

# Tecnologia supercrítica como uma alternativa para purificar xilitol biotecnológico

## Supercritical technology as an alternative for biotechnological xylitol purification

Diego Tresinari dos Santos<sup>1\*</sup>; Arturo Fernández Sotelo<sup>2</sup>; Boutros Fouad Sarrouh<sup>3</sup>; Lilia Masson Salaue<sup>4</sup>; Nalda Romero Palácios<sup>4</sup>; Silvio Silvério Silva<sup>5</sup>

### Resumo

Processos biotecnológicos têm sido desenvolvidos e aplicados com sucesso para a obtenção de novos produtos. Entre estes, um em desenvolvimento é o uso de microorganismos que fermentam a xilose da fração hemicelulósica de resíduos agroindustriais à xilitol, um alimento funcional com importantes aplicações industriais. Dentre os resíduos agroindustriais o bagaço de cana-de-açúcar é o mais abundante resíduo lignocelulósico no Brasil, e este não tem sido aproveitado em todo seu potencial devido ao desconhecimento ou a não existência de tecnologias disponíveis para serem prontamente aplicadas, ou têm sido utilizado de forma menos valorizada. Neste contexto a biotecnologia surge como uma via alternativa para geração de produtos de alto valor agregado visando aproveitar estes resíduos em todo seu potencial. Basicamente os processos biotecnológicos podem ser divididos em duas etapas: a etapa do processo em si e a etapa de purificação. Como as etapas de separação, recuperação e purificação constituem uma parte importante do processo biotecnológico, podendo alcançar até 80 % do custo final do produto, este trabalho, por conseguinte, visou à recuperação e purificação de xilitol através do uso de uma tecnologia alternativa, ainda não aplicada com este objetivo, a tecnologia supercrítica. O bioprocessos foi conduzido em um reator de leito fluidizado com células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em alginato de cálcio eficazmente e o processo de purificação do meio fermentado foi realizado em um extrator supercrítico com capacidade de 50ml usando CO<sub>2</sub> + etanol como solvente. Foi-se avaliado a influência dos parâmetros: pressão e suporte no processo de purificação, utilizando um planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> sendo a temperatura e o tempo de residência do solvente com a matriz líquida mantidas constantes. Os resultados preliminares demonstram a potencialidade da utilização da tecnologia supercrítica como uma alternativa para purificar xilitol biotecnológico produzido a partir de bagaço de cana-de-açúcar.

**Palavras-chave:** Purificação. Xilitol. Bagaço de cana-de-açúcar. Tecnologia supercrítica. Processos biotecnológicos.

### Abstract

Biotechnological processes have been developed and applied successfully to obtain new products. Among these, one in development is the use of microorganisms that ferment xylose from the hemicellulosic fraction of agroindustrial waste to xylitol, a functional food with important industrial applications.

<sup>1</sup> Pesquisador da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. E-mail: diego\_tresinari@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Graduando da Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas da Universidad de Chile, UC. E-mail: afernandezsotelo@gmail.com

<sup>3</sup> Pesquisador da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, USP. E-mail: bsarrouh@yahoo.es

<sup>4</sup> Profs. da Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas da Universidad de Chile, UC. E-mail: lmasson@ciq.uchile.cl; nromero@uchile.cl

<sup>5</sup> Prof. da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, USP. E-mail: silvio@debiq.eel.usp.br

\*Autor para correspondência

Among the agroindustrial waste the sugarcane bagasse is the most abundant lignocellulosic residue in Brazil, and this has not been exploited to its full potential due to ignorance or lack of readily available technology to be applied, or have been used in a less valued. In this context the biotechnology emerges as an alternative route for generation of high-value added products aimed use this waste suitably. Basically the biotechnological processes can be divided in two stages: the stage of the process itself and the purification stage. As the separation, purification and recovery stages are an important part of the biotechnology process, which can reach up to 80% of the final cost of the product, this study therefore aimed the recovery and purification through the use of an alternative technology, not yet applied for this aim, the supercritical technology. The bioprocess was carried out in a fluidized reactor with cells of *Candida guilliermondii* immobilized in calcium alginate effectively and the purification process was tested in a supercritical extractor with a capacity of 50ml using CO<sub>2</sub> + ethanol as solvent. It was evaluated the influence of the parameters: pressure and support in the purification process, using a 2<sup>2</sup> full factorial design keeping the temperature and residence time of solvent with the liquid matrix constant. The preliminary results showed the potentiality of use supercritical technology as an alternative for biotechnological xylitol purification produced from sugarcane bagasse.

**Key words:** Purification. Xylitol. Sugarcane bagasse. Supercritical technology. Biotechnology

## Introdução

O xilitol além de ser um adoçante alternativo não cariogênico de grande valor sócio-econômico, tem se destacado na área biomédica sendo utilizado na prevenção e combate de patologias como a dermatite atópica (MASAKO et al., 2005a, b), colite pseudo-membranosa (NAABER et al., 1996), otite média aguda (KONTIOKARI; UHARI; KOSKELA, 1998), osteoporose (TISCHLER et al., 1996), anemia hemolítica (WANG; VAN EYS, 1981) e fibrose cística (ZABNER et al., 2000).

Tradicionalmente o xilitol é produzido por síntese química através da hidrogenação catalítica da D-xilose por um processo que apresenta elevado custo devido às condições de alta pressão e temperatura utilizadas e a necessidade de diversas etapas de purificação da matéria-prima empregada. (SILVA et al., 1997; WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998). O alto gasto energético aliado à necessidade de purificação prévia da matéria-prima tem motivado a busca de uma rota alternativa para produção deste adoçante.

No Brasil, um dos resíduos lignocelulósicos mais abundantes é o bagaço de cana-de-açúcar. Existem várias pesquisas visando o seu aproveitamento. Uma potencial alternativa seria o emprego do bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima para a bioprodução de xilitol (SILVA et al., 1997). Os trabalhos relacionados com a produção de xilitol

a partir de resíduos lignocelulósicos encontrados na literatura enfatizam fundamentalmente os aspectos de obtenção e tratamento de hidrolisados hemicelulósicos, a redução de xilose a xilitol por via química, assim como os aspectos metabólicos da produção por via biotecnológica. Entretanto, o processo de recuperação e purificação deste bioproduto tem sido pouco reportado na literatura.

Um dos mais complexos passos para o estabelecimento de um processo fermentativo industrial é a etapa de recuperação do produto formado. Segundo Wheelwright (1987), a etapa de recuperação e purificação de produtos obtidos de meios fermentados é a parte crítica no estabelecimento de um processo biotecnológico, representando a maior fração do custo de produção. Sendo assim, há a necessidade de se estabelecer técnicas eficientes e competitivas, de modo a tornar o processo biotecnológico viável economicamente.

Segundo Asenjo (1990), quando se pretende separar determinado produto de uma solução, deve-se levar em consideração alguns critérios pertencentes ao que o autor chama de regulamento: “escolha o processo de separação baseado nas diferentes propriedades físico-químicas ou bioquímicas, escolhendo o processo pelo qual irá se explorar as diferenças destas propriedades entre o produto e impurezas de maneira mais eficiente”.

Uma variedade de técnicas tem sido

desenvolvida para a separação, recuperação e purificação de ingredientes alimentícios. Alguns como a cristalização ou precipitação já estão bem estabelecidos, enquanto outros, separação baseada em membranas e extração com fluidos supercríticos têm sido estudadas visando a sua aplicação pela indústria em um futuro próximo (SINGH; SINGH, 1996).

A extração com fluidos supercríticos é um procedimento ambientalmente limpo que se tem mostrado com um grande potencial para a extração e purificação de compostos orgânicos em diversas áreas, como na indústria farmacêutica, de cosméticos, bebidas e alimentos (YODA et al., 2003).

Um fluido supercrítico é definido por como sendo alguma substância que se encontra na sua temperatura e pressão críticas. O fluido supercrítico apresenta propriedades físico-químicas intermediárias entre líquido e gás. Sua densidade próxima à dos líquidos aumenta seu poder de solvente e sua elevada difusividade e baixa viscosidade acelera a transferência de massa (BRUNNER, 1994).

De todos os fluidos com potencial de utilização, destaca-se o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), em função de sua temperatura crítica ser ligeiramente acima da temperatura ambiente ( $31,1^\circ \text{C}$ ), o que evita a destruição de substâncias termossensíveis, a sua pressão crítica (73,8 bars ou 1071 psi) não é difícil de ser obtida, não é inflamável, é inodoro e quimicamente inerte. Adicionalmente,  $\text{CO}_2$  é encontrado em alta pureza a um baixo custo (BRUNNER, 1994).

Segundo Yoda et al. (2003) quando se tem a necessidade de solubilizar substâncias de maior polaridade, é necessário adicionar pequenas quantidades de co-solvente, geralmente solventes orgânicos polares como o etanol, para modificar as propriedades do solvente.

Diante do exposto, este artigo visou avaliar a recuperação e purificação de xilitol produzido a partir da bioconversão de xilose de hidrolisado

hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar através do uso de uma tecnologia alternativa, ainda não aplicada com este objetivo, a tecnologia supercrítica.

## Material e Métodos

### *Obtenção, concentração, caracterização e tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar*

Foram utilizadas amostras de bagaço de cana-de-açúcar provenientes da Usina Guarany, localizada na cidade de Olímpia/ SP. O hidrolisado hemicelulósico foi obtido em reator de aço inox com capacidade de 250 litros, localizado no departamento de Engenharia Química da Escola de Engenharia de Lorena/USP. O bagaço foi percolado com  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (98 % de pureza) como catalisador em uma razão de 100 mg  $\text{H}_2\text{SO}_4$ / g de matéria seca durante 10 minutos à temperatura de  $121^\circ \text{C}$ . Após resfriado, o hidrolisado foi centrifugado e estocado em câmara fria à  $4^\circ \text{C}$ . O hidrolisado foi então concentrado sob pressão reduzida em um evaporador de aço inox com capacidade volumétrica de 30 litros à  $70^\circ \text{C}$ , a fim de se obter uma concentração de xilose 5 vezes maior do àquela obtida na hidrólise. Após a etapa de concentração o hidrolisado foi tratado com óxido de cálcio comercial para elevação do pH até o valor de 7,0. Em seguida foi filtrado sob vácuo e então tratado com ácido fosfórico para diminuir o pH até o valor de 5,5, seguido novamente de outra etapa de filtração. Carvão ativo foi utilizado em uma proporção de 2,5% (massa de carvão/ volume de hidrolisado tratado), levado ao shaker onde foi agitado a 200 rpm,  $30^\circ \text{C}$ , por uma hora. Em seguida, filtrado a vácuo novamente e autoclavado sob pressão de 0,5 atm durante 15 minutos conforme procedimento descrito por Alves et al. (1998). A caracterização química visando a determinação de seus açúcares componentes foi realizada por HPLC em cromatógrafo SHIMADZU LC-10-AD.

### *Microorganismo e preparo do inóculo*

Em todos os experimentos utilizou-se a linhagem de levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, descrita por Barbosa et al. (1988), proveniente da coleção de culturas do Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena/USP, mantida em meio ágar extrato de malte.

O inóculo foi preparado por cultivo da levedura em frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 50 ml de meio sintético composto de 30 g/l de xilose comercial, 3 g/l de sulfato de amônio, 0,1 g/l de cloreto de cálcio e 10% (v/v) de extrato de farelo de arroz. As células, cultivadas em incubadora de movimento rotatório com agitação de 200 rpm, a temperatura de 30°C, por 24 horas, foram recuperadas por centrifugação a 2000Xg por 20 min, lavadas e ressuspensas em água destilada esterilizada. Volumes adequados desta suspensão foram utilizados como inóculo de forma a se obter uma concentração celular inicial adequada no fermentador. Para o preparo do extrato de farelo de arroz uma suspensão de farelo de arroz na proporção de 200 g de farelo para cada litro de água foi preparada. Em seguida, esta suspensão foi autoclavada por 15 min e a temperatura de 111oC. Após o resfriamento, o sobrenadante foi separado por centrifugação a 2000Xg por 30 min e utilizado nos ensaios.

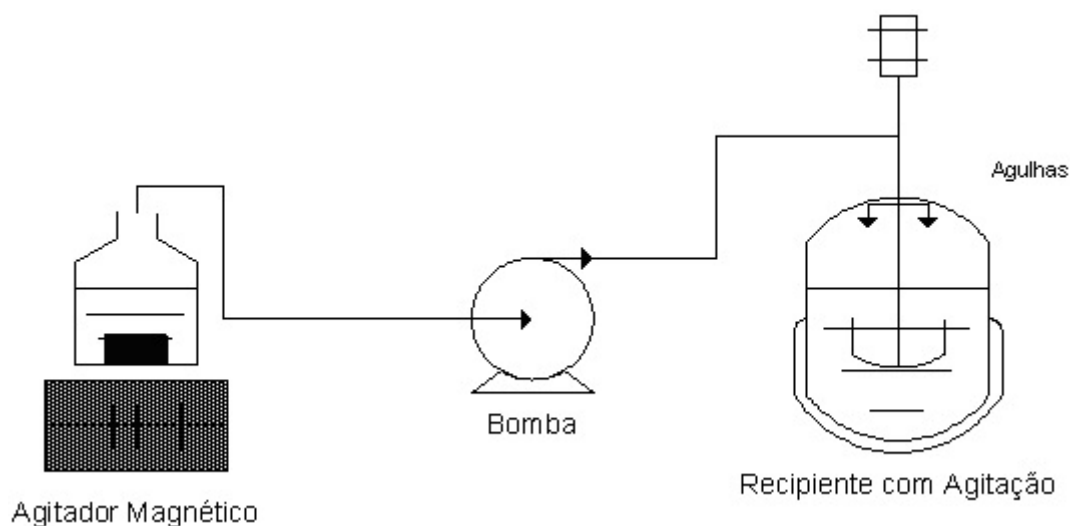
### *Meio de fermentação*

O meio de fermentação foi preparado pela adição

de 3g/l de sulfato de amônio, 0,1 g/l de cloreto de cálcio e 10% (v/v) de extrato de farelo de arroz ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

### *Imobilização das células de candida guilliermondii em alginato de cálcio*

As células foram imobilizadas pelo método de aprisionamento em gel de alginato de cálcio. A suspensão celular, obtida conforme descrito anteriormente, foi adicionada a uma solução de alginato de sódio (2%) (SG 1100– Degussa Ltda, Brasil), previamente autoclavada a 111°C por 15 min, de modo a se obter uma suspensão celular homogênea, com concentração celular igual a 3,0 g/l. Esferas de gel foram produzidas pelo gotejamento desta suspensão em uma solução de cloreto de cálcio com concentração igual a 0,1 M mantida sob agitação, previamente preparada em água destilada e esterilizada a 121°C por 30 min. Para o gotejamento da suspensão celular na solução de cloreto de cálcio, uma bomba peristáltica e duas agulhas 19 G (1 ½ polegada) foram utilizadas, conforme ilustrado na (Figura 1). As esferas formadas, contendo as células imobilizadas, foram mantidas na solução de cloreto de cálcio a 4°C pelo período de 24 h. Após o período de cura, as esferas foram lavadas em água destilada esterilizada e utilizadas nos ensaios fermentativos.

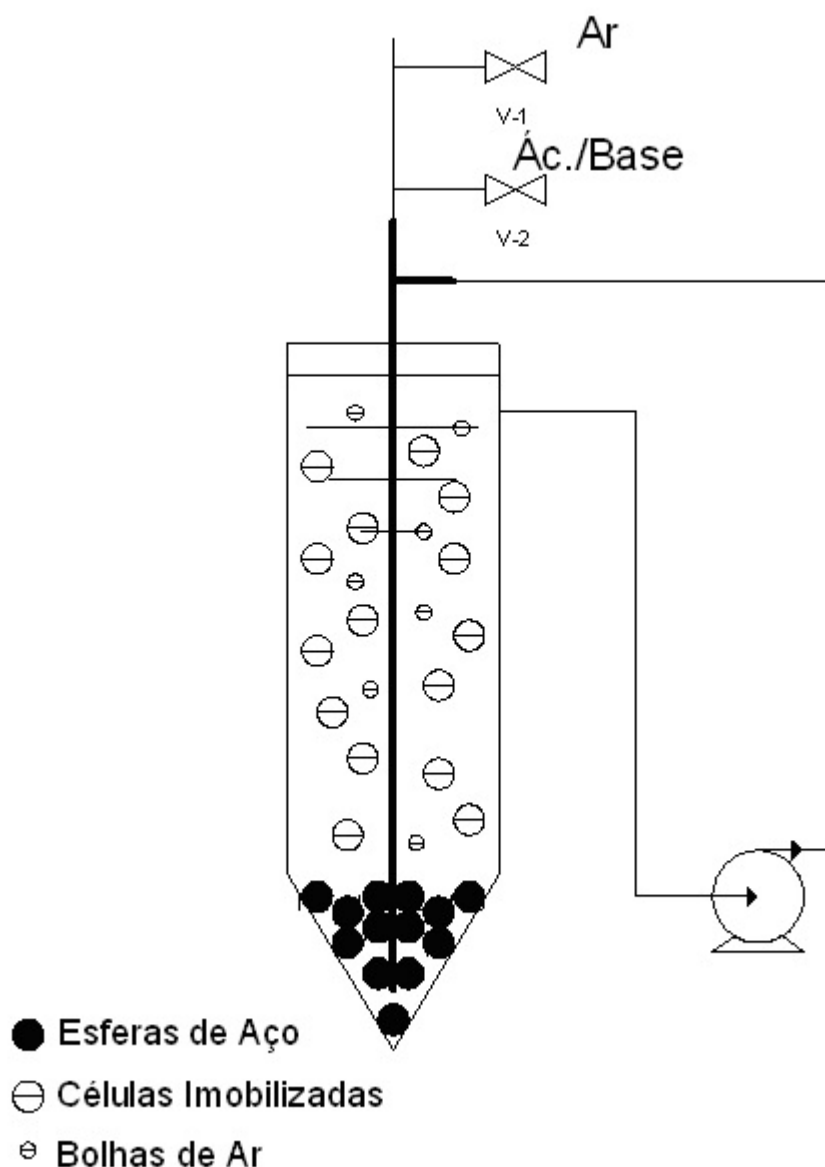


**Figura 1.** Representação esquemática do sistema utilizado para a imobilização das células de *Candida guilliermondii* em gel de alginato de cálcio.

#### *Biorreator de leito fluidizado e condições de fermentação*

O processo de bioconversão foi conduzido em um reator de leito fluidizado adquirido da Bioengineering (Wald, Suíça) marca PID Fermenter AWS, com capacidade nominal de 1,7 litros (Figura 2). A fermentação foi controlada utilizando sensores apropriados no recipiente principal do reator para monitorar as variáveis: temperatura, pH inicial, oxigênio dissolvido, vazão de recirculação do meio fermentado (fluxo da bomba de reciclo) e vazão de ar. O processo foi iniciado pelo enchimento do reator com o suporte alginato de cálcio contendo células ativas de *Candida guilliermondii*

imobilizadas e o meio de fermentação, sendo que, em seguida, os parâmetros operacionais foram ajustados para uma temperatura de 30°C e pH inicial de fermentação de 5,5. Para a determinação de possíveis efeitos determinados pelas variáveis em estudo sobre as respostas analisadas, optou-se pela adoção do tempo de consumo de 90% de xilose inicial presente no meio como ponto de referência para as análises estatísticas. Foram determinadas as concentrações dos açúcares residuais e xilitol por HPLC em cromatógrafo SHIMADZU LC-10-AD após a separação das células imobilizadas do meio fermentado por simples filtração.



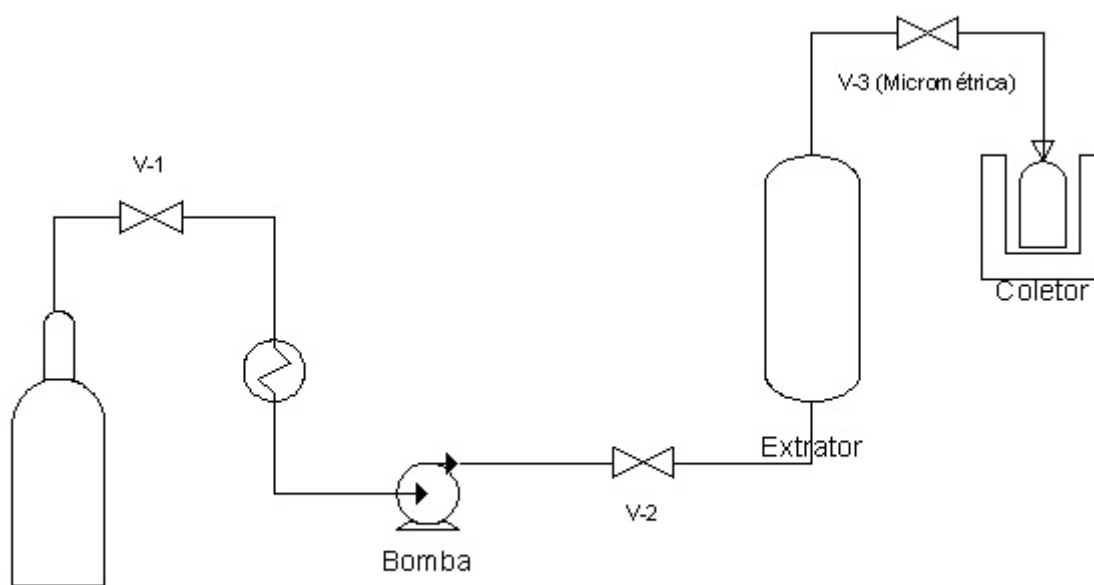
**Figura 2.** Representação esquemática do biorreator de leito fluidizado.

#### *Extrator supercrítico e condições de extração*

O extrator supercrítico utilizado foi um da marca Applied Separations, modelo Spe-ed SFE, equipado com restritor independente de fluxo e pressão, com extratores de aço inoxidável 316SS com capacidade de 50ml projetados para resistir a pressões de 600bar e temperatura de 220 °C (Figura 3). CO<sub>2</sub> foi o solvente utilizado para percolar o extrator. O extrator foi preenchido com uma solução contendo

45 % (v/v) de meio fermentado e 55 % (v/v) de etanol puro diretamente ou através de embeбimento em celite (suporte sólido inerte).

O procedimento de extração consistiu inicialmente de extração estática por 15 minutos, seguida de extração dinâmica à uma determinada temperatura ( $T = 50^{\circ} \text{C}$ ) e pressão (400 ou 500 bar) por também 15 minutos.

Cilindro de CO<sub>2</sub>**Figura 3.** Representação esquemática do extrator supercrítico.*Delineamento experimental*

Pressão e uso de suporte (Celite) foram as variáveis avaliadas. Na (Tabela 1) estão apresentados os níveis escolhidos para cada variável. O sinal (+) representa o nível máximo; o sinal (-) o nível mínimo. Um planejamento fatorial completo 2<sup>2</sup> foi estudado, conforme mostrado na (Tabela 2). Como variáveis de resposta considerou-se a eficiência de

extração de xilose do meio fermentado e a eficiência de retenção de xilitol no resíduo (meio fermentado). As outras variáveis, volume de amostra, volume de co-solvente, tempo de extração e temperatura foram todas fixadas em valores previamente determinados. Baseado em experimentos anteriores (resultados não apresentados) os valores empregados das variáveis foram, respectivamente: 4ml, 5ml, 30 minutos e 50° C.

**Tabela 1.** Codificação dos níveis para os parâmetros avaliados (Temperatura cte = 50°C)

Parâmetros	Nível Inferior (-)	Nível Superior(+)
X <sub>1</sub> (Pressão, bar)	400	500
X <sub>2</sub> (Suporte (Celite))	Sem	Com

**Tabela 2.** Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> para estudo da influência das variáveis: pressão e suporte na eficiência de extração de xilose e xilitol do meio fermentado.

Experimentos	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub> (bar)	X <sub>2</sub>
1	-	-	400	Sem
2	-	+	400	Sem
3	+	-	500	Com
4	+	+	500	Com

*Parâmetros de fermentação e de extração***a) Fator de conversão de xilose em xilitol (Yp/s, g xilitol/g xilose)**

$$Yp/s = \Delta P / \Delta S = (P_f - P_i) / (S_i - S_f) \quad (1)$$

Onde:

P<sub>f</sub> = concentração final de xilitol

P<sub>i</sub> = concentração inicial de xilitol

S<sub>f</sub> = concentração final de xilose

S<sub>i</sub> = concentração inicial de xilose

**b) Eficiência de conversão de xilose em xilitol (η%)**

$$\eta (\%) = (Yp/s \text{ obtido} / Yp/s \text{ teórico}) \times 100 \quad (2)$$

Onde: Yp/s teórico = 0,917 g xilitol/g xilose (BARBOSA et al., 1988)

**c) Produtividade volumétrica em xilitol (Qp, g xilitol/l.h)**

$$Qp = (P_f - P_i) / t \quad (3)$$

Onde: t = tempo de fermentação.

**d) Eficiência de extração de xilose do meio fermentado (%)**

$$E_1 (\%) = (\text{xilose extraída (g/l)} / \text{xilose inicial na amostra (g/l)}) \times 100 \quad (4)$$

Onde: xilose inicial na amostra (g/l) = 4,2 g/l

**e) Eficiência de retenção de xilitol no resíduo (meio fermentado) (%)**

$$E_2 (\%) = [\text{xilitol inicial na amostra (g/l)} - \text{xilitol extraído (g/l)}] / \text{xilitol inicial na amostra (g/l)} \times 100 \quad (5)$$

Onde: xilitol inicial na amostra (g/l) = 41,5 g/l

*Métodos analíticos*

As concentrações dos açúcares e xilitol foram determinadas por HPLC em cromatógrafo SHIMADZU LC-10-AD. Para a análise do teor das amostras estas foram previamente filtradas em filtro *Sep Pak* C18 e injetadas no cromatógrafo, utilizando-se as seguintes condições: coluna BIO-RAD AMINEX HPX-87H (300 X 7,8 mm) mantida à temperatura de 45°C; volume de injeção de 20 µl; detector de índice de refração RID 6A; fase móvel H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 N e fluxo de 0,6 ml/min.

**Resultados e Discussão**

*Obtenção de xilitol biotecnológico a partir de bagaço de cana-de-açúcar utilizando célula de candida guilliermondii imobilizadas em alginato de cálcio*

Uma etapa primordial na obtenção de xilitol biotecnológico a partir de resíduos agroindustriais é a etapa de hidrólise da fração hemicelulósica, fração esta rica em xilose (SARROUH et al., 2007a). Neste trabalho o método de hidrólise ácida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> foi o utilizado.

Após as etapas de concentração, tratamento e auto-clavagem do hidrolizado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar uma concentração de 65,11 g/l de xilose foi obtida. Outros compostos também foram detectados, tais como outros açúcares, arabinose, glicose, ácido acético, bem como traços dos inibidores de fermentação furfural, hidroximetilfurfural, dentre outros, conforme esperado (SARROUH; SANTOS; SILVA, 2007b). Devido à baixa concentração destes compostos no hidrolizado considerou-se neste estudo que o hidrolizado continha majoritariamente xilose.

Utilizando este hidrolizado e células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em alginato de cálcio após 96 horas de fermentação obteve-se um meio fermentado contendo uma concentração de xilitol de 41,5 g/l e de xilose residual de 4,2 g/l, sendo 93,55 % do substrato (xilose) convertido neste



produto (xilitol). O fator de conversão de xilose em xilitol ( $Y_{P/S}$ ) foi de 0,573, a eficiência de conversão de xilose em xilitol ( $\eta$ ) de 62,49 % e a produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_p$ ) de 0,389 g de xilitol/l.h.

Comparativamente a outros trabalhos desenvolvidos utilizando outros tipos de reatores e/ou outros métodos de imobilização de células para o mesmo sistema fermentativo os resultados deste trabalho foram similares e em alguns casos melhores. Santos et al. (2003) utilizando células imobilizadas em vidro poroso e o mesmo bioreator de leito fluidizado neste trabalho obteve uma produtividade volumétrica em xilitol ( $Q_p$ ) 28,03 % menor que a obtida com o sistema de imobilização selecionado neste estudo.

### *Recuperação e purificação de xilitol utilizando tecnologia supercrítica*

O meio fermentado obtido contendo majoritariamente xilose e xilitol foi utilizado nos ensaios de recuperação/purificação de xilitol. Analogicamente a consideração de que o hidrolisado somente continha xilose devido à baixa concentração dos outros compostos, considerou-se que no meio fermentado somente continha xilose não fermentada e xilitol.

A separação de compostos de meios complexos tem sido estudada para diferentes sistemas. Processos que visam à separação de xilose de outros compostos ainda estão em fase de desenvolvimento e geralmente empregam várias etapas. Em 2009, um processo foi desenvolvido para esta finalidade, porém somente emprega  $CO_2$  supercrítico em uma das diversas etapas para remover os compostos mais apolares (HOLLINGSWORTH, 2009). Payne e Kerton (2010) estudando a solubilidade de xilose e xilitol em diferentes fluidos ambientalmente corretos demonstraram que xilitol são insolúveis em  $CO_2$  supercrítico puro. Como a utilização de co-solventes propicia um aumento na solubilidade de compostos mais polares em  $CO_2$  supercrítico, etanol

foi adicionado como co-solvente neste trabalho. Porém, observou-se que o que ocorria era uma pouca solubilização do xilitol e uma grande da xilose em dióxido de carbono supercrítico. Possivelmente, uma explicação para este fenômeno seria que a quantidade de etanol adicionada ao  $CO_2$  que atuou como co-solvente foi pequena, não resultando no aumento da polaridade necessária para se extrair (recuperar) o xilitol. Usualmente a faixa de teor de co-solvente adicionada ao  $CO_2$  é de 5 a 20 % (m/m) e o empregado neste trabalho foi de 6,42 % (m/m). Outra provável explicação seria que o modo como o co-solvente foi empregado também tenha afetado a sua eficiência em modificar a polaridade do  $CO_2$  supercrítico. Geralmente, uma mistura de  $CO_2$  e co-solvente são bombeadas conjuntamente ao extrator não sendo o co-solvente adicionado diretamente ao extrator, apesar de haver trabalhos que indicam que, por exemplo, um determinado teor de umidade (água ao sólido a ser extraído) do que se deseja extrair pode atuar modificando a polaridade do solvente supercrítico empregado.

Como o objetivo deste trabalho é a separação destes compostos independentemente da forma como ela é realizada, os experimentos foram prosseguidos empregando os 6,42 % (m/m) de etanol como co-solvente e  $CO_2$  supercrítico como solvente, visando atingir uma máxima remoção de xilose do meio fermentado e uma mínima de xilitol. Desta forma, um alto teor de xilitol deveria ficar retido na célula extratora e um alto teor de xilose deveria sair como extrato por arraste/solubilização em  $CO_2$  supercrítico + etanol.

Assim, foram feitos 4 ensaios em duplicata seguindo a matriz experimental já apresentada (Tabela 2) visando avaliar a potencialidade desta tecnologia para esta nova aplicação, bem como verificar a influência das variáveis pressão e necessidade de suporte no processo de purificação de xilitol de meio fermentado. Foram calculadas a eficiência de extração de xilose do meio fermentado e a eficiência de retenção de xilitol no meio fermentado para cada ensaio (Tabela 3).

**Tabela 3.** Resultados experimentais dos ensaios extrativos.

Experimentos	X1 (bar)	X2	Extração de xilose (E) (%)	Retenção de xilitol (R) (%)
1	400	Sem	17,44	98,11
2	400	Com	9,02	98,68
3	500	Sem	48,02	95,76
4	500	Com	16,76	98,67

A análise da eficiência de extração de xilose foi realizada através de cálculo direto sobre a concentração de xilose no extrato. Encontrapartida, a eficiência de retenção de xilitol no resíduo (meio fermentado) foi realizada de forma indireta através de cálculos de balanço de massa.

Observou-se que a eficiência de extração de xilose e de retenção de xilitol do meio fermentado alcançou valores da ordem de 48 e 98%, respectivamente, demonstrando a potencialidade de separação destes compostos por esta tecnologia. Apesar de ainda, conseqüentemente, mais de 50 % de xilose tender a permanecer no meio fermentado futuros experimentos serão realizados principalmente focados na otimização da extração de xilose, uma vez que os resultados de eficiência de retenção de

xilitol foram promissores.

A fim de melhor analisar os resultados obtidos, e se determinar o grau de influência de cada fator sobre as extrações, calculou-se os efeitos individuais dos fatores e o efeito de interação pressão/suporte (Tabela 4).

A (Tabela 4) mostra que para a variável resposta R (Retenção de xilitol), tanto o fator pressão como o fator uso de suporte, bem como a sua interação não foi significativa, pois geralmente para que um fator seja considerado significativo, este deve apresentar um valor de efeito maior que 10. O que quer dizer que a faixa de pressão utilizada, bem como o fato de se agregar ou não Celite, não interferiu na eficiência de retenção de xilitol do meio fermentado.

**Tabela 4.** Cálculo dos Efeitos individuais e de interação.

Fatores	Extração de xilose (E) (%)	Retenção de xilitol (R) (%)
Pressão	19,16	-1,18
Suporte	-19,8	1,74
Pressão/Suporte	-11,42	1,17

Já para a variável resposta E (Extração de xilose), tanto o fator pressão como o fator uso de suporte foram significantes (efeitos individuais altos), o que quer dizer que estes dois fatores exercem influência sobre a eficiência de extração de xilose do meio fermentado. E devido aos seus expressivos valores numéricos de efeitos individuais (19,16 e 19,84), esta influência é muito significativa sobre esta variável resposta. Verifica-se que uma pequena alteração nestas variáveis, por exemplo, alteração na pressão de 50 bars resulta em uma alteração

significativa no valor de E. Analisando-se o valor real dos efeitos individuais, quer dizer, levando-se em conta o sinal que o acompanha, pode-se concluir que o aumento da pressão, conjuntamente com o fato de não se suportar a amostra em celite possibilita melhores eficiências de extração de xilose do meio fermentado.

A partir dos cálculos dos efeitos individuais e de interação (Tabela 4), pôde-se chegar ao seguinte modelo matemático (Equação 1 e 2) que expressa a relação entre a eficiência de extração de xilose e

de retenção de xilitol, respectivamente, em função dos fatores analisados dentro da faixa de condições ensaiadas (sem – com suporte; 400 – 500 bar):

$$Y = \text{Média} + E_a/2*(a) + E_b/2*(b) + E_{ab}/2*(a)*(b)$$

### Equação Geral

$$Y = 22,81 + 9,58*(a) - 19,84*(b) - 5,71*(a)*(b)$$

### Equação 1

$$Y = 22,81 - 0,588*(a) - 0,87*(b) - 0,585*(a)*(b)$$

### Equação 2

onde: a = Pressão e b = Suporte

## Conclusões

Conclui-se que a aplicação da tecnologia supercrítica como uma alternativa para purificar xilitol biotecnológico produzido a partir de bagaço de cana de açúcar é promissora.

Utilizando células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em alginato de cálcio resultados similares ou melhores do que utilizando outros tipos de reatores e/ou métodos de imobilização de células para o mesmo sistema fermentativo foram obtidos:  $Y_{p/S} = 0,573$ ,  $\eta = 62,49\%$  e  $Q_p = 0,389$  g de xilitol/l.h.

Verificou-se que os melhores resultados em termos de separação de xilitol do açúcar residual xilose foram obtidos ao se utilizar meios fermentados não suportados em celite e a pressões maiores de extração. Observou-se que a eficiência de extração de xilose e de retenção de xilitol do meio fermentado alcançou valores da ordem de 48 e 98%, respectivamente, demonstrando a potencialidade de separação destes compostos por esta tecnologia. Apesar de ainda, conseqüentemente mais de 50 % de xilose tender a permanecer no meio fermentado futuros experimentos serão realizados principalmente focados na otimização da extração de xilose.

## Agradecimentos

À Pró-reitoria de Graduação da Universidade de São Paulo (USP) e à Universidad de Chile (UC).

## Referências

ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; SILVA, S. S.; PRATA, A. M. R. Pre treatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysisate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, New York, v. 70/72, n. 1, p. 89-98, 1998.

ASENJO, A. J. Separation process in biotechnology. New York: Marcel Dekker, 1990.

BARBOSA, M. F. S.; MEDEIROS, M. B. de; MANCILHA, I. M.; SCHENEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, New York, v. 3, n. 4, p. 241-51, 1988.

BRUNNER, G. *Gas extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes*. New York: Springer, 1994.

HOLLINGSWORTH, R. I. *Process for the preparation and separation of arabinose and xylose from a mixture of saccharides*. United States Patent, Patent n. US 7, p. 498-430, 2009.

KONTIOKARI, T.; UHARI, M.; KOSKELA, M. Antiadhesive effects on otopathogenic bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Oxford, v. 41, n. 5, p. 563-565, 1998.

MASAKO, K.; HIDEYUKI, I.; SHIGEYUKI, O.; ZENRO, I. A novel method to control the balance of skin microflora. Part 1. Attack on biofilm of *Staphylococcus aureus* without antibiotics. *Journal of Dermatological Science*, Amsterdam, v. 38, n. 3, p. 197-205, 2005a.

MASAKO, K.; YUSUKE, K.; HIDEYUKI, I.; ATSUKO, M.; YOSHIKI, M.; KAYOKO, M.; MAKOTO, K. A novel method of to control the balance of skin microflora. Part 2. A study to assess the effect of a cream containing farnesol and xylitol on atopic dry skin. *Journal of Dermatological Science*, Amsterdam, v. 38, n. 3, p. 207-213, 2005b.

NAABER, P.; LEHTO, E.; SALMINEN, S.; MIKELSAAR, M. Inhibition of adhesion of *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, New Jersey, v. 14, n. 4, p. 205-209, 1996.

PAYNE, S. M.; KERTON, F. M. Solubility of bio-sourced

- feedstocks in 'green' solvents. *Green Chemistry*, v. 12, n. 9, Cambridge, p. 1648-1653, 2010.
- SANTOS, J. C.; CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; CONVERTI, A. Xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate in fluidized bed reactor: effect of the air flowrate. *Biotechnology Progress*, New Jersey, v. 19, n. 4, p. 1210-1215, 2003.
- SARROUH, B. F.; SANTOS, D. T.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Technical-Economical Evaluation of Sugarcane Bagasse Hydrolysis for Bioethanol Production. *Chemical Engineering and Technology*, New Jersey, v. 30, n. 2, p. 1-7, 2007a.
- SARROUH, B. F.; SANTOS, D. T.; SILVA, S. S. Biotechnological production of xylitol in a three-phase fluidized bed bioreactor with immobilized yeast cells in Ca-alginate beads. *Biotechnology Journal*, New Jersey, v. 2, n. 6, p. 759-763, 2007b.
- SILVA, S. S.; RIBEIRO, J. D.; FELIPE, M. G. A.; VITOLLO, M. Maximizing the xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by controlling the aeration rate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, New York, v. 63/65, n. 1, p. 557-564, 1997.
- SINGH, P. C.; SINGH, R. K. Choosing an appropriate bioseparation technique. *Trends in Food Science and Technology*, Amsterdam, v. 7, n. 2, p. 49-58, 1996.
- TISCHLER, A. S.; POWERS, J. F.; DOWNING, J. C.; RISEBERG, J. C.; SHAHSAVARI, M.; ZIAR J.; MCCLAIN, R. M. Vitamin D<sub>3</sub>, lactose and xylitol stimulate chromaffin cell proliferation in the rat adrenal medulla. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Amsterdam, v. 140, n. 1, p. 115-123, 1996.
- WANG, Y. M.; VAN EYS, J. Nutritional significance of fructose and sugar alcohols. *Annual Review of Nutrition*, Palo Alto, v. 1, n. 1, p. 437-75, 1981.
- WHEELWRIGHT, S. M. Designing downstream processes for largescale protein purification. *Bio/Technology*, New York, v. 5, n. 8, p.789-793, 1987.
- WINKELHAUSEN, E.; KUSMANOVA, S. Microbial conversion of D-Xylose to Xylitol. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Amsterdam, v. 86, n. 1, p. 1-14, 1998.
- YODA, S. K.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. M. Supercritical fluid extraction from *Stevia rebaudiana* Bertini using CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> + water: extraction kinetics and identification of extracted components. *Journal of Food Engineering*, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 125-134, 2003.
- ZABNER, J.; SEILER, M. P.; LAUNSPACH, J. L.; KARP, P. H.; KEARNEY, W. R.; LOOK, D. C.; SMITH, J. J.; WELSH, M. J. The osmolyte xylitol reduces the salt concentration of airway surface liquid and may enhance bacterial killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 97, n. 21, p. 11614-11619, 2000.