



Potencialidades do uso de Manoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae* como fonte de produtos para indústria vinícola

Bernardo Alves Cinelli

Eduardo Augusto Henriques Figueiredo

Projeto Final de Curso

Orientadores

Prof.^ª Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

Prof. Daniel Weingart Barreto, D.Sc.

Fevereiro de 2010

**POTENCIALIDADES DO USO DE MANOPROTEÍNAS DE
Saccharomyces cerevisiae COMO FONTE DE PRODUTOS
PARA INDÚSTRIA VINÍCOLA**

Bernardo Alves Cinelli

Eduardo Augusto Henriques Figueiredo

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Aprovado por:

Bernardo Dias Ribeiro, MSc.

Estevão Freire, DSc.

Tatiana Felix Ferreira, MSc.

Orientado por:

Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

Daniel Weingart Barreto, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ – Brasil

Fevereiro de 2010

Cinelli, B. A.

Figueiredo, E. A. H.

Potencialidades do uso de manoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae* como fonte de produtos para indústria vinícola / Bernardo Alves Cinelli, Eduardo Augusto Henriques Figueiredo. UFRJ/EQ, 2010.

xi, 94. p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2010.

Orientadores: Andréa Medeiros Salgado e Daniel Weingart Barreto.

1. Manoproteína. 2. Vinicultura. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Monografia.
(Graduação – UFRJ/EQ). 5. Andréa Medeiros Salgado. D.Sc. e Daniel Weingart Barreto. D.Sc.

"A sabedoria da natureza é tal que não produz nada de supérfluo ou inútil"

Nicolau Copérnico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaríamos de agradecer aos nossos orientadores Prof. Daniel Weingart Barreto e Prof.^a Andréa Medeiros Salgado, pelas informações, e conhecimento.

Um agradecimento a todos do Laboratório de sistemas biológicos imobilizados (E-122) especialmente à Ariana aluna de doutorado da Prof.^a Andréa, que teve paciência e não se importou com nossa constante presença no laboratório.

Ao aluno de doutorado do Prof. Daniel, Bernardo Dias Ribeiro, homônimo de um dos que aqui vos escreve.

À professora Priscilla Filomena F. Amaral, pelo uso da enzima (Lyticase).

Ao professor Márcio Nele de Souza, pelo uso do equipamento para os testes de tensão superficial.

A todos nossos amigos da faculdade, por acaso os mesmos, pela boa companhia e conversas sempre interessantes e produtivas, em especial à Nádia Helena Lima pelos conselhos e por dedicar seu tempo à leitura deste trabalho, que também é namorada do Bernardo.

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos

POTENCIALIDADES DO USO DE MANOPROTEÍNAS DE *Saccharomyces cerevisiae* COMO FONTE DE PRODUTOS PARA INDÚSTRIA VINÍCOLA

Bernardo Alves Cinelli
Eduardo Augusto Henriques Figueiredo
Fevereiro, 2010

Orientador: Prof. Daniel Weingart Barreto, D.Sc.

Outros orientadores: Prof.^a Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

Este trabalho propõe uma alternativa que visa agregar valor à biomassa de levedura proveniente de rejeitos de processos fermentativos. A célula de levedura *Saccharomyces cerevisiae*, em especial sua parede celular, constituiu-se como fonte de moléculas bioativas, como as beta glucanas e as manoproteínas, sendo estas uma classe de proteínas altamente glicolisadas.

A partir da análise das diversas aplicações dos componentes da parede celular de leveduras, nas mais diversas áreas, as manoproteínas apresentam enfoque especial, já que mostram uma potencial aplicabilidade na indústria vinícola como estabilizante da cor, aroma e dos sais tartáricos presentes no vinho. Além de apresentar uma vantagem importante que é sua origem natural.

Para obtenção das manoproteínas, foram realizados alguns métodos para promover o rompimento celular e sua separação da parede celular incluindo lises térmicas e enzimáticas. O método térmico de obtenção de manoproteínas de parede celular de leveduras que demonstrou melhores resultados teve um rendimento de 7,9% em relação ao peso seco de levedura e mostrou boa ação emulsificante.

Foi projetada ainda uma operação em larga escala (*scale-up* do processo de bancada). Tal operação foi alvo de uma análise de viabilidade econômica, que compreendeu o estabelecimento de um mercado alvo para o produto e estimativas de investimento necessário e custo de produção total, gerando subsídios para realizar a projeção do fluxo de caixa e utilizar indicadores de viabilidade econômica, como a taxa interna de retorno (TIR) e o valor presente líquido (VPL), mostrando que se trata de um projeto atrativo.

O projeto ainda foi submetido a uma análise de sensibilidade, visando mensurar a robustez dos resultados, diante de mudanças em parâmetros, como o preço de venda do produto e de compra de insumos.

ÍNDICE

Capítulo I – Introdução	1
Capítulo II – Objetivos geral e específicos.....	4
Capítulo III – Revisão bibliográfica	5
III.1) Problemática: "desperdício" de um recurso, as leveduras <i>Saccharomyces</i> geradas como resíduo de processos fermentativos	5
III.2) Bioquímica e Biologia celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
III.3) Aplicações atuais e potenciais das leveduras e seus componentes.....	12
III.3.1) Indústria alimentícia	12
III.3.2) Indústria cosmética.....	15
III.3.3) Medicina	15
III.3.4) Indústria de fertilizantes	16
III.3.5) Indústria vinícola.....	16
III.4) As rotas existentes de extração de manoproteínas da parede celular de leveduras.....	23
Capítulo IV – Procedimentos experimentais.....	29
IV.1) Rotas propostas e testadas.....	29
IV.1.1) Rota 1 de obtenção.....	29
IV.1.2) Rota 2 de obtenção.....	30
IV.1.3) Nossas propostas alternativas à lise térmica.....	32
IV.2) Materiais e métodos.....	32
IV.2.1) Obtenção das frações pelos diferentes métodos	32
IV.2.2) Métodos analíticos	35
IV.2.3) Testes de caracterização das amostras obtidas.....	36
Capítulo V – Resultados e Discussão	38
V.1) Extração e purificação das manoproteínas.....	38
V.2) Rendimento	41
V.3) Caracterização das manoproteínas obtidas.....	42
V.3.1) Resultados do teste de emulsificação	43
V.3.2) Testes de tensão superficial.....	46

Capítulo VI – Análise do mercado	49
VI.1) Avaliações do possível mercado consumidor de manoproteínas	49
VI.2) O mercado de vinho	49
VI.3) Panorama do mercado de vinhos no Brasil	51
VI.4) O mercado de vinho nos outros países componentes do MERCOSUL e associados.....	53
VI.5) A segmentação proposta em números	54
Capítulo VII – Dimensionamento de equipamentos	58
VII.1) Processo proposto	58
VII.2) Dimensionamento dos equipamentos principais	61
VII.2.1) <i>Reator encamisado com agitação</i>	61
VII.2.2) <i>Trocador de calor</i>	62
VII.2.3) <i>Centrífuga</i>	64
VII.2.4) <i>Decantador</i>	65
VII.2.5) <i>Tanque de armazenamento</i>	66
VII.2.6) <i>Liofilizador</i>	66
Capítulo VIII – Análise econômica do processo.....	67
VIII.1) Investimento: suas parcelas	68
VIII.2) Estimativa do investimento total.....	69
VIII.2.1) <i>Custos dos equipamentos</i>	71
VIII.3) Estimativa dos custos de produção	73
VIII.3.1) <i>Custos de manufatura inerentes ao projeto em questão</i>	74
VIII.4) Estimativa do preço de venda dos produtos produzidos.....	79
VIII.5) Fluxo de Caixa e análise de viabilidade	80
VIII.6) Análise de Sensibilidade	83
Capítulo IX – Considerações finais e Perspectivas futuras	86
Bibliografia:.....	88
Anexo	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Imagens de Canavial e usina de álcool. Fonte: www.copersucar.com.br	6
Figura 2 - Representação da arquitetura da parede celular onde em (A) temos um módulo e em (B) temos uma associação dos mesmos. Fonte: Lipke (1998).....	8
Figura 3 - Representação do monômero da β -1,3 glucana. Fonte: Fleuri, 2005	9
Figura 4 - Representação do monômero (m) da β -1,6 glucana. Fonte: Fleuri, 2005.....	9
Figura 5 - Representação monomérica da quitina. Fonte: Fleuri, 2005	10
Figura 6 - Tipos de ligação entre as frações protéica e carboidrato extraída de I. Corbacho <i>et al.</i> , 2005.	11
Figura 7 - Borra de vinho tinto merlot após fermentação. fonte: www.veritaswinery.com	17
Figura 8 - Efeito protetor de polissacarídeo sobre a estabilidade de colóides. Fonte: Darricarrère, 2006.....	21
Figura 9 - Estrutura da micotoxina ochratoxina A. Fonte: Caride, 2006	22
Figura 10 - Diagrama de blocos processo proposto adaptado de Charpentier <i>et al.</i> (2000).....	24
Figura 11 – Diagrama do processo proposto por Freidmund. (adaptado de Freidmund <i>et al.</i> , 2003).....	25
Figura 12 - Diagrama de blocos processo proposto por Chaud e Scarbiere (2006)	26
Figura 13 – Diagrama Leseffre. Fonte: Patente número EP1094117A depositada pela empresa lesaffre	27
Figura 14 - Diagrama DSM (adaptado de patente número WO2006/067145 A1)	28
Figura 15 - Fluxograma da Rota 1 de obtenção de manoproteínas de <i>S. cerevisiae</i>	30
Figura 16 – Fluxograma da Rota 2 de obtenção de manoproteínas de <i>S. cerevisiae</i>	31
Figura 17 – Curva padrão do método de dosagem açucares totais aplicando padrões de manose	35
Figura 18 - Composição das amostras obtida pelos diversos métodos utilizados de extração ..	38
Figura 19 – Foto da amostra ML1 liofilizada	40
Figura 20 – Foto da amostra ML2 liofilizada	41
Figura 21 - Foto da amostra ML2/Enzimática liofilizada	41
Figura 22 – Emulsão (de clorofórmio) formada pela solução contendo ML1	43
Figura 23 - Gráfico resultante do teste de emulsificação para amostra ML1	44

Figura 24 - Teste de emulsificação para amostra ML2 liofilizada.....	44
Figura 25 - Teste de emulsificação para amostra ML2 enzimática.....	45
Figura 26 - Gráfico tensão superficial em função concentração da amostra ML1	46
Figura 27 – Teste de tensão superficial em função concentração da amostra ML1	47
Figura 28 Comparação entre os agentes emulsificantes obtidos (ML2,ML2/Enz eML1) e os comerciais quanto a tensão superficial.....	48
Figura 29 – Imagem de parreiral da casta <i>vitis vinifera</i> . Fonte: www.botanical.com	52
Figura 30 – Evolução da produção de vinhos finos no Brasil. Fonte: Adaptado de União Brasileira de Vitivinicultura – Uvibra, Instituto Brasileiro do Vinho – Ibravin.	55
Figura 31 - Processo proposto para extração de manoproteínas em laboratório	59
Figura 32 - Fluxograma do processo proposto para produção de manoproteínas em larga escala	60
Figura 33 - Estrutura do investimento total em uma planta industrial.....	68
Figura 34 - Classificação dos diversos custos relacionados à operação de uma planta química (adaptado de Timmerhaus e Peters, 1980).....	74
Figura 35 – Exemplo de creme de levedura proveniente de uma usina sucroalcooleira. Fonte: ethanolbrasil.blogspot.com	75
Figura 36 - Saldo de caixa acumulado em (R\$ Mil)	83
Figura 37 – Influência do preço da matéria-prima no Custo Total de produção.....	84
Figura 38 – Análise de sensibilidade da TIR frente a variações em determinados parâmetros .	85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição típica da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . (adaptado de Magnelli, 2002)	7
Tabela 2 - Composição centesimal aproximada das células de levedura íntegras; do autolisado total; do extrato de levedura e da fração parede celular; todos em base seca	13
Tabela 3 – Quantificação de açúcares e proteína em nossas amostras	38
Tabela 4 – Rendimentos em % (p/p) para as amostras liofilizadas obtidas pelos diferentes métodos de extração (ML1, ML2 e ML2/Enz.)	41
Tabela 5 - Produção mundial de vinho (em 10 ⁵ litros)	50
Tabela 6 - Produção de vinhos no estado do Rio Grande do Sul, em milhões de litros	51
Tabela 7 - Produção de vinho no ano de 2006 por países, em 10 ⁶ litros	53
Tabela 8 - Evolução da Produção de vinho por países no período de 2005 a 2008, em milhões de litros. Entre parêntesis dados da produção de vinho fino.	54
Tabela 9 - Projeção da produção de vinho a ser absorvida em nosso planejamento, em milhões de litros.....	56
Tabela 10 - Estimativa de produção de manoproteínas por ano	57
Tabela 11 - Equipamentos presentes no processo em larga escala	60
Tabela 12 - Descrição das correntes presentes no processo em larga escala	61
Tabela 13 - Componentes do investimento fixo (adaptado de Timmerhaus e Peters)	69
Tabela 14 - Métodos de estimativa do ISBL	70
Tabela 15 - Custos de todos os equipamentos da planta para produção de manoproteínas	72
Tabela 16 - Fatores de Lang	72
Tabela 17 - Valor de ISBL e OSBL obtido para o processo, investimento total e suas parcelas..	73
Tabela 18 – Parcelas do custo de manufatura para nosso 1º Ano de operação	76
Tabela 19 - Parcelas do custo de manufatura para nosso 2º Ano de operação	77
Tabela 20 - Parcelas do custo de manufatura para nosso 3º Ano de operação	78
Tabela 21 - Estimativas dos custos gerais	79
Tabela 22 – Parcelas do Custo Total de Produção para os três primeiros anos	79
Tabela 23 - Preços de mercado produtos concorrentes	80
Tabela 24 – TIR e VPL do nosso projeto	82

Capítulo I – Introdução

A história da associação de leveduras com a sociedade humana está diretamente relacionada com a evolução do pão, da cerveja e do vinho como alimentos e bebidas, originadas há cerca de 5.000 anos atrás. As primeiras observações de células de levedura foram relatadas por Antonie van Leeuwenhoek em meados do século XVII. O significado destes achados permaneceu obscuro até os estudos clássicos de Pasteur e Hansen durante a segunda metade do século XIX, o que anunciava o início das disciplinas de microbiologia e bioquímica. Desde 1950, vários textos clássicos especificamente destacaram a importância comercial e cultural de leveduras em alimentos e bebidas. (Fleet, 2006).

As leveduras são fungos unicelulares, eucarióticos, e que muito contribuíram para o processo científico, principalmente biotecnológico, e hoje estão dentre os microrganismos mais explorados comercialmente. Suas propriedades biológicas e metabólicas são empregadas desde a antiguidade para elaboração de produtos fermentados, como pães, cervejas e vinhos. Atualmente, o potencial de leveduras extrapola a produção de alimentos e seus produtos biotecnológicos são utilizados em indústrias químicas, farmacêuticas, agrícolas, de biocombustíveis e na área ambiental. (Gaspar, 2008). Dentre as principais espécies de leveduras pode-se destacar a *Saccharomyces cerevisiae*.

As células de levedura possuem uma parede celular robusta, responsável por fornecer proteção física e suporte osmótico, que representa 20 a 25% do peso seco da célula (Montijn *et. al.*, 1994).

Os principais componentes das paredes das células fúngicas são polissacarídeos e glicoproteínas, sendo para *S. cerevisiae*, bem como para a maioria das outras leveduras, a parede constituída por cerca de 85 a 90% de polissacarídeos e 10 a 15% de proteína. Os principais componentes das paredes das células fúngicas são polissacarídeos e glicoproteínas, sendo que para *S. cerevisiae*, bem como para a maioria das outras leveduras, a parede é constituída por cerca de 85 a 90% de polissacarídeos e 10 a 15% de proteína.

A resistência mecânica da parede é devida principalmente à camada interna, que consiste em β 1,3-glucana e quitina, que representam cerca de 50 a 60% do peso

seco da parede (Klis *et al.*, 2002). O outro componente presente são as proteínas glicosiladas, em especial as manoproteínas, elas representam cerca de 30 a 50% do peso seco da parede celular. Suas propriedades imunoestimulantes e bioemulsificantes, além de estabilidade protéica, de compostos fenólicos e tartárica, vêm sendo relatadas (Cameron *et al.*, 1988; Jensen *et al.*, 2008; Lubbers *et al.*, 1994; Dupin *et al.*, 2000), tornando-as consideravelmente atrativas para aplicação industrial.

As leveduras vem sendo utilizadas para panificação e produção de etanol há milhares de anos, e estima-se que a produção mundial é superior a 2,5 milhões de toneladas (Freimund, 2003). Apesar disso, em alguns processos industriais a levedura atua apenas como agente de transformação, sendo descartada após a produção. Nas indústrias de cerveja, vinho e destilarias de etanol são gerados grandes excedentes de levedura, que são normalmente descartados ou usados somente como ração animal.

Assim sendo, o desenvolvimento de metodologias para extração de manoproteínas é de grande interesse, e a sua produção pode ser economicamente favorável, pois o processo pode estar convertendo um resíduo de baixo valor em um produto de alto valor agregado.

Por isso, tem-se estudado as manoproteínas como um aditivo na produção de vinho (P. Comuzzo *et al.*, 2006; Dupin *et al.*, 2000; Gonzalez-Ramos, 2008; Ayestarán e Guadalupe, 2008), inclusive já sendo atualmente comercializadas.

Partindo-se da problemática pré-existente, citada anteriormente, e contrapondo a isto as diversas aplicações de alto valor agregado proporcionadas pelas moléculas bioativas presentes na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, procuramos dar destaque para o prosseguimento deste trabalho nas manoproteínas presentes na parede celular dessas leveduras. Este estudo se justifica principalmente pelo fato desta ter duas aplicações comprovadas por uma série de trabalhos científicos, a primeira como bioemulsificante, produto cuja demanda é crescente, sobretudo no atual contexto de busca de produtos que substituam derivados do petróleo, e a segunda como aditivo para vinhos, a qual também se mostra de grande interesse. Assim credencia-se como uma oportunidade que, para ser aproveitada, necessita que estudos mais profundos sejam feitos, sobretudo no que tange ao desenvolvimento de processos de extração eficientes, no sentido de aliarem de forma otimizada pureza e rendimento.

O presente trabalho aborda o estudo de potencialidades do uso de leveduras *S. cerevisiae* como possível fonte de produtos de química fina e especialidades. Desta forma as manoproteínas serão objeto de estudo, e o mercado de produção de vinhos no Brasil será analisado, assim como será estudada a possibilidade de uma produção em larga escala deste produto.

Capítulo II – Objetivos geral e específicos

Para atingir o objetivo geral do nosso projeto que consistia em estudar a potencialidade do uso de Manoproteínas de *Saccharomyces cerevisiae* como fonte de produtos para a indústria vinícola, alguns objetivos específicos foram traçados, como:

- Fazer um levantamento sobre possíveis utilizações para as leveduras geradas como resíduo em processos fermentativos;
- Avaliar a viabilidade do creme de levedura, como matéria prima para extração de manoproteínas;
- Propor um processo para extração em escala laboratorial de manoproteínas e caracterizar o produto obtido;
- Analisar o possível mercado alvo (indústria vinícola), propor um aumento de escala a partir do procedimento realizado em laboratório e analisar sua viabilidade econômica;

Capítulo III – Revisão bibliográfica

III.1) Problemática: "desperdício" de um recurso, as leveduras Saccharomyces geradas como resíduo de processos fermentativos

O presente trabalho se propõe a analisar uma situação que vem se colocando nos últimos anos: o baixo aproveitamento da biomassa composta por leveduras, em especial *Saccharomyces cerevisiae*, geradas por processos fermentativos. A questão possui duas vertentes principais: o lado ambiental, em se tratando de material orgânico, que possui alta carga poluente, caracterizada pela alta demanda bioquímica que apresenta, o que inviabiliza o seu lançamento sem tratamento adequado em corpos receptores como rios por exemplo. A segunda decorre desta primeira, como um aproveitamento economicamente viável desta biomassa ao invés do gasto com tratamento para posterior descarte.

A questão se torna ainda mais relevante quando consideramos o âmbito nacional, devido à intensa utilização de processos fermentativos. O Brasil é o maior produtor mundial de álcool de cana-de-açúcar e hoje, é o segundo maior do mundo na produção total de etanol, a Figura 1 mostra imagens de um canavial e usina sucroalcooleira respectivamente. A produção de álcool anidro e hidratado na safra de 2006/07 foi de 17,9 milhões de metros cúbicos (Brazil Bio-Fuels Annual Report – USDA), sendo que a disponibilidade de levedura após a fermentação pode ser estimada em 2 Kg de levedura seca a cada 100 litros de etanol produzidos (Baptista, 2001 apud Desmonts, 1966) o que leva a uma geração, como resíduo, de aproximadamente 350 mil toneladas de biomassa de leveduras na referida safra. Há ainda a contribuição do setor cervejeiro, um pouco mais discreta, estando estimada em 3500 toneladas/ano segundo Chaud e Sgarbieri, 1999.



Figura 1 – Imagens de Canavial e usina de álcool. Fonte: www.copersucar.com.br

Partindo-se desses dados, o aproveitamento econômico desse, a princípio, “resíduo” se apresenta como uma necessidade real, porém o destino principal atualmente dado a este material é a sua incorporação a rações animais, sendo uma fonte de proteínas, vitaminas do complexo B, minerais essenciais e fibra dietética (Reed & Nagodawithana, 1991). No entanto, há claramente um cenário de subaproveitamento de um material, já que rações animais são produtos de baixo valor agregado e que estão longe de aproveitar, em sua plenitude, o real potencial das leveduras (Jaehrig, 2007).

Portanto é clara a necessidade de se buscar alternativas, através de pesquisa e desenvolvimento nas organizações e instituições, que visem utilizar esta biomassa como um recurso, ao invés de resíduo, no sentido de se obter a partir das leveduras produtos que tenham alto valor agregado em detrimento da destinação pouco nobre como insumo para rações animais.

Nesta direção está apontado este trabalho, o qual visa mapear as iniciativas já realizadas e também fazer uma proposta no sentido de valorizar a biomassa resultante de processos fermentativo como uma fonte de produtos de química fina e especialidades.

III.2) Bioquímica e Biologia celular da levedura Saccharomyces cerevisiae

A parede celular das leveduras talvez seja a estrutura mais interessante quando se pensa em aproveitamento de biomoléculas, pois a mesma possui em sua composição química carboidratos, além de proteínas glicolisadas, as glicoproteínas, o que torna crescente o número de trabalhos que buscam a extração e possíveis aplicações destas moléculas. Por esse motivo neste trabalho será focada a parede celular como a possível fonte de produtos com valor agregado considerável.

A parede celular de leveduras é responsável pela forma da célula e a integridade do organismo durante o crescimento e divisão celular. Esta estrutura deve apresentar resistência para situações onde haja o aumento da pressão osmótica interna, mas também elasticidade para situações como a divisão celular. É uma estrutura rígida que representa cerca de 20 a 25% do peso seco da célula (Rogers *et. al.*, 1998).

Estudos recentes a apresentam como uma estrutura dinâmica, o que implica dizer que sua estrutura pode ser mutável até mesmo em função das condições ambientais, o que se contrapõe a concepção superada de que se tratava de algo sólido e estático (Klis *et. al.*, 2002).

Essa parede celular é constituída principalmente por polissacarídeos (80-90%), composta por três açúcares: glicose, manose e N-acetilglicosamina que formam as β -glucanas, mananas e quitina, respectivamente.

Os polímeros de manose ligados covalentemente a peptídeos correspondem à formação de manoproteínas, que correspondem à faixa de 30 a 50% do peso seco da parede celular; polímeros de glicose (β -glucanas) correspondem a 60% e polímeros de N-acetilglicosamina (quitina), que representam aproximadamente 1 a 2% (Magnelli, 2002). Esses dados estão apresentados na Tabela a seguir:

Tabela 1 - Composição típica da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*. (adaptado de Magnelli, 2002)

Composição da parede celular (% em peso seco da parede celular)	
Manoproteínas	30-50%
Beta 1,3 glucana	45-50%
Beta 1,6 glucana	10-15%
Quitina	1-2%

Segundo Lipke (1998), temos a definição da parede celular como uma treliça onde seus componentes ocupam apenas de 10 a 20 % do seu volume, tal estrutura é formada por módulos constituídos por uma camada interna composta por β -1,3 glucana e quitina conectada à camada externa composta por manoproteínas através de glucanas do tipo β -1,6, as quais, portanto, tem papel destacado na arquitetura da

parede celular. Estes módulos, ilustrados na figura 2, seriam associados sequencialmente como unidades de um polímero por ligações covalentes entre as manoproteínas na camada externa e interações não covalentes na camada interna.

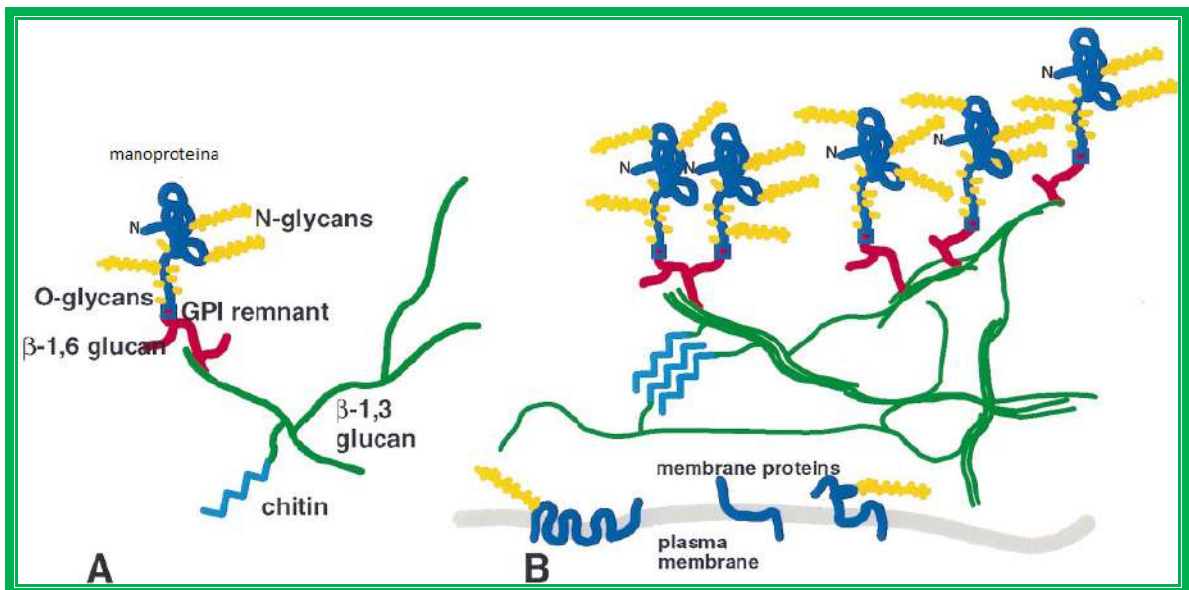


Figura 2 - Representação da arquitetura da parede celular onde em (A) temos um módulo e em (B) temos uma associação dos mesmos. Fonte: Lipke (1998)

Glucanas

Beta 1,3

Pertencente a família das glucanas e se trata de um polímero de glicose conectado por ligações do tipo 1,3. São responsáveis juntamente com a quitina pela formação da camada mais interna da parede celular, a qual é a responsável pela elasticidade característica dessa estrutura (Klis et. al., 2002). Nessa camada as β -1,3 glucanas formam um trama fibrosa. Possuem uma forma de espiral flexível que confere sua elasticidade. Seu grau de polimerização é função das condições ambientais, variando em torno do número de 1500 unidades de glicose, e se trata de uma molécula moderadamente ramificada com síntese alocada na membrana plasmática da célula. A estrutura química do monômero formador deste polímero de pode ser vista na figura 3.

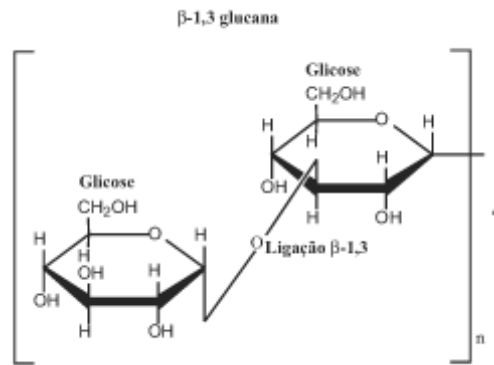


Figura 3 - Representação do monômero da β-1,3 glucana. Fonte: Fleuri, 2005

Beta 1,6

Este polissacarídeo (Figura 4), formado pela conexão de glicoses com ligações do tipo 1,6, tem papel destacado na arquitetura da parede fazendo uma ponte entre as camadas externa e interna. Trata-se de um polímero mais ramificado e mais curto que o anterior, o que lhe confere uma característica diferenciada que é a maior solubilidade em soluções aquosa alcalinas, enquanto a β-1,3 glucana é insolúvel nessas soluções, segundo Magnelli (2002). A solubilidade é uma propriedade muito importante, sobretudo quando se tem o objetivo de extrair um determinado componente para explorar uma determinada aplicabilidade.

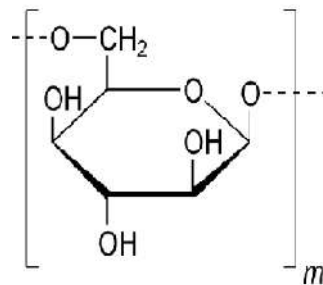


Figura 4 - Representação do monômero (m) da β-1,6 glucana. Fonte: Fleuri, 2005

Quitina

Trata-se de um homopolímero linear (β-(1→4)) de resíduos de N-acetilglucosamina (Figura 5), sendo um polissacarídeo insolúvel em água, e tem como principal função biológica conferir rigidez e insolubilidade à parede celular (Lipke, 1998).

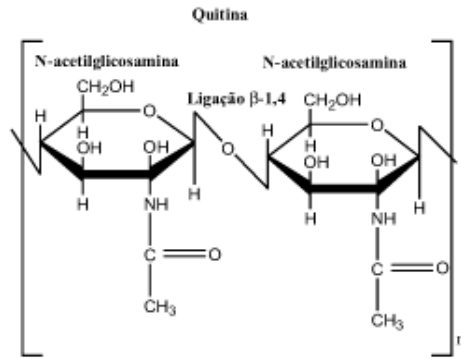


Figura 5 - Representação monomérica da quitina. Fonte: Fleuri, 2005

Manoproteínas

Manoproteína é um termo que se refere a uma família de proteínas altamente glicosiladas e solúveis em água, cuja fração carboidrato varia na faixa de 50 a 90% do seu peso molecular total, onde a manose é o resíduo majoritário (90 a 95%), sendo a glicose responsável pelo restante (5 a 10%), (Lipke, 1998).

As funções biológicas dessas moléculas são variáveis, elas são responsáveis pela formação da camada mais externa da parede celular, tendo importante papel no reconhecimento intercelular, e possuem atividade imunogênica, além de contribuírem com a proteção da camada mais interna e da membrana plasmática contra agressões do meio externo (Corbacho, 1995). Essas funções englobam participações em processos fisiológicos como a floculação, formação de biofilmes, esporulação, entre outras, demonstrando que as manoproteínas são moléculas fundamentais para o funcionamento da engrenagem celular de leveduras (Klis *et al.* 2002).

Em relação à ligação glicosídica as manoproteínas apresentam dois tipos: no primeiro temos a ligação de cadeias longas e ramificadas de resíduos de manose fosforilados (40 a 100 unidades) ao resíduo de asparagina da fração protéica por ligações do tipo N (*N-linkage*), enquanto no segundo temos a ligação de uma cadeia de comprimento variando de 1 a 5 monômeros de manose, não fosforilados, aos resíduos de serina e treonina por ligações do tipo O (*O-linkage*) (Barriga et al. 1999). A Figura 6 mostra esquematicamente esses dois tipos de ligação glicosídica.

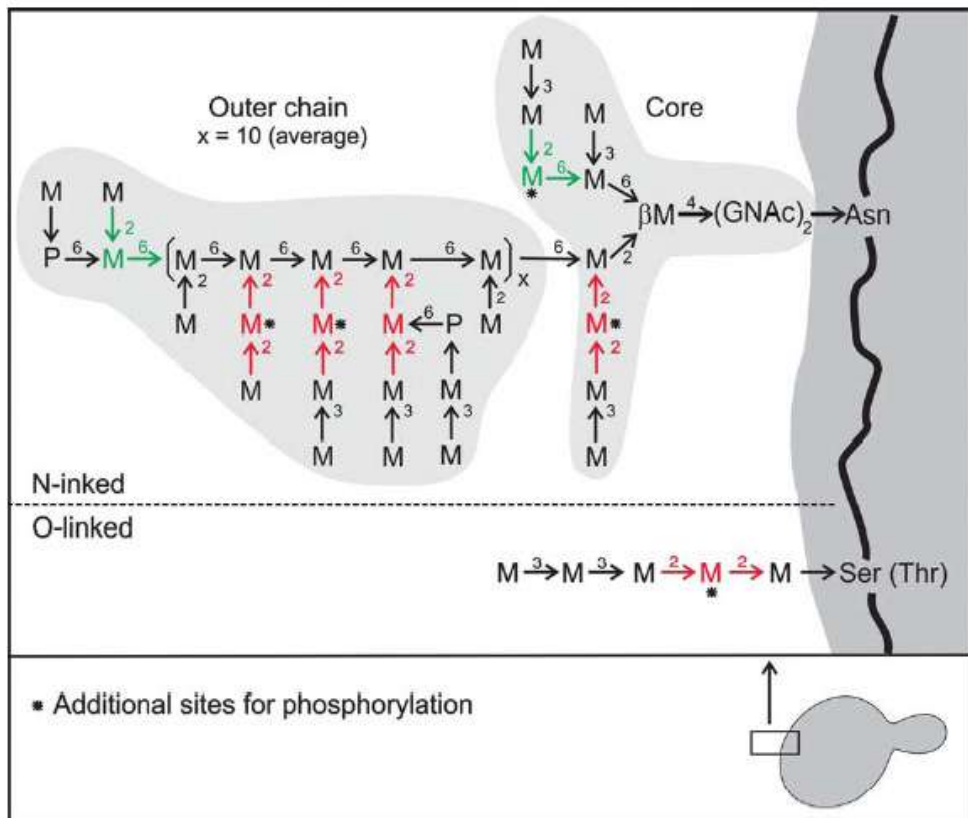


Figura 6 - Tipos de ligação entre as frações protéica e carboidrato extraída de Corbacho *et al.*, 2005.

A disposição dessas moléculas também não é uniforme e serve de critério para a divisão das mesmas em duas grandes classes: a primeira, majoritária, seria composta por manoproteínas ligadas covalentemente a β -1,6 glucana como foi mencionado anteriormente, sendo sensível a atuação de enzimas glucanases (Van der Vaart e Chapman, 1995); a segunda seria composta por aquelas glicoproteínas que não estão ligadas covalentemente a glucana, estão apenas ancoradas à camada externa (são também conhecidas como extraídas por SDS), possuem ligações do tipo ponte de dissulfeto e outras interações. Dentro do primeiro tipo, haveria ainda aquelas que estão ligadas diretamente à β -1,3 glucana uma ligação sensível a álcalis (Klis et al 2002).

É importante frisar que essas duas famílias também tem outra característica que as diferencia, o teor de glicosilação: as ligadas covalentemente tem uma fração de carboidrato responsável por uma faixa de 50 a 80% do peso molecular e normalmente apresentam alguma função enzimática, enquanto aquelas que não se encontram ligadas covalentemente possuem um fração de açúcar da ordem de 90% (Barriga *et al.* 1995).

O conhecimento da estrutura e dos diversos componentes da parede celular, além de ser muito importante para elucidar fenômenos fisiológicos e metabólicos da célula, também é de grande importância para se desenhar processos de extração de componentes específicos, pois fornece informações como o tipo de ligação desses componentes à estrutura em si, além de fornecerem dados relativos, por exemplo, à solubilidade, fundamentais em processos extrativos.

III.3) Aplicações atuais e potenciais das leveduras e seus componentes

Este item tem por objetivo mapear as utilizações da biomassa de levedura, enfocando em alternativas que tenham um potencial de agregar valor a este recurso. Será dado enfoque especial para a aplicação das moléculas presente na parede celular, em especial a glucana e as manoproteínas.

III.3.1) Indústria alimentícia

O principal setor que vem buscando absorver este resíduo, transformando-o em recurso com algum valor agregado, é o alimentício, aproveitando-se das características nutricionais deste material. No entanto é importante atentar que o uso da levedura “in natura” se mostra limitado, pois o aproveitamento nutricional fica restrito pela baixa digestibilidade da parede celular (Moura, 1986). Por isso passou-se a processar esta levedura, através da sua autólise ou rompimento celular, o que gera duas frações: o extrato que é o alvo das indústrias alimentícias; e a fração correspondente a parede celular. A Tabela 2 (Sgarbieri *et al.*, 1999) exemplifica a composição centesimal aproximada das células de levedura íntegras, do autolisado total, do extrato de levedura e da fração parede celular, todos em base seca.

Tabela 2 - Composição centesimal aproximada das células de levedura íntegras; do autolisado total; do extrato de levedura e da fração parede celular; todos em base seca

Componente (%)	Células íntegras (U)	Autolisado total (AT)	Extrato (Ex)	Fração parede celular (Pc)
Proteína (N x 5,8)	48,74	46,45	61,54	32,70
RNA	5,70	7,90	6,90	1,83
Lipídios	3,33	3,30	1,89	4,54
Cinzas	8,55	8,83	12,50	4,43
Fibra total	24,40	25,03	2,70	55,04
Fibra solúvel	22,52	24,76	2,70	31,59
Fibra insolúvel	1,88	0,27	0,00	23,45
Não determinado	10,60	10,82	19,20	1,46

Fonte: Sgarbieri *et. al.* 1999

As células de levedura apresentam ainda consideráveis teores de vitaminas, particularmente do complexo B, e minerais essenciais ao organismo animal (HALÁSZ e LÁSTITY,1991).

Em relação ao uso da levedura e seus derivados em indústrias de alimentos, para produção de sopas desidratadas e produtos cárneos, é importante ressaltar a importância de algumas propriedades funcionais específicas, a saber: solubilidade, absorção de água e óleo, retenção de água e capacidade emulsificante (Kollar e Sturkik, 1992; David R. Cameron, 1988; Barriga *et. al.*, 1999). A solubilidade dos ingredientes de um alimento como a sopa é muito importante, uma vez que poderá influenciar no sabor e textura do alimento. As proteínas de células isoladas de levedura possuem baixa solubilidade quando comparadas a outras proteínas vegetais como a soja, principalmente nas faixas de pH mais comuns nos alimentos.

De acordo com Kanterewicz *et al.*(1989) a capacidade de absorção de óleo tem grande importância na formulação de alimentos, podendo influenciar na ordem de adição dos ingredientes secos na mistura, além de ser usado para determinar os tempos de mistura utilizando uma distribuição uniforme do óleo ou gordura na mistura seca. Otero *et al.* (1996) observaram que a capacidade de absorver óleo do

concentrado protéico de levedura foi aproximadamente três vezes o valor da absorção de óleo do isolado protéico de soja.

A capacidade de absorção de água de um componente do alimento determina não somente a aceitabilidade do produto final em termos de textura e suculência, mas também a sua margem de lucro. Estes índices são essenciais em alimentos como a gelatina, na qual se obtém um produto com aproximadamente 95% de água. Kinsella (1976) ressalta que a capacidade de retenção de água é de grande utilidade na fabricação de produtos cárneos, impedindo a perda de água no processo de cozimento, em produtos de panificação e em alimentos viscosos como sopas.

Segundo Nagodawithana (1992), os nucleotídeos obtidos do RNA de leveduras são atualmente empregados como realçadores de sabor para carne ou queijo em indústrias de alimentos.

As glucanas da parede celular também tem sido amplamente utilizadas como espessantes, devido à sua propriedade de aumentar a viscosidade em sistemas aquosos. A parede celular bruta, lavada com água, produz uma viscosidade mínima de 500 centipoise quando suspenso em solução aquosa, a 10% em peso e 25°C, de acordo com a patente americana (E.U.A. Pat. 4, 122), descrita por Robbins e Seeley (1977).

Além de sua propriedade espessante, ainda são usadas como emulsificantes, estabilizantes, flavorizantes e texturizantes, por exemplo, em molhos para saladas. A *Food and Drug Administration (FDA)* permite seu uso como estabilizante, espessante e texturizante em doces e sobremesas congeladas, coalhadas, pastas de queijo e análogos (Dziezak, 1987).

Outra aplicação de grande interesse é a utilização como substituto de gordura em certos tipos de alimentos dietéticos, tais como cobertura de saladas, sorvetes etc., devido ao sabor agradável e textura suave.

A glucana de levedura encontra também uso como fibra dietética. A fibra dietética é uma mistura de diferentes compostos (principalmente polissacarídeos) que permanecem intactos após tratamento enzimático específico. A parte insolúvel da fibra dietética consiste de celulose e lignina e a solúvel de substâncias pécticas, gomas e glucanas mistas 1-3 e 1-4 (Halasz e Lasztity, 1991).

A glucana incorporada na dieta hipercolesterolêmica de ratos baixou rapidamente e de forma significativa os níveis de colesterol sérico, podendo ser considerada um agente hipocolesteremiante (Robbins; Seeley, 1977).

As manoproteínas, as quais apresentam também propriedades emulsificantes podendo ser então utilizadas como emulsificante comercial (Cameron et. al., 1988; Barriga, 1999). Além de eficiente se trata de uma opção natural, um bioemulsificante, sendo uma alternativa aos emulsificantes tradicionais derivados do petróleo, o que vem tendo uma busca crescente, tendo em vista a já altamente debatida escassez do petróleo e seu potencial poluidor.

As leveduras podem ainda ser fonte de um corante carotenóide astaxantina (Lyons *et al.* 1993; Johnson e Schroeder, W. 1995) aprovado pela FDA como corante alimentício.

III.3.2) Indústria cosmética

Esta é uma área que também começa a utilizar o extrato de leveduras na formulação de seus produtos baseando-se no novo conceito de cosméticos multifuncionais, que combinam ingredientes com alta atividade antienvhecimento e hidratante, sem, contudo causar irritação cutânea, devido a efeitos sinérgicos entre os componentes (Gaspar *et al.*, 2008), além da tendência de se utilizar matérias primas renováveis na formulação, a qual é plenamente atendida por materiais provenientes de leveduras.

As principais potencialidades neste caso são o alto teor de aminoácidos, peptídeos, proteínas e os polissacarídeos, que podem ter efeitos de renovação das células e de cicatrização (Bentley *et al.*, 1990; Kim and Yun, 2006; Péterszegi *et al.*, 2003).

Ao extrato de levedura também tem sido atribuída uma atividade contra o fotoenvhecimento e doenças provenientes de estresse oxidativo, devido à presença, fundamentalmente, de polissacarídeos da família das glucanas, que possuem atividade imunomodulatória.

III.3.3) Medicina

Esta é outra área que vem valorizando a levedura como uma fonte em potencial de produtos de aplicação nobres. Este setor vem se aproveitando principalmente das glucanas presentes na parede celular, que tem sido referidas como detentoras de propriedades imunoestimulantes. Essa glucana pertence à classe de drogas conhecidas como Modificadores da Resposta Biológica (*Biological Response Modifiers* - BRMs), com efeito benéfico em uma variedade de patologias experimentais causadas por bactérias, vírus, fungos e parasitos. Além disso, atua como modificadora da supressão imunológica e também de doenças neoplásicas em nível experimental (Williams *et al.*, 1991).

As glucanas, segundo estudos experimentais e epidemiológicos, apresentam, entre outras propriedades, a de atuar como um regulador intestinal com efeito laxativo. As fibras também apresentam propriedades que ajudam no tratamento de doenças como diabetes e hipercolesterolemia e por estas características atuam na prevenção de doenças coronárias e câncer de cólon (Sgarbieri e Pacheco, 1998).

III.3.4) Indústria de fertilizantes

O extrato de levedura também tem encontrado utilizações como insumo na produção de fertilizantes, sendo atribuído, além da atividade fertilizante em si, também a uma atividade de estimulação do sistema de defesa das plantas. Como exemplo de um produto em escala comercial com esta aplicação cita-se o KeyPlex 350 (*US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs BIOPESTICIDES REGISTRATION ACTION DOCUMENT - Yeast Extract Hydrolysate from Saccharomyces cerevisiae - PC Code 100053*).

III.3.5) Indústria vinícola

Este setor apresenta um confronto entre dois modelos de organização da produção vinícola, a do “velho mundo” principalmente de regiões da França, tradicional, baseado no conhecimento acumulado e guardado em segredo por gerações de vinhateiros; e do “novo mundo”, pragmático, que compensa a pouca tradição com investimento em tecnologia e na qualificação formal dos enólogos (Roese

2008). São evocadas nos meios profissionais e enófilos pelas expressões *vins de terroir*¹ versus “vinhos tecnológicos”.

O modelo mais tradicional e conservador defende que o vinho deve ser submetido a processos de envelhecimento em barris ou em borras, compostas, sobretudo, pelas leveduras que fermentaram o vinho e que entraram em processo de autólise, tais processos visam apurar e desenvolver todo o potencial organoléptico e sensorial desta bebida.

O processo que ocorre durante o envelhecimento em borras (em francês: “*elevage sur lies*”), ilustrado pela Figura 7, foi relatado por Pérez-Serradilla e Luque de Castro (2008), segundo o qual se baseia na liberação de peptídeos, polissacarídeos, manoproteínas, esteróis entre outras moléculas liberadas pelas leveduras que entram em autólise (processo no qual as células se auto degradam pela liberação de enzimas endógenas causando a morte e o seu rompimento celular) ao longo do tempo, constituindo a borra. São as moléculas liberadas nesta maturação, as responsáveis pela melhoria das qualidades sensoriais experimentadas pelo vinho, entre estas: estabilização da cor, diminuição de acidez e degradação dos compostos.



Figura 7 - Borra de vinho tinto merlot após fermentação. Fonte: www.veritaswinery.com

Os vinhos do “Novo Mundo”, originários principalmente da Austrália, Estados Unidos, Argentina, Chile e África do Sul, buscam soluções que visem justamente

¹ *Terroir*, termo em Francês, que não tem tradução em nenhuma outra língua, se refere tanto à qualidade do solo como às práticas culturais consideradas tradicionais

contornar principalmente o fator tempo promovendo a melhora da qualidade do vinho através da adição de aditivos ao invés do envelhecimento.

O problema, como já foi dito, é a demanda alta de tempo, pois se trata de um processo complexo e muito lento de interação entre o vinho e a borra. Devido a isto vem sendo desenvolvidos produtos que tentem mimetizar de forma acelerada o processo pelo qual o vinho é submetido durante o envelhecimento. Estes seriam aditivos que incluam em sua composição as moléculas liberadas durante a autólise das células de leveduras. Tal iniciativa vai de encontro com a demanda cada vez mais atual e presente por aditivos de origem natural. Neste contexto vem ganhando especial destaque as manoproteínas, a qual vem sendo alvo de vários estudos científicos visando avaliar e comprovar a sua bioatividade sobre o vinho (Pozo-Bayón *et al.*, 2009).

Tais estudos indicam que as manoproteínas podem contribuir decisivamente na atenuação de alguns problemas enfrentados por essa indústria, como a estabilização dos sais de tartarato, das proteínas e da cor e aromas originais da bebida, entre outros, abrindo a possibilidade de se formular aditivos naturais baseados nas mesmas. As diversas atividades das manoproteínas no vinho serão avaliadas separadamente a partir dos problemas que estes encontram durante as etapas de fabricação, maturação e envelhecimento.

Problema 1. A estabilização dos sais de tartarato e das proteínas do vinho

A origem

A presença de sais tartáricos, bitartarato de potássio (KHT), tartarato de cálcio (CaT) e o desenvolvimento de agregados protéicos são as principais causas da instabilidade dos vinhos.

O ácido tartárico é o principal ácido orgânico produzido pela uva durante seu desenvolvimento. É solubilizado na forma de sais de potássio e cálcio nos mostos de uvas durante o seu processamento. Durante a fermentação, a solubilidade dos sais de ácido tartárico diminui com o aumento da concentração de etanol (devido à fermentação de açúcares).

Nos vinhos jovens, bitartarato de potássio (KHT) está sempre presente em concentrações supersaturadas e se cristaliza espontaneamente. Após o engarrafamento dos vinhos, a instabilidade dos tartaratos pode se tornar um problema comercial devido ao caráter imprevisível de sua cristalização. Além disso, os consumidores normalmente consideram a presença de cristais na garrafa como um sinal de menor qualidade do vinho (*YEAST MANNOPROTEINS AS A FOOD ADDITIVE FOR WINE - FINAL ASSESSMENT REPORT, 2008*).

Outra causa de instabilidade do vinho é a agregação de proteínas instáveis do vinho, o que dá origem à formação de aglomerados de proteínas, expressão ,que se refere ao processo de desnaturação seguida de floculação e conseqüente precipitação de proteínas, originárias da uva, o que contribui para reduzir a qualidade do vinho, contribuindo para a turvação do líquido (Caride, 2005)

Soluções existentes

Tratamentos físicos podem ser utilizados antes do engarrafamento do vinho para impedir a cristalização de sais de tartarato. Estes tratamentos consistem em promover a cristalização por resfriamento do vinho a -4°C ou na eliminação dos íons potássio e tartárico por eletrodialise ou pela utilização de resinas de troca iônica. No entanto, o tempo e consumo de energia nos processos, podem supostamente alterar o equilíbrio coloidal de vinhos.

Quanto aos problemas gerados pela agregação de proteínas, com a conseqüente turbidez no vinho, são atualmente resolvidos pela utilização de bentonita. No entanto, este tratamento tem um efeito negativo sobre as características organolépticas do vinho. Além disso, este tratamento requer um trabalho adicional para o produtor e leva à perda de vinho, que continua a ser absorvido pela bentonita.

As alternativas

A alternativa aos tratamentos físicos de vinhos é a utilização de aditivos, que impeçam a nucleação ou o crescimento de cristais KHT e a agregação de proteínas.

Carboximetilcelulose e ácido meta-tartárico pertencem ao grupo dos aditivos que inibem o crescimento de cristais KHT. Porém, a carboximetilcelulose não foi aceita pela comunidade de produtores de vinho devido ao seu presumido efeito organoléptico negativo nos vinhos tratados. O ácido meta tartárico, por outro lado, é instável no pH do vinho, e a temperatura em que o vinho é armazenado. Com o tempo, o ácido meta-tartárico será hidrolisado e assim seu efeito protetor desaparece. Portanto, seu uso é restrito aos vinhos de baixa qualidade para consumo rápido. Outra desvantagem é que, idealmente, um aditivo deve ser um componente natural do vinho. Este não é definitivamente o caso do ácido meta-tartárico ou carboximetilcelulose. (Patente WO 2006/067145).

Aditivos naturais que são ativos contra a formação de agregados (do inglês *haze*) protéicos tanto na nucleação quanto no crescimento dos cristais KHT são preferidos aos aditivos químicos. Um exemplo de aditivo natural é a manoproteína. As manoproteínas estão naturalmente presentes no vinho, e como já foi dito, são um dos principais componentes da parede celular das leveduras. Pesquisas recentes demonstraram que manoproteínas presentes nas paredes celulares de leveduras são responsáveis pela melhora na estabilidade dos sais de tartarato (Gonçalves e Heyraud, 2002) e possuem efeito protetor quanto à agregação protéica (Ramos et al., 2008). Por essas características, entre outras que serão analisadas, hoje já existem no mercado uma série de produtos comerciais contendo manoproteína, a se citar, claristar® (empresa DSM), biolees® e mannostab® (Lesaffre), monnovin® (Biorigin), Surlí one® (Enartis).

Problema 2. A estabilização da cor, aroma e redução da adstringência do vinho

A origem

A cor dos vinhos, especialmente a dos vinhos tintos, é uma das propriedades mais importantes utilizadas para a avaliação comercial e exerce uma influência considerável sobre a comercialização desses produtos. Sabe-se que a cor do vinho tinto, em grande parte, depende de sua composição fenólica, especialmente as antocianinas, derivados de antocianinas, e pigmentos poliméricos.

A pigmentação característica dos vinhos pode ser explicada pela formação de compostos coloidais coloridos a partir da ligação entre taninos e antocianinas ou entre antocianinas (processo de copigmentação), porém estes colóides estão sob uma estabilidade frágil, pois os compostos fenólicos são altamente reativos. (Jacob S. Jensen, 2008).

É sabido que polissacarídeos atuam como protetores desses colóides, uma vez que reduzem a reatividade dos compostos fenólicos, o que impede que haja uma polimerização desenfreada entre essas moléculas ou a ligação com outras moléculas, o que levaria a desestabilização dos colóides e sua subsequente precipitação. O mecanismo da ação protetora exercida pelos polissacarídeos pode ser ilustrado pela Figura 8.

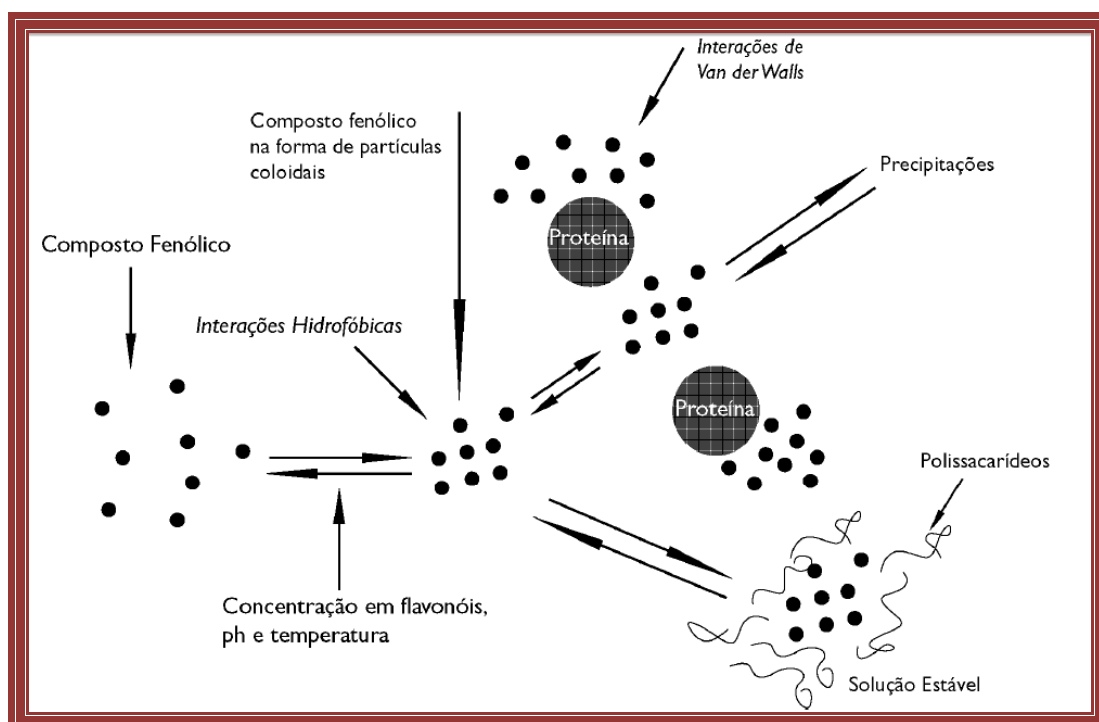


Figura 8 - Efeito protetor de polissacarídeo sobre a estabilidade de colóides. Fonte: Darricarrère, 2006

Nesta classe de moléculas com características protetoras podemos incluir as manoproteínas (Escot *et al.*, 2001; Riou, Vernhet, Doco & Moutonet, 2002 apud Pozo-Bayon, M, 2009).

Os compostos voláteis do vinho constituem um sistema complexo de multicomponentes de diversos grupos químicos, tais como álcool, cetona, aldeído, entre outros. Sabe-se que os compostos que conferem aroma são capazes de interagir com polissacarídeos e proteínas. Tem sido realizada diversos estudos a respeito das

interações entre os compostos voláteis do vinho e as manoproteínas da parede celular de leveduras, entre eles podemos citar os trabalhos realizados por Comuzzo *et al.*, 2006; Lubbers *et al.*, 1994; P. Chaliier *et al.*, 2007.

Existe uma dificuldade para se entender as interações entre os compostos responsáveis pelo aroma e as manoproteínas, devido ao fato de que tanto as partes glicosídicas quanto as peptídicas destas glicoproteínas podem ter interações com os compostos que conferem aroma ao vinho.

A adstringência também é um fator muito importante quando se avalia a qualidade de um vinho. Esta é decorrente da presença dos taninos, caracterizados por sua capacidade de combinar-se com as proteínas e outros polímeros como os polissacarídeos. A adstringência é causada pela precipitação das proteínas e das glicoproteínas da saliva e a consequente secura característica. Uma vez que as manoproteínas diminuem a reatividade dos taninos, a reação com proteínas da saliva serão minimizadas (Smith & Noble, 1998; Feuillat, 2001 apud Pozo-Bayon, M, 2009).

Problema 3 - Presença da ochratoxina A

A ochratoxina A (Figura 9) é uma toxina fúngica (produzida em especial por *Aspergillus niger* e *A. carbonarium*), e o vinho é um dos possíveis produtos suscetíveis a tal contaminação (Zimmerli and Dick 1996 apud Caride, A, 2006). Em função disto é crescente a demanda por estratégias que eliminem tal toxina do produto final. Neste caso as manoproteínas também tem papel importante, pois as mesmas atuam como sequestrantes, adsorvendo essas toxinas, conforme foi demonstrado em diversos trabalhos (Devegowda *et al.*,1998; Zaghini *et al.* 1998 apud Caride, A. 2006).

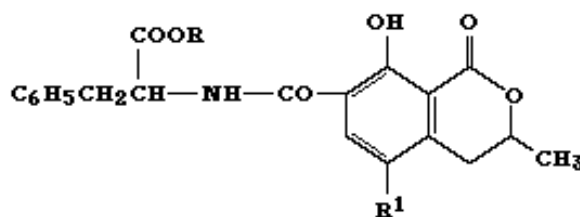


Figura 9 - Estrutura da micotoxina ochratoxina A. Fonte: Caride, 2006

III.4) As rotas existentes de extração de manoproteínas da parede celular de leveduras

O primeiro processo de extração de manoproteínas da parede celular de leveduras foi proposto por Peat ainda na década de 1960. O processo se baseava na solubilização das manoproteínas em água a partir de uma lise térmica em autoclave com tampão pH 7 seguido de uma recuperação por precipitação de Fehling (a partir da formação de um complexo de cobre insolúvel).

Como já foi dito anteriormente, as manoproteínas podem basicamente ser divididas em duas classes, a se citar: as ligadas covalentemente a beta 1,6 glucana e as ligadas não covalentemente à parede. Portanto, as manoproteínas obtidas no trabalho de Peat provavelmente eram majoritariamente dessa segunda classe. Visando remover essa mesma classe foram sendo propostos outros métodos baseados na adição de agentes redutores como o SDS e o beta mercaptoetanol, entre outros agentes como a uréia (Valentin *et al.* 1984 e Casanova *et al.*, 1989).

A fim de obter também a fração ligada covalentemente à parede, Parascandola e colaboradores (1997) propuseram aliar à extração com SDS uma etapa posterior enzimática com o uso de uma beta 1,3 glucanase, estratégia semelhante também foi utilizada por Montijn *et al* (1994).

Barriga *et al.* (1999), visando a utilização das manoproteínas como bioemulsificante, propôs uma adaptação ao método proposto por Peat para a extração, onde foi feita uma lise térmica em autoclave por 3 horas, com uma solução tamponada (pH=7) das leveduras, a diferença ficou na etapa de recuperação das manoproteínas feita por uma unidade de microfiltração.

Charpentier *et al.* (2000) propuseram uma lise por força mecânica com moinho de bolas ao invés de uma lise térmica, seguida por uma etapa enzimática com beta 1,6 glucanase e posterior liofilização, processo que está representado na Figura 10.

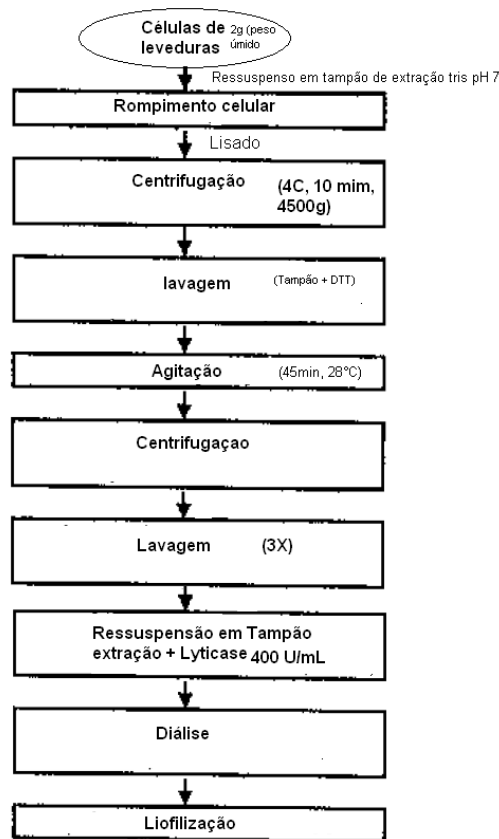


Figura 10 - Diagrama de blocos processo proposto adaptado de Charpentier *et al.* (2000).

Magnelli e colaboradores (2001) propuseram uma rota baseada em uma serie de digestões enzimáticas sequenciadas, com o uso de quitinase, β -1,6 glucanase e β glucosidase, intercaladas por etapas de diálise.

Freidmund *et al.* em 2003 propuseram um processo de obtenção de beta glucanas no qual se obtém a manoproteína como subproduto, um diagrama do processo está apresentado na Figura 11.

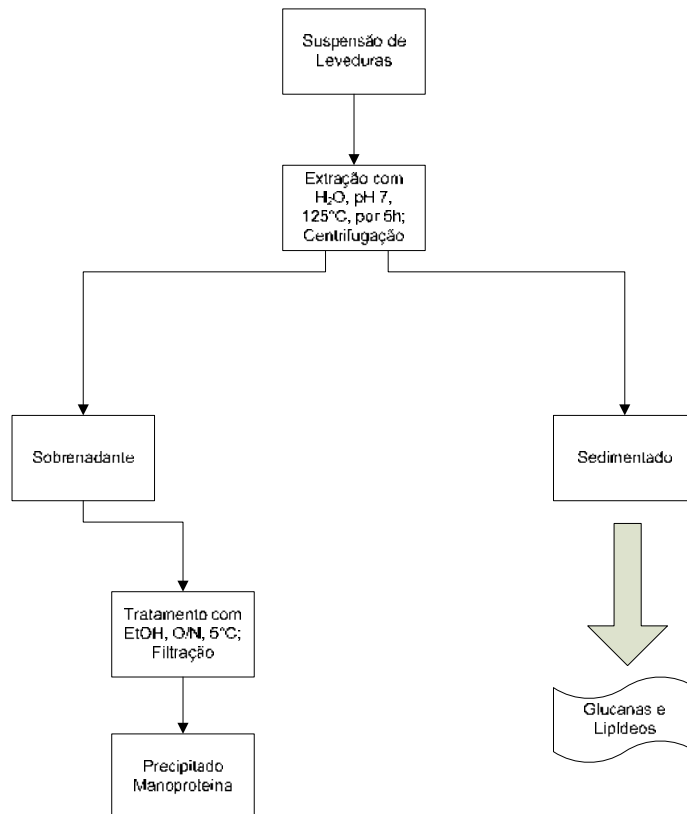


Figura 11 – Diagrama do processo proposto por Freidmund. (adaptado de Freidmund *et al.*, 2003)

O processo se baseia na solubilização das manoproteínas não ligadas covalentemente à parede celular através de uma lise térmica em água (autoclavando um creme de leveduras com pH ajustado para 7 por adição de NaOH durante 5 horas), seguida de precipitação em etanol das manoproteínas e filtração.

Chaud e Scarbiere (2006) propuseram uma rota representada pelo diagrama da Figura 12, com o objetivo de se obter as frações de manoproteínas (glicoproteínas) e beta glucana separadamente.

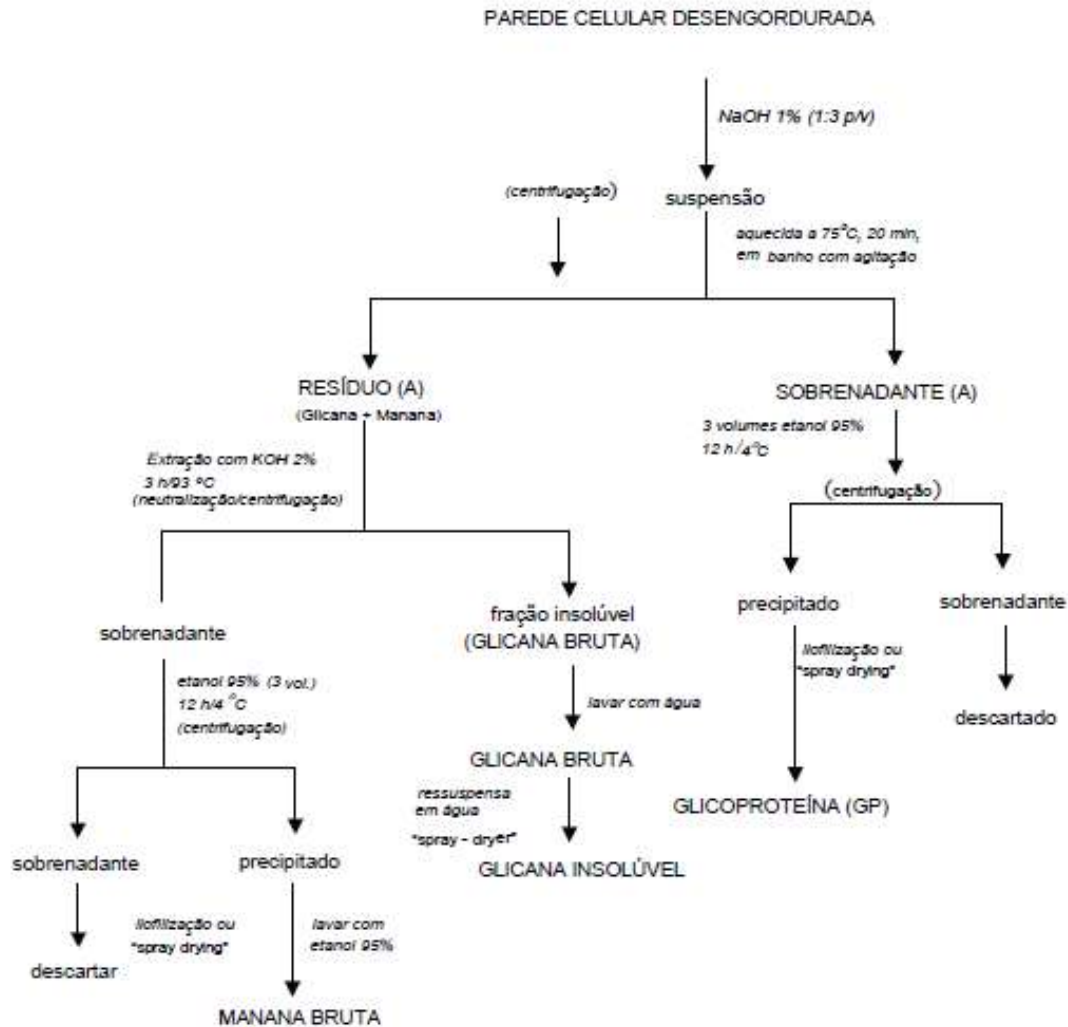


Figura 12 - Diagrama de blocos processo proposto por Chaud e Scarbiere (2006)

O processo parte da parede celular desengordurada e faz uma extração previa de glicoproteína com solução alcalina quente, seguida de recuperação por precipitação com etanol.

Ferracini-Santos e Sato (2009) propuseram uma adaptação ao processo de Freimund, na qual a lise térmica é realizada em autoclave, porém não foi feita somente em água e sim em uma solução tampão (pH=7), e o tempo de autoclavagem foi reduzido de 5 para 3 horas, o que segundo os autores, reduziu a degradação dos componentes da parede celular.

O uso de manoproteínas, como já foi dito, já alcançou escala industrial, sobretudo como aditivo de vinhos, levando ao patenteamento de rotas de extração por grupos como DSM foods (Holanda) e Lesaffre (França).

A Patente depositada pela Lesaffre propõe o processo apresentado na Figura 13.

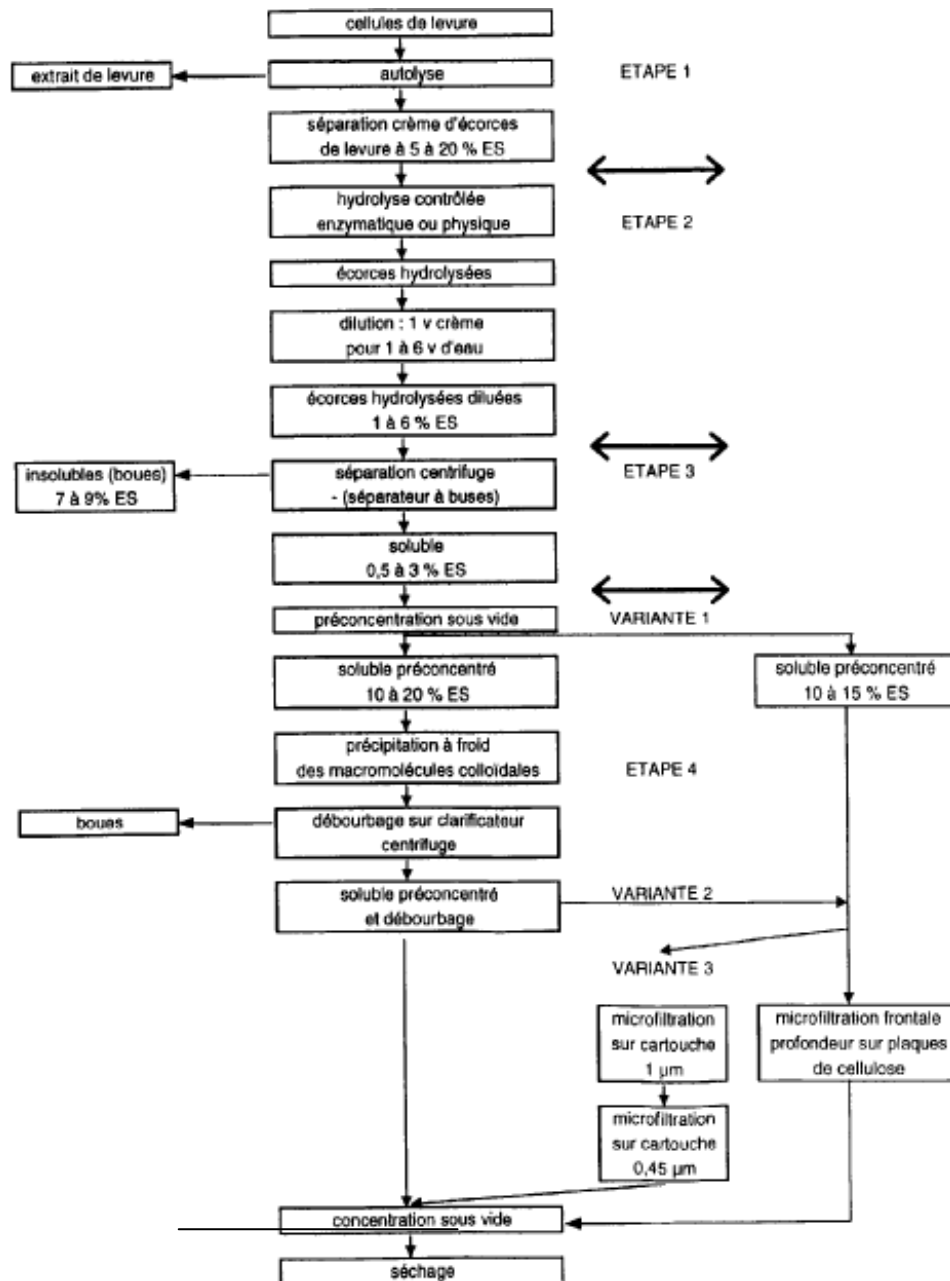


Figura 13 – Diagrama Leseffre. Fonte: Patente número EP1094117A depositada pela empresa lesaffre

A empresa holandesa DSM também vem se mostrando interessada nas manoproteínas como aditivos de vinhos, tendo depositado ao menos duas patentes no mercado, referentes ao produto comercializado com nome claristar®. Analisando as

patentes pode-se perceber que todas adotam uma mesma rota básica, apresentada pelo diagrama de blocos (Figura 14).

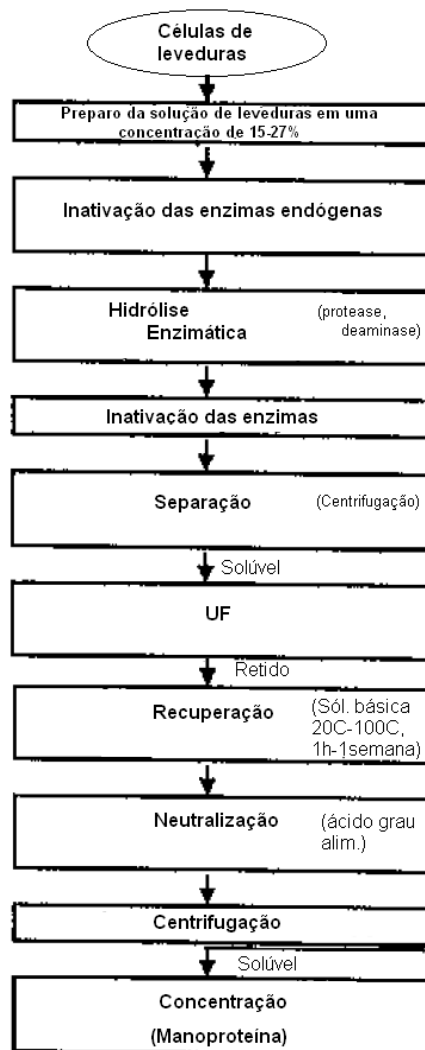


Figura 14 - Diagrama DSM (adaptado de patente número WO2006/067145 A1)

No relatório descritivo da patente há uma alusão ao método proposto pela empresa Lesaffre, classificado como excessivamente trabalhoso e pouco aplicável na realidade, para a produção de manoproteína.

Capítulo IV – Procedimentos experimentais

Neste capítulo é apresentada uma rota de extração, baseando-se na literatura existente, que alie um desempenho satisfatório em termos de rendimento e pureza um custo viável do produto de interesse, as manoproteínas, a partir de células de *Saccharomyces cerevisiae* de panificação.

IV.1) Rotas propostas e testadas

IV.1.1) Rota 1 de obtenção

A primeira rota avaliada foi baseada no método proposto por Freidmund (2003), uma vez que o mesmo se apresentou como uma das rotas mais simples de obtenção das manoproteínas. O roteiro experimental está apresentado a seguir (Figura 15) na forma de um diagrama e é composto basicamente por uma lise térmica de um creme de leveduras (solução aquosa sem tampão) em autoclave por 4 horas, seguido por uma etapa de centrifugação, onde o sobrenadante é submetido a uma precipitação com etanol 95%. O precipitado é então recuperado com o auxílio de um funil de separação e liofilizado.

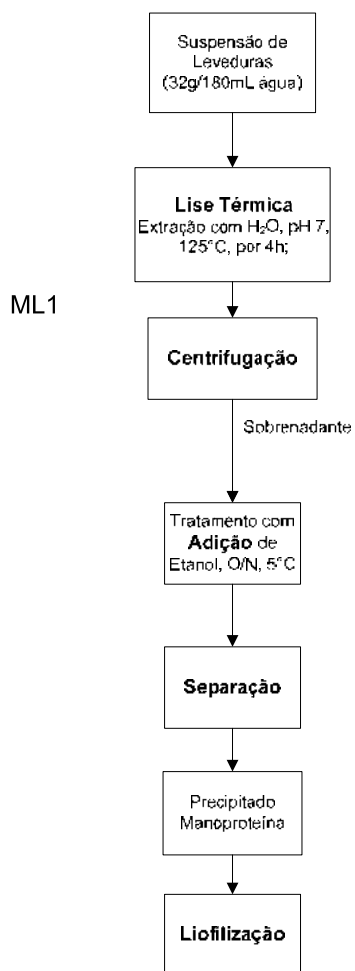


Figura 15 - Fluxograma da Rota 1 de obtenção de manoproteínas de *S. cerevisiae*

IV.1.2) Rota 2 de obtenção

É importante frisar que com o método da lise térmica há acesso majoritariamente as manoproteínas não ligadas covalentemente à parede celular. Para haver acesso as manoproteínas ligadas a β -1,3 glucana da parede, a forma descrita na literatura como já foi citado é com o uso de uma digestão enzimática com uma β -1,3 glucanase (zymolase ou lyticase, por exemplo). A partir avaliou-se uma segunda rota de extração onde foi acrescentada uma etapa com a enzima lyticase sobre o precipitado obtido da etapa de centrifugação, o qual não havia sido utilizado na primeira rota proposta neste trabalho. Ainda vale ressaltar que mudamos dois parâmetros na lise térmica em autoclave, um em relação ao fato de termos utilizado uma solução tampão fosfato (pH=7) ao invés de água, seguindo as propostas de Ferrini-Santos (2009) e Assis (2000), outro parâmetro modificado foi o tempo de 3

horas ao invés das 4 horas utilizadas na rota anterior, também seguindo as propostas de Ferracini-Santos (2009) e Assis (2000), que alegaram que deste modo a degradação dos compostos da parede celular seria menor.

O diagrama do processo em nível de bancada está exposto na Figura 16.

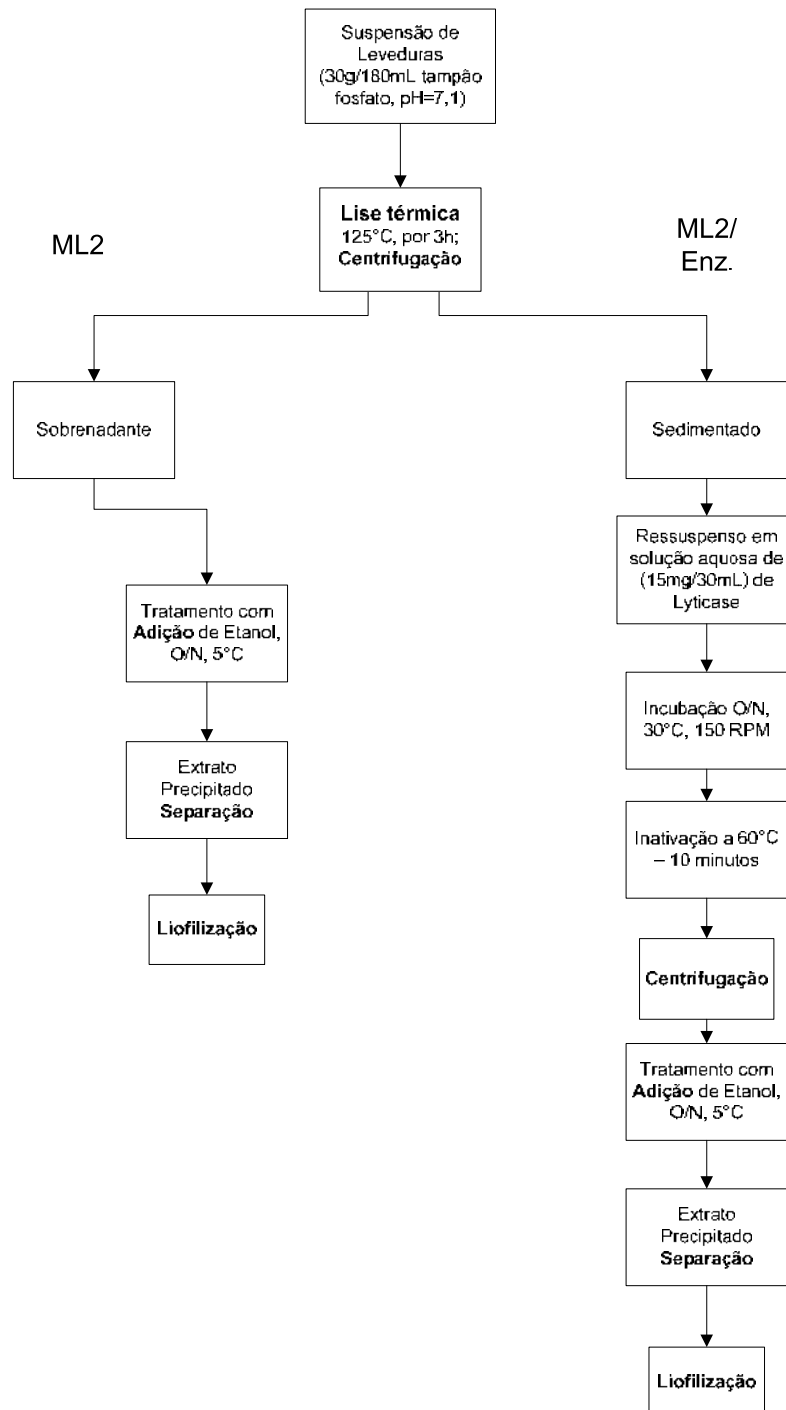


Figura 16 – Fluxograma da Rota 2 de obtenção de manoproteínas de *S. cerevisiae*

IV.1.3) Nossas propostas alternativas à lise térmica

Testamos ainda alternativas à lise térmica, para se obter a fração não ligada à parede, neste caso a proposta deste trabalho foi o uso de um agente redutor (com ação desnaturante sobre as proteínas). Foram avaliadas, separadamente, as ações do sulfato dodecil de sódio (SDS) e do dithiothreitol (DTT), além do teste com uréia, seguindo a proposta de Valentin *et al.* (1984). Essas propostas visam obter um rompimento celular mais brando, extraíndo as já mencionadas manoproteínas conectadas por ligações não-covalentes à parede celular.

IV.2 Materiais e métodos

IV.2.1) Obtenção das frações pelos diferentes métodos

Preparo da suspensão de leveduras

A biomassa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) de panificação (Fleischmann & Royal), foi pesada e posteriormente foi preparada uma mistura com água destilada, com ajuste de pH com Hidróxido de Sódio (0,1M) para 7,0, tendo sido adicionados 32g em 180 mL de água, resultando em uma concentração de 14,4% (p/p) em base úmida de levedura. (Em outros experimentos foram preparadas suspensão de levedura em concentrações 14,3% (p/p) e em tampão fosfato (50 mM, pH = 7,1).

O processo de lise térmica e centrifugação

A suspensão descrita foi colocada em erlenmeyer e levada para uma autoclave, onde permaneceu por 4 horas a 121°C, para garantir o rompimento celular. Posteriormente foi resfriada e adicionada água destilada, para obter uma diluição de 1,5 vezes. Depois esse volume foi centrifugado a uma velocidade de agitação de 4500 rpm por 20 minutos e separado em alíquotas, sobrenadante e precipitado, para posteriores análises. Esse procedimento segue o método usado por Freimund *et al.* (2003), que foi modificado do método desenvolvido por Peat *et al.* (1961).

A lise térmica realizada por um segundo método, seguiu como a descrição anterior, porém permaneceu em autoclave a 121°C por 3 horas. E a partir deste

método, após a centrifugação o precipitado seguiu para a extração enzimática. Enquanto o sobrenadante segue o procedimento descrito abaixo.

Precipitação do sobrenadante em etanol e a obtenção da manoproteína bruta

Ao sobrenadante proveniente da centrifugação foi adicionado etanol até que o volume chegue a uma proporção de 70% no recipiente, ou seja, adicionado 2,33 vezes o volume inicial. A mistura foi agitada, e mantida *overnight* a 5°C.

Separação e obtenção do precipitado

A mistura em questão é composta por sólido e líquido, porém a separação por filtração não se mostrou satisfatória (dentre as condições testadas). Assim foi realizada uma separação por decantação com funil de separação. A amostra mantida neste funil precipitava aos poucos, e separamos o precipitado da fase líquida, composta basicamente por etanol e água. Essa amostra de precipitado é o que chamamos de manoproteína bruta (ML1 não liofilizada), alíquotas desta foram separadas para análises do conteúdo de carboidratos totais, glicose e proteínas. Posteriormente estas amostras foram liofilizadas (ML1), e também alíquotas desta foram separadas para análises do conteúdo de açúcares totais, glicose e proteínas.

A fração obtida pelo segundo método recebeu tratamento idêntico ao descrito para ML1 e após a liofilização tal amostra foi denominada de ML2.

Obtenção da nova fração obtida enzimaticamente a partir da parede celular

Após a lise térmica em tampão fosfato, realizada por 3 horas a 121°C, o centrifugado foi ressuspenso em uma solução aquosa de uma beta-glucanase (Lyticase) em uma concentração de 0,5 mg/mL, e incubada *overnight* a 30°C em velocidade de agitação de 150 rpm. Posteriormente a enzima foi inativada, a 60°C por 10 minutos. Depois de centrifugado, foi adicionado etanol ao sobrenadante até que o volume chegasse a 30% de água no recipiente. A mistura foi agitada e mantida *overnight* a 5°C. A separação foi realizada por decantação com funil de separação.

Com essa amostra de precipitado removida enzimaticamente, foram feitas alíquotas para posteriores análises de conteúdo de carboidrato totais, glicose e

proteínas. Depois essa amostra foi liofilizada e denominada de amostra ML2 enzimática, ou simplesmente ML2/Enz.

Outros métodos de obtenção de manoproteína sem lise térmica

Método lise em SDS

O método foi realizado de acordo com o realizado por Chaffin *et al.* (1988), com pequenas modificações, como segue. Foi preparada uma suspensão de *S. cerevisiae* em 50 mM de tampão de lise contendo 2% de SDS (p/V) em fosfato de sódio pH 7.1, tendo sido adicionados 10g em 50 mL, resultando em uma concentração de 16,7% (p/p) em base úmida de levedura. A suspensão resultante foi agitada vigorosamente, incubada em água fervente por 5 minutos e resfriada em banho de gelo por 2 minutos.

Método lise em SDS + DTT

Foi preparada uma suspensão de levedura em uma concentração de 16,7% (p/p) em base úmida, em uma solução contendo 1% de SDS e 10 mM de DTT em tampão fosfato (50 mM, pH = 7,8). Em seguida a suspensão foi fervida por 5 minutos e resfriada em banho de gelo por 2 minutos.

As suspensões obtidas pelos três métodos acima seguiram o mesmo procedimento descrito a seguir: As soluções foram centrifugadas (velocidade de agitação de 4500 rpm por 10 minutos). Depois de centrifugado, ao sobrenadante foi adicionado etanol até que o volume chegasse a 30% de água no recipiente. As misturas foram agitadas e mantidas *overnight* a 5°C. As separações também foram realizadas por decantação com funil de separação.

Método lise em uréia

A suspensão de levedura em uma concentração de 16,7% (p/p) base úmida, foi mantida em uma solução contendo uréia (Vetec) 6 M em tampão fosfato (50 mM, pH = 7,8) por 30 minutos a temperatura ambiente. Essa metodologia foi uma adaptação de um método realizado por Valentin *et al.* (1984).

IV.2.2) Métodos analíticos

As metodologias analíticas usadas para as análises de concentração de açúcares totais, glicose e proteínas das alíquotas são descritas a seguir. Todos reagentes e solventes utilizados por esses métodos eram grau P.A.

Determinação de carboidratos totais

Para a dosagem dos carboidratos totais a amostra foi hidrolisada previamente pelo procedimento de hidrólise ácida e as dosagens de açúcar total foram realizadas pelo método do fenol-sulfúrico (Michel Dubois, 1956). Foram adicionados em tubos de 2mL, 0,2 mL de solução contendo as diferentes amostras, 0,2 mL de fenol 5% e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (Vetec). Após agitação vigorosa essa mistura foi aquecida em banho de água à 100°C por 5 minutos. As leituras efetuadas a 490 nm no espectrofotômetro UV-Visível do Laboratório E-122.

Para a determinação do teor de açúcares totais na amostra final obtida pelos diferentes métodos foi realizada a seguinte curva padrão (Figura 17), utilizando-se uma solução padrão de D-manose em concentrações de 10; 20; 40; 80; 120 mg/L. As análises foram realizadas em duplicata.

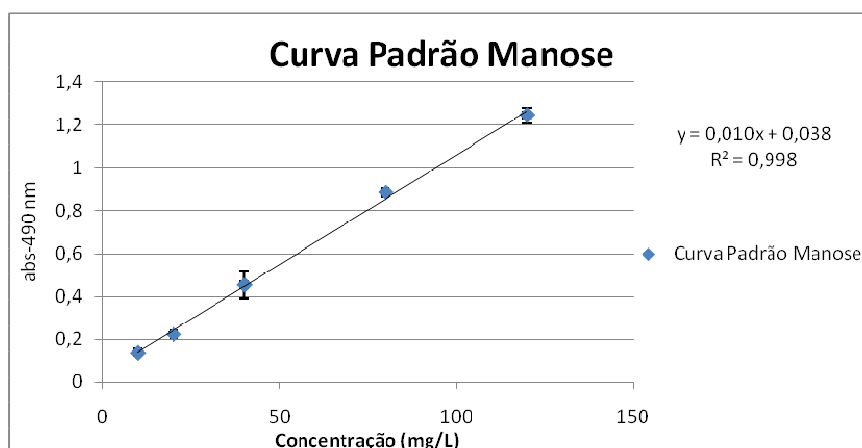


Figura 17 – Curva padrão do método de dosagem açúcares totais utilizando padrões de manose

Determinação do teor de proteínas

Foram realizadas análises para determinação do teor de proteína nas amostras, através do método Lowry (Lowry *et al.*, 1951), para tal foram adicionados 1,48 mL de reagente A em um volume de 370 µL de amostra, deixando por 10 minutos no escuro

em temperatura ambiente. Depois, foram adicionados 148 µL do reagente B, mantido por 30 minutos em ausência de luz, até a leitura em espectrofotômetro UV-VIS do lab E-122, em absorvância de 660 nm.

Sendo o dito reagente A: Solução preparada com 1 mL de CuSO_4 1% (p/v) e 1 mL de solução de tartarato de Sódio e Potássio 2% (p/v) em um balão volumétrico de 100 mL, e completada com solução de Na_2CO_3 2% em NaOH 0,1M. E o reagente B: Solução aquosa 50% de Folin-Ciocalteu.

Foi elaborada uma curva-padrão com uma solução de Albumina de soro bovino (BSA), em concentrações de 0,01; 0,02; 0,04; 0,07; 0,10 g/L, e utilizando como branco a água destilada em substituição à amostra.

Determinação de glicose

Para determinação de glicose livre foi realizado método de GOD-POD (Sigma Aldrich), feito com 12 µL das diferentes amostras, 1200 µL do reativo glicose oxidase-peroxidase. A reação ocorreu temperatura ambiente por 15 minutos. A emissão colorimétrica foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda de 505 nm. Foram realizadas análises tendo D-glicose (100 mg/dL) como padrão e os brancos foram realizados utilizando-se água no lugar da amostra.

IV.2.3) Testes de caracterização das amostras obtidas

Tendo sido feitas as análises de proteínas e açúcares totais, procuramos caracterizar as amostras obtidas, visando obter informações que confirmassem a presença das manoproteínas. Para obter tal caracterização eram necessários testes que procurassem trabalhar com alguma característica peculiar das manoproteínas e uma opção viável foi a propriedade emulsificante que tais moléculas apresentam de acordo com a literatura (Cameron *et al*, 1988; Barriga *et al*, 1999).

Dois testes visando mensurar esta propriedade foram propostos e são apresentados a seguir:

Teste emulsificante

Para o teste de emulsão 6 mL de clorofórmio e 4 mL da solução emulsificante foram adicionadas a uma proveta graduada. As soluções emulsionantes foram preparadas com as amostras liofilizadas solubilizadas em água destilada e as concentrações de nossos extratos usados no teste variaram em função do tipo de extrato obtido (já que usamos diferentes métodos de obtenção dos mesmos). O volume inicial da fase de clorofórmio foi observado visualmente na escala graduada da proveta e o valor anotado. A proveta em seguida foi vigorosamente agitada por 3 minutos. Depois disso foi mantida por 1 hora, e o volume final da fase de clorofórmio observado visualmente na escala graduada da proveta e anotado.

O percentual emulsionado (IE) foi calculado usando os volumes iniciais (V_i) e finais (V_f) da fase de clorofórmio, demonstrado pela seguinte fórmula: $IE = \frac{V_f}{V_i} \times 100$.

Teste de tensão superficial

Este teste visa mensurar a tensão superficial de uma determinada solução, que pode ser definida como a resultante das forças de atração que as moléculas da superfície de um líquido sofrem pelas moléculas presentes no interior do líquido. A tensão superficial é a propriedade responsável pela superfície do líquido atuar como uma membrana elástica, impondo resistência à perfuração da mesma. Algumas moléculas atuam como redutores da tensão superficial de líquidos, entre elas as manoproteínas, segundo a literatura (Cameron *et. al.*, 1988).

Existem algumas formas de se medir a tensão superficial, no caso deste trabalho foi utilizado um tensiômetro de placa (modelo TE3, Lauda) o qual fornece medidas rápidas e precisas da tensão superficial.

Tal tensiômetro pode ser definido como uma balança de torção, que utiliza um fino fio de torção para aplicar a força necessária para remover um anel de platina da superfície do líquido a ser testado. O fio de torção é fixado por um grampo em uma das extremidades e por uma cabeça giratória acoplada à escala na outra extremidade. A escala graduada possui 90 divisões, cada divisão correspondendo a 1 dina.

Foram medidas as tensões superficiais de soluções aquosas contendo uma concentração na faixa de 25 mg/L até 10 g/L, de amostras ML1, ML2 e ML2/enz.

Capítulo V – Resultados e Discussão

V.1) Extração e purificação das manoproteínas

Tendo sido feitas as extrações e as análises anteriormente descritas, apresenta-se na Tabela 3 um resumo dos resultados pertinentes às análises realizadas para cada amostra.

Tabela 3 – Quantificação de açúcares e proteína em nossas amostras

Método	Concentração de açúcares totais obtida nas análises das amostras não liofilizadas (g/L)	Teor de açúcares totais nas amostras (%)	Concentração de proteína (g/L)	Teor de proteína nas amostras (%)	Teor de glicose nas amostras liofilizadas (%)
ML1 não liofilizada	41,502 ± 0,783	94,12 ± 1,78	2,058 ± 0,019	4,67 ± 0,04	—
ML1	—	85,06 ± 0,00	—	4,83 ± 0,18	0,73 ± 0,01
ML2	—	45,29 ± 4,88	—	3,75 ± 0,02	0,72 ± 0,03
ML2/Enzimático	—	81,42 ± 2,34	—	2,55 ± 0,04	1,81 ± 0,14
Lise SDS	6,607 ± 0,734	—	0,368 ± 0,031	—	—
Lise SDS+DTT	5,090 ± 0,391	—	0,463 ± 0,048	—	—
Lise Uréia	1,077 ± 0,196	—	0,031 ± 0,006	—	—

A composição em termos de carboidratos totais, proteínas, e glicose de cada amostra foram compiladas na forma de um gráfico, apresentado na Figura 18.

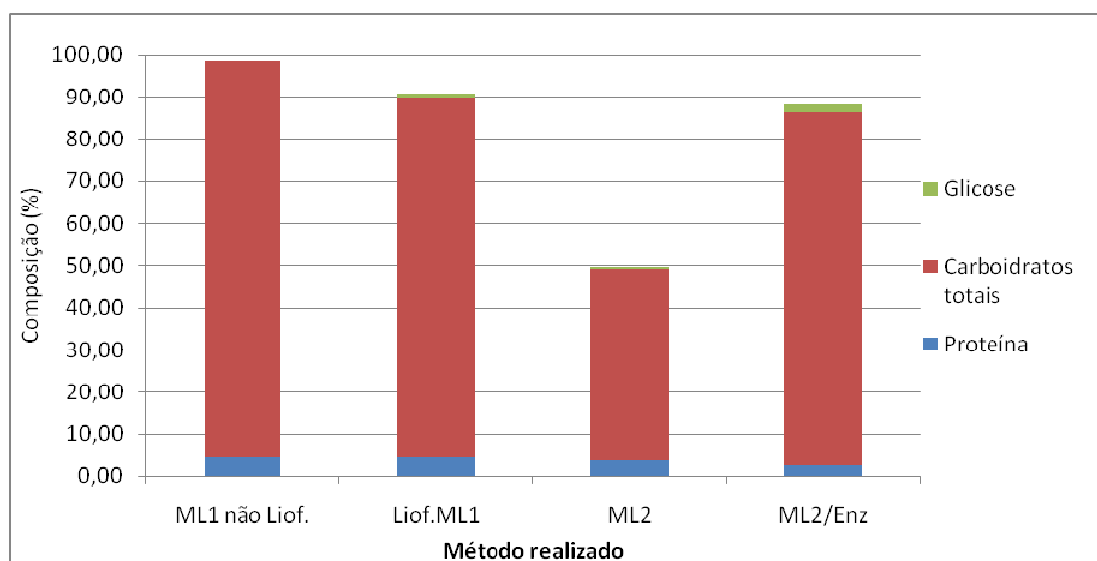


Figura 18 - Composição das amostras obtida pelos diversos métodos utilizados de extração

A partir do gráfico e da Tabela apresentados algumas conclusões e observações devem ser ressaltadas:

- A amostra ML1 não liofilizada apresenta uma relação carboidrato/proteína mais próxima da apresentada pela literatura ao se tratar de manoproteínas não ligadas covalentemente à beta glucana: 95% carboidrato / 5% proteína, já citada no capítulo 3. O seu baixo teor de glicose também é coerente, pois as manoproteínas tem sua fração carboidrato majoritariamente composta por manose.
- Na comparação entre as amostras liofilizadas (Figura 18) provenientes da lise térmica sem tampão nas condições anteriormente descritas (ML1); e lise térmica em tampão (ML2); podemos observar uma pequena redução na fração de proteínas, mas principalmente nota-se um menor teor de carboidratos totais presentes na amostra do método térmico em tampão em comparação ao sem tampão, enquanto a quantidade de glicose livre presente permanece praticamente inalterada. Essa diferença pode ser em função das condições da lise não terem sido as ótimas: além da presença do tampão fosfato em pH 7,1, tivemos ainda uma alteração no tempo total de lise a 121°C, sendo reduzida de 4 para 3 horas, tendo sido observado uma diferença na coloração do lisado, que ficou mais escuro e com uma cor amarela mais intensa e forte.
- Na análise da lise térmica em tampão posteriormente incubada em beta-glucanase (ML2/enz), observa-se uma maior presença de carboidratos na amostra. A ação da β -glucanase (Lyticase) levou a quebra da β -glucana contida na parede celular e, assim, possivelmente possibilitou uma maior solubilidade da glucana e glucana/manoproteína em água, e sendo essa também insolúvel em etanol o resultado encontrado seria igualmente positivo na análise de carboidratos totais. Esse poderia ser o motivo para esses valores mais elevados de açúcares presentes e mais baixos de proteínas presentes, assim a glucana estaria sendo um contaminante na amostra final de manoproteína obtida através deste método com pós-tratamento com beta-glucanase (esta hipótese será melhor discutida após os testes de caracterização). Outro fato observado é que a quantidade de glicose livre presente foi maior, provavelmente proveniente da glucana hidrolisada.

- O fato das composições de proteínas e carboidratos terem ficado em valores mais baixos quando comparadas ao não liofilizado pode se dever a não solubilização total das amostras liofilizadas em água, na realização dos métodos analíticos. Esta dificuldade de solubilização em água é comum em amostras após passarem pelo processo de liofilização.
- Em relação às amostras (não liofilizadas) obtidas pela ação de agentes redutores e desnaturantes (SDS, SDS+DTT e uréia) pode-se estabelecer uma comparação com a amostra ML1 não liofilizada, em termos da concentração de açúcares totais, que aponta para as extrações com os agentes redutores e uréia terem tido um desempenho consideravelmente inferior a extração ML1, uma vez que a presença de açúcar na amostra é um indicativo preliminar importante da possível presença de manoproteínas. Ressalta-se que a comparação é possível uma vez que as concentrações em termos de leveduras nos cremes iniciais, submetidos aos diversos processos extrativos, eram muito próximas.

Considerando que a intenção de fazermos a extração com os agentes redutores foi justamente buscar uma alternativa a lise térmica, no sentido de se extrair as manoproteínas, em especial aquelas que não são ligadas covalentemente à parede celular (beta glucana), pelo exposto acima resolvemos prosseguir com o procedimento de lise térmica em detrimento das alternativas baseadas em agentes redutores ou desnaturantes.

As imagens dessas amostras ML1, ML2 e ML/Enzimático liofilizadas podem ser observadas, respectivamente, pelas Figuras 19, 20, 21.



Figura 19 – Foto da amostra ML1 liofilizada



Figura 20 – Foto da amostra ML2 liofilizada



Figura 21 - Foto da amostra ML2/Enzimática liofilizada

V.2) *Rendimento*

As amostras obtidas foram liofilizadas e pesadas para determinação do rendimento e armazenadas a -18°C para posteriores estudos e análises.

A Tabela 4 mostra as massas obtidas após a liofilização e os valores de rendimento obtidos pelos três métodos (ML1, ML2 e ML2/Enz). Os rendimentos foram calculados em valores percentuais da massa inicial de leveduras (peso úmido) em relação ao seu peso seco, adotando um valor de 60% de água presente (Brown, 1983) e em relação à massa teórica de parede celular, adotando valores presentes no capítulo 3.

Tabela 4 – Rendimentos em % (p/p) para as amostras liofilizadas obtidas pelos diferentes métodos de extração (ML1, ML2 e ML2/Enz.)

Método	Massa liofilizada obtida (g)	Rendimento (%) em relação à massa inicial (base úmida)	Rendimento (%) Peso seco de leveduras	Rendimento (%) Parede celular
ML1	1,0142	3,17	7,92	31,69
ML2	2,985	9,95	24,87	99,5
ML2/Enz.	0,6748	2,25	5,62	22,49

A análise dos dados presentes nesta Tabela mostra em primeira instância que o método ML1 apresenta coerência com os dados da literatura uma vez que tem um rendimento de 31,69% em relação à parede celular, valor que está na faixa da fração manoprotéica da parede celular, entre 30 e 50% segundo Magnelli (2002), ressaltando que isto não garante que temos nesta amostra apenas manoproteínas, mas se aliarmos estes dados aos resultados da análise de proteínas e carboidratos temos indicativos importantes de que esta pode ser uma fração majoritariamente composta por manoproteínas, conclusão esta que deve ser melhor embasada, e este foi o intuito dos testes de caracterização cujos resultados serão apresentados posteriormente.

Pode-se notar ainda que a massa obtida pelo método ML2 (2,985 g) foi bem superior às outras duas, quase 2 gramas a mais do que o obtido em ML1, e ainda notamos um valor absurdo de 99,5% de rendimento em relação à parede celular. Isto leva a crer que essas diferenças nas condições da lise térmica possivelmente levaram a obtenção de um extrato mais impuro. Estes resultados serão melhor embasados após os teste de caracterização.

A extração da ML2/enz teve, a princípio, um rendimento inferior aos demais processos, mas se consideramos que a intenção desta rota era complementar a extração preliminar via lise térmica, buscando obter a fração manoprotéica ligada à beta glucana, poderíamos considerar um valor considerável e importante (2,25% em comparação com os 3,17% para a obtida em ML1, ambos em termos da massa inicial de levedura). No entanto tal conclusão pode ser contestada se for considerado que esse rendimento pode estar mascarado pela presença de resíduos de glicose originários da beta glucana degradada pela atuação desta enzima, o que ficou indicado pelas análises anteriores, de forma que tal lise além de onerar consideravelmente o processo, pode estar na realidade contribuindo de forma discreta para a extração de manoproteínas, e levando à uma contaminação do produto final com glicose.

V.3) Caracterização das manoproteínas obtidas

As substâncias tensoativas, também denominadas por surfactantes, são constituídas por moléculas com propriedades anfipáticas bem definidas, isto é, contêm grupos hidrofóbicos e grupos hidrofílicos. A combinação destas propriedades opostas numa única molécula confere a estas substâncias características únicas quando em

contato com a água, tais como a formação de agregados acima de certa concentração (micela) e a capacidade de solubilizar substâncias pouco solúveis em água (emulsificação), estas duas propriedades estão diretamente relacionadas. Como já mencionado, as manoproteínas possuem essa característica e, portanto, foram realizados testes de medição da tensão superficial e emulsificação.

V.3.1) Resultados do teste de emulsificação

Os resultados estão apresentados em forma de gráficos (Figuras 23, 24 e 25), onde cada curva foi construída com pelo menos quatro pontos de concentração do agente emulsificante (amostras obtidas), de tal forma que fosse possível chegar a concentração mínima de agente a ser utilizado para obter a emulsificação, (a partir da qual é possível obter 100% de emulsificação). A Figura 22 mostra uma imagem de um dos nossos testes.



Figura 22 – Emulsão (de clorofórmio) formada pela solução contendo ML1

As substâncias tensoativas tendem a agrupar-se em contato com a água, para minimizar a energia do sistema, dando origem a micelas (agregados coloidais formados espontaneamente em água por compostos anfipáticos). A curva gerada por esses experimentos tem como característica um salto, onde em uma pequena faixa de variação de concentração há uma grande variação na capacidade de emulsificação, apenas a partir dessa concentração micelar crítica as micelas são formadas. Acima dessa concentração, não há variação na tensão superficial do líquido, permanecendo praticamente constante.

As amostras selecionadas foram as ML1, ML2 e ML2/enzimático, sendo todas amostras utilizadas nestes testes eram liofilizadas.

➤ Amostra ML1

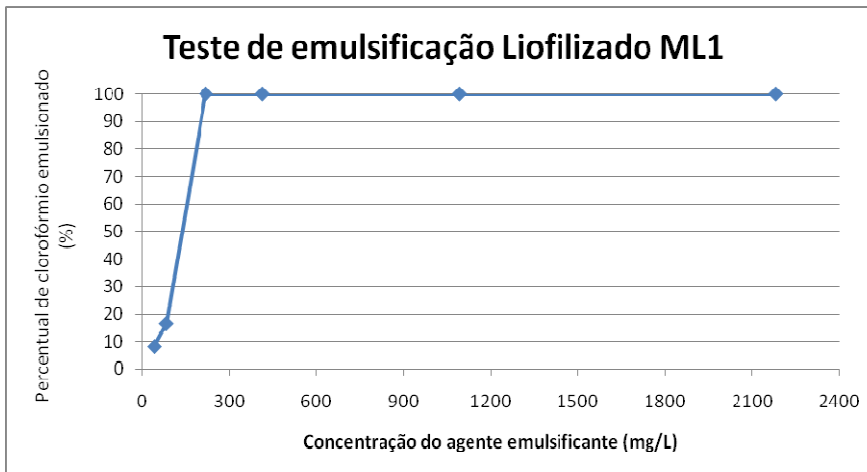


Figura 23 - Gráfico resultante do teste de emulsificação para amostra ML1 liofilizada.

A Percentagem da fase de clorofórmio emulsionada em função da concentração do emulsificante presentes na fase aquosa pode ser vista na Figura 23. Antes de uma concentração crítica em torno de 218 mg/L, nenhuma emulsão foi observada, ou foi apenas parcialmente observada. A esta concentração, 100% de clorofórmio foi emulsionado.

➤ Amostra ML2

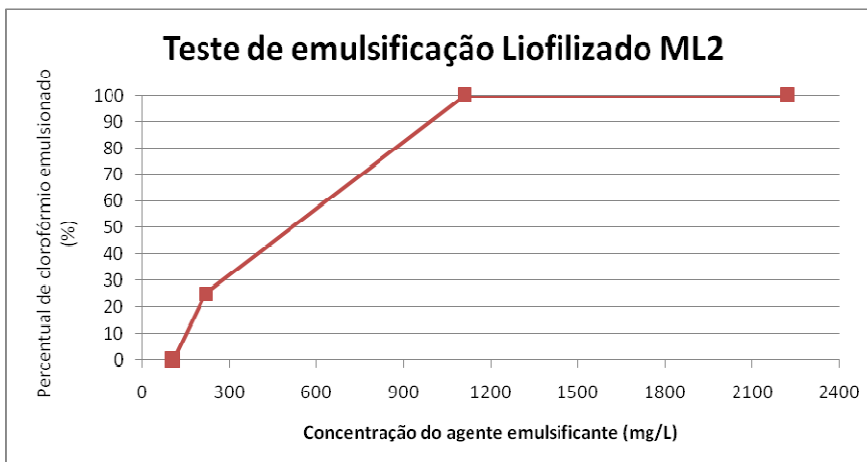


Figura 24 - Teste de emulsificação para amostra ML2 liofilizada.

Para esta amostra ML2, a faixa onde há concentração mínima de agente se situa em torno de 1100 mg/L.

➤ Amostra ML2/Enzimático

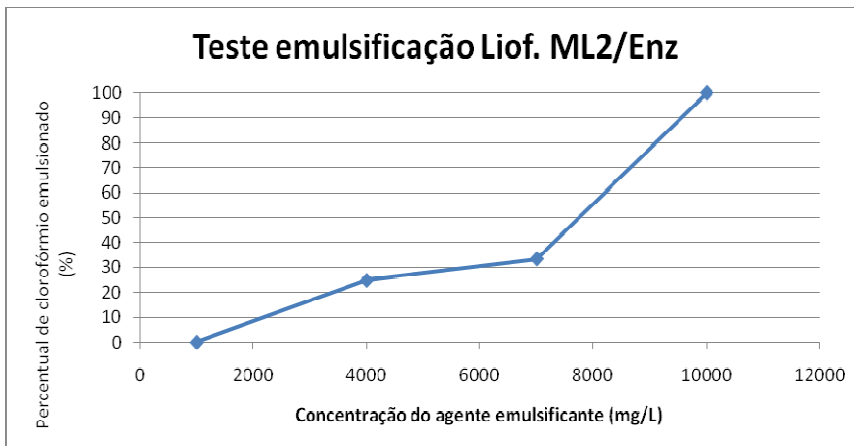


Figura 25 - Teste de emulsificação para amostra ML2 enzimática.

A amostra ML2 enzimática apresentou concentração mínima para obter 100% de emulsificação na faixa de 8000-10000 mg/L.

Comparando os resultados das três amostras pode-se notar claramente que este teste embasou algumas conclusões que haviam sido apresentadas anteriormente, entre as quais:

- A fração ML1 de fato é a que apresenta possivelmente maior teor de manoproteínas, tendo em vista que esta foi a amostra que precisou de uma concentração menor para obter 100% de emulsificação dentre as comparadas. O valor obtido de concentração crítica, foi comparável ao encontrado em Barriga *et. al.* (1999), um valor de 321 mg/L. Assim como o resultado obtido por Cameron *et. al.* (1988,) levando a 100% de emulsificação de clorofórmio, com 400 mg/L de manoproteína.
- A amostra ML2 apresentou, apesar de um resultado de rendimento de extração alto se comparado ao da amostra ML1, um menor poder emulsificante o que indica que esta amostra tem um alto nível de contaminantes, como já estava indicado por resultados de análises anteriores.
- A fração ML2/enzimática realmente apresenta um teor alto de contaminantes (possivelmente glucana), uma vez que é necessária uma concentração maior de agente para obter-se 100% de emulsificação. Se consideramos que resíduos de glicose não contribuem para o aumento da capacidade emulsificante da amostra, estes de fato devem influenciando o resultado.

É importante ressaltar que este teste possui um percentual de erro considerável, tendo em vista que baseia em uma observação visual, no entanto, não compromete as conclusões apresentadas. Já que os resultados obtidos foram muito distantes entre si (a diferença da faixa de concentração mínima entre as amostras foi considerável).

Outros testes mais precisos foram utilizados como o teste de medida da tensão superficial.

V.3.2) Testes de tensão superficial

Os resultados são apresentados em forma de gráficos com dados gerados pelo *software* acoplado ao tensiômetro, correlacionando tensão superficial (em dina/cm) e a concentração da solução teste (soluções aquosas das diversas amostras). As amostras selecionadas foram ML1 e ML2, tendo em vista que a amostra enzimática demonstrou não ter capacidade emulsificante potencial. Os gráficos estão apresentados nas Figuras 26 e 27.

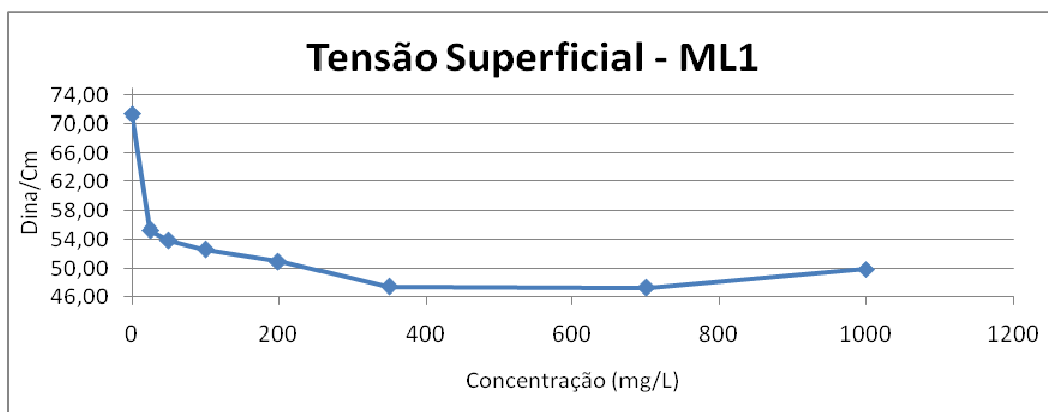


Figura 26 - Gráfico tensão superficial em função concentração da amostra ML1

Este gráfico demonstra que a amostra foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de um valor de 71,4 (valor obtido em nosso experimento) para 47 dina/cm em uma concentração de aproximadamente 0,35 g/L.

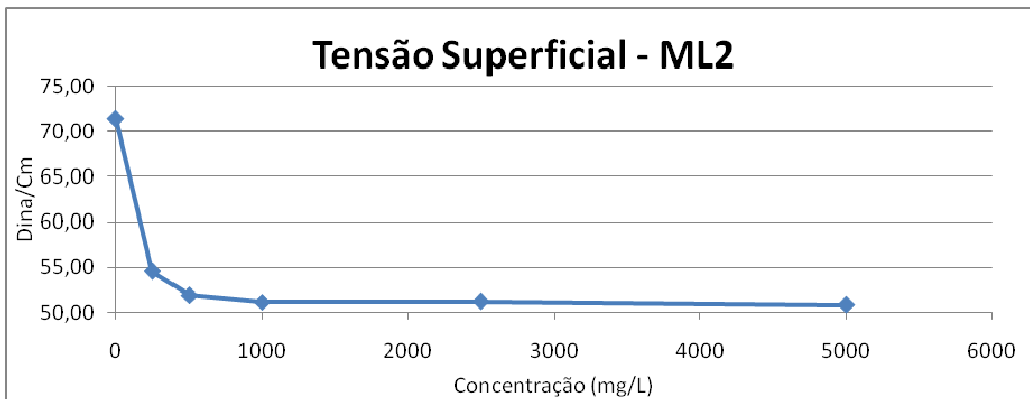


Figura 27 – Teste de tensão superficial em função concentração da amostra ML2

O gráfico revela que esta amostra tem um atuação menos eficiente como agente redutor de tensão superficial se comparada a amostra ML1, reduzindo a tensão da água para o valor de aproximadamente 51 dina/cm, para uma concentração de 1 g/L de amostra. As observações obtidas neste teste ratificam as concluídas com os dados do teste de emulsificação.

As observações obtidas neste teste ratificam as conclusões obtidas com os dados do teste de emulsificação.

É importante frisar que, além de caracterizar a amostra, estes dois testes, em especial o de tensão superficial, também podem ser utilizados como testes de aplicação, tendo em vista que uma aplicação destacada das manoproteínas é como um bioemulsificante. Neste sentido podemos comparar os resultados obtidos, em especial para a amostra ML1, com resultados de desempenho de agentes emulsificantes comerciais (Tween 80 e Span 20). Tal comparação está apresentada na Figura 28.

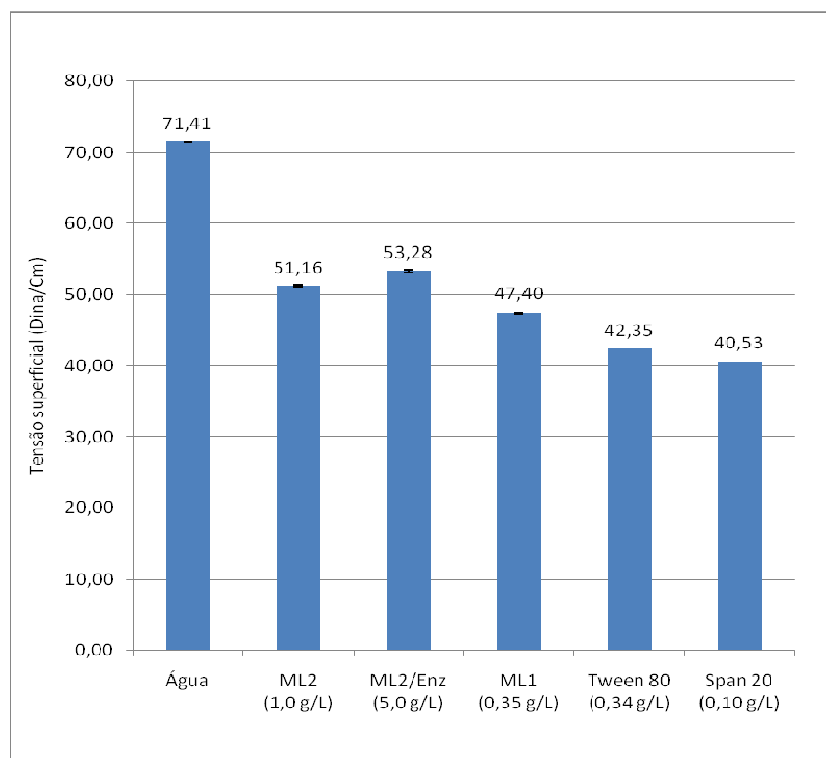


Figura 28 Comparação entre os agentes emulsificantes obtidos (ML2,ML2/Enz eML1) e os comerciais quanto a tensão superficial

O resultado a princípio mostra menor poder emulsificante das amostras obtidas em relação às comerciais, mas temos de considerar que os produtos comerciais são a referência para o mercado em termos de desempenho. Estes produtos, porém, apresentam um inconveniente, a sua origem petroquímica, o que restringe a utilização destes agentes em setores importantes, como o alimentício. Ainda é possível ressaltar que, talvez, com um processo de aperfeiçoamento em termos de purificação o desempenho de uma formulação de manoproteínas possa ser melhorado.

Capítulo VI – Análise do mercado

VI.1) Avaliações do possível mercado consumidor de manoproteínas

O produto deste processo, como já foi dito, vem tendo duas utilidades principais: como aditivo de vinho e como bioemulsificante. A título desta análise nos deteremos ao mercado de aditivos, deixando a demanda por emulsificantes como uma alternativa possível de expansão do mercado consumidor de manoproteínas.

Em uma análise como esta é importante, primeiramente, definir o mercado efetivo que o produto pode alcançar, sendo necessárias algumas premissas. As duas primeiras estão apresentadas abaixo:

Premissa 1: Tendo em vista a escassez de dados relativos a aditivos de vinhos, inclusive os baseados em manoproteínas, sobretudo a nível nacional, foi feita análise indireta a partir de informações relativas ao mercado de vinho. A correlação entre as duas informações será dada pelos dados de quantidade de aditivo por litro de vinho recomendada pelos produtores.

Premissa 2: A produção da planta terá como principal objetivo atender à demanda nacional de aditivos de vinho e de forma secundária à demanda de outros países do MERCOSUL em especial Argentina, Uruguai e Chile (país associado ao Mercosul).

Entretanto, antes de continuarmos com este processo de segmentação, iniciado com as premissas 1 e 2, faremos uma breve análise do mercado de vinhos como um todo.

VI.2) O mercado de vinho

O vinho é uma das bebidas mais antigas e, ao longo da sua história, além da sua grande importância econômica, ele sempre esteve associado a rituais, tanto religiosos como pagãos. A simbologia em torno do vinho sempre se misturou à sua importância como mercadoria e hoje nenhuma outra bebida tem a sua imagem tão associada à tradição como ele. Essa característica atribuiu especificidades ao fenômeno do

crescimento do comércio internacional de vinho e à sua transformação em produto global.

O negócio do vinho movimenta aproximadamente US\$ 180 bilhões no mercado mundial (Organização Internacional da Uva e do Vinho – OIV, 2006). Dentre os principais produtores destacam-se os países tradicionais do “Velho Mundo” como França, Itália, Espanha, Portugal e Alemanha e, mais recentemente, os países do “Novo Mundo” como EUA, Chile, Austrália, Nova Zelândia, Argentina, África do Sul e Brasil. A partir da década de 1970 os vinhos do Novo Mundo, que representavam apenas 5% do mercado internacional, ganharam qualidade e passaram a competir com os europeus no mercado internacional e, atualmente, já são responsáveis por 50% do total de vinhos comercializados no mundo.

Segundo dados da OIV, em 2006 a estimativa de produção mundial de vinho foi de aproximadamente 28,3 bilhões de litros (Tabela 5), enquanto o consumo mundial foi de 24,2 bilhões de litros.

Tabela 5 - Produção mundial de vinho (em 10⁵ litros)

Período em anos	Produção (10 ⁵ L)
1971 - 1975	313.115
1976 - 1980	326.046
1981 - 1985	333.552
1986 - 1990	304.192
1991 - 1995	263.092
1996 - 2000	272.557
2001 - 2005	272.735
2001	265.671
2002	257.123
2003	264.089
2004	296.911
2005	279.880
2006	282.779

Fonte: Adaptado do Relatório da OIV - SITUATION OF THE WORLD VITICULTURAL SECTOR IN 2006

VI.3) Panorama do mercado de vinhos no Brasil

Analisando o mercado nacional, percebemos que o único estado que divulga estatísticas sobre a produção de vinho é o Rio Grande do Sul, entretanto considera-se que atualmente o estado seja responsável por mais de 90% da produção nacional, fazendo com que a sua produção, expressa na Tabela 6, seja uma boa representação da produção do país (Mello, 2008).

Tabela 6 - Produção de vinhos no estado do Rio Grande do Sul, em litros

PRODUÇÃO	2005	2006	2007	2008
Vinho de mesa	226.080.432	185.100.887	275.287.908	287.506.811
Tinto	180.698.666	149.527.555	228.156.220	241.057.928
Branco	39.212.146	31.738.390	42.118.552	42.942.053
Rosado	6.169.620	3.809.942	5.013.136	3.506.830
Vinho Fino	45.453.898	32.168.976	43.176.484	47.334.502
Tinto	25.409.805	18.868.108	24.786.071	27.583.032
Branco	20.012.363	13.249.969	17.598.428	18.812.571
Rosado	31.730	50.900	791.985	938.898

Fonte: Embrapa Uva e Vinho - Vitivinicultura brasileira: Panorama 2008

Nesta Tabela estão representados os dados de algumas das categorias de vinho produzidas. A lei Nº 10.970 de 12 de novembro de 2004 alterou dispositivos da Lei nº 7.678, de 8 de novembro de 1988, que dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho.

Assim de acordo com a legislação nacional estabelecida, o vinho de mesa pode ser definido como o vinho com teor alcoólico de 8,6% a 14% em volume, podendo conter até uma atmosfera de pressão a 20°C, enquanto vinho fino é aquele de teor alcoólico de 8,6% a 14% em volume, elaborado mediante processos tecnológicos adequados que assegurem a otimização de suas características sensoriais e exclusivamente de variedades *Vitis vinífera* do grupo Nobres.

Vitis vinífera é a espécie de videira (*Vitis* sp.) mais cultivada para a produção do vinho. Esta trepadeira da família das vitáceas, cujo fruto é a uva, vem sendo cultivada por várias civilizações européias há milhares de anos, o que originou dezenas de variedades, as denominadas castas, através de seleção artificial. Originária da Ásia, a *Vitis vinífera* é cultivada em todas as regiões de clima temperado. A Figura 29 mostra uma parreira de uvas de uma das castas da espécie *Vitis vinífera*.



Figura 29 – Imagem de parreiral da casta *vitis vinifera*. Fonte: www.botanical.com

Retomando o processo de segmentação, adotaremos uma nova premissa, baseada nas definições acima apresentadas:

Premissa 3: O produto estará voltado para o mercado de vinhos finos pois os mesmos comportam em seu preço final e estão definidos na legislação como produtos que fazem uso de tecnologias de aperfeiçoamento de suas qualidades sensoriais. Entre elas possivelmente a aditivação com manoproteínas.

O consumo interno de vinhos finos se mostra crescente no mercado nacional com o aumento em 14,63% de 2005 para 2006, o que demonstra que a produção pode também apresentar cenário semelhante nos próximos anos. No entanto, é importante ressaltar que o Brasil ainda ocupa o 53º lugar em consumo no ranking mundial com 1,8 litro/habitante/ano (Rocha, 2006).

Os importados ainda representam a maior fatia do mercado nacional com participação de 64,89%. Dentre os motivos dessa supremacia estrangeira pode-se destacar a taxa de câmbio que favorece as importações e a preferência do consumidor brasileiro pelo produto importado. Os dados da Secretaria do Comércio Exterior (SECEX), órgão subordinado ao Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior, revelam que a participação dos importados tem se intensificado nos últimos anos: em 2006 o Brasil importou 46,37 milhões de litros de vinho, o que representou 23,67% a mais que em 2005. Quanto às origens dos vinhos importados pelo Brasil, observa-se que países vizinhos como Chile e Argentina são os principais exportadores. Os preços dos vinhos chilenos e argentinos são competitivos em relação aos vinhos

comuns de mesa brasileiros, o que explica a maior concorrência com os vinhos nacionais (IEA 2007).

As exportações brasileiras de vinho ainda são pequenas, porém com um crescimento expressivo em 2008 onde foram exportados 10,35 milhões de litros de vinho, 215,33% a mais do que a quantidade verificada em 2007 (Mello, 2009).

VI.4) O mercado de vinho nos outros países componentes do MERCOSUL e associados

Em relação ao mercado dos outros países do Mercosul e associados, temos os seguintes dados de produção fornecidos pela OIV (Tabela 7) no seu relatório anual (STATE OF VITIVINICULTURE WORLD REPORT).

Tabela 7 - Produção de vinho no ano de 2006 por países, em 10⁶ litros

País	Produção (10⁶ L)
Argentina	1539,6
Bolívia	7,3
Chile	844,9
Paraguai	6,0
Peru	60,0
Uruguai	92,3

Fonte: Adaptado do Relatório da OIV - SITUATION OF THE WORLD VITICULTURAL SECTOR IN 2006

Segundo o instituto IERAL (Instituto de estudos da realidade Argentina e Latinoamericana) a produção de vinhos finos na Argentina representou em média 60% da produção total anual ao longo do período 2006-2008, já no Uruguai o percentual estaria na faixa de 30 a 35% (<http://www.uruguaywines.com>), enquanto o percentual chileno seria em torno de 50%.

Os mercados chilenos e argentinos vêm se mostrando cada vez mais sólidos, com crescimento progressivo ao longo dos últimos anos, e principalmente com um comprometimento cada vez maior com o padrão de qualidade, até mesmo porque suas produções se voltam em grande parte para exportação. Por exemplo, as exportações argentinas cresceram 75% em cinco anos (dados do IERAL). Tendo em vista este cenário pode-se dizer que aditivos, como os baseados em manoproteínas de leveduras, podem encontrar um campo fértil nesses mercados.

VI.5) A segmentação proposta em números

Partindo-se das premissas 1, 2 e 3 e de dados de mercado apresentados anteriormente, podemos estabelecer a primeira segmentação do mercado de vinho, onde a fatia destinada ao nosso produto seria representada pelo somatório da produção de vinhos finos (em cada ano) de cada um dos países (Tabela 8). Os dados apresentam ainda, a fim de comparação, a produção total de vinho dos respectivos países.

Tabela 8 - Evolução da Produção de vinho por países no período de 2005 a 2008, em milhões de litros. Entre parêntesis dados da produção de vinho fino.

País/ Ano	2005	2006	2007	2008
Brasil	319,9	237,2	333,7	368,3
(Vinho Fino)	(45,4)	(32,2)	(43,2)	(41,3)
Argentina	1522,2	1539,6	1504,6	1467,7
(Vinho Fino)	(913,3)	(923,8)	(902,8)	(880,6)
Chile	788,6	844,9	822,7	868,3
(Vinho Fino)	(394,3)	(422,5)	(411,4)	(434,2)
Uruguai	89,2	92,3	100,0	104,0
(Vinho Fino)	(29,0)	(30,0)	(32,5)	(33,8)

Fonte: Adaptado do relatório da OIV - INITIAL RESULTS FROM THE 2009 HARVESTS IN COUNTRIES OF THE SOUTHERN HEMISPHERE

A produção brasileira, comparada a estes outros países em questão, possui ainda uma baixa parcela de sua produção em vinho finos. Este fato se deve a uma demanda muito maior de vinhos mais baratos, e normalmente de pior qualidade, como os de mesa. A evolução da produção brasileira de vinho fino pode ser vista na Figura 30. Podemos observar que essa produção também tem oscilado, porém com um crescimento na produção de mais de 30% nesses seis anos analisados.

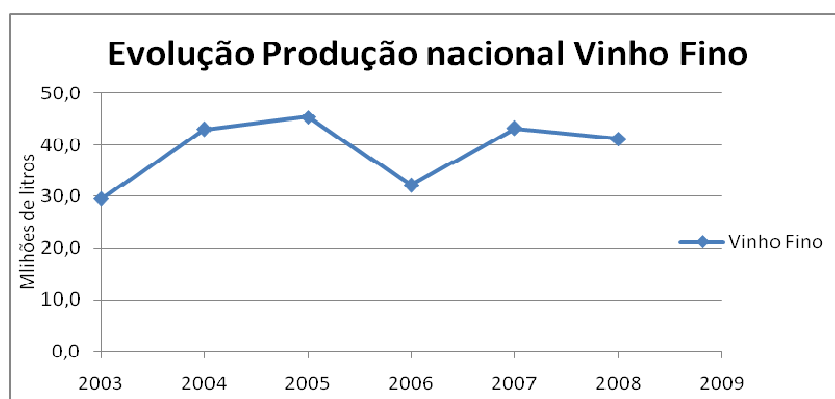


Figura 30 – Evolução da produção de vinhos finos no Brasil. Fonte: Adaptado de União Brasileira de Vitivinicultura – Uvibra, Instituto Brasileiro do Vinho – Ibravin.

É necessário perceber que, neste momento, será necessário fazer uma estimativa de qual percentual deste mercado estará acessível ao produto proposto neste trabalho, pois não seria razoável acreditar que poderíamos alcançar a totalidade do mercado de vinhos finos, fazendo com que novas premissas sejam necessárias:

Premissa 4: Tendo em vista que estamos considerando nossa produção em solo nacional, teremos portanto como principal mercado o brasileiro e nossa meta inicial, para o primeiro ano de produção, seria de atender a 5% do mercado já restrito pelas premissas anteriores e exposto na Tabela 8.

Quanto ao mercado representado pelos outros países sulamericanos adotaremos a premissa de que poderemos fornecer para 1 % desse mercado, uma vez que haveriam questões adicionais na conquista desse mercado, entre elas o estabelecimento de uma rede de contato e de representantes comerciais mais complexa que no mercado nacional.

Premissa 5: Baseando-se no cenário positivo do setor vinícola também teremos metas de crescimento da fatia de mercado atendida para o mercado brasileiro, projetadas para os três primeiros anos de operação. Assim seria 5% da produção de vinho fino no primeiro ano; 10% no segundo ano, uma meta de crescimento razoável tendo em vista que nosso produto já terá passado pela avaliação dos primeiros produtores e terá mais chances de alcançar novos consumidores, e 12% para o terceiro ano de operação, já considerando uma queda na taxa de crescimento e que a nossa fatia de mercado tenderia a se estabilizar para os anos seguintes.

Quanto aos países sul-americanos, teríamos também um crescimento na parcela do mercado atingida, passando para 2% no segundo ano e chegando a 3 % no terceiro ano. Levando tais metas em consideração, podemos observar o seguinte cenário exposto pela Tabela 9:

Tabela 9 - Projeção da produção de vinho a ser absorvida em nosso planejamento, em milhões de litros.

Mercado/ Ano	1º Ano	2º Ano	3º Ano
Brasileiro	2,07	4,13	4,96
Argentino	8,81	17,61	26,42
Chileno	4,34	8,68	13,02
Uruguaio	0,34	0,68	1,01
Total	15,55	31,10	45,41

Desta forma podemos calcular de quanto será nossa produção, para tal, novamente precisaremos fazer uso de uma suposição, fazendo a estimativa de forma indireta partindo-se dos dados de mercado de vinho para se obter valores referentes a aditivos, como havia sido previsto na premissa 1.

A suposição citada acima se refere ao valor que será adotado como referência para aplicação de um produto baseado em manoproteínas, cujo uso se destine à aditivação de vinhos. Tal valor foi estabelecido a partir dos dados de aplicação recomendados encontrados para produtos comerciais contendo manoproteína em sua composição, situados na faixa de 10 a 70 g/hL de vinho. Assim fez-se a média aritmética encontrando-se o valor de 40 g/hL ou 0,4 g/L. Este valor foi adotado para ser feita a estimativa da quantidade de manoproteína a ser produzida, afim de atender a demanda, partindo-se dos dados de mercado de vinhos resumidos na Tabela 9.

A produção projetada de manoproteínas anual para o período referente aos três primeiros anos está apresentada na Tabela 10. Ao final do terceiro ano de funcionamento, teríamos assim uma demanda 18.165 Kg de manoproteína (Tabela 10).

Tabela 10 - Estimativa de produção de manoproteínas por ano

Estimativa de produção/ Ano	1º Ano	2º Ano	3º Ano
Produção de Manoproteínas (Kg)	6.220,28	12.440,56	18.165,24

É importante observar que, ao final de três anos de funcionamento, haverá uma suposta demanda de 18.165 Kg de manoproteína. A importância se resume no fato de que este valor será adotado como referência para ser feito todo o dimensionamento dos equipamentos presentes na planta, uma vez que a mesma tem de ser capaz de atender toda a demanda projetada no período escolhido, mesmo que haja ociosidade durante o início de operação.

Capítulo VII – Dimensionamento de equipamentos

Nosso objetivo consiste na produção de manoproteína a partir de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. Foi gerado um fluxograma do nosso processo, especificando os equipamentos a serem utilizados na produção. O dimensionamento, a função de cada equipamento, bem como os procedimentos e as hipóteses empregadas, quando necessárias, também serão discutidas neste capítulo. Os resultados gerados serão a base para o cálculo da análise econômica da planta, apresentados no próximo capítulo.

É importante ressaltar que o processo proposto foi idealizado para ser conduzido em regime de batelada. Devido às dificuldades inerentes às características do processo, entre elas o elevado tempo na operação de lise térmica, a princípio o processo não será aplicado em regime contínuo em escala industrial.

VII.1) Processo proposto

A partir da análise dos nossos resultados e considerando que uma etapa enzimática poderia onerar demasiadamente o processo, tomamos como referência para realização dos cálculos de dimensão dos equipamentos utilizados, e posterior análise econômica, a rota de obtenção ML1, cujo diagrama será reapresentado na Figura 31.

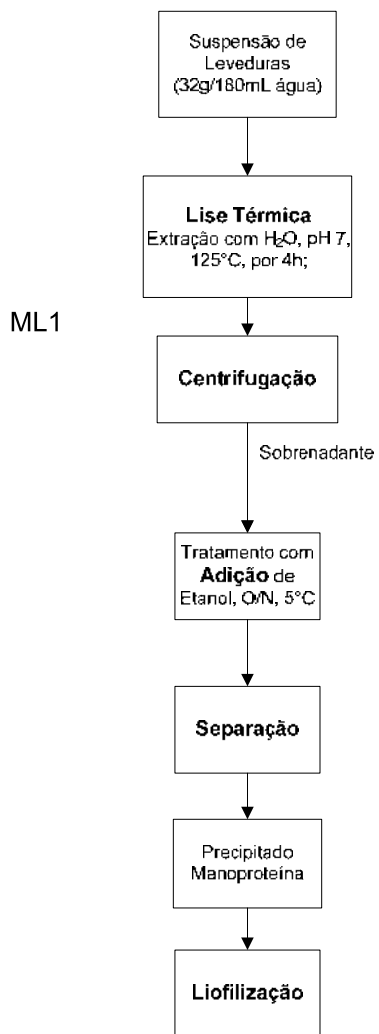


Figura 31 - Processo proposto para extração de manoproteínas em laboratório

A nossa proposta para extrapolar este processo para larga escala pode ser representada pelo fluxograma exposto na Figura 32.

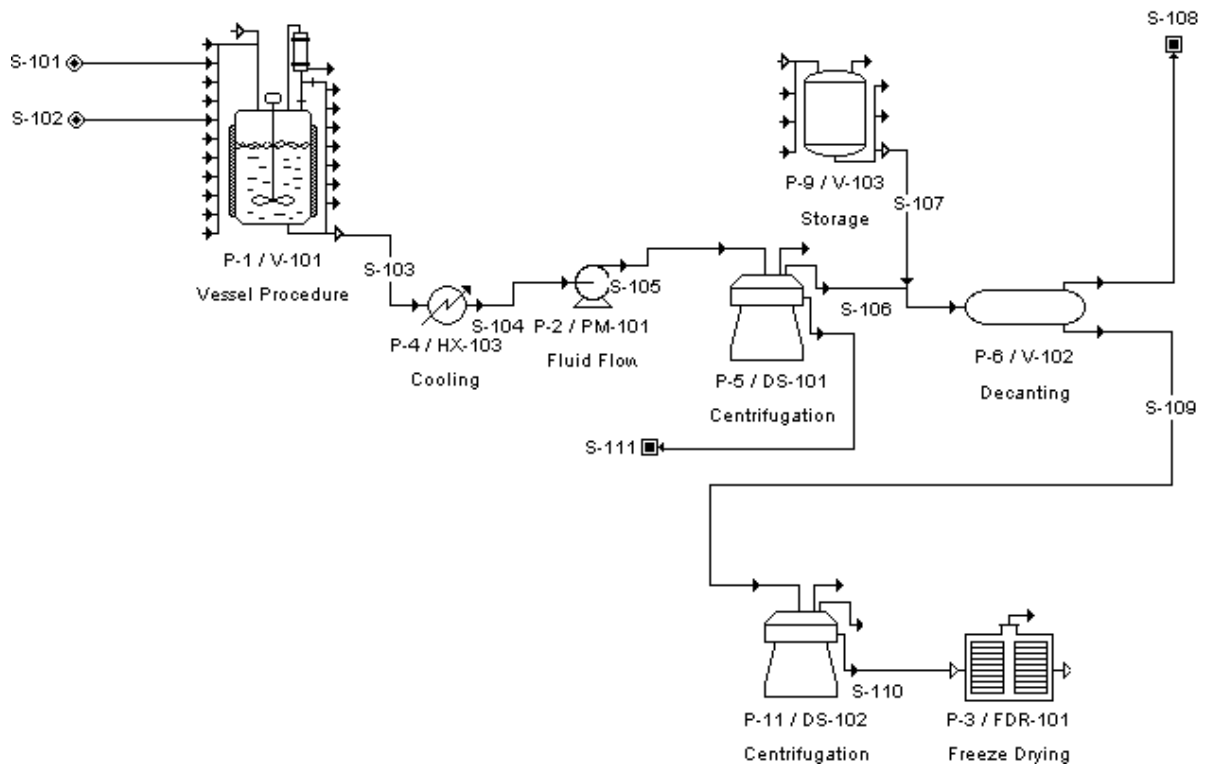


Figura 32 - Fluxograma do processo proposto para produção de manoproteínas em larga escala

A descrição dos equipamentos apresentados no fluxograma está exposta na Tabela 11.

Tabela 11 - Equipamentos presentes no processo em larga escala

Numeração	Equipamento
P-1	Reator encamisado com agitação
P-2	Bomba
P-3	Liofilizador
P-4	Trocador de calor
P-5	Centrífuga
P-6	Decantador
P-9	Tanque de armazenamento
P-11	Centrífuga (*)

*obs: esta centrífuga é a mesma que a P-5, havendo assim apenas uma centrífuga na planta

A descrição das correntes pode ser observada na Tabela 12.

Tabela 12 - Descrição das correntes presentes no processo em larga escala

Numeração	Descrição	Destino da corrente
S 101	Creme de levedura	Reator
S102	NaOH (0,5M)	Reator
S103	Suspensão de levedura (120°C)	Trocador de Calor
S104	Suspensão de levedura (45°C)	Bomba
S105	Suspensão de levedura bombeado	Centrifuga
S106	Líquido centrifugado	Decantador
S107	Etanol	Decantador
S108*	Líquido Decantado	Recuperação
S109	Precipitado Decantado	Centrifuga
S110	Torta úmida Centrifugada (manoproteína)	Liofilizador
S111	Torta úmida (parede celular)	-

* saída de líquido do decantador, destinada a recuperação de etanol na destilaria anexa.

VII.2) Dimensionamento dos equipamentos principais

Todos os equipamentos principais diretamente relacionados à produção das manoproteínas são constituídos de aço inoxidável 316, de modo a proporcionar uma maior durabilidade, boa resistência à corrosão, e, assim, garantir que não haja liberação de impurezas para o produto, tendo em vista que este deve ter grau alimentício.

VII.2.1) Reator encamisado com agitação

A fim de realizarmos a lise térmica, faremos uso de um reator encamisado, que terá sua temperatura mantida em 121°C por 4 horas. O reator além de manter a temperatura constante, deverá ser agitado. Embora na etapa de laboratório a solução permaneceu em autoclave sem agitação, ao fazermos essa extrapolação de escala o reator agitado se faz necessário para promover uma homogeneização, a fim de garantir uma troca térmica mais efetiva.

Devido a operação ser realizada em regime de batelada, o funcionamento se daria possivelmente apenas 5 dias por semana, assim a quantidade diária de manoproteína a ser produzida será de 75,7 kg, consideramos um fator de operação de 240 dias/ano, equivalente a 66% de um ano, levando a um consumo máximo (por ano) de 18.165 Kg de manoproteína, como já foi mostrado no capítulo anterior.

Visando uma produção final de 75,7 Kg de manoproteína por dia, considerando a operação de duas bateladas por dia, chegamos a uma produção de 37,85 Kg por batelada, iremos assumir que o rendimento obtido em laboratório será aproximadamente o mesmo em maior escala, assim a massa de levedura necessária a ser processada deve ser de 1.194,2 Kg. Segundo valores obtidos nos trabalhos de Chaud e Sgarbieri (2006); e Gaspar *et al.* (2008), a suspensão de biomassa de levedura (creme de levedura), proveniente de uma usina de álcool, pode se encontrar em suspensão celular de aproximadamente 20% (p/p). Desta forma teríamos uma entrada em massa de 5.971,2 Kg de creme de levedura neste reator, aonde ainda será adicionado um volume de 74,6 litros de NaOH (0,5M) para a correção do pH.

A densidade das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* tem um valor médio de 1.112,6 Kg/m³ (Kubitschek, 1984), assim podemos estimar o volume útil, que será de:

$$V_u = \frac{1194,2}{1112,6} + 4,777 + 0,0746 = 5,925 \text{ m}^3$$

Para o cálculo desse volume somamos o volume das leveduras, de hidróxido de sódio e do líquido existente na suspensão de leveduras.

Sendo assim, considerando 5,925 m³ o volume útil, correspondente a 80% do volume total, o volume total do reator deverá ser de **7,4 m³**.

VII.2.2) Trocador de calor

Após as 4 horas de lise térmica, a solução lisada seguirá em uma tubulação para a próxima unidade (centrifugação), porém a corrente proveniente do reator se encontra a aproximadamente 120 °C, e torna-se necessário promover um resfriamento dessa corrente, assim entre o reator e a centrífuga, haverá um trocador de calor utilizando água de resfriamento. O objetivo desta etapa consiste em levar esta suspensão a uma temperatura final de 45 °C, e depois seguir para a centrifugação.

Portanto faremos os cálculos do trocador de calor.

Nesse momento precisamos fazer uso de algumas estimativas, de modo a possibilitar a obtenção de nossas variáveis especificadas.

Consideramos que a corrente de saída do reator terá uma vazão de 2 L/s, levando um tempo total de esvaziamento de 49,37 minutos. Essa vazão corresponde a um fluxo mássico de 2,04 Kg/s (w_1).

A temperatura de entrada da corrente quente no trocador (T_{eq}) corresponde a aproximadamente a 120 °C, e a temperatura de entrada da corrente de água de resfriamento (T_{ef}) será de 20 °C.

A temperatura de saída da água de resfriamento (T_{sf}) foi estimada em 45°C, usualmente temperatura máxima de água de resfriamento, enquanto a temperatura final de saída da corrente quente (T_{sq}) também deve ser 45°C, como já havia sido mencionado.

Os parâmetros são:

$$U = 700 \text{ W/m}^2 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$Cp_q = Cp_f = 4184 \text{ J/Kg } ^\circ\text{C}$$

A capacidade calorífica da corrente quente (Cp_q) foi aproximada para o Cp da água (20°C). E o coeficiente global de troca térmica (U) foi estimado por uma mistura equivalente entre água fria e uma solução diluída. (Sinnott, 1986)

As variáveis calculadas neste caso serão a vazão da água (w_f) e a área de troca térmica (A). Para estes cálculos resolvemos as seguintes equações:

$$Q = w_f Cp_f (T_{sf} - T_{ef}) = w_q Cp_q (T_{eq} - T_{sf})$$

$$Q = UA \Delta T_{ln}$$

$$\Delta T_{ln} = \frac{(T_{eq} - T_{sf}) - (T_{sf} - T_{ef})}{\ln \frac{T_{eq} - T_{sf}}{T_{sq} - T_{ef}}}$$

$$Q = 640395,6 \text{ W} ; \Delta T_{ln} = 45,51 \text{ } ^\circ\text{C}$$

$$w_f = 6,12 \text{ Kg/s}$$

$$A = 20,1 \text{ m}^2$$

Sendo assim obtivemos um valor de 20,1 m² ou 216,4 ft² de área de troca térmica. A massa total água de resfriamento será igual a 302,1 kg por batelada.

Para realizar os cálculos acima, assumimos que a troca térmica será realizada em um trocador de calor bitubular. Este trocador é recomendado para serviços que demandem uma área de troca pequena, apresentam um custo razoavelmente baixo além de minimizar os possíveis problemas decorrentes da presença de sólidos no fluido e possuir uma maior facilidade de limpeza.

VII.2.3) Centrífuga

O objetivo desta operação está na separação da fração lisada, como os componentes celulares da levedura (principalmente parede celular), do sobrenadante, fração solúvel em água contendo nosso produto de interesse. Para tal fim, foi proposta a utilização de uma centrífuga de discos.

Os Parâmetros são:

Células de levedura são aproximadamente esféricas com um raio de 2,5 μm (a) e uma densidade de 1,1126 g/cm^3 (ρ).

Densidade da água: 1,0 g/cm^3 (ρ_0).

A viscosidade foi considerada igual a da água: 0,01 $\text{g}/\text{cm s}$ (μ).

Dados estimados:

Número de discos (n): 60;

Raio externo (R_0): 22,5 cm; Raio interno (R_1): 12,5 cm;

Velocidade de rotação (ω): 6250 rpm; ângulo dos discos cônicos: $\theta = 45^\circ$;

Para calcularmos fluxo máximo de fluido processado na centrífuga (Q), temos a seguinte equação:

$$Q = \{v_g\} [\Sigma]$$

Sendo

Velocidade de sedimentação :

$$v_g = \frac{2a^2(\rho - \rho_0)g}{9\mu}$$

Fator característico da centrífuga :

$$\Sigma = \frac{2n\pi\omega^2(R_0^3 - R_1^3)\cot\theta}{3g}$$

Em nosso caso chegamos a

$$Q = v_g \Sigma = (1,53 \times 10^{-4} \text{ cm/s}) \times (3,20 \times 10^7 \text{ cm}^2) \times \frac{1\text{L}}{10^3 \text{ cm}^3} = 4,9 \text{ L/s}$$

Com a vazão de processamento calculada podemos estimar o tempo de centrifugação, o volume a ser centrifugado é a corrente de saída do reator já resfriada (5.925 litros ou 6.045,8 Kg), ou seja, será necessário um tempo de **20,15** minutos.

A fim de especificação do equipamento o valor de sigma da nossa centrífuga foi de 3.197,1.

Haverá uma segunda operação com este mesmo equipamento, porém esta segunda operação demanda um volume muito menor e esta mesma especificação de centrífuga é suficiente. Desta forma ainda garantimos uma diminuição do tempo ocioso da centrífuga.

VII.2.4) Decantador

Para a saída da centrífuga iremos considerar que da massa total de levedura (1.194,2 Kg) apenas 32% (382,1 Kg) será centrifugado, pois 60% dessa massa é umidade, e dos sólidos 20% seriam componentes solúveis em água (incluindo a massa de manoproteína). Vamos considerar ainda que essa torta de levedura saia com 25% de umidade, assim temos uma massa total de centrifugado de 509,5 Kg. Enquanto o líquido separado terá uma massa de 5.536,3 Kg. Este centrifugado obtido pode ser considerado um subproduto do processo, com valor comercial, uma vez que é composto basicamente por elementos da parede celular, que não são solúveis em água, podendo ser comercializado como insumo para rações animais, por exemplo.

Em primeiro lugar nesse momento, precisamos calcular o volume de etanol necessário para proporcionar a precipitação da manoproteína. Essa corrente de etanol irá se misturar com a corrente do líquido centrifugado por meio de uma mistura em linha, auxiliada pela colocação de chicanas, promovendo uma boa homogeneização dos fluidos sem gastos extras com equipamento.

Podemos considerar agora a densidade da solução de saída da centrífuga equivalente a da água (1.000 Kg/m^3), assim temos um volume de 5.536,3 litros. Para esse volume precisamos de um volume de etanol de 12.899,8 litros.

Com esse volume total ($18,4 \text{ m}^3$), e levando em conta a margem de 20% de segurança chegamos a $V_d = 23 \text{ m}^3$. Devemos deixar claro que este equipamento será na verdade um tanque de estocagem cilíndrico com fundo cônico, apenas para deixar que a sedimentação das manoproteínas precipitadas em etanol ocorra, e levar a um adensamento no fundo do tanque. O tempo de residência estimado foi de 3 horas, novamente levando em conta valores obtidos em laboratório (testado em funil de separação).

VII.2.5) Tanque de armazenamento

Em duas bateladas por dia será necessário 25,8 m³ de etanol proveniente da corrente de reciclo de álcool da usina anexo, então o volume do tanque de estocagem do etanol deverá ser de **27,3 m³**.

VII.2.6) Liofilizador

Este equipamento normalmente não é dimensionado especialmente para cada caso, existe um série de modelos especificados que alteram a capacidade de fluido processado. Visando a obtenção final de 37,85 Kg de manoproteína liofilizada, foi estimado que o liofilizador tivesse uma capacidade de processamento de 100 Kg, considerando o possível teor de umidade presente na saída da centrífuga*.

*Esta sendo a segunda operação de centrifugação

Capítulo VIII – Análise econômica do processo

A análise econômica proposta neste trabalho terá como base a análise de mercado já apresentada no capítulo VI, à qual serão adicionadas as estimativas de investimento total, custos de produção e preço de venda dos produtos produzidos.

A partir da reunião de todas essas informações haverá condições de se projetar o fluxo de caixa da operação, que possibilitará uma análise preliminar da viabilidade econômica do projeto em questão. Adicionalmente será feita uma análise de sensibilidade, que permitirá avaliar o quão robusto é o projeto frente a variações em alguns parâmetros importantes, como por exemplo, o preço das matérias primas.

Antes de iniciar-se esta análise é fundamental que apresentemos uma consideração importante e que influenciará esta avaliação:

Consideração

A planta de produção de manoproteínas estará localizada de forma anexa a uma usina de álcool, de forma semelhante ao que ocorre em uma refinaria de petróleo, onde as indústrias vivem em uma espécie de simbiose onde uma poderá fornecer insumos ou utilidades para a outra de tal modo que ambas se beneficiem. Esta situação se encaixa no perfil de uma biorrefinaria, uma forma análoga às refinarias de petróleo, na qual se utiliza biomassa como fonte de energia e uma gama de produtos. Tal conceito vem ganhando muita força nos últimos anos.

Justificativa da consideração

Ao estar localizada de forma anexa a uma indústria sucroalcooleira, alguns benefícios seriam alcançados, entre os quais a obtenção do rejeito de creme de levedura em grandes volumes derivado da fermentação de álcool a um custo que pode ser considerado a princípio simbólico, e também o fato de ser possível o uso da operação de destilação para recuperação do etanol da própria usina, de forma a evitar-se o investimento em uma unidade de destilação, que é consideravelmente alto (Timmerhaus e Peters, 1980).

VIII.1) Investimento: suas parcelas

O investimento total de uma planta industrial é composto por três parcelas: o investimento fixo, o capital de giro e o investimento de partida (Perlingeiro, 2005).

O investimento fixo corresponde aos recursos necessários à construção do processo e pode ser subdividido em investimento direto e indireto, sendo que o direto corresponde à soma destinada ao material para montagem das instalações, subdividindo-se ainda em ISBL², correspondente a itens inseridos na área de processamento e em OSBL³, relacionado à instalações periféricas à planta. O investimento indireto corresponde a soma destinada aos serviços de engenharia, entre outros prestados, além de itens relacionados à construção civil. A Figura 33 que procura sistematizar a estrutura do investimento total.



Figura 33 - Estrutura do investimento total em uma planta industrial

O capital de giro corresponde aos recursos necessários para manter a empresa durante eventos como interrupções eventuais na produção, enquanto a última parcela, o investimento para partida, serve para cobrir custos que ocorram antes e durante a partida do processo como a contratação antecipada de certo tipo de pessoal ou a operação ineficiente durante este período (Perlingeiro, 2005).

Timmerhaus e Peters (1990) sistematizaram os diversos componentes do investimento fixo em uma Tabela, que foi adaptada e está apresentada na Tabela 13.

² ISBL, termo em inglês (Inside Battery Limits): custo instalado dos equipamentos diretamente envolvidos na produção

³ OSBL: Outside Battery Limits

Tabela 13 - Componentes do investimento fixo (adaptado de Timmerhaus e Peters, 1980)

Investimento fixo	
<i>Investimento direto (OSBL e ISBL)</i>	<i>Investimento indireto</i>
Aquisição dos equipamentos	Engenharia e supervisores
Instalação dos equipamentos	
Instrumentação e controle	Construções temporárias
Tubulações	
Instalações elétricas e seus equipamentos	Taxas da empreiteira
Mão de obra e materiais para edificações anexas a planta	
Infra-estrutura do local de construção	Contingenciamento
Estruturação de áreas periféricas a produção	
Aquisição do terreno	

VII.2) Estimativa do investimento total

Esta estimativa será construída a partir de algumas suposições presentes na literatura pertinente ao assunto:

- Suposição 1 – O investimento direto do tipo OSBL equivale a 45% do investimento ISBL.
- Suposição 2 – O investimento indireto equivale a 25% do investimento direto.
- Suposição 3 – O capital de giro pode ser estimado como 15% do investimento total.
- Suposição 4 – O Investimento de partida pode ser ajustado como 10% do investimento fixo. (Perlingeiro, 2005)

Considerando estas quatro suposições podemos chegar à seguinte expressão:

$$\text{Investimento Total} = 2,34 \times \text{ISBL}$$

Portanto para obter-se a estimativa do investimento total será necessária apenas a estimativa do ISBL do empreendimento em foco.

Timmerhaus e Peters (1980) apresentam alguns métodos para se estimar o

ISBL, os quais estão apresentados na Tabela 14, organizados de forma que a precisão da estimativa é decrescente.

Tabela 14 - Métodos de estimativa do ISBL

Métodos de estimativa do ISBL
Estimativa com itens detalhados
Estimativa por custos unitários
Porcentagem do custo <i>delivery</i> dos equipamentos
Aproximação com os fatores de Lang
Estimativa correlacionando plantas semelhantes com capacidade diferente

Os dois primeiros métodos (estimativas com itens detalhados e por custo unitário) envolvem o conhecimento profundo de todos os itens que compõe o ISBL, justificando a maior precisão de tais métodos. O terceiro faz estimativas das diversas parcelas a partir de fatores que são aplicados sobre o preço *delivery*, o qual inclui os custos de internação, enquanto a outra modalidade de preço, mais fácil de ser estimada, se restringe ao custo até a fronteira do país (preço FOB⁴). Já a quinta modalidade apresenta-se como uma opção razoavelmente grosseira de estimativa, pois faz correlações exponenciais entre a capacidade da planta a ser instalada com a capacidade de plantas já instalada de forma a obter a estimativa.

Surge como uma opção viável no caso da estimativa deste trabalho, a quarta opção, que é a aproximação com os fatores de Lang e é capaz de fornecer uma estimativa da ordem de grandeza do investimento, sem exigir informações aprofundadas e nem a obtenção dos preços *delivery*, uma vez que se baseia nos preços de equipamentos tipo FOB.

Esta metodologia baseia toda a estimativa das parcelas do ISBL a partir dos preços FOB dos equipamentos presentes, usando-se fatores correspondentes para cada item, portanto é fundamental que se apresente neste momento todos os preços relativos à planta a ser instalada.

⁴ FOB. Termo em inglês: free on board

VIII.2.1) Custos dos equipamentos

A obtenção dos custos dos equipamentos muitas das vezes não é imediata, isto ocorre basicamente em duas situações:

- a) O preço do equipamento nas dimensões (ou na faixa) é obtido, porém tem como base um ano de referência anterior ao ano em que está sendo feita a estimativa de investimento.
- b) O preço obtido se refere ao equipamento desejado, porém com um dimensionamento diferente do projetado.

Na primeira situação pode ser aplicado um índice de atualização (os mais recomendados são o *Chemical Engineering cost index* e o *Marshall & Swift index*, segundo Perlingeiro, 2005). No nosso projeto os seguintes custos foram obtidos dessa forma. O valor adotado do índice de *Marshall & Swift* foi de 1449,3 (*Chemical Engineering*, 2009) referente ao ano de 2008, para indústria de processamento químico.

Na segunda situação pode ser usar uma correlação exponencial para se obter o custo na dimensão desejada.

$$\frac{Custo_b}{Custo_a} = \left(\frac{Tamanho_b}{Tamanho_a} \right)^R$$

Esta correlação foi aplicada no nosso projeto, por exemplo, para o cálculo da centrífuga.

Ou ainda através do site www.matche.com, que calcula o custo FOB dos equipamentos a partir das especificações do projeto.

Adicionalmente foram obtidos diretamente da literatura diversos dados sobre os equipamentos, tanto parâmetros de dimensionamento, tanto estimativas de custo (Douglas, 1988; Perlingeiro, 2005; Roger G. Harrison, 2003; Timmerhaus e Peters, 1990).

Com o intuito de melhor sistematizar os dados levantados, reunimos, na Tabela 15, os custos de todos os equipamentos da planta de produção de manoproteínas.

Tabela 15 - Custos de todos os equipamentos da planta para produção de manoproteínas

Equipamentos	Custo total (R\$)
Reator	88.353,05
Trocador de calor	10.075,35
Centrífuga	38.746,71
Tanque de Armazenamento	6.437,58
Decantador	35.651,23
Liofilizador	499.500,00
Sub Total	678.763,92
Custo total dos Equipamentos (Internalizado*)	950.269,48

*Foi adotado um valor de 40% de internalização dos equipamentos

Os fatores individuais para correlacionar itens do investimento ISBL, extraídos de Timmenhaus e Peter (1980), com o custo total dos equipamentos presentes na planta estão expostos na Tabela 16.

Tabela 16 - Fatores de Lang

Fatores de Lang (F)	Valores de F (para processamento sólido líquido)
Itens do ISBL	
Instalação de equipamentos	0,39
Instrumentação e controle	0,13
Tubulações	0,31
Instalações elétricas	0,1

A partir desses fatores a estimativa do ISBL pode ser obtida pelas expressões a seguir:

$ISBL = \text{custo dos equipamentos} + (\sum \text{fatores de Lang}) \times \text{Custo Total dos equipamentos}$

$ISBL = \text{Custo dos equipamentos} + 0,93 \times \text{Custo dos equipamentos}$

Ou $ISBL = 1,93 \times \text{Custo Total dos Equipamentos (CTE)}$

O valor de ISBL e OSBL obtido para o processo, assim como o investimento total

e suas parcelas podem ser observados na Tabela 17. Sendo que:

$$\text{Investimento Total} = \text{Capital de Giro} + \text{Investimento de partida} + \text{Investimento Fixo}$$

Tabela 17 - Valor de ISBL e OSBL obtido para o processo, investimento total e suas parcelas

ISBL	1.834.020,10
OSBL	825.309,04
Capita de giro	643.741,05
Investimento de partida	331.957,64
Investimento Fixo (IF)	3.319.576,38
Investimento Total	4.291.607,03

VIII.3) Estimativa dos custos de produção

A estimativa do investimento é apenas a primeira parte de uma avaliação econômica, as análises dos custos de operação da planta e do preço de venda dos produtos gerados no processo também são imprescindíveis.

Para esta estimativa dos custos totais de produção foram considerados os custos (Figura 34) de acordo com a classificação apresentada por Timmerhaus e Peters (1980).

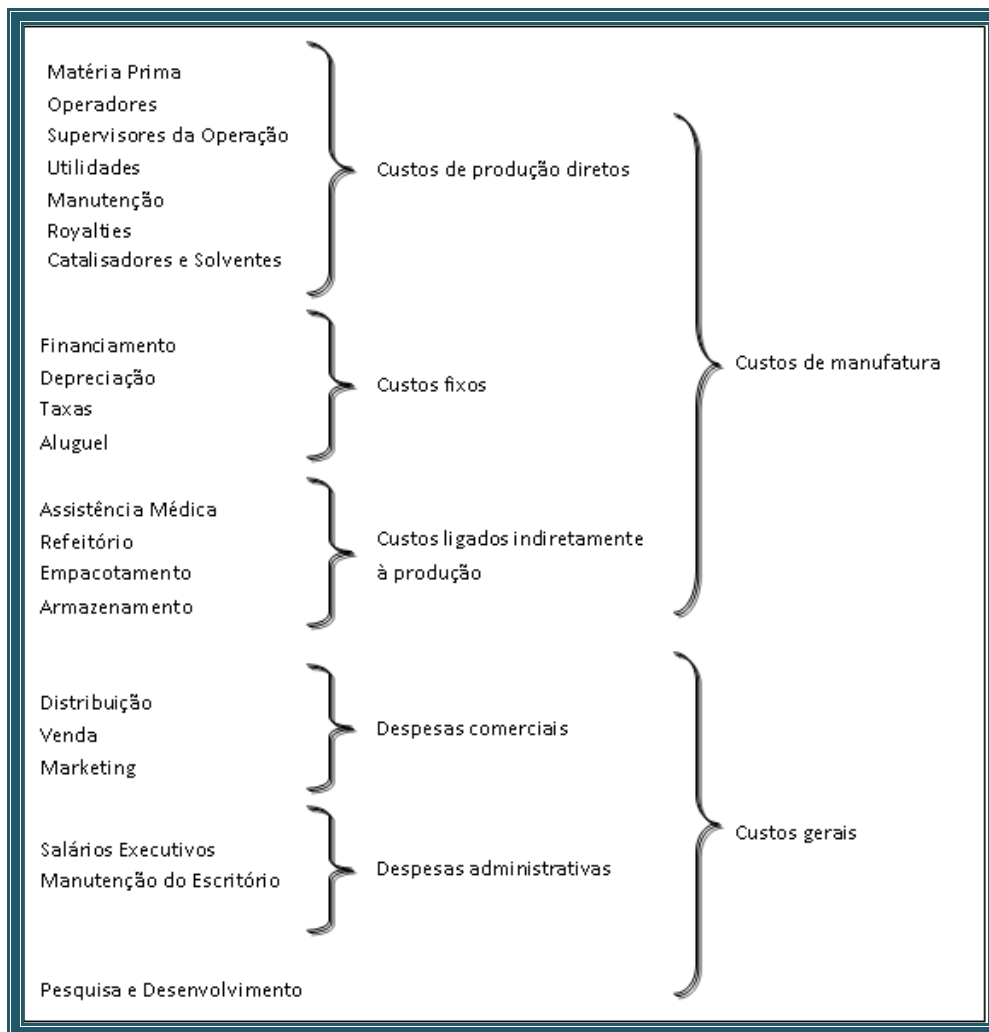


Figura 34 - Classificação dos diversos custos relacionados à operação de uma planta química (adaptado de Timmerhaus e Peters, 1980)

Cabe agora estimarmos o custo de operação da planta em questão, seguindo a divisão acima proposta, onde a soma dos custos de manufatura e custos gerais indica o valor do Custo Total de produção da operação. Como primeira etapa, avaliaremos os custos de manufatura inerentes ao nosso processo.

VIII.3.1) Custos de manufatura inerentes ao projeto em questão

Os custos de manufatura possuem três componentes: Custos de produção diretos, Custos Fixos, e Custos indiretamente ligados a produção, conforme exposto na Figura 34.

Custos de produção diretos e custos fixos

Em relação às matérias primas, o processo apresenta como principal insumo o creme de levedura, proveniente de usinas sucroalcooleiras (ilustrado pela Figura 35), na medida em que consideramos sua instalação de forma anexa a uma usina, no interior do estado de São Paulo.



Figura 35 – Exemplo de creme de levedura proveniente de uma usina sucroalcooleira. Fonte: ethanolbrasil.blogspot.com

A princípio essa escolha de localização seria a opção mais interessante, uma vez que tal estado centraliza uma enorme quantidade de usinas, que procuram o aperfeiçoamento tecnológico de forma constante, além do fato de que numa disputa entre a localização estar próxima da fonte de matéria prima ou do mercado consumidor, no caso desta planta, podemos afirmar que a localização deverá estar preferencialmente próxima da matéria prima, embasando-se para tanto na consideração proposta por Timmerhaus e Peters (1980), que considera que a matéria prima é um fator extremamente importante na escolha da localização de uma planta, sobretudo se os volumes trabalhados de matéria prima são consideráveis, como é o caso deste projeto, além de sua vida útil ser muito menor do que a do produto final (o produto final é liofilizado possuindo assim um alto tempo de prateleira).

Esta associação já está sendo experimentada na prática no Brasil. Como exemplo, pode-se citar a associação da usina Vale do Ivaí, localizada no interior do estado do Paraná com a empresa Alltech, onde a usina fornece o creme de levedura para esta empresa que produz ração animal (extraído do site www.valedoivai.com.br).

O preço do Kg de creme de levedura nas condições expostas, pode ser

estimado em R\$ 0,26, baseado em Moreira *et. al.* (1999), que em seu trabalho adquiriu a este valor para adicionar em ração animal. Além do creme de levedura temos o hidróxido de sódio. Estes mais os custos de utilidade e custos de mão de obra, perfazem o Custo direto de produção.

Em relação aos custos indiretos de produção, a estimativa de seu valor baseou-se em Timmehaus e Peters (1990), que propõe que elas sejam estimadas em 50% do custo total de mão de obra.

Ao final desta etapa podemos apresentar as parcelas dos custos discriminados de manufatura para os três primeiros anos, levando-se em conta a produção estimada de manoproteínas exposta na Tabela 10 (capítulo VI). Os dados estão apresentados nas Tabelas 18, 19 e 20.

Tabela 18 – Parcelas do custo de manufatura para nosso 1º Ano de operação

Requerimentos (1º Ano)				
Matéria-Prima	Unidade	Quantidade Anual	Custo Unitário (R\$)	Total (R\$)
Creme Levedura	Kg	981.310,2	0,26	255.140,65
NaOH	Kg	12.259,78	0,93	11340,30
Total de M.P				266.480,95
Utilidades				
Água de Resfriamento	L	49.654,745	0,02405	1.194,20
Energia elétrica	kWh	117.594	0,0185	2.175,49
Total de Utilidades				3.369,69
Mão de Obra				
Operadores*	Homem/hora	8.640	15,60	134.784,00
Supervisores da operação	Homem/hora	2.880	84,00	241.920,00
Total de M.O				376.704,00
Custos indiretamente ligados à produção			0,5*Total M.O	188.352,00
Manutenção, impostos e seguros, despesas gerais			0,03*ISBL	55.020,60
Depreciação			0,1*IF	331.957,64

Custo Total de manufatura **1.221.884,88**

* 3 operadores/turno 6h - incluindo encargos sociais

Tabela 19 - Parcelas do custo de manufatura para nosso 2º Ano de operação

Requerimentos (2º Ano)				
Matéria-Prima	Unidade	Quantidade Anual	Custo Unitário (R\$)	Total (R\$)
Levedura	Kg	1.962.620,4	0,26	510.281,30
NaOH	Kg	24.519,57	0,93	22.680,60
Total de M.P		1.987.140,0		532.961,91
Utilidades				
Água de Resfriamento	L	99.309,490	0,02405	2.388,39
Energia elétrica	kWh	117.594	0,0185	2.175,49
Total de Utilidades				4.563,88
Mão de Obra				
Operadores*	Homem/hora	8.640	15,60	134.784,00
Supervisores da operação	Homem/hora	2.880	84,00	241.920,00
Total de M.O				376.704,00
Custos indiretamente ligados à produção			0,5*Total M.O	188352,00
Manutenção, impostos e seguros, despesas gerais			0,03*ISBL	55.020,60
Depreciação			0,1*IF	331.957,64
Custo Total de manufatura				1.489.560,03

* 3 operadores/turno 6h - incluindo encargos sociais

Tabela 20 - Parcelas do custo de manufatura para nosso 3º Ano de operação

Requerimentos (3º Ano)				
Matéria-Prima	Unidade	Quantidade Anual	Custo Unitário (R\$)	Total (R\$)
Levedura	Kg	2.865.744,8	0,26	745.093,65
NaOH	Kg	35.808	0,93	33.122,40
Total de MP				778.216,05
Utilidades				
Água de Resfriamento	L	145.008	0,02405	3.487,44
Energia elétrica	kWh	117.594	0,0185	2.175,49
Total de Utilidades				5.662,93
Mão de Obra				
Operadores*	Homem/hora	8.640	15,60	134.784,00
Supervisores da operação	Homem/hora	2.880	84,00	241.920,00
Total de M.O				376.704,00
Custos indiretamente ligados à produção			0,5*Total M.O	188.352,00
Manutenção, impostos e seguros, despesas gerais			0,03*ISBL	55.020,60
Depreciação			0,1*IF	331.957,64
Custo Total de manufatura				1.735.913,23

* 3 operadores/turno 6h - incluindo encargos sociais

Obs adicional: A porcentagem de 3% do ISBL para o item manutenção seguros e despesas gerais, assim como a de depreciação sendo 1% do Investimento Fixo foram baseadas em Chavel (1989).

Obtida a estimativa dos custos de manufatura, falta a parcela dos custos gerais, os quais incluem basicamente (em nosso caso) despesas administrativas e comerciais. Para este projeto serão assumidos os valores apresentados na Tabela 21, todos baseados em Timmerhaus e Peters (1980).

Tabela 21 - Estimativas dos custos gerais

Estimativa dos custos gerais		
	Estimativa (Timmerhaus)	Valor assumido no projeto
Despesas administrativas	15-30% (relativo ao custo de mão de obra)	15%
Despesas comerciais	5-20% (relativo ao custo total)	15%

Considerações importantes a cerca desses custos gerais:

- As despesas administrativas foram estimadas no extremo inferior da faixa uma vez que a estrutura administrativa desta planta pode ser considerada de baixa complexidade
- As despesas comerciais foram consideradas altas uma vez que teremos que ter uma estrutura de vendas considerável para conseguirmos penetrar nas diversas vinícolas, sobretudo no exterior.

O custo total de produção, assim como suas parcelas, estão expostos na Tabela 22.

Tabela 22 – Parcelas do Custo Total de Produção para os três primeiros anos

	1º Ano	2º Ano	3º Ano
Custo total de manufatura	1.221.884,88	1.489.560,03	1.735.913,23
Custos gerais	282.103,92	329.340,71	372.814,80
Custo Total de Produção	1.503.988,80	1.818.900,74	2.108.728,03

VIII.4) Estimativa do preço de venda dos produtos produzidos

Na operação em destaque temos a fração manoprotéica como principal produto de venda. A fim de fixarmos um preço de venda, consideramos os preços de produtos existentes no mercado, apresentados na Tabela 23.

Tabela 23 - Preços de mercado produtos concorrentes

Produto Comercial	Preço de mercado
Mannovin (Biorigin)	R\$ 340,00/Kg
Claristar (DSM)	US\$ 240,00/kg
Biolees (lesaffre)	US\$ 180,00/Kg

É importante ressaltar as fontes desses valores, onde o preço do Mannovin foi obtido diretamente com vendedores da empresa, enquanto os outros foram obtidos em sites de venda. Baseando-se, portanto, nos valores e nas fontes, o posicionamento adotado para o preço se baseou no valor do Mannovin. Importante considerar que o preço possa ser um pouco abaixo do praticado, a fim de se ter uma vantagem competitiva sobre um produto que já se encontra no mercado, portanto adotou-se o valor de 90% do preço do Mannovin, equivalente a R\$ 306,00/Kg.

Ainda podemos considerar que temos um subproduto que pode ser aproveitado economicamente, que é a torta obtida na centrifugação após a lise térmica, a qual é composta basicamente por elementos da parede celular como glucana e quitina, que não solubilizaram em água. Este produto poderia ser compatível com produtos comerciais compostos de parede celular de levedura. Um exemplo comercial seria o *goldcell CW* comercializado pela Biorigin, pelo preço de R\$14,00/Kg. Entretanto nosso subproduto não será processado e possuirá em torno de 25% de água, por tais motivos consideramos que este poderia ter um valor de venda de 10% do *goldcell CW*, assim obtemos R\$ 1,40/Kg.

VIII.5) Fluxo de Caixa e análise de viabilidade

A projeção do fluxo de caixa está mostrada na Figura em anexo, e foi considerado que o valor pago nos investimentos fixos e de partida, foram pagos no ano zero de operação, até porque estamos levando em consideração o pequeno porte da planta industrial. Ou seja, a projeção foi estipulada para a planta entrar em operação em um ano.

(Ver Anexo)

Em análises econômicas da viabilidade de um projeto busca-se confrontar uma opção de investimento com maior risco (como a instalação de uma planta química) com uma opção mais conservadora, como modelo um investimento no mercado financeiro. A questão é comparar as taxas de retorno sobre o capital investido e contrabalancear as diferenças de risco de cada investimento.

O retorno exigido pelos fornecedores de capital, ou o custo de capital, em uma aplicação no mercado financeiro segura pode ser utilizado como a Taxa Mínima de Atratividade (TMA) nessas análises econômicas de projetos. Nosso valor de TMA assumido foi de 10% ao ano. A esse valor confrontaremos a taxa de retorno obtida se o mesmo capital fosse investido na construção da planta de manoproteína projetada neste trabalho. Este valor pode ser obtido por meio de informações contidas no fluxo de caixa da operação, apresentado em anexo.

Além da comparação de taxas internas de retornos, existe outra forma de se analisar a viabilidade econômica preliminar de um projeto: através da análise do Valor Presente Líquido (VPL), método que determina o valor presente de pagamentos futuros. Este consiste em uma fórmula matemático-financeira em que o valor dos investimentos e do fluxo de caixa atual e futuro são convertidos para um valor equivalente na data atual, por meio de uma taxa de conversão. Esta conversão é devida ao fato do poder aquisitivo do dinheiro sofrer alterações com o passar do tempo. A taxa de conversão utilizada neste método é a Taxa Mínima de Atratividade (TMA). A seguir temos a fórmula para o cálculo do VPL.

$VPL = \sum_{t=0}^n \frac{FC_t}{(1+i)^t}$	<p>t = período (anos ou meses) n = tempo total projeto (anos ou meses) i = taxa mínima de atratividade (TMA) FC = fluxo caixa por período</p>
---	--

O Valor Presente Líquido de um projeto de investimento possui as seguintes possibilidades de resultado:

- Maior do que zero: significa que o investimento é economicamente atrativo, pois o valor presente das entradas de caixa é maior do que o valor presente das saídas de caixa.

- Igual a zero: o investimento é indiferente, pois o valor presente das entradas de caixa é igual ao valor presente das saídas de caixa.
- Menor do que zero: indica que o investimento não é economicamente atrativo porque o valor presente das entradas de caixa é menor do que o valor presente das saídas de caixa.

Vale a pena ressaltar que a TIR é obtida a partir da fórmula usada para o VPL, onde este será considerado igual a 0 e a TIR será o i da equação.

A Tabela 24 apresenta a Taxa Interna de Retorno e Valor Presente Líquido para o projeto de planta de produção de manoproteína.

Tabela 24 – TIR e VPL do nosso projeto

Custo de Capital	10,00%	a.a.
Valor Presente Líquido	R\$	6.191.903,69
Taxa Interna de Retorno	35,14%	a.a.

A avaliação do investimento relativo à construção de uma fábrica de produção de manoproteína a partir de creme de levedura, nas condições consideradas de custos de equipamentos, preço de matéria-prima e demandas dos mercados interno e externo, mostrou bons indicadores, exibindo uma TIR de 35,14% e um VPL de R\$ 6,2 milhões.

O valor obtido da TIR a partir dos resultados do Fluxo de Caixa pode ser considerando atrativo neste caso, pois foi bem superior ao custo de capital considerado (10% ao ano).

Outra maneira de se analisar a viabilidade econômica de um projeto é através do gráfico de *Payback*, em que utilizamos o fluxo de caixa acumulado versus o tempo (em anos), de forma que quando a curva cruzar o eixo do tempo ter-se-á o tempo necessário para que ocorra o pagamento do capital investido. O gráfico do saldo acumulado está exposto na Figura 36.

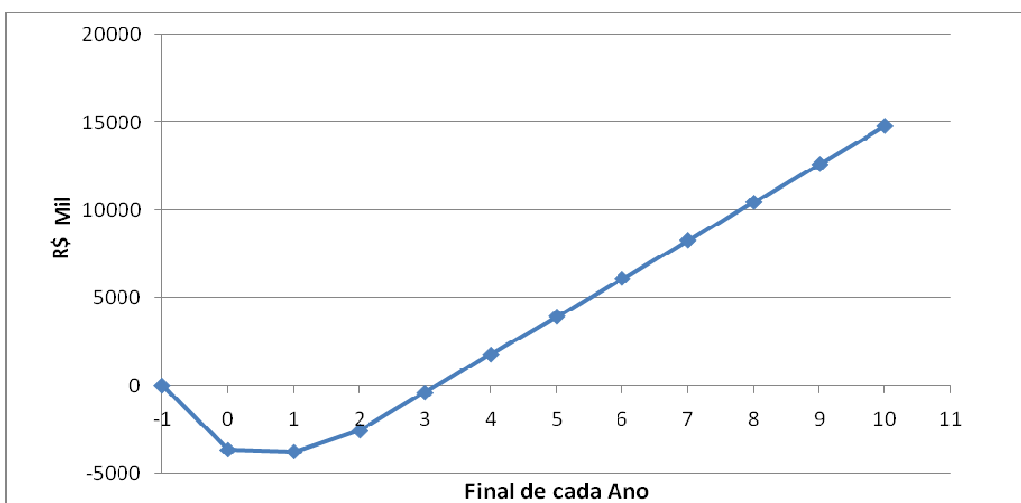


Figura 36 - Saldo de caixa acumulado em (R\$ Mil)

Após 2 anos, pode-se observar valores positivos de saldo e em apenas três anos de operação seria recuperado todo o valor monetário investido inicialmente. Assim, o Tempo de Retorno de Investimento (*payback*) obtido foi de aproximadamente 3 anos.

A partir da análise dos indicadores observamos parâmetros positivos e que apontam para a viabilidade desse projeto, dentro das considerações tomadas. Mas se faz importante neste momento uma análise de sensibilidade de alguns parâmetros, na viabilidade econômica do nosso processo.

VIII.6) Análise de Sensibilidade

A análise de sensibilidade tem como objetivo determinar a importância da variação de determinada variável no custo total de produção, e na taxa interna de retorno do projeto. Para isso escolhe-se a variável de teste, que terá seu valor aumentado e diminuído de forma sistemática, mantendo todas as outras variáveis constantes, e verifica-se a influência que esta tem no custo final. (Brito, 2003)

Primeiramente faremos a análise de sensibilidade do custo de produção total. Uma variável teste de interesse neste projeto é o custo da biomassa de leveduras, pois se trata do custo fundamental em termos de matéria prima, e compõem um fatia importante do custo de produção. Será importante considerar então cenários onde o preço deste insumo possa ser maior ou menor do que o adotado para cálculo do custo total de produção, correspondente à R\$0,26/Kg.

A proposta será variar o preço do creme de levedura (-25%, 50%, 100%, 200%, 300%) em relação ao preço de referência de R\$0,26/Kg, tomando como base o terceiro ano de operação. O resultado no gráfico da Figura 37 permite uma melhor visualização da influência do preço da levedura no custo total de produção.

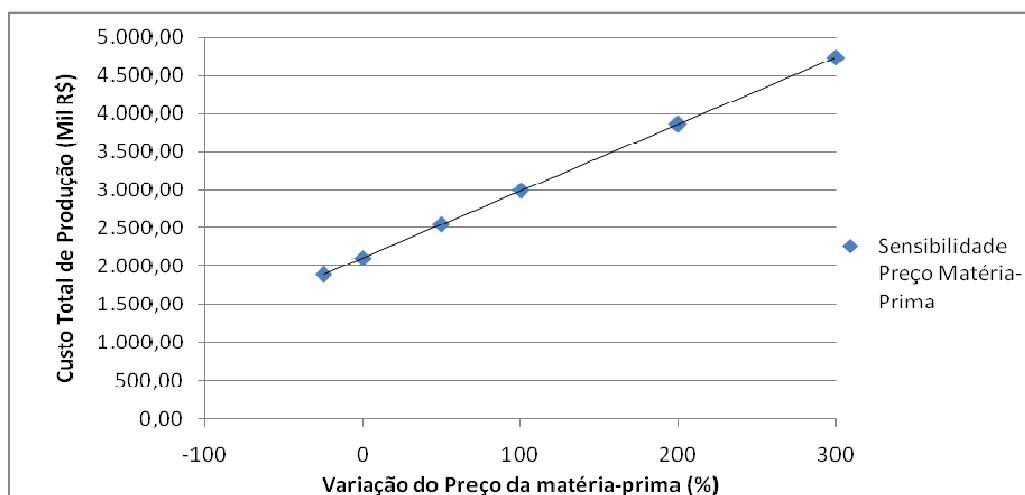


Figura 37 – Influência do preço da matéria-prima no Custo Total de produção

A análise deste gráfico mostra que o custo da matéria prima de fato é um parâmetro de impacto considerável no custo total de produção de manoproteína, portanto qualquer iniciativa que permita a sua redução será de grande valia para a viabilização econômica do processo. A saída adotada neste projeto, foi uma associação da operação a uma usina sucroalcooleira, portanto, é extremamente válida e se mostra fundamental para a viabilização do projeto, uma vez que viabiliza a compra do creme de levedura por um preço bastante minimizado. Assim a planta estará ao lado da principal fonte deste insumo, que é justamente uma usina sucroalcooleira.

Para um estudo de análise de sensibilidade mais completo, foi gerado o gráfico exposto na Figura 38, onde foram avaliados alguns dos principais parâmetros em relação à TIR do nosso projeto.

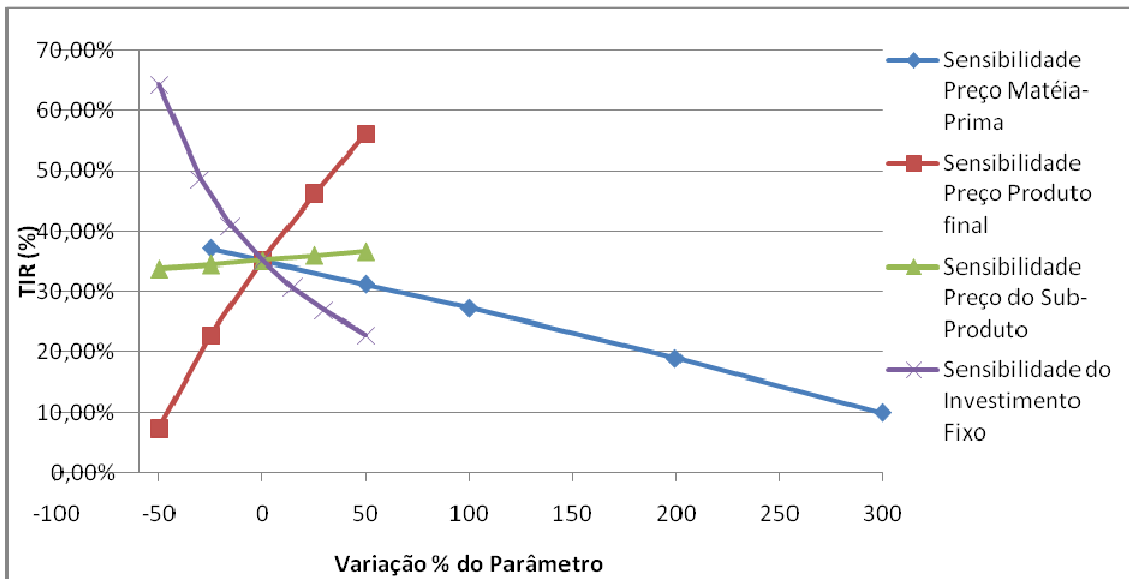


Figura 38 – Análise de sensibilidade da TIR frente a variações em determinados parâmetros

O Preço das matérias primas, na verdade, se refere ao custo do creme de levedura e se mostrou razoavelmente sensível, e como esse valor é um dos mais aproximados em nossas previsões, devemos dar uma atenção especial no estudo. Mas é importante ressaltar que para inviabilizar o projeto será necessário um aumento de 300% no valor pago nas leveduras.

O preço do subproduto (torta de parede celular úmida) se mostrou como o parâmetro de menor influencia sobre a TIR dentre os analisados.

Quanto ao Investimento Fixo, como era de se esperar, a TIR se mostrou bem sensível às variações neste parâmetro, pois o investimento fixo é um reflexo dos custos dos equipamentos considerados no projeto. O preço de venda da nossa manoproteína também apresentou grande influência sobre a TIR, mas podemos ressaltar que seria necessário que o valor de venda estimado fosse reduzido a metade para comprometer a atratividade do projeto.

Vale ressaltar que a análise econômica realizada neste trabalho, se tratou de uma avaliação apenas preliminar positiva, uma vez que o projeto apresentou uma TIR consideravelmente superior a TMA além de um VPL positivo e uma robustez interessante em relação às variações de alguns parâmetros. No entanto, temos que destacar que apesar desta análise preliminar apresentar resultados satisfatórios, se faz ainda necessária a realização análises posteriores mais detalhadas.

Capítulo IX – Considerações finais e Perspectivas futuras

O trabalho buscou oferecer uma alternativa para agregar valor à biomassa de leveduras de rejeito de processos fermentativos, através da extração de manoproteína presente na parede celular da levedura. A revisão bibliográfica permitiu concluir que muitos são os trabalhos científicos que procuraram estudar possíveis aplicações e mecanismos de atuação não somente para as manoproteínas, como também para a beta glucana, outra molécula bioativa presente na parede celular de leveduras.

O levantamento também permitiu observar que o campo de aplicações dessas moléculas é vasto, compreendendo setores como, por exemplo, vinícola, alimentício, e de cosméticos, sendo ressaltadas ainda as propriedades médicas, como a redução de níveis de colesterol no sangue promovida por beta glucanas.

O enfoque para o desenvolvimento de um processo, como já foi dito, foi na obtenção das manoproteínas, para tanto foi proposto inicialmente algumas rotas em laboratório. A rota escolhida (ML1) foi o processo por via térmica, na qual se obteve o produto com melhor relação pureza/rendimento dentre os demais testados. Para esta rota foi proposta uma extrapolação de escala do processo.

Foi realizada uma avaliação econômica deste processo em larga escala e adotou-se como parâmetros de avaliação a taxa de retorno (TIR) e o valor presente líquido (VPL). Primeiramente foi feita uma segmentação do mercado de vinho, a fim de se estimar o tamanho do mercado alvo e a produção da planta. Posteriormente foi feita uma estimativa do investimento total necessário e dos custos de produção, de forma que reunidos todos esses dados, foi possível obter a projeção do fluxo de caixa da operação.

O resultado da análise econômica preliminar proposta pode ser considerado positivo, uma vez que o mesmo apresentou TIR superior a TMA adotada, assim como um VPL positivo. A análise destes parâmetros foi complementada pela análise de sensibilidade, que sinaliza a robustez do processo. Tal análise apresentou alguns aspectos importantes, como o fato do projeto ser razoavelmente sensível ao preço do creme de leveduras, ou seja, quanto mais eficiente for o planejamento da operação no sentido de se minimizar esses custos, maior será a sua viabilidade. Portanto saídas

como a apresentada no projeto, onde se propõe a instalação da planta anexa a uma usina sucroalcooleira, se mostram bastante interessantes, ressaltando que esta já é uma estratégia usada em nível nacional, como a parceria entre a empresa de biotecnologia Alltech e a usina Vale do Itajaí.

Este trabalho permite concluir, sobretudo se analisarmos o contexto nacional, onde toneladas de leveduras de rejeito ainda são destinadas à formulação de rações animais, pode-se afirmar que processos na direção do aproveitamento das moléculas bioativas das leveduras, se constituem numa potencial oportunidade de investimento.

Grandes empresas, como a holandesa DSM e a francesa Lesaffre, tem investido valores consideráveis em P&D na direção de desenvolver produtos a partir de componentes celulares de leveduras. No contexto brasileiro podemos destacar a Biorigin, que possui uma série de produtos formulados com componentes celulares de *Saccharomyces cerevisiae*, com as mais diversas aplicações.

Podemos dizer, portanto, que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* de fato pode ser vista como uma fonte de produtos de química fina e especialidades, que ainda pode ser melhor explorada, e neste cenário o Brasil desponta em uma posição privilegiada devido a larga disponibilidade desta biomassa.

Bibliografia:

Assis, E. M. (1996) Polissacarídeo da parede celular de levedura de cervejaria (*Saccharomyces cerevisiae*), obtida por rompimento mecânico da célula e de processo industrial de autólise; *Tese de Doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1996.

AYESTARA´N, Z. G. (2008). Effect of Commercial Mannoprotein Addition on Polysaccharide, Polyphenolic, and Color Composition in Red Wines. *J. Agric. Food Chem.*

Barriga, J. (August de 1995). Characterization of the emulsifying mannoproteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *A thesis submitted to the Faculty of Graduate studies and Research in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Engineering*.

Baptista, A. (2001). *Saccharomyces cerevisiae* em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxinas. Dissertação (mestrado em agronomia) USP.

Bentley, J., Hunt, T., Weiss, J., Taylor, C.M., Hanson, A.N., Davies, G.H., Halliday, B.J., 1990. Peptides from live yeast cell derivative stimulate wound healing. *Arch. Surg.* 125, 641–646.

BORGES, J. N. (2006). ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS DA PAREDE CELULAR DA LEVEDURA *Phaffia rhodozyma*.

Brito, P. (2003) *Análise e viabilidade de Projetos de investimento*, Editora Atlas S:A.

BROWN, M. E. (1983). Yeast Water Relations: Physiological Changes Induced by Solute Stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*. *Journal of General Microbiology*, 129, 3453-3463.

CAÑADA LORENZO, F. P. (2005). Effect of Red Grapes Co-winemaking in Polyphenols and Color of wines. *J. Agric. Food Chem.*

CAMERON, D. R.; COOPER D. G.; NEUFELDD. R. J. (1988). The Mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* Is an Effective Bioemulsifier. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, pp. 1420-1425.

Casanova, M.; Gil, L.; Sentraeur, R. (1989) Identification of wall-specific antigens synthesized during germ tube formation by *Candida albicans*. *Infection and Immunity* 57, 262-271.

Caride, A. (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek*. 89: 417–422.

Chalier P, Angot B, Delteil D, Doco T & Gunata Z (2007). Interactions between aroma compounds and whole mannoproteins isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chem* 100: 22–30.

Charpentier, C. ; Alexandre, H.; Blanchet, S.; (2000) Identification of a 49-kDa hydrophobic cell wall mannoprotein present in velum yeast which may be implicated in velum formation FEMS Microbiology Letters 185 (147-150).

Chaud,S.; Sgarbieri,V. (2006) Propriedades funcionais(e tecnológicas) da parede celular de leveduras da fermentação alcoólica, manana e glicoproteína Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 26(2): 369-379.

Comuzzo, P.; Tat, L; Tonizzo, A.; F, Battistutta (2006). Yeast derivatives (extracts and autolysates) in winemaking: Release of volatile compounds and effects on wine aroma volatility. *Food Chemistry* .

Corbacho, I. (2005). A genome-wide screen for *Saccharomyces cerevisiae* nonessential genes involved in mannosyl phosphate transfer to mannoprotein-linked oligosaccharides. *Fungal Genetics and Biology* . 42 (2005) 773–790.

Daniel Gonzalez-Ramos, E. C. (2008). A Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Strain Overproducing Mannoproteins Stabilizes Wine against Protein Haze. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* .

Darricarrère, A. C. (2006). INFLUÊNCIA ORGANOLÉPTICA DA ADIÇÃO DE DIFERENTES DOSES DE MANOPROTEÍNAS PARIETAIS LEVEDURIANAS EM VINHO FINO TINTO SANGIOVESE DA SAFRA 2005 DA SERRA GAÚCHA.

Douglas, J. M. (1988). *Conceptual Design of Chemical Process*. McGraw-Hill INTERNATIONAL EDITIONS.

Dupin,I.; Stockdale, V. J.; Williams P. J.; Jones G. P; Markides A. J.; Waters E. J. (2000) *Saccharomyces cerevisiae* Mannoproteins That Protect Wine from Protein Haze: Evaluation of Extraction Methods and Immunolocalization. *J. Agric. Food Chem.*, 48 (4), pp 1086–1095

Dziezak, J. (ed.) (1987) *Yeasts and yeast derivatives: definitions, characteristics, and processing*. Food Technology, Chicago, v. 41, n. 2, p. 104-112, 119-120.

Ferracini-Santos,L; Sato,H. (2009) Isolamento de polímeros da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da atividade antioxidante da manana-proteína isolada *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 2, 322-326.

FLEET, G. H. (2006). The Commercial and Community Significance of Yeasts in Food and Beverage Production. In: G. H. FLEET, *The Yeast Handbook*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Fleuri, L. (2005). Produção, purificação, clonagem e aplicação de enzimas líticas. *Química Nova*. vol. 28 no.5.

FOOD STANDARDS. (19 March 2008). *FINAL ASSESSMENT REPORT - YEAST MANNOPROTEINS AS A FOOD ADDITIVE FOR WINE*.

Freidmund, S.; Sauter,M. (2003). A new non-degrading isolation process for 1,3-b-D-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydrate Polymers* . 54 (2003) 159–171.

- Gaspar,R., Junior,F., Gianeti, Campos, M. Evaluation of dermatological effects of cosmetic formulations containing *Saccharomyces cerevisiae* extract and vitamins Food and Chemical Toxicology 46 (2008) 3493–3500.
- Gonçalves,F.; Heyraud, A. (2002). Characterization of white wine mannoprotein, J.Agric.Food Chem,50,6097
- Halász A, Lásztity R. (1991) Use of yeast biomass in food production. Boca Raton: CRC Press.
- Ivan Moreira, C. A. (1999). Utilização de levedura de recuperação (*Saccharomyces* sp.), seca por spray-dry, em rações fareladas ou peletizadas para leitões na fase inicial.
- JACOB S. JENSEN, S. D. (2008). Prediction of Wine Color Attributes from the Phenolic Profiles of Red Grapes (*Vitis vinifera*). *J. Agric. Food Chem.*
- Jaehrig, S., Rohn, S., & Kroh, L. (2007). In Vitro Potential Antioxidant Activity of (1→3),(1→6)-β-d-Glucan and Protein Fractions from *Saccharomyces cerevisiae* Cell Walls. *J. Agric. Food Chem.*, 4710–4716.
- Jeffrey A.T. Barriga, D. G. (1999). Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, pp. 96–102.
- Kanterewicz, R.J.; Pilosof, A.(1989) A simple method for determining oil absorption capacity of protein and the kinetics of oil uptake. Journal of American Oil Chemists Society, Champaign, v. 66, n. 6, p. 809-812.
- Kim, K.S., Yun, H.S., 2006. Production of soluble β-glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 39, 496–500.
- Kinsella, J. (1976) Functional properties in foods; a survey. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Boca Raton, v. 7, n. 3, p. 219-280
- Klis, F.; Mol, P.; Hellingwerf, K.; Brul, S. (1994),. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*. P. 239-256.
- Kollar, R.; Sturkik, E.;(1992) Complete fractionation of *Saccharomyces cerevisiae* biomass. Food Biotechnology, New York, v. 6, n. 3, p. 225-237.
- Kubitschek, H. E.; Baldwin, W. W. (1984). Buoyant density variation during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.*
- Lipke, P. (1998). Cell Wall Architecture in Yeast:New Structure and New Challenges. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* . p. 3735–3740 Vol. 180, No. 15.
- Lowry, O., N. Rosebrough, A. Farr and R. Randall, (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lubbers, S., Charpentier, C., Feuillat, M., & Voilley, A. (1994). Influence of yeast walls on the behaviour of aroma compounds in a model wine. *American Journal Enology and Viticulture*, 45, 29–33.

- Lyons T., Jacques K., Dawson K. (1993) Miscellaneous products from yeasts. In: Rose AH, Harrison JS (eds) *The yeasts*, vol 5. Yeast technology, 2nd edn. Academic, London, pp 293–325.
- Magnelli, P. (2002). A Refined Method for the Determination of *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Composition and b-1,6-Glucan Fine Structure. *Analytical Biochemistry* . 301, 136–150 (2002).
- Maria, A. (Outubro de 1998). INTERAÇÕES DO CLORODIAZEPÓXIDO EM MEIOS MICELARES Avaliação das propriedades ácido/base e de solubilidade.
- Marie-France Garcia-Parpet. (2004) Mundialização dos mercados e padrões de qualidade “vinho, o modelo francês em questão”. *Tempo Social*, revista de sociologia da USP, v. 16, n. 2.
- Mello, L (2008)- Atuação do Brasil no Mercado Vitivinícola Mundial – Panorama 2008 *Embrapa Uva e Vinho*
- MICHEL DUBOIS, K. A. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *ANALYTICAL CHEMISTRY* .
- Montijn, R, Rinsum, J Schagen, Klis, F (1994) Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain *VOI*. 269, No. 30, pp.19338-19342
- Moura, E. (1986) Fontes protéicas não convencionais: perspectivas do seu emprego na alimentação Desnutrição intrauterina e pós natal. 2 ed. Panamed editorial PP.43-63.
- Nagodawithana, T. (1992), Yeast-derived flavours and flavour enhancers and their probable mode of action. *Food Technol.*, 46, 138-144.
- Pacheco, M. (1996) Propriedades funcionais, nutricionais e toxicológicas de concentrados proteicos de levedura (*saccharomyces sp.*), obtidos por diferentes processos de extração Tese doutorado em ciências da nutrição Unicamp.
- Parascandola, P.; Alteris, E.; Sentradu, R.; Zueco, J. (1997) Immobilization and ethanol stress induce the same molecular response at the level of the cell wall in growing yeast. *FEMS Microbiology Letters*, v. 150, p. 121-126, 1997.
- Pascale Chalié, B. A. (2005). Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *foodchem*.
- Peat, S.; Edward, E. (1961) *Polysaccharides of Baker's Yeast. Part I V.I Mannan*.
- Perez-Serradilla J.; Luque de Castro M (2008) Role of lees in wine production: a review. *Food Chem* 111: 447–456.
- Perlingeiro, C. A. (2005). *Engenharia de Processos*. Blucher.
- Péterszegi, G., Isnard, N., Robert, A.M., Robert, L., (2003). Studies on skin aging. Preparation and properties of fucose rich oligo and polysaccharides. Effect on fibroblast proliferation and survival. *Biomed. Pharmacother.* 57, 187–194.

Robbins, A, Seeley, D. (1977). Cholesterol lowering effect of dietary yeast and yeast fractions. *J Food Sci.* 42(3):694-8.

Roese, M. (2008). O MONDO VINO DE CABEÇA PARA BAIXO: AS TRANSFORMAÇÕES NO MERCADO INTERNACIONAL DO VINHO E O NOVO EMPRESARIADO VINÍCOLA. *Rev. Sociol. Polít.*

Roger G. Harrison, P. T. (2003). *Bioseparation Science and Engineering*. Oxford university press.

Roger, P. ; Nguyen, H.; Fleet, G. (1998). Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl Microbiol Biotechnol.* 50: 206-212.

Sgarbieri, V.; Alvim, D. Vilela, E. Baldin, V.; Bragagnolo, N. (1999) Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* SP,) para uso como ingrediente na formulação de alimentos *Brazilian Journal of food Technology*, v.2, n.1, 2, p.119-125.

SINNOTT, R.K. (1986). *Chemical Engineering – Introduction to Chemical Engineering Design*, Volume 6, Pergamon Press, Oxford.

Timmerhaus, K., & Petres, M. (1980). *Plant design and economic for chemical engineers*. international student edition. 3ª ed.

Timmerhaus, K., & Petres, M. (1990). *Plant design and economic for chemical engineers*. 4ª ed. McGraw-Hill Chemical Engineering Series.

H. Torabizadeh, S. A. Shojaosadati and H. A. Tehrani. (1996). Preparation and Characterisation of Bioemulsifier from *Saccharomyces cerevisiae* and its Application in Food Products. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, 29, 734–737.

Valentim, E. Herrero, F. ; Pastor, I ; Sentraudeu, R. (1984) Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*-*Journal of General Microbiology*, 130, 1419-1428.

Van Der Vart, M.; Chapman, J. (1995). Identification of Three Mannoproteins in the Cell Wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. p. 3104–3110.

Zenaida Guadalupe, A. P. (2007). Maceration Enzymes and Mannoproteins: A Possible Strategy To Increase Colloidal Stability and Color Extraction in Red Wines. *J. Agric. Food Chem.*

Outras fontes Bibliográficas:

Acesso em Junho de 2009, disponível em <http://www.wineintro.com/glossary/c/coldstabilization.html>

Acesso em 29 de Janeiro de 2010, disponível em <http://www.uruguayanwines.com>

Acesso em 4 de Fevereiro de 2010, disponível em www.copersucar.com.br

AGRÍCOLA, I. D. (s.d.). IEA. Acesso em 14 de Janeiro de 2010, disponível em <http://www.iea.sp.gov.br>

Biorigin. (s.d.). Acesso em 12 de Abril de 2009, disponível em <http://www.biorigin.com.br>

Denis Duboudieu, B. (2000). *Patente Nº 6,139,891*. United States.

DSM. (s.d.). Acesso em 12 de abril de 2009, disponível em http://www.dsm.com/en_US/html/home/dsm_home.cgi

Enartis. (s.d.). Acesso em 12 de Abril de 2009, disponível em <http://www.enartis.com/>

INSTITUTO BRASILEIRO DO VINHO. IBRAVIN. Disponível em: <<http://www.ibravin.org.br/>>
Acesso em: 10 jan. 2010.

Lallemand. (s.d.). Acesso em 6 de abril de 2009, disponível em <http://www.lallemandwine.us>

Lankhorst, P. P. (2006). *Patente Nº 2006/067145 A1*. Intenational Publication.

Nossiter, J. (Diretor). (2004). *MONDOVINO* [Filme Cinematográfico]

OIV. (2009). *INITIAL RESULTS FROM THE 2009 HARVESTS IN COUNTRIES OF THE SOUTHERN HEMISPHERE*.

OIV. (2006). *SITUATION OF THE WORLD VITICULTURAL SECTOR IN 2006 - SUPPLEMENT TO THE OIV REPORT*.

OIV. (2009). *WORLD VITIVINICULTURAL ECONOMIC DATA* .

UNIÃO BRASILEIRA DE VITIVINICULTURA.UVIBRA. Disponível em:
<<http://www.uvibra.com.br/>>. Acesso em: 10. Jan. 2010.

*US Environmental Protection Agency Office of Pesticide Programs BIOPESTICIDES
REGISTRATION ACTION DOCUMENT - Yeast Extract Hydrolysate from Saccharomyces cerevisiae
- PC Code 100053*.

USPTO. (s.d.). Acesso em 26 de março de 2009, disponível em <http://www.uspto.gov/> Vagine,
M. (2006). *Patente Nº WO 2006/056725*.

Projeção do Fluxo de caixa (R\$)

Ano	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Entradas	0,00	2.020.639,54	4.041.279,08	5.900.976,44	5.900.976,44	5.900.976,44	5.900.976,44	5.900.976,44	5.900.976,44	5.900.976,44	5.900.976,44
1.1 Receita de vendas	0,00	2.020.639,54	4.041.279,08	5.900.976,44	5.900.976,44	5.900.976,44	5.900.976,44	5.900.976,44	5.900.976,44	5.900.976,44	5.900.976,44
1.1.1 Manoprotetora	0,00	1.903.405,68	3.806.811,36	5.558.563,44	5.558.563,44	5.558.563,44	5.558.563,44	5.558.563,44	5.558.563,44	5.558.563,44	5.558.563,44
1.1.2 Sub Produto (parede celular)	0,00	117.233,86	234.467,72	342.413,00	342.413,00	342.413,00	342.413,00	342.413,00	342.413,00	342.413,00	342.413,00
Saídas	3.651.534,02	2.129.307,26	2.854.102,53	3.728.099,53	3.728.099,53	3.728.099,53	3.728.099,53	3.728.099,53	3.728.099,53	3.728.099,53	3.728.099,53
2.1 Custos de Manufatura	0,00	701.575,24	1.370.762,44	1.215.603,59	1.215.603,59	1.215.603,59	1.215.603,59	1.215.603,59	1.215.603,59	1.215.603,59	1.215.603,59
2.1.1 Diretos	0,00	646.534,64	1.315.741,84	1.160.582,99	1.160.582,99	1.160.582,99	1.160.582,99	1.160.582,99	1.160.582,99	1.160.582,99	1.160.582,99
Matérias-primas:	0,00	266.480,95	532.961,91	778.216,05	778.216,05	778.216,05	778.216,05	778.216,05	778.216,05	778.216,05	778.216,05
Utilidades:	0,00	3.369,69	4.563,88	5.662,93	5.662,93	5.662,93	5.662,93	5.662,93	5.662,93	5.662,93	5.662,93
Mão de Obra:	0,00	376.704,00	778.216,05	376.704,00	376.704,00	376.704,00	376.704,00	376.704,00	376.704,00	376.704,00	376.704,00
2.1.2 Fixos	0,00	55.020,60	55.020,60	55.020,60	55.020,60	55.020,60	55.020,60	55.020,60	55.020,60	55.020,60	55.020,60
Despesas gerais e outros custos	0,00	55.020,60	55.020,60	55.020,60	55.020,60	55.020,60	55.020,60	55.020,60	55.020,60	55.020,60	55.020,60
2.2 Custos Gerais	0,00	282.103,92	329.340,71	372.814,80	372.814,80	372.814,80	372.814,80	372.814,80	372.814,80	372.814,80	372.814,80
2.2.1 Comerciais	0,00	225.598,32	272.835,11	316.309,20	316.309,20	316.309,20	316.309,20	316.309,20	316.309,20	316.309,20	316.309,20
2.2.2 Administrativas	0,00	56.505,60	56.505,60	56.505,60	56.505,60	56.505,60	56.505,60	56.505,60	56.505,60	56.505,60	56.505,60
2.3 Investimento Total	3.651.534,02	643.745,80	9,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2.3.1 Investimento Fixo	3.319.576,38	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2.3.2 Capital de Giro	0,00	643.741,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2.3.3 Investimento de Partida	331.957,64	4,74	9,30	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2.4 Imposto sobre o lucro líquido (50%)		501.882,31	1.153.990,08	2.139.681,14	2.139.681,14	2.139.681,14	2.139.681,14	2.139.681,14	2.139.681,14	2.139.681,14	2.139.681,14
4. Saldo	-3.651.534,02	-108.667,73	1.187.176,55	2.172.876,91	2.172.876,91	2.172.876,91	2.172.876,91	2.172.876,91	2.172.876,91	2.172.876,91	2.172.876,91

Anexo