empacotada com a zeólita BaWE com granulometria entre 53-125 μm a 30 $^{\circ}\text{C}$ (A) e 50 $^{\circ}\text{C}$ (B)	45
Figura 6- Perfil de eluição de xilitol, xilose e arabinose em coluna empacotada com a zeólita BaWE com granulometria entre 125-250 μm (A) e 250-425 μm (B)	47
Figura 7- Isoterma de adsorção de xilitol em zeólita BaWE a 50 $^{\circ}\text{C}$	48
Figura 8- Perfis de concentração de xilitol obtidos em diferentes vazões de alimentação a 50 $^{\circ}\text{C}$ em leito fixo de zeólita BaWE	50
Figura 9- Tempo de retenção do xilitol versus altura de leito/velocidade intersticial (L/v_1) a 50 $^{\circ}\text{C}$	51
Figura 10- Perfis de concentração de arabinose obtidos em diferentes vazões de alimentação a 80 $^{\circ}\text{C}$ em leito fixo de zeólita BaWE	52
Figura 11- Tempo de retenção da arabinose versus altura de leito/velocidade intersticial (L/v_1) a 80 $^{\circ}\text{C}$	52
Figura 12- Curva de ruptura em leito de zeólita BaWE utilizando uma solução constituída de xilitol, xilose e arabinose	54
Figura 13- Superfície de resposta para a eficiência de separação xilitol/arabinose em função da temperatura (T) e da velocidade superficial (v_s)	58
Figura 14- Gráfico típico de van Deemter	61
Figura 15- Dados de HETP versus velocidade da fase móvel para xilitol e arabinose a 80 $^{\circ}\text{C}$	61
Figura 16- Perfil de eluição de xilitol, xilose e arabinose em leito de zeólita BaWE eluído com etanol a 30 % (v/v)	64
Figura 17- Valores de fator de rendimento $Y_{P/S}$ e produtividade volumétrica Q em xilitol das fermentações dos hidrolisados tratados com variação de	

pH/carvão ativo (A), resina A103-S (B), carvão ativo (C) e resinas de troca iônica (D)	70
Figura 18- Consumo de xilose, glicose, arabinose e ácido acético e produção de xilitol durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar	74
Figura 19- Esquema simplificado dos processos de fermentação e separação de xilitol	75
Figura 20- Perfil de eluição de xilitol, xilose e arabinose em 2 colunas de zeólita BaWE com altura total de leito igual a 89 cm e $V_p/V_I = 0,08$	79
Figura 21- Perfil de eluição de xilitol, xilose e arabinose em 3 colunas de zeólita BaWE e $V_p/V_I = 0,08$	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características e propriedades físico-químicas do xilitol	4
Tabela 2- Doçura relativa e valor calórico de alguns polióis	5
Tabela 3- Denominação das zeólitas Baylith 415, Baylith WE 894 e Na ₈₆ X trocadas com diferentes cátions	21
Tabela 4- Características das zeólitas Baylith 415, Baylith WE 894 e Na ₈₆ X em suas formas catiônicas originais (CaA, NaWE e NaX)	21
Tabela 5- Variáveis e níveis avaliados no planejamento experimental	26
Tabela 6- Matriz do delineamento experimental	27
Tabela 7- Condições de análise de xilitol, arabinose e xilose por HPAEC-PAD em coluna PA100	34
Tabela 8- Volume de poro e porcentagens de óxido de alumínio e silício da zeólita NaWE	40
Tabela 9- Densidade, área superficial e porcentagem de Na ₂ O nas zeólitas NaWE e BaWE	41
Tabela 10- Eficiência de separação do xilitol (ES) utilizando as zeólitas NaWE e BaWE a 30 °C e 50 °C	42
Tabela 11- Eficiência de separação (ES) do xilitol utilizando zeólita BaWE em diferentes granulometrias	46
Tabela 12- Eficiências de separação (ES) do xilitol obtidas nos ensaios realizados segundo o planejamento fatorial 2 ³	55
Tabela 13- Estimativa dos efeitos, erro – padrão, teste t de “Student” e valor de “p” para ES xilitol/arabinose segundo o planejamento fatorial 2 ³	56
Tabela 14- ANOVA para o planejamento fatorial 2 ³ para a ES xilitol/arabinose	57
Tabela 15- Estimativa dos efeitos, erro – padrão e teste t de “Student” e valor de “p” para ES xilitol/xilose segundo o planejamento fatorial 2 ³	59
Tabela 16- ANOVA para o planejamento fatorial 2 ³ para a ES xilitol/xilose	60
Tabela 17- Eficiência de separação (ES) do xilitol em coluna de zeólita utilizando diferentes concentrações de etanol (% em v/v)	62
Tabela 18- Parâmetros de separação do xilitol em coluna de zeólita BaWE utilizando diferentes concentrações de acetona (% em v/v)	65
Tabela 19- Composição parcial do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar natural (HN) e concentrado (HC), expressa em g.L ⁻¹	66

Tabela 20- Concentração dos compostos tóxicos nos hidrolisados concentrado (HC) e tratados, expressa em g.L ⁻¹	67
Tabela 21- Concentração dos compostos tóxicos no hidrolisado natural (HN), no tratado com carvão ativo e no tratado/concentrado, expressa em g.L ⁻¹	69
Tabela 22- Composição inicial e final do meio fermentação contendo hidrolisado de bagaço de cana, expressa em g.L ⁻¹	72
Tabela 23- Parâmetros de separação do xilitol proveniente de solução sintética e de meio fermentado em coluna de zeólita BaWE	76
Tabela 24- Eficiências de separação do xilitol (ES) em função do número de colunas de leito fixo de zeólita BaWE e do volume do pulso de alimentação	77
Tabela 25- Composição das frações obtidas do ensaio com 2 colunas de zeólita BaWE e volume de pulso igual a 8 % do volume do leito, expressa em %	78

RESUMO

O xilitol é um açúcar-álcool com ampla utilização na indústria alimentícia, porém mesmo sendo numerosos os estudos sobre a sua produção a partir da fermentação de hidrolisados hemicelulósicos, poucos são os trabalhos que tratam da sua separação e purificação. O objetivo principal deste trabalho é, portanto, desenvolver uma metodologia de separação do xilitol dos compostos remanescentes no meio fermentado obtido por fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar por *Candida guilliermondii*.

Inicialmente, ensaios conduzidos com as zeólitas Na₈₆X, Baylith 415 e Baylith WE 894 em diferentes formas catiônicas permitiram constatar a maior eficácia das zeólitas NaWE e BaWE na adsorção do xilitol e posteriormente, o uso de colunas de leito fixo empacotadas com estas duas zeólitas em diferentes granulometrias, a 30 e 50 °C, revelou que a separação do xilitol foi superior com o uso da zeólita BaWE com partículas de 53-125 µm a 50 °C. Estas condições foram empregadas na determinação da constante de equilíbrio deste composto usando a resposta a pulsos cromatográficos, sendo o valor obtido igual a 1,03.

Os efeitos da temperatura, da velocidade superficial e da razão volume de pulso/volume de leito (Vp/VI) sobre a separação do xilitol foram investigados através de análise estatística de experimentos delineados por um planejamento fatorial 2³, que revelou que a condição mais favorável para separar o xilitol envolve o uso de temperatura de 80 °C, velocidade superficial de 0,5 cm.min⁻¹ e Vp/VI igual a 0,2. O emprego de etanol e acetona em diferentes concentrações como eluentes permitiu concluir, após avaliação das eficiências obtidas e do custo dos mesmos, que o etanol a 30 % é o eluente mais adequado para ser utilizado na separação do xilitol.

Após a determinação dos parâmetros de separação em meio sintético, iniciaram-se os testes com meio fermentado, obtido da fermentação de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com *Candida guilliermondii*. Dentre as metodologias

empregadas na destoxificação deste meio, o uso de resinas de troca iônica foi o mais eficiente, permitindo obter maiores parâmetros fermentativos.

A avaliação da separação do xilitol obtido por fermentação foi realizada variando-se o número de colunas e o volume do pulso e os melhores resultados foram obtidos utilizando-se 2 e 3 colunas de zeólita BaWE alimentadas com volume de pulso igual a 8 % do volume do leite. Apesar das eficiências de separação terem sido superiores com 3 colunas, verificou-se que a porcentagem de xilitol nas frações enriquecidas e a quantidade recuperada deste poliol foram somente ligeiramente superiores às obtidas em sistema com 2 colunas (0,5 e 2,1 % superiores, respectivamente). Além deste fato, o sistema de 2 colunas contribuiu para uma eluição mais rápida dos compostos e requereu menor volume de eluente. Estas observações permitiram concluir que dentre os sistemas experimentais avaliados, o composto por 2 colunas de zeólita BaWE com altura total de leite de 89 cm, alimentadas com volume de pulso igual a 8 % do volume do leite, a 80 °C e 0,5 cm.min⁻¹ conduziu a uma melhor separação do xilitol. Nestas condições obteve-se uma fração com 97,28 % de xilitol, 0,84 % de arabinose, 0,82 % de xilose e 0,54 % de arabitol e eficiências de separação de 3,17 e 2,72 com relação a arabinose e a xilose, respectivamente.

ABSTRACT

Xylitol is a sugar alcohol with large utilization in food industry. Nevertheless, although there are numerous studies on its production from the fermentation of hemicellulosic hydrolysates, there are few works dealing with its separation and purification. The principal aim of this work is, therefore, to develop a methodology for xylitol separation from the compounds remaining in the fermented medium, which was obtained by fermentation with *Candida guilliermondii* in sugar cane bagasse hydrolysate.

Initially, assays were conducted with the zeolites Na₈₆X, Baylith 415 and Baylith WE 894 in different cationic forms, which permitted us to observe a higher effectiveness of zeolites NaWE and BaWE in the xylitol adsorption, and later, the use of fixed bed columns packed with these two zeolites in different granulometries, at 30 and 50 °C, revealed that the xylitol separation was better when 53-125 µm BaWE zeolite particles at 50 °C were utilized. These conditions were also employed for determining the equilibrium constant of this compound using the chromatographic pulse response technique, the value obtained being equal to 1.03.

The effects of temperature, superficial velocity and pulse volume/bed volume ratio (Vp/Vl) on the xylitol separation were investigated by means of statistical analysis of experiments described by a 2³ factorial design, which showed that the most favorable conditions for this separation are: temperature of 80 °C, superficial velocity of 0.5 cm.min⁻¹ and Vp/Vl of 0.2. The use of ethanol and acetone at different concentrations as eluents enabled us to conclude, after an evaluation of their costs and of the efficiencies obtained, that ethanol at 30 % is the most suitable eluent for xylitol separation.

After determining the parameters of separation in synthetic medium, tests were performed with fermented medium obtained from fermentation of sugar cane

bagasse hydrolysate with *Candida guilliermondii*. Of the methodologies employed for detoxification of this medium, the use of ion-exchange resins proved the most effective, giving higher fermentative parameters.

The separation of xylitol obtained from fermentation was evaluated by varying the number of columns and the pulse volume, the best results being attained with 2 and 3 columns of zeolite BaWE fed with a pulse volume equal to 8 % of bed volume. Although the separation efficiencies were enhanced by using 3 columns, it was observed that the amount of xylitol in the enriched fractions and its recovered amount were only slightly higher than those obtained using 2 columns (0.5 and 2.1 % higher, respectively). In addition, the 2-column system contributed to a more rapid elution of the compounds and required a lower eluent volume. It can therefore be concluded that, of the experimental systems that were evaluated, the one composed of two columns of zeolite BaWE with a bed 89 cm in total height and fed with a pulse volume equal to 8 % of bed volume, at 80 °C and 0.5cm.min⁻¹, led to a better xylitol separation. Under these conditions, the fraction obtained contained 97.28 % xylitol, 0.84 % arabinose, 0.82 % xylose and 0.54 % arabitol, and the efficiencies of xylitol separation from arabinose and xylose were 3.17 and 2.72 respectively.

1- INTRODUÇÃO

O xilitol foi descoberto há aproximadamente 113 anos por Bertrand, Fischer e Stahel. Relatos de sua cristalização a partir da hidrogenação de xilose altamente pura e de sua produção por microrganismos surgiram algumas décadas depois. Desde então tem se observado crescente o seu uso na nutrição parenteral e na dieta de diabéticos (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982).

Suas propriedades anticariogênicas foram notadas apenas no final dos anos de 1960 e efetivamente confirmadas nos estudos de Mäkinen (1976), que evidenciaram a redução em 90 % da incidência de novas cáries e a remineralização das lesões pré-existentes quando a sacarose foi substituída pelo xilitol. Outras descobertas do uso do xilitol na área médica têm sido recentemente divulgadas, como a possível utilização no tratamento da osteoporose (MATTILA; KNUUTTILA; SVANBERG, 1998).

A primeira produção de xilitol em larga escala ocorreu na Finlândia, em 1975, na planta da empresa Finnish Sugar Co. Ltd, com capacidade de produção de 3000 toneladas/ano (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982). O consumo mundial deste poliál é de 480.000 toneladas/ano e a companhia norte-americana Xyrofin, uma divisão da Cultor Food Science, é a líder na produção do xilitol, responsável por 80 % do mercado (PSZCZOLA, 1999).

Estudos como os de Sherman e Chao (1986), Ho, Ching e Ruthven (1987), Cheng e Lee (1992), Burkert (2003), Union Carbide Corporation (1984) e UOP Inc. (1988), atestam a eficiência das zeólitas na separação de açúcares e de polióis, notadamente em razão de sua estrutura cristalina, elevada área específica e estabilidade térmica. Entretanto, na literatura, apenas uma referência sobre o uso destes adsorventes na separação do xilitol foi encontrada, citando somente a separação em relação ao inositol (UNION CARBIDE CORPORATION, 1985a).

Assim, centra-se o presente estudo, pioneiro na abordagem do tema, no desenvolvimento de uma metodologia de separação do xilitol dos açúcares

presentes no meio fermentado a partir da utilização de zeólitas. Para a realização deste objetivo foram cumpridas as seguintes etapas:

a) Seleção de zeólitas promissoras na adsorção do xilitol, envolvendo testes em banho finito e ensaios preliminares em coluna de leito fixo;

b) Estudo da influência do diâmetro de partícula da zeólita selecionada na separação;

c) Determinação da constante de equilíbrio do xilitol;

d) Realização de um planejamento fatorial completo 2^3 para determinar se a temperatura, a velocidade superficial e a razão volume de pulso/volume de leito são significativas na separação do xilitol e quais condições são mais adequadas. Nesta etapa um ensaio por análise frontal permitiu estipular o máximo valor de volume de pulso/volume de leito a ser utilizado no planejamento;

e) Avaliação do uso de etanol e acetona como eluentes;

f) Avaliação de diferentes metodologias de destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, incluindo a execução de ensaios fermentativos dos hidrolisados tratados;

g) Obtenção do meio fermentado a ser utilizado nos ensaios de separação do xilitol proveniente do hidrolisado;

h) Avaliação da separação do xilitol obtido por fermentação.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1- Xilitol

2.1.1- Propriedades e aplicações

A descoberta da habilidade das leveduras em fermentar a xilose despertou grande interesse para a produção de insumos a partir desta pentose, dentre os quais o xilitol, um açúcar-álcool pentahidroxilado. O xilitol apresenta propriedades similares à sacarose, como o poder adoçante, a rápida dissolução na água e o reduzido valor calórico (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982) e é considerado uma substância GRAS (“generally recognized as safe” ou “geralmente reconhecida como segura”) pelo FDA (Food and Drug Administration), órgão regularizador de alimentos dos Estados Unidos. Pode ser ingerido por diabéticos (seu metabolismo não necessita de insulina) e, também, utilizado na redução de cáries e na remineralização de lesões por elas provocadas (MÄKINEN, 1976). O elevado calor de dissolução negativo, responsável pela sensação de frescor, assim como outras propriedades estão apresentadas na Tabela 1.

O xilitol também é capaz de inibir o crescimento das bactérias *Staphylococcus coagulase* e *S. pneumoniae* e deste modo pode ser utilizado no tratamento da otite (TAPIAINEN et al., 2002; UHARI; TAPIAINEN; KONTIOKARI, 2000) e da fibrose cística (ZABNER et al., 2000). A administração oral de xilitol a ratos impediu a progressão da osteoporose através do aumento da massa óssea (MATTILA; KNUUTTILA; SVANBERG, 1998).

Na indústria alimentícia é empregado em condimentos, produtos enlatados, gelatinas e gomas de mascar, entre outros, melhorando a cor, a textura, o sabor e a estabilidade destes produtos (HYVÖNEN; TÖRMA, 1983; MÄKINEN, 1976). Além destas melhorias, o xilitol não participa das reações de Maillard e não reduz o valor nutricional das proteínas presentes nos alimentos (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998). Na indústria farmacêutica o xilitol é incorporado em vitaminas, cremes e fios dentais, enxaguatórios bucais e

lavatórios nasais (PEPPER; OLINGER, 1988). Estes dois ramos industriais são os maiores responsáveis pelo mercado anual de U\$ 28 milhões (IOWA ENERGY CENTER, 2000).

Tabela 1- Características e propriedades físico-químicas do xilitol (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982; NABORS; GELARDI, 1991).

Fórmula empírica	$C_5H_{12}O_5$
Peso molecular	152,15 g.mol ⁻¹
Ponto de fusão	92-96 °C
Ponto de ebulição	216 °C (760 mm Hg)
pH (solução aquosa 10 %)	5-7
Densidade (solução aquosa)	10 %-1,03 g.mL ⁻¹ ; 60 %-1,23 g.mL ⁻¹
Solubilidade a 20 °C	63 g.100 g ⁻¹ solução
Viscosidade (solução aquosa a 20 °C)	10 %- 1,23 cP; 60 %- 20,63 cP
Calor de solução	34,8 cal.g ⁻¹

Entre os produtos que contém xilitol pode-se citar a goma de mascar *XyliFresh* (Leaf), que é adoçada totalmente com xilitol, o enxaguatório bucal *Spearmint Oral Rinse* (Epic), o creme dental *Sorriso Multi Ação* (Colgate-Palmolive) e a goma de mascar *Vivident* (van Melle), sendo os dois últimos, produtos da indústria brasileira.

Comparado a polióis como sorbitol, manitol, lactitol e eritritol, o xilitol apresenta maior doçura relativa (Tabela 2), no entanto, não é o menos calórico deles.

Tabela 2- Doçura relativa e valor calórico de alguns polióis (KRETCHMER; HOLLENBECK, 1991; NABORS; GELARDI, 1991; PSZCZOLA, 1999).

Poliol	Doçura relativa (%)	Valor calórico (kcal.g⁻¹)
Xilitol	100	2,4
Sorbitol	50-60	2,6
Maltitol	85-95	3
Manitol	50	1,6
Lactitol	30-40	2
Eritritol	70	0,2

2.1.2- Métodos de obtenção

O xilitol presente em frutas e vegetais pode ser obtido pela extração sólido-líquido, porém esta é uma tecnologia de alto custo devido à dificuldade de extração das pequenas quantidades deste polioli disponíveis nestas fontes.

A conversão química da xilose é o método industrial comumente utilizado na produção de xilitol. Entre os inconvenientes desta via estão o crítico processo de purificação da xilose e o emprego de altas temperaturas e pressões (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982), que contribuem para o elevado custo desta produção. Além disso, Mikkola e Salmi (2001) relatam que o catalisador utilizado, o níquel Raney, apresenta rápida desativação e é dificilmente separado do meio de reação.

A transformação da xilose para xilitol por via microbiológica é uma alternativa promissora à via química devido à utilização de condições reacionais mais brandas (redução dos custos energéticos) e à alta eficiência dos microrganismos na conversão xilose-xilitol, que segundo Morita (1998) pode ser de até 87,3 % da teórica. Apesar desta constatação, a única companhia que produz xilitol por fermentação é a coreana Bolak Co, que ao substituir o método

químico pelo microbiológico verificou redução de 50 % dos custos (BOLAK sweetens Korean biology industry with competitive material products, 2001).

Ressalta-se que ambos os métodos de produção utilizam resíduos da agroindústria como palha de arroz, bagaço de cana-de-açúcar, casca de aveia, sabugo de milho e madeiras. Um estímulo para viabilizar o uso do bagaço de cana na produção de xilitol é o grande montante gerado no Brasil, de 81 milhões de toneladas por ano, com um excedente de 11 milhões (VASCONCELOS, 2002).

2.1.2.1- Via química

A produção de xilitol por via química consiste inicialmente na hidrólise de resíduos lignocelulósicos ricos em xilana para a obtenção de um hidrolisado com alto teor de xilose, seguida da remoção de sais inorgânicos, impurezas orgânicas e cor do hidrolisado, por exclusão iônica. O fracionamento desta solução purificada por técnicas cromatográficas de troca iônica permite obter uma solução de xilose de alta pureza, que é então hidrogenada em altas temperaturas (80 a 140 °C) e pressões (até 50 atmosferas) na presença de um catalisador metálico, como o de níquel Raney. A solução de xilitol obtida é submetida a um fracionamento cromatográfico usando resinas de troca iônica para recuperar frações de xilitol de alta pureza, que então são cristalizadas (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982; MELAJA; HAMALAINEN, 1977).

2.1.2.2- Via microbiológica

Os primeiros passos da bioconversão da xilose por leveduras ocorrem pela ação das enzimas intracelulares xilose-redutase (EC 1.1.1.21) e xilitol-desidrogenase (EC 1.1.1.9) induzidas pela xilose e pelo xilitol, respectivamente, nos microrganismos fermentadores de xilose. Inicialmente a D-xilose é reduzida a xilitol pela enzima xilose-redutase dependente de NADPH ou NADH e o xilitol, pela ação da xilitol-desidrogenase dependente de NAD, é então oxidado à D-xilulose e

após a fosforilação a D-xilulose 5P entra na via das fosfopentoses (NOLLEAU et al., 1993). As coenzimas exigidas nas etapas iniciais do metabolismo da xilose são geradas na conexão da via das fosfopentoses com a via glicolítica (PRIOR; KILIAN; du PREEZ, 1989). A produção de xilitol é finalizada com a recuperação deste poliálcool do caldo fermentado, etapa imprescindível para obtenção de xilitol com alto grau de pureza.

A taxa de aeração é um dos parâmetros que exercem maior influência na produção de xilitol por microrganismos. Um suprimento limitado de oxigênio favorece a produção de xilitol, pois o NADH não é regenerado e como consequência o aumento na proporção NADH/NAD⁺ inibe a ação da xilitol desidrogenase e, portanto a oxidação do xilitol (KRUSE; SCHÜGERL, 1996). Outros parâmetros como pH, temperatura, concentração inicial de xilose, concentração e idade do inóculo são também fatores reguladores deste bioprocessamento.

2.2- Hidrolisados como matéria-prima para a obtenção de xilitol

A hidrólise de resíduos lignocelulósicos libera compostos tóxicos aos microrganismos que limitam o consumo da fonte de carbono e reduzem a cinética de crescimento (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMINGUEZ, 1998). Leonard e Hajny (1945 apud PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMINGUEZ, 1998, p.25) consideram como inibidores o ácido acético, furfural, hidroximetilfurfural, íons metálicos, compostos fenólicos, ácidos aromáticos, aldeídos e compostos derivados de extrativos.

A ação inibitória do ácido acético depende da concentração de sua forma não-dissociada, que é função do pH. Em meios com pH inferior a 4,75 este ácido se encontra na forma não-dissociada e pode difundir-se através da membrana citoplasmática, reduzindo o pH citossólico (PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000b; PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMINGUEZ, 1998). Em altas concentrações de ácido acético a capacidade da célula de bombear prótons para reduzir a queda do pH intracelular está esgotada, o que resulta na falta de ATP, dissipação da força

próton-motora e acidificação do citoplasma (RUSSEL, 1992). Entretanto, Felipe et al. (1995) constataram que a presença deste ácido em concentrações de até $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ estimulou o rendimento e a produtividade em xilitol por *Candida guilliermondii* durante fermentação em meio sintético.

O furfural e o hidroximetilfurfural exercem efeitos prejudiciais porque interferem na ação de várias enzimas da via glicolítica (SANCHEZ; BAUTISTA, 1988). Estes pesquisadores verificaram que o crescimento de *Candida guilliermondii* em meio sintético é inibido em concentrações acima de 1 g.L^{-1} de furfural e $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ de hidroximetilfurfural.

Os compostos fenólicos afetam a habilidade da membrana biológica em atuar como barreira seletiva e matriz enzimática. Apesar do mecanismo de inibição destes compostos ainda não estar bem elucidado, sabe-se que os fenólicos de baixo peso molecular são os mais tóxicos (HEIPIEPER et al., 1994, apud PALMQVIST; HAHN-HAGERDAL, 2000b).

Quando meios complexos como os hidrolisados hemicelulósicos são utilizados o efeito dos compostos tóxicos é sinérgico, ou seja, a ação acumulativa dos mesmos é provavelmente a causa de inibição do metabolismo celular (PREZIOSI-BELLOY; NOLLEAU; NAVARRO, 1997). Lohmeier-Vogel, Sopher e Lee (1998) relataram que os inibidores furfural, hidroximetilfurfural e acetato quando presentes individualmente em baixas concentrações no meio de cultivo não afetaram significativamente os parâmetros fermentativos, entretanto, quando adicionados juntos, o crescimento de *Pichia stipitis* foi inibido e o consumo de xilose foi bastante lento. Contudo, a toxicidade dos hidrolisados pode ser contornada com seu tratamento (destoxificação) com enzimas, carvão ativo, resinas de troca iônica, extração com solventes, aclimatização do microrganismo, neutralização ou a combinação destes, os quais promovem redução parcial ou total destes compostos, permitindo uma melhor fermentação dos hidrolisados hemicelulósicos (CRUZ et al., 1999; KRASTANOV, 2000; MARTON, 2002; RANATUNGA et al., 2000; SENE et al., 1998; VERDE, 1999).

Krastanov (2000) usou as enzimas lacase e tirosinase co-imobilizadas seguidas da adsorção com Polyclar e obteve decréscimo de 42-90 % das diferentes substâncias fenólicas avaliadas. Cruz et al. (1999) realizaram uma extração com acetato de etila no hidrolisado de eucalipto e conseguiram redução de 88 % dos compostos derivados da lignina.

Sene et al. (1998) estudaram a adaptação de *Candida guilliermondii* ao hidrolisado de bagaço de cana e concluíram que as células mais adaptadas possuem maior capacidade de metabolizar compostos tóxicos, observando consumo de 63 % de ácido acético por células adaptadas 4 vezes em hidrolisados com concentrações crescentes de xilose.

Empregando a variação de pH juntamente com carvão ativo em condições otimizadas (pH= 2,5 e T= 60 °C) Marton (2002) observou redução de 76,22 % de fenóis e 44,18 % de ácido acético.

Ranatunga et al. (2000) observaram decréscimo de 12, 70 e 66 % de fenóis, furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente, de um hidrolisado de madeira ao utilizar hidróxido de cálcio, porém, a concentração de ácido acético permaneceu inalterada. Segundo estes autores, a variação de pH teoricamente remove os inibidores por precipitação, convertendo-os quimicamente em formas não tóxicas. O efeito positivo deste tratamento também se deve à instabilidade dos inibidores em altos valores de pH (PALMQVIST; HÄGERDAL, 2000a).

Verde (1999) utilizou resinas para tratar o hidrolisado de bagaço de cana e observou remoção do ácido acético, do furfural, do hidroximetilfurfural e dos íons cobre, níquel, ferro e cromo, além de redução de 97,72 % dos fenóis. Rodríguez et al. (2000) propuseram um método de destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana baseado no emprego das resinas de troca iônica e verificaram decréscimos de 100 % de fenóis, 97 % do ácido acético e 60 % do furfural. Luo, Brink e Blanch (2002) verificaram que os compostos aromáticos e ácidos alifáticos foram removidos de um hidrolisado de madeira pela resina aniônica Dowex MWA-1, assim como o furfural e o hidroximetilfurfural.

O método mais econômico de destoxificação dos meios de cultivo é segundo Ranatunga et al. (2000) a alteração de pH com hidróxido de cálcio, porém, este tratamento causa decréscimo na concentração de xilose, como observado por Marton (2002). Entretanto, embora as resinas de troca iônica apresentem custo mais elevado, possuem vida útil longa e são constantemente reutilizadas por serem facilmente regeneradas, além de não reduzirem o teor de xilose (RODRÍGUEZ et al., 2000).

Ressalta-se que a comparação e a escolha entre os métodos de redução do teor de compostos tóxicos devem ser feitas levando-se em consideração tratamentos realizados na mesma matéria-prima (que deve ser hidrolisada em iguais condições) e também fermentações empregando-se o mesmo microrganismo, assim assegurando a presença de inibidores em concentrações similares.

2.3- Zeólitas

2.3.1- Definição e propriedades

As zeólitas são aluminossilicatos cristalinos e hidratados, com elementos dos grupos IA e IIA, que têm se destacado como adsorventes devido ao caráter microporoso, à dimensão de poro uniforme, à elevada área específica, à adsorção seletiva baseada nas dimensões moleculares, às propriedades de troca iônica e à estabilidade térmica (MOSCOU, 1991).

2.3.2- Estrutura

As zeólitas são formadas por uma rede tridimensional infinita de tetraedros de AlO_4 e SiO_4 , unidos uns aos outros pelo compartilhamento dos átomos de oxigênio (BRECK, 1974). No tetraedro de silício cada íon tem sua carga +4 balanceada pelos 4 oxigênios e, portanto, este tetraedro é eletricamente neutro.

Entretanto, cada tetraedro de alumínio tem uma carga residual -1, já que o alumínio trivalente está ligado a 4 oxigênios, fazendo com que cada tetraedro de alumínio precise de uma carga +1 proveniente do cátion na estrutura para manter-se neutro. Este cátion é geralmente o sódio, que pode ser substituído por troca iônica, um método útil para alterar as propriedades das zeólitas.

Os tetraedros de silício e alumínio (unidades de construção primária da zeólita) (Figura 1) combinam-se entre si formando as unidades de construção secundária, que podem ser cubos, prismas hexagonais ou octaedros. Os tetraedros estão arranados de tal maneira que as zeólitas apresentam uma estrutura aberta composta por canais ocupados por água e cátions (BHATIA, 1946). A congregação das unidades de construção secundária resulta na estrutura final das zeólitas.

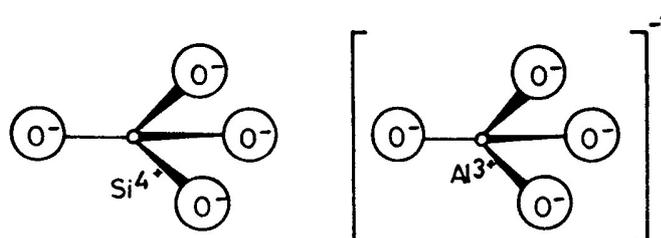
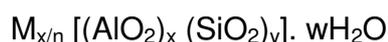


Figura 1- Unidades de construção primária das zeólitas (BHATIA, 1946).

A unidade celular (a menor unidade da estrutura) é, segundo Breck (1974), representada pela fórmula estrutural:



onde M é o cátion de compensação de valência n, w é o número de moléculas de água, y/x é a taxa que depende da estrutura (geralmente com valores entre 1 e 5) e a soma x+y é o número total de tetraedros na célula unitária da zeólita.

2.3.3- Zeólitas A, X e Y

As zeólitas sintéticas A, X e Y foram descobertas entre 1949 e 1954 (FLANIGEN, 1991) e consistem de tetraedros ligados que formam um octaedro-cubo denominado unidade de sodalita (BHATIA, 1946). De acordo com Bhatia (1946) a zeólita A é formada quando as unidades de sodalita estão ligadas através de anéis de 4 membros. A abertura do poro desta zeólita é determinada por anéis de 8 tetraedros (8-Ring) e apresenta diâmetro de poro de 4,2 Å. A cavidade resultante cercada pelas 8 unidades de sodalita tem diâmetro aproximado de 11,4 Å (Figura 2). Cada unidade de sodalita desta zeólita contém 24 tetraedros e a proporção Si/Al é próxima a 1.

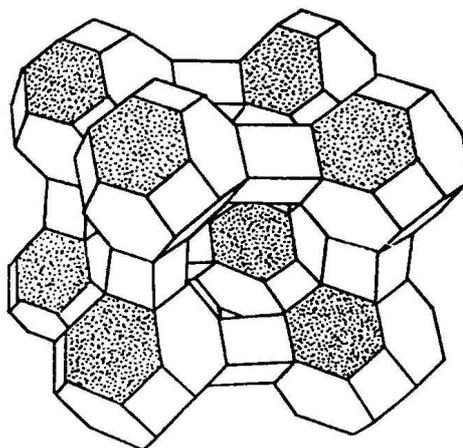


Figura 2- Estrutura das zeólitas do tipo A (KÄRGER; RUTHVEN, 1991).

As zeólitas X e Y apresentam estrutura mais aberta que a zeólita A e a mesma estrutura de rede da zeólita natural faujasita. A célula unitária destas zeólitas é composta por 8 unidades de sodalita conectadas por 16 prismas hexagonais (BRECK, 1974). Esta estrutura resulta em uma supercavidade rodeada por 10 unidades de sodalita, suficientemente grande para englobar uma esfera com diâmetro de 12 Å. A abertura nesta grande cavidade está ligada por unidades de sodalita, resultando em anéis de 12 tetraedros (12-Ring).

A célula unitária destas zeólitas consiste de 192 tetraedros e apresenta dimensão de 25 Å. De acordo Kärger e Ruthven (1991) uma das diferenças entre as zeólitas X e Y é a proporção Si/Al, que na zeólita X está na faixa de 1,0-1,5 e na zeólita Y é de 1,5-3,0. As demais diferenças são a ordenação de Si e Al nos tetraedros e a distribuição dos cátions (BURKERT, 2003). A estrutura das zeólitas X e Y está representada na Figura 3.

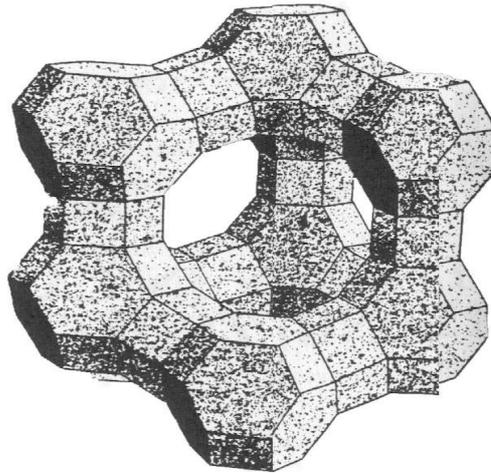


Figura 3- Estrutura das zeólitas do tipo X e Y (KÄRGER; RUTHVEN, 1991).

2.3.4- Aplicações

Somente dois séculos após a introdução do termo zeólita e com o trabalho pioneiro e sistemático de Barrer os químicos demonstraram interesse por estes aluminossilicatos. Atualmente a produção destes compostos inorgânicos é de $1,6 \cdot 10^6$ toneladas por ano (LIEBAU, 2003).

As zeólitas podem ser utilizadas na purificação de gases, como a separação de O_2 e N_2 , e de misturas líquidas. Uma vez que possuem alta capacidade de adsorção de água podem ser empregadas na secagem de gases e líquidos e na conservação de alimentos.

Processos de separação tais como o de oleofinas de parafinas, de isômeros de xileno, de carboidratos e de proteínas são freqüentemente mediados por

zeólitas, assim como processos de remoção de amônia da água potável, de íons metálicos de águas residuárias e de produtos de fissão radioativa presentes em efluentes radioativos.

As zeólitas substituíram em grande parte os fosfatos na tarefa de reduzir a dureza da água (trocando o sódio de sua estrutura pelo cálcio e magnésio presentes na água) e, portanto têm sido amplamente utilizadas como agentes seqüestrantes em detergentes. Esta utilização perfaz 68 % do mercado de zeólitas em volume.

A aplicação catalítica das zeólitas ocorre principalmente na indústria petroquímica, onde se tornaram indispensáveis, já que quase toda a gasolina é produzida com sua ajuda (GHOBARKAR; SCHÄF; GUTH, 1999). A catálise não é o maior segmento de mercado das zeólitas, mas é responsável por mais de 55 % do faturamento, já que os produtos obtidos usando estes catalisadores têm um valor muito maior do que os próprios catalisadores (SCHMIDT).

2.4- Separação de açúcares e polióis

2.4.1- Métodos de separação

A adsorção, em operações em batelada ou colunas (cromatografia), é um dos métodos utilizados em processos de separação de açúcares e polióis. Este fenômeno ocorre quando um soluto dissolvido (adsorbato) se liga a um adsorvente sólido através de forças intermoleculares relativamente fracas (adsorção física) ou de ligações químicas (adsorção química). A análise da adsorção é baseada no equilíbrio, então apresentado sob a forma de isotermas de adsorção. Estas isotermas relacionam a concentração do soluto na solução e na superfície do adsorvente.

As isotermas de adsorventes microporosos como as zeólitas são geralmente do tipo I, ou seja, côncavas em relação a abscissa, pois há um limite definido de saturação que corresponde ao preenchimento completo dos

microporos (RUTHVEN, 1984). No entanto, as isotermas de carboidratos em zeólitas apresentam de um modo geral comportamento linear (BURKERT, 2003; CHING et al., 1987; SCHÖLLNER; EINICKE; GLÄSER, 1993), podendo aproximar-se de outras isotermas em uma faixa limitada de concentração (BELTER; CUSSLER; HU, 1988). A separação de açúcares por cromatografia por adsorção utilizando zeólitas é relatada nas patentes da Union Carbide Corporation, que abordam a separação da arabinose dos açúcares glicose, manose e xilose empregando a zeólita BaX (UNION CARBIDE CORPORATION, 1985b) e a separação glicose/maltose em zeólita do tipo Y (UNION CARBIDE CORPORATION, 1987). Cheng e Lee (1992) também utilizaram uma zeólita do tipo Y (BaY) para separar frutose e glicose.

Quanto à separação do xilitol com zeólitas pode-se afirmar a existência de um único estudo, a patente da Union Carbide Corporation (1985a), que cita o emprego da zeólita NaX na separação do inositol de uma solução sintética contendo xilitol, com fator de separação de 4. Esta mesma patente investiga também a separação do inositol em relação a xilose e a arabinose, com fatores de separação de respectivamente 8,7 e 4,4.

Em comparação a resinas com diâmetros de partículas iguais, as zeólitas oferecem menos resistência à transferência de massa (HO; CHING; RUTHVEN, 1987); contudo a maioria dos trabalhos sobre separação de açúcares e polióis é realizada com resinas.

Melaja e Hamalainen (1977) empregaram uma resina trocadora de cátions na separação do xilitol de outros polióis e através da combinação das frações ricas em xilitol obtiveram 96 % deste composto. A patente da Suomen Xyrofin Oy (1992) relata a separação de xilitol dos açúcares e dos polióis remanescentes no meio fermentado utilizando uma resina de poliestireno sulfonada em ligações cruzadas com divinilbenzeno. Este estudo relata a obtenção de uma fração com 85 % de xilitol, 2 % de xilose, 1,7 % de arabinose e manose, 1,4 % de galactose, 0,4 % de glicose, 1,1 % de manitol e 8,5 % de outros compostos.

Gurgel et al. (1995) ao utilizarem uma resina trocadora de ânion fraca e outra trocadora de cátion forte, não verificaram efeito significativo na purificação do xilitol. A patente da Ajinomoto Co., Inc. (2003) cita a utilização de uma resina trocadora de cátions para separar a xilulose de uma mistura de xilitol e arabitól, seguida da cristalização para separar estes polióis, obtendo xilitol cristalino com 99,1 % de pureza. Anteriormente a eluição com resinas e cristalização, a solução contendo os polióis foi descolorida com carvão ativo e então concentrada.

A cromatografia em coluna de sílica gel seguida da cristalização das frações ricas em xilitol possibilitou recuperar 33 % deste poliól. No entanto, a extração supercrítica com dióxido de carbono mostrou-se ineficiente na recuperação deste poliól do meio fermentado (RICARDO FILHO, 2001).

Apesar do uso difundido das resinas, ressalta-se que as mesmas apresentam natureza orgânica e tendem a expandir quando expostas a soluções aquosas, fato que diminui a precisão das separações devido à mudança no volume do leito durante o processo (UNION CARBIDE CORPORATION, 1984).

Além dos métodos cromatográficos, outros métodos como a cristalização e o uso de membranas têm sido utilizados na separação de açúcares e polióis. Affleck (2000) propôs a utilização de membrana de polissulfona na separação do xilitol, observando a passagem de até 90,3 % do xilitol do meio fermentado e a retenção de até 53,6 % de materiais protéicos. A análise dos cristais do permeado isento de xilose revelou pureza de aproximadamente 87 % de xilitol e 11,5 % de arabinose. Faria, Pereira Júnior e Nóbrega (2002) avaliaram a separação do xilitol por membrana, obtendo um permeado com alto grau de pureza e ausente de macromoléculas de alto peso molecular.

Di Luccio et al. (2000) investigaram a separação de frutose de uma mistura de açúcares contida em um meio de fermentação com o uso de membrana polimérica microporosa e constataram a remoção da frutose do caldo fermentado. Ressalta-se que estes são sistemas potencialmente viáveis para economizar energia, porém um problema comum dos cristais de xilitol recuperados por

tratamento com membrana é a falta de remoção dos sais inorgânicos, que faz com que o rendimento e a pureza dos cristais de xilitol sejam menores (AFFLECK, 2000).

De Faveri et al. (2004) otimizaram a cristalização do xilitol e relataram o valor de sua supersaturação de 728 g.L^{-1} e a temperatura de resfriamento de $-6 \text{ }^{\circ}\text{C}$ como as melhores condições para o rendimento de cristalização (0,54) e o grau de pureza (0,97).

A cromatografia em leito fixo, técnica operacional empregada no presente estudo é um processo relativamente simples que oferece flexibilidade operacional e segundo Dechow (1989) apresenta menores taxa de escoamento, queda de pressão por unidade de comprimento da coluna e investimentos em relação aos sistemas móveis, que têm sido divulgados devido à maximização da transferência de massa e à necessidade de menores volumes de adsorvente e de eluente (Ernst; Hsu, 1989 apud NAVARRO et al. 1997, p.39). Felsing (2003) relata que os custos dos sistemas móveis como o leito móvel simulado (SMB) e do processo batelada são aproximadamente os mesmos em taxas de produção de 1 a 5 toneladas métricas/ano, o que indica que o uso do SMB só é economicamente viável quando a produção ocorre em larga escala.

A etapa de separação, independentemente da técnica a ser utilizada, sobrecarrega o custo total do processo e de acordo com Belter, Cussler e Hu (1988) é freqüentemente mais cara do que a manufatura inicial. Os gastos energéticos são os principais responsáveis pelos custos de uma planta industrial e em separações cromatográficas estão relacionados com a purificação das soluções diluídas (ROUSSEAU, 1987).

2.4.2- Variáveis que influenciam a separação

Entre as variáveis que influenciam a separação de carboidratos e polióis em colunas podem ser citadas a temperatura, a velocidade superficial, a fase móvel utilizada, a quantidade de amostra injetada e as dimensões da coluna.

A separação de açúcares é de um modo geral favorecida em temperaturas elevadas. De acordo com Ma (2001) a temperatura de operação deve estar na faixa de 60 a 85 °C para prevenir o crescimento de microrganismo no aparato experimental e melhorar o escoamento da solução de açúcares.

Quanto à influência da velocidade superficial em separações desta natureza, Bubnik et al. (2004) relataram que a eficiência de separação de uma mistura de sacarose-betaína aumentou com o decréscimo da taxa de escoamento, assim como observado por Matijašević, Vasić-Rački e Pavlović (1997) na separação de glicose e frutose. Segundo Cheng e Lee (1992) a lenta vazão pode dar ao componente preferido mais tempo para penetrar nos macroporos do adsorvente, resultando em melhores separações.

A patente da Danisco Sweeteners Oy (2003) relata a separação cromatográfica de diversos compostos utilizando o leito móvel simulado e cita que o eluente a ser empregado pode ser etanol, água ou mistura deles. A patente da Daicel Chemical Industries, Ltd. (2002) cita que para separar misturas que consistem de compostos farmacêuticos, agroquímicos ou alimentícios, o líquido dessorvente pode ser, por exemplo, um álcool como metanol, etanol ou isopropanol ou uma cetona como acetona, metiletil cetona ou ciclohexanona.

Uma melhora no grau de separação quando menores quantidades de adsorbato são utilizadas é relatada pela Union Carbide Corporation (1985b). Uma separação maior também foi observada por Lorenzo (2004) ao reduzir o volume do pulso contendo glicose e frutose de 4 para 1 mL. Cheng e Lee (1992) relataram aumento de 25 % na separação de frutose e glicose em zeólita na forma K^+ ao reduzir a quantidade injetada na coluna de 8 para 2 mL.

A determinação das dimensões ótimas de uma coluna cromatográfica depende de fatores como o tamanho da amostra, a concentração da solução e a capacidade do adsorvente (AVCI; ÇAMURDAN; ÜLGEN, 2000). Quando um alto grau de separação é exigido, é necessário o uso de colunas longas. Entretanto, quanto maior a coluna, maior também a quantidade de adsorvente necessária, tornando o produto cada vez mais diluído (UNION CARBIDE CORPORATION, 1985 b). Além deste fato, a utilização de grandes alturas de leito aumenta a queda de pressão e o custo da operação (ROUSSEAU, 1987). Portanto, é necessário que um processo ótimo de separação envolva colunas com alturas menores que a requerida para a separação completa dos picos e, também, envolva a separação da porção do efluente que contém a mistura dos picos e o reciclo desta na alimentação (UNION CARBIDE CORPORATION, 1985b).

O projeto da coluna deve levar em consideração a disponibilidade de espaço físico, as dificuldades de construção e a análise econômica. Assim sendo, deve-se aumentar o diâmetro das colunas ao invés do comprimento das mesmas. Nestas condições ressalta-se a necessidade de utilizar distribuidores de fluxo para garantir que a solução de alimentação e o eluente percorram toda a superfície do adsorvente, sem que haja a canalização dos fluidos (DECHOW, 1989).

Apesar dos avanços que têm sido realizados nas separações cromatográficas, como a modelagem e a simulação destes processos, a otimização e o escalonamento dos mesmos ainda são complicados devido ao grande número de parâmetros operacionais envolvidos (AVCI; ÇAMURDAN; ÜLGEN, 2000).

2.4.3- Princípio da separação em zeólitas

A seletividade de adsorção das zeólitas, que requer adsorção preferencial de um componente de uma mistura, está baseada nas diferenças no equilíbrio de adsorção e nas taxas de adsorção ou na exclusão por tamanho (efeito de peneira molecular) (RUTHVEN, 1988).

O efeito de peneira molecular é causado por diferenças no tamanho e/ou forma entre a abertura do cristal e a molécula de adsorbato (BRECK, 1974). As zeólitas que atuam como peneiras, pois nem todas a fazem, tem poros de tamanho uniforme (3 a 10 Å) que irão excluir completamente moléculas maiores que seu diâmetro. A ação destas peneiras pode ser total ou parcial. Se total, a difusão de uma espécie no sólido pode ser totalmente evitada enquanto a difusão de uma segunda espécie ocorre; se parcial, os componentes da mistura binária difundem-se no sólido em diferentes taxas (BRECK, 1974).

Um outro mecanismo de separação de carboidratos e polióis em zeólitas envolve a adsorção do tipo troca de ligantes do poliól no cátion zeolítico, com troca de moléculas de água ligadas ao cátion com um complexo multi-dentado de grupos hidroxil dos polióis ligados ao cátion. O poliól que formar um complexo tri-dentado será mais fortemente adsorvido que aquele que formar um complexo bi-dentado. As imposições geométricas e a localização dos cátions nas zeólitas, assim como a capacidade das moléculas grandes de açúcares e polióis em posicionar seus grupos hidroxil perto dos cátions para formar os complexos, são responsáveis pelo comportamento único de seletividade das zeólitas (Sherman; Chao, 1986).

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Zeólitas

As zeólitas utilizadas foram a Baylith 415 e a Baylith WE 894, ambas da Bayer e a Na₈₆X da Aldrich. Estas zeólitas foram trocadas com os cátions Na⁺¹, Ca⁺², Ba⁺² e K⁺¹, recebendo a denominação apresentada na Tabela 3. As características destas zeólitas em suas formas catiônicas originais estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 3- Denominação das zeólitas Baylith 415, Baylith WE 894 e Na₈₆X trocadas com diferentes cátions.

	Baylith 415	Baylith WE 894	Na₈₆X
Cátion			
Na ⁺¹	NaA	NaWE	NaX
Ca ⁺²	CaA	CaWE	CaX
Ba ⁺²	BaA	BaWE	BaX
K ⁺¹	KA	KWE	KX

Tabela 4- Características das zeólitas Baylith 415, Baylith WE 894 e Na₈₆X em suas formas catiônicas originais (CaA, NaWE e NaX).

	Baylith 415	Baylith WE 894	Na₈₆X
Característica			
Razão SiO ₂ /Al ₂ O ₃	1,49	3,47	5,29
Cátion original	Ca ⁺²	Na ⁺¹	Na ⁺¹ , NH ₄ ⁺¹
% Na ₂ O	—	10,57	2,45

3.2- Troca iônica

A troca do cátion de compensação original das zeólitas por outros (Na^{+1} , Ca^{+2} , Ba^{+2} e K^{+1}) foi baseada na metodologia utilizada por Silva (1998). As reações de troca iônica foram realizadas em batelada, em reator encamisado a 75 °C. Água deionizada foi adicionada à zeólita e o pH ajustado entre 5 e 6 com HCl 20 % (v/v). A solução do sal de troca foi então adicionada e a mistura agitada por 24 horas. A quantidade de sal para a troca foi calculada pelo número de equivalentes-grama de Na_2O presente na zeólita e a quantidade de zeólita de modo a resultar em 15 % de massa seca de adsorvente na suspensão. A determinação da umidade da zeólita foi realizada pelo aquecimento gradual da amostra em mufla até 800 °C.

Após as 24 horas de tratamento com solução salina a suspensão foi lavada 2 vezes em funil de Büchner; a primeira lavagem foi realizada a 75 °C com solução salina e água em volumes iguais aos utilizados no reator e a segunda lavagem com água, a 75 °C, em volume duas vezes superior ao do reator. Uma vez efetuadas as lavagens, a torta foi seca em estufa a 120 °C durante 24 horas.

3.3- Ensaio iniciais para seleção da zeólita

Ensaio de adsorção foram realizados com as zeólitas Baylith 415, Baylith WE 894 e Na_{86}X trocadas com os diferentes cátions a fim de selecionar as que melhor adsorvem o xilitol. Estes testes foram conduzidos utilizando o método do banho finito a 30 °C e consistiram da agitação prévia (140 rpm) de frascos contendo 1 g de zeólita e 5 mL de água durante 1 hora para hidratação deste adsorvente. Após este período adicionou-se uma solução de xilitol (30 g.L^{-1}) e as concentrações inicial e final das suspensões foram medidas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), conforme especificado no item 3.20.1.1.

3.4- Caracterização das zeólitas

As zeólitas NaWE e BaWE foram caracterizadas quanto à composição, densidade e área superficial, utilizando respectivamente espectrometria de emissão ótica por plasma com acoplamento induzido, picnometria à hélio e isotermas de adsorção de nitrogênio (método BET). Estas isotermas também foram utilizadas para determinar o volume de poro da NaWE. A porcentagem de troca do sódio, que expressa a eficiência da troca iônica, foi determinada pela expressão:

$$\text{PST} = \frac{\% \text{ inicial sódio} - \% \text{ final de sódio}}{\% \text{ inicial de sódio}} \quad (3.1)$$

3.5- Metodologia de resposta a pulsos cromatográficos

Os ensaios realizados de acordo com este método consistiram da alimentação de um pulso de adsorbato, de volume fixo, e posterior eluição do mesmo com um dessorvente, com vazão controlada por bomba peristáltica. As amostras que saíram da coluna foram coletadas por um coletor de frações RediFrac (Pharmacia Biotech).

Estes ensaios foram avaliados utilizando-se o parâmetro eficiência de separação (ES) como resposta, o qual foi definido de acordo com Lu e Lee (1987):

$$(\text{ES})_{12} = \frac{\Delta\mu_{12}}{\sigma_{12}} \quad (3.2)$$

sendo

$$\Delta\mu_{12} = |\mu_1 - \mu_2| \quad (3.3)$$

$$\sigma_{12} = (\sigma_1\sigma_2)^{1/2} \quad (3.4)$$

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^n C_i t_i \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n C_i \Delta t_i} \quad (3.5)$$

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n C_i (t_i - \mu)^2 \Delta t_i}{\sum_{i=1}^n C_i \Delta t_i} \quad (3.6)$$

onde μ e σ^2 são, respectivamente, o primeiro e o segundo momento para cada componente, C_i é a concentração do componente na fração i , t_i o respectivo tempo e Δt_i o intervalo de amostragem.

Alguns experimentos foram discutidos em termos do fator de seletividade (α), que é igual a:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \text{ ou } \frac{\mu_2}{\mu_1} \quad (3.7)$$

onde k é a constante de equilíbrio e μ o tempo de retenção ou primeiro momento dos componentes.

3.6- Ensaio preliminares em coluna de leito fixo com as zeólitas NaWE e BaWE

Os ensaios preliminares de separação do xilitol na presença dos açúcares arabinose e xilose foram realizados em coluna de vidro empacotada com as zeólitas NaWE e BaWE com granulometria de 53-125 μm , utilizando-se a metodologia de resposta a pulsos cromatográficos. Utilizou-se um leito de 25 cm, temperaturas de 30 e 50 $^\circ\text{C}$, vazão de 0,1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, volume de pulso de 2 mL e solução de alimentação contendo 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilitol, 0,9 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de arabinose e 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de xilose. As concentrações destes componentes foram determinadas por cromatografia líquida de íons (HPAEC-PAD) (item 3.20.1.2).

3.7- Influência da granulometria de partícula na separação do xilitol

Este estudo foi realizado em coluna de leito fixo de zeólita BaWE, variando-se a granulometria das partículas entre 53-125 μm , 125-250 μm e 250-425 μm . A metodologia de resposta a pulsos cromatográficos foi empregada a uma vazão de 0,1 mL.min⁻¹ e 50 °C, utilizando-se pulsos com volumes iguais a 2 mL e solução contendo 30 g.L⁻¹ de xilitol, 4 g.L⁻¹ de xilose e 3 g.L⁻¹ de arabinose. As amostras foram quantificadas por HPAEC-PAD (item 3.20.1.2).

3.8- Determinação da constante de equilíbrio

A constante de equilíbrio do xilitol foi determinada através de isotermas de adsorção com a zeólita BaWE em banho finito. Foram utilizados frascos herméticos agitados a 140 rpm a uma temperatura de 50 °C. Inicialmente foi realizada uma hidratação da zeólita (1 g) com água (5 mL) durante 1 hora e posteriormente foi efetuada a adição de 15 mL de soluções de xilitol de 30 a 150 g.L⁻¹. Amostras no tempo inicial e final foram retiradas e quantificadas por CLAE (item 3.20.1.1)

As curvas isotermas foram expressas em termos de q^* (quantidade de adsorbato adsorvida no equilíbrio) e C^* (concentração de adsorbato na solução, no equilíbrio), sendo q^* calculado pela diferença entre as concentrações inicial e de equilíbrio e relacionado com a massa seca de zeólita.

Com o propósito de confirmar o resultado obtido para a constante de equilíbrio do xilitol empregando-se o banho finito, utilizou-se o método de resposta a pulsos cromatográficos. Para a determinação de tal constante utilizou-se uma coluna de vidro (1 cm diâmetro interno x 25 cm comprimento) alimentada com um pulso de volume igual a 20 % do volume do leito e concentração de 30 g.L⁻¹, que foi eluído com água a vazões de 0,2 a 0,6 mL.min⁻¹, a 50 e 80 °C. A constante de equilíbrio da arabinose também foi determinada a 80 °C para verificar a

seletividade da zeólita BaWE em relação a este açúcar e ao xilitol. As frações foram quantificadas por HPAEC-PAD (item 3.20.1.3)

3.9- Curva de ruptura

A curva de ruptura foi obtida através da alimentação contínua (método de análise frontal) de uma solução contendo 30 g.L⁻¹ de xilitol, 4 g.L⁻¹ de xilose e 3 g.L⁻¹ de arabinose em coluna empacotada com a zeólita BaWE (53-125 µm) até a saturação do leito. A coluna com 1 cm de diâmetro interno e altura de leito de 15 cm foi mantida a 50 °C e a vazão utilizada foi de 0,2 mL.min⁻¹. As concentrações dos componentes foram determinadas por HPAEC-PAD (item 3.20.1.2).

3.10- Planejamento experimental

Na Tabela 5 estão apresentados os níveis e as variáveis do planejamento fatorial completo 2³, onde T é a temperatura (°C), vs é a velocidade superficial (cm.min⁻¹) e Vp/VI é o volume de pulso/volume de leito (adimensional).

Tabela 5- Variáveis e níveis avaliados no planejamento experimental.

	T	vs	Vp/VI
Níveis			
-1	50	0,5	0,2
0	65	1,5	0,45
+1	80	2,5	0,7

Os onze ensaios deste planejamento (incluídos os 3 pontos centrais) foram realizados em ordem aleatória utilizando o método de resposta a pulsos

cromatográficos, estando a matriz deste delineamento experimental demonstrada na Tabela 6. Uma coluna com 1 cm de diâmetro interno e 25 cm de comprimento foi alimentada com uma solução composta por 30 g.L⁻¹ de xilitol, 4 g.L⁻¹ de xilose e 3 g.L⁻¹ de arabinose, a qual foi eluída com água. As frações foram quantificadas por HPAEC-PAD (item 3.20.1.3).

Tabela 6- Matriz do delineamento experimental.

Nº experimento	T	vs	Vp/VI
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

3.11- Determinação da velocidade ótima da fase móvel

As velocidades ótimas da fase móvel para a separação do xilitol e da arabinose a 80 °C foram determinadas através gráfico de van Deemter, que relaciona a altura equivalente a um prato teórico (HETP) com a velocidade da fase móvel. A HETP foi obtida de acordo com a equação 3.8, utilizada por Ho, Ching e Ruthven (1987) e os parâmetros desta equação, por sua vez, a partir dos perfis de

concentração destes componentes determinados no item 3.8 pelo método de resposta a pulsos cromatográficos.

$$\text{HETP} = \frac{\sigma^2}{\mu} L \quad (3.8)$$

onde:

σ^2 ...segundo momento para o componente

μ ...primeiro momento para o componente

L...comprimento do leito

3.12- Análise estatística dos dados

Os resultados do planejamento foram tratados empregando-se o software Statistica versão 5.0.

3.13- Ensaio utilizando etanol e acetona como eluente

A avaliação da eficiência do etanol e da acetona como eluentes na separação do xilitol foi realizada utilizando o método de resposta a pulsos cromatográficos com soluções aquosas destes compostos nas concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50 % (v/v). Uma coluna de vidro com diâmetro interno de 1 cm e comprimento de 25 cm foi utilizada para eluir a solução composta por 30 g.L⁻¹ de xilitol, 4 g.L⁻¹ de xilose e 3 g.L⁻¹ de arabinose, empregando-se as melhores condições obtidas no planejamento, ou seja, temperatura de 80 °C, velocidade superficial de 0,5 cm.min⁻¹ e volume de pulso/volume de leito igual a 0,2. As amostras foram quantificadas por HPAEC-PAD (3.20.1.3).

3.14- Hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar

3.14.1- Obtenção

O hidrolisado foi obtido pelo tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com ácido sulfúrico na proporção de 130 mg de ácido por 1 g de bagaço seco a 121°C/30 min em reator de aço inoxidável de 250 L. Após a obtenção o hidrolisado ácido foi centrifugado para remoção de partículas sólidas.

3.14.2 – Concentração

A concentração foi realizada em evaporador a vácuo com capacidade de 4 L à temperatura de 70 °C e fator de concentração igual a 3. Após esta etapa o hidrolisado foi estocado em câmara fria a 0,8 °C.

3.15- Métodos de tratamento do hidrolisado

Foram realizados quatro diferentes tratamentos, abaixo descritos:

3.15.1- Variação de pH/adicação de carvão ativo:

O hidrolisado concentrado 3 vezes foi submetido à elevação do pH até 7,0 pela adição de óxido de cálcio comercial e à redução do pH para 5,5 com ácido fosfórico P.A. Após cada uma destas etapas a mistura foi filtrada a vácuo para remoção do precipitado formado. O hidrolisado neutralizado foi tratado com carvão ativo (tipo CDA-Brasilac) em uma proporção de 2,4 % (p/v), submetido à agitação de 200 rpm a 30 °C durante 1 hora e filtrado para eliminar o carvão ativo. Este tratamento foi realizado de acordo com o trabalho de Alves (1997).

3.15.2- Emprego da resina aniônica A-103S

Após elevação do pH do hidrolisado concentrado 3 vezes para 3,5 com óxido de cálcio, este foi centrifugado a 2000 rpm/15 min para remoção do precipitado formado. Uma alíquota de 500 mL deste hidrolisado foi tratada a temperatura ambiente com a resina A-103S (Purolite) empacotada em uma coluna de 2,5 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento. Após o tratamento esta resina foi regenerada com uma solução de NaOH 2 %.

3.15.3- Emprego de carvão ativo

Este tratamento consistiu na adição de carvão ativo (tipo CDA-Brasilac) em uma proporção de 2,4 % (p/v) ao hidrolisado natural (sem concentrar) em pH 0,92 e posterior agitação desta mistura a 200 rpm/1 hora a 30 °C, que foi então filtrada e submetida à concentração (fator 3), de acordo com os estudos de Rodrigues et al. (2001).

3.15.4- Emprego de resinas de troca iônica

O pH do hidrolisado concentrado 3 vezes foi ajustado para 3,5 com óxido de cálcio ou hidróxido de sódio, a mistura formada foi centrifugada a 2000 rpm/15 min e amostras de 800 mL do hidrolisado foram tratadas em colunas de 2,5 cm de diâmetro e 40 cm de comprimento empacotadas com as resinas A-103S, A-860S, A-500, C-150 e A-103S (Purolite). Esta seqüência de utilização de resinas foi sugerida por Verde (1999) e a regeneração destas foi efetuada com NaOH 2 % (A-103S), NaCl 10 % (A-860S e A-500) e H₂SO₄ 5 % (C-150).

3.16- Microrganismo e preparação do inóculo

A levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, mantida em ágar-extrato de malte a 4 °C, foi cultivada a 30 °C/200 rpm em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 g.L⁻¹ de xilose, 2 g.L⁻¹ de sulfato de amônio, 0,1 g.L⁻¹ de cloreto de cálcio e 20 g.L⁻¹ de extrato de farelo de arroz. As soluções de sulfato de amônio e cloreto de cálcio foram esterilizadas a 121 °C/20 min e as de xilose e extrato de farelo autoclavadas a 111 °C/15 min.

3.17- Fermentação dos hidrolisados de bagaço de cana em frascos agitados

As fermentações dos hidrolisados de bagaço de cana tratados (itens 3.15.1 a 3.15.4) e suplementados com nutrientes da mesma forma empregada no cultivo do inóculo, com exceção da xilose, que foi suprida através da adição do hidrolisado tratado, foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 mL. O pH do hidrolisado suplementado foi ajustado para 5,5 com NaOH ou H₂SO₄ e as fermentações ocorreram nas condições de 30 °C/200 rpm e concentração celular inicial equivalente a 1 g.L⁻¹ de massa celular seca. As concentrações de xilitol e dos açúcares foram determinadas por CLAE (item 3.20.1.4), assim como as de furfural e hidroximetilfurfural (item 3.20.2), compostos fenólicos (item 3.20.3) e ácido acético (item 3.20.4).

3.18- Obtenção de xilitol a partir do hidrolisado de bagaço de cana em reator de bancada

O xilitol foi obtido por fermentação do hidrolisado de bagaço de cana tratado com resinas de troca iônica (item 3.15.4) e suplementado da mesma forma que o utilizado nas fermentações em frascos agitados (item 3.17) utilizando-se a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037.

A fermentação foi realizada em sistema descontínuo em reator Bioflo III (New Brunswick Scientific Co.) equipado com eletrodo de pH e de oxigênio dissolvido (Mettler Toledo), termopar e agitador com 2 pás do tipo “flat-blade”, contendo 1200 mL de meio. As condições empregadas foram temperatura de 30°C, agitação de 300 rpm e concentração celular inicial equivalente a 1 g.L⁻¹ de massa celular seca. Os valores de k_La (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio) e pH iniciais empregados, respectivamente 20 h⁻¹ e 4,6 foram determinados por Morita (1998) como sendo os mais favoráveis para uma melhor conversão de xilose em xilitol. Após a centrifugação as amostras de fermentação retiradas periodicamente, incluindo o meio fermentado final, foram analisadas por CLAE para a quantificação de xilitol, xilose e arabinose (item 3.20.1.4), furfural e hidroximetilfurfural (item 3.20.2), compostos fenólicos (item 3.20.3), celobiose e ácidos acético, glucurônico, fórmico e levulínico (item 3.20.4), manose, galactose, manitol e arabitol (item 3.20.5), íons metálicos (item 3.20.6) e proteínas (item 3.20.7).

3.19- Separação do xilitol obtido por fermentação

O primeiro ensaio de separação do xilitol obtido por fermentação em reator de bancada foi conduzido em uma coluna de leito fixo de 36 cm de altura e 1 cm de diâmetro interno com etanol 30 % (v/v) como eluente a temperatura de 80 °C, velocidade superficial de 0,5 cm.min⁻¹ e volume de pulso igual a 20 % do volume de leito. A seguir, duas e três colunas em série com alturas totais de leito respectivamente iguais a 89 e 142 cm e diâmetro interno de 1 cm foram utilizadas para eluir o meio fermentado nas mesmas condições de temperatura e velocidade superficial acima citadas, exceto pelo volume de pulso, que variou de 8 a 20 % do volume de leito.

3.20- Métodos analíticos

3.20.1- Análise de xilitol e carboidratos

Anteriormente à estas análises as amostras foram filtradas em membrana de 0,22 µm (Millipore) para eliminar qualquer partícula sólida presente. Foram utilizados como padrões o xilitol e a xilose da Sigma e a arabinose da Merck.

3.20.1.1- Nos ensaios para seleção da zeólita e constante de equilíbrio (banho finito)

Utilizou-se cromatografia líquida de alta eficiência (equipamento Varian 9010) com detector de índice de refração Varian RI-4, coluna de troca iônica Shodex KS801 a 60° C e água deionizada como fase móvel a uma vazão de 0,8 mL.min⁻¹.

3.20.1.2- Nos ensaios preliminares em coluna de leito fixo, na curva de ruptura e na influência da granulometria de partícula na separação do xilitol

As frações contendo xilitol, arabinose e xilose foram analisadas por cromatografia líquida de íons com detector de amperometria pulsada (HPAEC-PAD), em equipamento Dionex (modelo DX500) e coluna analítica Carbopac PA10 (Dionex), a temperatura ambiente e vazão de 1 mL.min⁻¹. Para obter uma separação cromatográfica satisfatória destes compostos avaliou-se diferentes porcentagens de uma solução aquosa de NaOH 330 mM como fase móvel utilizando método isocrático, com base no manual da Dionex Corporation (Document nº 031193-05). Os valores investigados desta solução de NaOH variaram de 3 a 10 %, sendo observadas melhores separações cromatográficas com o uso de 7 % de NaOH 330 mM e 93 % de água.

3.20.1.3- Na determinação da constante de equilíbrio (resposta a pulsos cromatográficos), no planejamento experimental e nos ensaios com etanol e acetona como eluentes

O xilitol e os carboidratos xilose e arabinose foram quantificados por HPAEC-PAD, em equipamento Dionex (modelo DX500) e coluna analítica Carbowac PA100 (Dionex). As condições de análise dos ensaios de separação nos quais a água foi utilizada como eluente e também dos ensaios nos quais utilizou-se o etanol e acetona como eluentes estão apresentadas na Tabela 7. Em ambas as situações utilizou-se uma solução de limpeza de NaOH 50 mM e acetato de sódio 500 mM.

Tabela 7- Condições de análise de xilitol, arabinose e xilose por HPAEC-PAD em coluna PA100.

Parâmetro	Ensaios com água	Ensaios com etanol ou acetona
Fase móvel	NaOH 50 mM	NaOH 100 mM
Vazão (mL.min ⁻¹)	1,0	0,8
Temperatura (°C)	25	25
Volume de injeção (µL)	125	125

3.20.1.4- Nos hidrolisados e nos ensaios com meio fermentado

As amostras de hidrolisado e de meio fermentado foram filtradas em filtros SEP-PAK C18 (Millipore) e analisados por CLAE e detector de índice de refração, em equipamento Waters, coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H. As condições utilizadas foram: temperatura de 45 °C, H₂SO₄ 0,01 N como fase móvel e vazão de 0,6 mL.min⁻¹.

3.20.2- Análise de furfural e hidroximetilfurfural

As amostras foram inicialmente filtradas em membrana de 0,22 µm (Millipore) e então a concentração destes compostos furanos foi determinada por CLAE (equipamento Waters) em coluna Hewlett-Packard RP18 mantida a 25 °C e detector de ultra-violeta a 276 nm. A fase móvel, composta de acetonitrila/água (1:8) com 1 % de ácido acético, foi utilizada a uma vazão de 0,8 mL.min⁻¹. Os padrões utilizados foram o furfural e o 5-hidroximetilfurfural, ambos da Aldrich.

3.20.3- Análise de fenóis

Os compostos fenólicos solúveis foram determinados segundo a metodologia utilizada por Rocha (2000) que consiste na alcalinização da amostra com NaOH 6 M até pH 12,0 e posterior leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 280 nm. A concentração de fenóis foi obtida através da correlação com a absorbância segundo a equação 3.9:

$$C_{\text{fenóis}} (\text{g.L}^{-1}) = 4,187 \cdot 10^{-2} (\text{Abs}_{280\text{nm}} - \text{Abs}_{\text{F/HMF}}) - 3,279 \cdot 10^{-4} \quad (3.9)$$

Onde: $\text{Abs}_{\text{F/HMF}} = C_{\text{F}} \cdot \epsilon_{\text{F}} + C_{\text{HMF}} \cdot \epsilon_{\text{HMF}}$

$\epsilon_{\text{F}} = 146,85 \text{ L.g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{\text{HMF}} = 114,00 \text{ L.g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ são os coeficientes de extinção e C_{F} e C_{HMF} são, respectivamente as concentrações de furfural e hidroximetilfurfural obtidas segundo o item 3.20.2.

3.20.4- Análise de celobiose e dos ácidos acético, glucurônico, fórmico e levulínico

Estes compostos foram quantificados do mesmo modo como os açúcares presentes no hidrolisado (item 3.20.1.4).

3.20.5- Análise de manose, manitol e arabitol

A manose e os polióis manitol e arabitol foram analisados por cromatografia líquida de íons e detector de amperometria pulsada, em equipamento Dionex (modelo DX500) e coluna analítica Carbopac PA100 (Dionex), utilizando-se um gradiente reverso de NaOH (135 a 45 mM) durante 10 minutos a temperatura ambiente e vazão de 1 mL.min⁻¹. Foram utilizados os padrões manose e arabitol da Sigma e manitol da Synth.

3.20.6- Análise de íons metálicos

Os íons metálicos foram quantificados por espectrometria de absorção atômica por ionização de chama.

3.20.7- Análise de proteínas

A concentração de proteínas no meio fermentado foi determinada de acordo com a metodologia de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como proteína de referência.

3.20.8- Análise da massa celular

A concentração de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 presente no inóculo foi determinada através da correlação da absorbância, medida em espectrofotômetro a 600 nm, com a curva-padrão de massa seca celular após a separação das células por centrifugação, lavagem em água destilada estéril por 2 vezes e suspensão em água. A curva-padrão foi obtida do cultivo da levedura em meio e condições iguais às empregadas na preparação do inóculo (item 3.16).

3.20.9- Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) foi determinado no meio de fermentação isento de biomassa com um eletrodo de oxigênio, de acordo com a metodologia proposta por Pirt (1975).

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1- Ensaios iniciais para seleção da zeólita

Os resultados dos ensaios de adsorção realizados com as zeólitas Baylith WE 894 e Na₈₆X demonstraram que estas zeólitas trocadas com cálcio não foram capazes de adsorver xilitol, a exemplo do que ocorreu com as zeólitas KA, NaA e NaX. A zeólita Baylith 415 na forma cálcica apresentou adsorção insignificante, apesar da ampla divulgação do uso deste cátion na adsorção de poliois e carboidratos. A ausência de adsorção observada nas zeólitas KA e na NaA pode ser explicada pela redução no tamanho efetivo do poro com a troca do cálcio, um íon divalente, por íons univalentes (potássio e sódio), como observado por BRECK (1974). Provavelmente esta redução tornou-se uma barreira para a difusão da molécula de xilitol nos poros da zeólita, já que este poliols, segundo Hyvönen, Koivistoinen e Voirol (1982), apresenta de 2,9 a 3,0 Å e os poros destas zeólitas, 3,8 e 3 Å, respectivamente (RUTHVEN, 1988).

A diferença entre as concentrações inicial e final de xilitol nos ensaios com a zeólita KX foi da ordem de 0,2 g.L⁻¹, enquanto que com a KWE tal diferença foi quase nula. Estes resultados demonstram uma fraca interação do potássio com o xilitol e estão em acordo com a observação de Morel, Lhermet e Morel-Desrosiers (1988 apud SCHÖLLNER; EINICKE; GLÄSER, 1993, p.89) que relataram que os íons potássio em soluções aquosas apresentam fraca interação com monossacarídeos.

Com relação ao cátion bário foram observados decréscimos de 0,26, 0,42 e 0,88 g.L⁻¹ nas concentrações do sobrenadante dos testes conduzidos com as zeólitas BaA, BaX e BaWE, respectivamente. Já o decréscimo obtido com a zeólita NaWE foi de 0,52 g.L⁻¹, que é 41 % menor do que o apresentado pela BaWE. A diferença nos resultados obtidos com o uso da zeólita na forma sódica e bária ajusta-se às observações de Ruthven (1988), de que a substituição de um cátion monovalente por um divalente, ou seja, um aumento na carga dos cátions, aumenta a força de adsorção.

A constatação de que diferentes zeólitas na mesma forma catiônica exibem diferentes capacidades de adsorção demonstra que além do tipo do cátion, características da estrutura zeolítica como a taxa Si/Al também são de grande importância no controle da adsorção.

A partir dos resultados destes experimentos, as zeólitas NaWE e BaWE, que apresentaram maior capacidade de adsorção do xilitol, foram escolhidas para serem utilizadas nos próximos ensaios.

4.2- Caracterização das zeólitas

A Tabela 8 apresenta o volume de poro e as porcentagens de óxido de alumínio e silício da zeólita Baylith WE 894 na sua forma original (NaWE).

Tabela 8- Volume de poro e porcentagens de óxido de alumínio e silício da zeólita NaWE.

Volume do poro ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)	0,22
Al_2O_3 (%)	16,96
SiO_2 (%)	58,93

A quantificação dos óxidos de alumínio e silício é uma medida útil na determinação do tipo da zeólita. Considerando que todo o silício esteja presente na estrutura cristalina pode-se dizer, a partir da Tabela 8, que a zeólita NaWE apresenta taxa Si/Al igual a 3,07 e é portanto do tipo Y.

O volume do poro, de $0,22 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, é semelhante aos volumes de zeólitas com estrutura do tipo faujasita citados por Breck (1974), que são em torno de $0,3 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$.

A medida da distribuição de tamanho dos poros não foi realizada no presente trabalho, contudo, através dos dados de Burkert (2003), que foram obtidos para a mesma zeólita, pode-se verificar uma distribuição uniforme com diâmetro médio de 0,5621 nm (5,62 Å). Este resultado confirma o caráter microporoso desta zeólita e possibilita que a molécula de xilitol (3 Å) penetre no interior da partícula e interaja com sua superfície. As interações adsorbato- adsorvente na superfície interna da partícula são de grande importância, já que esta superfície é aproximadamente 1000 vezes superior a externa.

Os valores de densidade e área superficial apresentados na Tabela 9 permitem relatar que a troca iônica do sódio pelo bário na zeólita Baylith WE 894 ocasionou mudanças nas suas características. A densidade que originalmente era de 1,97 g.cm⁻³ (NaWE) passou para 2,41 g.cm⁻³ (BaWE). Este resultado está de acordo com as observações feitas por Breck (1974), que afirma que a densidade das zeólitas pode ser elevada com a troca por íons pesados como o bário. Este autor cita que algumas zeólitas substituídas por este cátion apresentam densidade de 2,8 g.cm⁻³.

Tabela 9- Densidade, área superficial e porcentagem de Na₂O nas zeólitas NaWE e BaWE.

	NaWE	BaWE
Densidade (g.cm ⁻³)	1,97	2,41
Área superficial (m ² .g ⁻¹)	448,45	560,50
% Na ₂ O	10,57	3,24

A área superficial também foi elevada com a substituição do íon sódio pelo bário: a área superficial da zeólita NaWE é de 448,5 m².g⁻¹ enquanto que a da BaWE é igual a 560,5 m².g⁻¹ (Tabela 9). Uma constatação contrária a esta foi observada por Silva (1998) ao substituir o sódio pelo bário em uma zeólita do tipo Y, com decréscimo de 13 % na área superficial. Entretanto, esse autor relata um

aumento de 6 vezes na área superficial ao trocar o sódio de uma zeólita do tipo A pelo cálcio.

O teor de óxido de sódio nas zeólitas NaWE e BaWE (Tabela 9) permitiu calcular a porcentagem de íons sódio trocados (PST), que é igual a 69,35 %. Este elevado valor, similar ao observado por Silva (1998) para uma zeólita do tipo Y também trocada com bário, confirma a eficiência do processo de troca iônica.

4.3- Ensaios preliminares em coluna de leito fixo com as zeólitas NaWE e BaWE

Os resultados dos experimentos realizados em coluna com as zeólitas NaWE e BaWE com granulometria entre 53-125 µm estão apresentados na Tabela 10. Observa-se que o efeito da elevação da temperatura na separação xilitol/xilose foi favorável com a zeólita NaWE apesar da pequena adsorção, mas não o foi com a BaWE. Na separação xilitol/arabinose este efeito foi positivo com o uso da zeólita BaWE, encontrando-se a 50 °C eficiência de separação aproximadamente 22 % superior em relação à obtida à 30 °C. O uso de temperaturas elevadas é interessante à indústria de alimentos, já que previne o crescimento microbiano, reduz a viscosidade e aumenta a solubilidade dos componentes no solvente (BESTE et al., 2000).

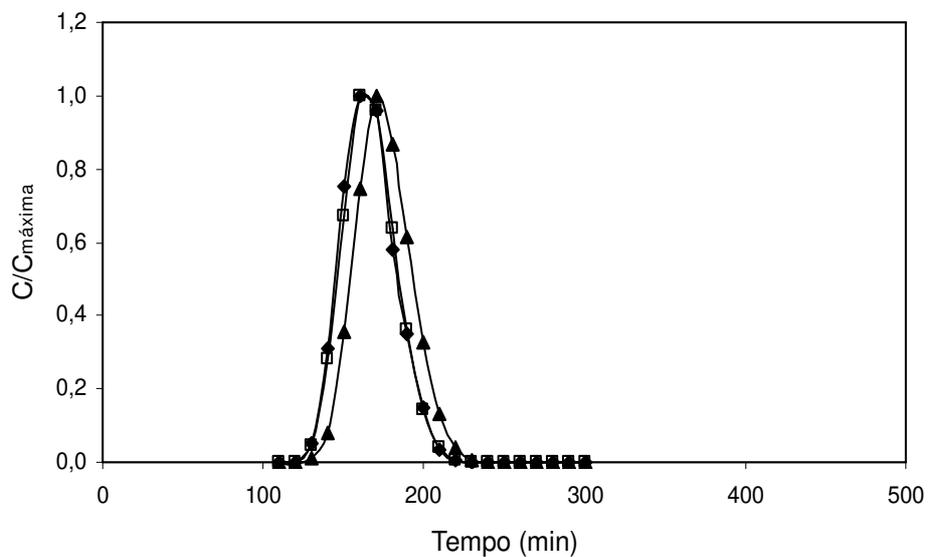
Tabela 10- Eficiência de separação do xilitol (ES) utilizando as zeólitas NaWE e BaWE a 30 °C e 50 °C.

Zeólitas/Temperatura	ES_{xilitol/xilose}	ES_{xilitol/arabinose}
NaWE/30 °C	0,045	0,54
NaWE/50 °C	0,073	0,52
BaWE/30 °C	0,92	0,90
BaWE/50 °C	0,91	1,15

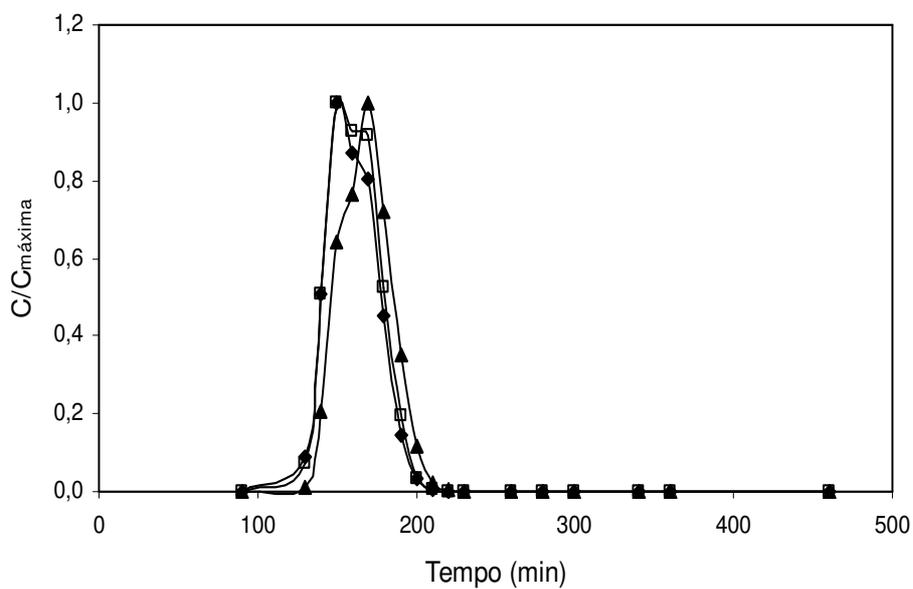
Cheng e Lee (1992) estudaram a separação de frutose e glicose em temperaturas de 25, 40 e 60 °C e observaram que melhores separações ocorreram a 40 °C, pois a 60 °C ocorreu escurecimento dos monossacarídeos. Beste et al. (2000) também investigaram a separação de glicose e frutose, variando a temperatura de 25 a 80 °C, e verificaram que os coeficientes de transferência de massa de ambos componentes aumentaram com a temperatura.

Comparando os perfis de eluição das Figuras 4 e 5 observa-se um aumento na separação do xilitol com a troca dos íons sódio por bário. Nos ensaios conduzidos com a zeólita NaWE (Figura 4) os compostos são eluídos em aproximadamente 220 minutos, independentemente da temperatura empregada. Observa-se também uma sobreposição dos picos da xilose e do xilitol, indicando a ausência de separação destes componentes. Nos ensaios conduzidos com a zeólita BaWE (Figura 5) observa-se maior tempo de retenção do xilitol na coluna, sugerindo a existência de maior afinidade entre este poliol e o cátion bário em comparação ao sódio. Apesar desta observação, a zeólita BaWE apresentou maior afinidade pela arabinose, sendo o fator de seletividade (α) deste monossacarídeo em relação ao xilitol igual a 1,19. A forte atração entre a arabinose e os íons bário também ficou evidenciada na patente da Union Carbide Corporation (1985b), que relata recuperação de arabinose de uma mistura de galactose, glicose, manose e xilose, sendo o volume de retenção da arabinose 2 vezes superior ao do segundo componente mais fortemente retido na coluna empacotada com zeólita do tipo X.

As eficiências de separação obtidas da eluição em coluna permitem constatar que o uso da zeólita BaWE a 50 °C conduziu a uma melhor separação do xilitol e portanto os próximos ensaios foram conduzidos com esta zeólita e nesta temperatura.

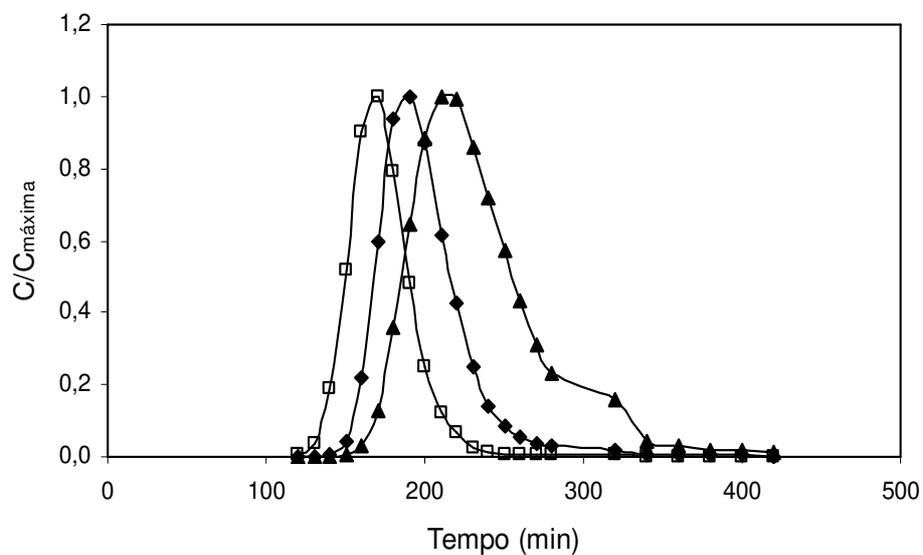


(A)

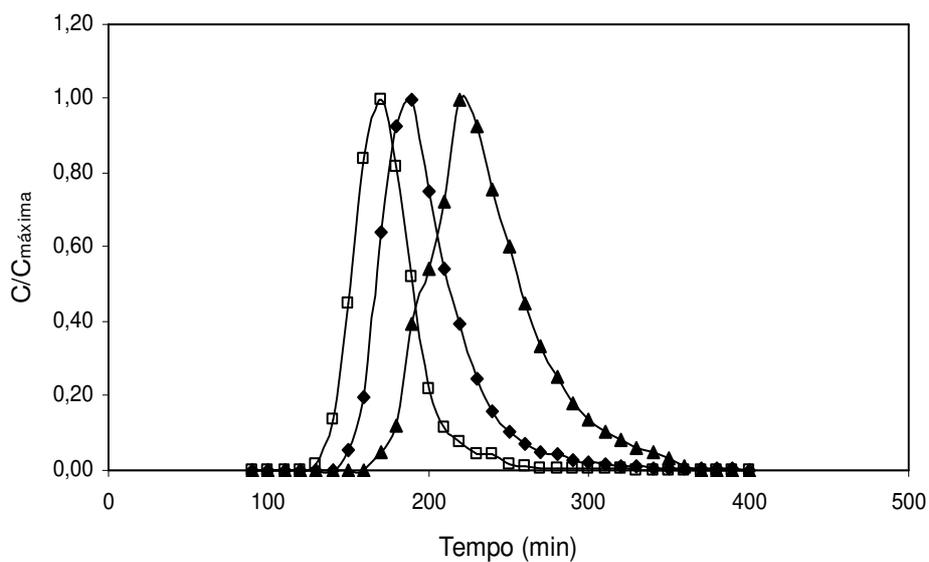


(B)

Figura 4– Perfil de eluição de xilitol (–♦–), xilose (–□–) e arabinose (–▲–) em coluna empacotada com a zeólita NaWE com granulometria entre 53-125 μm a 30 °C (A) e 50 °C (B).



(A)



(B)

Figura 5— Perfil de eluição de xilitol (—♦—) , xilose (—□—) e arabinose (—▲—) em coluna empacotada com a zeólita BaWE com granulometria entre 53-125 μm a 30 °C (A) e 50 °C (B).

4.4- Influência da granulometria de partícula na separação do xilitol

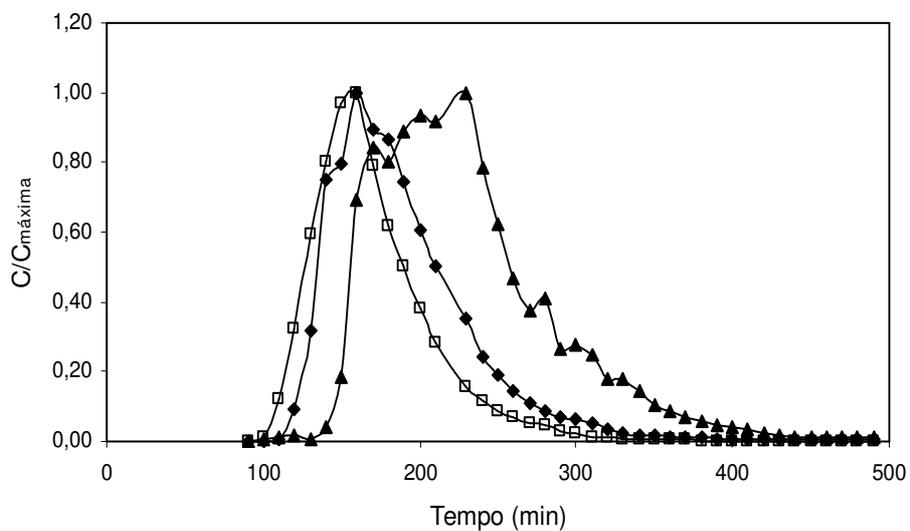
Avaliando a influência da granulometria de partícula da zeólita BaWE na eficiência de separação do xilitol, verificam-se melhores respostas com o uso de partículas de menor granulometria, como pode ser evidenciado na Tabela 11 e nas Figuras 5B, 6A e 6B. Por outro lado, as mais baixas separações foram obtidas com a faixa de diâmetro entre 125-250 μm , notando-se a contaminação de grande parte da área do pico de xilitol pela arabinose (Figura 6A). Burkert e Maugeri Filho (1998) estudaram a adsorção de cefalosporina e também observaram que partículas menores permitiram maiores taxas de adsorção.

Na Tabela 11 pode-se observar que a diferença entre os valores da eficiência de separação xilitol/arabinose obtida com o uso partículas de diâmetro de 53-125 μm e 250-425 μm é da ordem de 13 %, enquanto que, entre a separação xilitol/xilose é de 26 %. A superioridade nas eficiências de separação xilitol/arabinose e xilitol/xilose obtidas com o emprego da faixa de diâmetro maior em relação à intermediária é ainda mais marcante (21 e 37 % superiores).

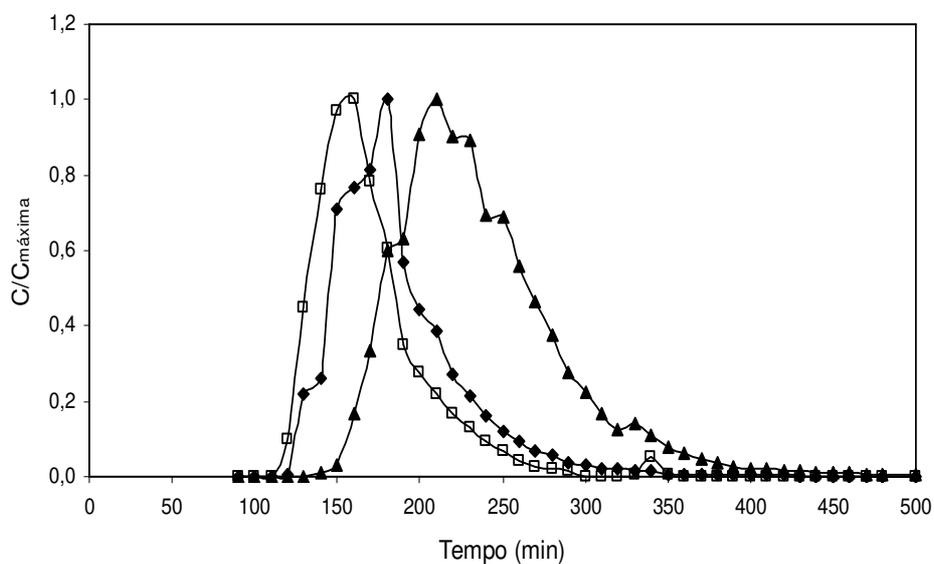
Tabela 11- Eficiência de separação (ES) do xilitol utilizando zeólita BaWE em diferentes granulometrias.

Granulometria (μm)	<i>ES</i> _{xilitol/xilose}	<i>ES</i> _{xilitol/arabinose}
53-125	0,91	1,15
125-250	0,42	0,79
250-425	0,67	1,00

O uso de partículas de diâmetro pequeno permite obter um leito com porosidade menor e, portanto mais homogêneo, resultando em menor dispersão do líquido e em maior transferência de massa (DECHOW, 1989). Estes fatos provavelmente explicam a melhor separação obtida com partículas de 53-125 μm .



(A)



(B)

Figura 6– Perfil de eluição de xilitol (\blacklozenge), xilose (\square) e arabinose (\blacktriangle) em coluna empacotada com a zeólita BaWE com granulometria entre 125-250 µm (A) e 250-425 µm (B).

Uma vez que os experimentos conduzidos com diâmetro de partícula de 53-125 μm levaram a maiores eficiências de separação do xilitol, esta faixa foi empregada nos ensaios posteriores.

4.5- Determinação da constante de equilíbrio

A isoterma de equilíbrio do xilitol foi obtida em banho finito em uma ampla faixa de concentração e está representada graficamente na Figura 7 através da qual observa-se um bom ajuste dos dados experimentais ao modelo linear. Matijašević e Vasić-Rački (2000) verificaram que as isotermas de glicose e frutose em resinas são representadas por equações lineares até a concentração de 300 g.L^{-1} , assim como constatado por Ching et al. (1987) ao estudar o equilíbrio de glicose em zeólita do tipo Y na forma Ca^{+2} . Já a isoterma para a frutose nesta zeólita apresentou forma do tipo I, com curvatura acentuada em relação à abscissa em elevadas concentrações. Silva (1998) também verificaram isoterma não-linear para frutose em zeólita Y nas formas Ca^{+2} e Ba^{+2} .

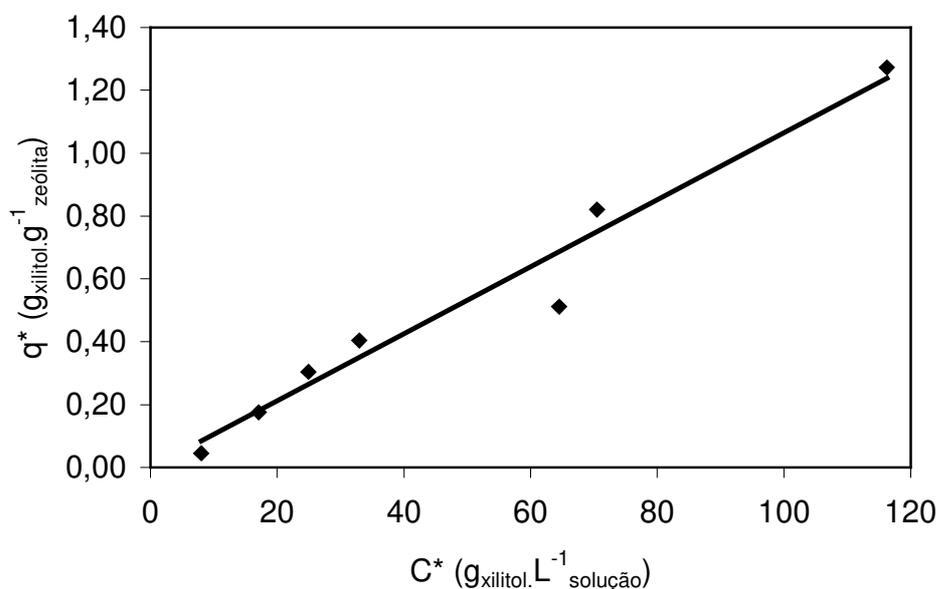


Figura 7- Isoterma de adsorção de xilitol em zeólita BaWE a 50 °C.

As isotermas do tipo linear são expressas pela equação 4.1, onde q^* é a concentração adsorvida de soluto no equilíbrio ($\text{g}_{\text{adsorbato}} \cdot \text{g}_{\text{adsorvente}}^{-1}$), c^* é a concentração do soluto na solução no equilíbrio ($\text{g}_{\text{adsorbato}} \cdot \text{L}_{\text{solução}}^{-1}$) e k é a constante de equilíbrio ($\text{L}_{\text{solução}} \cdot \text{g}_{\text{zeólita}}^{-1}$).

$$q^* = K c^* \quad (4.1)$$

Utilizando a metodologia do banho finito, obteve-se uma constante de equilíbrio do xilitol igual a $1,07 \cdot 10^{-2} \text{ L}_{\text{solução}} \cdot \text{g}_{\text{zeólita}}^{-1}$ (ou na forma adimensional $K = 0,54$) e coeficiente de correlação igual a 0,98. O desvio médio entre os valores experimentais e preditos de q^* igual a 16,94 % demonstra um bom ajuste dos dados pelo modelo linear. Comparando-se o valor de K adimensional com os resultados da literatura observa-se que o mesmo foi da mesma ordem de grandeza daqueles obtidos para monossacarídeos como glicose e frutose. Uma comparação com estudos sobre xilitol não foi realizada devido à ausência de dados de equilíbrio deste poliol.

A constante de equilíbrio do xilitol também foi determinada pelo método de eluição cromatográfica. O tempo de retenção médio do xilitol no leito fixo de zeólita foi calculado pela equação do primeiro momento (equação 3.5), obtido a partir dos perfis de concentração apresentados na Figura 8.

A equação 4.2, utilizada por Ching e Ruthven (1988), foi empregada para relacionar o tempo de retenção μ (min) com a constante de equilíbrio de adsorção K_1 (adimensional):

$$\mu = \frac{L}{\varepsilon v_1} [\varepsilon + (1 - \varepsilon) K_1] \quad (4.2)$$

onde:

L ...comprimento do leito (cm)

v_1 ...velocidade intersticial ($\text{cm} \cdot \text{min}^{-1}$)

ε ...porosidade do leito

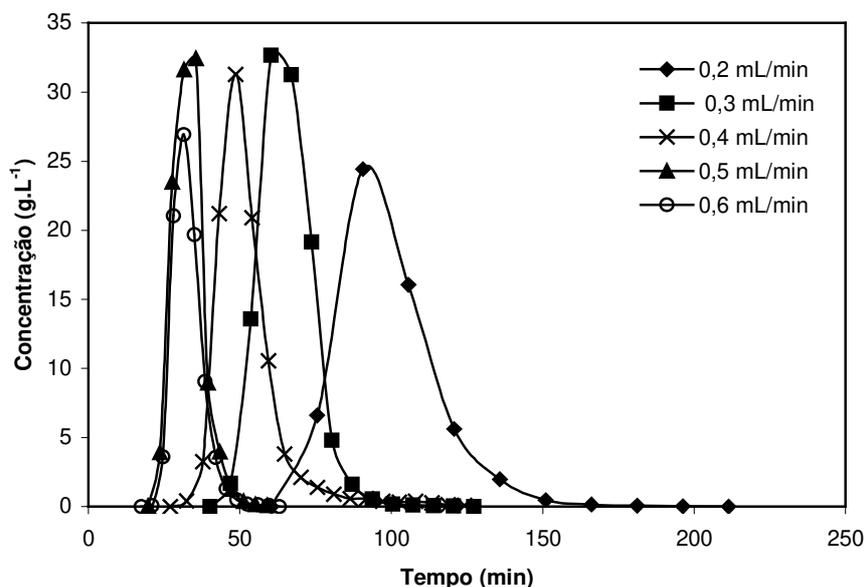


Figura 8– Perfis de concentração de xilitol obtidos em diferentes vazões de alimentação a 50 °C em leito fixo de zeólita BaWE.

Com o valor da porosidade do leito ($\varepsilon = 0,58$), determinada por Burkert (2003), plotou-se o gráfico do tempo de retenção pela altura de leito/velocidade intersticial (L/v_1) (Figura 9). A partir do coeficiente angular da reta, que é igual a $1 + \left(\frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}\right) K_1$, calculou-se o valor da constante de equilíbrio do xilitol a 50 °C, que é igual a 1,03, sendo o coeficiente de correlação da referida reta igual a 0,99.

O valor da constante de equilíbrio do xilitol obtida pelo método do banho finito ($K = 0,54$) não foi confirmado pela técnica de eluição cromatográfica ($K_1 = 1,03$), que resultou em um valor aproximadamente 2 vezes superior deste parâmetro de equilíbrio.

Utilizando estas duas metodologias Matijašević e Vasić-Rački (2000) verificaram variação nas constantes de equilíbrio de glicose. Entretanto uma razoável concordância entre as constantes de frutose obtidas em banho finito e por eluição cromatográfica foi observada por Burkert (2003).

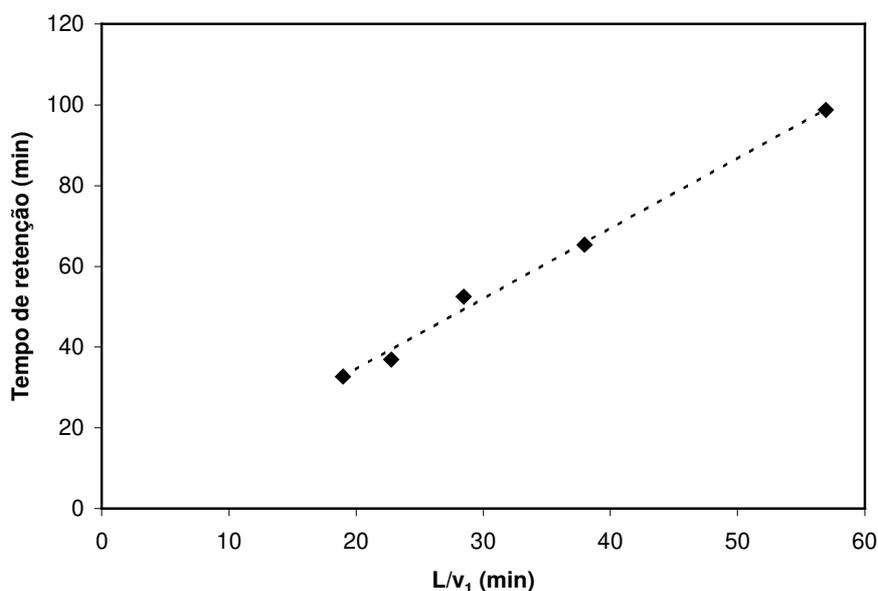


Figura 9– Tempo de retenção do xilitol versus altura de leito/velocidade intersticial (L/v_1) a 50 °C.

Visando investigar se a constante de equilíbrio do xilitol varia com a temperatura realizou-se um novo ensaio utilizando o método de eluição cromatográfica a 80 °C. Nestas condições a constante de equilíbrio do xilitol foi igual a 1,05 ($r= 0,99$), apresentando um desvio de 2 % em relação ao valor obtido a 50 °C. Este fato demonstra que esta constante é independente da temperatura na faixa de 50 a 80 °C, como observado por Ho, Ching e Ruthven (1987) para a glicose.

Com a finalidade de determinar a seletividade da zeólita BaWE em relação ao xilitol e a arabinose, a constante de equilíbrio deste monossacarídeo foi calculada a 80 °C pelo método de eluição cromatográfica. Através das Figuras 10 e 11 calculou-se a constante de equilíbrio da arabinose, que é igual a 1,16 ($r= 0,99$).

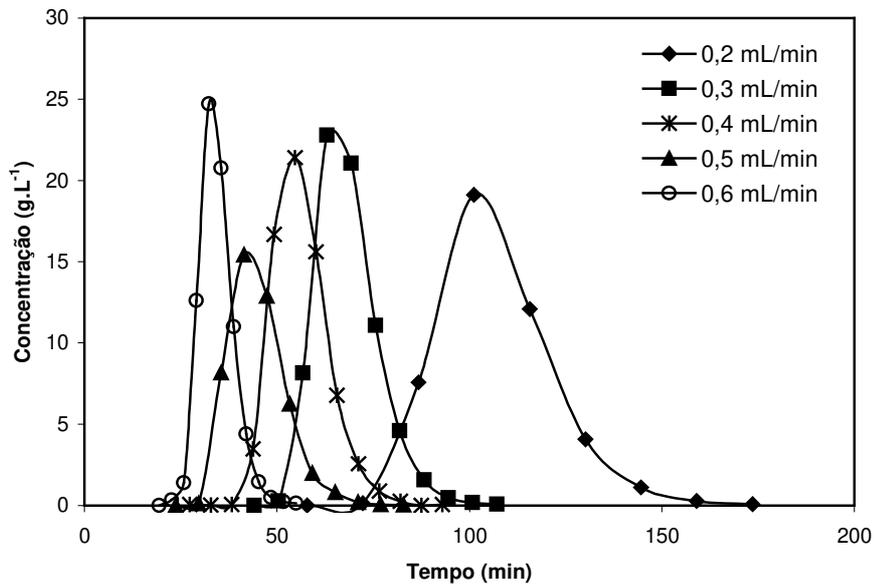


Figura 10 –Perfis de concentração de arabinose obtidos em diferentes vazões de alimentação a 80 °C em leito fixo de zeólita BaWE.

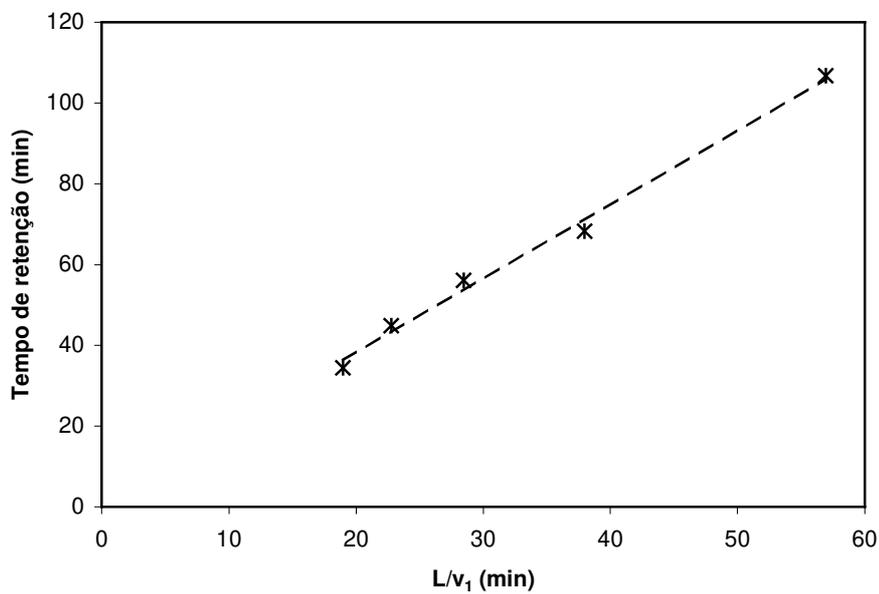


Figura 11- Tempo de retenção da arabinose versus altura de leito/velocidade intersticial (L/v_1) a 80 °C.

O produto da divisão das constantes de equilíbrio da arabinose e do xilitol permitiu o cálculo do fator de seletividade (α) destes compostos em coluna de leito fixo de zeólita BaWE a 80 °C, que corresponde a 1,10, indicando que esta zeólita apresenta maior afinidade pela arabinose. Não foram encontrados na literatura dados de fator de seletividade para estes compostos, entretanto, pode-se dizer que este é um valor razoável, comparando-se com os valores de α obtidos da separação frutose/glicose em trabalhos realizados por Ching et al. (1987) com a zeólita CaY e com a resina Duolite, que revelaram α de 1,55 e 1,28, respectivamente.

4.6- Curva de ruptura

O ensaio por análise frontal, que resultou na curva de ruptura, foi realizado com o objetivo de verificar a máxima quantidade de amostra a ser injetada na coluna. Este dado foi utilizado como referência de valor da variável volume de pulso/volume de leito dos ensaios delineados pelo planejamento experimental.

A Figura 12 demonstra que os tempos de ruptura obtidos para o xilitol, xilose e arabinose (correspondentes a concentrações iguais a 10 % da concentração inicial- $C/C_0 = 0,1$) são iguais a 42, 45 e 51 minutos, respectivamente. Portanto, a máxima quantidade de amostra a ser injetada, expressa como volume de pulso/volume de leito é de 0,7.

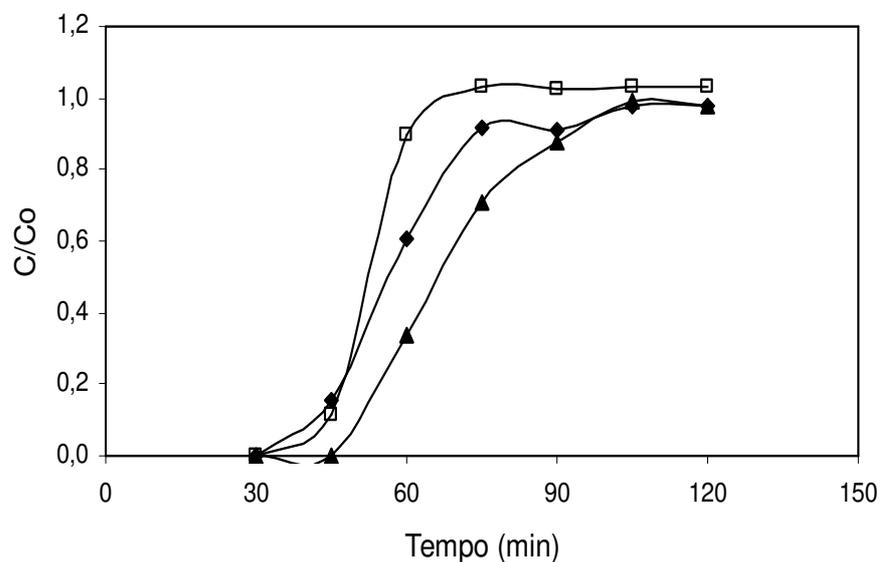


Figura 12– Curva de ruptura em leito de zeólita BaWE utilizando uma solução constituída de xilitol (–◆–) , xilose (–□–) e arabinose (–▲–).

4.7- Planejamento experimental

Os ensaios conduzidos em leito fixo com a zeólita BaWE a 30 e 50 °C (item 4.3) demonstraram que a temperatura de 50 °C favoreceu a separação do xilitol. No entanto, optou-se por ampliar a faixa de estudo a fim de determinar qual o efeito de temperaturas mais elevadas nesta separação.

A Tabela 12 apresenta as eficiências de separação obtidas dos ensaios delineados de acordo com o planejamento fatorial 2^3 . Observa-se que os valores de ambas as eficiências (ES xilitol/arabinose e ES xilitol/xilose) variaram com as diferentes condições de temperatura (T), velocidade superficial (v_s) e volume de pulso/volume de leito (V_p/V_l).

Tabela 12- Eficiências de separação (ES) do xilitol obtidas nos ensaios realizados segundo o planejamento fatorial 2³.

Nº experimento	T	vs	Vp/VI	ES_{xilitol/arabinose}	ES_{xilitol/xilose}
1	50	0,5	0,2	0,62	0,64
2	80	0,5	0,2	0,86	0,28
3	50	2,5	0,2	0,50	0,38
4	80	2,5	0,2	0,66	0,34
5	50	0,5	0,7	0,66	0,26
6	80	0,5	0,7	0,81	0,14
7	50	2,5	0,7	0,51	0,33
8	80	2,5	0,7	0,56	0,11
9	65	1,5	0,45	0,56	0,23
10	65	1,5	0,45	0,60	0,22
11	65	1,5	0,45	0,59	0,24

De acordo com a análise dos dados da Tabela 13, que apresenta entre outros a estimativa dos efeitos, pode-se concluir que para a ES xilitol/arabinose a temperatura (T) e a velocidade superficial (vs) foram significativas em nível de 95 % de confiança. A temperatura apresentou efeito positivo sobre esta resposta, demonstrando que ao passar do nível inferior para o superior a separação é favorecida em um valor aproximado de 0,15 vezes. O favorecimento da separação xilitol/arabinose com o aumento da temperatura já havia sido observado ao comparar a eficiência desta separação a 30 ou 50 °C; sendo esta separação superior em 22 % a 50 °C.

O efeito exercido pela velocidade superficial (vs) sobre a separação xilitol/arabinose é negativo, indicando que a utilização de menores valores implica em melhores respostas (Tabela 13). Observação semelhante foi feita por Matijašević, Vasić-Rački e Pavlović (1997) para a separação de glicose e frutose.

Geralmente as menores taxas de escoamento conduzem a melhores separações, pois de acordo com Cheng e Lee (1992), a lenta vazão pode dar ao componente preferido mais tempo para penetrar nos macroporos do adsorvente.

A variável volume de pulso/volume de leito (Vp/VI) não exerceu influência significativa na separação do xilitol da arabinose, assim como as interações de 2ª ordem.

Tabela 13- Estimativa dos efeitos, erro – padrão, teste t de “Student” e valor de “p” para ES xilitol/arabinose segundo o planejamento fatorial 2³.

Fator	Efeito	Erro padrão	t (4)	p
Média	0,6304	0,0145	43,5744	0,000002
T	+0,1488 *	0,0339	4,3851	0,0118
vs	-0,1800 *	0,0339	-5,3048	0,0061
Vp/VI	-0,0286	0,0339	-0,8437	0,4463
T x vs	-0,0433	0,0339	-1,2755	0,2712
T x (Vp/VI)	-0,0498	0,0339	-1,4686	0,2159
vs x (Vp/VI)	-0,0213	0,0339	-0,6271	0,5646

* significativo em nível de 95 % de confiança

R²= 0,9289

Erro residual= 0,0023

Os fatores estatisticamente não significativos sobre a separação do xilitol/arabinose (Vp/VI e interações de 2ª ordem) foram eliminados e adicionados à falta de ajuste e a análise de variância (ANOVA) foi então realizada (Tabela 14).

Tabela 14- ANOVA para o planejamento fatorial 2^3 para a ES xilitol/arabinose.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média de quadrados	F calculado
Regressão	0,11	2	0,055	21,15
Resíduo	0,021	8	0,0026	
Falta ajuste	0,02	6		
Erro puro	0,0009	2		
Total	0,131	10		

R= 0,92

F_{0,95; 2; 8} = 4,46

O coeficiente de correlação (R= 0,92) é bem adequado para a obtenção de um modelo de 1ª ordem (equação 4.3) bem como o teste F ($F_{\text{calculado}}/F_{\text{tabelado}}$), que resultou em um valor calculado 4,7 vezes superior ao tabelado (Tabela 14).

$$\text{ES xilitol/arabinose} = 0,63 + 0,075 T - 0,09 \text{ vs} \quad (4.3)$$

A superfície de resposta para a ES xilitol/arabinose apresentada na Figura 13 permite visualizar uma melhor separação quando são empregadas uma maior temperatura (80 °C) e uma menor velocidade superficial (0,5 cm.min⁻¹).

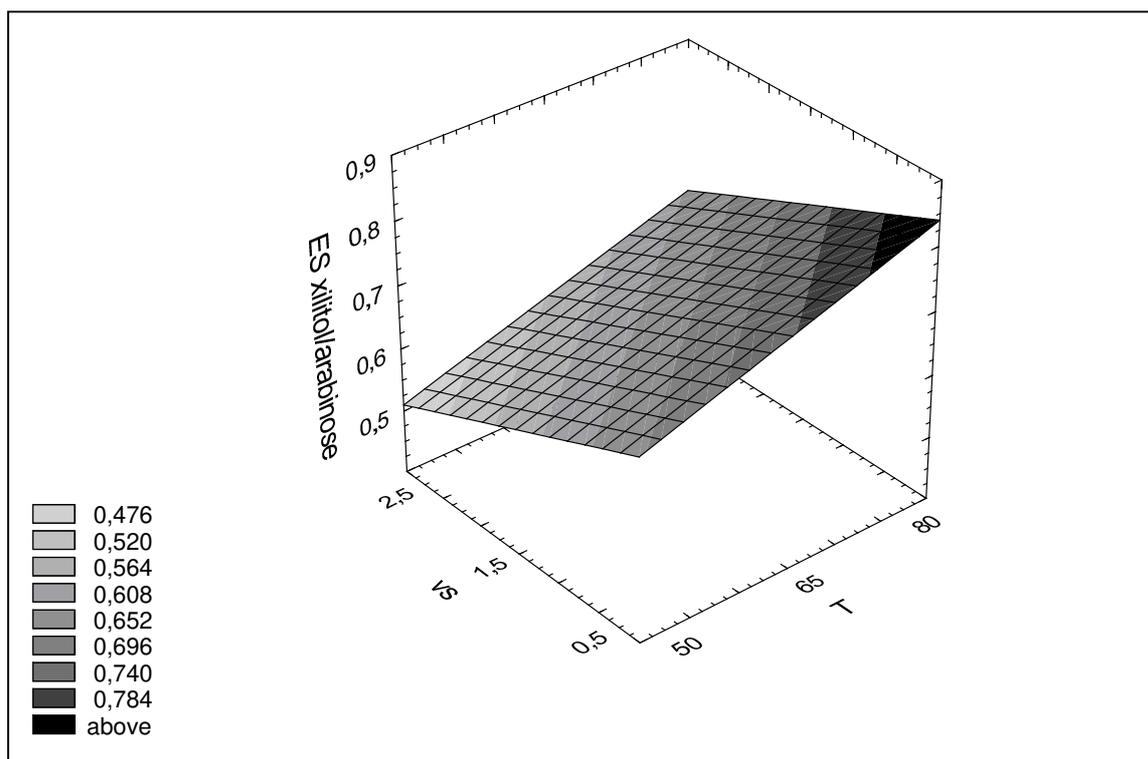


Figura 13- Superfície de resposta para a eficiência de separação xilitol/arabinose em função da temperatura (T) e da velocidade superficial (vs).

A Tabela 15 apresenta o resultado da análise estatística referente a separação do xilitol/xilose. Observa-se que a velocidade superficial (vs) não exerceu influência na eficiência desta separação, assim como não foram observados efeitos de interação significativos para esta resposta.

Ressalta-se que a temperatura (T) foi significativa na separação do xilitol e da xilose em nível de 90 % de confiança e apresentou efeito negativo (diminuição da eficiência de separação ao passar de 50 para 80 °C). Como este parâmetro exerce efeito oposto sobre as duas respostas em análise, seria correto determinar uma temperatura que favorecesse ambas as respostas. Entretanto, como o objetivo do trabalho é separar o xilitol proveniente de hidrolisado fermentado, optou-se pela utilização da temperatura de 80 °C nos ensaios seguintes,

contornando esta situação através da redução da quantidade de xilose na alimentação pelo prolongamento do tempo de fermentação.

Tabela 15- Estimativa dos efeitos, erro – padrão e teste t de “Student” e valor de “p” para ES xilitol/xilose segundo o planejamento fatorial 2³.

Fator	Efeito	Erro padrão	t (4)	P
Média	0,2870	0,0296	9,7087	0,0006
T	-0,1852 **	0,0693	-2,6725	0,0556
vs	-0,0361	0,0693	-0,5208	0,6300
Vp/VI	-0,2012 *	0,0693	-2,9026	0,0440
T x vs	0,0560	0,0693	0,8072	0,4648
T x (Vp/VI)	0,0120	0,0693	0,1724	0,8715
vs x (Vp/VI)	0,0605	0,0693	0,8728	0,4320

* significativo em nível de 95 % de confiança

** significativo em nível de 90 % de confiança

$R^2 = 0,8120$

Erro residual= 0,0096

Diferentemente do ocorrido com a separação xilitol/arabinose, a separação xilitol/xilose é influenciada pela quantidade de amostra injetada na coluna. Esta separação demonstrou ser mais elevada ao reduzir o volume do pulso de 70 para 20 % do volume do leite (Tabela 15). Uma melhora no grau de separação quando menores quantidades de adsorbato são injetadas já havia sido relatada por Union Carbide Corporation (1985b).

A partir dos dados experimentais foi possível obter a ANOVA (Tabela 16) para a ES xilitol/xilose, que não foi suficientemente adequada para descrever um

modelo de 1ª ordem devido aos valores do teste F (2,54) e do coeficiente de correlação (R= 0,86) não muito satisfatórios.

Tabela 16- ANOVA para o planejamento fatorial 2³ para a ES xilitol/xilose.

Fonte de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média de quadrados	F calculado
Regressão	0,15	2	0,075	11,36
Resíduo	0,053	8	0,0066	
Falta ajuste	0,053	6		
Erro puro	0,0002	2		
Total	0,203	10		

R= 0,86
F_{0,95; 2; 8}= 4,46

A interpretação estatística dos resultados do planejamento fatorial permitiu determinar as condições mais favoráveis de trabalho, ou seja, temperatura de 80 °C, velocidade superficial de 0,5 cm.min⁻¹ e volume de pulso/volume de leite igual a 0,2.

4.8- Determinação da velocidade ótima da fase móvel

O típico gráfico de van Deemter (Figura 14) relaciona a HETP e a velocidade do eluente, permitindo o cálculo da velocidade ótima da fase móvel.

Os gráficos de van Deemter para o xilitol e para a arabinose, apresentados na Figura 15, demonstram que as curvas obtidas seguem a forma típica, apresentando aumentos da altura de prato acima e abaixo da altura mínima, atribuídos aos efeitos de transferência de massa e difusão longitudinal, respectivamente. A mínima altura de prato para o xilitol (HETP= 0,27 cm) é obtida na velocidade linear de 0,88 cm.min⁻¹, que corresponde a uma vazão de

0,4 mL.min⁻¹. Já para a arabinose a velocidade ótima é de 0,66 cm.min⁻¹, obtida a uma altura mínima de prato de 0,35 cm e equivalente a vazão de 0,3 mL.min⁻¹.

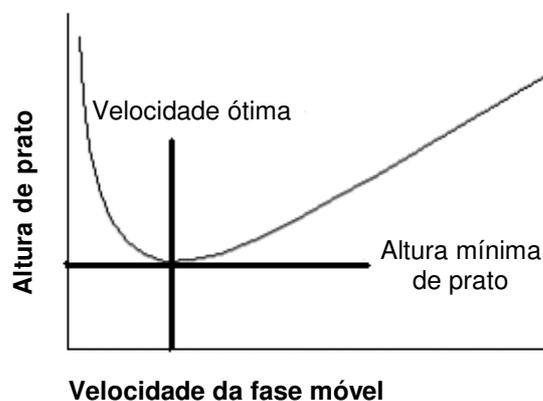


Figura 14- Gráfico típico de van Deemter (SHEFFIELD HALLAM UNIVERSITY).

Os valores das velocidades ótimas da fase móvel determinados através da Figura 15 são equivalentes aos obtidos a partir do planejamento experimental, que indicou velocidade superficial de 0,5 cm.min⁻¹, o que corresponde a 0,4 mL.min⁻¹.

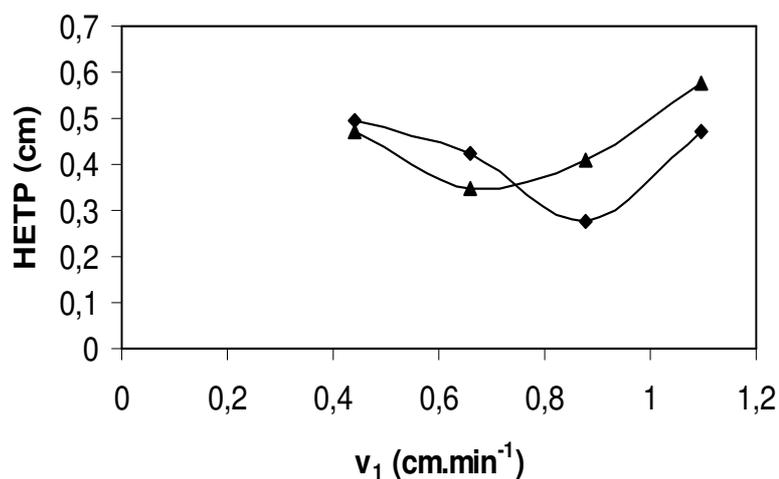


Figura 15- Dados de HETP versus velocidade da fase móvel para xilitol (—◆—) e arabinose (—▲—) a 80 °C.

4.9- Avaliação da influência de diferentes eluentes na separação do xilitol

4.9.1- Etanol

Analisando os resultados dos experimentos nos quais etanol foi utilizado como dessorvente (Tabela 17) constata-se que o aumento na concentração da solução alcoólica de 10 para 30 % causou maior influência sobre a separação do xilitol/arabinose do que sobre a do xilitol/xilose: a ES xilitol/arabinose aumentou em 42 %, enquanto que a separação do xilitol e da xilose foi incrementada em somente 24 %. Entretanto ao comparar o uso de etanol a 10 e 40 % observa-se um aumento de quase 100 % na separação do xilitol em relação a xilose com o emprego de etanol a 40 %.

Tabela 17- Eficiência de separação (ES) do xilitol em coluna de zeólita utilizando diferentes concentrações de etanol (% em v/v).

Concentração	ES _{xilitol/arabinose}	ES _{xilitol/xilose}
0 *	0,86	0,28
10	1,35	0,41
20	1,56	0,45
30	1,92	0,51
40	1,89	0,80
50	1,21	0,61

*experimento realizado com água como eluente

As eficiências de separação obtidas com etanol, independentemente da concentração utilizada, são superiores às obtidas com água, como pode ser visto na Tabela 17. Lorenço (2004) também relata o efeito positivo do uso de etanol na

separação de glicose e frutose: a eficiência do processo praticamente duplicou ao substituir a água por uma solução aquosa de etanol 15 %.

Kaplan e Hutkins (2000) utilizaram uma solução de etanol a 5 e 15 % para eluir, respectivamente, sacarose e uma mistura de fruto-oligossacarídeos. A patente da UOP Inc. (1988) relata a utilização de etanol (puro ou em solução aquosa) na adsorção seletiva de arabinose em leitos de zeólitas do tipo faujasita. Contrariamente a estes resultados, Cheng e Lee (1992) relatam o pequeno efeito do etanol a 95 % como dessorvente na separação de glicose e frutose por zeólita.

Observa-se na Tabela 17 que a máxima eficiência de separação do xilitol/arabinose foi obtida ao utilizar etanol a 30 % (ES= 1,92), enquanto que a do xilitol/xilose foi melhor ao empregar etanol a 40 % (ES= 0,80). Ao aumentar o teor da solução alcoólica de 40 para 50 % são observadas reduções de aproximadamente 36 e 24 % respectivamente para as separações xilitol/arabinose e xilitol/xilose.

Os perfis de concentração obtidos do experimento com etanol a 30 % (Figura 16) demonstram que a xilose é o primeiro componente a eluir da coluna de zeólita, seguida do xilitol e posteriormente da arabinose, que apresenta um maior espalhamento de pico. Esta seqüência é verificada em todos os ensaios, independentemente da concentração de etanol utilizada. Uma adsorção mais forte de arabinose, comparada a açúcares como xilose e glicose, foi relatada nas patentes da Union Carbide Corporation (1985b) e da UOP Inc. (1988) ao utilizar as zeólitas BaX e CaX, respectivamente.

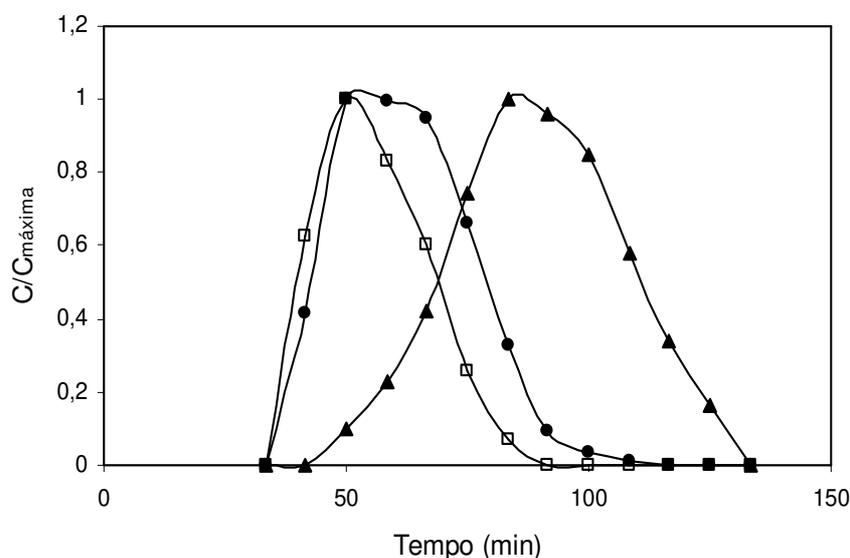


Figura 16- Perfil de eluição de xilitol (—●—), xilose (—□—) e arabinose (—▲—) em leito de zeólita BaWE eluído com etanol a 30 % (v/v).

4.9.2- Acetona

Os dados obtidos dos ensaios com acetona revelam que a concentração de 30 % é nitidamente a mais favorável para separar o xilitol, assim como observado para o etanol com relação à separação xilitol/arabinose.

A Tabela 18 permite verificar aumentos nas diferenças entre os tempos de retenção dos compostos com o uso de concentrações crescentes de acetona, o que implica em melhores separações.

Os maiores tempos de retenção (μ) obtidos foram relativos a arabinose, independentemente da concentração de acetona utilizada, o que permite concluir que a arabinose é o componente da mistura que permanece retido na coluna por maior tempo.

O fato de melhores separações terem sido obtidas com o uso de acetona pode ser explicado pela menor polaridade deste solvente em relação ao etanol e a

água, pois solventes com polaridades menores promovem maior interação e conseqüentemente maior fixação entre o soluto e o adsorvente (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1995).

Os ensaios para seleção do eluente permitiram concluir que a acetona a 30 % (v/v) é o dessorvente que conduz a melhores separações do xilitol, porém com o uso do etanol a 30 % (v/v) foram obtidas eficiências de separação satisfatórias. Uma vez que o etanol é produzido em grandes quantidades, apresenta preço reduzido e é facilmente removido de soluções aquosas, o referido eluente, na concentração de 30 % (v/v), foi escolhido para ser utilizado nos ensaios de separação do xilitol obtido por fermentação.

Tabela 18- Parâmetros de separação do xilitol em coluna de zeólita BaWE utilizando diferentes concentrações de acetona (% em v/v).

	Acetona 10%	Acetona 20%	Acetona 30%
Parâmetro			
μ xilitol	50,53	49,76	74,70
μ arab	64,68	73,15	104,70
μ xilose	47,47	44,96	65,81
μ xilitol- μ arab	14,15	23,39	30,00
μ xilitol- μ xilose	3,06	4,80	8,88
σ^2 xilitol	68,28	119,47	111,52
σ^2 arab	97,95	260,47	148,25
σ^2 xilose	53,58	60,76	75,20
ES xilitol/arabinose	1,56	1,76	2,65
ES xilitol/xilose	0,39	0,52	0,93

μ (min); σ^2 (min²)

4.10- Caracterização do hidrolisado de bagaço natural e concentrado

A hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar permitiu obter diferentes compostos, que estão apresentados na Tabela 19. A avaliação desta tabela demonstra que, dentre os carboidratos, a xilose é o mais abundante e dentre os compostos tóxicos (ácido acético, compostos fenólicos, furfural e hidroximetilfurfural) os fenóis encontram-se em maiores quantidades. Em comparação aos trabalhos desenvolvidos por Carvalho et al. (2002) e Marton (2002), observa-se uma concentração baixa de ácido acético e similar ao valor de $1,91 \text{ g.L}^{-1}$ obtido por Verde (1999).

Tabela 19- Composição parcial do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar natural (HN) e concentrado (HC), expressa em g.L^{-1} .

Compostos	HN	HC
Glicose	1,14	2,98
Xilose	18,12	54,13
Arabinose	1,34	3,88
Ácido acético	1,70	2,94
Furfural	0,13	$1,6 \cdot 10^{-2}$
Hidroximetilfurfural	$7,9 \cdot 10^{-3}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$
Fenóis	3,47	9,57

Após a concentração deste hidrolisado observa-se a ocorrência de um aumento na concentração de glicose, xilose e arabinose proporcional ao fator de concentração, isto é, os teores destes açúcares foram superiores em aproximadamente 3 vezes aos originais, como observado por Rodrigues et al. (2001) e Marton (2002), sugerindo que estes açúcares não foram degradados durante a evaporação a vácuo.

O teor de hidroximetilfurfural aumentou de $7,9 \cdot 10^{-3}$ para $2,0 \cdot 10^{-2} \text{ g.L}^{-1}$, o que corresponde a um fator de concentração igual a 2,5. Um resultado já esperado e observado por Morita (1998) foi a redução na concentração de furfural, pois de acordo com Perry e Green (1997) o baixo ponto de ebulição deste composto em condições de temperatura elevada e pressão reduzida favorece sua redução. O ácido acético, por ser uma substância volátil, apresentou um fator de concentração igual a 1,73, valor similar ao relatado por Morita, Silva e Felipe (2000) e Carvalho et al. (2002). O fator de concentração observado para os fenóis (FC= 2,76) está muito próximo do experimental estipulado (FC= 3).

4.11- Tratamento e fermentação dos hidrolisados

A análise quantitativa dos hidrolisados tratados permitiu verificar a capacidade das metodologias empregadas na redução do furfural, do hidroximetilfurfural (HMF), do ácido acético e dos compostos fenólicos. As concentrações destas substâncias no hidrolisado concentrado e nos tratados estão apresentadas na Tabela 20.

Tabela 20- Concentração dos compostos tóxicos nos hidrolisados concentrado (HC) e tratados, expressa em g.L^{-1} .

	Ac. acético	Furfural	HMF	Fenóis
Hidrolisado				
HC	2,94	$1,6 \cdot 10^{-2}$	$2,0 \cdot 10^{-2}$	9,57
Tratado com variação pH/ carvão ativo	2,90	$8,8 \cdot 10^{-3}$	$2,2 \cdot 10^{-3}$	2,09
Tratado com resina aniônica	2,74	$4,7 \cdot 10^{-3}$	$1,3 \cdot 10^{-2}$	2,84
Tratado com resinas de troca iônica	0,31	$6,1 \cdot 10^{-3}$	$4,3 \cdot 10^{-3}$	0,79

O emprego das resinas de troca iônica A-103S, A-860S, A-500 e C-150 na destoxificação do hidrolisado concentrado permitiu o decréscimo de 89 % da concentração de ácido acético e de 92 % na de compostos fenólicos. A elevada redução dos compostos fenólicos se deve, provavelmente às resinas A-860S e A-500, que de acordo com Purolite (1999) foram desenvolvidas para remover compostos orgânicos coloridos, sendo a A-860S particularmente efetiva quando a concentração destes compostos é alta. Decréscimos de 62 % de furfural e 78 % de hidroximetilfurfural (HMF) foram alcançados, sendo estes resultados similares aos de Larsson et al. (1999), que relatam redução de 70 % dos derivados de furano com resina trocadora de ânions.

A presença de íons metálicos no hidrolisado tratado com resinas foi constatada, no entanto o uso das resinas promoveu remoção de níquel e redução de 80 % de ferro e superior a 98 % dos íons manganês, cromo e magnésio. Verde (1999) constatou remoção de níquel e ferro e Rodríguez et al. (2000) observaram decréscimos maiores que 98,5 % na concentração de ferro e magnésio ao utilizar resinas de troca iônica.

Uma redução nos teores de furfural e fenóis (70 %) e de hidroximetilfurfural (34 %) do hidrolisado concentrado foi verificada com o uso isolado da resina aniônica A-103S. Comparado aos estudos de Verde (1999), este ensaio promoveu redução semelhante de fenóis e mais elevada de hidroximetilfurfural. A A-103S é uma resina macroporosa que, apesar de ter sido desenvolvida para adsorver entre outros compostos, ácidos orgânicos com pKa até 5 (PUROLITE, 1999), no presente trabalho reduziu somente 7 % de ácido acético, valor baixo se comparado aos 24 % relatados por Rodríguez et al. (2000). Uma redução mais elevada no teor deste ácido não foi constatada provavelmente devido ao fato da resina utilizada já estar com sua capacidade total de troca esgotada, devido à prévia redução dos furanos e fenóis. A redução mais elevada de ácido acético relatada por Rodríguez et al. (2000) ocorreu porque anteriormente a A-103S este pesquisador utilizou a resina A-860S, que removeu grande parte dos compostos fenólicos e furfural e 32 % deste ácido.

O tratamento baseado na variação de pH do hidrolisado concentrado e posterior adição de carvão ativo foi eficiente na redução dos fenóis, como descrito por Verde (1999) e do hidroximetilfurfural, como citado por Alves (1997). No entanto, o ácido acético permaneceu no hidrolisado em concentração elevada ($2,90 \text{ g.L}^{-1}$), assim demonstrado na Tabela 20. Esta quantidade de ácido é, de acordo com Felipe et al. (1995), prejudicial ao consumo de xilose, não existindo o efeito estimulante observado em concentrações de até $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ de ácido acético. O decréscimo na concentração de furfural (45 %) foi inferior ao relatado por Alves (1997), que é de 73 %.

A análise dos resultados obtidos da metodologia baseada no uso de carvão ativo como agente único de destoxificação, feita através da comparação entre os valores de concentração dos compostos no hidrolisado natural e no tratado sem concentrar revela decréscimos de 27 % no teor de ácido acético e 38 % de furfural. Reduções mais elevadas foram constatadas para o hidroximetilfurfural (HMF) (99 %) e para os compostos fenólicos (77 %) (Tabela 21). A evaporação a vácuo deste hidrolisado tratado demonstrou que os fatores de concentração obtidos foram similares àqueles discutidos no item 4.10.

Tabela 21- Concentração dos compostos tóxicos no hidrolisado natural (HN), no tratado com carvão ativo e no tratado/concentrado, expressa em g.L^{-1} .

	Ac. acético	Furfural	HMF	Fenóis
Hidrolisado				
HN	1,70	0,13	$7,9.10^{-2}$	3,47
Tratado com carvão ativo	1,24	0,08	7.10^{-4}	0,78
Tratado com carvão ativo e concentrado	2,40	$2,2.10^{-2}$	$1,9.10^{-3}$	2,02

As fermentações dos hidrolisados tratados demonstraram que os maiores valores de produtividade volumétrica ($0,64 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) e fator de rendimento em xilitol ($0,75 \text{ g}_{\text{xilitol}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{xilose}}$) foram obtidos com o emprego das resinas de troca iônica, conforme demonstrado na Figura 17. Esta produtividade foi nitidamente superior às obtidas com os demais tratamentos, observando-se melhoras ao redor de 43, 28 e 41 % em relação à variação de pH/adição de carvão ativo, ao emprego da resina aniônica e ao uso isolado do carvão ativo, respectivamente. Já o fator de rendimento não apresentou variação tão significativa com os tratamentos, com exceção do tratamento baseado na variação de pH/adição de carvão ativo.

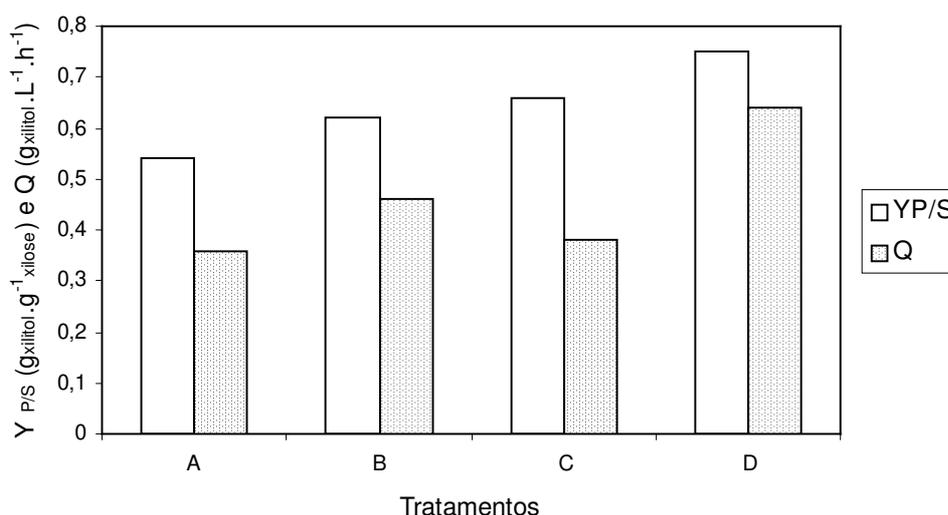


Figura 17- Valores de fator de rendimento $Y_{P/S}$ e produtividade volumétrica Q em xilitol das fermentações dos hidrolisados tratados com variação de pH/carvão ativo (A), resina A103-S (B), carvão ativo (C) e resinas de troca iônica (D).

A pequena redução no teor de ácido acético e de furfural, compostos tóxicos à levedura que podem atuar em sinergia, provavelmente foi a causa da obtenção dos baixos valores dos parâmetros fermentativos (produtividade

volumétrica de $0,37 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e fator de rendimento de $0,54 \text{ g}_{\text{xilitol}}.\text{g}^{-1}_{\text{xilose}}$ ao empregar a variação de pH/adição de carvão (Figura 17). Ressalta-se que este foi o único tratamento a reduzir o teor de xilose do hidrolisado.

As diferentes metodologias avaliadas não exerceram influência no consumo de glicose, que em todas as condições avaliadas ocorreu nas primeiras 12 horas de cultivo. Quanto à arabinose observou-se um consumo na presença de baixas concentrações de xilose no caldo fermentado, conforme também constatado por Morita (1998).

4.12- Fermentação em reator de bancada do hidrolisado tratado com resinas de troca iônica

A composição de carboidratos, polióis, álcoois, ácidos e compostos fenólicos do meio de fermentação contendo hidrolisado de bagaço de cana tratado com resinas de troca iônica está apresentada na Tabela 22.

Os carboidratos xilose, arabinose e manose foram reduzidos pela *Candida guilliermondii* aos seus respectivos polióis: xilitol, arabitol e manitol. Contrariamente, Meyrial et al. (1991) afirmam que ao cultivar esta levedura em meio sintético contendo somente manose, esta hexose não foi convertida em manitol, mas usada para produzir etanol e massa celular. Por outro lado, a produção de arabitol a partir da arabinose foi constatada por estes autores.

Além dos poliois, também se observou a formação de $1,14 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol e $0,78 \text{ g.L}^{-1}$ de etanol e a presença de celbiose ($2,58 \text{ g.L}^{-1}$), ácido glucurônico ($2,02 \text{ g.L}^{-1}$) e compostos fenólicos ($0,52 \text{ g.L}^{-1}$).

Tabela 22- Composição inicial e final do meio fermentação contendo hidrolisado de bagaço de cana, expressa em g.L⁻¹.

Compostos	Concentração inicial	Concentração final
Glicose	1,74	0
Xilose	43,48	0,96
Arabinose	2,76	1,61
Manose	NA	0,20
Celobiose	NA	2,58
Xilitol	0	25,70
Arabitol	0	0,39
Manitol	0	0,08
Glicerol	0	1,14
Etanol	0	0,78
Ac. acético	0,71	0
Ac. glucurônico	NA	2,02
Compostos fenólicos	NA	0,52

NA- não analisado

A análise de metais revelou a presença dos íons cálcio (86 mg.L⁻¹), ferro (44 mg.L⁻¹), níquel (30 mg.L⁻¹), cromo (63 mg.L⁻¹), manganês (11 mg.L⁻¹), magnésio (206 mg.L⁻¹), potássio (5260 mg.L⁻¹) e sódio (9575 mg.L⁻¹). Acredita-se que a elevada concentração de sódio se deve a utilização de hidróxido de sódio para elevar o pH do hidrolisado, sem que o íon sódio desta base fosse trocado com o cátion da resina catiônica C-150 e conseqüentemente removido do hidrolisado.

O hidrolisado fermentado já centrifugado (sem células) contém 41 mg.L^{-1} de proteínas e está isento de furfural, de hidroximetilfurfural e dos ácidos fórmico e levulínico.

Os perfis de consumo de açúcares e de ácido acético e da produção de xilitol estão apresentados na Figura 18. Verifica-se que a xilose e a arabinose foram consumidas parcialmente, respectivamente em 97,8 e 41,7 %, sendo a taxa de consumo da xilose ($0,93 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) muito maior do que a da arabinose ($0,025 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Observação similar quanto as diferentes taxas em que estas pentoses são consumidas é relatada por Meyrial et al. (1991). Com relação à glicose e ao ácido acético, notou-se consumo integral. Através desta figura observa-se que o pH apresenta um pequeno aumento nas primeiras 26 horas de fermentação provavelmente devido ao consumo de ácido acético e então decresce continuamente até o valor de 4,22.

A produtividade volumétrica em xilitol foi de $0,56 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e o fator de rendimento de $0,60 \text{ g}_{\text{xilitol}}.\text{g}^{-1}_{\text{xilose}}$. Estes parâmetros fermentativos foram da mesma grandeza que os obtidos por Silva et al. (2003) que, ao cultivar a levedura *Candida guilliermondii* imobilizada em vidro poroso em reator de leite fluidizado, obtiveram $0,6 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,57 \text{ g}_{\text{xilitol}}.\text{g}^{-1}_{\text{xilose}}$. Embora Morita (1998) tenha aplicado ao hidrolisado um tratamento de destoxificação diferente, os valores encontrados por este pesquisador ($0,55 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $0,63 \text{ g}^{-1}_{\text{xilose}}.\text{g}^{-1}_{\text{xilitol}}$) foram muito similares aos aqui obtidos, mesmo com um consumo parcial de ácido acético. Pode-se concluir que, em reator de bancada, a conversão de xilose em xilitol é a mesma, tratando-se o hidrolisado com resinas ou com variação de pH/carvão ativo.

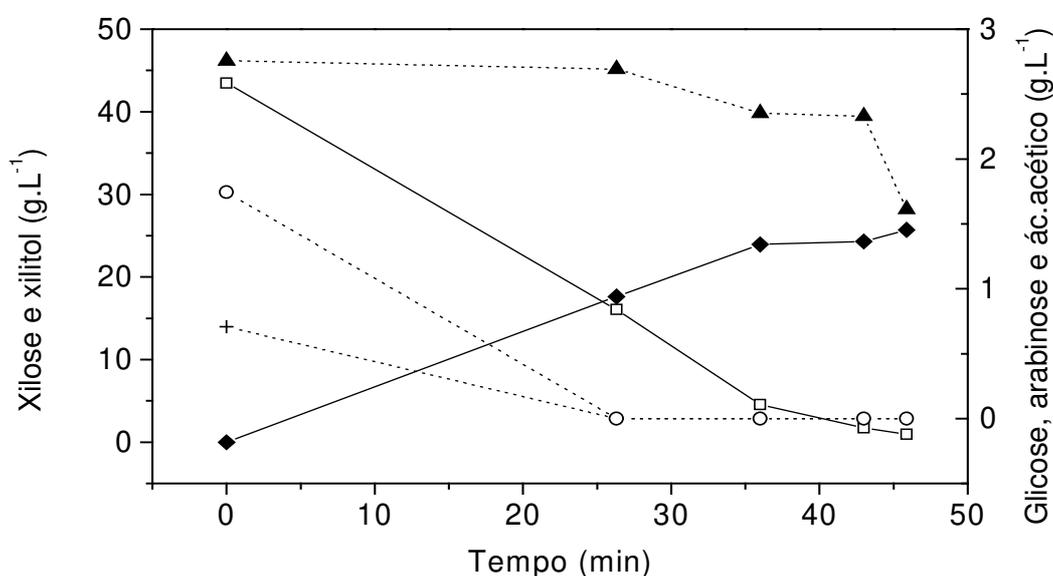
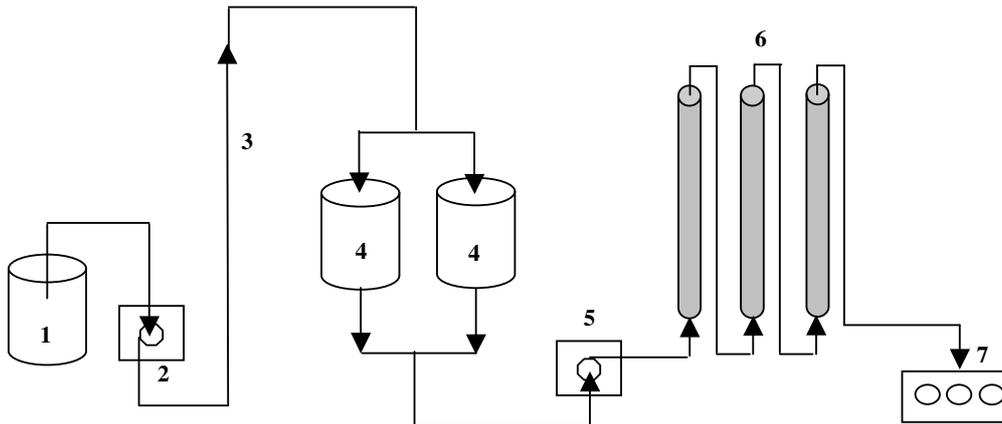


Figura 18- Consumo de xilose (—□—), glicose (--○--), arabinose (--▲--) e ácido acético (---+---) e produção de xilitol (—◆—) durante a fermentação do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.

4.13- Separação do xilitol obtido por fermentação em reator de bancada

Os ensaios de separação conduzidos com hidrolisado fermentado em reator de bancada foram realizados de acordo com o esquema que está representado na Figura 19. A alimentação descendente do meio fermentado na primeira coluna, empregando-se o método de resposta a pulsos cromatográficos, foi realizada com uma bomba peristáltica e as frações contendo os compostos foram coletadas na saída da última coluna utilizando-se um coletor de frações. A temperatura de 80°C foi mantida através da circulação de água na camisa da coluna pelo acoplamento a um banho termostatizado. A composição da solução do pulso utilizada nestes ensaios está apresentada na Tabela 22 do item 4.12.

Para a avaliação da separação do xilitol obtido por fermentação inicialmente foi realizado um ensaio utilizando uma coluna com altura de leito de zeólita de 36 cm, o qual permitiu obter fatores de seletividade iguais a $\alpha_{\text{arabinose, xilitol}} = 1,33$ e $\alpha_{\text{xilose, xilitol}} = 0,91$.



- 1- Fermentador; 2- Centrífuga ou filtro; 3- Meio clarificado; 4- Tanques de espera; 5- Bomba dosadora; 6- Colunas de separação; 7- Coletor seletivo

Figura 19- Esquema simplificado dos processos de fermentação e separação de xilitol.

Posteriormente duas colunas de zeólita BaWE em série com altura total de leito igual a 89 cm e volume de pulso correspondente a 20 % do volume total dos leitos foram empregadas para separar o xilitol. Os resultados deste ensaio foram $\alpha_{\text{arabinose, xilitol}} = 1,34$ e $\alpha_{\text{xilose, xilitol}} = 0,90$, ou se expressos em termos de eficiência de separação, $ES_{\text{xilitol/arabinose}} = 1,47$ e $ES_{\text{xilitol/xilose}} = 0,69$. Utilizando a mesma proporção de volume de pulso em relação ao volume de leito e eluindo uma solução sintética de xilitol ($29,30 \text{ g.L}^{-1}$), arabinose ($3,19 \text{ g.L}^{-1}$) e xilose ($4,08 \text{ g.L}^{-1}$) em leito de 84 cm de altura obteve-se uma melhor separação de xilitol e arabinose, como pode ser verificado na Tabela 23.

Tabela 23- Parâmetros de separação do xilitol proveniente de solução sintética e de meio fermentado em coluna de zeólita BaWE.

Parâmetro	Solução sintética	Meio fermentado
μ xilitol	181,53	170,30
μ arabinose	274,11	228,83
μ xilose	161,88	152,77
$ \mu \text{ xilitol} - \mu \text{ arab} $	92,58	58,53
$ \mu \text{ xilitol} - \mu \text{ xilose} $	19,65	17,53
σ^2 xilitol	1299,17	1208,39
σ^2 arabinose	1942,91	2069,52
σ^2 xilose	876,49	337,64
ES xilitol/arabinose	2,32	1,47
α arabinose, xilitol	1,51	1,34
ES xilitol/xilose	0,60	0,69
α xilose, xilitol	0,89	0,90

μ (min); σ^2 (min²)

Uma redução significativa na diferença entre o tempo de retenção do xilitol e da arabinose, assim como um maior espalhamento do pico da arabinose (expresso por σ^2) foram verificados no ensaio conduzido com meio fermentado em relação a solução sintética. Estes fatos contribuíram para uma separação menos efetiva (5 % inferior), devida provavelmente à presença de outros compostos no meio fermentado, que é confirmada pelos menores valores de eficiência de separação e fator de seletividade. Entretanto com relação ao par xilitol/xilose a menor proporção de xilose em relação ao xilitol parece ser a responsável pela melhor separação verificada no meio fermentado (ES X/X= 0,69) (Tabela 23).

A Tabela 24 apresenta as eficiências de separação obtidas variando-se o número de colunas (e por conseqüência a altura do leito) e o volume do pulso

injetado com relação ao volume do leite. Comparando-se os ensaios realizados em uma única coluna com leite de 36 cm e em duas colunas com altura total de 89 cm, ambos com volume de pulso igual a 20 % do volume do leite, verifica-se que o emprego de duas colunas não apresentou melhora significativa nas separações.

Tabela 24- Eficiências de separação do xilitol (ES) em função do número de colunas de leite fixo de zeólita BaWE e do volume do pulso de alimentação.

Nº colunas	Altura total (cm)	Vp/VI	ES X/A	ES X/X
1	36	0,2	1,42	0,74
2	89	0,2	1,47	0,69
2	89	0,08	3,17	2,72
3	142	0,08	3,81	2,85

ES X/A...eficiência de separação xilitol/arabinose

ES X/X...eficiência de separação xilitol/xilose

Novamente realizou-se um ensaio com duas colunas de zeólita, sendo a primeira delas alimentada com um pulso com volume correspondente a 8 % do volume total dos leitos. A redução do volume do pulso de 13,98 mL ($Vp/VI=0,2$) para 5,65 mL ($Vp/VI=0,08$) resultou no aumento das eficiências de separação xilitol/arabinose e xilitol/xilose em 116 e 294 %, respectivamente (Tabela 24). Lorenço (2004) reduziu o volume do pulso de 4 para 1 mL e verificou uma melhor separação de frutose e glicose usando a zeólita Baylith WE 894 trocada com bário. Cheng e Lee (1992) também empregaram zeólita, do tipo Y trocada com potássio, e relataram aumento de 25 % nesta separação ao reduzir a quantidade injetada na coluna de 8 para 2 mL.

O fracionamento da mistura eluída deste ensaio demonstra que as frações 10 a 12 contêm 22,55 % de xilitol, 58,60 % de glicerol, 13,40 % de celobiose e

5,45 % de outros componentes (ácido glucurônico, arabitol e manitol), como pode ser observado na Tabela 25. A massa de xilitol dessas frações corresponde a somente 1,8 % da injetada.

Tabela 25- Composição das frações obtidas do ensaio com 2 colunas de zeólita BaWE e volume de pulso igual a 8 % do volume do leite, expressa em %.

	Fração 10-12	Fração 13-21	Fração 22-27
Compostos			
Xilose	0	0,82	0
Xilitol	22,55	97,80	53,54
Arabinose	0	0,84	46,46
Arabitol	0,43	0,54	0
Manitol	0,32	0	0
Glicerol	58,60	0	0
Celobiose	13,40	0	0
Ácido glucurônico	4,7	0	0

Já as frações 13 a 21 são altamente enriquecidas em xilitol (97,28 %) e com pequenas quantias de arabinose (0,84 %), xilose (0,82 %) e arabitol (0,54 %). A combinação destas frações permitiu a recuperação de 94,53 % de xilitol. Se a pureza do xilitol exigida for maior que 97 %, recomenda-se reciclar estas frações, ou seja, eluí-las novamente no leito de zeólitas. A fração final (22-27) é constituída de 3,65 % de xilitol e 46,46 % de arabinose e através dela recuperou-se 79,65 % da arabinose presente no pulso. Devido à massa inexpressiva de xilitol não é necessário reciclar esta última fração, a menos que se deseje recuperar a arabinose.

A Figura 20 apresenta os perfis de concentração de alguns dos compostos presentes na solução de alimentação em função do volume de eluição dos mesmos, obtidos do ensaio com 2 colunas e volume de pulso igual a 8 % do volume do leito. O xilitol é o primeiro composto a eluir, com início em aproximadamente 40 mL, seguido da xilose, enquanto a arabinose começa a surgir um pouco antes dos 80 mL. A pequena sobreposição dos picos do xilitol e da arabinose demonstra o alto grau de separação obtido entre estes compostos. Diferentemente dos resultados aqui observados com relação aos tempos de retenção, Jones e Wall (1960) verificaram que, com resina Dowex na forma bária, o xilitol é o componente mais fortemente retido. Outra constatação destes pesquisadores, também diferente da aqui verificada, é a ausência de separação da xilose e da arabinose.

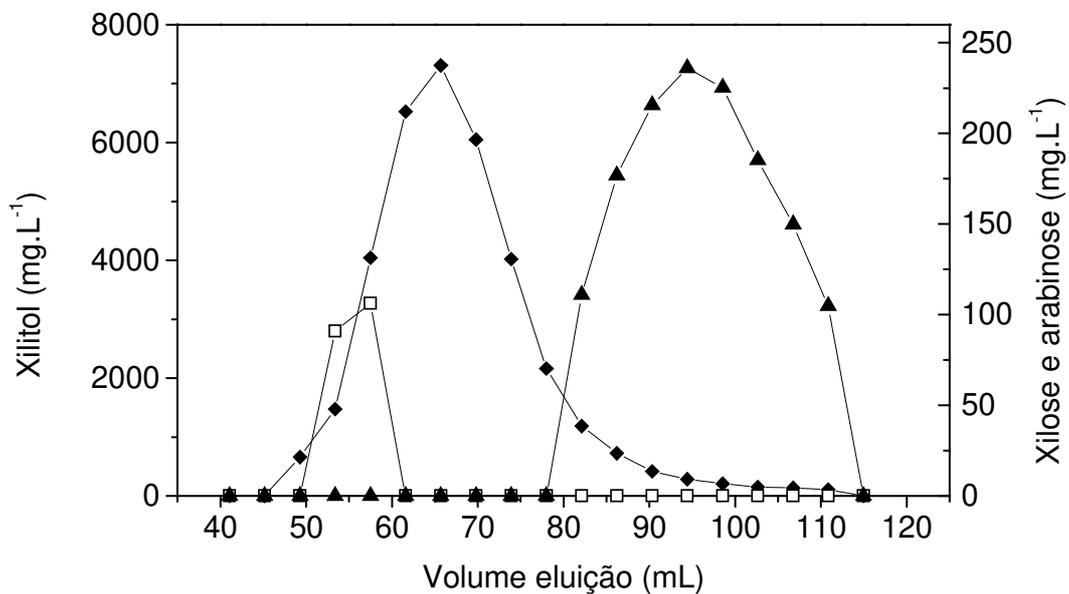


Figura 20- Perfil de eluição de xilitol (—◆—), xilose (—□—) e arabinose (—▲—) em 2 colunas de zeólita BaWE com altura total de leito igual a 89 cm e $V_p/V_l = 0,08$.

Após variar o volume de pulso nos experimentos com duas colunas de zeólita BaWE em série e verificar que o pulso com volume igual a 8 % do volume total dos leitos favoreceu a separação do xilitol, optou-se por utilizar três colunas em série, com altura total de leito igual a 142 cm com o objetivo de melhorar esta separação.

Na Figura 21, que apresenta os perfis de concentração (em escala normalizada) do meio fermentado eluído em 3 colunas, observa-se a separação completa da xilose e arabinose, como já ocorrido no teste anterior (2 colunas, $V_p/V_l = 0,08$). Saska, Chen e Vatelot (1999) empregaram oito colunas em escala piloto preenchidas com a resina Dowex Monosphere 99 e leito móvel simulado e conseguiram uma fração com 83,2 % de xilose e 7,4 % de arabinose.

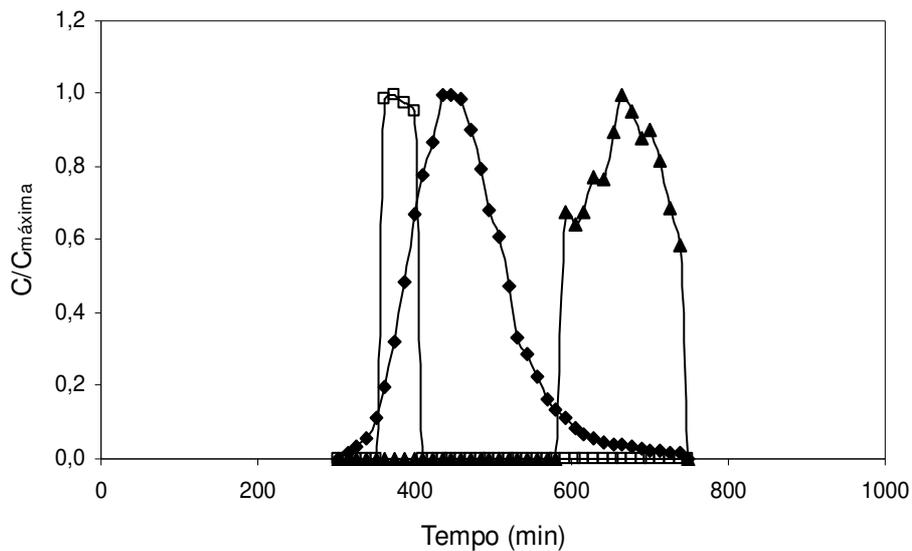


Figura 21– Perfil de eluição de xilitol (—♦—), xilose (—□—) e arabinose (—▲—) em 3 colunas de zeólita BaWE e $V_p/V_l = 0,08$.

A eluição do meio fermentado em 3 colunas de zeólita BaWE permitiu obter eficiências de separação de 3,81 e 2,85 para os pares xilitol/arabinose e xilitol/xilose, respectivamente. A composição das frações ricas em xilitol, obtidas deste ensaio é de 98,29 % de xilitol, 0,47 % de arabinose, 0,49 % de xilose, 0,69 % de arabitol e 0,06 % de manose. A análise das demais frações revelou que o glicerol, o ácido glucurônico e a celobiose eluíram antes da fração rica em xilitol, não contaminando-a. Estes resultados são indícios de que a zeólita utilizada nestes ensaios (BaWE) pode ter atuado como peneira molecular em relação ao ácido glucurônico e a celobiose, já que as moléculas destes compostos apresentam maior número de átomos de carbono do que as de xilitol, xilose e arabinose.

Com relação à separação do xilitol, xilose e arabinose, acredita-se que a seletividade do tamanho do poro do adsorvente provavelmente não foi a propriedade responsável pela separação, já que os mesmos apresentam tamanhos similares. Esta constatação reforça a evidência da formação do complexo cátion-adsorbato, que segundo a patente da UOP (1989), varia a orientação de moléculas de açúcares com a abertura dos poros do adsorvente, promovendo uma disposição adequada da configuração estrutural das moléculas de açúcares que coincide com a forma da abertura do poro do adsorvente.

As frações não foram analisadas quanto aos compostos fenólicos devido ao pequeno volume coletado, contudo, acredita-se que o efeito de peneira acima citado com relação ao ácido glucurônico e a celobiose possa também ter ocorrido, já que o fenol mais simples tem 6 átomos de carbono.

Através da comparação entre os ensaios realizados em duas e três colunas de zeólita BaWE (alturas totais de leito iguais a 89 e 142 cm, respectivamente), com volume de pulso igual a 8 % do volume de leito ($V_p/V_l = 0,08$), observa-se que o incremento na altura do leito resultou em aumento de 5 e 20 % nas eficiências de separação do xilitol/xilose e xilitol/arabinose, respectivamente (Tabela 24). Interpretando os resultados em termos de porcentagem de xilitol nas frações e recuperação do mesmo, pode-se dizer que no ensaio com leito de 89 cm o xilitol

representa 97,80 % da fração enriquecida, sendo sua recuperação igual a 94,5 %. Já a combinação das frações obtidas do leito de comprimento maior (3 colunas) resulta em 98,29 % de xilitol, correspondente a 96,5 % da massa presente na solução do pulso.

Apesar da separação do xilitol ter sido superior no ensaio com 3 colunas de zeólita BaWE verificou-se que a porcentagem deste poliol nas frações enriquecidas foi somente 0,5 % maior do que a obtida com 2 colunas, assim como a quantidade de xilitol recuperada foi apenas 2,1 % superior. No experimento com 2 colunas notou-se a presença de arabinose, xilose e arabitol como contaminantes da fração mais rica em xilitol e no de 3 colunas, além destes componentes, a manose também estava presente. Além destes fatos, o sistema de 2 colunas contribuiu para uma eluição mais rápida dos compostos presentes na alimentação e envolveu menor volume de eluente. Estas observações permitiram concluir que, dentre os sistemas experimentais avaliados, aquele composto de 2 colunas com altura total de leito de 89 cm, alimentadas com um pulso com volume correspondente a 8 % do volume do leito, a 80 °C e velocidade superficial de 0,5 cm.min⁻¹ foi o que conduziu a melhores separações do xilitol presente no hidrolisado fermentado de bagaço de cana-de-açúcar.

5- CONCLUSÕES

Os ensaios iniciais para seleção da zeólita demonstraram que a Baylith WE 894 em sua forma original (Na^+) e trocada com bário, respectivamente NaWE e BaWE, apresentaram maior capacidade de adsorção para o xilitol. A avaliação posterior destas zeólitas a 30 e 50 °C, revelou que o uso da BaWE a 50 °C conduziu à maiores eficiências de separação do xilitol.

A caracterização da zeólita NaWE quanto a taxa Si/Al permitiu concluir que esta é uma zeólita do tipo Y, considerando que todo o silício esteja na estrutura cristalina.

O favorecimento da separação do xilitol de uma solução sintética de xilose e arabinose ocorreu com o emprego de partículas com diâmetro entre 53-125 μm e com concentrações crescentes de etanol e de acetona até 30 %.

O método de eluição cromatográfica demonstrou ser uma técnica de fácil execução na determinação da constante de equilíbrio do xilitol, fornecendo $K=1,03$. A utilização do banho finito resultou em isotermas lineares e pequenas quantidades adsorvidas de xilitol, com valor de K igual a 0,54.

O planejamento fatorial demonstrou que as melhores condições para a separação do xilitol são temperatura de 80 °C, velocidade superficial de 0,5 $\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$ e volume de pulso igual a 20 % do volume de leito ($V_p/V_l=0,2$).

O estudo comparativo de quatro diferentes tratamentos de destoxificação do hidrolisado de bagaço de cana permitiu afirmar que o uso de resinas de troca iônica foi o mais eficiente, promovendo redução de 62 % de furfural, 78 % de hidroximetilfurfural e de aproximadamente 90 % de ácido acético e compostos fenólicos, resultando em uma fermentação com produtividade volumétrica em xilitol de 0,64 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ e fator de rendimento em xilitol igual a 0,75 $\text{g}_{\text{xilitol}}\cdot\text{g}_{\text{xilose}}^{-1}$.

Comparando-se as eficiências de separação do xilitol obtidas usando meio sintético e hidrolisado fermentado como solução de alimentação em condições

semelhantes, constatou-se que esta separação é influenciada pela presença de outros compostos no meio e pela proporção destes.

Os ensaios de separação do xilitol obtido pela fermentação do hidrolisado de bagaço de cana, permitiram concluir que o aumento na altura de leito de 36 para 89 cm, usando volume de pulso igual a 20 % do volume do leito não melhorou a separação do xilitol. Por outro lado, a redução do volume de pulso de 20 para 8 % do volume do leito de 89 cm acarretou no aumento da separação deste poliól.

O fracionamento do hidrolisado fermentado em leito de 89 cm usando volume de pulso igual a 8 % do volume do leito permitiu obter uma fração constituída de 97,80 % de xilitol, com recuperação de 94,5 %, porcentagens ligeiramente inferiores às obtidas com leito de 142 cm. Considerando-se estas observações, o tempo de corrida e a quantidade de eluente necessária, conclui-se que o sistema experimental composto de 2 colunas de zeólita BaWE com altura total de leito de 89 cm, alimentadas com um pulso com volume igual a 8 % do volume do leito a $0,5 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$ e a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ foi o que conduziu a melhores separações do xilitol presente no hidrolisado fermentado de bagaço de cana-de-açúcar.

A recuperação do xilitol do meio fermentado de bagaço de cana-de-açúcar utilizando zeólitas mostrou-se altamente satisfatória se comparada a processos de separação de outros açúcares e polióis, evidenciando a potencialidade da zeólita BaWE como adsorvente na separação do xilitol obtido por fermentação.

6- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para que trabalhos futuros sejam conduzidos na linha de pesquisa do atual trabalho recomenda-se:

- Utilizar metais da série lantanídea como cátion de compensação das zeólitas, uma vez que a literatura revela forte interação do xilitol com os mesmos.

- Avaliar a separação do xilitol empregando solventes com polaridade menor que a da acetona, uma vez constatado que eluentes com polaridade reduzida favorecem tal separação. Ainda com relação ao eluente, executar uma análise do custo-benefício do etanol, que existe em abundância no Brasil.

- Realizar estudos de adsorção do xilitol em faixas de concentração mais elevadas, quando a isoterma poderá se tornar não linear.

- Investigar a separação de soluções concentradas de xilitol de modo a viabilizar a condução deste processo com o caldo obtido industrialmente e realizar o reciclo das frações não enriquecidas neste poliálcool no leito de zeólitas.

- Otimizar a separação do xilitol através do uso de colunas cromatográficas com diâmetros maiores, já que o uso de colunas muito longas implica no aumento da queda de pressão e está relacionado com a disponibilidade de espaço físico.

- Estudar a influência dos compostos presentes no hidrolisado fermentado sobre a separação do xilitol.

- Calcular os parâmetros de transporte como difusividade efetiva e dispersão axial e aplicá-los ao leito móvel simulado, o qual pode conduzir a produtos com maior pureza e a maiores recuperações.

- Utilizar membranas de zeólitas na separação do xilitol, já que esta utilização consiste em um método contínuo que não requer eluente, eliminando deste modo a etapa de destilação para a separação deste.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AFFLECK, R.P. **Recovery of xylitol from fermentation of model hemicellulose hydrolysates using membrane technology.** Blacksburg, 2000. 104p. Thesis (Master in Biological Systems Engineering) – Virgine Politechnical Institute.
2. AJINOMOTO CO., INC., Aoki, Y., Ono, E., Nagashima, K. **Process for producing xylitol of high purity.** US. n. 6.538.133, 2 Aug. 2000, 25 Mar. 2003.
3. ALVES, L.A. **Tratamentos do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para produção biotecnológica de xilitol.** Lorena, 1997. 100p. Tese (Mestre em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena.
4. AVCI, A.K.; ÇAMURDAN, M.C.; ÜLGEN, K.Ö. Quantitative description of protein adsorption by frontal analysis. **Process biochemistry**, v.36, n.1/2, p.141-148, Sept., 2000.
5. BELTER, P.A.; CUSSLER, E.L.; HU, W-S. **Bioseparations: downstream processing for biotechnology.** New York: John Willey & Sons, Inc., 1988. 368p.
6. BESTE, Y.A.; LISO, M.; WOZNY, G.; ARLT, W. Optimization of simulated moving bed plants with low efficient stationary phases: separation of fructose and glucose. **Journal of chromatography A**, v.868, n.2, p.169-188, Feb., 2000.
7. BHATIA, S. **Zeolite catalysis: Principles and applications.** Boca Raton, Florida: CRC Press, 1946. Chap. 2: Zeolite composition and structure: p.7-18.
8. BOLAK sweetens Korean biology industry with competitive material products. **News World**, v.9, n.96, Feb., 2001. Disponível em <<http://www.newsworld.co.kr>>. Acesso: 21/06/2004.

9. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.
10. BRECK, D.W. **Zeolite molecular sieves: Structure, chemistry and use**. New York: John Willey & Sons, Inc., 1974. 771p.
11. BUBNIK, Z.; POUR, V.; GRUBEROVA, A.; STARHOVA, H.; HINKOVA, A., KADLEC, P. Application of continuous chromatographic separation in sugar processing. **Journal of food engineering**, v.61, n.4, p.509-513, Mar., 2004.
12. BURKERT, C.A.V. **Separação de glucose, fructose, oligossacarídeos e dextranas utilizando zeólitas**. Campinas, 2003. 159p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
13. BURKERT, C.A.V.; MAUGERI FILHO, F. **Estudo experimental da separação de cefalosporina C em coluna de leito fixo**. In: XII SIMPÓSIO NACIONAL DE FERMENTAÇÕES, 1998, Uberlândia. **Anais**. Minas Gerais.
14. CARVALHO, W., SILVA, S.S., CONVERTI, A., VITOLO, M., FELIPE, M.G.A., ROBERTO, I.C., SILVA, M.B., MANCILHA, I.M. Use of immobilized *Candida* yeast cells for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.98-100, p.489-497, Mar., 2002.
15. CHENG, Y.L.; LEE, T.Y. Separation of fructose and glucose mixture by zeolite. **Biotechnology and bioengineering**, v.40, n.4, p.498-504, Aug., 1992.
16. CHING, C.B.; HO, C.; HIDAJAT, K.; RUTHVEN, D.M. Experimental study of a simulated counter-current adsorption system - V. Comparison of resin and zeolite absorbents for fructose-glucose separation at high concentration. **Chemical engineering science**, v.42, n.11, p.2547-2555, 1987.

17. CHING, C.B.; RUTHVEN, D.M. A liquid phase chromatography study of sorption and diffusion of glucose and fructose in NaX and KX zeolite crystals. **Zeolites**, v.8, n.1, p.68-73, Jan., 1988.
18. COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. **Introdução a métodos cromatográficos**. 6. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 1995. 279p.
19. CRUZ, J.M.; DOMÍNGUEZ, J.M.; DOMÍNGUEZ, H.; PARAJÓ, J.C. Solvent extraction of hemicellulosic wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity. **Food chemistry**, v.67, n.2, p.147-153, Nov., 1999.
20. DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD., Ikeda, H. **Simulated moving bed separation system**. US. n. 0.108.905, 1 Apr. 2002, 15 Aug. 2002.
21. DANISCO SWEETENERS OY., Heikkila, H., Lewandowski, J., Kuisma, J. **Chromatography separation method**. US. n. 0006191, 9 May 2002, 9 Jan. 2003.
22. DECHOW, F.J. **Separation and purification techniques in biotechnology**. New Jersey: Noyes Publications, 1989, 490p.
23. DE FAVERI, D.; TORRE, P.; PEREGO, P.; CONVERTI, A. Optimization of xylitol recovery by crystallization from synthetic solutions using response surface methodology. **Journal of food engineering**, v.61, n.3, p.407-412, Feb., 2004.
24. DI LUCCIO, M.; SMITH, B.D.; KIDA, T.; BORGES, C.P.; ALVES, T.L.M. Separation of fructose from a mixture of sugars using supported liquid membranes. **Journal of membrane science**, v.174, n.2, p.217-224, July, 2000.
25. DIONEX CORPORATION. **Manuals and literature**: Installation instructions and troubleshooting guide for the CARBOPAC PA10 guard column and CARBOPAC PA10 analytical column. 2000. Doc. nº 031193-05.

26. ERNST, U.P.; HSU, J.T. Industrial Engineering and Chemical Research, v.28, p.1211, 1989. *Apud: Journal of Chromatography A*, v.770, n.1-2, p.39-50, May, 1997.
27. FARIA, L.F.F.; PEREIRA JÚNIOR, N.; NÓBREGA, R. Xylitol production from D-xylose in a membrane reactor. **Desalination**, v.149, n.1-3, p.231-236, Sept., 2002.
28. FELINGER, A. Optimization of preparative separations. **Technical Report**, v.8, n.25, 2003. Disponível em: <<http://www.albmolecular.com/features/tekreps/vol08/no25>>. Acesso em: 21 jun. 2004.
29. FELIPE, M.G. A.; VIEIRA, D.C.; VITOLO, M.; SILVA, S.S.; ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M. Effect of acetic acid on xylose fermentation to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Journal of basic microbiology**, v.35, n.3, p.171-177, Jan., 1995.
30. FLANIGEN, E.M. **Zeolites and molecular sieves**: an historical perspective. In: VAN BEKKUM, H., FLANIGEN, E.M., JANSEN, J.C. Introduction to zeolite science and practice. Amsterdam: Elsevier, 1991. v.58, Chap.2, p.13-33. (Studies in surface science and catalysis).
31. GHOBARKAR, H.; SCHÄF, O.; GUTH, U. Zeolites - from kitchen to space. **Progress in solid state chemistry**, v.27, n.2-4, p.29-73, 1999.
32. GURGEL, P.V.; MANCILHA, I.M.; PEÇANHA, R.P.; SIQUEIRA, J.F.M. Xylitol recovery from fermented sugar cane bagasse hydrolysate. **Bioresource technology**, v.52, n.3, p.219-223, 1995.
33. HEIPIEPER, H.J.; WEBER, F.J.; SIKKEMA, J.; KEWEL, H.; DE BONT, J.A.M. Mechanism of resistance of whole cells to toxic organic solvents. **TIBTECH**, v.12, p.409-415, 1994. *Apud: Bioresource technology*, v.74, n.1, p.25-33, Aug., 2000a.

34. HO, C.; CHING, C.B.; RUTHVEN, D.M. A comparative study of zeolite and resin adsorbents for the separation of fructose-glucose mixtures. **Industrial and engineering chemistry research**, v.26, n.7, p.1407-1412, July, 1987.
35. HYVÖNEN, L.; KOIVISTOINEN, P.; VOIROL, F. Food technological evaluation of xylitol. In: CHICHESTER, C.O., MRAK, E.M., STEWART, G.F. **Advances in food research**. New York: Academic Press, 1982. v.28, p.373-403.
36. HYVÖNEN, L.; TÖRMÄ, R. Examination of sugars, sugar alcohols, and artificial sweeteners as substitutes for sucrose in strawberry jam. Keeping quality tests. **Journal of food science**, v.48, n.1, p.186-192, Jan/Feb, 1983.
37. IOWA ENERGY CENTER. Sweetner made from ethanol scraps. **Perspectives**, v.8, n.3, p.4, Aug/Sept., 2000. Disponível em: <<http://www.energy.iastate.edu/news/newsletters/perspectives/AugustSept00.pdf>>. Acesso: 21/06/2004.
38. JONES, J.K.N.; WALL, R.A. The separation of sugars on ion-exchange resins. Part II. Separation of monosaccharides. **Canadian journal of chemistry**, v.38, n.12, p.2290-2294, Dec., 1960.
39. KAPLAN, H.; HUTKINS, R.W. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Applied and environmental microbiology**, v.66, n.6, p.2682-2684, June, 2000.
40. KÄRGER, J.; RUTHVEN, D.M. **Diffusion in zeolites:** and other microporous solids. New York: John Willey & Sons, Inc., 1991. 605p.
41. KRASTANOV, A. Removal of phenols from mixtures by co-immobilized laccase/tyrosinase and Polyclar adsorption. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v.24, n.24, p.383-388, June, 2000.
42. KRETCHMER, N.; HOLLENBECK, C.B. **Sugars and sweeteners**. Boca Raton: CRC Press, 1991. 297p.

43. KRUSE, B.; SCHÜGERL, K. Investigation of ethanol formation by *Pachysolen tannophilus* from xylose and glucose/xylose co-substrates. **Process biochemistry**, v.31, n.4, p.389-407, May, 1996.
44. LARSSON, S.; REIMANN, A.; NILVEBRANT, N-O.; JÖNSSON, L.J. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.77-79, p.91-103, 1999.
45. LEONARD, R.H.; HAJNY, G.J. Industrial and chemical engineering, v.37, p.390-395, 1945. *Apud*: **Bioresource technology**, v.66, n.1, p.25-40, Oct., 1998.
46. LIEBAU, F. Ordered microporous and mesoporous materials with inorganic hosts: definitions of terms, formula notation, and systematic classification. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.58, n.1, p.15–72, Feb., 2003.
47. LOHMEIER-VOGEL, E.M.; SOPHER, C.R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v.20, n.2, p.75-81, Feb., 1998.
48. LORENÇO, C.M. **Desenvolvimento de processo contínuo de obtenção de fructose a partir de sacarose**. Campinas, 2004. 95p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
49. LU, T-S.; LEE, T-Y. Separation of diethylbenzene isomers by column adsorption and desorption. **Industrial engineering and chemical research**, v.26, n.10, p.2024-2028, Oct., 1987.
50. LUO, C.; BRINK, D.L.; BLANCH, H.E. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolysate to ethanol. **Biomass and bioenergy**, v.22, n.2, p.125-138, Feb., 2002.

51. MA, H-C. **Process for continuous separation of glucose and fructose.** US 6.258.176. 16 June 2000; 10 July 2001.
52. MÄKINEN, K.K. Xylitol: the sugar that prevents tooth decay. **The Futurist**, p.135-139, June, 1976.
53. MARTON, J.M. **Avaliação de diferentes carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para obtenção biotecnológica de xilitol.** Lorena, 2002. 101p. Tese (Mestre em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena.
54. MATIJAŠEVIĆ, Lj.; VASIĆ-RAČKI, Đ. Separation of glucose-fructose mixtures: counter-current adsorption system. **Biochemical engineering journal**, v.4, n.2, p.101-106, Jan., 2000.
55. MATIJAŠEVIĆ, Lj.; VASIĆ-RAČKI, Đ.; PAVLOVIĆ, N. Separation of glucose/fructose mixtures. Analysis of elution profiles. **Chemical engineering journal**, v.65, n.3, p.209-212, Aug., 1997.
56. MATTILA, P.T.; KNUUTTILA, M.L.E.; SVANBERG, M.J. Dietary xylitol supplementation prevents osteoporotic changes in streptozotocin-diabetic rats. **Metabolism**, v,47, p.578-583, 1998.
57. MELAJA, A.J.; HAMALAINEN, L. **Process for making xylitol.** US 4.008.285. 18 June 1975; 15 Feb. 1977.
58. MEYRIAL, V.; DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*: fermentation behaviour. **Biotechnology letters**, v.13, n.4, p.281-286, 1991.
59. MIKKOLA, J.P.; SALMI, T. Three-phase catalytic hydrogenation of xylose to xylitol- prolonging the catalyst activity by means of on-line ultrasonic treatment. **Catalyst today**, v.64, n.3-4, p.271-277, Jan., 2001.

60. MOREL, J.P.; LHERMET, C.; MOREL-DESROSIERS, N. Journal of chemical society Faraday transactions 1, v.84, p.2567, 1988. *Apud: Journal of chemical society Faraday transactions*, v.89, n.11, p.1871-1876, June, 1993.
61. MORITA, T.A. **Estudo da produção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar: efeito do pH e da aeração.** Lorena, 1998. 78p. Tese (Mestre em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena.
62. MORITA, T.A.; SILVA, S.S.; FELPIE, M.G.A. Effects of initial pH on biological synthesis of xylitol using xylose-rich hydrolysate. **Applied biochemistry and biotechnology**, v.84-86, p.751-759, 2000.
63. MOSCOU, L. The zeolite scene. In: VAN BEKKUM, H., FLANIGEN, E.M., JANSEN, J.C. **Introduction to zeolite science and practice.** Amsterdam: Elsevier, 1991. v.58, Chap.1, p.1-12. (Studies in surface science and catalysis).
64. NABORS, O´B.L.; GELARDI, R. **Alternative sweeteners.** 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1991. 461p.
65. NOLLEAU, V.; PREZIOSI-BELLOU, L.; DELGENES, J. P.; NAVARRO, J. M. Xylitol Production from Xylose by Two Yeast Strains: Sugar Tolerance. **Current microbiology**, v. 27, n.4, p.191-197, Oct., 1993.
66. PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource technology**, v.74, n.1, p.17-24, Aug., 2000a.
67. PALMQVIST, E., HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource technology**, v.74, n.1, p.25-33, Aug., 2000b.

68. PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource technology**, v.65, n.3, p.191-201, Sept.,1998.
69. PEPPER, T.; OLINGER, P.M. Xylitol in sugar-free confections. **Food Technology**, v.42, n.10, p.98-106, Oct., 1988.
70. PERRY, R.H.; GREEN, D.W. **Perry's chemical engineer's handbook**. 7.ed. New York: McGraw-Hill, 1997.
71. PIRT, S.J. **Principles of microbe and cell cultivation**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1975. Chap.9: Oxygen demand and supply: p.81-93.
72. PREZIOSI-BELLOY, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J.M. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugar mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. **Enzyme and microbial technology**, v.21, n.2, p.124-129, Aug., 1997.
73. PRIOR, B.A.; KILIAN, S.G.; du PREEZ, J.C. Fermentation of D-xylose by the yeasts *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. Prospects and problems. **Process biochemistry**, v.24, n.1, p.21-32, Feb., 1989.
74. PSZCZOLA, D.E. Sweet beginnings to a new year. **Food technology**, v.53, n.1, p.70-76, Jan., 1999.
75. PUROLITE- ION EXCHANGE RESINS. **Technical Data**, 1999.
76. RANATUNGA, T.D.; JERVIS, J.; HELM, R.F.; MCMILLAN, J.D.; WOOLEY, R.J. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. **Enzyme and microbial technology**, v.27, n.3-5, p.240-247, Aug., 2000.
77. RICARDO FILHO, W.C. **Ensaio de recuperação e purificação do xilitol de um meio fermentado de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. Lorena, 2001. 100p. Tese (Mestre em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena.

78. ROCHA, G.J.M. **Deslignificação de bagaço de cana-de-açúcar assistida por oxigênio**. São Carlos, 2000. 136p. Tese (Doutor em Química) – Instituto de Química- Universidade de São Paulo.
79. RODRIGUES, R.C.L.B.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P.V. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian journal of chemical engineering**, v.18, n.3, p.299-311, Sept., 2001.
80. RODRÍGUEZ, M.L.D.; SOLENZAL, A.I.N.; MORALES, M.V.; MARTÍNEZ, E.A.; SANTANA, E.M.; BUENO, M.G.; DENIS, D.R. Obtención de xilitol a partir de hidrolizados de bagazo de caña. **CubaAzúcar**, v. XXIX, n.1, p.21-24, ene.-mar., 2000.
81. ROUSSEAU, R.W. **Handbook of separation process technology**. New York: John Willey & Sons, Inc., 1987, 1010p.
82. RUSSELL, J.B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of applied bacteriology**, v.73, n.5, p.363-370, Nov., 1992.
83. RUTHVEN, D.M. **Principles of adsorption and adsorption processes**. New York: John Willey & Sons, Inc., 1984. 433p.
84. RUTHVEN, D.M. Zeolites as selective adsorbents. **Chemical engineering progress**, v.84, n2, p.42-50, Feb., 1988.
85. SANCHEZ, B.; BAUTISTA, J. Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and microbial technology**, v.10, n.5, p.315-318, May, 1988.

86. SASKA, M.; CHEN, F.; VATELOT, A. Bagasse-to-xylitol process: preliminary testing. **International sugar journal**, v. 101, n.1207, p.354-358, 1999.
87. SCHMIDT, W. **Application of zeolites**. Disponível em: <http://www.mpi-muelheim.mpg.de/kofo/institut/arbeitsbereiche/schueth/html/zeolites_f2.html>. Acesso em: 21 june 2004.
88. SCHÖLLNER, R.; EINICKE, W-D.; GLÄSER, B. Liquid-phase adsorption of monosaccharide-water mixtures on X and Y zeolites. **Journal of chemical society Faraday transactions**, v.89, n.11, p.1871-1876, June, 1993.
89. SENE, L.; FELIPE, M.G. A.; VITOLO, M.; SILVA, S.S.; MANCILHA, I.M. Adaptation and reutilization of *Candida guilliermondii* cells for xylitol production in bagasse hydrolysate. **Journal of basic microbiology**, v.38, n.1, p.61-69, Jan., 1998.
90. SHEFFIELD HALLAM UNIVERSITY, School of Science and Mathematics. Chromatography: Introductory theory. Disponível em: <<http://www.shu.ac.uk/schools/sci/chem/tutorials/chrom/chrom1.htm>>. Acesso: 21/06/2004.
91. SHERMAN, J.D.; CHAO, .C. C. Carbohydrate separations using zeolite molecular sieves. In: MURAKAMI, Y., IJIMA, A., WARD, J.W. **New developments in zeolite science and technology**. Amsterdam: Elsevier, 1986. v.28, p.1025-1032. (Studies in surface science and catalysis).
92. SILVA, C.F. **Efeitos da troca iônica em zeólitas na adsorção de frutose**. Campinas, 1998. 96p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
93. SILVA, S.S.; SANTOS, J.C.; CARVALHO, W.; ARACAVALA, K.K.; VITOLO, M. Use of a fluidized bed reactor operated in semi-continuous mode for xylose-to-xylitol conversion by *Candida guilliermondii* immobilized on porous glass. **Process biochemistry**, v.38, n.6, p.903-907, Jan., 2003.

94. SUOMEM XYROFIN OY, Heikkila, H.; Nurmi, J.; Rahkila, L.; Toyryla, M. **Method for the production of xylitol.** US. n. 5.081.026, 2 Nov. 1990, 14 Jan. 1992.
95. TAPIAINEN, T.; LUOTONEN, L.; KONTIOKARI, T.; RENKO, M.; UHARI, M. Xylitol administered only during respiratory infections failed to prevent acute otitis media. **Pediatrics**, v.109, n.2, p.e19, Feb., 2002.
96. UHARI, M.; TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, v.19, Supplement 1, p.s144-s147, Dec., 2000.
97. UNION CARBIDE CORPORATION, Chao, C.C.; Sherman, J.D. **Bulk separation of sorbitol by selective adsorption on zeolitic molecular sieves.** US. n. 4.544.778, 29 Aug. 1984, 1 Oct. 1985a.
98. UNION CARBIDE CORPORATION, Chao, C.C.; Sherman, J.D. **Separation of arabinose by selective adsorption on zeolitic molecular sieves.** US. n. 4.516.566, 30 Dec. 1982, 14 May 1985b.
99. UNION CARBIDE CORPORATION, Goodman, W.H. **Process for separating maltose from mixtures of maltose, glucose and other saccharides.** US. n. 4.707.190, 2 Sep. 1986, 17 Nov. 1987.
100. UNION CARBIDE CORPORATION, Sherman, J.D.; Chao, C.C. **Bulk separation of polyhydric alcohols by selective adsorption on zeolitic molecular sieves.** US. n. 4.456.774, 13 Oct. 1983, 26 June 1984.
101. UOP, Kulprathipanja, S. **Process for separating arabinose from a mixture of aldoses.** US. n. 4.880.919, 31 Dec. 1986, 14 Nov. 1989.
102. UOP INC, Chang, C-H. **Process for separating arabinose.** GB. n. 0.290.684, 8 May 1987, 17 Nov. 1988.
103. VASCONCELOS, Y. Não sobra nem o bagaço. Disponível em: http://revistapesquisa.fapesp.br/show.php?id=revistas1.fapesp1..20020702.20020777..SEC7_2>. Acesso: 26/10/2004.

104. VERDE, M.V. **Aplicação de resinas de troca iônica no tratamento de hidrolisado hemicelulósico para processos fermentativos.** Lorena, 1999. 81p. Tese (Mestre em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena.
105. ZABNER, J.; MICHAEL, P.S.; LAUNSPACH, J.L.; KARP, P.H.; KEARNEY, W.R. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. **PNAS**, v.97, n.21, p.1164-1169, 2000.