UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL

BOUTROS FOUAD SARROUH

**Estudo da Produção Biotecnológica de Xilitol em Reator de Leito
Fluidizado Utilizando Bagaço de Cana-de-açúcar e Células Imobilizadas:**
Avaliação de Parâmetros Operacionais e Viabilidade Econômica

LORENA - SP

2009

BOUTROS FOUAD SARROUH

**Estudo da Produção Biotecnológica de Xilitol em Reator de Leito
Fluidizado Utilizando Bagaço de Cana-de-açúcar e Células Imobilizadas:
*Avaliação de Parâmetros Operacionais e Viabilidade Econômica***

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia
Industrial

Área de Concentração: Conversão de Biomassa

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

LORENA – SP
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação

Biblioteca Universitária

Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo – EEL/USP

Sarrouh, Boutros Fouad

Estudo da produção biotecnológica de xilitol em reator de leito fluidizado utilizando bagaço de cana-de-açúcar células imobilizadas: avaliação de parâmetros operacionais e viabilidade econômica / Boutros Fouad Sarrouh; orientador Silvio Silvério da Silva. -- Lorena: 2009.

185 f. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.

1. Xilitol 2. *Candida guilliermondii* 3. Imobilização 4. Bagaço de cana-de-açúcar 5. Hidrolisado hemicelulósico 6. Análise técnico-econômica (Xilitol). I. Título.

664.16 - CDU

DEDICATÓRIA

À minha querida família, que mesmo longe está sempre presente em meu coração.

À minha querida esposa pelo amor, apoio e confiança incondicionais, mesmo nos momentos difíceis.

Aos meus sogros, Deusdedit e Marília, que me acolheram com muito carinho em sua família.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me abrir os caminhos.

Ao Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, primeiramente por ter me dado a oportunidade de cursar o doutorado no Brasil sob sua valiosa orientação, e pelo apoio, confiança e amizade que contribuíram profundamente para minha formação profissional, minha sincera gratidão.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos professores do Departamento de Biotecnologia (LOT), em especial à Dra. Maria das Graças de Almeida Felipe e Dr. Jorge Jackson Rocha pela dedicação, amizade e apoio.

Aos técnicos do laboratório, Nicanor, Paulinho, Jussara e a Dra. Rita por sempre estarem presentes para me auxiliar no trabalho.

Às queridas e atenciosas Sandra, Cida, Bia e Lilian pelo apoio e auxílio

Aos colegas e amigos com os quais compartilhei meus dias de trabalho: Juan, Budaia, Sérgio, Bruno, Flávio, Carol, Adriana, Juliana, Priscila, Thaís, Ricardo, Ismael (*Dark*), Robson, Victor, Paula, Dani, Michel, Vinicius, Fernando (*Pernambuco*) e Wiliam e aos meus compadres Giovani e Priscila.

Ao Departamento de Biotecnologia – DEBIQ – EEL da Universidade de São Paulo - USP, pela oportunidade da realização do Doutorado.

Aos amigos, Daniel, Sandro e Crisla pela amizade e pelo apoio.

Ao amigo João pelo auxílio na análise econômica deste trabalho.

A minha querida esposa Livia por toda a compreensão, paciência, apoio, carinho e dedicação.

RESUMO

SARROUH, B. F. **Estudo da produção biotecnológica de xilitol em reator de leito fluidizado utilizando bagaço de cana-de-açúcar e células imobilizadas: avaliação de parâmetros operacionais e viabilidade econômica.** 2009. 185f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, São Paulo. 2009.

O xilitol vem se destacando nas áreas alimentícia, odontológica, farmacêutica e médica, além de apresentar significativo potencial de aplicação em outros segmentos industriais (têxteis e químicos). Os benefícios do xilitol abriram as portas para novas áreas de venda além de crescimento no setor de pólios e adoçantes no mercado mundial. O presente trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia tecnicamente e economicamente viável para a obtenção de xilitol a partir do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando biorreator de leito fluidizado com células da levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 imobilizadas em suporte natural de alginato de cálcio. Para avaliar a viabilidade técnica deste processo biotecnológico, foram realizadas fermentações em bateladas simples conforme um planejamento fatorial 2^3 com três pontos centrais. Em seguida, foi avaliada a influência das variáveis, fluxo de fluidização, fator de concentração do hidrolisado e vazão do ar no fator de rendimento (Y_p/s) e na produtividade volumétrica (Q_p). Segundo os resultados obtidos, observou-se que apenas o aumento no fluxo de fluidização exerceu uma influência positiva no fator de rendimento e na produtividade do processo. Tal fato é devido a uma melhor transferência de oxigênio do meio para o interior do suporte de imobilização, resultando em maior consumo de xilose e produção de xilitol. O processo biotecnológico utilizado neste trabalho resultou em, uma concentração final de xilitol de 34 g/L a partir de uma concentração inicial de xilose de 49 g/L, um fator de rendimento (Y_p/s) de 0,7 g/g (equivalente a 76 % de eficiência de bioconversão) e uma produtividade volumétrica (Q_p) de 0,44 g/L.h, após 72h de fermentação. Foram realizados também fermentações em bateladas repetidas com reciclo das células imobilizado, nas condições de fermentação otimizadas e indicadas pela análise estatística realizada. Verificou-se que, o fator de rendimento (Y_p/s) e a produtividade volumétrica (Q_p) do processo apresentaram pequenas variações ao longo das 6 bateladas repetidas (B1-B6), com uma produção final média de 31,5 g/L de xilitol. Entretanto, a partir da batelada B7 observou-se, uma diminuição de 44 % na concentração final do xilitol produzido (17 g/L) e de 28% no número final de células viáveis imobilizadas ($3,4 \times 10^{10}$ mL/cel.) em comparação com as bateladas B1-B6 (valor médio de $4,7 \times 10^{10}$ mL/cel.), após 72 h de fermentação. Esta redução no crescimento das células imobilizadas pode ser explicada pela possível difusão e acúmulo de materiais insolúvel proveniente do hidrolisado, ao longo das 7 bateladas remetidas, para o interior do suporte de imobilização propiciando assim limitações na transferência de xilose no meio de fermentação para o interior das células encapsuladas. Com o objetivo de avaliar o custo de produção de xilitol, foi realizado um estudo técnico-econômico para a produção de xarope de xilitol de 80% de pureza, utilizando hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana em uma planta piloto com capacidade de processar 1 tonelada de bagaço. Segundo os resultados obtidos deste estudo, observou-se que este processo biotecnológico para a produção de xilitol mostrou-se economicamente viável com um *payback* de 24 meses e uma TIR (Taxa interna de retorno) de 51,7%, sendo o preço estimado para a venda do xarope de xilitol no mercado de R\$ 211,60. Visando reduzir o custo de venda deste xarope e aumentar a competitividade do xilitol em relação a outros pólios encontrados no mercado, foram sugeridas modificações em algumas etapas do processo realizado neste trabalho (aumento na eficiência da hidrólise para 80% e a utilização de resinas de troca iônica no tratamento do hidrolisado hemicelulósico). O processo modificado resultou em uma redução no preço de venda do xarope de xilitol, sendo este valor estimado a R\$ 113,10, correspondendo a apenas 28 % do preço de venda do xilitol cristalizado no mercado interno (R\$ 402,50). O processo biotecnológico para a produção de xilitol mostrou-se economicamente promissor para uma futura implantação em nível industrial.

PALAVRAS-CHAVE: Xilitol. *Candida guilliermondii*. Imobilização. Bagaço de cana-de-açúcar. Hidrolisado hemicelulósico. Análise técnico-econômica.

ABSTRACT

SARROUH, B. F. **Study of the biotechnological production of xylitol in a fluidized bed reactor using sugarcane bagasse and immobilized cells: evaluation of operational parameters and economical viability.** 2009. 185p. Thesis (Doctoral in Industrial Biotechnology) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo. Lorena, São Paulo. 2009.

Xylitol is being distinguished for its application in the industries of food, odontology and pharmacy; furthermore, it presents a potential use in other industrial segments (textiles and chemicals). The different benefits of xylitol will open doors for new selling areas which will lead to its growth in the international market of polyols and alternative sweeteners. The present work had as an objective the contribution in the development of a technically and economically viable technology for the production of xylitol starting from the hemicellulosic hydrolysate of sugarcane bagasse, using a fluidized bed bioreactor with yeast cells of *Candida guilliermondii* FTI 20037 immobilized in a natural support of calcium alginate. To evaluate the technical viability of this biotechnological process, they were realized simple batch fermentations according to a factorial design 2^3 with three central points. Furthermore, it was evaluated the influence of the variables, fluidization flux, hydrolysate concentration factor and air flux in the process yield (Yp/s) and volumetric productivity (Qp). According to the obtained results it was observed that, only an increase in the fluidizations flux exercised a positive influence in process yield and volumetric productivity. This fact is due to a better oxygen transfer to the inside of the immobilization support, resulting in a higher xylose consumption and xylitol production. The biotechnological process used in this work resulted in, a final concentration of xylitol of 34 g/L starting from an initial concentration of xylose of 49 g/L, a yield (Yp/s) of 0.7 g/g (corresponding to 76 % of bioconversion efficiency) and a volumetric productivity (Qp) of 0.44 g/L.h, after 72h of fermentation. Also they were realized repeated batch fermentations with the recycle of the immobilized cells, using the optimized fermentation conditions as indicated by the statistical analysis previously done. It was verified that, the yield (Yp/s) and the volumetric productivity (Qp) of the process have presented small variations throughout the 6 repeated batch fermentations (B1-B6), with an average final production of 31,5 g/L of xylitol. On the other hand, at the end of the batch fermentation B7 it was observed a decrease of 44% in the final concentration of the produced xylitol (17 g/L) and 28% in the final number of viable immobilized cells (3.4×10^{10} mL/cells) in comparison with the batch fermentations B1-B6 (average value of 4.7×10^{10} mL/cells), after 72h of fermentation. This reduction in the growth rate of the immobilized cells can be explained by the possible diffusion and accumulation of insoluble substances originating from the hemicellulosic hydrolysate, during the 7 repeated batch fermentations, into the interior of the immobilization support resulting in limitations in xylose transference from the fermentation medium into the encapsulated cells. With the objective to evaluate the production cost of xylitol, it was realized a technical-economical study for the production of a xylitol syrup with 80% of purity, using hemicellulosic hydrolysate from sugarcane bagasse in a pilot plant with the capacity to process 1 tons of bagasse. According to the results obtained in this study, it was observed that the biotechnological process for xylitol production has shown to be economically viable with a payback period of 24 months and a TIR of 51. 7%, considering that the selling price of xylitol syrup (80% of purity) was estimated to be R\$ 211.60 in the internal market. Aiming to reduce the selling cost of xylitol syrup and increase its competitiveness in relation to other polyols found in the market, they were suggested modifications in some stages of the process used in this work (increase in the hydrolysis efficiency to 80% and the utilization of ionic exchange resins in the treatment of the hemicellulosic hydrolysate). The modified process resulted in a reduction in the selling price of xylitol syrup, being this value estimated in R\$ 113.10 corresponding to only 28% of the selling price of crystallized xylitol in the internal market (R\$ 402.50). The biotechnological production of xylitol has shown to be economically promising for future implantation at industrial level.

KEY-WORDS: Xylitol. *Candida guilliermondii*. Immobilization. Sugarcane bagasse. Hemicellulosic hydrolysate. Technical-economical analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura e composição química de resíduos lignocelulósicos.....	28
Figura 2- Influência da etapa de pré-tratamento na estrutura lignocelulósica do bagaço de cana-de-açúcar.....	30
Figura 3- Aproveitamento de bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de diferentes produtos químicos de alto valor.....	32
Figura 4- Exemplos de produtos formulados a base de xilitol.....	38
Figura 5- Fluxograma do processo de produção de xilitol por via química a partir da fibra de milho (LAROSA, 2002).....	40
Figura 6- Esquema geral das etapas do processo biotecnológico para a produção de xilitol.....	41
Figura 7- Via metabólica utilizada na fermentação de D-xilose por leveduras e bactérias (adaptada de KHANKAL; CHIN; CIRINO, 2006).....	44
Figura 8 - Ilustração dos métodos de imobilização (KOURKOUTAS <i>et al.</i> , 2004).....	53
Figura 9 - Procedimento ilustrativo detalhado para a preparação das esferas do alginato de Cálcio (HUANG; LAI; LIN, 2006).....	56
Figura 10- Composição do alginato: (a) Cadeia de ácidos manurônicos (blocos M), (b) Cadeia de ácidos gulurônicos (blocos G) e (c) Cadeia de ácidos manurônicos e gulurônicos alternados (blocos MG) (KAWAGUTI; SATO, 2008).....	58
Figura 11- Modelo para a formação da malha de alginato de cálcio, (a) Homopolímeros de unidades de ácido gulurônico, (b) Ligação entre os blocos G e os íons de cálcio com carga positiva, (c) Formação da rede de gel com blocos G unidos através dos íons cálcio (KAWAGUTI; SATO, 2008).....	59
Figura 12- Ilustração do equipamento utilizado para a imobilização das células de <i>Candida guilliermondii</i> em gel de alginato de cálcio.....	75
Figura 13- Biorreator de leito fluidizado.....	76
Figura 14- Relação entre a velocidade mínima de fluidização e a porosidade do leito.....	92
Figura 15- Variação da concentração de glicose em função do tempo para os ensaios realizados.....	104

Figura 16- Variação da concentração de arabinose em função do tempo para os ensaios realizados.....	105
Figura 17- Variação da concentração de xilose em função do tempo para os ensaios realizados.....	106
Figura 18- Produção de xilitol em função do tempo para os ensaios realizados.....	108
Figura 19- Relação de consumo de ácido acético em função do tempo para os ensaios realizados.....	109
Figura 20- Representação comparativa dos resultados das variáveis da bioconversão xilose-xilitol obtidas no final das fermentações realizadas.....	111
Figura 21- Microfotografia das células imobilizadas em suporte de alginato de cálcio.....	112
Figura 22- Variação da concentração de células imobilizadas em função do tempo para todos os ensaios realizados.....	113
Figura 23- Representação dos efeitos principais das variáveis estudadas sobre o fator de rendimento (Y_p/s).....	117
Figura 24- Superfície de resposta representando os efeitos das variáveis estudadas sobre o fator de rendimento (Y_p/s).....	118
Figura 25- Gráfico <i>Pareto</i> demonstrando a influência das variáveis estudadas sobre a produtividade volumétrica (g/L.h) do processo.....	121
Figura 26 - Superfície de resposta representando os efeitos das variáveis estudadas sobre a produtividade volumétrica.....	122
Figura 27- Superfície de resposta representando a região dos valores otimizados pela análise estatística das variáveis estudadas.....	124
Figura 28- Variação na concentração de xilose em função do tempo ao longo das bateladas repetidas de fermentação.....	127
Figura 29- Formação de xilitol em função do tempo ao longo das bateladas repetidas de fermentação.....	127
Figura 30- Resultados da produtividade volumétrica e do fator de rendimento em xilitol no final de cada batelada das 7 bateladas de fermentação.....	129
Figura 31- Variação na concentração de arabinose em função do tempo ao longo das bateladas repetidas de fermentação.....	130
Figura 32- Variação na concentração de glicose em função do tempo ao longo das bateladas repetidas de fermentação.....	131

Figura 33-	Variação na concentração de ácido acético em função do tempo ao longo das bateladas repetidas de fermentação.....	131
Figura 34-	Resultados da concentração de células imobilizadas e livres no final das 7 bateladas de fermentação.....	132
Figura 35-	Partículas de alginato de cálcio com células de <i>C. guilliermondii</i> no final da batelada B6 (após 432 h de fermentação).....	134
Figura 36-	Partículas de alginato de cálcio com células de <i>C. guilliermondii</i> no final da batelada B7 (após 504 h de fermentação).....	134
Figura 37-	Determinação do <i>payback</i> do processo biotecnológico para a produção de xilitol.....	138
Figura 38-	Determinação do <i>payback</i> do processo melhorado para a produção de xilitol.....	143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição (%) de diferentes resíduos agrícolas e de madeiras.....	27
Tabela 2- Propriedades físico-químicas e estrutura do xilitol (98% de pureza).....	34
Tabela 3- Situação legal do uso de xilitol na dieta humana em alguns países.....	37
Tabela 4 - Codificação dos níveis para as variáveis avaliadas.....	80
Tabela 5- Matriz do planejamento fatorial 2^3 para avaliação da influência das variáveis: vazão de ar, fator de concentração de hidrolisado e fluxo de fluidização.....	80
Tabela 6- Planilha utilizada para o cálculo do Capital Fixo de Investimento.....	89
Tabela 7- Planilha utilizada para o cálculo do Custo de Produção de xilitol.....	89
Tabela 8- Planilha utilizada para apresentar os resultados dos cálculos do Fluxo de Caixa do processo de produção de xilitol.....	89
Tabela 9- Propriedades hidrodinâmicas do reator de leito fluidizado com células imobilizadas.....	91
Tabla 10- Composição química do bagaço de cana de açúcar “ <i>in natura</i> ”.....	93
Tabela 11- Valores das concentrações (g/L) de açúcares e compostos fenólicos no hidrolisado hemicelulósico original e concentrado de bagaço de cana-de-açúcar.....	93
Tabela 12- Valores das concentrações (g/L) de açúcares, ácido acético e compostos fenólicos no hidrolisado hemicelulósico concentrado após a etapa de tratamento.....	96
Tabela 13- Avaliação do K_La para diferentes condições de aeração (X_1), concentração do hidrolisado (X_2) e fluxo de fluidização (X_3).....	97
Tabela 14- Resultados das fermentações realizadas segundo a matriz do planejamento fatorial 2^3 completo com 3 pontos centrais.....	99
Tabela 15- Caracterização inicial do meio de fermentação (tempo 0h) em relação à concentração inicial de açúcares, de ácido acético, de compostos fenólicos, de células livres e de número de células imobilizadas viáveis.....	102
Tabela 16- Caracterização final do meio fermentado em relação à produção de xilitol e ao consumo da xilose, glicose, arabinose e do ácido acético nos 11 ensaios de fermentação.....	103
Tabela 17- Valores dos parâmetros da bioconversão do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar, obtidos nos diferentes ensaios realizados.....	110

Tabela 18- Concentração de células imobilizadas, livres e totais nos diferentes ensaios realizados.....	112
Tabela 19- Estimativa dos efeitos principais, desvio padrão e teste t de <i>Student's</i> para o fator de conversão de xilose em xilitol.....	116
Tabela 20 - Análise de variância das variáveis no rendimento do processo.....	118
Tabela 21- Estimativa dos efeitos, desvio padrão e teste t de <i>Student's</i> para a produtividade volumétrica em xilitol.....	120
Tabela 22- Análise de Variância das variáveis na produtividade do processo.....	120
Tabela 23- Coeficientes para o modelo linear relativo ao fator de rendimento (Y_p/s).....	123
Tabela 24- Coeficientes para o modelo linear relativo à produtividade volumétrica do processo (Q_p).....	123
Tabela 25- Valores ótimos das variáveis independentes preditos pela análise estatística.....	124
Tabela 26- Valores ótimos das variáveis dependentes preditos pela análise estatística.....	124
Tabela 27- Teste de validade dos valores otimizados preditos pela análise estatística do processo.....	126
Tabela 28- Resultados das bateladas repetidas de fermentação com reciclo de células imobilizadas após 72 h de fermentação.....	128
Tabela 29- Cálculo do capital fixo de investimento para a produção do xilitol em nível de planta piloto.....	136
Tabela 30- Cálculo dos custos de insumos e o custo total da produção de xilitol em nível de planta piloto.....	137
Tabela 31- Cálculos do fluxo de caixa do processo e valor total de venda do xarope de xilitol.....	138
Tabela 32- Cálculo do capital fixo de investimento do processo biotecnológico modificado para a produção do xilitol em nível de planta piloto.....	140
Tabela 33- Cálculo dos custos de insumos e o custo total de produção de xilitol utilizando o processo biotecnológico modificado.....	141
Tabela 34- Cálculos dos valores finais de fluxo de caixa do processo melhorado para a produção de xilitol em nível de planta piloto.....	142

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	26
2.1 Matérias-primas lignocelulósicas.....	26
2.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar como fonte de xilose para a produção de xilitol.....	31
2.2 Xilitol: um póliol de alto valor para as indústrias alimentícias e farmacêuticas.....	33
2.3 Processos disponíveis para a produção de xilitol.....	38
2.3.1 Produção de xilitol por via química.....	38
2.3.2 Produção de xilitol por via biotecnológica.....	40
2.4 Principais fatores que influenciam a produção de xilitol por via fermentativa.....	46
2.5 Condução de bioprocessos utilizando células imobilizadas.....	51
2.5.1 Métodos de imobilização.....	52
2.5.2 Imobilização de células pelo método de aprisionamento em gel de alginato de cálcio.....	54
2.5.3 Uso de células imobilizadas para a produção de xilitol.....	60
2.6 Biorreatores com células imobilizadas.....	61
2.6.1 Biorreator de leito fluidizado.....	62
2.7 Processos de produção de xilitol no mundo atual.....	63
2.8 Análise econômica do processo biotecnológico para a produção de xilitol.....	66
3. OBJETIVOS.....	70
3.1 Gerais.....	70
3.2 Específicos.....	70
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	72
4.1 Preparo do bagaço de cana-de-açúcar e obtenção do hidrolisado.....	72
4.2 Microorganismo e preparo do inóculo.....	73
4.3 Imobilização das células de <i>Candida guilliermondii</i> em alginato de cálcio.....	74
4.4 Preparo do meio de fermentação.....	75
4.5 Biorreator de leito fluidizado e condições de fermentação.....	76
4.6 Estudo hidrodinâmico do reator de leito fluidizado com células imobilizadas.....	77

4.6.1	Determinação de coeficiente de arraste ($C_{D,S}$).....	77
4.6.2	Determinação do Número do Reynolds.....	78
4.6.3	Determinação da velocidade mínima e máxima de fluidização.....	79
4.7	Estudo da influência das variáveis: vazão de ar, fluxo de fluidização e fator de concentração do hidrolisado utilizando a metodologia de delineamento experimental.....	79
4.8	Métodos analíticos.....	80
4.8.1	Determinação da concentração dos açúcares, ácido acético e etanol.....	81
4.8.2	Determinação dos compostos fenólicos totais (inibidores).....	81
4.8.3	Determinação das concentrações celulares livres e imobilizadas.....	82
4.8.4	Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La).....	84
4.8.5	Parâmetros de bioconversão xilose-xilitol.....	85
5.	ANÁLISE TÉCNICO- ECONÔMICA DO PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA A PRODUÇÃO DE XILITOL.....	88
6.	METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	90
7.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
7.1	Características hidrodinâmicas do reator de leito fluidizado com células imobilizadas em alginato de cálcio.....	91
7.2	Caracterização do hidrolisado antes e após as etapas de concentração, tratamento e autoclavagem.....	93
7.3	Tratamento químico do hidrolisado concentrado (processo <i>overliming</i>).....	95
7.4	Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) para as diferentes condições utilizadas nas fermentações realizadas.....	97
7.5	Avaliação dos ensaios fermentativos em função das diferentes condições experimentais estudadas.....	99
8.	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ COM TRÊS PONTOS CENTRAIS.....	116
8.1	Avaliação dos efeitos das variáveis estudadas sobre o fator de rendimento (Y_p/s) do processo.....	116
8.2	Avaliação dos efeitos das variáveis estudadas sobre a produtividade volumétrica do processo.....	119

8.3 Modelos empíricos para as respostas Y_p/s e Q_p em função das variáveis em estudo.....	122
8.4 Otimização das variáveis de resposta (Q_p e Y_p/s) e validação dos modelos obtidos.....	123
8.5 Avaliação da estabilidade operacional do sistema de bateladas repetidas com células imobilizadas em alginato de cálcio.....	126
9. AVALIAÇÃO TÉCNICO-ECONÔMICA DO PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA A PRODUÇÃO DE XILITOL.....	135
9.1 Levantamento de dados técnicos e econômicos do processo de produção biotecnológica de xilitol.....	135
10.CONCLUSÕES.....	144
11. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	146
REFERÊNCIAS.....	147
APÊNDICES.....	159
ANEXOS.....	169

1. INTRODUÇÃO

Este trabalho representa a continuidade dos esforços para a viabilização de processos fermentativos empregando-se bagaço de cana-de-açúcar e biocatalisadores imobilizados em biorreator de leito fluidizado para a produção de xilitol.

O xilitol é um póliol que vem se destacando nas áreas alimentícia, odontológica, farmacêutica e médica, além de apresentar significativo potencial de aplicação em outros segmentos industriais. Dentre suas propriedades destaca-se o seu poder adoçante semelhante à sacarose, sua ação anticariogênica, sua indicação para o consumo por diabéticos, para pessoas obesas e para pacientes portadores de deficiência de glicose 6-P-desidrogenase (MUSSATTO; ROBERTO, 2002). Atualmente o xilitol é produzido em escala industrial por via química a partir de xilose pura extraída de hidrolisados hemicelulósicos, sob condições de elevada pressão e temperatura (SOLEIMMANI; TABIL; PANIGRAHI, 2006). Esta reação exige a presença do catalisador níquel, o que dificulta as etapas posteriores à produção para remoção de resíduos deste catalisador.

Outra possibilidade de obtenção de xilitol é pela via biotecnológica, e grandes esforços estão sendo empreendidos para se estabelecer uma tecnologia por via fermentativa para a obtenção deste produto (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008; CUNHA, 2006; SOLEIMMANI; TABIL; PANIGRAHI, 2006, SANTOS *et al.*, 2005)

Apesar da não existência de estudos específicos sobre a viabilidade econômica do processo biotecnológico, acredita-se que a via fermentativa resultará em menores custos de produção quando comparada à via química utilizada e, conseqüentemente no aumento do uso do xilitol e de seus benefícios à saúde humana. Atualmente, devido a fatores como o uso de temperaturas amenas, pressão atmosférica e a facilidade de algumas leveduras para utilizar a xilose presente no hidrolisado hemicelulósico diretamente sem prévia purificação, sendo

apenas necessário um simples tratamento físico-químico do hidrolisado para sua destoxificação (MIYAFUJI *et al.*, 2003). Outra vantagem significativa do processo biotecnológico é a geração de efluentes que são facilmente tratáveis, reduzindo drasticamente a poluição ambiental.

Atualmente, os trabalhos de pesquisa do Grupo de Microbiologia Aplicada (GMBiO) da EEL-USP, visando à produção de xilitol têm sido direcionados para o estabelecimento dos parâmetros operacionais e das opções de processo que maximizem a produção de xilitol. Estão em execução também investigações sobre as etapas de tratamento do hidrolisado e desenvolvimento de técnicas de separação do produto do meio fermentado.

Buscando melhorar o desempenho deste bioprocessos, foram realizados estudos no Departamento de Biotecnologia da EEL-USP sobre o uso de técnicas de imobilização de células para serem usadas na produção de xilitol. Diversas vantagens podem ser citadas com relação ao uso de células imobilizadas, e os recentes trabalhos desenvolvidos têm comprovado este fato. Maiores concentrações celulares podem ser alcançadas no meio de fermentação e o aumento na eficiência e produtividade do processo são bastante comum. Além disso, a facilidade de separação do sistema imobilizado do meio permite não só a sua reutilização como também a operação do sistema reacional em modo contínuo com elevadas vazões específicas de alimentação, tornando o sistema imobilizado bastante atrativo principalmente para redução de custos em escala industrial.

Na primeira etapa, foi dada continuidade às pesquisas referentes ao uso de alginato de cálcio como suporte de imobilização em diferentes tipos de biorreatores como biorreator de tanque agitado (CUNHA, 2006; CARVALHO *et al.*, 2004), biorreator de cesta (CARVALHO *et al.*, 2004) e biorreatores de coluna de bolhas e de leito fluidizado (SARROUH; SILVA, 2008; SANTOS *et al.*, 2005).

A segunda abordagem objetiva-se a condução de processos em biorreator de leito fluidizado, uma vez que estudos têm demonstrado melhor desempenho do sistema imobilizado quando operado neste tipo de reator.

Reatores de leito fluidizado têm se mostrado de uma forma geral uma boa opção para a obtenção de melhores condições de aeração e transporte de nutrientes em sistemas que utilizam células imobilizadas. Neste caso, é também desejável que o suporte utilizado apresente boa estabilidade físico-química, e que evite danos causados pela agitação mecânica aos suportes frágeis de géis hidrofílicos, tais como o alginato.

Entre os fatores fundamentais que interferem no uso de células imobilizadas por encapsulamento em suportes inertes e conduzidos em reator de leito fluidizado, destaca-se a vazão de ar. Este parâmetro tem uma influência direta na quantidade de células presentes no meio fermentativo, na produtividade de xilitol, na melhor fluidização no reator e, portanto na difusão do oxigênio para as células imobilizadas. Outro fator importante é a concentração do hidrolisado que também influencia na taxa de crescimento celular e na produtividade de xilitol, uma vez que o aumento da concentração do hidrolisado proporciona aumentos na concentração inicial de xilose, favorecendo a produção de xilitol. Entretanto também pode resultar em um aumento nas concentrações dos compostos tóxicos ao mecanismo microbiano. Da mesma forma, a velocidade de recirculação do meio no reator é um fator que deve ser avaliado em estudos com reatores de leito fluidizado uma vez que este parâmetro exerce influência na característica do reator por se aproximar a um reator de mistura, o que afeta significativamente a taxa de transferência de oxigênio no meio de fermentação e conseqüentemente os parâmetros fermentativos.

Observa-se que de uma forma geral que estes parâmetros estão interligados e direcionados á transferência de oxigênio no reator. Desta forma é fundamental um estudo destes parâmetros individuais e a verificação do efeito da interação entre eles, visando obter

elevadas produtividades em xilitol, permitindo o desenvolvimento de uma tecnologia alternativa que possa ter aplicação industrial.

Com relação à vazão de ar, é importante observar que poucos estudos foram realizados para a otimização deste parâmetro na produção de xilitol em reator de leito fluidizado a partir de bagaço de cana-de-açúcar, utilizando células imobilizadas em alginato de cálcio. Deve-se salientar também que os dados da literatura (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998c) apontam a necessidade de que o estudo da influência da aeração na produção de xilitol seja feito considerando também a concentração inicial de substrato, uma vez que os efeitos combinados destas duas variáveis exercem forte influência sobre a produção de xilitol. Desta forma, é indicado que sejam otimizados simultaneamente os parâmetros vazão de ar e fator de concentração do hidrolisado, que estão diretamente interligado com a concentração inicial de xilose.

Considerando a vazão de ar, fluxo de fluidização e o fator de concentração do hidrolisado como sendo variáveis operacionais fundamentais para o estabelecimento de uma tecnologia eficiente para a obtenção de xilitol, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência destes parâmetros no uso de células de *Candida guilliermondii* FTI 20037, imobilizadas em gel de alginato de cálcio, para a obtenção de xilitol a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar em bateladas simples utilizando um reator de leito fluidizado. Adicionalmente, foram realizados experimentos em bateladas repetidas para avaliação da estabilidade operacional do biocatalisador imobilizado, nas condições previamente estabelecidas.

Um dos grandes desafios no estabelecimento de processos biotecnológicos é a estimativa e estabelecimento de sua viabilidade econômica. Até o momento, não se realizou nenhum estudo referente à estimativa de custos deste processo biotecnológico. Entretanto os resultados experimentais de diferentes trabalhos de pesquisa feitos em nossos laboratórios ou

consultados em diferentes artigos publicados por outros autores apontam que a via biotecnológica para a produção de xilitol é uma tecnologia alternativa e promissora com grande viabilidade econômica comparado com o processo químico. Para confirmar estas observações, o presente trabalho buscou realizar uma análise preliminar de custos do processo de obtenção de xilitol. Para este fim, foi feito um estudo de mercado do produto além dos cálculos do custo total de investimento e custos de produção em nível de planta piloto com capacidade de processamento de uma tonelada de bagaço de cana-de-açúcar. Também foram determinados os seguintes parâmetros: *Taxa Interna de Retorno (TIR)* e o *Valor Líquido (VL)*.

Deve-se salientar que este trabalho, sendo uma proposta inovadora para a obtenção de xilitol a partir de hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de cana-de-açúcar utilizando células imobilizadas em alginato de cálcio em um biorreator de leito fluidizado, permitirá uma melhor compreensão deste bioprocessos, o que contribuirá para estudos futuros visando a sua viabilização em escala industrial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Matérias-primas lignocelulósicas

Materiais lignocelulósicos são fontes abundantes de compostos orgânicos, apresentando grande potencial de uso como matéria-prima em processos industriais para a produção de alimentos, combustíveis, insumos químicos, enzimas e bens de consumo diversos (LATIF; RAJOCA, 2001).

Estes materiais são os principais constituintes da biomassa vegetal, como os resíduos agrícolas e florestais (palha de arroz, eucalipto, bagaço de cana-de-açúcar e sabugo de milho), os quais são acumulados no ambiente, ocasionando problemas de poluição e representando a perda de valiosos recursos (LYND *et al.*, 2005). Sendo assim, é importante que se desenvolvam processos biotecnológicos viáveis para o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos na obtenção de produtos úteis à humanidade e, portanto, o emprego de processos fermentativos tem sido bastante estudados. Como exemplos, citam-se alguns trabalhos de pesquisa sobre o uso dos carboidratos presentes na biomassa vegetal para a produção de butanodiol (JANSEN; FLICKINGER; TSAO, 2004), etanol (GRAY; ZHAO; EMPTAGE, 2006; SARROUH *et al.*, 2007), proteína microbiana (CRAWFORD *et al.*, 2004) e xilitol (SANTOS, 2005; CUNHA, 2006; SARROUH; SILVA, 2008; CARVALHO, CANILHA; SILVA, 2008).

O potencial e as características específicas das técnicas para o uso destes materiais relacionam-se intimamente à sua constituição. Resíduos lignocelulósicos são constituídos basicamente por três frações: duas delas, a celulose e a hemicelulose, são formadas por

polissacarídeos, e a outra por um material polifenólico, a lignina, sendo que a composição e a proporção variam entre estes constituintes de acordo com a espécie vegetal da qual se originaram (LYND *et al.*, 2005). A composição exata não é bem definida, e varia de espécie para espécie com relação aos constituintes e suas proporções (KUHAD; SINGH, 1993), conforme apresentado na Tabela 1.

A celulose, material orgânico mais abundante na natureza, é um polímero linear de alto peso molecular, insolúvel em água, constituído por unidades de celobiose ligadas entre si por ligações β -1,4 glicosídicas. O grau de polimerização, determinado pelo número de resíduos de glicose, varia de 1000 a 50000, dependendo da origem (KUAD; SING, 1993). Este polímero natural é a substância base de muitos produtos como papel, filmes, fibras e aditivos.

Tabela 1 - Composição (%) de diferentes resíduos agrícolas e de madeiras

Resíduos	Hexosanas	Pentosanas	Lignina	Cinzas
Bagaço de Cana-de-açúcar	33	30	29	4
Palha de Cevada	40	20	15	11
Vidoeiro (Birch Wood)	40	33	21	4
Sabugo de Milho	42	39	14	2
Talo de Milho	35	15	19	5
Casca de Amendoim	38	36	16	5
Palha de Aveia	41	16	11	12
Pinheiro	41	10	27	8
Palha de Arroz	32	24	13	12
Casca de Arroz	36	15	19	20
Serragem	55	14	21	5
Palha de Sorgo	33	18	15	10
Palha de Trigo	30	24	18	10
Madeira dura	45	30	20	5
Madeira branda	42	27	28	3

Fonte: (adaptada de KUHAD; SINGH, 1993)

A hemicelulose pode representar até 40% do material da parede celular dos vegetais e agindo como composto de reserva e sustentação é um polímero complexo em termos de componentes e estrutura molecular. Genericamente, pode-se afirmar que a hemicelulose é um

grupo de polissacarídeos ramificados, constituído principalmente por resíduos de pentoses, hexoses e ácidos urônicos. Em hidrolisados de hemicelulose, são encontradas, entre outras substâncias, D-xilose, D-manose, D-glicose, D-galactose e L-arabinose, ácido D-glicurônico e ácido D-galacturônico. A fração pentose tem elevada porcentagem de resíduos de D-xilose (usualmente não menos que 95%) (KNAUF; MONIRUZZAMAN, 2004).

Outra fração dos materiais lignocelulósicos é a lignina, uma macromolécula polifenólica amorfa composta principalmente por unidades de fenilpropano. Na biomassa vegetal, está associada à celulose e hemicelulose, o que impede a degradação destes materiais, ou seja, a lignina confere rigidez e baixa reatividade ao conjunto de fibras dos vegetais. Além disso, tecidos lignificados resistem ao ataque de microrganismos, impedindo a penetração de enzimas destruidoras no tecido celular (KNAUF; MONIRUZZAMAN, 2004). A Figura 1 mostra a estrutura fibrosa da biomassa vegetal, além da composição química de cada uma das frações que a constitui.

Figura 1 – Estrutura e composição química de resíduos lignocelulósicos

Uma das limitações para o aproveitamento integral de todas as frações dos resíduos lignocelulósicos é a própria estrutura da biomassa. Geralmente, é necessária a ruptura do complexo lignina-celulose-hemicelulose ou a remoção de cada fração por técnicas de pré-tratamento e deslignificação. Sem este tratamento preliminar dificilmente a biomassa será aproveitada em processos industriais, uma vez que a associação de suas frações constituintes confere grande resistência ao ataque de agentes químicos, enzimáticos ou microbianos (SAHA *et al.*, 2005). Segundo Parajó, Dominguez e Dominguez (1998c), a separação simultânea dos três principais grupos de polímeros da biomassa, não é possível com o uso dos procedimentos convencionais de separação (como cristalização, precipitação ou extração). Pelo menos um dos polímeros é degradado por tratamentos baseados nas diferenças em suas propriedades químicas. A celulose e a hemicelulose, por exemplo, são menos susceptíveis à oxidação que a lignina, mas ambas podem ser hidrolisadas por ácidos, ao contrário do polímero fenólico, que permanece como um resíduo sólido no meio ácido.

Diversos métodos têm sido empregados para a hidrólise dos componentes dos materiais lignocelulósicos (SUN; CHENG, 2002; KUMAR *et al.*, 2009), tornando-os úteis para uso em bioprocessos, por meio da liberação de seus correspondentes açúcares fermentáveis. Como exemplo destes métodos, destaca-se a hidrólise alcalina (DAWSON; BOOPATHY, 2008); a explosão a vapor (KUMAR *et al.*, 2009), a hidrólise enzimática (PAN *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2009) e a hidrólise ácida (ZHAO; WANG; LIU, 2008).

A fração hemicelulósica, por apresentar uma estrutura aberta, tem a difusão do catalisador facilitada dentro da cadeia polimérica, o que aumenta o rendimento das reações de hidrólise. Este fato, associado a sua estrutura heterogênea e, ao baixo grau de polimerização, fazem com que este constituinte da biomassa seja bastante atrativo para uso em processos fermentativos (SAHA *et al.*, 2005)

Ácidos diluídos podem ser usados como catalisadores de uma hidrólise limitada chamada de pré-hidrólise (AGUILAR *et al.*, 2002). Esta consiste na hidrólise da fração hemicelulósica, permanecendo a celulose e a lignina quase inalteradas. A pré-hidrólise ácida tem sido a mais eficiente na obtenção de açúcares a partir da fração hemicelulósica para uso como fonte de carbono em fermentações, sendo os ácidos sulfúricos e clorídricos os mais comumente empregados para este fim (HERRERA *et al.*, 2003; ROBERTO; MUSSATTO; RODRIGUES, 2003; SAHA *et al.*, 2005). A pré-hidrólise é realizada sob condições brandas e é vantajosa não apenas para a obtenção de hidrolisados ricos em xilose, prevenindo a formação de produtos de degradação, mas também porque aumenta a susceptibilidade da celulose à hidrólise subsequente (SAHA *et al.*, 2005), conforme apresentado na Figura 2.

Figura 2 – Influência da etapa de pré-tratamento na estrutura lignocelulósica do bagaço de cana-de-açúcar (USA, DEPARTMENT OF ENERGY, 2009)

2.1.1 Bagaço de cana-de-açúcar como fonte de xilose para a produção de xilitol

No Brasil, um dos resíduos lignocelulósicos mais abundantes é o bagaço de cana-de-açúcar e para o qual, novas técnicas de aproveitamento são sempre necessárias. O bagaço é constituído pelo material fibroso obtido após a moagem da cana para a extração do caldo. No Brasil, de acordo com o Ministério da Agricultura (2009), a produção de cana de açúcar na safra de 2008/2009 é estimada em cerca de 557 milhões de toneladas, o que corresponde a uma produção de bagaço de cana aproximadamente de 167 milhões de toneladas, segundo a proporção indicada por Procknor (2000).

Grande parte do bagaço de cana é utilizada pela própria indústria como fonte de energia, onde as próprias usinas utilizam até 80% deste bagaço como fonte energética em substituição ao óleo combustível no processo de aquecimento das caldeiras e para a geração e venda de energia elétrica (TEIXEIRA; PIRES; NASCIMENTO, 2007).

Existem, entretanto, usos não energéticos para o bagaço da cana, alguns deles já viabilizados comercialmente. Merece destaque seu emprego como matéria-prima na indústria de papel e papelão, fabricação de aglomerados, material alternativo na construção civil, ração animal e na produção de biomassa microbiana, revestimentos acústicos, forragem para agricultura, xilitol, etanol, hidroximetilfurfural, alcalóides e enzimas (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008; NEUREITER *et al.*, 2004; HOWARD *et al.*, 2003; SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001; PANDEY *et al.*, 2000). Entretanto, há ainda um excedente (de 10 a 20%) deste resíduo que não é utilizado, causando sérios problemas de estocagem e poluição ambiental (TEIXEIRA; PIRES; NASCIMENTO, 2007). Sendo assim, é importante que se desenvolvam novas técnicas visando ao aproveitamento destes resíduos agroindustriais na obtenção de produtos úteis à humanidade e, com este

objetivo, o emprego de processos fermentativos tem sido bastante estudados (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008; SARROUH; SANTOS; SILVA, 2007; BAUDEL; ZAROR; ABREU, 2005; DELGENES *et al.*, 1998).

Dentre as possibilidades de utilização do bagaço em bioprocessos encontra-se a utilização da xilose presente na fração hemicelulósica desta matéria-prima como substrato para a produção de xilitol (Figura 3), um adoçante alternativo com importantes aplicações industriais (SILVA *et al.*, 2003).

Figura 3 - Aproveitamento de bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima para a produção de diferentes produtos químicos de alto valor

Da mesma forma, a fração celulósica (polímero de glicose) está sendo utilizada para a produção de etanol, butanol, isopropanol, 2,3-butadienol, glicerol, acetona, ácido acético e ácido butírico (SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001). Em relação à lignina, ela pode ser aproveitada para produzir fenol (usado na produção das resinas fenol-formaldeído), vanilina (aromatizante utilizado na indústria alimentícia), e energia elétrica por processos de combustão ou cogeração (PELLEGRINI, 2002) (Figura 3).

2.2 Xilitol: um póliol de alto valor para as indústrias alimentícias e farmacêuticas

O xilitol é um açúcar-álcool de cinco moléculas de carbono (álcool pentahidroxilado) encontrado nas fibras de muitos vegetais incluindo milho, framboesa, ameixa, entre outros. Também pode ser extraído de alguns tipos de cogumelo, entretanto a extração a partir destas fontes é economicamente inviável devido às pequenas concentrações (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998a). As propriedades físico-químicas deste biocomposto são apresentadas na Tabela 2.

Também encontrado nos organismos humanos e de mamíferos, o xilitol é produzido em pequena quantidade como produto intermediário do metabolismo de carboidratos. A produção endógena diária é em média de 20 gramas em uma pessoa adulta normal (YLIKAHRI, 1979 apud MUSSATTO; ROBERTO, 2002).

Existem várias características que fazem do xilitol uma substância atrativa para uso em diferentes produtos comerciais. Seu uso é indicado para pessoas diabéticas, uma vez que seu metabolismo é independente de insulina (MÄKINEN, 2000). É ainda indicado para pacientes

portadores de deficiência da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (MÄKINEN, 2000) e como adoçante dietético (MUSSATTO; ROBERTO, 2002).

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas e estrutura do xilitol (98% de pureza)

FÓRMULA	C ₅ H ₁₂ O ₅ (Peso Molecular 152,15 g/mol)
NOME QUÍMICO	(1,2,3,4,5)-Pentahidroxipentano
ESTRUTURA QUÍMICA 3D
APARÊNCIA	Pó branco cristalino
ODOR	Não apresenta
ATIVIDADE ÓPTICA	Não apresenta
PONTO DE FUSÃO	92-96°C
PONTO DE EBULIÇÃO	216°C
SOLUBILIDADE	á 4°C = 122g/100 g de água á 20°C = 169 g/100 g de água á 40°C = 291 g/100 g de água Parcialmente solúvel em etanol e metanol
pH EM H ₂ O (100g/l)	5-7
DENSIDADE DA SOLUÇÃO	10%, 1,03g/ml; 60%, 1,23 g/ml
VISCOSIDADE DA SOLUÇÃO À 20°C	10%, 1,23 cP; 60%, 20,63 cP
CALOR DE DISSOLUÇÃO	-34,8 cal/g
PODER ADOÇANTE (tomando como base a sacarose = 1, em solução com uma concentração igual a 30 g/l a 20°C)	Sacarose = 1 D-fructose = 1,6 D-glicose = 0,5 – 0,8 D-xilose = 0,67 Maltose = 0,4 – 0,5 Lactose = 0,3 Xilitol = 0,86 – 1,15 Maltitol = 0,9
AÇÚCARES REDUTORES	≤0.20%
ESTABILIDADE	Estável à 120°C, não sofre caramelização; estável também sob condições usuais em processamento de alimentos; caramelização ocorre se aquecido por alguns minutos em temperatura próxima à do ponto de ebulição.
SALMONELLA	Negativo
LEVEDURAS E FUNGOS	Negativo
METAIS PESADOS	≤5ppm
As	≤0.5ppm
Ni	≤2ppm
Pb	≤1ppm
Cl	≤50ppm

Entre as principais propriedades deste composto, o destaque deve ser dado a seu poder anti e não cariogênico (AUTIO, 2002; MÄKINEN, 2000). É não cariogênico, uma vez que os microrganismos normalmente encontrados na cavidade oral não são capazes de metabolizá-lo, o que impede que os mesmos produzam ácidos que ataquem o esmalte dos dentes e provoquem as lesões que produzem cárie. Uma explicação adicional para o efeito anticariogênico do xilitol é a redução da quantidade de *Streptococcus mutans* (principal agente patogênico responsável pela cárie) na saliva, obtida através do uso regular de gomas de mascar contendo este poliálcool (AUTIO, 2002; MÄKINEN, 2000; ALANEN; HOLSTI; PIENIHAKKINEN, 2000).

Em outro trabalho, Iawata *et al.*, (2003) relataram a redução na retenção de glicose na boca devido ao uso de dentifrícios contendo xilitol e flúor. Além disso, estudos têm demonstrado que o xilitol auxilia na remineralização de lesões iniciais. Este fenômeno parece estar relacionado a efeitos do uso de xilitol nas placas bacterianas, no fluxo e na composição da saliva e no equilíbrio entre desmineralização e remineralização do esmalte (MUSSATTO; ROBERTO, 2002, MÄKINEN, 2000). O consumo diário recomendado pelos dentistas é de 3 a 12 gramas de xilitol por dia, o que representa um aceitável custo de benefício uma vez que o xilitol é um produto ainda considerado caro no mercado (MÄKINEN, 2000).

Outras aplicações deste poliálcool têm sido estudadas, como é o caso do uso do mesmo como agente de prevenção de infecções em crianças (UHARI; TAPIAINEN; KONTIOKARI, 2000). Compostos derivados de xilitol também possuem aplicações de interesse industrial os monoésteres de xilitol, os quais possuem propriedades para uso como surfactantes em medicamentos (CASTILLO *et al.*, 2003).

Dentre outras recentes aplicações na área médica ressalta-se por ter sido descoberto como um agente de prevenção de otite média aguda em crianças (VERNACCHIO; VEZINA; MITCHELL, 2007).

Um verniz dentário, desenvolvido por Pereira (2007) a base de xilitol, representa uma nova aplicação contra cáries e infecções de vias aéreas superiores. O verniz contendo 10% de xilitol mostrou-se eficaz na sua proteção contra a cárie em até 72 horas após sua aplicação.

Uma aplicação também recente do xilitol é na formulação de creme ou gel dermatológico para combater lesões na pele (como no caso da dermatite). Segundo o trabalho de Ferreira, Barbosa e Silva (2009), ensaios em vivo foram realizados para verificar a aplicação segura do xilitol na pele. Estudos de irritação cutânea foram feitos com coelhos utilizando uma solução de xilitol de 5 e 10% (w/w). Ensaios de foto-toxicidade também foram realizados em coelhos guineanos, utilizando apenas uma solução de 10% (w/w). Os autores observaram que, o creme com 10% de xilitol não induziu a formação de eritema ou edema e resultou na melhora das lesões da pele, mas mostrou propriedades de foto-toxicidade.

Outra característica interessante do ponto de vista de aplicações industriais do xilitol é que o mesmo não participa de reações de escurecimento do tipo *Maillard*, o que indica seu uso em alimentos que devem ser processados a altas temperaturas (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998a).

Com relação à segurança do uso de xilitol na dieta humana, o FDA (*“Food and Drug Administration”*) classifica este produto como GRAS - *“Generally Recognised as Safe”* (AGUIAR; OETTERER; MENEZES, 1999). Apesar de sua utilização em grandes quantidades resultar em diarreia osmótica, graças às suas propriedades laxativas, esse efeito varia de acordo com cada indivíduo e pode ser evitado se o produto for introduzido na dieta em quantidades gradativamente crescentes (CULBERT, 1986 apud MUSSATTO; ROBERTO, 2002). Com relação à situação legal do uso de xilitol na dieta alimentar, na Tabela 3 são apresentados alguns exemplos referentes à legislação em alguns países.

Tabela 3 - Situação legal do uso de xilitol na dieta humana em alguns países

País	Situação legal
Alemanha	Permitido para uso em alimentos e também aceito na nova regulamentação de diabéticos.
Argentina	Permitido pela lei alimentícia.
Brasil	Aprovado como produto dietético pelo DIMED – Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Medicamentos, do ministério da Saúde, conforme processo nº 4624/79, comunicado nº 730/80, de 7 de julho de 1980.
Canadá	Permitido em gomas de mascar desde agosto de 1976, em níveis considerados adequados para o processo.
Estados Unidos	Pode ser usado em alimentos dietéticos, na quantidade suficiente para a obtenção do efeito desejado.
França	Permissão para uso em alimentos que estão sob estudo.
Inglaterra	Não é mencionado na lei alimentícia britânica.
Japão	Permitido somente para nutrição parenteral.
México	Permitido como açúcar substituto para diabéticos.
Suíça	Mencionado na lei alimentícia desde 1936. Permitido em produtos dietéticos sob declaração: “adoçante com xilitol”.

Fonte: (AGUIAR; OETTERER; MENEZES 1999)

Comercialmente já são encontrados vários produtos que contêm xilitol em sua formulação. No Brasil, observa-se um crescente interesse no uso do xilitol em diversos produtos. Na área de dentifrícios podem ser destacados os cremes dentais Fluotrat, entre outros. Existem também guloseimas formuladas à base de xilitol, como por exemplo, os chicletes Trident e diet Valda e a bala Smints. A Figura 4 mostra alguns exemplos de produtos que contêm xilitol.

Figura 4 - Exemplos de produtos formulados a base de xilitol

2.3 Processos disponíveis para a produção de xilitol

2.3.1 Produção de xilitol por via química

O xilitol está presente naturalmente em pequenas quantidades em certos frutos e vegetais, entretanto, a extração a partir dessas fontes é economicamente inviável devido às baixas concentrações encontradas (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998a). Em larga escala, este poliálcool é produzido por redução química de xilose derivada principalmente de hidrolisados de madeira, processo que apresenta inúmeras desvantagens, as quais encarecem o produto final, destacando-se o uso de altas pressões e temperaturas, além da necessidade de etapas de purificação tanto no “*upstream*” quanto no “*downstream*” (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ; DOMÍNGUEZ, 1998b).

Para a produção por via química (Figura 5), são necessárias extensivas operações de troca iônica e fracionamento cromatográfico para a obtenção da xilose de elevada pureza. A etapa de hidrogenação ocorre em reatores descontínuos a pressões elevadas (50 atm) e temperatura na faixa de 80-140 °C na presença do catalisador níquel de Raney. Após a remoção do catalisador por filtração e troca iônica, a solução hidrogenada contendo o xilitol é concentrada, sofre fracionamento cromatográfico utilizando resinas catiônicas e é cristalizada para a obtenção do xilitol puro (MIKKOLA *et al.*, 2000). A etapa crítica desta rota de produção é a purificação da xilose contida no hidrolisado hemicelulósico. Apesar da utilização de resinas de troca iônica e fracionamento cromatográfico, os diversos açúcares presentes no hidrolisado não são totalmente separados ou removidos, e apreciáveis quantidades de D-galactose, D-manose e L-arabinose presentes podem dificultar a etapa de cristalização e purificação da xilose (MARTINEZ *et al.*, 2007). A etapa de hidrogenação também é prejudicada pela geração de pequenas quantidades de subprodutos, como a formação de xilulose por isomerização, a qual pode ser hidrogenada a arabitól (MIKKOLA *et al.*, 2000). A via química foi a primeira a ser utilizada para produção comercial de xilitol pela Finnsugar Ltda. (Cultor), empresa finlandesa cujo controle acionário passou a ser, desde 1999, do grupo dinamarquês Danisco A/S e que foi recentemente comprado pelo grupo Nordzucker AG (NORDIC SUGAR, 2009). Nesta empresa, a matéria-prima utilizada é a xilose pura obtida de xilana proveniente da hidrólise da fração hemicelulósica de cavacos de madeira (DANISCO XYLITOL, 2005).

Figura 5 – Fluxograma do processo de produção de xilitol por via química a partir da fibra de milho (LAROSA, 2002)

2.3.2 Produção de xilitol por via biotecnológica

Um dos processos mais atrativos, atualmente, é a via biotecnológica (Figura 6), a qual apresenta vantagens como o uso de condições mais brandas de pressão e temperatura (CUNHA, 2006; SANTOS, 2005), a não necessidade de utilização de xilose pura, uma vez que os microorganismos são capazes de converter xilose em xilitol diretamente a partir do hidrolisado hemicelulósico (SARROUH; SILVA, 2008). Além disso, da via biológica não

leva à formação de resíduos tóxicos que precisariam ser removidos nas etapas de purificação (TADA *et al.*, 2004).

Figura 6 – Esquema geral das etapas do processo biotecnológico para a produção de xilitol

No Brasil, pesquisas vêm sendo realizadas sistematicamente para a produção de xilitol por via biológica, usando principalmente o bagaço de cana-de-açúcar como matéria-prima. Entre as vantagens mais importantes do processo biológico em relação ao processo químico, destacam-se:

- ✓ Redução dos custos em relação aos processos químicos, uma vez que não há necessidade de purificação da xilose, trabalha com condições amenas de temperatura e pressão e podem-se utilizar enzimas e microorganismos específicos que atuam somente na conversão de xilose em xilitol o que leva a um maior rendimento e facilita na separação.

- ✓ Apresenta características que minimizam o impacto ambiental, como diminuição da toxicidade dos efluentes e o uso de recursos renováveis, como a biomassa vegetal.
- ✓ No processo microbiológico não é requerida uma solução de xilose de alta pureza.
- ✓ Na produção microbiana, altos valores de rendimento são alcançados a partir de xilose (70-85%), enquanto somente 50-60% são alcançados no caso do processo químico (MAKINEN, 2000). Tal fato resulta na diminuição de 20 % no custo de produção do xilitol biotecnológico (JIN-SEO, 2007b).

No processo biotecnológico são usados microorganismos fermentadores de pentose (xilose) para sua conversão em vários produtos, como xilitol, álcoois, ácidos orgânicos, cetonas, polióis ou ainda proteína celular (SCHUCHARDT; RIBEIRO; GONÇALVES, 2001). Especificamente com relação à capacidade de reduzir xilose em xilitol, algumas bactérias, leveduras e fungos apresentaram potencial para uso em vias fermentativas na obtenção deste produto (PANDEY *et al.*, 2000).

Em geral, entre os microrganismos, as leveduras são consideradas as melhores produtoras de xilitol, sendo que as do gênero *Candida* têm se destacado, permitindo a obtenção dos melhores resultados (SIRISANSANEEYAKUL; STANISZEWSKI; RIZZIZ, 1995; BARBOSA *et al.*, 1988; GONG *et al.*, 1983).

No trabalho de Gong *et al.*, (1983) os autores avaliaram a capacidade de produção de xilitol (também a partir de xilose) por 20 linhagens de *Candida* pertencentes a 11 diferentes espécies, 21 linhagens de *Saccharomyces* pertencentes a 8 espécies diferentes e 8 linhagens de *Schizosaccharomyces pombe*. Todas as espécies de *Candida* testadas produziram xilitol com concentrações finais no meio da ordem de 10-15% massa/volume.

As linhagens de *Schizosaccharomyces pombe* produziram, consideravelmente, menos xilitol que as do gênero *Candida*, apesar de utilizarem xilose em maior quantidade. Outro

trabalho que pode ser destacado foi o desenvolvido por Barbosa *et al.* (1988), no qual os autores também avaliaram leveduras para a produção de xilitol a partir de xilose. Foram testadas 44 linhagens pertencentes a 12 espécies, distribuídas em cinco gêneros, sendo indicadas linhagens de espécies de *Candida guilliermondii* e *Candida tropicalis* como bastante promissoras para este fim. Usando altas densidades celulares sob condições aeróbicas foram produzidos 77 g/L de xilitol a partir de 104 g/L de xilose.

Leathers (2003) cita diversos trabalhos nos quais espécies recombinantes de *S. cerevisiae* contendo o gene da enzima xilose redutase de *P. stipitis* ou *C. shehatae* são capazes de converter xilose a xilitol com rendimentos próximos à razão estequiométrica de 1:1 e produtividades volumétricas entre 0,6 e 1,0 g/L.h. Estas espécies recombinantes, entretanto, requerem um co-substrato como a glicose para crescimento e geração de cofatores. Segundo este autor, o uso de elevados níveis de glicose produz uma alta concentração de etanol que se considera tóxico e inibe o crescimento celular e também bloqueia o transporte de xilose em *Saccharomyces*.

A via metabólica utilizada por estes microrganismos na qual o xilitol é produzido pode ser resumida da seguinte forma: a xilose é inicialmente reduzida a xilitol em uma reação catalisada pela enzima xilose redutase – XR (E.C. 1.1.1.2.1), na presença de NADH e/ou NADPH. Esta etapa é seguida pela oxidação do xilitol a xilulose catalisada pela enzima NAD⁺-dependente ou, mais raramente, NADP⁺-dependente xilitol desidrogenase – XDH (E. C. 1.1.1.9). A xilulose pode então ser fosforilada a xilulose 5-fosfato, molécula esta que pode ser convertida, através de reações não oxidativas da via pentose monofosfato, a gliceraldeído 3-fosfato e frutose 6-fosfato. Estes compostos intermediários podem ser metabolizados por a via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) que está conectada a outras vias como o ciclo de Krebs e às reações de fermentação alcoólica (WINKELHAUSEN; KUSMANOVA, 1998). O

esquema proposto por Khankal, Chin e Cirino (2006), demonstrado na Figura 7, representa a principal via metabólica envolvida na fermentação de xilose por leveduras e bactérias.

Figura 7- Via metabólica utilizada na fermentação de D-xilose por leveduras e bactérias (adaptada de KHANKAL; CHIN; CIRINO, 2006)

A especificidade das enzimas XR e XDH aos cofatores reduzidos e oxidados varia de acordo com a levedura (WILSON *et al.*, 2003). Em *Candida utilis*, por exemplo, a XR é NADPH-dependente e a XDH é NAD^+ -dependente. Em *Pichia stipitis* a XR é NADPH ou NADH-dependente e a XDH é principalmente NAD^+ -dependente. Para a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 observou-se que a XR requer o cofator NADPH e a XDH é principalmente NAD^+ -dependente (BRANCO *et al.*, 2009).

Há uma íntima relação entre a especificidade da XR aos cofatores NADH ou NADPH e o acúmulo de xilitol no citoplasma do microrganismo, com sua posterior excreção para o

meio. Quando a atividade da XR de determinado microrganismo depende de NADH ou NADPH, o cofator NAD^+ utilizado na redução da xilose a xilitol pode ser recuperado na etapa seguinte, seja em condições anaeróbias ou de limitação de oxigênio. Neste caso e sob tais condições, o principal produto do metabolismo de xilose é o etanol (não há acúmulo de xilitol). Quando, entretanto, a atividade da XR de um dado microrganismo depende apenas de NADPH, sob condições de limitação de oxigênio observa-se acúmulo de xilitol, uma vez que, nestas condições, a capacidade da cadeia respiratória de recuperação do cofator oxidado é baixa, o que acarreta diminuição da atividade da XDH, diminuindo a taxa de transformação de xilitol em xilulose (NÁHLÍK *et al.*, 2003). Ainda neste caso, o NADPH necessário à redução da xilose catalisada pela XR é suprido graças à integração da via das pentoses com a via EMP, uma vez que 1 mol de glicose 6-fosfato (composto que pode ser produzido a partir de parte da xilose metabolizada) pode ser oxidado completamente a CO_2 e H_2O , gerando 12 moles de NADPH a partir de 12 moles de NADP^+ (CARVALHO *et al.*, 2002b).

Barbosa, *et al.*, (1998) propõem um rendimento teórico de 0,9 moles de xilitol para cada mol de D-xilose utilizado, conforme Equação 1:

Entretanto, de acordo com Parajó, Dominguez e Dominguez. (1998a), o metabolismo de xilose em leveduras gera vários produtos, como dióxido de carbono, etanol, ácido acético e polissacarídeos. Os fatores de rendimento em produto são dependentes da regulação do fluxo de carbono através das rotas metabólicas disponíveis.

O processo de formação de xilitol não pode ser interrompido após o primeiro passo, quando a xilose é convertida em xilitol. O crescimento celular depende de alguns produtos metabólicos, sendo também necessários que os cofatores sejam regenerados através de

diferentes passos na via metabólica (BRANCO *et al.*, 2009). Cunha (2006) e Santos (2005), correlacionaram a formação de xilitol com o decréscimo da concentração de oxigênio dissolvido e da velocidade de duplicação celular.

Nos trabalhos desenvolvidos pelo GMBiO na EEL-USP utilizou-se a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037. Linhagem selecionada por Barbosa *et al.* (1988), e que tem se mostrado bastante promissora, seja para uso em meios sintéticos ou hidrolisados hemicelulósicos contendo xilose (CARVALHO; CANILHA; SILVA, 2008; SARROUH; SANTOS; SILVA, 2008; CUNHA, 2006; SANTOS, 2005).

2.4 Principais fatores que influenciam a produção de xilitol por via fermentativa

Além do microrganismo, diversos são os fatores que influenciam no processo fermentativo de obtenção de xilitol, entre os quais podem ser citados a presença de inibidores, o pH, a aeração, o fator de concentração do hidrolisado, a concentração inicial de células e o modo de condução do processo.

Com relação à concentração celular do inóculo, Cao *et al.*, (1994), utilizando meio sintético, concluíram que o aumento na concentração inicial de células favoreceu a obtenção de elevadas concentrações de xilitol ao final da fermentação. Estes autores utilizaram a levedura *Candida sp* B-22 e obtiveram 210 g/L de xilitol a partir de 260 g/L de xilose após 96h de fermentação, partindo-se de uma concentração celular inicial de 26 g/L. Observaram também, entretanto, redução na produtividade específica a altas concentrações celulares, o que poderia, segundo os autores, ser devido a limitações da quantidade de oxigênio. Roberto *et al.* (1995), trabalhando com meio sintéticos e hidrolisados hemicelulósicos de bagaço de

cana-de-açúcar e palha de arroz, reportaram que o uso de altas densidades celulares melhorou a produtividade volumétrica e diminuiu os efeitos tóxicos de inibidores, limitando a morte celular causada por sua assimilação ou degradação.

Em outro trabalho, Felipe *et al.* (1996a) trabalhando com hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, observaram que uma concentração inicial de 3,0 g/L da levedura *Candida guilliermondii* foi suficiente para a superação dos efeitos inibitórios do ácido acético. Uma elevação da concentração celular para 6,0 g/L, entretanto, resultou em decréscimos no fator de rendimento e produtividade. Sendo assim, conforme se pode observar, a elevação na concentração celular inicial favorece o processo fermentativo de produção de xilitol, havendo, entretanto, valores de concentração acima dos quais há importantes diminuições em parâmetros importantes, como fator de rendimento e produtividade. Esta diminuição tem sido atribuída a limitações na taxa de transferência de oxigênio para os microrganismos, uma vez que o coeficiente de difusão deste gás diminui com o aumento na concentração de células no meio (FELIPE *et al.*, 1997a). Estes fatos reforçam a necessidade de novos estudos visando o aumento na concentração e/ou taxa de transferência de oxigênio no meio quando se trabalha com inóculos de elevada densidade celular (CARVALHO, 2000).

Outro fator que exerce importante influência na produção de xilitol por via microbiana utilizando-se hidrolisados hemicelulósicos é a presença de inibidores. A presença de determinados compostos em hidrolisados hemicelulósicos pode inibir o crescimento do microorganismo, diminuindo também sua capacidade de aproveitamento da fonte de carbono para a produção de xilitol (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2005). Entre esses, encontram-se o furfural, o hidroximetilfurfural e o ácido acético, gerados durante a decomposição da fração hemicelulósica (MARTON; FELIPE; PESSOA, 2003), além de compostos fenólicos originados da lignina e íons metálicos oriundos da corrosão de equipamentos.

O furfural e o hidroximetilfurfural são os principais produtos formados pela desidratação das pentoses e hexoses, respectivamente. Em estudos realizados por Sanches e Bautista (1988), o furfural e o hidroximetilfurfural provocaram retardamento no processo fermentativo no início da fermentação e inibiram o crescimento da levedura *Candida guilliermondii*. Estes efeitos foram provavelmente causados pela ação destes compostos sobre as enzimas glicolíticas triose-fosfatodesidrogenase e a álcool desidrogenase.

O ácido acético, que pode ser encontrado nos hidrolisados hemicelulósicos tem seu efeito inibitório relacionado ao pH (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998c), uma vez que, em meios mais ácidos, a forma não dissociada deste ácido está presente em maiores concentrações. Esta forma (não dissociada) é capaz de difundir-se através da membrana celular, atingindo o citoplasma e, ao encontrar no interior da célula valores mais elevados de pH, dissocia-se, diminuindo o pH intracelular a valores abaixo dos limites fisiológicos (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998c; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

A relação do efeito do ácido acético em função do pH foi observada por Ferrari *et al.* (1992), os quais, utilizando hidrolisado hemicelulósico de eucalipto, não verificaram nenhuma produção de xilitol em meios com concentração de ácido acético de 10 g/L e pH 5,0. Quando o pH foi elevado para 5,5 ou 6,5, entretanto, pôde-se observar produção de xilitol (e também consumo de ácido acético). Felipe *et al.* (1997a), trabalhando com a levedura *Candida guilliermondii* em meio semi-sintético, observaram que a produção de xilitol foi favorecida quando a concentração de ácido acético no meio foi baixa (1,0 g/L). Segundo os autores, este comportamento sugere que a fermentação de xilose a xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* é estimulada por baixas concentrações de ácido acético. Embora concentrações maiores de ácido acético (5 g/L) tiveram efeito negativo sobre a bioconversão.

Conforme se pôde observar, o efeito da presença de ácido acético no meio de fermentação utilizado para a bioconversão de xilose a xilitol é um assunto bastante complexo, sendo este efeito dependente de vários outros fatores como pH, relação substrato/ácido acético (FELIPE *et al.*, 1997a), aeração (SANTOS *et al.*, 2005), além de composição e origem do meio de fermentação (FELIPE *et al.*, 1997b). A existência destes inibidores no meio de fermentação oriundos de hidrolisados hemicelulósicos torna necessário que estes sejam tratados antes da bioconversão (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

Com este objetivo, diversos trabalhos foram executados para a redução dos efeitos negativos dos inibidores em processos fermentativos incluindo o tratamento do hidrolisado por métodos físicos, químicos e biológicos (KUMAR *et al.*, 2009). Como exemplo disto cita-se a utilização de resinas de troca iônica e carvão ativo (MARTON, FELIPE e PESSOA, 2003), tratamento com álcalis e ácidos (FELIPE *et al.*, 1997b), extração com solventes (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b) ou ainda combinações destes.

Conforme pode ser observado, o pH inicial de fermentação é um parâmetro bastante importante no processo de bioconversão de xilose em xilitol e, quando a utilização de hidrolisados hemicelulósicos está intimamente ligada à presença de ácido acético. Para o caso da produção de xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, Felipe *et al* (1997a) observaram que a formação de xilitol foi fortemente inibida em pH inicial inferior a 4,5, sendo que o processo foi favorecido para pH próximo a 6,5. Resultados semelhantes foram encontrados por Sene, Felipe e Silva (2000).

A vazão de ar é outro fator que exerce grande influência na produção de xilitol por fermentação, afetando a produção de ATP e a regeneração de coenzimas (NÁHLÍK *et al.*, 2003). Quando condições anaeróbias são utilizadas no processo, ocorre um desequilíbrio no potencial redox da célula, devido à elevação na concentração de NADH, o que força a paralisação do metabolismo celular. Por outro lado, condições de elevada aeração desviam o

metabolismo microbiano para a produção de células, diminuindo a produção de xilitol. Desta forma, deve-se trabalhar sob condições de limitação de oxigênio, nas quais se observa acúmulo de xilitol, devido à limitação da quantidade de cofator oxidado necessário a atividade da xilitol desidrogenase (XDH) (NÁHLÍK *et al.*, 2003).

Ribeiro (1997) desenvolveu para a levedura *Candida guilliermondii* cultivada em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar um modelo estatístico quadrático que descreveu a influência da agitação e da vazão de alimentação de ar sobre a produção de xilitol. Este modelo indicou como condições ótimas para o processo, uma agitação de 357 rpm e aeração de 0,62 vvm ($K_{La}=21,6 \text{ h}^{-1}$). Nestas condições, a produtividade obtida foi de 0,84 g/L.h, com uma concentração de xilitol de 40,32 g/L e um fator de rendimento $Y_{p/s}=0,65 \text{ g/g}$.

Considerando que a produção de xilitol por leveduras é muito sensível à concentração do substrato, é recomendado que ambas as variáveis - vazão de ar e fator de concentração do hidrolisado - sejam estudadas simultaneamente para a otimização da produção de xilitol (SANTOS, *et al.*, 2005). Em um estudo considerando o efeito simultâneo da aeração e do fator de concentração do hidrolisado (HORITSU *et al.*, 1992) foi observado que as condições de aeração levaram a valores ótimos de produtividade volumétrica em xilitol distintos quando diferentes fatores de concentração do hidrolisado foram utilizados. Quando a menor concentração do substrato estudada (90 g/L) foi utilizada, a condição de ótima aeração determinada correspondeu a um coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) de 300 h^{-1} , enquanto que para uma concentração de xilose de 150 g/L os melhores resultados foram obtidos com o uso de condições de maior aeração ($K_{La}=450 \text{ h}^{-1}$).

Santos (2005), trabalhando com células imobilizadas em vidro poroso e zeólita em reator de leito fluidizado observou que maiores vazões de ar tendem a favorecer o valor da produtividade volumétrica em xilitol, entretanto tais condições resultaram em prejuízo para os

valores de fator de conversão e concentração do produto. Segundo este autor, menores vazões de ar favoreceram maior fator de rendimento em xilitol.

Diversas estratégias têm sido estudadas para melhoria da eficiência e da produtividade do processo de bioconversão xilose-xilitol. De acordo com Santos (2005) e Cunha (2006), o uso de células imobilizadas em bateladas é uma alternativa interessante para melhorar o processo fermentativo quando são utilizados meios de hidrolisados hemicelulósicos. Esta metodologia é baseada em fermentações sucessivas, nas quais as células imobilizadas de cada experimento são reutilizadas como inóculo no experimento seguinte.

2.5 Condução de bioprocessos utilizando células imobilizadas

O uso de células imobilizadas tem como vantagem principal facilitar a separação e recuperação do biocatalisador (SANTOS, 2005; SANTOS *et al.*, 2005a, CUNHA, 2006). Esta facilidade de separação indica o uso destes sistemas em processos conduzidos em bateladas repetidas, nos quais, ao final de uma batelada de fermentação, o reator é descarregado e alimentado com novo meio de cultivo, sendo mantidas as células imobilizadas em seu interior. Este modo de condução apresenta como vantagem a eliminação da etapa de preparo do inóculo, a recuperação e reuso das células e a possibilidade de sua adaptação ao meio de cultura, o que pode resultar em maiores produtividades e eficiência (CARVALHO; CANILHA; SILVIA, 2008; CARVALHO, 2002b; CUNHA, 2006; SANTOS *et al.*, 2005a; CARVALHO, 2000).

De acordo com Ramakrishna e Prakasham (1999), as técnicas de imobilização de células, que tiveram origem nas técnicas de imobilização de enzimas, têm atraído a atenção de

vários pesquisadores. Alguns processos utilizando células imobilizadas têm sido estudados visando viabilizar os mesmos para uso industrial: No Japão há relatos de processos em desenvolvimento para a produção de cerveja e saquê, usando leveduras imobilizadas (FREEMAN; LILLY, 1998).

Loukatos *et al.* (2003) propõe o uso de células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em material celulósico deslignificado para a produção contínua de vinhos e bebidas destiladas em um reator de leito fixo tipo torre multiestágio de 11000 L.

A principal desvantagem associada ao uso de células imobilizadas está ligada ao fato de que a presença de elevadas densidades celulares pode ocasionar problemas relacionados ao transporte dos substratos e produtos, com consequente limitação nas taxas de reação. Estes problemas podem, entretanto, ser minimizados com a correta escolha do método e do suporte de imobilização além do tipo de biorreator (CARVALHO, 2000).

2.5.1 Métodos de imobilização

Existem diversos métodos para a imobilização de biocatalisadores. Estes métodos podem ser agrupados em quatro grandes grupos (KOURKOUTAS *et al.*, 2004), conforme mostrado na Figura 8.

O método de imobilização por meio de ligação a superfícies, envolve a adesão das células ao suporte de imobilização através de adsorção natural ou através de métodos químicos como formação de ligações cruzadas com glutaraldeído e quelação a óxidos metálicos (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

Figura 8 - Ilustração dos métodos de imobilização (KOURKOUTAS *et al.*, 2004)

O método de imobilização por meio de aprisionamento em matrizes porosas envolve a difusão das células em uma matriz porosa pré-formada ou a síntese *in situ* da matriz porosa em torno das células a serem imobilizadas (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

O método de imobilização por meio de contenção em barreiras envolve a utilização de barreiras pré-formadas ou a formação *in situ* da barreira em torno das células a serem imobilizadas (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

O método de imobilização por meio de auto-agregação envolve a agregação ou a floculação das células de maneira natural ou artificialmente induzida. O tamanho

relativamente grande dos agregados celulares permite a sua utilização em biorreatores projetados para trabalhos com células imobilizadas (KOURKOUTAS *et al.*, 2004).

De acordo com Kourkoutas *et al.* (2004), o método de imobilização deve satisfazer os seguintes critérios: não apresentar efeitos adversos nas propriedades biocatalíticas desejadas, ser seguro e simples, requerer poucas etapas e ingredientes para o seu preparo, possibilitar ampliação de escala e ser econômico. Também o mesmo autor ressaltou que, os suportes e matrizes utilizados para a imobilização de células idealmente deveriam satisfazer os seguintes critérios: não reduzir a atividade catalítica desejada, não reagir com substratos, nutrientes ou produtos presentes no meio, reter a integridade física e ser insolúvel sob as condições de operação, ser permeável a reagentes e produtos, apresentar elevada superfície específica, ser resistente à degradação microbiana, ser elástico o suficiente para acomodar células em crescimento, ser disponível em quantidades adequadas, apresentar qualidade padronizada e preço aceitável, apresentar simplicidade de manuseio e ser ambientalmente seguro e/ou reciclável. A escolha do método de imobilização e do tipo de suporte depende basicamente de dois fatores: das características peculiares do material biológico, e das condições de uso do sistema imobilizado.

Diante da variabilidade destes fatores, não existe um método geral de imobilização e nem um suporte universal. As condições de imobilização geralmente só poderão ser estabelecidas empiricamente, dependendo da escolha do binômio suporte-método sobre aquele que apresentar maior retenção da atividade (SANTOS, 2005).

2.5.2 Imobilização de células pelo método de aprisionamento em gel de alginato de cálcio

O método de aprisionamento em polímeros naturais, devido a sua simplicidade e flexibilidade, tem se tornado a técnica de imobilização mais extensivamente utilizada para a imobilização de células viáveis. Devido ao tamanho das células, é muito simples preparar redes cuja porosidade permite completa retenção celular sem ocasionar limitações significativas ao transporte de substratos e produtos, possibilitando a obtenção de elevada eficiência de atividade catalítica (KAWAGUTI; SATO, 2008).

Este método de imobilização tem sido estudado para a imobilização de células viáveis, devido à possibilidade de uso de polímeros hidrofílicos biocompatíveis, como por exemplo, o alginato como suportes de imobilização (CUNHA, 2006; CARVALHO, *et al.*, 2003). Além disso, as células imobilizadas em uma matriz hidrofílica podem ser protegidas de condições não amenas de pH e temperatura, e também da presença de solventes orgânicos e/ou compostos inibidores presentes no meio de fermentação (PARK; CHANG, 2000). Como a matriz de aprisionamento apresenta limitações na transferência de massa, a imobilização na forma de esferas é geralmente preferida devida à elevada área superficial (CUNHA, 2006; CARVALHO *et al.*, 2002c)

O alginato é o polímero natural mais utilizado para a imobilização de células viáveis. A principal vantagem da utilização deste material como suporte de imobilização se deve à rápida gelificação na presença de íons cálcio sob condições amenas (sem alterações drásticas de temperatura, pH e pressão osmótica), o que permite conservar a atividade e a viabilidade dos microrganismos imobilizados (COVIZZI *et al.*, 2007).

O método de aprisionamento em géis de alginato é extremamente econômico, uma vez que somente 10 gramas de gel são requeridas para imobilizar 200 gramas de células em peso-seco. Além disso, este material é barato, facilmente encontrado no mercado, o método de imobilização é versátil e permite o preparo de grandes quantidades de pellets de maneira

relativamente fácil (HUANG; LAI; LIN, 2006; KAWAGUTI; SATO, 2008), conforme mostrado na Figura 9.

Figura 9 – Procedimento ilustrativo detalhado para a preparação das esferas do alginato de Cálcio (HUANG; LAI; LIN, 2006)

O principal problema relativo à utilização do alginato de cálcio como suporte de imobilização é a sua rápida solubilização na presença de agentes quelantes do íon cálcio, como fosfato, citrato e EDTA, o que muitas vezes torna necessário a adição de íons cálcio no meio de fermentação ou tratamentos adicionais após a gelificação visando preservar a integridade dos pellets durante operações por tempos prolongados (HUANG; LAI; LIN, 2006). Outra desvantagem, que varia com o tipo de alginato utilizado, é a tendência das esferas em sofrer dilatação na presença de cátions monovalentes (HUANG; LAI; LIN, 2006).

Quando as células viáveis imobilizadas são expostas a um meio rico, o crescimento celular dependerá, inicialmente, das limitações difusionais impostas pela porosidade da matriz e, posteriormente, do impacto determinado pelo acúmulo da biomassa. No caso do emprego de alginato como suporte, as células colonizarão preferencialmente a periferia dos pellets,

devido principalmente ao fornecimento restrito de oxigênio (CUNHA, 2006). A faixa de penetração efetiva de oxigênio em esferas de alginato de cálcio foi estimada como sendo entre 0,1 e 0,15 mm (OGBONNA; MATSUMURA; KATAOKA, 1991), o que leva a concluir que o diâmetro ótimo dos pellets confeccionados com este material não deveria exceder 0,3 mm.

O alginato é um polissacarídeo presente em todas as “algas marrons”, embora poucas espécies sejam importantes comercialmente. A espécie *Macrocystis pyrifera* constitui a principal fonte de obtenção do alginato (GUISELEY, 1989). Quimicamente, os alginatos consistem de polímeros lineares dos ácidos D-Manurônico e L-Gulurônico unidos entre si através de ligações glicosídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ e $\alpha(1\rightarrow4)$, respectivamente. Estes polímeros encontram-se arrançados em três tipos de grupamentos diferentes: MMMMMM (Blocos M), GGGGGG (Blocos G) e MGMGMG (Blocos MG) (KAWAGUTI; SATO, 2008).

Os alginatos não formam géis termoreversíveis. A formação do gel ocorre quando cátions como Ca^{+2} são introduzidos em soluções do sal de sódio (alginato de sódio). A troca dos íons Na^{+1} pelos íons Ca^{+2} leva à formação de gel consistente cujas características reológicas dependem do tipo de alginato e do modo de introdução dos íons divalentes (KAWAGUTI; SATO, 2008).

As propriedades mecânicas dos géis de alginato de cálcio são fortemente influenciadas pela distribuição dos ácidos manurônico (bloco M) e gulurônico (bloco G) no polímero, assim como pelo peso molecular e pelo grau de polidispersibilidade (KAWAGUTI; SATO, 2008; HUANG; LAI; LIN, 2006). Os géis formados a partir de alginatos ricos em ácido gulurônico são mais quebradiços, enquanto aqueles formados a partir de alginatos ricos em ácido manurônico são mais maleáveis, sendo que os géis mais estáveis são obtidos a partir da utilização de polímeros com alta relação de blocos G (HUANG; LAI; LIN, 2006). De acordo com Kawaguti e Sato, (2008), os íons cálcio se ligam preferencialmente aos blocos G, conforme ilustrado na Figura 10. Este processo é altamente cooperativo se o número de

resíduos de guluronato excede 20 unidades. Não existem evidências da existência de especificidade ou cooperatividade em relação à ligação dos íons Ca^{+2} aos blocos M ou MG.

Figura 10 – Composição do alginato: **(a)** Cadeia de ácidos manurônicos (blocos M), **(b)** Cadeia de ácidos gulurônicos (blocos G) e **(c)** Cadeia de ácidos manurônicos e gulurônicos alternados (blocos MG) (KAWAGUTI; SATO, 2008)

Os íons Ca^{+2} ligados cooperativamente durante a gelificação são dispostos dentro das cavidades eletronegativas dos resíduos de poli-guluronato, como ovos dentro de uma caixa apropriada. A associação se inicia entre duas cadeias somente, lado a lado. Maiores agregados somente ocorrem sob condições forçadas de elevada concentração de íons Ca^{+2} (COVIZZI *et al.*, 2007; HUANG; LA; LIN, 2006). Este modelo de formação da malha de alginato de cálcio, proposto como um processo em dois estágios é ilustrado na Figura 11.

Figura 11 - Modelo para a formação da malha de alginato de cálcio, **(a)** Homopolímeros de unidades de ácido gulurônico, **(b)** Ligação entre os blocos G e os íons de cálcio com carga positiva, **(c)** Formação da rede de gel com blocos G unidos através dos íons cálcio (KAWAGUTI; SATO, 2008)

Considerando que as propriedades de gelificação do alginato, vitais para a sua utilização como suporte de imobilização, variam de acordo com a composição monomérica, com o arranjo sequencial e com o comprimento dos blocos G, a seleção cuidadosa do material de partida é essencial para a obtenção de bons resultados (KAWAGUTI; SATO, 2008).

Apesar do gel de alginato de cálcio ser amplamente utilizado para a imobilização de células viáveis não existe padronização das condições de imobilização, o que justifica estudos para cada aplicação em particular. Os parâmetros de imobilização, concentração de alginato de sódio, concentração de cloreto de cálcio, período e temperatura de incubação na solução de

cloreto de cálcio (cura), concentração inicial de células confinadas na matriz e diâmetro dos pellets são também fatores que influenciam na estabilidade, resistência e capacidade de retenção celular deste suporte (COVIZZI *et al.*, 2007).

2.5.3 Uso de células imobilizadas para a produção de xilitol

A bioconversão xilose-xilitol é um processo cujo estudo do uso de células imobilizadas tem sido bastante estudado em nossos laboratórios (SARROUH; SILVA, 2008; CANILHA *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2005a; CUNHA, 2006; CARVALHO *et al.*, 2004).

Carvalho *et al.* (2003) utilizando a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 imobilizada em alginato de cálcio para a produção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar, comparou o desempenho de três diferentes sistemas de fermentação: frascos *Erlenmeyer*, reator de tanque agitado e reator de tanque agitado tipo cesta. Neste trabalho, os resultados do fator de rendimento e produtividade volumétrica em xilitol obtidos com reator de tanque agitado foram semelhantes aos obtidos em frascos *Erlenmeyer*. Entretanto, os mesmo autores observaram que o uso deste tipo de biorreator resultou na redução do volume das esferas de alginato em 11% em relação ao volume das esferas em frascos *Erlenmeyer*. Este fato foi devido ao atrito das esferas com o agitador mecânico do biorreator de tanque agitado que resultou no rompimento do suporte de imobilização e na perda no volume das esferas de alginato. Buscando evitar este fenômeno, os autores utilizaram um reator de tanque agitado adaptado com uma cesta para confinamento das células. Neste caso, entretanto, houve prejuízo da produção de xilitol devido às limitações de transferência de massa.

Desta forma, além do método de imobilização e do suporte escolhido, outro fator de extrema importância para o bom desempenho de sistemas com células imobilizadas é a escolha de um biorreator adequado. Santos (2005), trabalhando com *Candida guilliermondii* FTI 20037 imobilizada em zeólita em um reator de leito fluidizado demonstrou que a variável da massa de suporte exerce efeito de interação com as demais variáveis do processo na bioprodução de xilitol com células imobilizadas em zeólita. Este autor observou que uma maior quantidade de suporte favoreceu a dissolução do oxigênio devido a uma maior redução no tamanho das bolhas de ar ao longo do leito fluidizado por causa da alta densidade de zeólita, facilitando assim a difusão do oxigênio para dentro do suporte.

O presente trabalho sugere uma proposta inovadora que contribuirá para aumentar os conhecimentos em fermentações com células imobilizadas em biorreator de leito fluidizado. Objetiva também entender melhor o modo de funcionamento e a forma de controle deste tipo de biorreator operando com células imobilizadas em suportes de imobilização com baixa densidade (como no caso do alginato de cálcio). Além de propor uma metodologia de trabalho mais eficiente e que conduza a resultados mais promissores.

2.6 Biorreatores com células imobilizadas

Embora para cada sistema com células imobilizadas uma variedade de tipos de reatores possa ser selecionada, o processo só será otimizado caso seja feita uma cuidadosa escolha do biorreator mais adequado ao sistema em uso. Esta escolha depende de fatores como facilidade de operação, características de mistura e homogeneização, transferência de oxigênio, distribuição de células viáveis, atrito com o biocatalisador, facilidade de *scale-up*,

cinética de reação, necessidade de controle do processo e custo do biorreator (COVIZZI *et al.*, 2007).

De acordo com Baron, Willaert e Backer (1996), os biorreatores para uso em sistemas com células imobilizadas podem ser agrupados em três categorias, de acordo com a fixação dos agregados celulares. Estas categorias incluem os reatores de tanques agitados tipo cesta, e os reatores de mistura com partículas suspensas. A maioria destes biorreatores contém três fases, ou seja, sólida (biomassa, suporte), líquida (solução de nutrientes e produtos) e gasosa (ar ou gás alimentado no reator, produtos gasosos – CO_2 , N_2 , CH_4). O trabalho e a operação de sistemas com duas fases (sólido/líquido ou até mesmo gás/sólido) são, consideravelmente, mais fácil que para sistemas trifásicos. Muitas operações aproximam-se do comportamento de um sistema bifásico, como as que são efetuadas com aeração externa (microaeróbicas), processos anaeróbios ou quando os gases formados podem ser eficientemente removidos. Caso seja necessária alimentação do reator com nutrientes gasosos (como o oxigênio), ou ainda quando produtos gasosos são formados em grande quantidade, sistemas sólido/gás/líquido são inevitáveis. Neste caso, a introdução direta de bolhas de ar, por exemplo, podem ocasionar problemas adicionais de operação devido às tensões de cisalhamento exercidas que podem causar ruptura do agregado - sistema célula/suporte (BARON; WILLAERT; BACKER, 1996).

2.6.1 Biorreator de leito fluidizado

O uso de biorreator de leito fluidizado permite melhores taxas de transferência de massa quando comparado aos sistemas com leito fixo, sem os inconvenientes de elevadas tensões de cisalhamento impostas ao meio em reatores de tanque agitado (WU *et al.*, 2003).

Uma significativa influência na taxa de transferência de massa (O_2), instabilidade do sistema em relação à retenção celular, e forte influência da tensão de cisalhamento do reator de mistura são ainda pontos críticos observados no processo bioconversão xilose-xilitol, o que dificulta a obtenção de elevadas produtividades no processo, prejudicando dessa forma estudos posteriores de ampliação de escala. Estudos da literatura apontam que a condução deste processo fermentativo em reator de leito fluidizado utilizando células imobilizadas em alginato seria uma forma fácil de contornar os problemas encontrados no reator de mistura. Biorreatores de leito móvel, tais como os de leito fluidizado promovem uma boa aeração do sistema, evitando danos causados pela agitação mecânica aos suportes frágeis de gel (SARROUH; SILVA, 2008; SANTOS *et al.*, 2005).

2.7 Processos de produção de xilitol no mundo atual

No início dos anos 90, uma produção anual de xilitol de 5000 toneladas foi reportada pelo mundo (BISWAS; VASHISHTHA, 2006). A União Européia conta com a metade da produção mundial de xilitol, enquanto a Ásia e os Estados Unidos possuem 30% e 20%, respectivamente.

Atualmente cerca de 95% da produção mundial de xilitol pertencem a 2 empresas finlandesas e o restante é dividido entre 4 empresas japonesas, 1 chinesa e 2 suíças (BISWAS e VASHISHTHA, 2006). Atualmente, a Finlândia e a China são os maiores produtores de

xilitol, por via química, no mundo. O mercado atual do xilitol é estimado ser de 639,5 milhões de reais por ano, com 35 % de crescimento alcançados nos últimos 2 a 3 anos (JIN-SEO, 2007a).

É esperado um crescimento acima de 50 % a partir de 2010, no mercado global do xilitol, quando a população for conscientemente bem informada sobre a existência do produto no mercado assim como seus benefícios, em especial na área da saúde oral (JIN-SEO, 2007a; JIN-SEO, 2007b).

Segundo estudos econômicos do *Instituto Tecnológico de Vera Cruz – México*, o custo de produção de xilitol de alto grau de pureza a partir do bagaço de cana-de-açúcar é de USD\$ 100 por quilo (GARCIA, 2005). Sua venda no mercado é de USD\$ 20 a USD\$ 200 por quilo, de acordo com o seu grau de pureza. Os principais países consumidores de xilitol são Estados Unidos, Canadá, Alemanha, França e Japão (GARCIA, 2005).

O mesmo instituto declarou um investimento inicial de USD\$ 7 milhões para uma proposta de produção de 500 toneladas de xilitol biológico no ano. Como gastos em equipamentos foram considerados quase 50% dos 7 milhões, sendo os demais destinados à construção, terreno, móveis e insumos. Segundo Garcia (2005), para uma produção lucrativa é necessário iniciar a planta com uma produção de 250 toneladas anuais e um período de retorno do capital investido de 2 anos.

O *Instituto Taiwanês de Pesquisa de Açúcar em Taiwan* também apresentou trabalhos de pesquisa extensivos na possibilidade da exploração comercial do xilitol de bagaço, além de ser responsável por desenvolver um processo de produção contínua de xilitol utilizando o bagaço em escala comercial (BISWAS; VASHISHTHA, 2006). O processo de produção envolve a etapa de desfibrar o bagaço em partículas pequenas. Para a etapa de hidrólise ácida foi utilizado o HCL. O bagaço foi alimentado ao reator junto com o HCL em uma relação de

0,25%: 12% (HCl : bagaço-massa seca). A temperatura de hidrólise foi de 100-125°C e o tempo de reação de 40 a 75min.

O Centro Asiático e Pacífico para a Transferência de Tecnologia (CAPTT) na China, desenvolveu uma tecnologia para a produção do xilitol químico utilizando agro-resíduos como o bagaço de cana e o sabugo de milho. O processo apresentou pouco impacto no meio ambiente além de não produzir qualquer gás residual. O material sólido restante da hidrólise ácida foi queimado e utilizado para geração energia do processo ou utilizado como nutriente para cultivo de fungos (BISWAS; VASHISHTHA, 2006). Após neutralização, a água do processo foi tratada com microorganismos anaeróbicos no caso da existência de substâncias orgânicas e reutilizada. Este processo foi comercializado na China (BISWAS; VASHISHTHA, 2006).

Alguns dados econômicos foram divulgados pelo instituto, para o desenvolvimento deste processo com capacidade de produção de 500 toneladas de xilitol por ano e um capital de investimento no valor de USD\$ 7 milhões (BISWAS; VASHISHTHA, 2006). Estes dados representavam os gastos em construção e insumos (Sabugo de milho – 17800 ton/ano, carbonato de sódio 800 ton/ano, ácido sulfúrico (92% a 98% conc.) - 1200 ton/ano, carvão ativo - 90 ton/ano, vapor – 9.5 ton/h (P = 0.6 Mpa), prédio – 7800 m², terreno – 4000 m², água – 110 ton/h), e mão-de-obra (total = 110, sendo: técnicos - 12, profissionais - 76, não profissionais – 28).

O Centro Asiático e Pacífico para a Transferência de Tecnologia (CAPTT) oferece também outra tecnologia chinesa, que envolve um processo seguro e flexível para a produção de xilitol químico com baixo investimento. O tratamento do efluente segue os critérios internacionais. O material sólido residual é queimado para a geração de energia. Este processo está sendo comercializado na China (BISWAS; VASHISHTHA, 2006). Também alguns dados econômicos deste processo foram divulgados pelo instituto, tais como a construção de

uma planta com capacidade de produção de 600 a 700 toneladas de xilitol por ano com um capital de investimento no valor de USD\$ 9 milhões. São os gastos em construção e insumos (Terreno– 4000 m², prédio – 5000 m², água – 2500 ton/ton de produto, energia –5500 KWH/ton de produto, bagaço de cana – 24500 ton/ano, ácido sulfúrico (92% a 98%) – 1700 ton/ano) e mão-de-obra requerida (Total mão-de-obra - 200, técnicos- 20) (BISWAS; VASHISHTHA, 2006).

2.8 Análise econômica do processo biotecnológico para a produção de xilitol

A análise econômica de um processo biotecnológico é de fundamental importância na transposição dos resultados obtidos para o setor produtivo. Esta análise pretende responder o quanto custa produzir um produto, quais investimentos são requeridos e se o processo de produção é viável ou não.

A análise de custos visa identificar e quantificar a relação entre vários parâmetros de desenhos ou operações do processo e os custos de investimento. Dentro desta análise de custo, a estimativa destes está relacionada com o custo da produção e o custo total de investimento (BORDEAUX-RÊGO *et al.*, 2008).

O presente trabalho buscou realizar um estudo de viabilidade econômica do processo de obtenção de xilitol por via biotecnológica, o qual foi de fundamental importância por apontar os pontos críticos deste processo.

Para este estudo diferentes fatores foram considerados como o tamanho e disponibilidade de equipamentos necessários, disponibilidade da matéria-prima, material de

consumo, eficiência do processo estudado na bioconversão xilose-xilitol e a capacidade de produção da proposta planta piloto.

Este estudo é considerado como fundamental no desenvolvimento desta tecnologia e podendo trazer importantes contribuições para os trabalhos desenvolvidos há anos no GMBiO (EEL/USP).

Deste modo, a análise econômica efetuada do processo estudado contribuirá eficientemente na disponibilização de dados importantes e necessários para um futuro “*scale up*”, e posterior implantação deste processo biotecnológico de produção do xilitol a nível industrial.

Apresentam-se a seguir as definições dos termos econômicos utilizados neste trabalho:

Capital – Valor necessário para a construção da planta piloto e produção do produto final. (PETERS; TIMMERHAUS, 1991).

Capital de Produção - Representa o valor em reais do total investido em matéria-prima, mão-de-obra, salários, contas, notas fiscais e taxas (PETERS; TIMMERHAUS, 1991).

Capital Fixo de Investimento - Representa o capital necessário para a instalação dos equipamentos do processo com gastos em tubulações, terreno, construção e instrumentos. Representa de 10 a 20% do capital total de investimento (PETERS; TIMMERHAUS, 1991).

Custos Indiretos - Incluem os custos de desenho e construção, engenharia, transporte, gastos de escritório e comunicação. Estes custos não podem ser diretamente cobrados do capital fixo de investimento (BORDEAUX-RÊGO *et al.*, 2008).

Custos Diretos - Incluem gastos em compra de equipamentos, instalações, tubulações, edificações, terreno, equipamentos elétricos e materiais, instrumentação e controle. Estes custos são diretamente cobrados do capital fixo de investimento e representam 30% do valor dos equipamentos comprados ou 8% do custo total do processo (BORDEAUX-RÊGO *et al.*, 2008).

Depreciação – Perda ocasionada nos equipamentos, edifícios e outros objetos materiais em função do tempo. A depreciação deve ser calculada no custo do processo devido a sua compensação no valor de imposto de renda (PETERS; TIMMERHAUS, 1991).

Payback – É o tempo de retorno do capital investido e serve como um potente indicador para determinar se o processo é viável ou não. Para um processo tornar-se viável o valor do *payback* calculado deve oscilar na faixa de 0 a 5 anos (BORDEAUX-RÊGO *et al.*, 2008; PETERS; TIMMERHAUS, 1991).

Valor Presente Líquido (VPL) - É utilizado com a finalidade de comparar o valor do investimento realizado com o valor presente dos fluxos de caixa gerados pelo processo (BORDEAUX-RÊGO *et al.*, 2008).

$VPL = \text{Fluxo de Caixa Acumulado} - \text{Capital Fixo de Investimento} > 0 \rightarrow VPL > 0$, o trabalho é aceito;

$VPL = \text{Fluxo de Caixa Acumulado} - \text{Capital Fixo de Investimento} < 0 \rightarrow VPL < 0$, o trabalho é rejeitado.

Taxa Interna de Retorno (TIR) - Representa a porcentagem dos lucros anuais obtidos pelo fluxo de caixa do processo. A taxa interna de retorno torna o VPL nulo. O valor

da TIR sempre deve ser maior que o valor da margem de contribuição do capital (BORDEAUX-RÊGO *et al.*, 2008).

Margem de contribuição do capital $>$ *TIR* - Trabalho deve ser aceito ($VPL > 0$);

Margem de contribuição do capital $<$ *TIR* - Trabalho deve ser aceito ($VPL < 0$).

3. OBJETIVOS

3.1 Gerais

Contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia economicamente viável para a obtenção de xilitol por via fermentativa a partir de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

3.2 Específicos

- Determinar por planejamento fatorial completo a influência dos parâmetros operacionais - o fator de concentração do hidrolisado, a vazão do ar e o fluxo de fluidização do meio da fermentação – em um biorreator de leito fluidizado usando células de *Candida guilliermondii* FTI 20037 imobilizadas em alginato de cálcio.
- Elaborar modelo estatístico que expresse o fator de rendimento e a produtividade volumétrica em xilitol, em função das variáveis estudadas na execução do planejamento estatístico e utilizar o modelo para a otimização do processo.
- Avaliar a estabilidade operacional do sistema em bateladas repetidas usando as condições otimizadas anteriormente.
- Realizar um estudo técnico-econômico do processo biotecnológico para a produção de xilitol otimizado neste trabalho. Onde os cálculos do capital total de investimento

e os custos da produção de xilitol serão realizados em nível de planta piloto com capacidade de processar 1 tonelada de bagaço por dia.

- Apresentar uma proposta de um processo biotecnológico economicamente viável para a produção de xilitol usando bagaço de cana-de-açúcar.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Preparo do bagaço de cana-de-açúcar e obtenção do hidrolisado

Utilizou-se o bagaço de cana-de-açúcar “*in natura*”, proveniente da Usina “Companhia Açucareira Vale do Rosário”, Orlândia – SP. Após recebimento e limpeza do bagaço, o mesmo foi exposto ao sol durante 4 dias para secagem. E em seguida este foi pesado e armazenado em sacos de 50 kg. Foi determinado também o teor de umidade do bagaço para auxiliar nos cálculos da dosagem de ácido necessário para o processo da hidrólise ácida. O bagaço de cana-de-açúcar “*in natura*” foi caracterizado quimicamente seguindo a norma proposta por Klason (ROCHA, 2000). O hidrolisado hemicelulósico foi obtido por hidrólise ácida do bagaço de cana em reator de aço inoxidável AISI 316 com capacidade volumétrica total de 370 L, equipado com camisa de óleo térmico para aquecimento indireto, localizado no departamento de Engenharia Química da EEL-USP. A hidrólise ácida foi efetuada com o objetivo de extrair a xilose presente na fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar.

Inicialmente, para a realização da hidrólise ácida do bagaço de cana-de-açúcar foi feita toda a limpeza e preparo do reator da hidrólise. Foram também testadas todas as válvulas, registros e sistema de aquecimento do reator. Uma vez preparado, o reator foi operado em regime descontínuo empregando-se as seguintes condições de hidrólise: temperatura de 121°C; tempo de reação de 10 minutos; 100 mg de ácido sulfúrico (98%) para 1 g de bagaço (matéria seca) e uma proporção entre massa seca de bagaço e volume de solução ácida de 1:10. Foram realizadas 4 operações de hidrólise obtendo-se aproximadamente 480 L de

hidrolisado, o qual foi então centrifugado em centrífuga industrial para separação de resíduos sólidos constituídos de celulignina. Posteriormente o hidrolisado foi transferido e armazenado em bombonas de 50 L. Em seguida, o mesmo foi submetido á etapa de concentração a vácuo visando aumentar o teor de açúcares, principalmente a xilose. Este processo ocorreu em concentrador a vácuo com 30 L de capacidade nominal operado de forma descontínua. O hidrolisado original foi concentrado pela redução de 1/3, 1/5 e 1/7 de seu volume, o que corresponde ao fator de concentração de 3x, 5x e 7x, respectivamente.

Após a etapa de concentração o hidrolisado foi tratado utilizando a destoxificação química “*overliming*”, conforme metodologia estabelecida por Alves *et al.* (1998). Este procedimento considerou a elevação do pH até 7,0 pela adição de óxido de cálcio (P.A. Sigma) e seguido de redução do pH até 5,5 pela adição de ácido fosfórico (P.A., Sigma). Em seguida, a este foi adicionado 2,5% (m/v) de carvão ativo CDA (Brasilac, Paraná, Brasil) e procedeu-se com agitação em incubadora com movimento rotatório a 200 rpm e 30 °C por 1h (MOHAGHEGHI; RUTH; SCHELL, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2001).

Após cada uma das etapas deste tratamento, o hidrolisado foi filtrado a vácuo em papel de filtro (Ø 18,5cm, Qualy; Brasil) para a remoção dos precipitados formados. Concluídas todas estas etapas, o hidrolisado foi autoclavado a 111°C por 15 minutos. O hidrolisado foi caracterizado durante as diferentes etapas do processo quanto ao valor do pH, e aos teores de glicose, xilose, arabinose, ácido acético e fenóis totais.

4.2 Microorganismo e preparo do inóculo

Em todos os experimentos foi utilizada a linhagem de levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037, descrita por Barbosa *et al.* (1988), proveniente da coleção de culturas do Departamento de Biotecnologia (LOT) da EEL-USP, e mantida em meio ágar extrato de malte. O inóculo foi preparado por cultivo da levedura em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 250 mL de meio sintético composto de 30 g/L de xilose, 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 a obtenção do extrato de farelo de arroz foi preparada uma suspensão deste na proporção de 200g de farelo para cada litro de água. Esta suspensão foi autoclavada por 15 min a temperatura de 111°C. Após resfriamento, o sobrenadante foi separado por centrifugação a 2000Xg por 30 min e utilizado nos ensaios.

4.3 Imobilização das células de *Candida guilliermondii* em alginato de cálcio

As células de *C. guilliermondii* FTI 20037 foram imobilizadas pelo método de aprisionamento em gel de alginato de cálcio. A suspensão celular, obtida conforme descrito no item anterior (4.2) 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 4,0 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 e mantida sob agitação, previamente preparada em água bidestilada e esterilizada a 121°C por 30 min. Para o gotejamento da suspensão celular na solução de cloreto de cálcio, foi empregada uma bomba peristáltica e duas agulhas 19 G (1 ½ polegada), conforme ilustrado na Figura 12.

Figura 12 - Ilustração do equipamento utilizado para a imobilização das células de *Candida guilliermondii* em gel de alginato de cálcio

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.

4.4 Preparo do meio de fermentação

O meio de fermentação foi preparado pela adição de 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 ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar.

4.5 Biorreator de leito fluidizado e condições de fermentação

As fermentações foram conduzidas em biorreator de leito fluidizado adquirido da Bioengineering (Wald, Suíça) marca PID Fermenter AWS, com capacidade nominal de 2.0 L (Figura 13).

A fermentação foi controlada utilizando sensores apropriados no recipiente principal do reator monitorando-se a temperatura, o pH inicial e o oxigênio dissolvido no meio fermentativo. O reator foi alimentado com 2 L de meio de cultivo, formulado conforme item 4.4, e com 300 g de esferas de gel com as células imobilizadas. Em seguida, os parâmetros operacionais do processo, conforme representados no planejamento experimental proposto neste trabalho foram ajustados para uma temperatura de 30 °C e pH inicial de fermentação de 5,5. No início da fermentação, em intervalos de 24 h, adicionou-se benzilpenicilina potássica (Benzecilin 5.000.000 UI, Teuto Brasileiro Ltda) ao meio de fermentação em uma concentração de 1.000.000 UI para o controle de possíveis contaminantes. O término da fermentação foi definido por um consumo de no mínimo 90% do conteúdo inicial de xilose do meio de cultivo.

Figura 13 - Biorreator de leito fluidizado

4.6 Estudo hidrodinâmico do reator de leito fluidizado com células imobilizadas

Inicialmente, realizou-se um estudo das características hidrodinâmicas do biorreator de leito fluidizado visando uma melhor compreensão do seu funcionamento e desempenho. Para este motivo foram avaliadas as variáveis, o coeficiente de arraste ($C_{D,s}$), o número de Reynolds (Re_f) a velocidade terminal ($U_{t,s}$) e a velocidade mínima (U_{mf}) e máxima de fluidização ($U_{max,f}$).

4.6.1 Determinação de coeficiente de arraste ($C_{D,s}$)

Existem três forças que atuam em uma partícula que cai livremente em um líquido infinito. Estas são: a força gravitacional, o empuxo de Arquimedes e a força de arraste do fluido. $C_{D,s}$ representa o coeficiente de arraste para uma partícula suspensa em um líquido e se calcula segundo a Equação 2 (WU *et al.*, 2003)

$$C_{D,s} = \frac{4 * \left(\rho_p - \rho_f \right) g * d_p}{3 \rho_f * U_{t\infty,s}^2} \quad (2)$$

ρ_p = densidade da partícula (g/mL), considerada igual à densidade da água (1,0 g/mL)

ρ_f = densidade do fluido (g/mL)

d_p = diâmetro da partícula (cm)

$U_{t\infty,s}$ = velocidade terminal de uma esfera em um fluido infinito (cm/s).

Fisicamente, este módulo indica a força necessária para manter uma partícula suspensa em um líquido. Em escala industrial, não se consideram os efeitos do cisalhamento das células imobilizadas com as paredes do reator, sendo $U_{t\infty,s} = U_{t,s}$. Por outro lado, em escala de laboratório deve-se levar em consideração estes efeitos. Desta forma, a velocidade terminal corrigida ($U_{t\infty,s}$) relaciona-se com a velocidade terminal aparente ($U_{t,s}$) segundo algumas das equações propostas na literatura consultada como por exemplo a Equação 3 para um regime laminar (WU, *et al.*, 2003):

$$U_{t,s} / U_{t\infty,s} = \left[\frac{1 - dp / D}{1 - 0.475 * dp / D} \right]^4 \quad (3)$$

Onde: D representa o diâmetro do reator (cm).

No presente trabalho, o cálculo da velocidade terminal $U_{t,s}$ foi realizada na zona mediana do reator para evitar possíveis interferências, e os experimentos realizados em triplicata.

4.6.2 Determinação do número do Reynolds

O número adimensional de Reynolds foi calculado segundo a Equação 4 (WU, *et al.*, 2003):

$$Re_f = \frac{\rho_f * U_{t,s} * dp}{\mu_f} \quad (4)$$

“ μ_f ” representa a viscosidade do fluido (g/m.s)

4.6.3 Determinação da velocidade mínima e máxima de fluidização

A velocidade máxima de fluidização U_{mf} foi representada pela velocidade terminal das partículas ($U_{t,s}$) e a velocidade mínima de fluidização (U_f) foi considerada a velocidade mínima necessária para manter suspenso o leito das células imobilizadas. O cálculo da (U_f) foi realizado segundo a Equação empírica 5 (WU *et al.*, (2003):

$$\xi^n = \frac{U_f}{U_{mf}} \quad (5)$$

Onde “n” foi representado pela seguinte Equação experimental 6 para o caso de alginato e PVA como suportes de imobilização, segundo Wu *et al.*, (2003),:

$$n = 3.84 * Re_t^{-0.033} \quad 35 < Re_t < 190 \quad (6)$$

4.7 Estudo da influência das variáveis: vazão de ar, fluxo de fluidização e fator de concentração do hidrolisado utilizando a metodologia de delineamento experimental

As variáveis selecionadas para realizar o estudo de otimização do processo de produção de xilitol em biorreator de leito fluidizado utilizando células imobilizadas foram: vazão de ar (mL/min), fluxo de fluidização (L/h) (fluxo da bomba de reciclo) e fator de concentração do hidrolisado (X vezes). Na Tabela 4 são apresentados os níveis escolhidos para cada variável. O sinal (+) representa o nível máximo; o sinal (-) o nível mínimo e o sinal (0) o ponto central. Foi proposto um planejamento fatorial completo 2^3 com três repetições no

ponto central, conforme apresentado na Tabela 5. Como variáveis de resposta foram consideradas a produtividade volumétrica em xilitol (Q_p em g/L.h) e o fator de conversão de xilose em xilitol ($Y_{p/s}$ em g/g). A otimização do processo em função das variáveis estudadas foi indicada pela análise estatística dos dados obtidos.

Tabela 4 - Codificação dos níveis para as variáveis avaliadas

Variáveis	Níveis		
	Inferior (-)	Médio (0)	Superior (+)
X_1 (vazão de ar, mL/min)	200	600	1000
X_2 (fator de concentração do hidrolisado)	3 vezes	5 vezes	7 vezes
X_3 (fluxo de fluidização, L/h)	19	38	57

Tabela 5 - Matriz do planejamento fatorial 2^3 para avaliação da influência das variáveis: vazão de ar, fator de concentração de hidrolisado e fluxo de fluidização

Ensaio	Níveis codificados			Níveis reais		
	X_1	X_2	X_3	X_1 (mL/min)	X_2 (X vezes)	X_3 (L/h)
1	+	+	+	1000	7	57
2	+	+	-	1000	7	19
3	+	-	+	1000	3	57
4	+	-	-	1000	3	19
5	-	+	-	200	7	19
6	-	+	+	200	7	57
7	-	-	+	200	3	57
8	-	-	-	200	3	19
9	0	0	0	600	5	38
10	0	0	0	600	5	38
11	0	0	0	600	5	38

4.8 Métodos analíticos

Todas as fermentações foram acompanhadas por meio do controle analítico de amostras retiradas periodicamente. As observações foram feitas com relação ao consumo de açúcares (glicose, xilose e arabinose) e ácido acético, à produção de xilitol, ao crescimento

celular (células livres e imobilizadas), à variação de pH e no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio dissolvido (K_{La}). Os resultados foram descritos na forma de Figuras e Tabelas, considerando-se o comportamento da levedura frente às condições experimentais avaliadas.

4.8.1 Determinação da concentração dos açúcares, ácido acético e etanol

A determinação da concentração dos açúcares glicose, xilose e arabinose, bem como do xilitol, ácido acético e etanol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (Cromatógrafo Waters 410, Milford, MA, USA) sendo empregada coluna HPX-87-H (300 x 7.8 mm) (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) mantida a 45 °C e detector de índice de refração RID 6A. Como fase móvel foi utilizado H_2SO_4 0,05 M, fluxo de 0,6 ml/min e volume de amostra injetada de 20 μ L.

As amostras, devidamente diluídas, foram filtradas em filtro *Sep Pak* C18. O eluente, antes do uso, foi filtrado a vácuo em membrana HAWP 0,45 μ m (MILLIPORE) e em seguida degaseificado em banho de ultrasom (Microsonic SX-50) por 30 minutos.

4.8.2 Determinação dos compostos fenólicos totais (inibidores)

A concentração dos compostos fenólicos totais (compostos tóxicos ao mecanismo microbiano) existentes no hidrolisado hemicelulósico devido à solubilização parcial da

lignina, causada pela ação do ácido sulfúrico na etapa de hidrólise, foi determinada pelo método descrito por Rocha (2000). Uma alíquota de 2 mL do hidrolisado obtido foi alcalinizada com NaOH 6 mol/L até pH 12 e diluída em um balão volumétrico de 500 ml. A absorbância desta solução foi analisada usando espectrofotômetro (Beckmam DU 640B, Califórnia, USA), em um comprimento de onda de 280 nm utilizando-se água destilada como referência. A concentração da lignina solúvel foi calculada pela Equação 7:

$$C_{\text{lig}} = 4,187 \times 10^{-2} (A_{\text{lig}280} - A_{\text{pd}280}) - 3,279 \times 10^{-4} \text{ [g/L]} \quad (7)$$

C_{lig} = concentração de lignina em g/L

$A_{\text{lig}280}$ = absorbância a 280 nm

$A_{\text{pd}280}$ = absorbância dos produtos de decomposição dos açúcares (furfural e hidroximetil furfural), cujas concentrações são consideradas ≈ 0 g/L

4.8.3 Determinação das concentrações celulares livres e imobilizadas

A concentração de células livres no meio de fermentação foi determinada pela leitura da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro (BECKMAN DU 640B, Califórnia, USA), e correlacionada com a massa seca de células (g/L) por meio de uma curva de calibração previamente construída. A análise do crescimento celular foi realizada isoladamente, com a concentração de células livres no meio de cultivo (g/L meio) e imobilizada em gel de alginato de cálcio (g/L gel), bem como a concentração celular total (g/L no reator), conforme proposto por Carvalho *et al.*, (2002a).

Para a determinação da concentração celular imobilizada nas esferas de alginato de cálcio, uma amostra de 0,2 g de esferas (pesada em balança analítica), previamente secas em papel toalha, foi dissolvida em solução de citrato de potássio (2%) com o auxílio de um vórtex. Após dissolução, a suspensão contendo as células foi centrifugada a 2000Xg por 15 min. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em água destilada. Esta suspensão foi devidamente diluída em água destilada e quantificada por espectrofotometria.

O número de células imobilizadas viáveis nas esferas de alginato de cálcio foi determinado através da contagem das células na câmara de *Neubauer*. Após a contagem, foram feitas as devidas correções referentes aos fatores de diluição e da câmara. O número de células presentes nesta suspensão foi correlacionado com o volume médio total de esferas dissolvidas e o volume de trabalho do reator, obtendo-se então o valor do número de células imobilizadas, expresso na unidade número de células/mL de reator.

O crescimento celular foi considerado em função do aumento na concentração de células livres no meio de cultivo (X_M) e de células imobilizadas na matriz de alginato de cálcio (X_I), ou como aumento na concentração celular total no reator (X_R), conforme proposto por Carvalho *et al.*, (2003). Para o cálculo da concentração celular total no reator (X_R), foi empregada a Equação 8:

$$V_R \cdot X_R = V_I \cdot X_I + V_M \cdot X_M \quad (8)$$

Onde, V_R representa o volume do reator (L), X_R a concentração celular total no reator (g/L), V_I o volume das partículas de gel (L), X_I a concentração celular nas partículas de gel (g/L), V_M o volume de meio de cultivo (L) e X_M a concentração celular no meio de cultivo (g/L).

A concentração de células livres no meio de fermentação (X_M) e a concentração de células imobilizadas nas partículas de alginato de cálcio (X_I) foram relacionadas ao volume de trabalho do reator (V_R) segundo as Equações 9 e 10:

$$X_{RM} = \left[X_M V_M / V_R \right] \quad (9)$$

$$X_{RI} = \left[X_I V_I / V_R \right] \quad (10)$$

Onde, X_{RM} representa a concentração de células livres no reator (g/L) e X_{RI} é a concentração de células imobilizadas no reator (g/L). Sendo assim, a soma das concentrações celulares livres e imobilizadas no meio, expressadas em volume de reator, forneceu a concentração celular total em relação ao volume de reator (X_R), conforme a Equação 11:

$$X_R = X_{RM} + X_{RI} \quad (11)$$

4.8.4 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La})

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) foi determinado pela metodologia do “*gassing-out*”. Antes da adição das partículas de gel com as células imobilizadas ao biorreator, o oxigênio no meio de cultivo foi removido por borbulhamento de gás nitrogênio até que a concentração de oxigênio dissolvido fosse reduzida a zero. Foi procedida a aeração e a fluidização do meio, e o aumento na concentração de oxigênio

dissolvido foi monitorado ao longo do tempo através de um eletrodo de oxigênio (Mettler Toledo, modelo InPro6100/220/S/N – PN 52200117), previamente calibrado de acordo com manual do fabricante. Por integração da equação de balanço de oxigênio no meio líquido (Equação 12) foi possível obter a relação apresentada na Equação 13:

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) \quad (12)$$

$$\ln\left(1 - \frac{C}{C^*}\right) = -k_L a \times t \quad (13)$$

C/C^* corresponde à leitura do eletrodo (fração da concentração de O_2 dissolvido em relação à concentração de saturação).

O gráfico do logaritmo de $\left(1 - \frac{C}{C^*}\right)$ em função do tempo permitiu determinar o valor de $K_L a$ em h^{-1} .

4.8.5. Parâmetros de bioconversão xilose-xilitol

a) *Fator de rendimento em xilitol ($Y_{P/S}$, em g/g)*

O fator de rendimento em xilitol foi determinado pela relação entre a quantidade de xilitol produzido e a correspondente variação de xilose.

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{(P_f - P_i)}{(S_i - S_f)} \quad (14)$$

Onde:

$Y_{P/S}$ = fator de rendimento em xilitol (g/g)

P_f = concentração final de xilitol (g/L)

P_i = concentração inicial de xilitol (g/L)

S_f = concentração final de xilose (g/L)

S_i = concentração inicial de xilose (g/L)

b) *Produtividade volumétrica em xilitol (Q_P , em g/L.h)*

Foi determinada pela razão entre a quantidade de xilitol produzida e o intervalo do tempo correspondente.

$$Q_P = \frac{(P_f - P_i)}{\Delta t} \quad (15)$$

Q_P = produtividade volumétrica em xilitol (g/L.h)

Δt = intervalo de tempo da fermentação (h)

c) *Eficiência de conversão de xilose em xilitol ($\eta\%$)*

Foi determinada pela razão entre o fator de rendimento observado ($Y_{P/S}$) e o fator de conversão teórico determinado por Barbosa *et al.* (1988) para a levedura estudada.

$$\eta = \frac{(Y_{P/S} \text{ observado})}{(Y_{P/S} \text{ teórico})} \times 100 \quad (16)$$

η = eficiência de conversão (%)

$Y_{P/S}$ teórico = 0,917 g xilitol / g xilose consumida

d) *Percentual de consumo de xilose ($Y\%$)*

O percentual de consumo de xilose foi determinado pela relação entre o conteúdo de xilose consumida em determinado instante e o conteúdo inicial de xilose.

$$Y = \frac{(S_i - S_f)}{S_i} \times 100 \quad (17)$$

S_f = concentração final de xilose (g/L)

S_i = concentração inicial de xilose (g/L).

5 ANÁLISE TÉCNICO- ECONÔMICA DO PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA A PRODUÇÃO DE XILITOL

A realização da análise econômica de uma planta de produção é um fator fundamental na determinação da viabilidade de um investimento. Para este fim, foram levantados dados econômicos de todos os equipamentos e insumos necessários para o processo biotecnológico de produção de xilitol a partir de bagaço de cana de açúcar.

Neste trabalho foi calculado o custo total de produção de xilitol por via biotecnológica em nível de planta piloto com capacidade de processar 1 tonelada de bagaço por dia. Os cálculos dos custos levaram em consideração o *Valor do Capital Fixo de Investimento* (custos diretos e indiretos) e o *Custo Total de Investimento* (somatório dos gastos na produção aos gastos em equipamentos e instalação), conforme mostrado nas Equações, 18 e 19 (BORDEAUX-RÊGO *et al.*, 2008). A Taxa Interna de Retorno (TIR) e o *PayBack* também foram calculados e apresentados em gráfico utilizando planilhas especializadas elaboradas em programa *Excel*

$$\text{Capital Total de Investimento} = \text{Capital Fixo de Investimento} + \text{Capital de Produção} \quad (18)$$

$$\text{Capital Fixo de Investimento} = \text{Custos Diretos} + \text{Custos Indiretos} \quad (19)$$

As Tabelas 6, 7 e 8, apresentam os modelos de cálculo de custos, utilizados neste trabalho, para o estudo da viabilidade econômica do processo de produção de xilitol.

Tabela 6 – Planilha utilizada para o cálculo do capital fixo de investimento

Item	Unidades	*Custo (R\$)
Fermentador		
Reator de Hidrólise		
Concentrador		
pHmetro		
Balança analítica		
Refrigerador/Congelador		
Centrífuga refrigerada		
Espectrofotômetro		
HPLC		
Bombas		
Tanques		
Custo Total de Equipamentos		

**No cálculo do custo final de cada equipamento são considerados as taxas dos impostos (ICMS, PIS e CONFINS)*

Tabela 7 – Planilha utilizada para o cálculo do custo de produção de xilitol

Custos de Produção	*Quantidade	Preço (R\$)	Custo Anual (R\$)	**Gastos totais por Batelada
Custos Diretos				
Bagaço de cana				
Xilose				
Nutrientes				
Cal				
Alginato de sódio				
Eletricidade				
Material Plástico				
Vidraria				
Custos Indiretos				
Depreciação				
Impostos				
Taxas				
Total				

**Quantidade referente 12 meses*

***No cálculo dos gastos totais são consideradas as taxas dos impostos (ICMS, PIS e CONFINS)*

Tabela 8 – Planilha utilizada para apresentar os resultados dos cálculos do fluxo de caixa do processo de produção de xilitol

Dados Econômicos	Valores
PayBack (retorno do capital)	
TIR (Taxa Interna de Retorno) ao ano	
Valor Presente Líquido	
Produção Anual - Litros de Xarope	
Custo do Xilitol Líquido - R\$ / Litro	
Venda Líquida (Net Sale) - R\$ / Litro	
Valor Total de venda (R \$) – Mercado Interno	
Margem de Contribuição %	

6. METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados obtidos foram analisados por meio dos cálculos da porcentagem de consumo de substrato, da produção de xilitol e das produtividades volumétricas. Os valores de concentração de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, etanol, xilitol, células livres, células imobilizadas, e pH foram dispostos em gráficos ou tabelas convenientes para análise do comportamento destas variáveis durante a fermentação. O mesmo foi feito quanto à eficiência de conversão de xilose a xilitol, a qual foi calculada ao final de cada fermentação e analisada sua relação com os parâmetros fermentativos de produção de xilitol.

A análise dos testes estatísticos foi realizada utilizando-se o programa *Statgraphics Centurion XV*, considerando como variáveis de resposta a produtividade volumétrica (Q_p , g xilitol/L.h e fator de rendimento de xilose em xilitol (Y_p/s , g xilitol/g xilose). Os resultados foram expressos em Tabelas de estimativas de efeitos, erros-padrão (teste t de *Student's*), análise de variância e nível de significância (p) além das figuras para a representação dos efeitos principais das variáveis estudadas. Modelos foram determinados pelo método dos mínimos quadrados aplicado aos resultados experimentais obtidos no planejamento fatorial completo. Para os cálculos dos custos do processo de produção de xilitol foi utilizado um programa especializado de análise de custos elaborado em Planilhas de *Excel*. Os resultados foram apresentados em Tabelas e Figuras.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Características hidrodinâmicas do reator de leito fluidizado com células imobilizadas em alginato de cálcio

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos do cálculo dos parâmetros hidrodinâmicos do reator de leito fluidizado utilizando células imobilizadas em alginato de cálcio. Estes parâmetros são representados por, o coeficiente de arraste ($C_{D,s}$) das partículas imobilizadas, o número de Reynolds (Re_t), a densidade aparente da partículas (ρ_f) e a velocidade terminal corrigida ($U_{t\infty,s}$) para cada diâmetro de partícula (d_p).

Ressalta-se que a velocidade terminal ($U_{t,s}$) foi calculada na zona mediana do reator para evitar possíveis interferências, por meio do cálculo do tempo que uma partícula necessita para percorrer verticalmente uma distância determinada (cm/s).

Tabela 9 - Propriedades hidrodinâmicas do reator de leito fluidizado com células imobilizadas

Parâmetros hidrodinâmicos	d_p (cm)	$U_{t\infty,s}$ (cm/s)	$U_{t,s}$ (cm/s)	$C_{D,s}$	Re_t	ρ_f (g/mL)
	0,22	2,13	1,94	1,58	42,7	1,00
	0,28	2,23	1,98	1,84	55,5	1,00
	0,25	2,24	2,02	1,62	50,4	1,00
	0,21	2,16	1,98	1,47	41,6	1,00
	0,23	2,19	1,99	1,56	45,7	1,00
	0,28	2,17	1,93	1,94	54,0	1,00
	0,27	2,25	2,01	1,74	54,2	1,00
	0,22	2,07	1,89	1,67	41,5	1,00
	0,22	2,15	1,96	1,55	43,1	1,00
	0,25	2,30	2,07	1,54	51,8	1,00
Valor médio	0,24	2,19	1,98	1,658	48,0	1,00

Segundo os resultados da Figura 14, observa-se a existência de duas zonas diferenciadas no sistema de imobilização com alginato de cálcio, uma zona compactada ($\xi < 0,57$) e outra fluidizada ($\xi \geq 0,57$).

Figura 14 - Relação entre a velocidade mínima de fluidização e a porosidade do leito

Observa-se ainda que, trabalhando com velocidades baixas de fluxo de fluidização ($< 0,38$ cm/s) o leito permaneceu compacto o sistema se comportou como um leito fixo ou compactado. Sendo assim verifica-se que, para que se obter um leito de células imobilizadas em alginato de cálcio adequadamente fluidizado no reator foram necessárias uma porosidade mínima (ξ) de 0,57 e uma velocidade mínima de fluidização ($U_f \geq 0,38$ cm/s), o que corresponde a um fluxo de fluidização de 30 L/h (Figura 14).

Ressalta-se que as células imobilizadas em alginato apresentaram menor velocidade mínima de fluidização (0,38 cm/s) que em outros suportes de imobilização de maior densidade, como por exemplo, zeólita (2,3 cm/s) e vidro poroso (2,3 cm/s) (SANTOS, 2005). Deve ressaltar que a densidade do alginato de cálcio é semelhante com a água uma vez que a maior parte destes suportes de imobilização é formada por água. (CARVALHO, 2000).

7.2 Caracterização do hidrolisado antes e após as etapas de concentração, tratamento e autoclavagem

O bagaço de cana-de-açúcar “*in natura*” foi caracterizado quanto a sua composição química expressa em hemicelulose (xilana), celulose (glucana), lignina, extrativos e cinza, de acordo com a metodologia proposta por Rocha, (2000). A Tabela 10 apresenta a composição química do bagaço de cana-de-açúcar utilizado no presente trabalho.

Tabela 10 - Composição química do bagaço de cana-de-açúcar “*in natura*”

Componentes	% Composição
Hemicelulose (Xilana)	25,8
Celulose (Glucana)	42,8
Lignina	22,1
Extrativos	6,1
Cinza	1,4
Total	98,2

Todos os hidrolisados (original, concentrado e tratado), obtidos nas diferentes etapa do processo foram caracterizados quanto ao pH, concentrações de xilose, glicose, arabinose, ácido acético, e compostos fenólicos. Os resultados referentes à caracterização química dos hidrolisados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 - Valores das concentrações (g/L) de açúcares e compostos fenólicos no hidrolisado hemicelulósico original e concentrado de bagaço de cana-de-açúcar.

Componentes	Hidrolisado (g/L)			
	Original	Concentrado 3X	Concentrado 5X	Concentrado 7X
Glicose	1,6	4,2	5,3	8,5
Xilose	19,4	53,5	77,0	115,0
Arabinose	1,8	5,0	6,2	9,5
Ácido Acético	3,0	4,6	6,5	9,1
Compostos Fenólicos	3,8	7,7	11,7	14,7
pH	1,1	0,7	0,5	0,4

De acordo com a Tabela 11, as condições de hidrólise empregadas promoveram um hidrolisado rico em xilose (19,4 g/L) e com baixa concentração de glicose (1,6 g/L), demonstrando uma extração seletiva da fração hemicelulósica do bagaço. Valores similares de concentrações de xilose e glicose em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar foram encontrados por Cunha (2006), Santos (2005), Carvalho (2000) e Morita e Silva (2000) empregando o mesmo tratamento de hidrólise. Segundo estes resultados, observou-se que a hemicelulose foi susceptível á hidrólise nas condições utilizadas, permanecendo a celulose sem considerável degradação. Tal observação esta de acordo com o esperado, uma vez que dados da literatura indicam que o processo da hidrólise ácida mostra-se mais eficiente para a obtenção de xilose a partir da fração hemicelulósica para uso como fonte de carbono em processos fermentativos (SAHA, 2005; KNAUF; MONIRUZZAMAN, 2004).

No hidrolisado concentrado e tratado foi observada uma concentração de 4,0 a 5,5 g/L de glicose, a qual corresponde a 6% do conteúdo de xilose presente no mesmo e uma relação xilose/glicose de 17. Uma baixa concentração de glicose em relação á xilose é desejada para a bioconversão de xilose em xilitol, uma vez que a glicose é metabolizada preferencialmente pelo microrganismo (SILVA *et al.*, 2007). De acordo com Felipe *et al.* (1993) níveis de glicose abaixo de 10% do total da xilose não afetam a produção de xilitol.

Além de xilose e outros açúcares, diversos compostos podem ser encontrados em hidrolisados hemicelulósicos de resíduos agrícolas obtidos por hidrólise ácida, como por exemplo, o ácido acético obtido da liberação do grupo acetil ligados á estrutura hemicelulósica do bagaço e compostos fenólicos obtidos da solubilização parcial da lignina, causada pela ação do ácido (RODRIGUES *et al.*, 2001).

Estudos realizados em nossos laboratórios comprovaram que a presença do ácido acético em altas concentrações (superiores a 6,0 g/L) exerce um efeito negativo na produção de xilitol pela levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 (CARVALHO, 2000).

No hidrolisado concentrado (Tabela 11), foi verificado aumento proporcional nos teores dos açúcares (xilose, glicose, arabinose). Entretanto, o mesmo comportamento não foi observado em relação às concentrações de ácido acético e compostos fenólicos. Os teores de ácido acético e compostos fenólicos aumentaram após a etapa de concentração, mas de forma não proporcional ao fator de concentração (Tabela 11). Isto ocorreu possivelmente devido à volatilização destes compostos durante o processo de concentração a 70 °C sob pressão reduzida. Este comportamento também é relatado por Cunha (2006), Matos (2004) e Rodrigues *et al.* (2001), em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar concentrado em condições semelhantes. Segundo Parajó, Dominguez e Dominguez. (1998c), a evaporação permite a redução na quantidade de diversos compostos voláteis, sendo possível a remoção de até 50 % do ácido acético presente. Entretanto, verificou-se que a diminuição do pH do hidrolisado ocorreu proporcionalmente ao fator de concentração, sendo que, quando o hidrolisado foi concentrado por um fator igual a 5x e 7x, o pH variou de 1,1 para 0,5 e 0,4 respectivamente (Tabela 11). Tal comportamento foi justificado no trabalho de Correa *et al.* (1995), no qual os autores relacionaram o decréscimo do pH do hidrolisado após a etapa de concentração com o aumento da concentração de íons H^+ provenientes do ácido sulfúrico utilizado como catalisador durante a hidrólise.

7.3 Tratamento químico do hidrolisado concentrado (processo *overliming*)

Segundos os resultados apresentados nas Tabelas 11 e 12, observou-se que as perdas nos teores de xilose no hidrolisado na etapa de tratamento foram de 5 % para o hidrolisado 3 vezes concentrado, de 10,4 % para o hidrolisado 5 vezes concentrado e de 16 %

para o hidrolisado 7 vezes concentrado. Estas perdas podem ter ocorrido em função de prováveis arrastes da xilose durante a etapa de tratamento químico para a remoção de compostos inibidores do metabolismo microbiano, uma vez que houve mudanças de pH e intensa formação de precipitados, os quais foram removidos por filtração. Observou-se também que houve perda de 20%, 40% e 50 % no volume final dos hidrolisados tratados e concentrados (3X, 5X e 7X, respectivamente).

Tabela 12 - Valores das concentrações (g/L) de açúcares, ácido acético e compostos fenólicos no hidrolisado hemicelulósico concentrado após a etapa de tratamento

Componentes	Hidrolisado Tratado (g/L)		
	Concentrado 3X	Concentrado 5X	Concentrado 7X
Glicose	3,9	4,9	5,5
Xilose	50,0	69,0	96,5
Arabinose	5,0	6,8	5,8
Ácido Acético	1,9	3,2	2,7
Compostos Fenólicos	0,6	0,9	1,2
pH	5,5	5,5	5,5

Alves (1997), empregando tratamento de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana concentrado 3 vezes, com as mesmas condições de tratamento empregadas neste trabalho, aliado à adição de 3 % de carvão ativo, relatou perdas nos teores de glicose (9,3 %), xilose (4,8 %) e arabinose (5,1 %) devido ao tratamento empregado. Do mesmo modo, Santos (2005), utilizando o mesmo tratamento observou perdas nos teores de xilose de 11 %, 9,5 % e 12 % para o hidrolisado concentrado 3,5 vezes, 4,25 vezes e 5 vezes, respectivamente. Por outro lado, Cunha (2006), obteve uma redução de 6,8% no teor de xilose, enquanto perdas superiores desta pentose foram relatadas por Marton, Felipe e Pessoa (2003) de 15,5% e por Carvalho (2000) de 13% no tratamento de hidrolisado concentrado 5 vezes.

Apesar da desvantagem relacionada à perda no volume do hidrolisado e no teor da xilose inicial usando este tipo de tratamento químico, deve-se destacar que trabalhos da literatura relatam a eficiência deste processo na remoção de compostos tóxicos por

precipitação, os quais podem então ser facilmente removidos por filtração (MOHAGHEGHI; RUTH; SCHELL, 2006; ALVES *et al.*, 1998).

7.4 Determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_La) para as diferentes condições utilizadas nas fermentações realizadas

A Tabela 13 apresenta os resultados obtidos dos valores de K_La nas 11 condições de fermentações realizadas, segundo o planejamento estatístico proposto neste trabalho.

Tabela 13 - Avaliação do K_La para diferentes condições de aeração (X_1), concentração do hidrolisado (X_2) e fluxo de fluidização (X_3)

Ensaio	X_1 (mL/min)	X_2 (Xvezes)	X_3 (L/h)	K_La (h ⁻¹)
1	1000	7	57	23
2	1000	7	19	22
3	1000	3	57	12
4	200	7	57	6
5	200	3	57	4
6	200	3	19	3
7	600	5	38	7
8	1000	3	19	11
9	200	7	19	5
10	600	5	38	6
11	600	5	38	7

Segundo os resultados apresentados na Tabela 13, um aumento na vazão de ar resultou em elevados valores de K_La (ensaio 1 e 2) devido a uma maior área de contato ar-líquido e diminuição na espessura da película estagnada da fase líquida levando a um aumento do coeficiente de transferência de massa da fase líquida (K_L) e conseqüentemente uma maior transferência de oxigênio no meio (K_La), segundo observações descritas por Schmidell

(2001). Por outro lado, valores baixos de K_{La} foram observados a uma baixa vazão de 200 mL/min (ensaios 4, 5, 6 e 9) devido ao menor volume de ar disponível no meio fermentado. Constatou-se também que nos ensaios fermentativos 1 e 3, usando-se as mesmas condições de aeração e fluxo de fluidização, mas diferentes concentrações de substrato, obteve-se diferentes valores de K_{La} (ensaio 1 de 23 h^{-1} e ensaio 3 de 12 h^{-1} , respectivamente). Esta variação foi, possivelmente à alteração da constante de Henry para cada concentração de substrato no meio de fermentação, conforme relatado por Osbek e Gayik (2001).

Segundo Santos (2005) a transferência de oxigênio em biorreator de leito fluidizado foi influenciada pelo fluxo de recirculação do meio. Este parâmetro ocasiona uma melhor fluidização do leito no biorreator e como consequência, melhora a transferência e disponibilidade do oxigênio no meio para as células imobilizadas, resultando no aumento da conversão de xilose a xilitol. Desta forma, também foi avaliada a influência do fluxo de fluidização sobre os valores obtidos do K_{La} para todas as 11 condições de fermentação realizadas.

Segundo os resultados apresentados na Tabela 13 observou-se que, trabalhando com diferentes fluxos de fluidização (57 L/h e 19 L/h) e mantendo a vazão de ar constante (1000 mL/min), houve um aumento nos valores de K_{La} obtidos experimentalmente (ensaios 1 e 2, 5 e 6, 3 e 8). Este aumento nos valores do K_{La} foi devido a melhor transferência e disponibilidade de oxigênio no meio fermentativo causada pelo aumento no fluxo de fluidização do biorreator. Deve-se ressaltar que o processo biotecnológico para a produção de xilitol é um processo microaeróbico. Desta forma, uma pequena variação na quantidade de oxigênio fornecido ao meio pode influenciar significativamente o rendimento e a produtividade do processo, uma vez que este é um fator limitante na produção de xilitol (SANTOS 2005; CUNHA 2006; CARVALHO *et al.*, 2004).

7.5 Avaliação dos ensaios fermentativos em função das diferentes condições experimentais estudadas

A Tabela 14 apresenta os resultados obtidos em relação as variáveis de resposta, fator de rendimento em xilitol ($Y_{p/s}$) e produtividade volumétrica do processo em xilitol (Q_p), nas diferentes fermentações realizadas de acordo com o planejamento fatorial 2^3 completo com três pontos centrais proposto neste trabalho.

Tabela 14 - Resultados das fermentações realizadas segundo a matriz do planejamento fatorial 2^3 completo com 3 pontos centrais

Ensaio	Níveis reais			Resultados	
	X_1 (mL/min)	X_2 (Xvezes)	X_3 (L/h)	$^aY_{p/s}$ (g xilitol/ g xilose)	bQ_p (g/L.h)
1	1000	7	57	0,54	0,35
2	1000	7	19	0,65	0,27
3	1000	3	57	0,61	0,45
4	200	7	57	0,50	0,45
5	200	3	57	0,78	0,37
6	200	3	19	0,63	0,19
7	600	5	38	0,75	0,46
8	1000	3	19	0,50	0,20
9	200	7	19	0,50	0,26
10	600	5	38	0,77	0,43
11	600	5	38	0,70	0,35

$^aY_{p/s}$: fator de conversão xilose-xilitol (g xilitol/g xilose), bQ_p : produtividade volumétrica em xilitol (g/L.h).

De acordo com os resultados da Tabela 14, observa-se que houve uma variação significativa nos valores de $Y_{p/s}$ obtidos (0,5 a 0,78 g xilitol/ g xilose) nos 11 ensaios fermentativos realizados. Os ensaios 5, 7 e 11 apresentaram um fator de rendimento em xilitol maior que 70 % apesar de serem conduzidos em diferentes condições de fermentação. No caso do ensaio 5, apesar da baixa aeração (200 mL/min) usada, o seu elevado fator de rendimento de 0,78 g xilitol/g xilose é relacionado primeiramente ao baixo fator de concentração do açúcar (3x), o que levou provavelmente a uma menor pressão osmótica

exercida pelo substrato sobre a parede celular resultando em um maior rendimento na bioconversão xilose-xilitol (LIU; LIU; ZHONG, 2006). O mesmo comportamento foi observado nos resultados do ensaio 4, onde usando as mesmas condições de aeração e fluidização do ensaio 5 mas com um maior fator de concentração (7x), obteve-se um menor fator de rendimento (0,5 g xilitol/g xilose), conforme a Tabela 14.

Outro fator que justifica o alto fator de rendimento observado no ensaio 5 (Tabela 14) é o elevado fluxo de fluidização (57 L/h) utilizado em comparação aos outros ensaios (19 L/h e 38 L/h), o que permitiu uma melhor transferência de oxigênio no meio fermentativo e, conseqüentemente, uma alta conversão de xilose em xilitol. Tal fato comprova a validade dos resultados do K_La (Tabela 13), no qual o aumento no fluxo de fluidização resultou em um aumento no valor deste coeficiente.

Nos ensaios 1, 2, 3 e 8 nos quais a taxa de aeração empregada foi de 1000 mL/min, observou-se um baixo rendimento do processo (0,5 g/L – 0,65 g/L) (Tabela 14). Este resultado indica que possivelmente em condições de elevada aeração, ocorre uma maior produção do cofator NAD⁺, favorecendo o acúmulo da enzima xilitol desidrogenase o que permite o desvio do metabolismo microbiano para a produção de células em detrimento da formação de xilitol (BRANCO *et al.*, 2008).

Quanto à produtividade volumétrica, observaram variações significativas para os 11 ensaios realizados (0,19 a 0,46 g xilitol/L.h). Altos valores de Q_p (0,45 g xilitol/L.h) foram obtidos nos ensaios 3 e 4, caracterizados pelo uso de alto fluxo de fluidização (56 mL/min). No caso dos ensaios 7 e 10, considerados como pontos centrais conforme proposto no planejamento fatorial, a alta produtividade do processo (0,46 g/L.h) e rendimento (0,76 g/g) é devido às condições ideais empregadas de aeração, agitação e fluxo de fluidização que favoreceram o metabolismo microbiano para a produção de xilitol. As Tabelas 15 e 16

apresentaram os resultados da caracterização do meio inicial e final das fermentações realizadas.

Tabela 15 - Caracterização inicial do meio de fermentação (tempo 0h) em relação á concentração inicial de açúcares, de ácido acético, de compostos fenólicos, de células livres e de número de células imobilizadas viáveis

Ensaio	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Compostos Fenólicos (g/L)	Células imobilizadas X _{RI} (g/L)	Número de células imobilizadas viáveis (cels/mL)
1 ^a	88,3	6,7	8,7	3,6	1,1	2,3	2,2×10 ¹⁰
2 ^a	82,4	7,9	7,4	5,1	1,3	2,1	1,6×10 ¹⁰
3 ^b	37,3	3,6	2,9	3,0	0,6	2,1	1,8×10 ¹⁰
4 ^a	90,2	11,0	9,6	5,4	1,1	1,8	5,8×10 ⁰⁹
5 ^b	38,2	4,2	3,5	3,0	0,5	1,8	1,3×10 ¹⁰
6 ^b	39,8	3,8	3,3	3,4	0,6	1,6	1,1×10 ¹⁰
7 ^c	61,0	6,0	5,4	5,0	0,9	2,0	1,9×10 ¹⁰
8 ^b	39,0	5,6	2,8	3,4	1,0	1,8	1,2×10 ¹⁰
9 ^a	93,0	7,6	5,5	6,0	1,3	1,8	6,0×10 ⁹
10 ^c	56,5	5,6	3,7	5,2	1,1	1,7	1,1×10 ¹⁰
11 ^c	57,0	5,0	4,0	4,0	0,9	1,7	1,1×10 ¹⁰

^a7x concentrado, ^b3x concentrado, ^c5x concentrado

Tabela 16 - Caracterização final do meio fermentado em relação á produção de xilitol e ao consumo da xilose, glicose, arabinose e de ácido acético nos 11 ensaios de fermentação

Ensaio	Tempo de fermentação (h)	Xilose residual (g/L)	Xilitol (g/L)	Consumo de xilose (%)	Consumo de ácido acético (%)	Consumo de Glicose (%)	Consumo de Arabinose (%)
1 ^a	96	5,0	41,5	80,0	100	100	5,2
2 ^a	188	5,3	50,5	93,6	100	100	16,5
3 ^b	48	2,1	21,6	94,4	73	100	17,5
4 ^a	96	4,5	43,2	95,0	78,2	100	38,8
5 ^b	72	3,9	26,8	89,0	50,0	100	12,6
6 ^b	120	4,7	23,0	88,2	56,3	100	16,4
7 ^c	96	2,2	44,0	81,8	82,4	88,4	3,9
8 ^b	96	1,2	18,6	98,0	100	100	28,0
9 ^a	168	3,5	44,0	96,0	100	100	66,6
10 ^c	96	3,5	40,6	94,0	100	100	24,3
11 ^c	120	3,6	37,0	94,0	100	100	17,0

^a7x concentrado, ^b3x concentrado, ^c5x concentrado

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 16, a glicose foi consumida rapidamente em todos os ensaios realizados, uma vez que não foi detectada a presença deste açúcar no meio de fermentação após 48 h (Figura 15). Resultados semelhantes foram obtidos por Cunha (2006), Santos (2005) e Carvalho (2000), trabalhando com células imobilizadas em suportes de álcool polivinílico (PVA-Lentikats), vidro poroso e alginato de cálcio, respectivamente.

Figura 15 – Variação da concentração de glicose em função do tempo para os ensaios realizados

Deve ressaltar-se que o tempo de consumo de glicose pode variar dependendo da concentração inicial deste açúcar no hidrolisado hemicelulósico. Em outro trabalho Lee, Ryu E Seo (1996), observaram que, em meio contendo 20 g/L de glicose e 20 g/L de xilose, a utilização de glicose foi rápida (consumo completo nas primeiras 24h) e este ocorreu desde o início da fermentação, enquanto a utilização de xilose foi precedida por uma fase “lag”, começando a ser consumida somente quando em pequenas concentrações de glicose no meio.

O consumo preferencial de glicose sobre a xilose por leveduras tem sido relatado também por Tavares *et al.* (2000). Estes autores atribuíram esse fato à repressão exercida por

este açúcar sobre as atividades das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase (fundamentais no metabolismo de xilose).

Nos ensaios realizados verificou-se também que a arabinose, outra pentose, presente no hidrolisado, foi utilizada parcialmente pela levedura. Observou-se um consumo baixo deste açúcar, nas primeiras 24 h horas da fermentação. Este consumo foi de apenas 10 %, sendo este valor aumentado para 38% (ensaio 3) após 72 h de fermentação (Figura 16).

Alves (1997) relatou um comportamento semelhante, no qual após 45 h de fermentação foi observado um consumo mínimo de arabinose (8 %), sendo o consumo máximo (45 %) observado no tempo de 63 h.

Figura 16 – Variação da concentração de arabinose em função do tempo para os ensaios realizados

Observou-se ainda que, no ensaio 9 houve uma queda significativa na concentração de arabinose após 168 h de fermentação, indicando um aumento na velocidade de consumo deste açúcar pela levedura. Tal comportamento pode ser explicado em função do esgotamento da xilose, onde a levedura em virtude das condições estressantes de cultivo utilizou a arabinose como fonte de carbono. Segundo Cunha (2006), trabalhando também em sistemas com células

imobilizadas, a arabinose passou a ser melhor assimilada a partir de 48 h de fermentação. Neste tempo, 41 % da concentração de xilose haviam sido consumidas, sendo observado consumo de 16% da concentração de arabinose neste período e de 32,4% após 72 h de fermentação. Isto confirma que as células foram capazes de metabolizar a arabinose mais rapidamente quando a xilose estava em menores concentrações. Resultados semelhantes foram obtidos por Gírio *et al.*, (2000), os quais observaram que a velocidade de consumo de arabinose era consideravelmente menor que a de consumo de xilose, só aumentando após consumo quase total da xilose presente. Os mesmos autores relataram que a assimilação de arabinose foi totalmente reprimida na presença de xilose, quando a relação entre as concentrações das mesmas foi de 4,0. Nesta situação, a arabinose só começou a ser consumida pelas células após o nível de xilose no meio diminuir de 50 g/L para 20 g/L. Sendo assim, os resultados experimentais sugerem a existência de um efeito de repressão catabólica da xilose sobre a arabinose.

Na Figura 17 observou-se que a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 utilizou quase toda a xilose presente no hidrolisado em todos os ensaios e a Figura 18 mostrou que esta utilização ocorreu de forma eficiente com relação à produção de xilitol.

Figura 17 – Variação da concentração de xilose em função do tempo para os ensaios realizados

De acordo com os dados apresentados na Tabela 16 e Figura 17, observou-se um consumo de xilose da ordem de 90 % em todos os ensaios ao final de cada fermentação. Observou-se também, que a velocidade de consumo de xilose foi diretamente proporcional à vazão de alimentação de ar, sendo este açúcar quase completamente consumido pela levedura após 48 h para o ensaio 3, quando foi utilizada a vazão de ar de 1000 mL/min ($K_L a$ de 12 h⁻¹). Por outro lado, quando a vazão de aeração utilizada foi de 200 mL/min, restavam ainda no meio cerca de 60% da concentração de xilose inicial após 72 h de fermentação no caso do ensaio 6 (Tabelas 14 e 16).

Este mesmo comportamento em relação ao consumo de xilose foi também observado, no trabalho de Santos (2005). Segundo este autor, trabalhando com *Candida guilliermondii* imobilizada em zeólita em um biorreator de leito fluidizado, a xilose foi quase completamente consumida em 72h e 48h de fermentação quando foram utilizadas as vazões de ar de 70 e 140 mL/min, respectivamente. Por outro lado, quando a vazão utilizada foi de 25 mL/min, apenas 60% da xilose inicial foi consumida após 72h de fermentação.

Segundo Branco *et al.*, (2008), a influência da aeração está relacionada com o nível das enzimas xilose redutase e a xilitol desidrogenase, como no caso da levedura *Candida guilliermondii*. Observações similares foram feitas por Carvalho *et al.*, (2002c), onde os autores relataram que baixas aerações podem causar um desbalanço no potencial redox da célula, devido à elevação na concentração de NADH, forçando a paralisação do metabolismo celular, o que foi evidenciado pelo baixo consumo de açúcares. Por outro lado, condições de elevada aeração favorecem o consumo de xilose, uma vez que uma maior atividade da cadeia respiratória possibilita a regeneração dos cofatores necessários para o metabolismo desta pentose (BRANCO *et al.*, 2008).

Conforme a Figura 18, a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 foi capaz de produzir xilitol a partir da xilose presente no hidrolisado em todos os ensaios. As

concentrações deste póliol ao final das fermentações foram compreendidas entre valores de 21,0 a 50,0 g/L (Tabela 16 e Figura 18).

Figura 18 – Produção de xilitol em função do tempo para os ensaios realizados

Observou-se que, em alguns ensaios (1 e 5) a levedura utilizada passou a consumir o xilitol presente no meio de fermentação, uma vez que as concentrações deste póliol foram reduzidas com intensidades variadas (Figura 18). Este fato provavelmente está relacionado à diminuição das concentrações de xilose para valores muito baixas, o que determinou não só a utilização do xilitol presente como fonte de carbono e energia pelas células, mas também um aumento no consumo da arabinose presente.

Com relação ao ácido acético, verifica-se na Figura 19 que a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 assimilou integralmente este ácido presente no hidrolisado em todos os ensaios realizados. O percentual de consumo do ácido acético parece estar relacionado às condições de aeração e crescimento celular. Em uma aeração de 1000 mL/min ($K_L a$ 23 h⁻¹) o ácido acético foi consumido em 96 h (ensaio 1) enquanto que a uma aeração de 200 mL/min ($K_L a$ 6 h⁻¹) o consumo do ácido acético em 96 h foi de 75% (ensaio 4). Observou-se também

que o percentual de consumo de ácido acético variou entre 50 e 100 % para todos os 11 ensaios realizados (Tabela 16 e Figura 19).

Figura 19 – Variação da concentração de ácido acético em função do tempo para os ensaios realizados

Van Zyl *et al.*, (1991), trabalhando com a levedura *Pichia stipitis*, observaram um alto consumo do ácido acético sob condições aeróbicas, sendo que, quando condições de limitação de oxigênio foram utilizadas, o consumo deste ácido ocorreu em menor extensão, diferentemente de quando utilizadas em condições de anaerobiose.

O consumo mais rápido de ácido acético pela levedura sob condições de maior aeração pode ser vantajoso ao processo, reduzindo a quantidade da forma não dissociada do ácido, a qual foi responsável pela sua toxicidade (PARAJÓ; DOMINGUEZ; DOMINGUEZ, 1998b). Este efeito, entretanto, não pode ser analisado isoladamente, uma vez que, apesar do aumento na aeração promover um consumo mais rápido do ácido acético, também pode exercer efeito negativo na produção de xilitol, desviando o metabolismo para a produção de biomassa microbiana (SOLEIMANI; TABIL; PANIGRAHI, 2006).

De acordo com Felipe *et al.*, (1997a), a habilidade da levedura *Candida guilliermondii* em usar o ácido acético como fonte de carbono sugere que esta levedura possa agir como

agente destoxicante do meio, aumentando a capacidade fermentativa do hidrolisado hemicelulósico.

Conforme pode ser verificado na Tabela 17 e Figura 20, os valores da eficiência de conversão xilose-xilitol de todos os ensaios ao final da fermentação foram de 55 a 85%, sendo que uma eficiência média de 85 % foi observada no ensaio 5 e nos pontos centrais 7 e 10. Da mesma forma, os melhores valores obtidos de produtividade volumétrica variaram entre 0,43 g/L.h e 0,46 g/L.h para os ensaios 3, 4, 7 e 10, respectivamente (Tabela 17 e Figura 20).

Tabela 17- Valores dos parâmetros da bioconversão do hidrolisado hemicelulósico do bagaço de cana-de-açúcar obtidos nos diferentes ensaios realizados

Ensaio	^a Y _{P/S}	^b Q _P	^c η%	^d Y%	^d P _F
1	0,54	0,35	60,0	80,0	41,5
2	0,65	0,27	71,4	94,0	50,5
3	0,61	0,45	67,0	94,4	21,6
4	0,50	0,45	55,0	95,0	43,2
5	0,78	0,37	85,3	89,0	26,8
6	0,63	0,19	68,3	88,0	23,0
7	0,75	0,46	82,0	82,0	44,1
8	0,50	0,45	54,0	95,0	18,6
9	0,50	0,37	53,5	89,0	44,0
10	0,77	0,43	84,0	88,0	40,6
11	0,70	0,35	75,0	82,0	37,0

^aY_{P/S}=fator de conversão xilose-xilitol (g xilitol/g xilose), ^bQ_P=produtividade volumétrica em xilitol (g/L.h), ^cη = eficiência de bioconversão e ^dP_F = concentração final de xilitol (g xilitol/L). ^dY%= percentual consumo de xilose.

Figura 20 - Representação comparativa dos resultados das variáveis da bioconversão xilose-xilitol obtidas no final das fermentações realizadas

Com relação à formação de xilitol, as concentrações deste póliol (Pf) no final das 11 fermentações do planejamento experimental variaram de 21,0 a 50,0 g/L (Tabela 17). As maiores concentrações (40 g/L a 50 g/L) foram observadas nos ensaios 1, 2, 4, 7, 9, 10 e 11 em função da alta concentração inicial de xilose utilizada (60 g/L a 90 g/L).

Segundo os resultados apresentados na Tabela 18, verificou-se que a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 apresentou um crescimento significativo no suporte de imobilização em todos os ensaios realizados com elevada viabilidade celular como no caso dos ensaios 1 e 2 (9,8 g/L e 7,7 g/L, respectivamente), considerando que a concentração de células imobilizadas determinada no início da fermentação (tempo 0h) foi aproximadamente de 2 g/L

.. A Figura 21 apresenta uma microfotografia (aumento 400X) de células imobilizadas

em alginato de cálcio, em fase de crescimento e coradas em azul de metileno. A Tabela 18 apresenta os valores de biomassa imobilizada e livre ao final das 11 fermentações realizadas.

Figura 21 - Microfotografia das células imobilizadas em suporte de alginato de cálcio

Tabela 18 – Concentração de células imobilizadas, livres e totais nos diferentes ensaios realizados.

Ensaio	Tempo final de fermentação (h)	Células Imobilizadas (X_{RI}) (g/L)	Número de células viáveis imob (cel/mL)	Células Livres (X_{RM}) (g/L)	Células Totais X_R (g/L)
1	96	9,8	$6,4 \times 10^{10}$	17,0	26,7
2	188	7,7	$8,2 \times 10^{10}$	8,0	15,6
3	48	4,0	$5,9 \times 10^{10}$	4,8	8,8
4	96	4,1	$4,0 \times 10^{10}$	5,6	9,7
5	72	3,0	$1,8 \times 10^{10}$	3,2	6,1
6	120	5,0	$3,0 \times 10^{10}$	1,6	6,6
7	72	4,3	$4,8 \times 10^{10}$	4,9	9,1
8	72	4,4	$3,4 \times 10^{10}$	6,0	10,5
9	168	4,5	$4,5 \times 10^{10}$	9,5	14,0
10	96	4,4	$5,1 \times 10^{10}$	8,2	12,6
11	117	4,5	$5,4 \times 10^{10}$	10,3	14,8

Quanta á biomassa microbiana imobilizada verificou-se que nas primeiras 48 horas de cultivo, em todos os ensaios realizados, houve um aumento de 100 % no conteúdo de biomassa confinada nas partículas de gel (X_{RI}). A partir deste tempo até o final do processo

foi verificado pouca mudança na concentração de biomassa aprisionada, com aumento de apenas 30% na concentração celular, indicando a saturação do suporte de alginato de cálcio (Tabela 18 e Figura 22).

Figura 22 – Variação da concentração de células imobilizadas em função do tempo para todos os ensaios realizados

Este fato foi explicado por Cunha (2006) que, trabalhando com o sistema de PVA-criogel como suporte de imobilização, atribuiu este lento aumento na concentração da biomassa no interior do suporte a um estado de “pseudo-saturação” do suporte que está relacionado a uma menor disponibilidade de oxigênio para as células encontradas na parte interior do suporte. Desta forma, a taxa de crescimento das células confinadas mais internamente nas partículas tende a diminuir com a redução na disponibilidade de oxigênio. No entanto, com o aumento da aeração do sistema, observou-se uma maior carga de biomassa imobilizada, atingindo novamente uma condição de manutenção na concentração após atingir determinado conteúdo de biomassa total no sistema (livre e imobilizada).

Foi verificado também, durante todos os ensaios de fermentação, um desprendimento de células da matriz de imobilização para o meio de cultivo e, conseqüentemente, crescimento de células livres. Este fato caracterizou o sistema como misto, em que uma parcela do conteúdo total de células permaneceu imobilizada nas partículas de gel, e outra, suspensa no meio (CUNHA, 2006).

Uma possível explicação para a elevada quantidade de biomassa suspensa em muitos sistemas com células imobilizadas deve-se a uma maior disponibilidade de oxigênio no meio líquido, além de não haver limitação de espaço físico para o crescimento, como para as células imobilizadas. O aumento no conteúdo de biomassa suspensa no meio se dá tanto pela multiplicação das células livres como pelo acréscimo de células provenientes do desprendimento do suporte. É interessante salientar que as células suspensas no meio exercem grande importância no processo, visto que estas também participam da bioconversão, e podem colaborar para a destoxificação do meio, como por exemplo, através do consumo do ácido acético presente no hidrolisado.

Carvalho *et al.* (2004), trabalhando com hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, verificaram a liberação de células de *Candida guilliermondii* do gel de alginato de cálcio e sua proliferação no meio. No caso de matrizes de alginato de cálcio a perda de células para o meio ocorre naturalmente devido ao aparecimento de poros na superfície das esferas, em função do crescimento das células imobilizadas (QUIRÓS *et al.*, 1995). Em outro trabalho semelhante, Martynenko *et al.* (2004) relataram a liberação de células do suporte de PVA-criogel em processo de champanização do vinho. Segundo estes autores a liberação de células ocorre quando a quantidade de biomassa acumulada no suporte atinge um valor crítico (saturação do suporte).

Um baixo crescimento das células livres foi notado no final de algumas fermentações (ensaios 5 e 6) (Tabela 18). Este fato ocorreu devido à baixa aeração empregada (200

ml/min), o que traz como consequência uma deficiência na disponibilidade de oxigênio no meio fermentativo. Entretanto, altas concentrações de biomassa microbiana foram observadas quando se utilizou altas vazões de ar (600 e 1000 ml/min - ensaios 1 e 11), conforme a Tabela 18.

8. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL 2³ COM TRÊS PONTOS CENTRAIS

8.1 Avaliação dos efeitos das variáveis estudadas sobre o fator de rendimento (Yp/s) do processo

Segundo a Tabela 19 e Figura 23, observa-se que o aumento na aeração (X1) e no fator de concentração do hidrolisado (X2) influenciou de forma negativa o fator de rendimento do processo. Por outro lado, verificou-se que o aumento na variável fluxo da fluidização (X3) proporcionou melhorias nos valores do fator de rendimento (Yp/s) do processo estudado neste trabalho para a produção biotecnológica de xilitol (Tabela 19 e Figura 23).

Tabela 19- Estimativa dos efeitos principais, desvio padrão e teste t de *Student's* para o fator de conversão de xilose em xilitol

Variáveis	Efeitos	Erro padrão	Valores de t
Média	0,630	± 0,086	
Vazão de ar:X1	-0,0275	± 0,202	0,92
Fator de Concentração:X2	-0,0825	± 0,202	1,61
Fluxo de Fluidização:X3	0,0375	± 0,202	1,89

Figura 23 - Representação dos efeitos principais das variáveis estudadas sobre o fator de rendimento (Y_p/s)

Observou-se, também, que os efeitos principais das variáveis, fluxo de fluidização (X_3) e fator de concentração (X_2) foram significativos ao nível de confiança de 90% (Tabela 20), no qual o valor mais alto de Y_p/s de 0,78 g/g foi alcançado utilizando o nível mínimo do fator de concentração (3X), e o nível máximo do fluxo de fluidização (57 L/h) (como no caso do ensaio 5 e conforme mostrado representado na superfície de resposta apresentada na Figura 24). Estes resultados demonstraram que maiores fluxos de fluidização favoreceram uma melhor transferência do oxigênio no meio de fermentação, além de uma melhoria na transferência de massa para o interior do suporte de imobilização, uma vez que o encapsulamento celular em suportes sólidos apresenta limitações na difusão de massa (WESTRIN; AXELSSON, 2004). Segundo Choi e Han (1981), o aumento no fluxo de fluidização em reatores de leito fluidizado e empacotado contribuiu com um aumento de 100 % na produtividade volumétrica do processo de produção de etanol (21 g/L.h), com uma eficiência de conversão de 94% no final da fermentação. Tal fato foi atribuído a uma melhora na transferência de massa do substrato e nutrientes encontrados no meio fermentativo para dentro das células.

Tabela 20 – Análise de variância das variáveis no rendimento do processo

Variáveis	Graus de liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F	Valor p
X1	1	0,0015	0,0015	0,10	0,38
X2	1	0,0130	0,013	0,92	0,10*
X3	1	0,0028	0,0028	0,19	0,09*
Erro Total	7	0,1030	0,0147		
Total	10	0,1210			

$R^2=0,97$; * significativo - nível de confiança 90%

Figura 24- Superfície de resposta representando os efeitos das variáveis estudadas sobre o fator de rendimento (Y_p/s)

Em se tratando da influência do fator de concentração, observou-se que, dentro da faixa de valores estudada, o aumento no fator de concentração do hidrolisado proporcionou uma maior concentração final do xilitol. Isso se deve à maior disponibilidade de xilose no meio, embora com valores relativamente baixos de fator de rendimento e produtividade do processo ao se comparar com hidrolisados menos concentrados.

Neste trabalho foi obtida uma concentração máxima de xilitol de 50,5 g/L (ensaio 2) trabalhando com uma concentração inicial de xilose de 82,4 g/L (fator de concentração do hidrolisado de 7X) após 188 h de fermentação (Tabela 16). O fator rendimento obtido foi de

0,62 g xilitol/ g xilose, valor considerado ainda baixo em relação ao fator de rendimento máximo de 0,78 g xilitol/ g xilose observado no ensaio 5, quando se utilizou um hidrolisado 3 vezes concentrado (Tabela 17). Este fato ressalta a observação feita por Parajó; Dominguez e Dominguez (1998c), de que quando os meios de fermentação são hidrolisados lignocelulósicos, existem efeitos adicionais relativos à concentração de substrato que devem ser levados em consideração. Segundo estes autores, se a concentração de xilose é elevada por concentração, ocorre também um aumento na concentração de outros componentes não voláteis, alguns deles causando inibição do metabolismo microbiano com conseqüente efeito negativo no rendimento e na produtividade do processo de produção de xilitol. Este comportamento também foi verificado neste trabalho, no qual o fator de concentração influenciou negativamente no fator de rendimento do processo, conforme a Figura 23.

8.2 Avaliação dos efeitos das variáveis estudadas sobre a produtividade volumétrica do processo

Conforme os resultados dos efeitos mostrados na Tabela 21 e o gráfico de *Pareto* na Figura 25, observou-se que a variável aeração não exerceu nenhuma influência sobre a produtividade do processo, dentro da faixa estudada. Tal observação justifica os menores valores da produtividade volumétrica (Q_p) de 0,19 e 0,20 g/L.h que foram obtidos nos ensaios 6 e 8, respectivamente. Embora a aeração utilizada no ensaio 8 (1000 mL/min) tenha sido maior que no ensaio 6 (200 mL/min).

Tabela 21- Estimativa dos efeitos, desvio padrão e teste t de *Student's* para a produtividade volumétrica em xilitol

Variáveis	Efeitos	Erro padrão	Valores de t
Média	0,34	$\pm 0,053$	
Vazão de ar:X1	0,00	$\pm 0,124$	1,11
Fator de Concentração:X2	0,03	$\pm 0,124$	1,82
Fluxo de Fluidização: X3	0,175	$\pm 0,124$	4,825*

* *significativo - nível de confiança 95%*

Segundo os resultados apresentados na Tabela 22, observou-se que o efeito principal da variável correspondente ao fluxo de fluidização foi significativo com nível de confiança de 95%, enquanto o efeito principal da vazão de ar e do fator de concentração foi estatisticamente não significativo na faixa estudada, conforme o gráfico de Pareto apresentado na Figura 25.

Tabela 22 - Análise de Variância das variáveis na produtividade do processo

Variáveis	Graus de liberdade	Soma Quadrática	Média Quadrática	F	Valor p
X1	1	0,000	0,00	0,00	1,00
X2	1	0,0018	0,0018	0,33	0,58
X3	1	0,061	0,061	11,15	0,012*
Erro Total	7	0,038	0,0054		
Total	10	0,101			

* *significativo - nível de confiança de 95%*

Figura 25– Gráfico *Pareto* demonstrando a influência das variáveis estudadas sobre a produtividade volumétrica (g/L.h) do processo

A influência positiva do aumento no fluxo de fluidização sobre a produtividade do processo de produção do xilitol pode ser explicada, uma vez que, maiores taxas de transferências de oxigênio e de massa favoreceram um rápido metabolismo celular, resultando no aumento no consumo do substrato e conseqüente formação mais rápida de produto. Neste trabalho obteve-se o maior valor de Q_p (0,45 g/L.h) quando foi empregado o nível máximo de fluxo de fluidização (57 L/h), conforme apresentado na Figura 26.

Figura 26 - Superfície de resposta representando os efeitos das variáveis estudadas sobre a produtividade volumétrica

8.3 Modelos empíricos para as respostas Y_p/s e Q_p em função das variáveis em estudo

Os valores de R^2 (0,97 e 0,80) para os modelos matemáticos empíricos obtidos para o Y_p/s e a Q_p (Tabelas 21 e 23, respectivamente) indicam que, um modelo linear com coeficiente de interação de primeira ordem pode explicar satisfatoriamente o comportamento dos parâmetros Y_p/s (g/g) e Q_p (g/L.h) em função das variáveis vazão de ar, fluxo de fluidização e fator de concentração, na faixa de valores estudada.

Conforme observado nas Tabelas 23 e 24, os coeficientes lineares, assim como a constante do modelo, são significativos ao nível de 95% de confiança. O modelo representativo pode então ser composto conforme apresentado nas Equações 20 e 21 referentes ao fator de rendimento (Y_p/s) à produtividade volumétrica (Q_p) do processo, na

qual o coeficiente não significativo foi mantido para um melhor ajuste dos resultados experimentais (maior valor de R^2):

Tabela 23- Coeficientes para o modelo linear relativo ao fator de rendimento (Y_p/s)

Variáveis	Coeficientes	Valor P	R^2
Modelo		0,0002*	0,97
Constante	0,816		
X1:Vazão de ar	0,0000343		
X2:Fator de Concentração	0,0206		
X3:Fluxo de Fluidização	0,000986		

**Significativo – nível de confiança de 95%*

$$Y_p/s = 0,751625 - 0,00003437 \cdot X1 - 0,020625 \cdot X2 + 0,000986 \cdot X3 \quad \text{Equação 20}$$

Tabela 24- Coeficientes para o modelo linear relativo à produtividade volumétrica do processo (Q_p)

Variáveis	Coeficientes	Valor P	R^2
Modelo		0,0164*	0,80
Constante	0,198		
X1:Vazão de ar	0,000		
X2:Fator de Concentração	0,075		
X3:Fluxo de Fluidização	0,0046		

**Significativo – nível de confiança de 95%*

$$Q_p = 0,198409 + 0,0 \cdot X1 + 0,0075 \cdot X2 + 0,00460526 \cdot X3 \quad \text{Equação 21}$$

8.4 Otimização das variáveis de resposta (Q_p e Y_p/s) e validação dos modelos obtidos

As Tabelas 25 e 26 apresentam os resultados das condições ótimas de fermentação e os valores ótimos das variáveis de resposta (Q_p e Y_p/s) preditos pela análise estatística.

Tabela 25 - Valores ótimos das variáveis independentes preditos pela análise estatística

Variáveis Independentes	Valor Mínimo	Valor Máximo	Valor Ótimo
X1: Vazão de ar	200,0	1000,0	200,0
X2: Fator de Concentração	3,0	7,0	3,7
X3: Fluxo de Fluidização	19,0	57,0	57,0

Tabela 26 - Valores ótimos das variáveis dependentes preditos pela análise estatística

Variáveis Dependentes	Valor Ótimo
Produtividade (Q_p , g/L.h)	0,42
Fator de Rendimento (Y_p/s , g/g)	0,70

A Figura 27 apresenta a superfície de resposta da região onde se encontram os valores ótimos de fator de rendimento e produtividade volumétrica em xilitol em função das variáveis em estudo otimizados pela análise estatística.

Figura 27- Superfície de resposta representando a região dos valores otimizados pela análise estatística das variáveis estudadas

Os resultados obtidos na Tabela 26 indicam que para alcançar os valores máximos das variáveis de resposta do processo Y_p/s de 0,7 g/g e Q_p de 0,42g/L.h é necessário trabalhar com uma vazão mínima de ar (200 mL/min), um fluxo máximo de fluidização (57 L/h) e um fator de concentração do hidrolisado de 3,7x (Tabela 25). Estes resultados confirmam a observação de que, ao favorecer a transferência de oxigênio no meio mediante o aumento no fluxo de fluidização observa-se também, um aumento na produtividade do processo, mesmo em baixas vazões de ar (200 mL/min) (Tabela 18). Este fato confirma a existência de um efeito negativo entre as variáveis de vazão do ar e o fator de concentração no rendimento do processo (Tabela 19). Resultados semelhantes foram também observados nos trabalhos de Carvalho *et al.*, (2003), Santos (2005) e Cunha (2006). Estes autores, trabalhando com a levedura *Candida guilliermondii* FTI 20037 imobilizada em diferentes suportes de imobilização e cultivada em diferentes sistemas reacionais, observaram que uma maior disponibilidade de oxigênio e substrato para as células resultou em um crescimento celular com reflexos negativos na produção de xilitol. Estes autores observaram que uma adequada condição de semi-anaerobiose é requisito fundamental para uma eficiente produção de xilitol por *Candida guilliermondii*, uma vez que condições aeróbias ou anaeróbias aumentam a fração de xilose consumida em vias alternativas.

Com relação à validade dos modelos apresentados nas Equações 22 e 23, foram utilizadas as condições ótimas preditas pela análise estatística - vazão de ar de 200 ml/min, fator de concentração de 3,7x e fluxo de fluidização de 57 L/h, (Tabela 26). Conforme pode ser observado na Tabela 27, os modelos empíricos que descreveram o fator de rendimento (Y_p/s) e a produtividade (Q_p) do processo em função das variáveis independentes, fluxo de fluidização, vazão de ar e fator de concentração - foram capazes de validar os resultados experimentais, dentro da faixa estudada com um nível de confiança de 95%.

Tabela 27 - Teste de validade dos valores otimizados preditos pela análise estatística do processo

Variáveis Resposta	Resposta Observada	Resposta Predita	Nível inferior limite de confiança 95%	Nível Superior limite de confiança 95%
Yp/s	0,70	0,70	0,38	0,86
Qp	0,44	0,42	0,48	0,58

8.5 Avaliação da estabilidade operacional do sistema de bateladas repetidas com células imobilizadas em alginato de cálcio

Considerando como referência os valores otimizados das variáveis independentes conforme indicado pela análise estatística (vazão de ar de 200 mL/min, fator de concentração de 3,7 e fluxo de fluidização de 57L/h), foram realizadas bateladas sucessivas de fermentação com reutilização do biocatalizador imobilizado. Ao final de cada ciclo, o caldo fermentado foi retirado e o biorreator foi novamente alimentado com meio fresco de cultivo (hidrolisado de bagaço). As partículas de gel com as células imobilizadas foram mantidas no interior do reator ao longo dos ciclos de fermentação.

A Figura 28 apresenta a variação no consumo da xilose e na Figura 29 a formação de xilitol em função do tempo ao longo das 7 bateladas repetidas de fermentação.

Figura 28- Variação na concentração de xilose em função do tempo ao longo das bateladas repetidas de fermentação

Figura 29- Formação de xilitol em função do tempo ao longo das bateladas repetidas de fermentação

Segundo os resultados obtidos na Tabela 28 observou-se que na primeira batelada (B1) houve um consumo de 99% da xilose em 72h de fermentação, resultando em um fator de rendimento (Y_p/s) de 0,7 g/g e uma produtividade volumétrica (Q_p) de 0,44 g/L.h com uma concentração final de xilitol de 34,0 g/L. Importante ressaltar que, os resultados observados experimentalmente estão de acordo com os valores ótimos preditos pela análise estatística, comprovando desta forma a sua validade na otimização do processo. Observou-se também que durante as bateladas repetidas B1 a B6 o consumo da xilose apresentou poucas variações

(media percentual de consumo de 92,6%). O mesmo comportamento foi observado no caso da produção de xilitol ao longo das primeiras 6 bateladas (B1-B6) (Pf de 31,5 g/L), conforme os resultados apresentados na Tabela 28.

Tabela 28 - Resultados das bateladas repetidas de fermentação com reciclo de células imobilizadas após 72 h de fermentação

Bateladas	^a Y _{P/S} (g/g)	^b Q _P (g/L.h)	^c μ%	^d Y%	^d P _F (g/L)	^e X _{RI} (g/L)	^f X _{RM} (g/L)	Cél. imob. viáveis (cels/mL)
B1	0,70	0,44	76,0	99,0	34,0	3,3	4,4	4,8X10 ¹⁰
B2	0,70	0,40	75,4	94,0	30,0	4,8	2,3	4,4X10 ¹⁰
B3	0,66	0,40	71,4	92,4	31,6	5,3	2,6	4,8X10 ¹⁰
B4	0,65	0,40	65,4	92,0	29,0	5,4	2,5	4,6X10 ¹⁰
B5	0,67	0,46	70,0	91,3	33,2	5,9	2,8	4,4X10 ¹⁰
B6	0,70	0,43	74,2	92,4	31,3	5,7	2,5	4,4X10 ¹⁰
B7	0,75	0,24	42,2	87,5	17,4	5,3	1,7	3,4X10 ¹⁰
*Media(σ)	0,69±0,034	0,43±0,14	74,3±5,60	92,7±3,44	31,5±2,82	5,1±0,86	2,3±0,36	4,4X10¹⁰

^aY_{P/S}: fator de conversão xilose-xilitol (g xilitol/g xilose), ^bQ_P: produtividade volumétrica em xilitol (g/L.h), ^cη = eficiência de bioconversão, ^dP_F = concentração final de xilitol (g xilitol/L). ^dY%: percentual consumo de xilose. ^eX_{RI} = concentração de células imobilizadas expressa em volume de reator e ^fX_{RM} = concentração de células livres expressa em volume de reator. *os valores da media (σ) correspondem as bateladas (B1-B6).

Conforme apresentado na Figura 30, houve pequenas variações no fator de rendimento e na produtividade do processo. Comportamento similar ao observado nos trabalhos de Sene *et al.*, (1998) e Carvalho (2000).

Sene *et al.* (1998), utilizando células livres de *Candida guilliermondii* cultivadas em frascos *Erlenmeyer* e, como substrato o hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar, foram observadas pequenas diferenças ao longo de 5 bateladas repetidas de fermentação no que se referente ao consumo de xilose.

Da mesma forma e segundo os resultados obtidos por Carvalho (2000), trabalhando com células imobilizadas, o fator de rendimento e a produtividade volumétrica em xilitol apresentaram pequenas variações ao longo de cinco bateladas repetidas de fermentação, com coeficientes de variação iguais a 3,7 e 7,5 %, respectivamente. Este mesmo autor ressaltou a

importância destes resultados para aplicações em escala industrial, uma vez que a realização de uma série de cultivos em batelada, sem perdas significativas no fator de rendimento e na produtividade volumétrica pode levar a reduções no tempo de operação geral além de contribuir para a redução dos custos operacionais.

Figura 30- Resultados da produtividade volumétrica e do fator de rendimento em xilitol no final de cada batelada das 7 bateladas de fermentação

Observou-se também que, a partir da batelada B7 houve uma redução de 26% no fator de rendimento e 50% na produtividade volumétrica em xilitol, sendo apenas o 42 % de xilose inicial foi consumida após 72 h de fermentação (Tabela 28). Resultados similares foram observados por Cunha (2006), trabalhado com células imobilizadas em PVA-hydrogel em reator de tanque agitado. O autor observou um aumento na assimilação de xilose até a batelada 3, no qual 97% do seu conteúdo inicial foi consumido em 72 horas de fermentação. A partir da batelada 4 houve uma redução de 2,5% no fator de rendimento e 21% na produtividade do processo.

Com relação ao consumo de arabinose, observou-se que ao longo das 7 bateladas repetidas de fermentação não ocorreu um consumo significativo deste açúcar (Figura 31). Tal fato mostrou-se uma adaptação significativa das células às condições otimizadas de fermentação para o consumo de xilose e a produção de xilitol, uma vez que seu metabolismo não foi desviado para o consumo de arabinose.

Figura 31- Variação na concentração de arabinose em função do tempo ao longo das bateladas repetidas de fermentação

Deve-se observar ainda que, com relação à glicose, esta foi completamente consumida nas primeiras 24h de fermentação em todas as bateladas (Figura 32). Este comportamento é típico da *Candida guilliermondii*, uma vez que este açúcar é consumido preferencialmente em relação a xilose e considerado importante para o crescimento celular em baixas concentrações (SILVA *et al.*, 2007).

Figura 32- Variação na concentração de glicose em função do tempo ao longo das bateladas repetidas de fermentação

Com relação ao ácido acético, este foi consumido completamente após 72 h de fermentação durante todas as 7 bateladas repetidas (Figura 33). Este fato sugere que a presença do ácido acético em baixas concentrações poderia ter sido utilizada para o crescimento celular. Lima *et al.*, (2004) e Rodrigues *et al.*, (2006) observaram que a presença de ácido acético no meio de cultivo pode favorecer o metabolismo da xilose pela levedura *Candida guilliermondii*.

Figura 33- Variação na concentração de ácido acético em função do tempo ao longo das bateladas repetidas de fermentação

Quanto á concentração celular, foi observado no final da primeira batelada (B1) um aumento de 50% no conteúdo de biomassa imobilizada em alginato de cálcio em relação a sua concentração inicial no gel, alcançando uma concentração de X_{RI} de cerca de 4,0 g/L (Tabela 28 e Figura 34), indicando assim a adaptação das células imobilizadas ao hidrolisado hemicelulósico. Chen e Gong (1985) constataram que, a adaptação das células ao hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar permitiu à levedura *Candida sp* B22, adquirir habilidade para superar os efeitos inibitórios causados pelos compostos tóxicos presentes, favorecendo assim a conversão de xilose em xilitol.

Por outro lado, verificou que uma pequena variação na concentração das células imobilizadas (X_{RI}) nas bateladas B2-B6 (Tabela 28 e Figura 34).

Figura 34- Resultados da concentração de células imobilizadas e livres no final de cada batelada das 7 bateladas de fermentação

Resultados semelhantes foram obtidos por Cunha (2006) trabalhando com PVA-Criogel, onde este autor observou um aumento de 98% no conteúdo de biomassa imobilizada na segunda batelada em relação ao que havia sido aprisionado no gel na primeira batelada, alcançando uma concentração de 13,94 g/L (X_I : massa seca células/volume de gel). Tal

concentração permaneceu relativamente constante durante os ciclos subseqüentes. Segundo o mesmo autor, este fato pode ser justificado devido à saturação do suporte de imobilização (estado de pseudo-saturação) e a uma menor disponibilidade de oxigênio em virtude do crescimento microbiano.

Conforme a Figura 34 observou-se no final da batelada B7 uma diminuição de 8 % na concentração final das células imobilizadas (X_{RI}) e 32 % na concentração final das células livres (X_{RM}) em relação á batelada repetida B6, conforme mostrado na Tabela 28. Esta perda na concentração das células livres foi provavelmente devido à redução na taxa de crescimento celular dentro do suporte de imobilização e, conseqüentemente, havendo menor desprendimento de células do suporte para o meio, levando a uma redução na concentração de células livres, uma vez que parte do conteúdo total das células livres provém do desgaste e rompimento do suporte de imobilização (CUNHA, 2006). Esta redução no crescimento das células imobilizadas pode ser explicada pela possível difusão e acúmulo de materiais insolúvel proveniente do hidrolisado hemicelulósico, durante as 7 bateladas, para dentro do suporte propiciando assim limitações na transferência de massa do meio para as células encapsuladas.

Neste trabalho, as partículas de alginato de cálcio utilizadas como suporte de imobilização celular exibiram boa estabilidade mecânica no biorreator de leito fluidizado e mantiveram estáveis ao longo das bateladas repetidas (B1-B6) (Figura 35). Entretanto, a partir da batelada B7 observou-se desgaste no suporte de imobilização (Figura 36).

Figura 35 - Partículas de alginato de cálcio com células de *Candida guilliermondii* no final da batelada B6 (após 432 h de fermentação)

Figura 36 - Partículas de alginato de cálcio com células de *Candida guilliermondii* no final da batelada B7 (após 504 h de fermentação)

9. AVALIAÇÃO TÉCNICO-ECONÔMICA DO PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA A PRODUÇÃO DE XILITOL

9.1 Levantamento de dados técnicos e econômicos do processo de produção biotecnológica de xilitol

Para realizar a análise econômica do processo biotecnológico para a produção de xilitol, em forma de xarope com 80 % de pureza, em nível de uma proposta produção em planta piloto foram feitas as seguintes considerações:

A planta piloto tem capacidade de processar 1 tonelada de bagaço por dia, o que corresponde a 240 bateladas de consumo anual (240 dias de trabalho). Na etapa da hidrólise ácida do bagaço de cana, para cada 1 tonelada de bagaço (umidade de 10%) são necessários 9000 L de solução ácida (relação de 1g de bagaço:10 g de solução ácido) e 50 L de H_2SO_4 (98%) (relação 100 mg ácida - 1g de bagaço) para produzir 72000 L de hidrolisado hemicelulósico com uma concentração de 18g de xilose /L (considerando uma eficiência de conversão da hidrólise ácida é de 60% segundo obtido neste trabalho). Em seguida, este caldo é concentrado (considerando um fator otimizado de concentração de 4 vezes segundo indicado pela análise estatística realizada neste trabalho), onde são obtidos 1800 L de hidrolisado com uma concentração de 72 g xilose /L. Após a etapa da destoxificação química do hidrolisado concentrado ocorre perda de 40 % no volume final do hidrolisado, resultando em 1080 L de hidrolisado tratado com uma concentração final de 64 g de xilose/L (considerando uma perda de 11% no teor de xilose na etapa de tratamento com etapa de “*overliming*”). Em seguida, na etapa de fermentação os nutrientes são adicionados ao

hidrolisado tratado resultando em uma diluição e redução na concentração de xilose para 61g /L (considerando um fator de diluição de 5%). Após a etapa de fermentação são obtidos 1080 L de fermentado com uma concentração de 42,7 g de xilitol/L (46 Kg de xilitol) (considerando o valor otimizado do fator de conversão de 0,7 g/g). Este caldo fermentando é purificado e concentrado (considerando um fator de concentração de 18,7 vezes) para atingir uma concentração de saturação de 800g de xilitol/L necessária para a etapa de cristalização. O volume final de xarope concentrado do xilitol é de 58 L com um grau de pureza de 80% (800g/L).

Tabelas 29 e 30 apresentam o cálculo do valor do capital de investimento total e o gasto total de produção de xilitol biológico em nível de planta piloto. A Tabela 31 apresenta os resultados dos cálculos do fluxo de caixa do processo. A análise da viabilidade econômica completa do processo encontra-se no Anexo A.

Tabela 29– Cálculo do capital fixo de investimento para a produção do xilitol em nível de planta piloto

Custos	%	Valores (R\$)
<i>Custos Diretos</i>		
Aquisição dos Equipamentos	100	752,900,00
Instalação do Equipamento	9	67,761,00
Instalação de Tubulações	8	60,232,00
Instalações Elétricas	5	37,645,00
Manutenção	10	75,290,00
<i>Custos Indiretos</i>		
Engenharia e Pesquisa	10	75,290,00
Gastos de Construção	12	90,348,00
Contingências	8	60,232,00
Capital Fixo de Investimento		1.219.698,00

Tabela 30– Cálculo dos custos de insumos e o custo total da produção de xilitol em nível de planta piloto

Material de Consumo	R\$	Consumo por Batelada	ICMS R\$	PIS R\$	COFINS R\$	Gastos por Batelada R\$
Levedura do banco de leveduras- ATCC	525,00	0,04%	63,00	8,23	37,91	16,63
Vidrarias (béquer, <i>Erlenmeyer</i> , balão volumétrico, etc.)	8000,00	0,004%	480,00	62,70	288,80	286,74
Micropipetas (10-100, 100-1000, 500-5000)	3000,00	0,004%	240,00	31,35	144,40	103,37
Alça de platina, Bico de Bunsen	250,00	0,004%	30,00	3,92	18,05	7,92
Termômetro	150,00	0,004%	18,00	2,35	10,83	4,75
Plásticos (Placas de Petri, vials, ponteiros e outros)	3000,00	0,004%	360,00	47,03	216,60	95,06
Reagentes	45000,00	0,004%	400,00	653,40	3.009,60	1.437,48
Ácido Sulfúrico	24000,00	0,004%	2880,00	348,48	1605,12	766,66
Gás GLP	35,00	1 Botijão	4,20	0,51	2,34	27,95
Água	4800,00	0,04%	576,00	69,70	321,02	153,33
Energia Kw/h (200KW consumo de cada batelada)	28800,00	0,04%	3.456,00	418,18	1.926,14	919,99
Custo de Produção por Batelada						3.739,88
Custo Total de Produção (240 Bateladas em Total)						897.570,97

Tabela 31- Cálculos do fluxo de caixa do processo e valor total de venda do xarope de xilitol

Dados Econômicos	Valores
<i>Payback</i> (retorno do capital)	24 meses
TIR (Taxa Interna de Retorno) ao ano	51,7 %
Valor Presente Líquido	R\$ 1,368,777
Produção Anual - Litros de Xarope	13920,0 L
Custo do Xarope de Xilitol (80 % de pureza)- R\$ / Litro	R\$ 77,17
Venda Líquida (Sem taxas de impostos) - R\$ /Litro	R\$ 147,39
Valor Total de venda (R \$) – Mercado Interno	R\$ 211,60
Margem de Contribuição %	47,60 %

Segundo os resultados mostrados na Tabela 31, observou-se que o processo estudado neste trabalho para a produção de xilitol pela via biotecnológica mostrou-se economicamente viável com um *payback* de 24 meses e uma TIR de 51,7%, sendo que o preço estipulado de venda de xarope de xilitol (80% de pureza) no mercado é de R\$ 211,60, representando 53% do preço do xilitol obtido por via química no mercado interno (R\$ 402,50).

Figura 37 – Determinação do *payback* do processo biotecnológico para a produção de xilitol

Com o objetivo de reduzir o custo de venda do xarope de xilitol (80% de pureza) e aumentar a competitividade do xilitol biotecnológico em relação a outros adoçantes encontrados no mercado, optou-se sugerir modificações em algumas etapas do processo realizado neste trabalho.

Estas modificações se basearam em primeiro, considerar uma eficiência de conversão em xilose de 80 % na etapa da hidrólise ácida, conforme estipulado por D'Moraes *et al.*, (2008) para que esta etapa do processo torna-se viável. Segundo, na etapa da destoxificação do hidrolisado hemicelulósico, foi proposto o uso de resinas de troca iônica em lugar do tratamento químico utilizando CaO e carvão ativo (“*overliming*”), devido á perda excessiva no volume do hidrolisado (40-50%) e na concentração da xilose (10-20%) observada neste tratamento. Segundo Marton *et al.*, (2003) o uso da resinas na destoxificação do hidrolisado mostrou uma eficiência de 95 % em remoção dos compostos tóxicos além de apenas 5% de perda de xilose e de volume.

O fluxograma do novo processo biotecnológico para produção de xilitol em escala de planta piloto com as modificações sugeridas é apresentado no Anexo B. Para avaliar a influência destas modificações na redução no custo do xarope de xilitol (80% de pureza), foram feitas as seguintes novas considerações:

Para a produção de xilitol em nível de planta piloto (capacidade de processamento de 1 tonelada de bagaço de cana) utilizando o processo com as modificações sugeridas, são necessários 9000 L de solução ácida (relação 1g de bagaço:10 g de solução ácida) e 50 L de H₂SO₄ (98%) (relação 100mg ácida : 1g de bagaço) para produzir 8550 L de hidrolisado hemicelulósico com uma concentração de 20g de xilose /L (considerando uma eficiência de 80% na hidrólise ácida e uma eficiência de 95% na etapa de filtração). Em seguida, este caldo é concentrado (considerando o fator de concentração de 4 vezes), onde são obtidos 2137,5 L de hidrolisado com uma concentração de 80 g xilose /L. Após a etapa da destoxificação do

hidrolisado concentrado utilizando resinas de troca iônica, considerando uma perda de 5% tanto no volume do hidrolisado como na concentração de xilose, são obtidos 2030,6 L de hidrolisado tratado com uma concentração de 76 g/L (154,3 Kg de xilose em 2030,6 L). Em seguida, na etapa de fermentação os nutrientes são adicionados ao hidrolisado tratado resultando em uma concentração final de xilose de 72,2 g de xilose/L (considerando um fator de diluição de 5%). Após a etapa de fermentação são obtidos 2030,6 L de fermentado com uma concentração de 50,4 g de xilitol/L (102,3 Kg de xilitol), considerando o fator de conversão = 0,7 g/g, após a etapa de fermentação. Este caldo fermentando é purificado e concentrado (fator de concentração 16 vezes) para atingir uma concentração de saturação de 800g de xilitol/L necessária para a etapa de cristalização. O volume final do xarope concentrado do xilitol é de 128 L com um grau de pureza de 80% (800g/L).

Tabelas 32, 33 e 34 apresentam os resultados da nova análise econômica do processo biotecnológico modificado para a produção de xilitol (no Anexo C encontra-se a análise detalhada da viabilidade econômica deste processo modificado).

Tabela 32– Cálculo do capital fixo de investimento do processo biotecnológico modificado para a produção do xilitol em nível de planta piloto

Custos	%	Valor (R\$)
<i>Custos Diretos</i>		
Aquisição dos Equipamentos	100	884.900,00
Instalação do Equipamento	9	79.641,00
Instalação de Tubulações	8	70.792,00
Instalações Elétricas	5	44.245,00
Manutenção	10	88.490,00
<i>Custos Indiretos</i>		
Engenharia e Pesquisa	10	88.490,00
Gastos de Construção	12	106.188,00
Contingências	8	70.792,00
Capital Fixo de Investimento		1.433.538,00

Segundo as Tabelas 32 e 33, observou que o custo do capital fixo de investimento e o custo total de produção (R\$ 1,433,538,00 e R\$ 1,464,432,77, respectivamente).do processo modificado foram maiores que os custos obtidos na proposta utilizada neste trabalho (R\$ 1,219,698,00 e R\$ 897570,97, respectivamente) (Tabelas 29 e 30). Este fato foi relacionado principalmente á eficiência da etapa de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico utilizando resinas de troca iônica (perda de apenas 5% no volume do hidrolisado em comparação a uma perda de 40% no tratamento “*overliming*”) e que resultou na obtenção de maiores volumes de hidrolisado hemicelulósico após a etapa de tratamento. Sendo assim, foi necessário um maior capital de investimento devido aos novos gastos na compra das resinas de troca iônica e dos fermentadores de maiores volumes além do consumo mais elevado de energia, água e reagentes na etapa de fermentação.

Tabela 34- Cálculos dos valores finais de fluxo de caixa do processo modificado para a produção de xilitol em nível de planta piloto

Dados Econômicos	Valores
<i>Payback</i> (retorno do capital)	24 meses
TIR (Taxa Interna de Retorno) ao ano	52,5%
Valor Presente Líquido	R\$ 1,645,635
Produção Anual - Litros de Xarope	30720,0 L
Custo do Xarope de Xilitol (80% de pureza) - R\$ / Litro	R\$ 53,43
Venda Líquida (Net Sale) - R\$ / Litro	R\$ 91,32
Valor Total de venda (R \$) – Mercado Interno	R\$ 131,10
Margem de Contribuição %	41,5%

Segundo os resultados apresentados na Tabela 34, observou-se que as modificações sugeridas para o processo biotecnológico utilizado neste trabalho resultaram em uma diminuição de 62 % no preço do xarope de xilitol (R\$ 131,10) (Tabela 34) com um *Payback* de 24 meses (Figura 38). Este fato é justificado, uma vez que os elevados gastos em

equipamentos e material de consumo são recompensados pela alta eficiência do processo modificado na produção de 30720 L por ano de xarope de xilitol (80% de pureza) (Tabela 34) em comparação com a produção obtida na primeira proposta de 13920 L (Tabela 31), o que resultou nesta significativa redução de 62 % no preço final do xarope de xilitol (R\$ 113,10).

Figura 38 – Determinação do *payback* do processo melhorado para a produção de xilitol

10. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que:

- A produção biotecnológica de xilitol, a partir do aproveitamento da fração hemicelulósica do bagaço de cana-de-açúcar, em biorreator de leito fluidizado operado com células imobilizadas mostrou-se tecnicamente e economicamente promissor.
- O aumento na vazão de ar na etapa de fermentação favoreceu o crescimento celular em detrimento da produção de xilitol. Entretanto, o aumento no fluxo de fluidização influenciou positivamente tanto a produtividade volumétrica como o fator de rendimento em xilitol, uma vez que promoveu uma melhor transferência do oxigênio do meio para o interior do suporte de imobilização, resultando em um maior consumo de xilose e consequente acúmulo de xilitol.
- Fermentações em sistemas de bateladas repetidas conduzidas em biorreator de leito fluidizado com células imobilizadas, progressivamente adaptadas ao hidrolisado permitiu a reutilização sucessiva das células imobilizadas durante as bateladas repetidas (B1-B6) sem reduções na concentração final de xilitol, na produtividade volumétrica em xilitol e no fator de rendimento de xilose em xilitol. Entretanto, no final da batelada B7 ocorreu uma perda na concentração das células imobilizadas celular e na produtividade volumétrica em xilitol.
- A análise técnico-econômica realizada do processo biotecnológico para a produção de xilitol utilizado neste trabalho mostrou-se economicamente viável com um *Payback* de

24 meses e um preço de venda do xarope de xilitol (80% de pureza) de R\$ 211,60 no mercado, representando 53% do preço do xilitol cristalizado no mercado (R\$ 402,50).

- O aumento da eficiência da hidrólise para 80% e a utilização de resinas de troca iônica no tratamento do hidrolisado hemicelulósico, sugeridas, no processo biotecnológico utilizado neste trabalho resultaram em uma diminuição de 62 % no preço do xarope de xilitol (R\$ 113,10) com o mesmo *Payback*.

11. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Otimizar a etapa da hidrólise ácida visando elevar a eficiência de extração da xilose para valores maiores que 80%.
- Estudar outros métodos de destoxificação do hidrolisado hemicelulósico (destoxificação biológica ou por membrana), buscando diminuir as perdas, no teor de xilose e no volume final do hidrolisado tratado, ocasionadas pela utilização dos métodos tradicionais (químico).
- Otimizar as condições operacionais das diferentes etapas do processo biotecnológico para a produção de xilitol em nível de planta piloto.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; OETTERER, M.; MENEZES, T. J. B. Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia. **Boletim SBCTA**, v. 33, n.2, p. 184-193, 1999.
- AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J. A.; GARROTE, G.; VÁSQUEZ, M. V. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 55, p. 309-318, 2002.
- ALANEN, P.; HOLSTI, M. L.; PIENIHAKKINEN, K. Sealants and xylitol chewing gum are equal in caries prevention. **Acta Odontologica Scandinavica**, v.58, p.279-284, 2000.
- ALVES, L. A.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; SILVA, S. S., PRATA, A. M. R. Pretreatment of sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70/72, p. 89-98, 1998.
- ALVES; L. A. **Avaliação do tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para produção biotecnológica de xilitol**. 1997. 92f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) -Faculdade de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 1997.
- AUTIO, J. T. Effect of xylitol chewing gum on salivary Streptococcus mutans in preschool children. **ASDC Journal of Dentistry for Children**, v.69, n.1, p. 81-86, 2002.
- BAE, S. M.; PARK, Y. C.; LEE, T. H.; KWEON, D. H.; CHOI, J. H.; KIM, S. K.; RYU, Y. W.; SEO, J. H. Production of xylitol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene in repeated fed-batch and cell-recycle fermentations. **Enzyme Microbial Technology**, v. 35, p. 545-549, 2004.
- BARBOSA, M. F. S.; de MEDEIROS, M. B.; MANCILHA, I. M.; SCHENEIDER, H.; LEE, H. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and same factors wich affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 3, p. 241-251, 1988.
- BARON, G. V.; WILLAERT, R. G.; BACKER, L. Immobilised cell reactors. In: BARON, G. V.; WILLAERT, R. G.; BACKER, L. **Immobilised Living cell systems: Modelling and Experimental Methods**. New York: John Wiley & Sons Ltda, 1996. p. 67-95.
- BAUDEL, H. M.; ZAROR, C.; ABREU, C. A. M. Improving the value of sugarcane bagasse wastes via integrated chemical production systems: an environmentally friendly approach. **Industrial Crops and Products**, v.21, p.309–315, 2005.
- BISWAS, S.; VASHISHTHA, N. Xylitol: Technology & Business Opportunities. **Chemical Engineering World**, v.33, n.1, 1998.

BORDEAUX-RÊGO, R.; PAULO, G. P.; ALMEIDA SPRITZER, I. M. P.; ZOTES, L. P. **Viabilidade Econômico-Financeira de Projetos**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Editora FGV, 2008, 161p.

BRANCO, R. F.; SANTOS, J. C.; SARROUH, B. F.; RIVALDI, J. D.; PESSOA, A. J.; SILVA S. S. Profiles of xylose reductase, xylitol dehydrogenase and xylitol production under different oxygen transfer volumetric coefficient values. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.84, p. 326-330, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Produção brasileira de cana-de-açúcar**. Secretaria de produção e agroenergia. Departamento da cana-de-açúcar e agroenergia.. 2009. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/ESTATISTICAS/PRODUC AO/03-PROD.%20CANA%20SAFRA.PDF>>. Acessado em: fev. 2009.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A. Xylitol Production From Wheat Straw Hemicellulosic Hydrolysate:Hydrolysate Detoxification And Carbon Source Used For Inoculum Preparation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.333-336, 2008.

CAO, N.; TANG, R.; GONG, C. S.; CHEN, L. F. The effect of cell density on the production of xylitol from D-xylose by yeast. **Applied Biochemistry and biotechnology**, v. 45/46, p. 515-519, 1994.

CARVALHO, W. **Estudo da imobilização de *Candida guilliermondii* FTI 20037 para obtenção de xilitol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2000. 95f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2000.

CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; CONVERTI, A.; VITOLO, M. Metabolic behavior of immobilized *Candida guilliermondii* cells during batch xylitol production from sugarcane bagasse acid hydrolyzate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 79, n.2, p. 165-169, 2002a.

CARVALHO W.; SILVA S. S.; VITOLO M.; FELIPE M. G. A.; MANCILHA I. M. Improvement in xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate achieved by the use of a repeated-batch immobilized cell system. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v.57c, p. 109-112, 2002b.

CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; CONVERTI, A.; VITOLO, M. Metabolic behavior of immobilized *Candida guilliermondii* cells during batch xylitol production from sugarcane bagasse acid hydrolyzate. **Biotechnology and Bioengineering**, v.79, n.2, p. 165-169, 2002c

CARVALHO, W.; SILVA, S. S.; SANTOS, J. C.; CONVERTI, A. Xylitol production by Ca-alginate entrapped cells: comparison of different fermentation systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 553-9, 2003.

CARVALHO, W.; SANTOS, J.C.; CANILHA, L.; ALMEIDA-SILVA, J. B.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. A study on xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by Ca-alginate entrapped cells in a stirred tank reactor. **Process Biochemistry**, v. 39, p.2135-2141, 2004.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Semi-continuous xylose-to-xylitol bioconversion by Ca-alginate entrapped yeast cells in a stirred tank reactor. **Bioprocess Biosystem Engineering**, v. 31, p.493–498, 2008.

CASTILLO, E.; PEZZOTTI, F.; NAVARRO, A.; LOPEZ-MÚNGUIA, A. Lipase-catalyzed synthesis of xylitol monoesters: solvent engineering approach. **Journal of Biotechnology**, v.102, p. 251-259, 2003.

CHEN, L. F.; GONG, C. S. Fermentation of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to xylitol by a hydrolysate acclimatized yeast. **Journal of Food Science**, v.50, p. 226-228, 1985.

CHOI, Y. D.; HAN, M. H. Continuous ethanol production by immobilized yeast in a fluidized reactor. **Biotechnology Letters**, v.3, n.11, p. 667-671, 1981.

CORREA, P. E. O.; RAMOS, R. M.; SILVA, S. S.; MANCILHA, I. M. Avaliação do fator de concentração do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar no crescimento e consumo de açúcares por *Candida guilliermondii*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA - INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 1995, São Carlos. **Anais do Congresso Brasileiro De Engenharia Química - Iniciação Científica**. São Carlos: Associação Brasileira de Engenharia Química (ABEQ), p.26-29.

COVIZZI, L. G.; GIESE, E. C.; GOMES, E.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.28, n.2, p.143-160, 2007.

CRAWFORD, D. L.; MCCOY, E.; HARKIN, J. M.; JONES, P. Production of microbial protein from waste cellulose by *Thermomonospora fusca*, a thermophilic actinomycete. **Biotechnology and Bioengineering**, v.15, n. 5, p. 833-843, 2004.

CUNHA, M. A. A. **Bioprodução de xilitol a partir de hidrolizado de bagaço de cana-de-açúcar em sistemas com células de *Candida guilliermondii* imobilizadas em hidrogéis de álcool polivinílico**. 2006. 215f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2006.

D'MORAES, A.; ALENCAR, Y.; OLIVEIRA, A.; GUESSE, R. 2nd Generation Bioethanol – Foundations for Enabling Sustainable Chemistry. In: CTBE WORKSHOP ON HYDROLYSIS ROUTE FOR CELLULOSIC ETHANOL FROM SUGARCANE, 2009, Campinas. **Poster Session for Research Group Presentations Abstract in the CTBE workshop on Hydrolysis Route for Cellulosic Ethanol from Sugarcane**. Campinas: University of Campinas (Unicamp), 2009, p.3.

DANISCO A/S. Xylitol. 2005. Disponível em: http://www.danisco.com/cms/connect/corporate/products%20and%20services/product%20range/sweeteners/xylitol/xylitol_en.htm. Acessado em: fev. 2009.

DAWSON, L.; BOOPATHY, R. Cellulosic ethanol production from sugarcane bagasse without enzymatic saccharification. **BioResources**, v.3, n.2, p. 452-460, 2008.

DELGENES, J. P.; ESCARE, M. C.; LAPLACE, J. M.; MOLETTA, R. Biological production of industrial chemicals, i.e. xylitol and ethanol, from lignocelluloses by controlled mixed culture systems. **Industrial Crops and Products**, v.7, p.101-111, 1998.

FELIPE, M. G. A.; ALVES, L. A.; SILVA, S. S.; ROBERTO, I. C.; MANCILHA, I. M.; SILVA, J. B. A. Fermentation of Eucaliptos hemicellulosic hydrolysate to xylitol by *Candida guilliermondii*. **Bioresource Technology**, v. 56, p. 281-283, 1996a.

FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; VITOLO, M.; ROBERTO, I. C.; SILVA, S. S.; ROSA, S. A. Preparação de xilitol por fermentação de hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana de açúcar. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 36, n.1, p. 103-114, 1993.

FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S. Environmental parameters affecting xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 18, p. 251-254, 1997b.

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

FERRARI, M. D.; NEIROTTI, E.; ALBORNOZ, C.; SAUCEDO, E. Ethanol production from eucalyptus wood hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 753-759, 1992.

FERREIRA, A. S.; BARBOSA, N. R.; SILVA, S. S. Xylitol Primary Dermal Irritation and Phototoxicity Evaluation. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.28, n.2, p.192-199, 2009.

FREEMAN, A.; LILLY, M. D. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, p. 335-345, 1998.

GARCÍA, N. Xilitol: Saborea el éxito que este prometededor endulcorante representa, y satisface un continente completo. 2005. Disponível em: <<http://www.entrepreneurespanol.com/pagina.hts?N=14614>>. Acessado em: maio 2009.

GÍRIO, F. M.; AMARO, C.; AZINHEIRA, H.; PELICA, F.; AMARAL-COLLAÇO, M. T. Polyols production during single and mixed substrate fermentations by *Debaryomyces hansenii*. **Bioresource Technology**, v.71, p. 245-51, 2000.

GONG, C. H.; GLAYPOOL, T. A.; McCRAKEN, L. D.; MAUN, C. M.; UENG, P. P.; TSAO, G. T. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 85-102, 1983.

GRAY, K. A.; ZHAO, L.; EMPTAGE, M. Bioethanol. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.10, p.141–146, 2006.

GUISELEY, K.B. Chemical and physical properties of algal polysaccharides used for cell immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v.11, p.706-716, 1989.

HERRERA, A.; TÉLLEZ-LUIS, S. J.; RAMÍREZ, J. A.; VÁZQUEZ, M. Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. **Journal of Cereal Science**, v. 37, p. 267-274, 2003.

HORITSU, H.; YAHASHI, Y.; TAKAMIZAWA, K.; KAWAI, K.; SUZUKI, T.; WATANABE, N. Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: optimization of production rate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p.1085-1091, 1992.

HOWARD, R. L.; ABOTSI, E.; Van RENSBURG, J. E. L.; HOWARD, S. Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion and enzyme production. **African Journal of Biotechnology**, v.2, n.12, p. 602-619, 2003.

HUANG, K. S.; LAI, T. H.; LIN, Y. C. Manipulating the Generation of Ca-alginate Microspheres using Microfluidic Channels-as a Carrier of Gold Nanoparticles. **Lab Chip**, v.6, p. 954–957, 2006.

IWATA, C.; NAKAGAKI, H.; MORITA, I.; SEKIYA, T.; GOSHIMA, M.; ABE, T.; ISOGAI, A.; HANAKI, M.; KUWAHARA, M.; TATEMATSU, M.; ROBINSON, C. Daily use of dentifrice with and without xylitol and fluoride: effect on glucose retention in humans in vivo. **Archives of Oral Biology**. v. 48, p. 389-395, 2003.

JANSEN, N. B.; FLICKINGER, M. C.; TSAO, G. T. Production of 2,3-butanediol from D-xylose by *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 4, p.362–369, 2004.

JIN-SEO, C. **KAIST Team Invents Xylitol Extracting Method**. The Korean Times, Korea. 2007a. Disponível em: <<http://www.koreatimes.co.kr/www/index.asp.ko>>. Acessado em: mar. 2008.

JIN-SEO, C. **Xylitol Sweetener to Be Mass-produced Via Microbe Process**. The Korean Times, Korea. 2007b. Disponível em: <<http://www.koreatimes.co.kr/www/index.asp.ko>>. Acessado em: mar. 2008.

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, v.31, n.1, p.134-143, 2008.

KHANKAL, R.; CHIN, J. W.; CIRINO, P. C. Understanding and Improving xylose utilization by *E. Coli*. Society for Industrial Microbiology Annual Meeting, Baltimore, USA, 2006. Disponível em: <http://www.che.psu.edu/Faculty/Cirino/downloads/reza_research.pdf>. Acessado em jun. 2007.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing: A perspective. **International Sugar Journal**, v.106, n.1263, p.147-150, 2004.

KOURKOUTAS, Y.; BEKATOROU, A.; BANAT, I. M.; MARCHANT, R.; KOUTINAS, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. **Food Microbiology**, v. 21, p.377–397, 2004.

KUHAD, R. C.; SINGH, A. Lignocellulose Biotechnology: Current and Future Prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.13, p. 151-173, 1993.

KUMAR, P.; BARRETT, D. M.; DELWICHE, M. J.; STROEVE, P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. **Industrial Engineering Chemical Resource.**, v.48,p. 3713–3729, 2009.

LATIF, F.; RAJOKA, M. I. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology**, v. 77, p.57-63, 2001.

LAROSA, R. **Alcoholes azúcares.** 2002. Disponível em: http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/biodie_lar/xilitol.htm. 2002. Acessado em jun. 2005.

LEATHERS, T. D. Bioconversions of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. **FEMS Yeast Research**, v.3, n.2, p. 133-140, 2003.

LEE, W.; RYU, Y.; SEO, J. Characterization of two substrate fermentation processes for xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene. **Process Biochemistry**, v.35, p. 1199-1203, 2000.

LIMA, L. H. A.; FELIPE, M. G. A.; VITOLO, M. ; TORRES, F. A. G. . Effect of acetic acid present in bagasse hydrolysate on the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in *Candida guilliermondii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 65, n. 6, p. 734-738, 2004.

LIU, H. J.; LIU, D. H.; ZHONG, J. J. Quantitative response of trehalose and glycerol syntheses by *Candida krusei* to osmotic stress of the medium. **Process Biochemistry**, v.41, p. 473-476, 2006.

LOUKATOS, P.; KANELAKI, M.; KOMAITIS, M.; ATHANASIADIS, I.; KOUTINAS, A. A. A new technological approach proposed for distillate production using immobilized cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.95, n.1, p. 35-9, 2003.

LYND, R. L.; VAN ZYL, W. H.; MCBRIDE, J. E.; LASER, M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.577–583. 2005.

MÄKINEN, K. K. The Rocky Road of Xylitol to its Clinical Application. **Journal of Dental Research**, v.79, n.6, p. 1352-1355, 2000.

MARTINEZ, E. A.; SILVA, J. B. A.; GIULIETTI, M.; SOLENZAL, A. I. N. Downstream process for xylitol produced from fermented hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology*, v.40, p.1193–1198, 2007

MARTON, J. M.; FELIPE, M. G. A.; PESSOA J. R, A. Avaliação de carvões ativos e das condições de adsorção no tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana empregando planejamento de experimentos. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 3, fev, 2003.

MARTYNENKO, N. N.; GRACHEVA, I. M.; SARISHVILI, N. G.; ZUBOV, A. AL.; EL'-REGISTAN, G. I.; LOZINSKY, V. I. Immobilization of *Champagne* Yeasts by inclusion into cryogels of polyvinyl alcohol: means of preventing cell release from the carrier matrix. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 40, n.2, 158-164, 2004.

MATOS, G. S. **Adaptação e reciclagem de *Candida guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar: efeito sobre as enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase**. 2004. 107f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2004.

MIKKOLA, J.; VAINIO, H.; SALMI, T.; SJÖHOLM, R.; OLLONQVIST, T.; VÄYRINEM, J. Deactivation kinetics of Mo-supported Raney Ni catalyst in the hydrogenation of xylose to xylitol. **Applied catalysis A: general**, v.196, n.1, p. 143-155, 2000.

MIYAFUJI, H.; DANNER, H.; NEUREITER, M.; THOMASSER, C.; BVOCHORA, J.; SZOLAR, O.; BRAUN R., Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, p. 396–400, 2003.

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

MORITA, T.; SILVA, S. S. Inhibition of microbial xylitol production by acetic acid and its relation with fermentative parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84/86, p. 801-808, 2000.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Influence of the toxic compounds present in brewer's spent grain hemicellulosic hydrolysate on xylose-to-xylitol bioconversion by *Candida guilliermondii*. **Process Biochemistry**, v. 40, n.12, p. 3801-3806, 2005.

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

NÁHLÍK, J.; PALATOVÁ, M.; GÍRIO, F.; ROSEIRO, C. Model identification and physiological control of xylitol production using *Debaryomyces hansenii*. **Process Biochemistry**, v. 38, n.12, p.1695-1705, 2003.

NEUREITER, M.; DANNER, H.; MADZINGAIDZO, L.; MIYAFUJI, H.; THOMASSER, C.; BVOCHORA, J.; BAMUSI, S.; BRAUN, R. Lignocellulose Feedstocks for the Production of Lactic Acid. **Chemical and Biochemical Engineering**, v.18, n.1, p.55–63, 2004.

NORDIC SUGAR. **Nordzucker completes acquisition of Danisco Sugar and significantly expands market position.** 2009. Disponível em: http://www.nordicsugar.com/cms/connect/info/sugar/media+centre/news/pressrelease_NZ_1.htm. Acessado em: mar. 2009.

OGBONNA, J. C.; MATSUMURA, M.; KATAOKA, H. Effective oxygenation of immobilized cells through reduction in bead diameters: a review. **Process Biochemistry**, v.26, p.109-121, 1991.

OSBEK, B.; GAYIK, S. The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. **Process Biochemistry**, v.36, p.729-741. 2001.

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

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

PAN, X.; XIE, D.; GILKES, N.; GREGG, D. J.; SADDLER, J. N. Strategies to Enhance the Enzymatic Hydrolysis of Pretreated Softwood with Content High Residual Lignin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.121/124, p. 1069-1080, 2005.

PANDEY, A.; SOCOOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCOOL, V. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**, v. 66, p. 25-40, 1998c.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 191-201, 1998a.

PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. M. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. **Bioresource Technology**, v. 65, p. 203-212, 1998b.

PARK, J. K.; CHANG, H. N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, v.18, p. 303-319, 2000.

PEREIRA, A. F. F., **Possíveis estratégias para a prevenção de otite média aguda: estudo 'in vitro' da liberação de xilitol em saliva artificial após aplicação de verniz**

em diferentes concentrações. 2007. 87f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PELLEGRINI, M. C. **inserção de centrais cogeradoras a bagaço de cana no parque energético do estado de são paulo: exemplo de aplicação de metodologia para análise dos aspectos locacionais e de integração energética.** 2002. 187f. Dissertação (Mestrado em Energia) - Programa Interunidades de Pós-Graduação em Energia – PIPGE (EP/FEA/IEE/IF), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

PETERS, M. S.; TIMMERHAUS, K. D. **Plant Design and Economics for Chemical Engineers.** 4th Edition. USA: McGraw-Hill. 1991. 150 p.

PROCKNOR, C. Subprodutos: o bagaço. **STAB, Açúcar, Álcool e Subprodutos**, v. 18, n. 4, p. 14, 2000.

QUIRÓS, C.; RENDUELES, M.; GARCÍA, L. A.; DÍAZ, M. Diffusion of microorganisms in calcium alginate beads. **Biotechnology Techniques**, v.9, p.809-14, 1995.

RAMAKRISHNA, S. V.; PRAKASHAM, R. S. Microbial fermentations with immobilized cells. **Current Science**, v. 77, n.1, 1999.

RIBEIRO, J. D. **Otimização da taxa de transferência de oxigênio na produção de xilitol por *Candida guilliermondii* FTI 20037.** 1997. 73f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 1997.

ROBERTO, I. C.; FELIPE, M. G. A.; MANCILHA, I. M.; VITOLO, M.; SATO, S.; SILVA, S. S. Xylitol production by *Candida guilliermondii* as an approach for the utilization of agro-industrial residues. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 255-257, 1995.

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

ROCHA, G. J. M. **Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assitida por oxigênio.** 2000. 136f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

RODRIGUES R. C. L. B.; SENE, L.; MATOS, G. S.; ROBERTO, I. C.; PESSOA J. R. A.; FELIPE, M. G. A. Enhanced xylitol production by recycling of *C. guilliermondii* cells in sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate. **Current Microbiology**, v. 53, p. 53-59, 2006.

RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, J. B. A.; VITOLO, M.; GÓMEZ, P.V. The influence of pH, temperature and hidrolisate concentration on the removal of volatile and non volatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.18, n.3, p. 299-311, 2001.

SAHA, B. C.; ITEN, L. B.; COTTA, M. A.; WU, V. Y. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. **Process Biochemistry**, v.40, p. 3693–3700, 2005.

SANCHEZ, B.; BAUTISTA, S. Effects of furfural and 5-hidroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. **Enzyme and Microbial technology**, v. 10, p. 315-318, 1988.

SANTOS, J. C. **Processo fermentativo de obtenção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar em reator de leito fluidizado: avaliação das condições operacionais**. 2005, 192f. Teses (Doutorado em Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2005.

SANTOS, J. C.; MUSSATTO, S. I.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Influence of aeration rate and carrier concentration on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolyzate in immobilized-cell fluidized bed reactor. **Process Biochemistry**, v. 40 p. 113–118, 2005.

SANTOS, J. C.; MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; CONVERTI, A.; SILVA, S. S. Evaluation of porous glass and zeolite as cells carriers for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. **Biochemical Engineering Journal**, v. 23, n. 1, p. 1-9. 2005a.

SARROUH, B. F.; SANTOS, D. T.; CONVERTI, A.; SILVA, S.S. Technical/economical evaluation of sugarcane bagasse for bioethanol production. **Chemical Engineering and Technology**, v. 30(2), p. 1-7. 2007.

SARROUH, B. F.; SILVA, S. S. Evaluation of the Performance of a Three-Phase Fluidized Bed Reactor with Immobilized Yeast Cells for the Biotechnological Production of Xylitol. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v.6, p. 1-15. 2008.

SCHMIDELL, W. Transferência de oxigênio em biorreatores. In: SCHMIDELL, W.; BORZANI, W; LIMA, U. A; AQUARONE, E. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v.2. 541p.

SCHUCHARDT, U.; RIBEIRO, M. L.; GONÇALVES, A. R.. A indústria petroquímica no próximo século: como substituir o petróleo como matéria-prima? **Química Nova**, v.24, n.2, p.247-251, 2001.

SENE, L.; FELIPE, M. G. A.; SILVA, S. S. Effect of environmental conditions on xylose reductase and xylitol dehydrogenase production in *Candida guilliermondii*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, p. 371-380, 2000.

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, p. 61-69, 1998.

SILVA, D. D. V.; MANCILHA, I. M.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Improvement of Biotechnological Xylitol Production by Glucose During Cultive of *Candida guilliermondii* in Sugarcane Bagasse Hydrolysate. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, n. 2, p.207-215, 2007.

SILVA, S. S.; SANTOS, J. C.; CARVALHO, W.; ARACAVA, K. K.; VITOLO, M. Use of 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, 2003.

SIRISANSANEYAKUL, S.; STANISZEWSKI, M.; RIZZIZ, M. Screening of Yeasts for Production of Xylitol from D-Xylose. **Journal of fermentation and bioengineering**, v.80, n.6, p. 565-570. 1995.

SOLEIMANI, M.; TABIL, L.; PANIGRAHI, S. **Bio-production of a Polyalcohol (Xylitol) from Lignocellulosic Resources: A Review**. In: CSBE/SCGAB 2006 ANNUAL CONFERENCE, THE CANADIAN SOCIETY FOR BIOENGINEERING, 2006. Edmonton Alberta,USA. **Book of Abstract**, The Canadian Society for Bioengineering, Edmonton Alberta, USA. Paper No. 06-106, p. 1-19.

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

TADA, K.; HORIUCHI, J.; KANNO, T.; KOBAYASHI, M. Microbial Xylitol Production from Corn Cobs Using *Candida magnolia*. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, v.98, n.3, p.228-230, 2004.

TAVARES, J. M.; DUARTE, L. C.; AMARAL-COLLAÇO, M. T.; GÍRIO, F. M. The influence of hexoses addition on the fermentation of D-xylose in *Debaromyces hansenii* under continuous cultivation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 743-747, 2000.

TEIXEIRA, F. A.; PIRES, A. V.; NASCIMENTO, N. P. V. Bagaço de cana-de-açúcar na alimentação de bovinos. **Revista eletrônica de Veterinária**. v.8, n.6, p. 1-9. 2007.

UHARI, M. T.; TAPIAINEN, T.; KONTIOKARI, T. Xylitol in preventing acute otitis media. **Vaccine**, v.19, n.1, p. 144-147, 2000.

USA. Department of Energy. **From biomass to cellulosic ethanol**. Disponível em: <http://genomicsgtl.energy.gov/biofuels/Biofuels_Placemat2.pdf>. Acessado em: Jan. 2009.

VAN ZYL, C.; PRIOR, B. A.; DU PREEZ, J. C. Production of ethanol from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.17, p. 357-369, 1988.

VERNACCHIO, L.; VEZINA, R. M.; MITCHELL, A. A. Tolerability of oral xylitol solution in young children: Implications for otitis media prophylaxis. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v.71, p.89-94, 2007.

WESTRIN B., A.; AXELSSON, A. Diffusion in gels containing immobilized cells: A critical review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n.5, p. 437-475, 2004.

WILSON, D. K.; KAVANAGH, K. L.; KLIMACEK, M.; NIDETZKY, B. The xylose reductase (AKR2B5) structure: homology and divergence from other aldo_/keto

reductases and opportunities for protein engineering. **Chemico-Biological Interactions**,. v. 143/144, p. 515-521, 2003.

WU, J. Y.; CHEN, K. C.; CHEN, C. T.; HWANG, S. J. Hydrodynamic Characteristics of immobilized cell Beeds in a liquid-Solid Fluidized-Bed Bioreactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 83, n.5, p.583-594, 2003.

ZHAO, X.; WANG, L.; LIU, D. Peracetic acid pretreatment of sugarcane bagasse for enzymatic hydrolysis: a continued work. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.83, p. 950–956, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A - CARACTERIZAÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO OBTIDO NOS ENSAIOS FERMENTATIVOS REALIZADOS

Tabela A.1 - Ensaio 1

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	80,3	6,7	8,7	3,6	0,0
24	58,5	6,3	0,0	2,3	10,1
48	43,0	6,7	0,0	0,9	18,1
72	22,0	6,5	0,0	0,0	27,4
96	5,0	6,4	0,0	0,0	41,5
120	3,0	2,3	0,0	0,0	17,0

Tabela A.2 - Ensaio 2

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	82,4	7,9	7,4	5,1	0,0
24	77,0	8,3	1,2	4,3	4,2
48	74,1	8,3	0,0	2,3	7,1
72	59,3	8,3	0,0	0,0	13,6
96	49,6	8,5	0,0	0,0	25,8
120	33,7	8,1	0,0	0,0	31,0
144	25,2	6,9	0,0	0,0	37,5
164	11,6	6,7	0,0	0,0	46,3
188	5,3	6,6	0,0	0,0	50,5

Tabela A.3- Ensaio 3

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	37,3	3,6	2,9	3,2	0,0
24	19,4	3,2	0,4	1,3	12,2
48	2,1	3,0	0,0	0,8	21,6
72	1,1	2,2	0,0	0,0	22,4

Tabela A.4- Ensaio 4

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	90,2	8,1	9,6	5,4	0,0
24	53,5	7,1	0,0	2,2	9,2
72	23,0	6,1	0,0	1,5	31,0
96	4,5	2,7	0,0	1,2	43,2
120	4,1	1,7	0,0	0,7	43,4

Tabela A.5- Ensaio 5

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	38,2	4,3	3,5	3,0	0,0
24	31,5	4,0	0,9	3,1	5,3
48	15,3	3,7	0,5	2,0	15,0
72	3,9	3,7	0,0	1,5	26,8
96	1,2	2,3	0,0	1,0	23,5

Tabela A.6- Ensaio 6

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	39,8	3,8	3,3	3,4	0,0
24	31,2	3,5	0,0	3,0	2,6
48	23,5	3,4	0,0	2,6	7,6
72	17,0	3,9	0,0	2,1	15,2
96	8,5	3,8	0,0	1,7	19,6
120	4,7	3,2	0,0	1,5	23,0

Tabela A.7- Ensaio 7

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	61,1	6,0	5,4	4,6	0,0
24	48,9	5,9	1,0	2,7	5,8
48	29,3	5,8	0,8	1,7	19,5
72	11,1	5,7	0,6	0,9	39,1
96	2,2	5,5	0,0	0,0	44,1

Tabela A.8- Ensaio 8

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	38,8	5,6	2,9	3,2	0,0
22	29,8	4,9	0,0	2,0	3,9
69	9,5	4,3	0,0	1,2	13,0
72	8,0	5,2	0,0	0,0	14,5
96	1,2	4,0	0,0	0,0	18,6

Tabela A.9- Ensaio 9

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	93,2	7,6	5,5	6,0	0,0
24	61,1	7,3	0,0	3,2	6,5
72	24,8	6,9	0,0	2,3	25,4
96	19,1	5,5	0,0	1,2	36,7
144	10,7	4,3	0,0	0,9	42,3
168	3,5	2,5	0,0	0,0	44,0

Tabela A.10- Ensaio 10

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	56,3	7,0	3,7	5,2	0,0
24	49,7	7,1	0,0	3,1	3,3
48	31,8	6,8	0,0	2,3	12,4
72	12,1	6,1	0,0	1,1	31,0
96	3,5	4,7	0,0	0,0	40,6

Tabela A.11- Ensaio 11

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	57,3	6,4	3,9	4,1	0,0
24	51,9	5,9	0,0	3,0	3,7
48	41,7	6,1	0,0	1,6	10,4
96	9,9	5,9	0,0	0,0	31,5
120	3,6	5,9	0,0	0,0	37,0

APÊNDICE B - CRESCIMENTO DE CÉLULAS LIVRES E IMOBILIZADAS NOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO REALIZADOS

Tabela B.1- Ensaio 1

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Cél. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	2,7	$2,2 \times 10^{10}$	2,7
24	5,9	6,5	$5,4 \times 10^{10}$	12,4
48	11,2	7,2	$5,8 \times 10^{10}$	18,4
72	14,9	8,5	$6,0 \times 10^{10}$	23,4
96	16,9	9,8	$6,4 \times 10^{10}$	25,7
120	20,0	10,4	$7,2 \times 10^{10}$	30,4

Tabela B.2- Ensaio 2

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Cél. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	2,1	$1,8 \times 10^{10}$	2,1
24	1,5	3,6	$3,1 \times 10^{10}$	5,1
48	2,9	4,0	$5,3 \times 10^{10}$	6,9
72	4,3	4,8	$6,0 \times 10^{10}$	9,1
96	5,5	5,4	$6,4 \times 10^{10}$	11,0
120	6,2	5,7	$6,8 \times 10^{10}$	11,9
144	6,9	6,7	$7,1 \times 10^{10}$	13,5
164	7,5	7,1	$7,8 \times 10^{10}$	14,6
188	7,9	7,7	$8,2 \times 10^{10}$	15,6

Tabela B.3- Ensaio 3

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Cél. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	2,1	$1,8 \times 10^{10}$	2,1
24	2,2	3,9	$4,4 \times 10^{10}$	6,1
48	4,8	4,0	$5,9 \times 10^{10}$	7,8
72	10,7	4,3	$6,51 \times 10^{10}$	15,0

Tabela B.4- Ensaio 4

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Cél. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	1,8	$5,9 \times 10^{09}$	2,3
24	1,8	2,1	$3,2 \times 10^{10}$	4,0
48	2,9	2,9	$3,5 \times 10^{10}$	5,8
72	4,3	3,7	$3,7 \times 10^{10}$	8,0
96	5,6	4,1	$4,0 \times 10^{10}$	8,7
120	7,0	4,2	$4,2 \times 10^{10}$	10,2

Tabela B.5- Ensaio 5

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas	No. Cél. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	1,9	$1,3 \times 10^{10}$	1,9
24	0,9	2,2	$1,6 \times 10^{10}$	3,1
48	1,7	2,6	$1,7 \times 10^{10}$	4,4
72	3,2	2,9	$1,8 \times 10^{10}$	5,1
96	4,5	3,0	$1,8 \times 10^{10}$	7,5

Tabela B.6- Ensaio 6

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Cél. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	1,6	$1,3 \times 10^{10}$	1,6
24	0,7	1,9	$1,5 \times 10^{10}$	2,6
48	1,1	2,3	$1,7 \times 10^{10}$	3,4
72	1,2	2,8	$1,8 \times 10^{10}$	4,0
96	1,4	3,8	$2,7 \times 10^{10}$	5,2
120	1,6	5,0	$3,0 \times 10^{10}$	6,6

Tabela B.7- Ensaio 7

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Cél. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	2,0	$1,9 \times 10^{10}$	2,0
24	0,8	2,9	$3,0 \times 10^{10}$	3,7
48	2,5	4,0	$4,1 \times 10^{10}$	6,5
72	4,9	4,3	$4,8 \times 10^{10}$	8,1
96	7,8	4,5	$5,3 \times 10^{10}$	12,3

Tabela B.8- Ensaio 8

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Cél. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	1,8	$1,3 \times 10^{10}$	1,8
24	1,3	2,9	$1,8 \times 10^{10}$	4,2
48	5,1	4,0	$1,9 \times 10^{10}$	9,1
72	6,1	4,4	$3,4 \times 10^{10}$	10,5
96	8,4	4,5	$3,4 \times 10^{10}$	12,9

Tabela B.9- Ensaio 9

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Cél. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	1,8	$5,9 \times 10^{10}$	2,3
24	1,6	2,1	$3,2 \times 10^{10}$	3,7
48	2,1	2,9	$3,5 \times 10^{10}$	5,0
72	2,9	3,7	$3,7 \times 10^{10}$	6,6
96	4,6	4,1	$4,0 \times 10^{10}$	8,6
120	5,0	4,2	$4,2 \times 10^{10}$	9,2
144	6,4	4,4	$4,3 \times 10^{10}$	10,8
168	9,5	4,5	$4,5 \times 10^{10}$	14,0

Tabela B.10- Ensaio 10

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Cél. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	1,7	$1,7 \times 10^{10}$	0,0
24	1,8	3,8	$4,2 \times 10^{10}$	5,6
48	5,2	4,0	$4,6 \times 10^{10}$	9,2
72	6,1	4,1	$4,7 \times 10^{10}$	10,2
96	8,2	4,4	$5,1 \times 10^{10}$	12,6

Tabela B.11- Ensaio 11

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Cél. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	1,7	$1,1 \times 10^{10}$	0,0
24	1,7	3,7	$4,2 \times 10^{10}$	5,4
48	2,3	3,8	$4,6 \times 10^{10}$	6,1
72	5,8	4,1	$4,7 \times 10^{10}$	10,0
96	8,2	4,4	$5,1 \times 10^{10}$	12,6
120	10,3	4,5	$5,4 \times 10^{10}$	14,8

APÊNDICE C - CARACTERIZAÇÃO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO OBTIDO NAS BATELADAS REPETIDAS REALIZADAS

Tabela C.1- Batelada B1

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	48,8	4,6	3,7	4,1	0,0
48	9,1	4,6	0,0	1,3	28,3
72	0,2	4,1	0,0	0,0	33,7

Tabela C.2- Batelada B2

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	46,9	4,3	3,6	3,4	0,0
24	30,6	4,1	3,2	0,0	7,6
48	23,8	4,8	2,3	0,0	20,2
72	3,7	4,1	2,2	0,0	29,8

Tabela C.3- Batelada B3

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	47,2	4,3	3,3	3,8	0,0
24	30,9	4,8	0,0	3,3	9,4
48	16,7	4,6	0,0	2,6	23,1
72	3,6	4,4	0,0	1,7	31,6

Tabela C.4- Batelada B4

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	48,7	4,7	3,6	2,8	0,0
24	23,3	5,6	0,0	2,4	18,5
48	10,2	5,7	0,0	1,3	26,3
72	4,0	5,6	0,0	0,0	29,0

Tabela C.5- Batelada B5

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	53,8	5,2	3,9	3,3	0,0
24	31,3	5,1	0,0	3,1	14,5
48	15,6	5,0	0,0	2,2	25,6
72	4,6	4,8	0,0	0,0	33,2

Tabela C.6- Batelada B6

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	49,8	4,8	3,4	4,0	0,0
24	34,6	5,4	0,0	3,2	8,9
48	15,7	5,3	0,0	2,4	22,4
72	3,8	5,0	0,0	0,0	31,3

Tabela C.7- Batelada B7

Tempo (h)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	Glicose (g/L)	Ácido acético (g/L)	Xilitol (g/L)
0	50,2	4,8	0,0	4,6	0,0
24	43,3	5,4	0,0	3,2	4,7
48	33,7	5,4	0,0	2,1	9,5
72	29,0	5,7	0,0	0,0	17,4
96	15,3	5,3	0,0	0,0	24,4
120	6,3	5,7	0,0	0,0	27,0

APÊNDICE D - CRESCIMENTO DE CÉLULAS LIVRES E IMOBILIZADAS NAS BATELADAS REPETIDAS DE FERMENTAÇÃO

Tabela D.1- Batelada B1

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Cél. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	2,1	$1,5 \times 10^{10}$	0,0
24	0,9	2,9	$4,1 \times 10^{10}$	3,8
48	2,4	3,2	$4,3 \times 10^{10}$	5,5
72	4,4	3,3	$4,8 \times 10^{10}$	7,7

Tabela D.2- Batelada B2

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Cél. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	2,8	$1,3 \times 10^{10}$	0,0
24	0,8	4,4	$3,9 \times 10^{10}$	5,2
48	1,6	4,7	$4,2 \times 10^{10}$	6,3
72	2,3	4,8	$4,4 \times 10^{10}$	7,2

Tabela D.3- Batelada B3

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Cél. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	4,4	$1,5 \times 10^{10}$	0,0
24	0,5	5,0	$3,3 \times 10^{10}$	5,5
48	1,5	5,1	$4,3 \times 10^{10}$	6,6
72	2,6	5,3	$4,8 \times 10^{10}$	7,8

Tabela D.4- Batelada B4

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Cél. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	4,6	$2,0 \times 10^{10}$	0,0
24	1,3	4,8	$2,6 \times 10^{10}$	5,3
48	1,9	5,1	$4,2 \times 10^{10}$	5,7
72	2,5	5,4	$4,6 \times 10^{10}$	7,9

Tabela D.5- Batelada B5

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Céls. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	4,7	$2,9 \times 10^{10}$	0,0
24	1,2	5,7	$4,1 \times 10^{10}$	6,9
48	1,8	5,8	$4,2 \times 10^{10}$	7,7
72	2,8	5,9	$4,4 \times 10^{10}$	8,7

Tabela D.6- Batelada B6

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Céls. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	5,3	$3,3 \times 10^{10}$	5,3
24	1,4	5,2	$3,9 \times 10^{10}$	6,6
48	2,1	5,4	$4,2 \times 10^{10}$	7,5
72	2,5	5,7	$4,4 \times 10^{10}$	8,2

Tabela D.7- Batelada B7

Tempo (h)	Células Livres (g/L)	Células Imobilizadas (g/L)	No. Céls. Imob. Viáveis (cel/mL)	Cel. Totais (g/L)
0	0,0	5,3	$2,9 \times 10^{10}$	5,3
24	1,0	5,4	$3,6 \times 10^{10}$	6,4
48	1,5	5,3	$3,4 \times 10^{10}$	6,8
72	1,7	5,3	$3,4 \times 10^{10}$	7,0
96	1,9	5,1	$3,3 \times 10^{10}$	7,0
120	2,0	5,1	$3,3 \times 10^{10}$	7,1

ANEXOS

ANEXO A - PLANILHA DE ANÁLISE TÉCNICO-ECONÔMICA DO PROCESSO BIOTECNOLÓGICO PARA A PRODUÇÃO DE XILITOL A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

	R\$	Unidades	Classe	Ocorrência	Depreciação (anos)	Depreciação (\$ Anual)	ICMS \$	PIS \$	COFINS \$
Equipamentos e Insumos da Planta Piloto de Xilitol	684.000,00								
Reator de Hidrólise	80.000,00	1	Investimento	Única	5	16.000,00	9.600,00	1.254,00	5.776,00
Concentrador	60.000,00	1	Investimento	Única	5	12.000,00	7.200,00	940,50	4.332,00
Fermentador	280.000,00	4	Investimento	Única	5	56.000,00	33.600,00	4.389,00	20.216,00
Filtro Prensa	50.000,00	1	Investimento	Única	5	10.000,00	6.000,00	783,75	3.610,00
Centrifuga	35.000,00	1	Investimento	Única	5	7.000,00	4.200,00	548,63	2.527,00
Caldeira de vapor	40.000,00	1	Investimento	Única	5	8.000,00	4.800,00	627,00	2.888,00
Bomba a vácuo	4.000,00	1	Investimento	Única	5		480,00	62,70	288,80
Compressor	5.000,00	1	Investimento	Única	5	1.000,00	600,00	78,38	361,00
Tanque de Cal (CaO)	10.000,00	1	Investimento	Única	5	2.000,00	1.200,00	156,75	722,00
Tanque de Carvão	10.000,00	1	Investimento	Única	5	2.000,00	1.200,00	156,75	722,00
HPLC	110.000,00	1	Investimento	Única	5	22.000,00	13.200,00	1.724,25	7.942,00
Equipamentos Esc. de Lab. Planta Piloto de Xilitol	68.900,00								
Microcomputador (internet)	5.000,00	2	Investimento	Única	3	1.666,67	600,00	78,38	361,00
Impressora	800,00	2	Investimento	Única	3	266,67	96,00	12,54	57,76
Mesa, cadeiras, bancos	3.000,00	1	Investimento	Única	5	600,00	360,00	47,03	216,60
Fluxo laminar	7.000,00	1	Investimento	Única	5	1.400,00	840,00	109,73	505,40
Capela de exaustão	2.400,00	1	Investimento	Única	5	480,00	288,00	37,62	173,28
Agitador mecânico	8.000,00	1	Investimento	Única	5	1.600,00	960,00	125,40	577,60
Agitador magnético	800,00	1	Investimento	Única	5	160,00	96,00	12,54	57,76
Agitador de tubos	2.500,00	1	Investimento	Única	5	500,00	300,00	39,19	180,50
Estufa	5.000,00	1	Investimento	Única	5	1.000,00	600,00	78,38	361,00

Balança analítica	3.300,00	1	Investimento	Única	5	660,00	396,00	51,73	238,26
Balança semi-analítica	2.200,00	1	Investimento	Única	5	440,00	264,00	34,49	158,84
Purificador de água (osmose reversa)	2.000,00	1	Investimento	Única	5	400,00	240,00	31,35	144,40
Autoclave	4.700,00	1	Investimento	Única	5	940,00	564,00	73,67	339,34
Espectrofotômetro e cubetas	8.000,00	1	Investimento	Única	5	1.600,00	960,00	125,40	577,60
Geladeira	1.500,00	2	Investimento	Única	5	300,00	180,00	23,51	108,30
Freezer	2.000,00	1	Investimento	Única	5	400,00	240,00	31,35	144,40
Mesa agitadora incubadora	6.500,00	1	Investimento	Única	5	1.300,00	780,00	101,89	469,30
pHmetro	700,00	1	Investimento	Única	5	140,00	84,00	10,97	50,54
Microscópio (câmara de newbauer incluído)	3.500,00	1	Investimento	Única	5	700,00	420,00	54,86	252,70

CUSTO DE AQUISIÇÃO DE EQUIPAMENTOS	R\$ 752.900,00					150.553,33	90.348,00	11.801,71	54.359,38
---	-----------------------	--	--	--	--	-------------------	------------------	------------------	------------------

Custos	%	Valor (R\$)
<i>Custos Diretos</i>		
Aquisição dos Equipamentos	100	752.900,0
Instalação do Equipamento	9	67.761,00
Instalação de Tubulações	8	60.232,00
Instalações Elétricas	5	37.645,00
Manutenção	10	75.290,00
<i>Custos Indiretos</i>		
Engenharia e Pesquisa	10	75.290,00
Gastos de Construção	12	90.348,00
Contingências	8	60.232,00
CAPITAL FIXO DE INVESTIMENTO		1.219.698,00

Rendimento do Processo - Xarope 80% Pureza	58,0	Litros / Ton Bagaço
Rendimento do Processo - Granulado	0,80	Kg Xilitol/ Litro Xarope
<i>OBS: Estudo somente para a produção do xarope</i>		
Custo Bagaço	25,00	R\$ / Tonelada
Processo	1,0	Tonelada de Bagaço / Batelada
Capacidade do Processo	1,0	Tonelada de Bagaço / Dia
Capacidade de Processamento do Bagaço	240,0	Ton / Ano
Subproduto: Celulose-Lignina	700,00	Kg / Ton Bagaço
Biomassa Microbiana	20,00	Kg / Ton Bagaço
Consumo Materiais (Reagentes, etc) - R\$ por Batelada	3.793,94	
Custos com Mão-de-Obra		
Técnicos	3	
Nível-Educação Nível Superior/Responsável	1	
Total de Salários	8.000,00	
Encargos	5.200,00	
TT Salário	13.200,00	
Gasto TT Anual com Mão de Obra (13 meses)	171.600,00	
RESUMO DE CUSTOS		
Gasto TT Anual com Mão de Obra	171.600,00	
Gasto Anual com Bagaço	6.000,00	
Venda Celulose (R\$ 25 a Tonelada)	(4.200,00)	
Venda de Biomassa (R\$ 1000 a Tonelada)	(4.800,00)	
Movimentação de Materiais (1% da Depreciação)	1.505,53	
Frete (R\$ 0.9 por Km rodado) Km= 30	6.480,00	
Custo Total de Produção- Total Ano (R\$)	910.545,97	
	1.087.131,51	
Produção Anual - Litros de Xarope	13.920,00	

Custo do xarope de Xilitol (80% de pureza)- R\$ / Litro **78,10**

MARGEM DE CONTRIBUIÇÃO

Venda Líquida (Net Sale) - R\$ / Litro	148,99
Produção Anual -Litros de Xarope	13.920
Faturamento Líquido Anual - R\$	2.073.912,55
Custo Anual Total	(1.087.131,51)
Margem de Contribuição Total (R\$)	986.781,05
Margem de Contribuição Unitária (R\$ / Litro)	70,89
Margem de Contribuição %	47,6%

Mercado

Xilitol Puro Granulado	175,00	US\$ / Kilo	Ao consumidor, Colocado no Brasil
Xarope Xilitol 80% Pureza	93,00	US\$ / Litro	Ao consumidor, Colocado no Brasil

Mercado Interno pode absorver toda a produção

Dólar Considerado **2,30** **R\$ / US\$**

Composição do Preço de Venda - Mercado Interno

Xarope 80% Pureza

Valor Total Nota (R\$)	213,90	Impostos Mercado Interno	Mercado Interno
IPI	10,19	IPI	5,00%
ICMS	38,50	ICMS	18,00%
PIS	2,89	PIS	1,65%
COFINS	13,33	COFINS	7,60%
TT Impostos	64,91	Total valor de impostos	30,60%
Venda Líquida (Net Sale) - R\$ / Litro	148,99		

Premissas

- Investimento em R\$
- Taxa Atratividade

1.219.698
12%

Câmbio considerado no Estudo	2,30	R\$ / US\$
---	-------------	-------------------

Retorno do Projeto

	1o. Ano	2o. Ano	3o. Ano	4o. Ano	5o. Ano
Margem de Contribuição Anual do Projeto	986.781	986.781	986.781	986.781	986.781
Crédito de Impostos do Investimento Inicial	39.127	39.127	39.127	39.127	-
Ganho Total do Projeto	1.025.908	1.025.908	1.025.908	1.025.908	986.781

	1º ANO	2º ANO	3º ANO	4º ANO	5º ANO
GANHO TOTAL (R\$)	1.025.908	1.025.908	1.025.908	1.025.908	986.781
DEPRECIAÇÃO (R\$)	150.553	150.553	150.553	150.553	150.553
BASE PARA CÁLCULO DO IR	875.355	875.355	875.355	875.355	836.228
IMPOSTO DE RENDA (IR = 34%)	(297.621)	(297.621)	(297.621)	(297.621)	(284.317)
GANHO TOTAL (Menos IR) (R\$)	577.734	577.734	577.734	577.734	551.910
DEPRECIAÇÃO (R\$)	150.553	150.553	150.553	150.553	150.553
GANHO TOTAL ANUAL (R\$)	728.288	728.288	728.288	728.288	702.464

<u>FLUXO DE CAIXA</u>	0	1	2	3	4	5	TOTAL
	R\$	R\$	R\$	R\$	R\$	R\$	R\$
Investimentos	(1.219.698)						
Ganho Total Anual		728.288	728.288	728.288	728.288	702.464	3.615.614
Fluxo de Caixa Líquido	(1.219.698)	728.288	728.288	728.288	728.288	702.464	2.395.916
Fluxo de Caixa Descontado		650.257	580.586	518.381	462.840	398.597	1.390.963
Fluxo de Caixa Líq. Acum.	(1.219.698)	(491.410)	236.877	965.165	1.693.452	2.395.916	
Fluxo de Caixa Desc. Acum.		(569.441)	11.145	529.526	992.366	1.390.963	
PAY BACK =	24	Meses					
TIR (taxa interna de retorno) (5anos) =	52,3%	ao ano					
						Ganho Médio Anual	723.123

Valor Presente Líquido (VPL) = R\$ 1,390,963

ANEXO B - FLUXOGRAMA DO PROCESSO MODIFICADO PARA A PRODUÇÃO DE XILITOL

ANEXO C – PLANILHA DE ANÁLISE TÉCNICO-ECONÔMICA DO PROCESSO MELHORADO PARA A PRODUÇÃO DE XILITOL A PARTIR DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

	R\$	Unidades	Classe	Ocorrência	Depreciação (anos)	Depreciação (\$ Anual)	ICMS \$	PIS \$	COFINS \$
Equipamentos Permanente da Planta Piloto de Xilitol	824.000,00								
Reator de Hidrólise	80.000,00	1	Investimento	Única	5	16.000,00	9.600,00	1.254,00	5.776,00
Concentrador	60.000,00	1	Investimento	Única	5	12.000,00	7.200,00	940,50	4.332,00
Coluna de Resinas	40.000,00	4	Investimento	Única	5	8.000,00	4.800,00	627,00	2.888,00
Fermentador	400.000,00	4	Investimento	Única	5	80.000,00	48.000,00	6.270,00	28.880,00
Filtro Prensa	50.000,00	1	Investimento	Única	5	10.000,00	6.000,00	783,75	3.610,00
Centrifuga	35.000,00	1	Investimento	Única	5	7.000,00	4.200,00	548,63	2.527,00
Caldeira de vapor	40.000,00	1	Investimento	Única	5	8.000,00	4.800,00	627,00	2.888,00
Bomba a vácuo	4.000,00	1	Investimento	Única	5	800,00	480,00	62,70	288,80
Compressor	5.000,00	1	Investimento	Única	5	1.000,00	600,00	78,38	361,00
HPLC	110.000,00	1	Investimento	Única	5	22.000,00	13.200,00	1.724,25	7.942,00
Equipamentos Esc. de Lab. Planta Piloto de Xilitol	60.900,00								
Microcomputador (internet)	5.000,00	2	Investimento	Única	3	1.666,67	600,00	78,38	361,00
Impressora	800,00	2	Investimento	Única	3	266,67	96,00	12,54	57,76
Mesa, cadeiras, bancos	3.000,00	1	Investimento	Única	5	600,00	360,00	47,03	216,60
Fluxo laminar	7.000,00	1	Investimento	Única	5	1.400,00	840,00	109,73	505,40
Capela de exaustão	2.400,00	1	Investimento	Única	5	480,00	288,00	37,62	173,28
Agitador magnético	800,00	1	Investimento	Única	5	160,00	96,00	12,54	57,76
Agitador de tubos	2.500,00	1	Investimento	Única	5	500,00	300,00	39,19	180,50
Estufa	5.000,00	1	Investimento	Única	5	1.000,00	600,00	78,38	361,00
Balança analítica	3.300,00	1	Investimento	Única	5	660,00	396,00	51,73	238,26
Balança semi-analítica	2.200,00	1	Investimento	Única	5	440,00	264,00	34,49	158,84

Purificador de água (osmose reversa)	2.000,00	1	Investimento	Única	5	400,00	240,00	31,35	144,40
Autoclave	4.700,00	1	Investimento	Única	5	940,00	564,00	73,67	339,34
Espectrofotômetro e cubetas	8.000,00	1	Investimento	Única	5	1.600,00	960,00	125,40	577,60
Geladeira	1.500,00	2	Investimento	Única	5	300,00	180,00	23,51	108,30
Freezer	2.000,00	1	Investimento	Única	5	400,00	240,00	31,35	144,40
Mesa agitadora incubadora	6.500,00	1	Investimento	Única	5	1.300,00	780,00	101,89	469,30
pHmetro	700,00	1	Investimento	Única	5	140,00	84,00	10,97	50,54
Microscópio (câmara de newbauer incluído)	3.500,00	1	Investimento	Única	5	700,00	420,00	54,86	252,70
CUSTO DE AQUISIÇÃO DE EQUIPAMENTOS R\$	884.900,00					177.753,33	106.188,00	13.870,81	63.889,7

Capital Fixo de Investimento		
<i>Custos Diretos</i>	%	Valor (R\$)
Aquisição dos Equipamentos	100	884.900,00
Instalação do Equipamento	9	79.641,00
Instalação de Tubulações	8	70.792,00
Instalações Elétricas	5	44.245,00
Manutenção	10	88.490,00
<i>Custos Indiretos</i>		
Engenharia e Pesquisa	10	88.490,00
Gastos de Construção	12	106.188,00
Contingências	8	70.792,00
CAPITAL FIXO DE INVESTIMENTO		1.433.538,00

Rendimento do Processo - Xarope 80% Pureza	128	Litros / Ton Bagaço
Rendimento do Processo - Granulado	0,80	Kg Xilitol/ Litro Xarope
<i>OBS: Estudo somente para a produção do xarope</i>		
Custo Bagaço	25,00	R\$ / Tonelada
Processo	1,0	Tonelada de Bagaço / Batelada
Capacidade do Processo	1,0	Tonelada de Bagaço / Dia
Capacidade de Processamento do Bagaço	240,0	Ton / Ano
Subproduto: Celulose-Lignina	700,00	Kg / Ton Bagaço
Biomassa Microbiana	20,00	Kg / Ton Bagaço
Consumo Materiais (Reagentes, etc) - R\$ por Batelada	6.101,80	

Custos com Mão-de-Obra

Técnicos	3
Nível-Educação Nível Superior/Responsável	1
Total de Salários	8.000,00
Encargos	5.200,00
TT Salário	13.200,00
Gasto TT Anual com Mão de Obra (13 meses)	171.600,00

RESUMO DE CUSTOS

Gasto TT Anual com Mão de Obra	171.600,00
Gasto Anual com Bagaço	6.000,00
Venda Celulose (R\$ 25 a Tonelada)	(4.200,00)
Venda de Biomassa (R\$ 1000 a Tonelada)	(4.800,00)
Movimentação de Materiais (1% da Depreciação)	1.777,53
Frete (R\$ 0.9 por Km rodado) Km= 30	6.480,00
Custo Total de Produção- Total Ano (R\$)	1.464.432,77
	1.641.290,31
Produção Anual - Litro de Xarope	30.720,00
Custo do xarope do xilitol (80% de pureza) - R\$ / Litro	53,43

MARGEM DE CONTRIBUIÇÃO

Venda Líquida (Net Sale) - R\$ / Litro	91,32
Produção Anual -Litros de Xarope	30.720
Faturamento Líquido Anual - R\$	2.805.203,19
Custo Anual Total	(1.641.290,31)
Margem de Contribuição Total (R\$)	1.163.912,88
Margem de Contribuição Unitária (R\$ / Litro)	37,89
Margem de Contribuição %	41,5%

Mercado

Xilitol Puro Granulado	175,00	US\$ / Kilo	Ao consumidor, Colocado no Brasil
Xarope Xilitol 80% Pureza	57,00	US\$ / Litro	Ao consumidor, Colocado no Brasil

Mercado Interno pode absorver toda a produção

Dólar Considerado	2,30	R\$ / US\$
-------------------	------	------------

Composição do Preço de Venda - Mercado Interno

Xarope 80% Pureza	
Valor Total Nota (R\$)	131,10
IPI	6,24
ICMS	23,60
PIS	1,77
COFINS	8,17
TT Impostos	39,78
Venda Líquida (Net Sale) - R\$ / Litro	91,32

Impostos Mercado Interno

Mercado

Mercado Externo

	Interno	
IPI	5,00%	0,00%
ICMS	18,00%	0,00%
PIS	1,65%	0,00%
COFINS	7,60%	0,00%
Total valor de impostos	30,60%	

Premissas

- Investimento em R\$
- Taxa Atratividade

1.433.538
12%

**Câmbio considerado
no Estudo**

2,30

R\$ / US\$

Retorno do Projeto		1o. Ano	2o. Ano	3o. Ano	4o. Ano	5o. Ano
Margem de Contribuição Anual do Projeto		1.163.913	1.163.913	1.163.913	1.163.913	1.163.913
Crédito de Impostos do Investimento Inicial		45.987	45.987	45.987	45.987	-
Ganho Total do Projeto		1.209.900	1.209.900	1.209.900	1.209.900	1.163.913

	1º ANO	2º ANO	3º ANO	4º ANO	5º ANO
GANHO TOTAL (R\$)	1.209.900	1.209.900	1.209.900	1.209.900	1.163.913
DEPRECIACÃO (R\$)	177.753	177.753	177.753	177.753	177.753
BASE PARA CÁLCULO DO IR	1.032.147	1.032.147	1.032.147	1.032.147	986.160
IMPOSTO DE RENDA (IR = 34%)	(350.930)	(350.930)	(350.930)	(350.930)	(335.294)
GANHO TOTAL (Menos IR)	681.217	681.217	681.217	681.217	650.865

(R\$)					
DEPRECIACÃO (R\$)	177.753	177.753	177.753	177.753	177.753
GANHO TOTAL ANUAL (R\$)	858.970	858.970	858.970	858.970	828.619

<u>FLUXO DE CAIXA</u>	0	1	2	3	4	5	TOTAL
	R\$	R\$	R\$	R\$	R\$	R\$	R\$
Investimentos	(1.433.538)						
Ganho Total Anual		858.970	858.970	858.970	858.970	828.619	4.264.499
Fluxo de Caixa Líquido	(1.433.538)	858.970	858.970	858.970	858.970	828.619	2.830.961
Fluxo de Caixa Descontado		766.938	684.766	611.398	545.891	470.180	1.645.635
Fluxo de Caixa Liq. Acum.	(1.433.538)	(574.568)	284.402	1.143.372	2.002.343	2.830.961	
Fluxo de Caixa Desc. Acum.		(666.600)	18.165	629.563	1.175.454	1.645.635	
PAY BACK =	24	Meses					
TIR (5 anos) =	52,5%	ao ano					

Ganho Médio Anual	852.900
--------------------------	----------------

Valor Presente Líquido (VPL) = R\$ 1,645,635