



**Estudo de viabilidade econômica da
produção de lipase por fermentação
submersa a partir de ácido oléico**

**Diego Soares Pinto
Paulo César Barjona**

Projeto de Final de Curso

Orientadores

**Prof.^a DSc. Andrea Medeiros Salgado
MSc. Ariana Farias Melo**

Outubro de 2011

Estudo de viabilidade econômica da produção de lipase por fermentação submersa a partir de ácido oléico

Diego Soares Pinto

Paulo César Barjona

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:

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.

Frederico Wanderley Tavares, D.Sc.

Nicola Bohrer Kabouk

Orientado por:

Ariana Farias Melo, M.Sc.

Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Outubro de 2011

Pinto, Diego Soares e Barjona, Paulo César.

Título/Diego Soares Pinto e Paulo César Barjona. UFRJ/EQ,
2011.

x, 57 p.; il.

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de
Química, 2011.

Orientadores: Andréa Medeiros Salgado e Ariana Farias Melo.

1. Fermentação Submersa. 2. Lipases. 3. Avaliação econômica.
4. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ). 5. Andréa Medeiros Salgado
e Ariana Farias Melo.

I. Título.

“Foi dado a você o dom da vida. É um dom frágil e não é algo que possa manter pra sempre.
Mas é o dom mais precioso do mundo todo. Use-o bem.”
(Autor desconhecido)

Agradecimentos

Às nossas orientadoras por nos guiarem ao longo desse projeto, tornando-o possível.

A todos os professores por compartilhar conosco o conhecimento, nos incentivando a sermos melhores.

Agradecimentos Diego:

Primeiramente a Deus. A Ele agradeço por tudo, pois foi um conjunto de fatos, nem sempre lógicos, de acontecimentos e ações provocados por si e outros, ou justificados pelo acaso, que foi possível a realização e conclusão deste trabalho.

Aos meus pais, José Carlos e Dayse, que sempre me apoiaram em todas as decisões que tomei e sempre me deram o suporte necessário para chegar até onde cheguei.

À minha irmã, Deisiane, que, mesmo estudando em outra cidade durante a minha vida acadêmica, sempre esteve presente nos momentos mais importantes da minha vida, inclusive quando o resultado do vestibular foi divulgado. Nunca me esquecerei do seu grito de euforia.

À minha avó, Maria José, que sempre me deu o colo que precisei nos momentos mais difíceis, apesar de sempre achar que eu era maluco por fazer engenharia. Nunca me esquecerei das guloseimas que ela fazia nas horas de estudo.

Ao meu avô, José Soares, que infelizmente não está mais entre nós. Exemplo de ser humano, profissional e pai de família. A ele agradeço os sábios conselhos que me foram dados e o orgulho que depositava em mim.

Aos meus tios e primos, José da Cunha, Lilian, Patrícia e Vitor, que, mesmo morando em outro estado, sempre me compreenderam e aceitaram as decisões que tomei.

Aos meus amigos de escola e de Niterói, que sempre compreenderam meus sumiços semestrais durante toda época de prova.

A minha turma de 2005/2, que não poderia ter sido melhor. Nela, conheci pessoas com quem pude conversar, festejar, chorar e crescer como

ser humano. Foram muitas companhias insubstituíveis, pessoas que surtavam junto comigo em vários momentos, estudavam até altas horas, fechando a biblioteca. E, é claro, sempre me permitindo momentos de descontração sem igual.

Aos amigos de faculdade conquistados durante todos esses anos, que me ajudaram a entender o significado da palavra convivência. Cada um com sua história, seu jeito de ser ou até mesmo com o seu bom dia toda manhã soube ganhar minha amizade. Digo com toda certeza do mundo que se não fossem estas pessoas, concluir todo este projeto seria uma tarefa muito mais árdua. Eles foram essenciais para a conclusão desta graduação.

Aos amigos de longe, que sempre me proporcionaram excelentes viagens e que sempre aproveitaram aquele feriado para vir me visitar.

A todos do laboratório 103, o grupo Biose, que foram meus primeiros colegas de trabalho. Agradeço pelo aprendizado e por todas as oportunidades que me foram dadas e me fizeram crescer como profissional.

Ao seu Antônio e seus funcionários, que sempre me salvaram na época de prova, tirando minhas milhões de cópias. Com certeza ainda estaria no 1º período sem o trabalho de toda essa turma.

Ao Steve Jobs, que criou o Iphone e o Ipod Touch, aparelhos que são um adianto na vida de qualquer universitário.

Agradecimentos Paulo:

À Alejandra, que esteve sempre ao meu lado, me dando inspiração e incentivo nas decisões cruciais.

Aos meus irmãos Rodger, Ricardo e Eduardo, pelos conselhos e por compartilharem comigo a alegria desse momento.

Ao Clayton, Patricia e Gabriela, pela generosidade de me acolherem em seu lar.

Aos meus amigos, que longe ou perto, torceram por mim e compartilharam as alegrias e tristezas.

E aos meus pais Roni e Carmelina, que mesmo estando distantes, me apoiaram em tudo e acreditaram nos meus sonhos. Obrigado pelo maravilhoso exemplo de vida.

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

ESTUDO DE VIABILIDADE ECONÔMICA DE PRODUÇÃO DE LIPASE POR FERMENTAÇÃO SUBMERSA A PARTIR DE ÁCIDO OLÉICO

Diego Soares Pinto
Paulo César Barjona

Outubro de 2011

Orientadores: Profa. Andréa Medeiros Salgado, D.Sc.,
Ariana Farias Melo, M.Sc.

A crescente preocupação com o meio ambiente e a busca por fontes alternativas e renováveis de matéria prima são temas em foco nos dias de hoje. O reaproveitamento e a reutilização de óleos, fontes ricas de carbono, na indústria de bioprocessos para produção de enzimas é o foco do presente trabalho. A lipase, enzima utilizada para diversos fins na indústria, é produzida por uma gama de microorganismos a partir de processos de fermentação. A escolha da fermentação submersa (FS) é adequada ao tipo de matéria prima oleosa, sendo um processo altamente difundido. Além disso, a utilização de um meio de cultura renovável pode viabilizar economicamente o projeto, gerando produtos a partir de processos mais baratos. A lipase produzida possui papel estratégico fundamental na produção de biodiesel, visto que uma de suas aplicações é como catalisador da reação de transesterificação para produção de biodiesel. Desta forma, o presente trabalho teve objetivo de estudar a viabilidade econômica da produção de lipase por *Candida rugosa*, microorganismo conhecido na literatura como ótimo produtor de lipases, em fermentação submersa utilizando ácido oléico como fonte de carbono. Dados obtidos da literatura, de experimentos realizados em escala laboratorial, foram utilizados para se determinar os parâmetros essenciais ao processo, e o software SuperPro Designer foi aplicado com a finalidade de executar a simulação de uma planta industrial de produção de lipase, permitindo também o levantamento de dados para um estudo de viabilidade econômica do processo. A planta simulada foi capaz de produzir um preparado enzimático a um custo de aproximadamente R\$ 4.500 por kg com capacidade de produção de 10 ton/ano, sendo que o preço de venda foi estimado em aproximadamente R\$ 5.600 por kg. Este resultado mostra que o processo apresenta grande potencial econômico e sugere que estudos posteriores devem ser realizados visando seu desenvolvimento em um processo em escala industrial.

ÍNDICE

Capítulo I. Introdução	1
Capítulo II. Revisão Bibliográfica	4
II.1. Lipases	4
II.1.1. Definição das Lipases	4
II.1.2. Classificação das Lipases	6
II.1.3. Aplicações Industriais e Mercado das Lipases	6
II.2. Fermentação Submersa	12
II.2.1. Definição	12
II.2.2. Parâmetros da Fermentação Submersa (FS)	13
II.2.3. Ampliação de Escala	15
II.3. Fonte de Carbono	16
II.4 – Purificação	17
II.5. Avaliação Econômica de Processos	18
II.5.1. Custos de Operação	19
II.5.2. Investimento	20
II.5.3. Custos de Equipamentos	22
II.5.4. Indicadores de Lucratividade	23
II.6. Software SuperPro Designer	24
Capítulo III. Objetivos	26
Capítulo IV. Materiais e Métodos	27
IV.1. Parte Experimental	27
IV.1.1. Matéria Prima	27
IV.1.2. Microorganismo	28
IV.1.3. Cultivo	28
IV.1.3.1. Preparo do Inóculo	28
IV.1.3.2. Experimentos para Produção de Lipase	28
IV.2. Síntese do Processo	29
IV.2.1. Operações e Equipamentos	29
IV.2.2. Balanço de Massa	30
IV.2.2.1. Preparo e Propagação do meio	30
IV.2.2.2. Fermentação	30
IV.2.2.3. Extração de Líquidos no decantador	31
IV.2.2.4. Centrifugação	31

IV.2.2.5. Remoção dos sólidos por precipitação salina	31
IV.2.2.6. Concentração por troca iônica	32
IV.2.3. Dimensionamento	32
IV.3. Avaliação Econômica	34
IV.3.1. Custos dos Equipamentos	34
IV.3.2. Custos de Materiais.....	35
IV.3.3. Custo do Trabalho.....	35
IV.3.4. Indicadores de Lucratividade	35
Capítulo V. Resultados e Discussão	36
V.1. Parte Experimental	36
V.1.1. Produção de lipase.....	36
V.2. Síntese do Processo.....	36
V.2.1. Balanço de Massa.....	39
V.2.2. Dimensionamento	40
V.3. Avaliação Econômica	41
V.3.1. Ocupação dos recursos	41
V.3.2. Custos de Investimento.....	42
V.3.3. Custos de Operação	44
V.3.4. Indicadores de Lucratividade	46
V.3.4.1. Fluxo de Caixa	46
Capítulo VI. Conclusão.....	49
Bibliografia.....	50
Anexo 1	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição de custos em uma planta industrial	20
Figura 2 - Distribuição de investimentos em uma planta industrial.....	21
Figura 3 - Metodologia do trabalho.....	27
Figura 4 - Fluxograma de uma planta de produção de lipase utilizando ácido oléico como fonte de carbono.....	37
Figura 5 – Gráfico de Grant.....	41
Figura 6 - Curva de peso seco obtida com células de <i>Candida rugosa</i>	56
Figura 7 - Reação de hidrólise do p-nitrofenol laurato	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Possibilidades de uso, em escala industrial, das lipases em diferentes áreas	8
Tabela 2 - Algumas lipases comerciais disponíveis e suas aplicações industriais.....	11
Tabela 3 - Equipamentos do processo	29
Tabela 4 - Parâmetros de dimensionamento da planta	32
Tabela 5 - Operações do processo	33
Tabela 6 - Parâmetros para a equação de custos.....	34
Tabela 7 - Preço dos insumos	35
Tabela 8 - Balanço de massa da planta	39
Tabela 9 - Dimensões dos equipamentos	40
Tabela 10 - Custos unitário e total dos equipamentos.....	42
Tabela 11 - Custos diretos e indiretos	43
Tabela 12 - Custos com Matéria-Prima	44
Tabela 13 - Custo de utilidades	44
Tabela 14 – Custos Operacionais	45
Tabela 15 – Fluxo de caixa.....	47

Capítulo I. Introdução

As enzimas são biocatalisadores com propriedades que as tornam altamente requisitadas. São muito ativas e versáteis, realizando uma série de transformações de modo seletivo e rápido. Enzimas são inerentes à maioria das matérias-primas alimentares e podem influenciar o processamento dos alimentos de várias formas, desejáveis ou não. A grande vantagem das enzimas é que elas catalisam as transformações moleculares sem ocorrência de reações paralelas, o que é comum em sínteses químicas, devido à sua especificidade (Reed, 1975; Dziezak, 1991; Patel, 2002; Pizarro & Park, 2003).

Hoje, aproximadamente 4.000 enzimas são conhecidas, e destas, cerca de 200 são usadas comercialmente, sendo que a maioria das enzimas é de origem microbiana (Sharma *et al.*, 2001).

As enzimas lipolíticas constituem, atualmente, o mais importante grupo de enzimas com enorme potencial para aplicações biotecnológicas. As lipases (Triacilglicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3), conhecidas como hidrolases, têm a função natural de catalisar a hidrólise de triglicerídeos de cadeia longa. Lipases atuam na interface orgânica aquosa catalisando a hidrólise de ligações éster carboxilases presentes em acilgliceróis para liberar ácidos orgânicos e glicerol podendo a reação inversa (síntese) ocorrer em ambientes não aquosos. Nestas condições podem catalisar reações de esterificação, transesterificação ou interesterificação. Sua estabilidade a altas temperaturas, ampla faixa de atuação em relação ao pH e sua enâncio seletividade na resolução de misturas racêmicas tornam estas enzimas atraentes e versáteis (Freire e Castilho, 1999; Sharma *et al.*, 2001).

Atualmente, as lipases têm sido de grande importância no cenário biotecnológico, econômico e industrial. Essas enzimas são utilizadas como ferramenta tecnológica, representando uma perspectiva de desenvolvimento nos processos para obtenção de monoglicerídios, ácidos graxos, agentes biotensioativos, compostos de aroma e sabor e lipídeos estruturados ou biomodificados (Oliveira, 2000).

As lipases têm encontrado aplicações em diversos tipos de indústrias, tais como de alimentos (aditivos, modificadores de aromas), química fina (síntese de ésteres), detergente (remoção de gorduras), tratamento de

efluentes (remoção de produtos oleosos) e farmacêutica (remédios, digestivos, enzimas para diagnósticos, etc.). O potencial de uso industrial das lipases em detergentes, biotransformações e reações de interesterificação e transesterificação também têm despertado interesse por essas enzimas. Lipases com especificidade comprovada têm especial importância nas reações de transformação e interesterificação, uma vez que os produtos formados podem ser mais facilmente obtidos por via enzimática do que em processos químicos convencionais (Maldonado, 2006). Muitas aplicações industriais destas enzimas são ainda limitadas pelo alto custo de produção e baixa produtividade. Em muitos casos, a fermentação para produção de lipases é lenta e o custo relativamente alto (Yang *et al.*, 2005).

A área da biotecnologia tem mostrado grande interesse pelas lipases de origem microbiana, sendo essas as mais estudadas atualmente. Este interesse é devido às características próprias das enzimas, como estabilidade e a ampla perspectiva de aplicação industrial, uma vez que permite maior controle dos parâmetros (pH, temperatura) e maior eficiência (Reed, 1975). No entanto, existem limitações para a utilização industrial da lipase microbiana, como o custo para a sua obtenção, que é determinado pelo rendimento da produção, pelas condições do processo e pela estabilidade da enzima. Para contornar isso é interessante que se procure aumentar a produtividade dos processos fermentativos. (Hadeball, 1991).

Considerando o aspecto econômico para produção de lipases por processos fermentativos, alguns métodos têm sido comumente empregados para aumentar a produtividade do processo: um consiste na seleção do microorganismo e otimização das condições de fermentação para aumentar a atividade lipásica; o outro consiste na redução do tempo de fermentação. De acordo com Pinheiro (2006), a otimização do processo fermentativo é um dos focos para aumentar a atividade lipásica.

Dentre os microorganismos produtores de lipases estão os fungos filamentosos, que atualmente são os mais utilizados nos processos biotecnológicos, as bactérias e as leveduras.

Leveduras são fungos unicelulares capazes de reproduzir-se vegetativamente por brotamento das células ou, mais raramente, por fissão celular. Essa característica confere às leveduras a capacidade de multiplicar-se

rapidamente em ambientes líquidos, que favorecem a dispersão das células (Pitt & Hocking, 1999). Apenas alguns gêneros de leveduras são capazes de sintetizar lipases, como: *Candida*, *Saccharomyces*, *Saccharomycopsis* e *Yarrowia*. (Hadeball, 1991).

Vários fatores influenciam na síntese de lipase pelos microorganismos. Os principais são: fonte de carbono; fonte de nitrogênio; presença de indutores, presença de estimuladores e inibidores; presença de agentes que afetam a interface óleo/água; temperatura de incubação, pH do meio de cultura e inóculo (Hadeball, 1991; Obradors *et al.*, 1993; Montesino *et al.*, 1996; Dominguez *et al.*, 2003).

Além disso, a produção de lipases pode ser realizada por fermentação submersa (FS) ou por fermentação em estado sólido (FES). A FES baseia-se em crescimento e metabolismo dos microorganismos em sólidos úmidos sem a presença de água livre e a FS utiliza meio de cultura líquido, com nutrientes solúveis (Castilho *et al.*, 2000). Neste caso, as células podem ser utilizadas na forma livre ou imobilizada.

Com isso, estudos sobre a utilização de microorganismos e diferentes formas de disponibilizá-los em meio de fermentação líquido, o mais utilizado na realidade industrial, podem ser uma alternativa para encontrar condições operacionais ideais para produção de lipases com maiores rendimentos.

A partir destes aspectos, o objetivo deste trabalho foi avaliar economicamente a produção de lipases por fermentação submersa, em meio sintético, utilizando como microorganismo *Candida rugosa*, na forma livre, e ácido oléico como fonte de carbono. Itens como investimento de capital total e custo do produto são discutidos. Além disso, indicadores de rentabilidade, tais como tempo de retorno, retorno sobre o investimento e taxa interna de retorno são apresentados e analisados .

Capítulo II. Revisão Bibliográfica

II.1. Lipases

II.1.1. Definição das Lipases

Lipases são enzimas pertencentes ao grupo das serina hidrolases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3). Seus substratos naturais são triglicerídeos e o seu modo de ação se assemelha ao das esterases, porém, sua atividade é aumentada quando situada na interface polar/apolar e apresenta maior afinidade por ácidos graxos de cadeia longa. As lipases são capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação, transesterificação e lactonização (esterificação intramolecular). Esta flexibilidade, aliada a diferentes possibilidades de especificidade pelo substrato existentes nas diferentes lipases, confere a estas enzimas um potencial enorme de aplicações (Gandhi, 1997).

Reações de esterificação, transesterificação, hidrólise e lactonização podem ser catalisadas pelas lipases. Aliadas a esta característica, diferentes possibilidades de especificidade pelo substrato existentes proporcionam a estas enzimas um grande potencial de aplicações.

Enzimas lipases são encontradas em tecidos animais, vegetais e podem ser produzidas por microorganismos, tendo papel fundamental no metabolismo de lipídios destes seres vivos: como enzimas digestivas, a deposição e mobilização dos tecidos de reservas energéticas e no metabolismo intracelular, atuando sobre as membranas celulares (Villeneuve *et al.*, 2000).

Inicialmente as lipases eram tradicionalmente obtidas de pâncreas de animais, no entanto, anos mais tarde, com a descoberta feita por Claude Bernard das lipases microbianas, ocorreu um aumento do interesse por estas devido à dificuldade de acesso ao material de origem animal (Hasan *et al.*, 2006).

Embora a lipase mais estudada até hoje seja a lipase pancreática, do ponto de vista industrial, as lipases microbianas são bem mais interessantes por permitirem produção em maior escala e poderem mais facilmente ser expressas, via clonagem, em outros organismos, o que facilita sua obtenção e purificação (Palekar *et al.*, 2000).

As lipases provenientes de microorganismos constituem um grupo de valiosas enzimas de aplicação biotecnológica, devido principalmente à versatilidade de suas propriedades, no que se refere à atuação enzimática e especificidade pelo substrato, sendo um dos grupos mais utilizados no segmento industrial (Hasan *et al.*, 2006).

Além das funções metabólicas, as lipases possuem um papel importante em biotecnologia, principalmente na indústria de óleos e alimentos, e em síntese orgânica, na preparação de compostos enantiomericamente enriquecidos (Sharma *et al.*, 2001; Costa e Amorim, 1999).

As propriedades catalíticas das lipases como a seletividade e a estereoespecificidade, dentre outras, podem ser de fácil controle através da manipulação nas condições das reações. A dependência destas propriedades catalíticas com o meio reacional pode ser uma consequência do complexo mecanismo de ação das lipases, que envolvem mudanças conformacionais em sua estrutura (Sabuquillo *et al.*, 1998).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando de 20 a 75 kDa, atividade em pH entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. São geralmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica (Castro *et al.*, 2004).

Vários microorganismos têm sido utilizados na produção de lipases; tais como: *Candida rugosa*, *Candida antarctica*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Achromobacter sp*, *Aspergillus sp*, *Mucor*, *Rhizopus sp*, *Penicillium sp*, *Geotrichum sp*, *Tulopsis sp* e *Candida sp* (Liu *et al.*, 2006).

Industrialmente, os fungos apresentam um valor em especial devido às enzimas produzidas por eles serem extracelulares normalmente, facilitando sua recuperação do meio de fermentação.

II.1.2. Classificação das Lipases

Para aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator crucial. A enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato, podendo ser divididas em 3 grupos baseados em sua especificidade:

- Lipases não específicas (produzidas por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas sp.*) que catalisam a quebra das moléculas de acilglicerol de forma aleatória, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares aqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior.

- Lipases 1,3 específicas (ex: de *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roquefortii*) liberam ácidos graxos das posições 1 e 3 e formam, por esta razão, produtos com composições diferentes daquelas obtidas pelas lipases não-regiosseletivas, ou mesmo pelo catalisador químico inferior.

- Lipases ácido graxo específicas, são lipases com ação específica na hidrólise de ésteres, cujos ácidos graxos são de cadeia longa insaturada com duplas ligações, em cis no carbono 9. Ésteres com ácidos graxos insaturados, ou sem insaturação no carbono 9, são lentamente hidrolisados. Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases e o exemplo mais estudado até hoje é a lipase de *Geotrichum candidum*. Esta habilidade de produzir novos tipos de misturas de triacilglicerídeos utilizando lipases regioespecíficas é uma das características mais interessantes para a aplicação no setor de óleos e gorduras (Castro *et al.*, 2004).

II.1.3. Aplicações Industriais e Mercado das Lipases

Com a crescente conscientização sobre questões ambientais e de custos, a biotecnologia está expandindo rapidamente, devido às diversas vantagens que ela oferece em relação às tecnologias convencionais. O ramo das enzimas industriais tem tido agora maiores iniciativas, resultando no desenvolvimento de uma série de novos produtos e em melhorias no processo e desempenho de vários produtos existentes.

As aplicações de enzimas podem ser divididas em aplicações industriais, aplicação em uso médico e em uso analítico. Estas aplicações estão dentro do que se chama de biotecnologia, que abrange as áreas da microbiologia, bioquímica, genética, engenharia química e engenharia bioquímica, com o objetivo de melhorar processos já existentes ou possibilitar o uso de novas matérias-primas (Lima *et al.*, 2001).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, proporcionando um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias consistentes para utilização no setor industrial (Jaeger *et al.*, 1994).

As lipases têm sido utilizadas em uma variedade de segmentos biotecnológicos, como em indústrias de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, oleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) e para tratamento de resíduos oleosos provindos da indústria do couro e de papel (Faber, 2000)

Apesar de nos dias de hoje o uso de lipases se apresentar focado nas indústrias de detergentes e de alimentos e ainda ser baseado nas reações de hidrólise, em sua maioria, novas aplicações vêm se estabelecendo nos diversos campos, decorrente também das reações de síntese e transesterificação e das características enâncio e régio seletivas das lipases: indústria de química fina, de cosméticos, farmacêutica, oleoquímica, de couros, de polpa e papel e no tratamento de resíduos industriais. A Tabela 1 mostra algumas aplicações de lipase em diferentes áreas.

Tabela 1 – Possibilidades de uso, em escala industrial, das lipases em diferentes áreas. (Fonte: Vulfson, 1994; Castro; Andersen, 1995.)

	Setor	Efeito Utilizado	Produto
Alimentício	Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos lácteos
	Panificação	Melhoramento do sabor/qualidade, prolongamento do tempo de prateleira	Confeitos e bolos
	Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação por remoção de lipídeos	Bebidas alcoólicas
	Processamento de derivados do ovo	Desenvolvimento de aroma e remoção de excesso de gorduras	Maionese, molhos e cremes
	Processamento de carne e peixe	Transesterificação de óleos naturais	Produtos embutidos
	Processamento de Óleos	Hidrólise de óleos (ac. Graxos) , diglicerídeos e monoglicerídeos.	Óleos e gorduras modificadas
Químico	Química Fina	Síntese de ésteres	Ésteres
	Detergentes	Remoção de manchas de óleo e gorduras	Detergentes
	Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos
	Analítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico
	Cosmético	Remoção de lipídeos	Cosméticos em geral
	Curtume	Remoção de gorduras das peles dos animais	Produtos de couro
	Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpeza de tubulação, tratamento de efluentes e outros, em combinação com outras enzimas

Outros exemplos podem ser encontrados na literatura como Gatfield (1986) que realizou a síntese enzimática de aroma de uma mistura de ésteres de etila a partir de gordura de manteiga usando a lipase de *Candida cylindracea*. Ambas as gorduras de manteiga hidrolisada e não hidrolisada sofreram considerável esterificação com etanol na presença da lipase.

A lipase extraída do microorganismo psicrotrófico, *Pseudomonas fluorescens* P38 foi capaz de realizar a síntese do éster de aroma caprilato de metila em baixas temperaturas (TAN; APENTEN, 1995).

Segundo Macedo (1997), a lipase de *Rhizopus sp.* apresenta grande habilidade em esterificar o álcool citronelol, principalmente na síntese de ésteres de baixa massa molar, empregados como formadores de aroma em alimentos, tais como acetato e butirato de citronelila.

O âmbito para a aplicação de lipase na indústria oleoquímica é enorme. Óleos e gorduras são produzidos no mundo a uma escala de aproximadamente 60 milhões de toneladas por ano e uma substancial parte (2 milhões por ano) são utilizadas em processos que consomem uma grande quantidade de energia como hidrólise, glicerólise e alcoólise (Hasan *et al.*, 2006).

Uma aplicação que tem merecido destaque é a utilização de lipases na obtenção de fármacos ou insumos farmacêuticos em suas formas enantioméricas ativas com elevada pureza ótica, pois estas enzimas são capazes de reconhecer moléculas quirais e atuam, preferencialmente, em um dos isômeros de uma mistura racêmica. É conhecido que alguns fármacos são produzidos e comercializados na sua forma racêmica, e que a atividade biológica depende, em muitos casos, de sua configuração absoluta. Normalmente um dos isômeros (R ou S) apresenta atividade biológica, enquanto o outro é menos ativo ou até mesmo tóxico (Hasan *et al.*, 2005).

A hidrólise seletiva da gordura do leite é outro exemplo de aplicação potencial de lipases. Segundo Balcão e Malcata (1998), o declínio do consumo per capita de gordura de leite em diversos países e a demanda por leite e derivados com menor teor de gordura têm aumentado a necessidade e o interesse do setor industrial em encontrar alternativas para o uso desta gordura. Neste caso, a lipase é responsável pela formação do aroma distinto no preparo de queijos do tipo Cheddar, para produzir substitutos de manteiga, aroma de queijo e outros aditivos usados na manufatura de cereais, molhos, aperitivos e

assados em geral e bolos. A adição desses hidrolisados aos alimentos confere uma variedade de efeitos sensoriais e é dependente da quantidade empregada (Balcão; Malcata, 1998). Em níveis baixos, nenhum aroma de ácido graxo livre no alimento é detectável, ocorrendo apenas um enriquecimento característico no aroma; conforme essa concentração é aumentada, um aroma semelhante à manteiga começa a ser detectado e, em presença de elevados níveis, o aroma sugere queijo. As características dos hidrolisados dependem da fonte da lipase utilizada, sendo adequadas as enzimas oriundas do leite (lipase lipoprotéica), pâncreas (lipase pancreática), fungos (*Aspergillus niger*, *Geotrichum candidum*, *Penicillium roqueforti*), bactérias (*Achromobacter lipolyticum*, *Pseudomonas fluorescens*) e trato gastrointestinal (Balcão; Malcata, 1998).

Como os microorganismos usados para obtenção de enzimas devem ser seguros para produção de alimentos, normalmente é possível comercializar misturas de enzimas que não foram extremamente purificadas (em outras palavras, a purificação para remover impurezas e compostos indesejados é desnecessária); por exemplo, uma companhia pode vender um produto caracterizado como “protease” que, na verdade, contem um número de proteases diferentes, frequentemente produzidas pelo mesmo microorganismo. Misturas de enzimas relacionadas são comumente úteis, porque muitas aplicações de enzimas são descobertas em experimentos empíricos. Na maioria dos casos, o mecanismo exato da ação da enzima é desconhecido, tornando difícil a determinação da função específica das enzimas.

Por esta razão, as companhias preferem vender enzimas como “categorias” (por exemplo, proteases) a produzir enzimas específicas. Isto diminui o custo da produção da enzima sem comprometer a qualidade ou segurança (Johnson-Green, 2002).

A quantidade de companhias que comercializam enzimas está próximo do milhar, em contrapartida o número de produtores é muito inferior. Ao todo, nos Estados Unidos e parte oeste da Europa, existem somente cerca de 30 indústrias produtoras de enzimas. Muitos produtores são do ramo da indústria químico-farmacêutica, para os quais o lucro proveniente da comercialização das enzimas desempenha um papel pouco significativo no seu faturamento global. Cerca de 90% da produção anual derivam das maiores empresas

produtoras de enzima, como Novozymes com sede na Dinamarca; Gist Brocades, na Holanda; Amano, no Japão; Solvay, Pfizer e Genencor, nos Estados Unidos (Castro; Mendes; Santos, 2003).

A Tabela 2 apresenta algumas lipases comerciais disponíveis no mercado.

Tabela 2 - Algumas lipases comerciais disponíveis e suas aplicações industriais. (Adaptado de Houde *et al.*)

Indústria	Aplicação	Nome Comercial	Fornecedor
Lácteos		Lipase A "Amano" 6	Amano
		Lipase M "Amano" 10	Amano
		Lipase F-AP15	Amano
		Lipase AY "Amano" 30	Amano
		Lipase G "Amano" 50	Amano
		Piccnate	Gist-Brocades
	EMC (enzyme-modified cheese - aroma cheddar)	Lipomod 187P	Biocatalysis
	EMC	Lipomod 224P	Biocatalysis
	EMC	Lipomod 338P	Biocatalysis
	EMC	Lipomod 34P	Biocatalysis
	EMC	Lipomod 621P	Biocatalysis
	EMC	Lipomod 29 P	Biocatalysis
Intensificação de aroma de queijo	Palatase	Novozymes	
Óleo e Gordura		Lipase A "Amano" 6	Amano
		Lipase M "Amano" 10	Amano
		Lipase G "Amano" 50	Amano
		Lipase F-AP15	Amano
		Lipase AY "Amano" 30	Amano
		Newlase F	Amano
	Interesterificação de óleo vegetal	Lipozyme TL IM	Novozymes
Farmacêutico	Ingrediente Farmacêutico	Lipozyme TL IM	Novozymes
	Síntese de compostos quirais	Lipase MY	Meito Sangyo
	Síntese de compostos quirais	Lipase ALC, ALG	Meito Sangyo

	Síntese de compostos quirais	Lipase PLC,PLG, QLC, QLG	Meito Sangyo
	Síntese de compostos quirais	Lipase AK “Amano”	Amano
Detergente		Lipolase, lipolase ultra, Lipo Prime, Lipex	Novozymes
Assados	Melhora da textura e cor da massa	Lipomod 657P	Biocatalysts
	Emulsificante	Lipopan F	Novozymes
Couro	Calagem	NovoLime	Novozymes
	Dispersão da gordura	GreaseX, NovoCor AD	Novozymes
Cosmético	Produção de miristato de isopropila	Novozym 435	Novozymes
Alimentos	Melhoria na qualidade de macarrão e de massas alimentícias a base de trigo	Noopazyme	Novozymes
	Suplemento Alimentar	Lipase L036P	Biocatalysts
		Lipase F-DS	Amano
		Lypolyve NA, CC	Lyven

II.2. Fermentação submersa

II.2.1. Definição

A fermentação submersa (FS), que tem como característica principal a utilização de um meio fermentativo líquido com nutrientes solúveis, é o processo mais utilizado para a produção de lipases (Martins, 2001; Alonso, 2001).

Cada microorganismo pode responder de forma diferente ao mesmo meio ambiente, assim como condições ambientais adversas podem causar alterações no comportamento (metabolismo, eficiência de produção, etc.) de uma mesma cepa microbiana.

A FS tem como vantagens a facilidade de controle de parâmetros como aeração, agitação, pH, temperatura e a possibilidade de automação. Há maior probabilidade de contaminação, pela maior quantidade de água, o que é um inconveniente do processo. Outra limitação é quando a enzima produzida é

extracelular, obtendo-se uma preparação mais diluída, sendo necessária a inclusão de uma etapa de concentração, mais trabalhosa no processo de purificação (Alonso, 2001).

O sistema de produção de lipases por FS pode ser realizado em frascos agitados, fermentadores de bancada ou fermentadores em escala industrial. O processo em batelada é o mais utilizado na produção de enzimas lipolíticas, devido ao seu baixo custo, porém necessita de uma maior vigilância operacional para assegurar a reprodutibilidade e constância das propriedades do produto.

II.2.2. Parâmetros da Fermentação Submersa (FS)

Os parâmetros da fermentação submersa envolvem desde a escolha do microorganismo até as condições do meio (fonte de carbono e nitrogênio) e condições operacionais (pH, temperatura, agitação e aeração).

Uma grande variedade de microorganismos tem habilidade de produzir lipases. No entanto, do ponto de vista industrial, os fungos são os preferidos como fontes de lipases, pois as enzimas produzidas por eles geralmente são extracelulares, facilitando a sua extração do meio fermentado e também por serem considerados microorganismos seguros para aplicação na indústria de alimentos, bebidas e farmacêutica, pois não são nocivos a saúde (Burkert, 2002).

Com relação à melhor formulação de meio de cultivo para produção de lipases fúngicas, regras gerais não têm sido reportadas, mas podem ser detectadas diversas tendências, comuns a muitos trabalhos.

A produção de lipases fúngicas requer altas concentrações de fontes de nitrogênio, quando comparada à produção de outras enzimas. Dentre as principais fontes citadas na literatura, a peptona vem sendo a mais utilizada. Essa fonte é usualmente adicionada na faixa de 1 a 7%(p/v) ao meio de fermentação. O extrato de levedura também vem sendo empregado como fonte única de nitrogênio, ou complementando um meio contendo peptona, em níveis de adição que variam de 0,1 a 1%(p/v) (Castilho *et al.*, 2000).

A maioria dos microorganismos produtores de lipases necessita de um indutor para promover a síntese enzimática, podendo este ser um triglicerídeo, um éster ou um ácido graxo, que pode ser adicionado ao meio com única fonte

de carbono ou em adição a carboidratos, em concentrações reduzidas. O meio de cultivo utilizado para produção é em geral complexo (sintético ou natural), adicionado de indutores, muito freqüentemente o óleo de oliva (Castilho *et al.*, 2000).

Em relação ao pH, em geral, a produção máxima de enzimas ocorre quando o pH atinge valores entre 7,0 e 8,0 (Castilho *et al.*, 2000).

Em relação à temperatura, a fermentação é normalmente realizada na faixa de 22 a 30°C (Castilho *et al.*, 2000).

A produção de lipases de *Aspergillus niger* J-1 foi testada por Falony *et al.* (2006) usando a fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES), em um meio de cultura mineral constituído de farelo de trigo. A otimização do meio de cultura foi realizada para FS e FES. A atividade máxima do lipase, 1,46 U/mL, foi obtida durante a fermentação submersa em um meio contendo glicose a 2% (p/v) e óleo de oliva a 2% (p/v), em condições de 1vvm de fluxo de ar e 450 m⁻¹ de taxa de agitação. 4,8 U/mL de atividade lipolítica foram alcançados usando o processo de fermentação em estado sólido com um meio que continha 0,75% (p/v) de sulfato de amônia e 0,34% (p/v) de uréia. O pH e temperatura ótimos para a atividade enzimática foram pH 6 e 40°C, sendo que a enzima apresentou 80% de sua atividade em meio neutro em temperaturas entre 20 e 30°C por um período de 24h.

A produção e algumas propriedades de lipase extracelular de *Penicillium citrium* foram investigadas por Burkert (2002). A lipase extracelular foi produzida em meio de cultivo basal contendo 2% (p/v) de amido, 0,5% (p/v) de (NH₄)₂SO₄, 0,0255% (p/v) de MgSO₄.7H₂O, 0,5% (p/v) de CaCO₃, 0,05% (p/v) de K₂HPO₄, 0,1% (p/v) de extrato de levedura e 5% (p/v) de peptona a 2% (p/v) e 122 rpm, e sua produção foi aumentada seis vezes, alcançando 4,776U/mL em 168 horas de fermentação, com a adição de 0,1% (p/v) de óleo de oliva. Várias gorduras foram testadas como suplementos, sendo que a tributirina foi o melhor substrato para a produção desta lipase. A atividade ótima ocorreu em pH 7,2 a 30°C, sendo a enzima estável na faixa de pH 5-7 e numa faixa de temperatura de 10 a 40°C.

A produção de lipase por um mutante de *Aspergillus niger* NCIM 1207 em fermentação submersa foi testada por Mahadik *et al.* (2004). O mutante UV-

10 cultivado em frascos agitados duplicou a produtividade da enzima quando acrescidos de 1% (p/v) de óleo de oliva.

Sanromán & Couto (2006), em seu estudo para a produção de lipase extracelular pelo fungo *Fusarium solani* FS1 em fermentação submersa, utilizaram como meio basal: 1,0 g/L de KH_2PO_4 ; 7 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 3 g/L de NaNO_3 e 30 g/L de peptona, sendo suplementado com diferentes fontes de carbono (glicose, óleo de oliva e peptona). O fungo produziu 10.500 U/L de lipase após 72h de incubação a 25°C e agitação de 120 rpm em meio contendo 3% (p/v) de peptona e 0,5% (v/v) de óleo de oliva. Já a glicose (1% p/v) inibiu o efeito estimulador do óleo de oliva.

DIAZ *et al.* (2006), obtiveram uma atividade específica de 203 U/g, no seu estudo de produção de lipase pelo fungo termotolerante *Rhizopus homothallicus* em fermentação submersa com condições iniciais: 40° C, agitação de 170 rpm, pH de 6,5 e utilizando como meio de cultura: 40 g/L da água de maceração do milho; 10 g/L de peptona; 14 g/L de KH_2PO_4 ; 2,4 g/L de K_2HPO_4 ; 0,4 g/L de MgSO_4 .

Gordillo *et al* (1998), estudaram a produção de lípase por *Candida rugosa*. Os valores de rendimento da produção da enzima foram ótimos quando a concentração de ácido oléico (fonte de carbono) foi de 2 g/l. A taxa de crescimento máximo foi de 0,15 h⁻¹, com um rendimento de 0,85 g de biomassa/ g ácido oléico.

II.2.3. Ampliação de Escala

A técnica de fermentação submersa possui relativa facilidade de cultivo em larga escala, já que garante homogeneidade do meio e facilidade no controle dos parâmetros como pH, temperatura, aeração, umidade e concentração de oxigênio dissolvido no processo, principalmente se monitorados por sensores adequados (Sanromán & Couto, 2006). Possui ainda ampla utilização na indústria, e é altamente difundida na produção de enzimas, desde o início do século passado. O processo em batelada é o mais utilizado pois evita desperdícios se monitorado constantemente (Burkert,2002).

II.3. Fonte de Carbono

O carbono é o principal componente da célula e algumas gorduras ou óleos têm sido utilizados como fonte de carbono e indutores da produção da lipase por microorganismos (Tan *et al.*, 2003). A presença da lipase permite ao microorganismo utilizar lipídeos de fonte animal e vegetal como fonte de carbono e energia para o seu crescimento (Hadeball, 1991).

A produção de lipase é necessariamente afetada pela fonte de carbono no meio de cultura. Como substrato para a produção de lipase e crescimento microbiano, as fontes de carbono mais usuais são os carboidratos, os ácidos orgânicos, os gliceróis, outros alcoóis e ácidos graxos (Hadeball, 1991).

Meios de cultura líquidos suplementados com concentrações fixas de vários compostos lipídicos têm sido empregados na obtenção de um rendimento elevado de lipase. A atividade lipásica tem sido detectada em meio de cultura que contém substratos lipídicos (óleo de oliva, ácido oléico, tributirina e óleo de soja), o que sugere que a enzima seja induzida por esses substratos (Shirazi *et al.*, 1998; Deive *et al.*, 2003).

Substratos lipídicos e seus metabólicos (ácidos graxos de cadeia longa) participam da síntese de lipase. Outros substratos, não relacionados à gorduras e óleos, como os carboidratos, propiciam bom crescimento celular, mas não são bons para síntese de lipase, enquanto os substratos lipídicos, principalmente os ácidos graxos, são excelentes indutores de lipase (Lotti *et al.*, 1998; Dalmau *et al.*, 2000).

Quando o óleo de oliva é a única fonte de carbono, o microorganismo utiliza - o de modo seqüencial. Inicialmente o óleo de oliva é hidrolisado por uma pequena quantidade de lipase proveniente do próprio inóculo do microorganismo em glicerol e ácidos graxos livres. Em seguida o microorganismo consome o glicerol liberado, ainda sem a produção da lipase. Finalmente, os ácidos graxos livres são consumidos com a indução da produção de uma quantidade significativa de lipases (Montesino *et al.*, 1996).

A fonte de carbono pode estimular ou inibir a síntese de lipase. Além disso, existem outros compostos que podem influenciar a produção de lipase por leveduras (Hadeball, 1991). A levedura *C. rugosa* consegue sintetizar a lipase mesmo sem a presença de um indutor, mas em menor quantidade

quando comparada à presença desta fonte de carbono como indutor (Lotti *et al.*, 1998).

O ácido oléico é conhecido como indutor e a glicose como repressora da síntese de lipase. No estudo realizado por Obradors e colaboradores (1993), o ácido oléico foi selecionado entre outros ácidos graxos com diferentes tamanhos da cadeia carbônica, já que se obteve eficiente rendimento de biomassa e de produção de lipase.

O óleo de oliva contém cerca de 70% de ácido oléico (C18:1) e é comumente utilizado com um substrato padrão para determinação da atividade lipolítica. Montesino e seus colaboradores (1996) confirmaram que o ácido oléico, resultante da hidrólise do óleo de oliva, é o principal indutor da produção de lipase.

A produção de lipase pela *C. rugosa* tem sido realizada, em geral, com misturas de fontes de carbono diferentes, geralmente açúcares (sacarose e glicose) e lipídeos (óleos vegetais, ácidos graxos), para se obter bom crescimento microbiano e a indução de produção da enzima (Montesino *et al.*, 1996).

II.4. Purificação

A purificação de lipases tem, em geral, dois objetivos básicos: (a) obtenção da enzima virtualmente pura, para melhor estudo de suas características bioquímicas e de sua estrutura e (b) obtenção de um produto com maior atividade específica (unidades de atividade/mg de proteína) para aplicação em diversos processos. Entretanto, processos de purificação costumam elevar grandemente o preço do produto final. Normalmente os protocolos de purificação de enzimas microbianas extracelulares são separados em duas etapas: pré-purificação e purificação por métodos cromatográficos.

Na purificação de lipases são aplicados principalmente três tipos de colunas cromatográficas: colunas de troca iônica, colunas de interação hidrofóbica e colunas de permeação em gel. Além destas são também utilizadas colunas de bioafinidade e colunas de adsorção inespecífica – empacotadas com hidroxapatita, por exemplo.

Como regra geral a maioria dos protocolos de purificação de lipases segue a seguinte lógica: nos primeiros passos de purificação são utilizadas colunas com grande capacidade de troca e baixo custo. Estão aí incluídas as resinas de troca iônica e de interação hidrofóbica. Estas últimas têm sido aplicadas com excelentes resultados na purificação de lipases e apresentam a vantagem adicional de dispensarem diálise de extratos precipitados pela adição de sais. Nas etapas finais de purificação em geral são aplicadas colunas de filtração em gel que garantem a remoção de agregados e produtos de degradação sofrida pela enzima ao longo do processo de purificação. Entretanto, este tipo de cromatografia fatalmente irá provocar a diluição do produto final, exigindo uma etapa de concentração posterior, como a liofilização (Koblitz and Pastore, 2004).

II.5. Avaliação Econômica de Processos

Ao se ter um processo produtivo, deve-se realizar um estudo da viabilidade econômica para qualquer que seja o produto em questão, pois, apesar de não ser suficiente para a implantação do processo, é uma condição necessária. Esse estudo leva em conta as condições materiais, como existência e disponibilidade dos recursos materiais utilizados no processo; econômicas, que remetem à capacidade de gerar lucro, recompensando os investidores em um dado momento; e sociais, como a existência de uma mão-de-obra necessária no processo.

Para fazer uma avaliação econômica de um processo, é necessário estimar os custos das operações e os investimentos envolvidos na cadeia produtiva, fazer uma análise da lucro obtido com a venda do produto e avaliar os indicadores de atratividade de investimento, tendo como base o fluxo de caixa previsto para o empreendimento.

Este tipo de análise pode ser feita com diferentes propósitos em diferentes níveis do desenvolvimento de um empreendimento, e quando ainda se é necessário uma maior precisão na estimativa do fluxo de caixa, deve-se detalhar mais o projeto.

II.5.1. Custos de Operação

Qualquer que seja o tipo de projeto em desenvolvimento é necessário estimar os custos de diversas naturezas. Como indicado por Chauvel *et al.* (2001), os custos de operação em um processo podem ser classificados em três categorias:

- Custos variáveis: diretamente proporcionais à produção da planta existente, e não à capacidade instalada de produção. Nesta categoria, encontram-se: custo de matéria-prima e utilidades, custos devido a subprodutos pouco importantes para o mercado.
- Custos fixos: proporcionais à capacidade instalada da planta, mas independentes da produção em si. Nesta categoria, encontram-se: custos de manutenção, custos administrativos, depreciação dos equipamentos e seguro das instalações.
- Mão-de-obra: se houver uma parada de emergência da planta, os custos variáveis iriam cessar. Porém, os custos de mão-de-obra continuariam inalterados. Tendo isto em vista, o custo de mão-de-obra não pode ser considerado como um custo variável e diretamente proporcional ao nível da produção.

Na Figura 1 abaixo, se observa uma distribuição típica de custos em uma planta industrial.

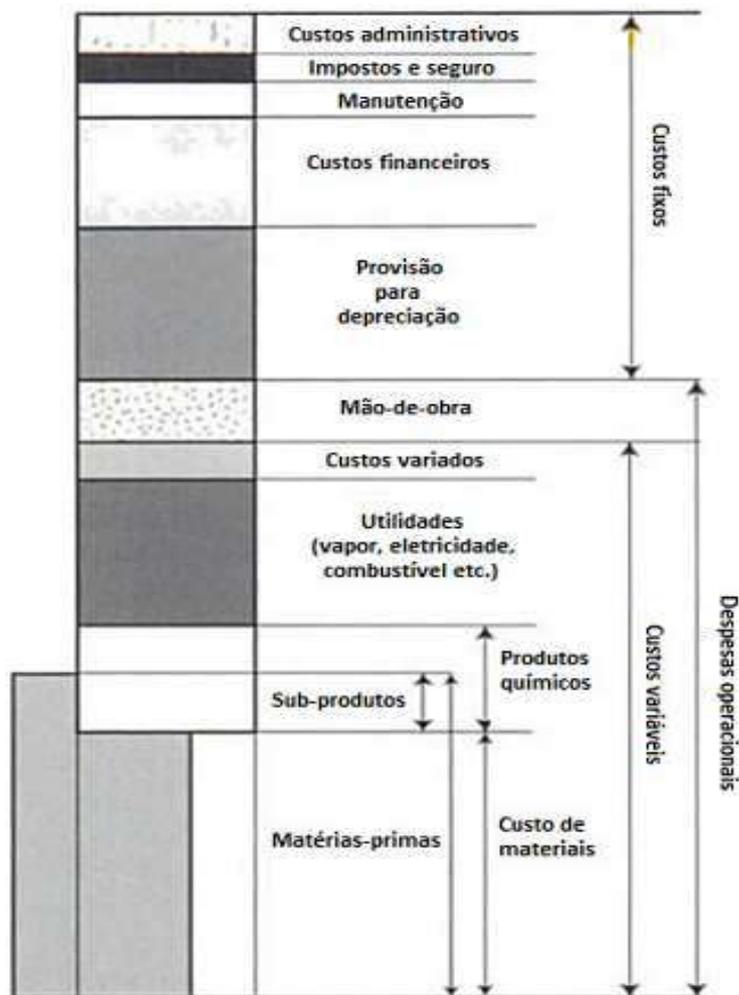


Figura 1 - Distribuição de custos em uma planta industrial (Peters e Timmerhaus, 1991).

II.5.2. Investimento

Os investimentos feitos numa planta industrial podem ser classificados em diferentes tipos de acordo com sua natureza. Chauvel *et al.* (2001), sugerem a seguinte classificação:

- Investimentos nas unidades produtivas (*inside battery limits* – ISBL): estritamente referente aos investimentos feitos nos componentes produtivos do complexo manufatureiro, como as fundações e estruturas necessárias para o funcionamento e as máquinas e equipamentos do processo.
- Investimento em serviços gerais e armazenamento (*outside battery limits* – OSBL): referente a diversos equipamentos e instalações que

contribuem de maneira indireta para o processo produtivo. Exemplo: unidades de geração de utilidades, tratamento de efluentes e tancagem.

- Capital fixo: referente aos custos de engenharia, peças de reposição, honorários da empreiteira e investimentos em unidades (ISBL e OSBL).
- Capital depreciável: referente ao capital fixo somado aos custos de partida, das cargas iniciais, dos juros vindos do empréstimo para a construção.
- Capital de giro: referente ao investimento temporário da operação da planta que, ao contrário dos outros, não sofre depreciação e pode ser vendido após um determinado tempo sem perda financeira (sem levar em conta mudanças no valor dos itens a serem vendidos e possíveis desvalorizações monetárias). Exemplo: estoque de matéria-prima e produtos químicos.

Na Figura 2 a seguir observa-se uma distribuição típica dos investimentos em uma planta industrial.

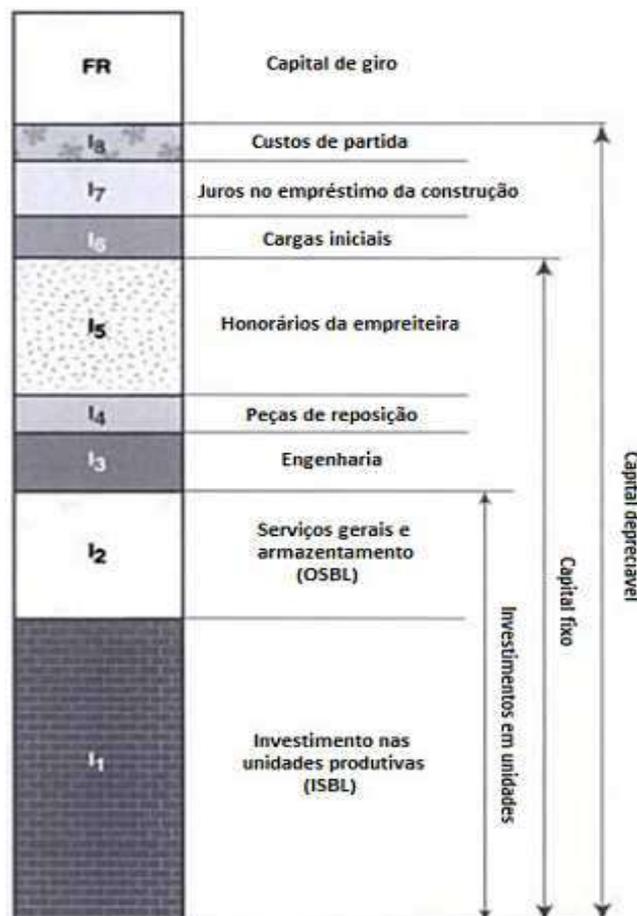


Figura 2 - Distribuição de investimentos em uma planta industrial (Peters e Timmerhaus, 1991).

Sabendo que as estimativas que são feitas referente ao capital necessário para os investimentos podem sofrer variações em relação ao nível do detalhamento necessário e oferecem diferentes precisões, Peters e Timmerhaus (1991) sugerem a seguinte classificação:

- Estimativa de ordem de magnitude, baseada em dados de custo anteriores; com erro provavelmente maior que $\pm 30\%$
- Estimativa de estudo, baseado no conhecimento dos principais custos de equipamentos; com erro provavelmente até $\pm 30\%$
- Estimativa preliminar, baseado em dados suficientes para que se possa fazer um orçamento; com erro provavelmente dentro de $\pm 20\%$
- Estimativa definitiva, baseado em dados quase completos, mas antes das especificações e dos desenhos dos equipamentos; com erro provavelmente dentro de $\pm 10\%$
- Estimativa detalhada, baseada em desenhos completos de engenharia e especificações; com erro provavelmente dentro de $\pm 5\%$.

II.5.3. Custos de Equipamentos

Entende-se por custos o consumo de bens e serviços, traduzidos em dinheiro, para o fornecimento de produtos. São determinados para um período de tempo ou para uma quantidade.

Os equipamentos se enquadram nos custos fixos de uma empresa, e independem da quantidade produzida. No equipamento ainda cabe calcular a amortização da depreciação e a manutenção que este equipamento recebe.

Para fins práticos é possível estimar o custo de um equipamento de determinada capacidade conhecendo o custo e a capacidade de um equipamento similar através da aplicação de uma equação (Equação 1) de ajuste de capacidade:

$$C_2 = C_1 \times (Q_2/Q_1)^f \quad \text{Equação 1}$$

Onde: C se refere ao custo, Q à capacidade, o sub-índice 1 se refere ao equipamento conhecido e 2 se refere ao equipamento a ser determinado. "f" é um fator que pode ser ajustado para um determinado tipo de equipamento de uma determinada indústria, baseando-se em dados de plantas existentes. É possível encontrar para f desde valores menores do que 2 e valores maiores do

que 1.0. Quando este fator é desconhecido, utiliza-se o valor médio de 0.6 como estimativa – por esta razão esta regra de escalonamento é conhecida como “regra dos seis décimos”.

Durante uma estimativa de investimento torna-se necessário ajustar preços praticados no passado para o presente, principalmente em função da variação de preços de materiais e custo do trabalho associado à instalação do equipamento. O uso de índices de custo é feito através do uso de índices de preço (Equação 2):

$$C_2 = C_1 \times (I_2/I_1) \quad \text{Equação 2}$$

Neste caso, C se refere ao custo, I ao valor do índice, 1 ao primeiro momento considerado e 2 ao segundo momento considerado. Diversas entidades publicam índices regularmente (usualmente anualmente) podendo se referir a diferentes indústrias, tipos de equipamentos ou itens de custo. No entanto, nenhum índice é capaz de levar em conta todos os fatores possíveis. Índices importantes no contexto são o *Marshall and Swift all industry index* e o *Chemical Engineering cost index*. (Peters e Timmerhaus ,1991)

II.5.4. Indicadores de Lucratividade

São vários os parâmetros utilizados para verificar a lucratividade ou atratividade financeira de uma empresa ou projeto. Quando o assunto é a quantidade de indicadores que são necessários para uma boa análise não é necessária uma grande quantidade de indicadores, mas sim um conjunto de índices que possibilite uma boa visão sobre a empresa.

Os índices de lucratividade analisados isoladamente trazem utilidade de informação reduzida. É preciso analisá-los em conjunto com os demais índices (liquidez, endividamento e atividade). Uma empresa pode apresentar, em determinado período, um bom índice de lucratividade mas, ao mesmo tempo, pode apresentar sérios problemas de liquidez.

Liquidez é a medida da capacidade da empresa para honrar suas obrigações financeiras em seus prazos de vencimento. Mas, para manter o capital de giro suficiente para o pagamento dessas despesas esta, nem sempre, é a melhor saída. Quanto maior o capital de giro, maior o volume do capital que está sendo utilizado, o que significa que os lucros terão de ser

proporcionalmente maiores para produzir o mesmo (ou maior) retorno do capital empregado.

Abaixo alguns indicadores importantes:

- Porcentagem da margem de lucro bruta: Deduzir o custo de produção da receita bruta e então expressar esse resultado em porcentual da receita.

$$\text{Receita} - (\text{Mão de obra e material ou CMV}) = \text{Lucro bruto}$$

Quanto mais alto esse índice, maior o valor agregado aos produtos ou aos serviços oferecidos.

$$\text{Margem bruta} = \text{lucro bruto} / \text{receita} \times 100$$

- Retorno sobre investimento (*return on investment – ROI*): é definido como a relação entre lucro obtido e o capital investido.
- Tempo de retorno de investimento (*payback time ou payback period*): é o tempo necessário para que o lucro líquido acumulado (soma dos lucros líquidos no tempo) se iguale ao investimento inicial. Não considera, em sua definição, os efeitos dos juros ou a distribuição dos lucros líquidos no tempo.
- Valor presente líquido (*Net Present Value – NPV*): é definido pela fórmula $\text{NPV} = \sum \frac{R_t}{(1+i)^t}$ ou seja, o NPV é a soma dos valores presentes dos fluxos de caixa anuais (*Cash Flow* nos tempos t) descontados de uma taxa de juros (i), e é denominada taxa de desconto até o período de fim de vida do empreendimento (R_t).
- Taxa interna de retorno (*Internal Return Rate – IRR*): é definida como a taxa que, utilizada na equação do NPV em substituição ao custo de capital, torna o NPV nulo no final de tempo de vida do empreendimento. A IRR deve ser comparada com uma taxa de atratividade mínima para que se possa avaliar quão interessante é investir no empreendimento.

II.6. Software SuperPro Designer

De acordo com Perlingeiro (2005) o problema para determinar a solução ótima de um projeto economicamente viável pode ser decomposto em três subproblemas: tecnológico (materiais envolvidos), estrutural (operações) e paramétrico (objetivo).

Devido ao grande número de soluções possíveis a um processo de otimização, uma ferramenta computacional é utilizada para gerar a resposta ao problema proposto, levando em consideração todas as variáveis inerentes ao processo.

Com o auxílio do software SuperPro Designer, um simulador de processos desenvolvido pela Inteligen Inc, é possível obter a solução ótima do processo de fermentação submersa, além das diversas soluções economicamente viáveis.

As características mais importantes do programa são a presença de mais de 140 operações unitárias, a possibilidade de simular operação em batelada e a ferramenta de análise econômica embutida. Essa última é de extrema importância para verificar a viabilidade de um projeto, passando da escala laboratorial e piloto para a planta industrial.

Capítulo III. Objetivos

O presente trabalho pretende contribuir para o desenvolvimento de um processo industrial de produção de lipase a partir da fermentação submersa por *Candida rugosa* e avaliar sua viabilidade do ponto de vista econômico.

Para tanto, foi necessário: avaliar em escala de bancada parâmetros do processo que permitam seu entendimento visando o balanço material de uma planta de escala industrial, propor um fluxograma do processo em batelada que represente o funcionamento de uma planta hipotética do processo, dimensionar equipamentos da planta e fluxos materiais necessários para o seu funcionamento e estimar custos de investimento e custos operacionais relativos ao processo, derivando destas estimações uma avaliação quanto à viabilidade econômica do processo.

Capítulo IV. Materiais e Métodos

Para a simulação de uma planta de produção de lipases por FS, se fez necessária a determinação de alguns parâmetros que são característicos deste processo.

Os parâmetros utilizados nesta primeira etapa de experimento, foram selecionados com base na bibliografia pesquisada sobre produção de lipase por leveduras por fermentação submersa (María *et al* 2006; Dalmau *et al* 2000 e Amaral *et al* 2006).

A maioria destes parâmetros está relacionada diretamente com a fermentação e os produtos gerados, tais como a quantidade de biomassa, a atividade enzimática obtida, o tempo de processo, entre outros.

Após a determinação dos parâmetros do processo, foi realizada uma busca pelos parâmetros econômicos necessários, como preços dos insumos, preço de venda do produto final e de subprodutos, equipamentos e etc.

Finalmente, de posse de todos os dados necessários, a síntese do processo e a avaliação econômica puderam ser realizadas.

A Figura 3 a seguir exemplifica a metodologia adotada neste trabalho.

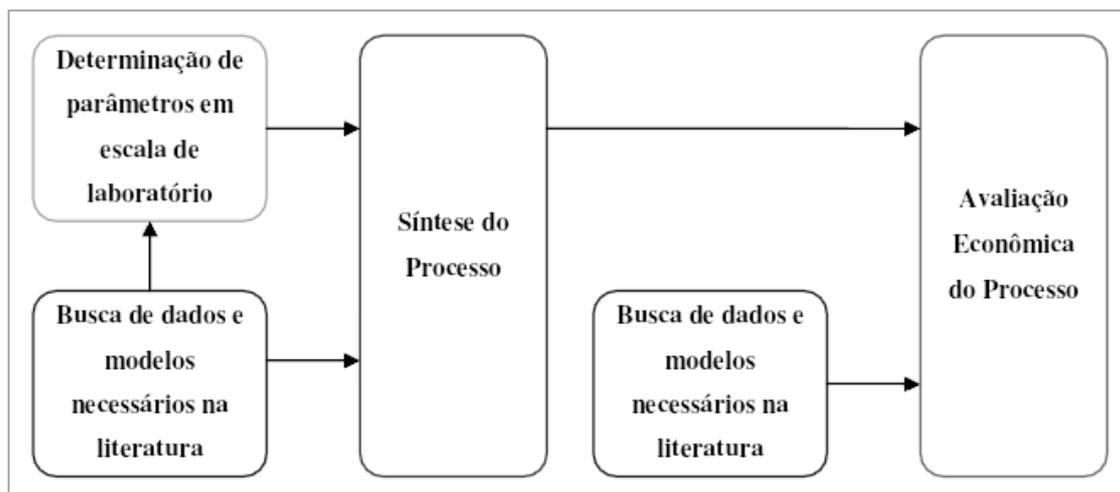


Figura 3 - Metodologia do trabalho

IV.1. Parte Experimental

Toda parte experimental foi obtida do trabalho de Melo (2010), e os resultados foram usados para fazer a simulação no programa SuperPro Designer, em escala industrial.

IV.1.1. Matéria Prima

A matéria prima escolhida como fonte de carbono para o processo de fermentação foi o ácido oléico, devido ao fato de ser uma ótima fonte de carbono para o crescimento celular, como visto na literatura, além da sua grande oferta no mercado devido aos seus diversos usos e benefícios.

Os componentes dos meios de cultivo e de preservação utilizados foram: glicose e agar-agar (Vetec), extrato de malte (SIGMA), peptona e extrato de lêvedo (Bacto™).

IV.1.2. Microorganismo

O microorganismo utilizado foi uma cepa de *Candida rugosa* NRRL Y-95 / NRRL Y-1496, cedida pelo ARS Collection.

As células foram conservadas a 4°C após 72 horas de crescimento em tubos de ensaios contendo meio de cultivo MYPD (“Malte Extract, Yeast Extract, Peptone, Dextrose”) (em p/v): extrato de lêvedo 0,3%, extrato de malte 0,3%, peptona 0,5%, glicose 1% e Agar-agar 2% (Melo, 2010).

IV.1.3. Cultivo

IV.1.3.1. Preparo do Inóculo

No ensaio de Melo (2010), a partir dos tubos contendo as células preservadas em meio sólido, estas foram inoculadas, de forma estéril com uma alça de platina, em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultivo YMPD. Os erlenmeyers foram colocados em um incubador rotatório a 27°C, 150 rpm, e após cerca de 70 horas, a absorvância de 1mL da amostra deste cultivo foi determinada a 600 nm, em espectrofotômetro e, em seguida as células foram centrifugadas de forma estéril a 3.000 g por 10 minutos e ressuspensas em 10 mL de meio de cultivo servindo de inóculo para os experimentos descritos nos itens posteriores. O volume centrifugado desse pré-inóculo foi suficiente para se obter uma concentração inicial de células de, aproximadamente, $1,0 \pm 0,1$ mg p.s. cel/mL de meios de cultivo.

IV.1.3.2. Experimentos para Produção de Lipase.

Paras os testes iniciais para produção de lipase por fermentação submersa foi utilizado o planejamento experimental realizado por Melo (2010), visando determinar as melhores concentrações dos componentes selecionados

para produção da enzima lipase. Neste planejamento foi feito um delineamento fracionário 2^{5-1} com 3 pontos centrais, realizados em triplicata a fim de estimar o erro experimental.

Os resultados encontrados por Melo (2010) em % p/v foram: extrato de levedura 0,5% , extrato de malte 0,9% , peptona 1,5% , ácido oléico 1,5% e tween 80 1,0% ; servindo de base para a estimativa inicial da quantidade dos componentes do meio a serem utilizados no projeto.

Todos os componentes do meio de cultivo foram autoclavados a 0,5 atm por 15 minutos, sendo então necessária etapa de esterilização do meio ao simular o processo industrial.

IV.2. Síntese do Processo

O fluxograma do processo foi desenvolvido com base nas operações previstas para a produção e purificação da lipase no trabalho experimental de Melo (2010), além do auxílio encontrado na literatura em Zhuang (2006), Ramirez *et al* (2009) e no site do fornecedor do programa SuprePro Designer utilizado na simulação do processo (<http://www.intelligen.com/literature.shtml>).

Para condições e parâmetros não encontrados na literatura ou de difícil medida, foi utilizado o modelo default do programa, que consiste em valores pré-estabelecidos e arquivados na base de dados do próprio programa. Esse é um modelo que pode ser usado em situações genéricas de simulação.

IV.2.1. Operações e Equipamentos

A Tabela 3 abaixo contempla os equipamentos utilizados no processo e suas respectivas funções.

Tabela 3 - Equipamentos do processo

Legenda	Equipamento	Operação
PRO1	Propagação Inóculo	Preparação do meio
EST1	Esterilizador	Esterilização do meio
FER1	Fermentador principal	Fermentação
HG1	Homogenizador	Homogenização do meio
DEC1	Decantador	Separação da enzima
CEN1	Centrífuga	Etapa de separação

PPS1	Precipitação Salina	Etapa de separação
COL1	Coluna de troca iônica	Troca Iônica- Purificação Enzima
SEC1	Secador Produto	Concentração Produto

IV.2.2. Balanço de Massa

O balanço de massa visa obter a conversão da matéria prima em biomassa e produtos, além de fornecer dados das reações intermediárias e dos equipamentos.

Os gases de emissão foram desconsiderados no balanço total visto que não há grande impacto na reação global.

IV.2.2.1. Preparo e propagação do meio

O ácido oléico, que é fonte de carbono do processo, e os nutrientes são levados a um esterilizador a vapor antes de entrar na etapa de propagação do inóculo e no Fermentador. Esse tipo de esterilizador foi escolhido por ser eficiente e não utilizar produtos químicos que podem prejudicar o meio, além de ser difundido no meio industrial.

A propagação no fermentador (propagador) do inóculo segue a seguinte reação, baseada nos resultados laboratoriais:



A quantidade de biomassa no inóculo obedece os resultados obtidos experimentalmente, e a gerada segue a proporção de 1 mg p.s de células/ ml meio de cultivo.

O componente *produtos secundários* obtido visa apenas completar o balanço mássico de forma correta, visto que são proteínas diversas formadas, indiferentes para o processo.

Todas as quantidades de meio e água foram utilizadas de acordo com os experimentos realizados por Melo (2010).

No anexo 1 podem ser vistas algumas determinações analíticas usadas para controle de processo.

IV.2.2.2. Fermentação

O software SuperPro Designer possibilita a simulação de um processo fermentativo baseada em uma equação que descreva o consumo dos reagentes e a formação de produtos.

A reação utilizada na fermentação foi a representada abaixo:



O balanço foi ajustado de modo que todo o ácido oléico fosse convertido na quantidade requerida de lipase, sendo formado produtos secundários da fermentação que entram na equação para fechar o balanço.

A quantidade de cada componente foi obtida de acordo com Zhuang *et al* (2007), que utiliza uma proporção de 50:5:1 de substrato, biomassa gerada e enzima, respectivamente.

Após a fermentação é adicionado um homogenizador para estabilizar a corrente, de modo a obter a enzima formada na etapa anterior.

IV.2.2.3. Extração de líquidos no decantador

Visto que a quantidade de água utilizada no processo é grande, e conseqüentemente, há diluição do produto, etapas para extração de líquidos são necessárias.

Nesse processo há remoção da água e do ácido oléico residual, concentrando a corrente que irá para centrifugação.

A perda de atividade enzimática é a default do equipamento, cerca de 5% em relação à operação anterior.

IV.2.2.4. Centrifugação

Na centrifugação considera-se 100% de recuperação da enzima. A biomassa residual teve eficiência de separação de 90% e aos outros componentes foi utilizado o default do programa SuperPro Designer.

A desnaturação na corrente de saída é prevenida com um resfriamento usando como fluido refrigerante água, até uma temperatura de 15°C, visto na centrifugação pode haver aquecimento e possível perda da atividade enzimática.

IV.2.2.5. Remoção dos sólidos por precipitação salina

A precipitação salina auxilia na filtragem e purificação da solução.

É feita uma lavagem com água, para purificar ao máximo a corrente, deixando apenas enzimas e proteínas puras ao final do processo. O programa utiliza uma desnaturação da enzima de cerca de 3%, em relação à operação anterior, para esse equipamento, resultando em perda da atividade enzimática.

IV.2.2.6. Concentração por troca iônica

Separa e concentra quase que a totalidade de enzimas disponíveis na corrente de entrada. Para isso utiliza uma lavagem com água, NaCl 0.1 e 0.5M, NaOH 0.5M e tampão Tris 50mM de acordo com Borkar *et al* (2009), e com o banco de dados do programa, que seleciona a melhor faixa de operação para o equipamento, resultando em melhores resultados. A perda de atividade enzimática, devido ao fato da separação não ser 100% efetiva, é a default do equipamento e definida em 5% em relação à operação anterior.

IV.2.3. Dimensionamento

Os parâmetros de projeto devem ser definidos de forma que o programa possa realizar os cálculos de dimensionamento dos equipamentos e utilização da planta. Em todos os casos, foram utilizados os parâmetros sugeridos pelo programa SuperPro Designer, que podem ser observados na Tabela 4 a seguir:

Tabela 4 - Parâmetros de dimensionamento da planta

Legenda	Equipamento	Parâmetros
PRO1	Propagação Inóculo	Volume Máximo = 50000 L
		Porcentagem máxima de utilização do volume= 90%
		Altura/Diâmetro = 3
EST1	Esterilizador	Vazão Máxima = 100000 L/h
FER1	Fermentador	Volume Máximo = 300000 L
		Porcentagem máxima de utilização do volume= 90%
		Altura/Diâmetro = 3
HG1	Homogenizador	Máxima Vazão = 333 L/min
DEC1	Decantador	Volume Máximo = 60000 L
		Porcentagem máxima de utilização do volume= 90%
		Altura/Diâmetro = 5
CEN1	Centrífuga	Máxima vazão = 200 L/min
PPS1	Precipitação Salina	Volume Máximo = 50000 L
		Altura/Diâmetro = 3
COL1	Coluna de Troca Iônica	Máxima vazão = 600 L/min
SEC1	Secagem Produto	Capacidade Sublimação = 600000 kg

Parâmetros de operação também devem ser definidos de forma que o programa possa calcular a real ocupação dos equipamentos. As operações de cada equipamento são definidas pelo usuário, de modo a conectar todas as correntes (Pull-in e Transfer-Out), designar a sequência das operações no equipamento e definir os parâmetros de operação. A Tabela 5 abaixo fornece esses valores.

Tabela 5 - Operações do processo

Legenda	Equipamento	Operação	Parâmetros
PRO1	Propagação Inóculo	Pull-In-1	Vazão Mássica = 30ton/batelada
		Pull-In-2	Vazão Mássica = 30ton/batelada
		Pull-In-3	Tempo e Vazão de EST1
		React	Tempo = 72 hrs
		Transfer-Out	Vazão Mássica = 30ton/batelada
EST1	Esterilizador	Sterelize	Tempo = 4 hrs
FER1	Fermentador principal	Pull-In-1	Tempo = Tempo de PRO1
		React	Tempo = 72 hrs
		Transfer-out	Tempo = 16 hrs
		SIP	Tempo= 15 min
HG1	Homogenizador	Homogenize	Tempo= 16 hrs
DEC1	Decantador	Decant	Tempo = 8 hrs
CEN1	Centrífuga	Centrifuge	Tempo = 4 hrs
PPS1	Precipitação Salina	Flotate	Tempo = 6 hrs
COL1	Coluna Troca Iônica	Load	Tempo = 9 hrs
		Wash	
		Regenerate	
SEC1	Secagem Produto	Dry	-

O tempo de reação do fermentador principal e da propagação do inóculo foram obtidos diretamente da literatura, como visto na seção IV.1. Os outros parâmetros listados na tabela acima são estimados pelo programa com base no seu banco de dados, levando em consideração as condições iniciais e finais requeridas no processo, tais como massa total final do produto.

IV.3. Avaliação Econômica

A avaliação econômica leva em conta a estimativa de dados relativa aos custos de equipamentos, materiais e trabalho. Foi utilizada a conversão de R\$ 1,60 para US\$ 1, valor obtido na data de realização dos cálculos.

IV.3.1. Custos dos Equipamentos

Com a finalidade de utilizar as equações descritas anteriormente para a estimativa dos custos de equipamentos com relação à capacidade e à variação temporal, foram utilizados os parâmetros descritos na seção II.5.3, custo (C_o), capacidade (Q_o), e fator de correção (f). Os valores são apresentados na Tabela 6 a seguir. Nos casos onde não foi possível encontrar os custos associados a capacidade utilizou-se o modelo default do *software*, que contém esses dados pré-configurados aos equipamentos.

Tabela 6 - Parâmetros para a equação de custos

Equipamento	Parâmetros para a equação de custos				
	Q_o	C_o (R\$)	f	Ano	Fonte
Propagação Inócua	0,56 m ³	254400	0,6	2000	Castilho <i>et al.</i> , 2000
Esterilizador	122,01 m ³ /h	160000	0,6	2004	Zhuang, 2006
Homogenizador	-	-	-	-	Default
Fermentador	24,91 m ³	1081600	0,6	2000	Castilho <i>et al.</i> , 2000
Decantador	50 m ³	19040	0,6	1999	Wooley <i>et al.</i> , 1999
Precipitação Salina	-	-	-	-	Default
Centrífuga	-	-	-	-	Default
Coluna de Troca Iônica	-	-	-	-	Default
Secagem Produto	-	-	-	-	Default

IV.3.2. Custos do Materiais

A Tabela 7 abaixo mostra o preço dos insumos utilizados no processo:

Tabela 7 - Preço dos insumos

Insumo	Preço (R\$/kg)
Ácido Oléico	3
Água	0,008
Extrato de levedo (Bacto)	288
Extrato de malte (Difco)	112
Peptona (Bacto)	256
Tween 80 (Sigma)	80

O custo da água utilizada no processo foi calculado com base no preço da água fornecida pela CEDAE (RJ) para fins industriais, de R\$ 8,409240 /m³. Esse custo pode ser diferente dependendo da escolha da localidade para implantação da planta.

O custo do Ácido Oléico foi estimado com base no preço FOB de mercado, em R\$ 3000 por tonelada, sendo este o preço utilizado na avaliação econômica do processo. (Fonte: site aliceweb.com, acessado em 29/08/2011)

Os preços dos demais reagentes foram obtidos diretamente dos catálogos disponibilizados na internet pelas empresas Bacto, Difco e Sigma, no site das respectivas.

IV.3.3. Custo do Trabalho

Estimou-se o custo relacionado ao trabalho como sendo de 2 salários mínimos mensais (R\$ 545,00 o salário mínimo em 2011) por operador. Sendo um turno de trabalho de 8 horas, obtêm-se R\$ 5,90 por hora trabalhada por operador.

IV.3.4. Indicadores de Lucratividade

Os indicadores de lucratividade foram calculados automaticamente pelo software utilizado, ao se definir as condições de operação e os custos.

A sensibilidade do preço do preparado enzimático foi obtida com base no rendimento da fermentação, variando a quantidade de proteína produzida e o fator de concentração da etapa de centrifugação.

Capítulo V. Resultados e Discussão

V.1. Parte Experimental

V.1.1. Produção de lipase

De acordo com Melo (2010), a produção de lipase foi feita estudando, através de um planejamento fatorial 2^{5-1} , a influência de três variáveis de produção, extrato de levedura, extrato de malte, peptona, ácido oléico e tween 80. Dos 19 experimentos realizados, obteve-se uma variação de 15,76 a 46,03 mg p.s cél./mL para crescimento celular e de 0,16 a 9,20 U/mL para atividade enzimática.

Os melhores resultados foram obtidos utilizando extrato de malte a 0,9% p/v, ácido oléico e peptona a 1,5 % p/v ,extrato de levedura a 0,5% p/v e tween 80 a 1,0% p/v, resultando numa maior atividade enzimática.

Trabalhos da literatura (Pernas, *et al* 2000; Gordillo *et al* 1998) relatam o efeito positivo do ácido oléico como agente indutor na produção de lipase por leveduras, corroborando com os resultados obtidos por Melo, 2010. Gombert *et al.*, 1999 e Maia *et al* 1999 também observaram um efeito positivo da peptona como fonte de nitrogênio na produção de lipase por leveduras.

V.2. Síntese do Processo

O fluxograma obtido para o processo pode ser visualizado na Figura 4 a seguir. O processo foi dividido em três seções: a primeira, compreendendo o preparo do meio, a propagação do inóculo e a fermentação, a segunda seção que contempla a concentração, e a terceira abrangendo a etapa de purificação e obtenção do produto final.

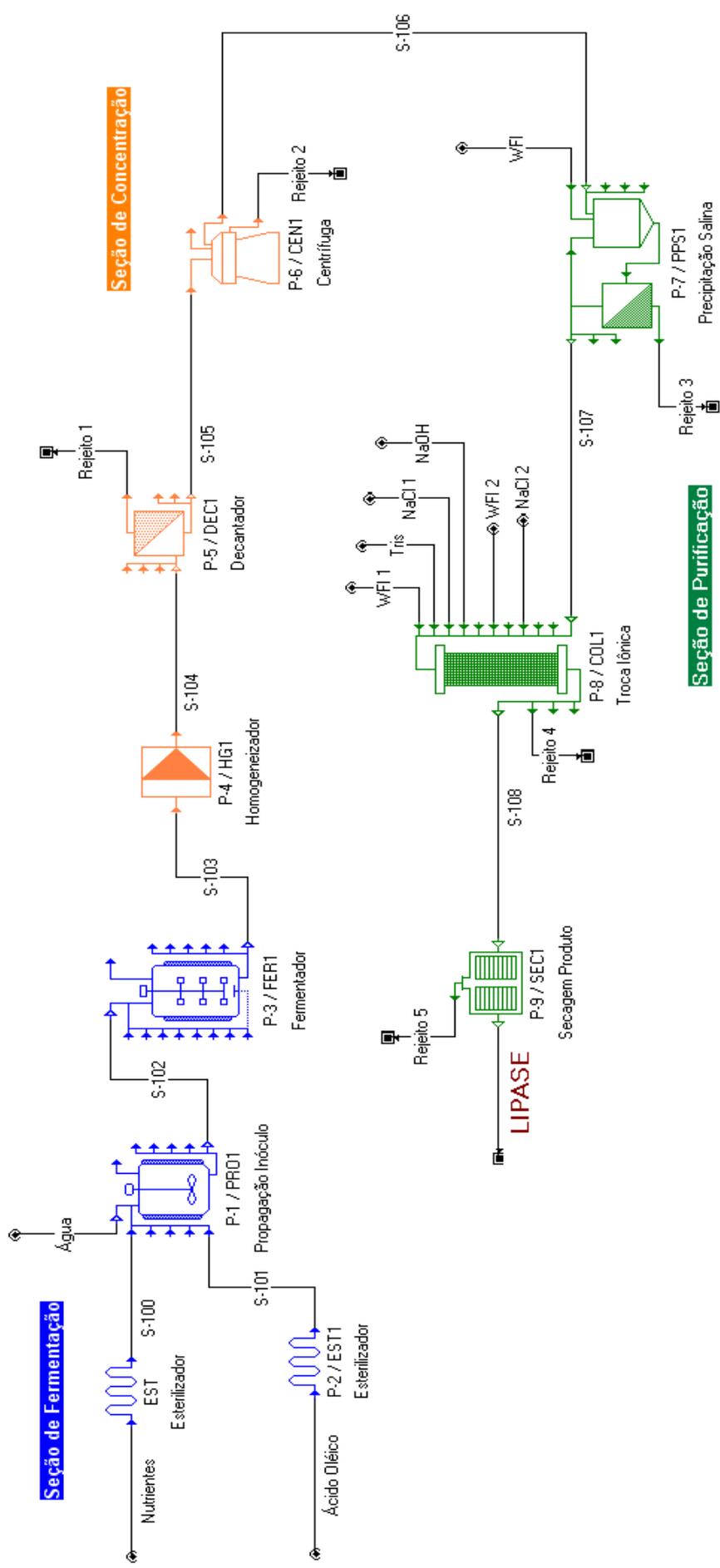


Figura 4 - Fluxograma de uma planta de produção de lipase utilizando ácido oléico como fonte de carbono
(FONTE: Elaboração própria utilizando SuperPro Designer)

Na primeira seção em azul, o ácido oléico e o meio de cultura são esterilizados, e utilizados como fonte de carbono e nutrientes para o preparo do inóculo e posterior fermentação. A etapa de preparo do inóculo é utilizada para ativar a fase de crescimento celular do microorganismo que será levado ao fermentador, tendo como ponto crítico manter as condições ótimas para o crescimento celular (pH, temperatura, concentração de nutrientes) e a ausência de agentes contaminantes no meio.

Ao tanque FER1 é levada a corrente S-102 contendo o meio reacional adequado para a fermentação, visando a produção de 100 kg de lipase ao final do processo. O processo fermentativo demanda um tempo longo de reação (72 horas) para que a produção da lipase seja eficiente. Esta é a seção limitante do processo pois apresenta maior tempo de operação, de aproximadamente 150 horas.

A corrente S-103 que sai do tanque de fermentação é homogeneizada para as etapas posteriores de concentração, destacadas em laranja. No decantador, como não há utilização de agentes coagulantes, o tempo de operação é dado pela velocidade de sedimentação, limitando o processo. Já na centrifugação, o limitante é a capacidade da centrífuga, sendo que quanto maior e mais potente, maiores os custos. Nesta seção os produtos secundários da fermentação são separados da lipase de interesse, e descartados nos rejeitos 1 e 2, que são em média 80% água, 15% produtos secundários e 5% nutrientes. No rejeito 2 há traços pouco relevantes do produto final também. O tempo de operação nesta seção é de 30 horas, aproximadamente.

Em verde, a seção de purificação utiliza as etapas de precipitação salina, troca iônica e secagem. A precipitação salina é uma purificação primária e rápida, se comparada a outras etapas do processo, visando diminuir a carga alimentada na etapa posterior. A troca iônica garante a pureza mínima requerida no processo, e é limitada pela capacidade disponível de troca do trocador. Para aumentar essa capacidade, sucessivas lavagens são feitas, aumentando o tempo de operação do equipamento. Ao final, a secagem concentra a lipase, de modo a obter o valor de 95% de pureza estabelecido no equipamento. Esse valor pode variar de acordo com o uso final desta enzima, barateando ou onerando os custos do processo. As indústrias farmacêutica e

de alimentos, por exemplo, utilizam lipase com alto grau de pureza, enquanto indústrias como a de detergentes e têxtil utilizam um grau de pureza menor. O tempo de operação na seção de purificação é de aproximadamente 60 horas, resultando num total de 240 horas de operação por batelada.

V.2.1. Balanço de massa

A Tabela 9 a seguir mostra os valores obtidos pelo cálculo do balanço de massa realizado na seção IV.2.2.

Os cálculos foram realizados para a obtenção de 100 kg/batelada de lipase ao final do processo.

Inicialmente 10 toneladas de ácido oléico são alimentados na planta, como fonte de carbono na propagação do inóculo. A quantidade dos nutrientes no pré-inóculo foi calculada de acordo com a porcentagem dada por Melo (2010), e os valores são apresentados na Tabela 8 abaixo.

Tabela 8 - Balanço de massa da planta

Balanço de Massa para a Planta	Valor	Unidade
-Seção de Fermentação		
Glicose	318,14	kg
Extrato de Malte	95,44	kg
Peptona	159,07	kg
Extrato de Lêvedo	95,44	kg
Água	30.509,59	kg
Ácido oléico	10.000,00	kg
Biomassa residual	701,58	kg
-Homogenizador		
Lipase	114,77	kg
-Decantador		
Rejeito 1 (água e nutrientes)	20.892,26	kg
-Centrífuga		
Lipase	113,62	kg
Rejeito 2 (água e nutrientes)	14.028,04	kg
-Precipitação Salina		

Rejeito 3 (sais e água)	5.271,54	kg
-Troca Iônica		
Massa de sais e água utilizada	280.566,90	kg
Rejeito 4 (sais, água e nutrientes)	284.290,82	kg
-Secagem Produto		
Lipase concentrada	100,00	kg
Rejeito 5 (água lavagem)	424,10	kg

Nota-se que a quantidade de lipase após a seção de fermentação é maior que os 100 kg estipulados, porém ao longo do processo é perdida, devido à desnaturação ocorrida nos equipamentos por gradientes de temperatura, pH ou agitação mecânica e à lipase descartada em separações não totalmente efetivas.

V.2.2. Dimensionamento

As dimensões e as quantidades dos equipamentos são obtidas de acordo com o banco de dados do programa e as condições iniciais do processo, sendo apresentados na Tabela 9 a seguir.

Tabela 9 - Dimensões dos equipamentos

Legenda	Equipamento	Quantidade	Dimensão
PRO1	Propagador Inóculo	1	Volume = 35032,34 L
EST1	Esterilizador	2	Capacidade = 2,83 m ³ /h
FER1	Fermentador	1	Volume = 53665,30 L
HG1	Homogenizador	1	Capacidade = 42,37 L/min
DEC1	Decantador	2	Capacidade = 63,56 m ²
CEN1	Centrífuga	1	Capacidade = 42,44 L/min
PPS1	Precipitação Salina	1	Capacidade = 43,79 m ²
COL1	Coluna Troca Iônica	2	Volume = 633,07 L
SEC1	Secagem Produto	1	Capacidade = 426,10 kg

É possível observar na Tabela 9 que o fermentador (FER1) é o equipamento que ocupa maior volume na planta industrial de produção de lipase. Este alto volume está diretamente associado ao tipo de fermentação utilizado, a fermentação submersa, com grandes volumes de água.

Os equipamentos listados acima ocupam uma área física de aproximadamente 200 m². Para a construção da planta desenhada, seguindo as normas da ABNT para construção civil, seria necessário um terreno de no mínimo 300 m².

Seria interessante a aquisição de mais uma centrífuga para ficar como reserva na planta, antevendo imprevistos que podem ocorrer com o equipamento, além de possibilitar a constante manutenção.

V.3. Avaliação Econômica

V.3.1. Ocupação dos recursos

A ocupação temporal dos recursos do processo, que possui etapas descontínuas, deve ser analisada de modo a compreender as dinâmicas intrínsecas do projeto.

Uma maneira de visualizar esta ocupação de recursos é através do Gráfico de Grant, mostrado na Figura 5.

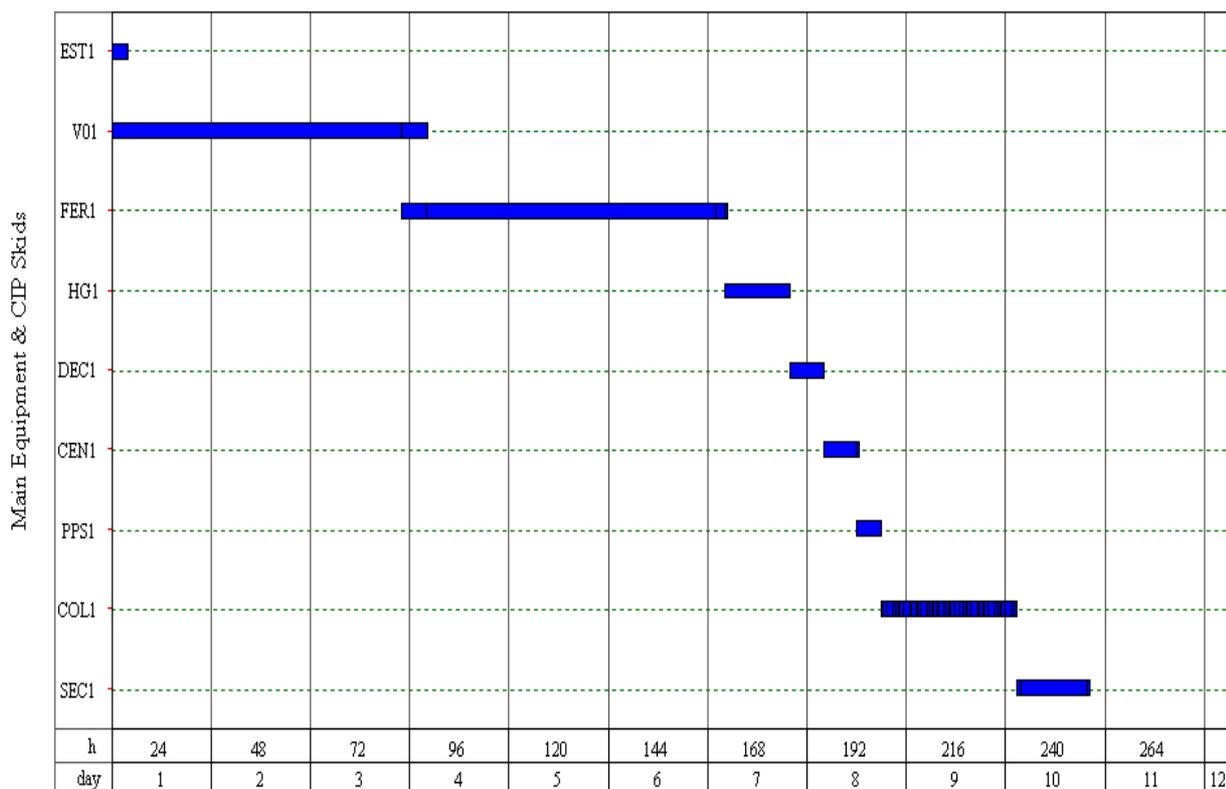


Figura 5 - Gráfico de Grant da ocupação de recursos

Ao analisar o gráfico, pode-se observar que o tempo total de ciclo é de aproximadamente 240 horas e que a Fermentação (FER1) é a etapa limitante

do processo. Com esse tempo 50 bateladas ao ano poderiam ser realizadas. Porém, como é possível iniciar uma batelada sem que a última etapa de todo o processo tenha terminado, o programa SuperPro Designer projetou um total de 96 bateladas ao ano, levando em conta um tempo mínimo de ciclo de 81,2 horas.

V.3.2. Custos de Investimento

Os custos relativos aos equipamentos são calculados de acordo com os dados apresentados anteriormente na Tabela 6. Os custos dos equipamentos não listados são estimados em 25% do custo total, de acordo com Peters e Timmerhaus (1991). Nas Tabelas abaixo são apresentados estes custos relativos aos equipamentos (Tabela 10), além dos custos diretos e indiretos relativos à planta (Tabela 11).

Tabela 10 - Custos unitário e total dos equipamentos

Legenda	Equipamento	Quantidade	Custo Unitário(R\$)	Custo Total (R\$)
PRO1	Propagador Inóculo	1	254.400	254.400
EST1	Esterilizador	2	160.000	320.000
FER1	Fermentador	1	1.081.600	1.081.600
HG1	Homogenizador	1	1.600	1.600
DEC1	Decantador	2	19.200	38.400
CEN1	Centrífuga	1	160.000	160.000
PPS1	Precipitação Salina	1	160.000	160.000
COL1	Coluna Troca Iônica	2	249.600	499.200
SEC1	Secagem Produto	1	19.000	19.000
Equipamento não listados				649.900
TOTAL				3.167.000

Além da fermentação, onde se é esperado um alto investimento por ser a principal etapa do processo, outro equipamento que chama a atenção é o esterilizador, com seu custo associado ao alto valor de energia utilizado para o aquecimento do vapor.

Em equipamentos não listados, são definidos os custos relativos a análises e controle dos parâmetros do processo, como controle de temperatura, pH, atividade enzimática e taxa de crescimento da biomassa.

Outros custos relacionados a investimentos necessários para produção da planta física foram derivados a partir dos custos de compra dos equipamentos de acordo com a Tabela 6, contendo valores dentro de faixa sugerida por Peters e Timmerhaus (1991).

Tabela 11 - Custos diretos e indiretos

	Item	Custo (R\$)
CUSTO DIRETO	Equipamentos	3.167.000
	Instalação	1.486.000
	Tubulação	1.108.000
	Instrumentação	1.267.000
	Isolamento	95.000
	Elétrica	317.000
	Edificações	3.167.000
	Melhoria terreno	475.000
	Instalações Auxiliares	1.267.000
	Custo Direto TOTAL	12.347.000
CUSTO INDIRETO	Engenharia	3.087.000
	Construção	4.321.000
	Custo Indireto TOTAL	7.408.000

Os valores obtidos na Tabela 11 foram obtidos diretamente pelo programa, e calculados a partir das tabelas de porcentagem de custos retiradas do livro de Peters e Timmerhaus (1991).

O custo total é a soma dos custos direto e indireto totais, dado por CT= R\$ 19.755.000. Além disso, é somado ao CT os custos da empreiteira para a construção da planta (R\$988.000) e da contingência (R\$1.976.000), totalizando ao final um valor de R\$ 22.718.000, valor esse utilizado nos cálculos de indicadores de lucratividade apresentados posteriormente.

V.3.3. Custos de Operação

Os custos de mão de obra se resumem ao montante de R\$ 6.304.000 por ano, com um gasto de R\$ 206,08 por hora de trabalho. Esses custos foram calculados sabendo que um mesmo trabalhador pode se ocupar de mais de um equipamento em seu turno.

Abaixo a Tabela 12 com os custos de matéria prima.

Tabela 12 - Custos com Matéria-Prima

Matéria Prima	Custo Unitário (R\$/kg)	Quantidade Anual (kg)	Custo Anual (R\$)	%
Água	0.008	3,444,108	29,000	0.16
Extrato de levedo	288.000	9,162	2,639,000	14.38
Peptona	256.000	15,271	3,909,000	21.31
Extrato de malte	112.000	9,162	1,026,000	5.59
Glicose	1.600	30,541	49,000	0.27
Agar – Agar	35.200	61,083	2,150,000	11.72
Ácido oléico	3.040	960,000	2,918,000	15.91
WFI	0.160	7,407,070	1,185,000	6.46
Tris Buffer	0.240	10,210,159	2,450,000	13.36
NaCl (0.1 M)	0.208	3,967,376	825,000	4.50
NaOH (0.5 M)	0.192	4,964,082	953,000	5.20
NaCl (0.5 M)	0.304	695,552	211,000	1.15
TOTAL		31,773,568	18,346,000	100.00

Na Tabela 13 são apresentados os custos de utilidades necessárias para o funcionamento da planta, fornecidos pelo programa, baseado na soma das utilidades utilizadas em cada equipamento.

Tabela 13 - Custo de utilidades

Utilidades	Quantidade anual	Unidade	Custo Anual (R\$)	%
Eletricidade	1,268,065	kWh	202,890	74.23
Vapor	363,203	kg	163	0.06
Água de resfriamento	19,551,953	kg	782	0.29

Água Gelada	248,228,488	kg	69,504	25.43
TOTAL			273,339	100.00

Apesar de não representar a maior quantidade anual no processo, a eletricidade representa o maior custo anual, pois a energia é uma utilidade cara no Brasil.

A Tabela 14 ilustra todos os custos operacionais da planta, obtidos diretamente dos cálculos efetuados pelo software, baseado nas tabelas de custos fornecidas por Peters e Timmerhaus (1991). O item chamado dependente da planta, que se apresenta como grande fonte de custos, resume em si a depreciação dos equipamentos, custos de manutenção e custos de natureza variada. Além disso, há um alto custo relacionado aos descartáveis, que poderiam ser reaproveitados num estudo posterior, para a otimização do processo.

Tabela 14 - Custos Operacionais

Custo do Item	R\$	%
Matéria Prima	18,345,600	43.56
Dependente do Trabalho	6,304,000	14.97
Dependente da Planta	4,228,800	10.04
Laboratório/QC/QA	1,059,200	2.52
Descartáveis	11,840,000	28.11
Tratamento rejeito	62,400	0.15
Utilidades	273,600	0.65
TOTAL	42,113,000	100.00

Considerando todos os custos descritos anteriormente e a produção de lipase da planta, chega-se ao custo de produção de R\$ 4.467,00 por kg de produto, calculado diretamente pelo programa na simulação. Este valor é menor do que o encontrado na venda do produto no mercado, logo, analisando somente os custos de produção e venda, pode-se obter lucro na produção.

V.3.4. Indicadores de Lucratividade

De acordo com Peters e Timmerhaus (1991), temos que analisar um conjunto de índices para se ter uma melhor visão sobre as finanças da empresa.

Com uma venda de 9.428 kg de produto por ano, o custo de produção de R\$ 4.467,00 por quilograma de produto, e o preço de mercado de R\$ 5.600,00 por quilograma, têm-se uma receita anual de R\$ 52.795.000,00. Com esses resultados e os custos fornecidos nas tabelas anteriores podemos calcular os índices discutidos na seção II.5.4.

A porcentagem da margem bruta foi de 32,37%, sendo que na indústria química a margem média é de 20% e na farmacêutica de 60% (Matos, 2003), mostrando que seu valor de mercado está mais próximo dos commodities da indústria química do que dos fármacos. A lipase produzida e comercializada apresenta portanto um baixo valor agregado.

O retorno do investimento obtido (ROI) foi de 50,26%. Comparando com os resultados obtidos na literatura por Castilho *et al* (2000), na produção de lipase, de 67,87%, e por Evangelista *et al* (1998) na produção de β -glucuronidase, de 52%, pode-se observar que o ROI calculado nesta simulação é satisfatório, dentro do resultado esperado economicamente.

O tempo de retorno do investimento é obtido quando o ROI atinge 100%, de acordo com Matarazzo (1997). Esse valor é atingido em 5,09 anos, levando em consideração as taxas tributárias. Ferreira *et al* (1995) na produção de 130 m³ de pectinase por ano, obteve um tempo de retorno de 4 anos. Zhuang (2006), obteve tempo de retorno de 2,75 anos. Já Mazin e Andréa (2010), obtiveram 6,77 anos em sua produção. A diferença pode se dar devido ao tipo de fermentação utilizada, aos equipamentos requeridos ou à quantidade produzida por ano, elevando os custos de produção.

Tanto o ROI quanto o tempo de retorno mostraram valores adequados no presente estudo em comparação com os valores obtidos em escala similar de produção (de 40 a 160 m³), tal qual afirma Castilho *et al* (2000).

V.3.4.1. Fluxo de Caixa

O Fluxo de Caixa projetado quando prevendo 15 anos de operação da planta, sem a previsão de tomada de empréstimos, com um tempo de

construção de 30 meses e de *start up* da planta de 4 meses é apresentado na Tabela 15.

Tabela 15 - Fluxo de caixa

Ano	Investimento	Receita	Custos de Operação	Lucro Bruto	Depreciação	Lucro Tributável	Impostos	Lucro Líquido	Fluxo de Caixa Líquido
1	- 6,815	0	0	0	0	0	0	0	- 6,815
2	- 9,087	0	0	0	0	0	0	0	- 9,087
3	- 9,099	19,798	22,375	- 2,577	2,158	0	0	- 419	- 9,518
4	0	52,795	42,113	10,681	2,158	10,681	4,273	8,567	8,567
5	0	52,795	42,113	10,681	2,158	10,681	4,273	8,567	8,567
6	0	52,795	42,113	10,681	2,158	10,681	4,273	8,567	8,567
7	0	52,795	42,113	10,681	2,158	10,681	4,273	8,567	8,567
8	0	52,795	42,113	10,681	2,158	10,681	4,273	8,567	8,567
9	0	52,795	42,113	10,681	2,158	10,681	4,273	8,567	8,567
10	0	52,795	42,113	10,681	2,158	10,681	4,273	8,567	8,567
11	0	52,795	42,113	10,681	2,158	10,681	4,273	8,567	8,567
12	0	52,795	42,113	10,681	2,158	10,681	4,273	8,567	8,567
13	0	52,795	39,955	12,840	0	12,840	5,136	7,704	7,704
14	0	52,795	39,955	12,840	0	12,840	5,136	7,704	7,704
15	3,419	52,795	39,955	12,840	0	12,840	5,136	7,704	11,123

Dos valores obtidos na Tabela 15 podem-se derivar alguns resultados pertinentes à análise econômica do processo como a Taxa Interna de Retorno (IRR), que sem impostos foi de 36,33%, enquanto que com impostos foi de 25,23%.

Para efeito comparativo, Ferreira *et al* (1995) obtiveram uma taxa interna de retorno de 18%. Já Mazin e Andréa (2010) 9,61%. De acordo com Rudd *et al* (1968) esta taxa varia de 8 a 18% para projetos na indústria química, sendo que nesta análise a taxa mínima de retorno esperado é de 17% (Luccio *et al*, 2002). E para IRR maiores que a taxa mínima, o investimento é considerado

viável. Como o IRR obtido no presente estudo, considerando os impostos, foi de 25,23%, o investimento é seguro.

O Valor Presente Líquido (NPV), fortemente dependente do custo de capital, também é obtido do fluxo de caixa, e foi avaliado para 3 patamares de taxa de desconto: 7, 9 e 11%, resultando, respectivamente, em R\$ 36.062.000 , 28.647.000 e 22.539.000. Em comparação, Zhuang (2006), obteve R\$ 48.387.000, R\$ 38.734.000 e R\$ 30.564.800, para 7, 9 e 11% respectivamente. Ambos os trabalhos apresentaram os três patamares positivos. Com valores de NPV positivo, o projeto cobrirá tanto o investimento inicial, como a remuneração mínima exigida pelo investidor, gerando ainda um excedente financeiro, fornecendo liquidez à indústria.

Nota-se que a planta possui alta capacidade de gerar lucros operacionais, mas o alto custo de investimento pode ter impacto profundo sobre o fluxo de caixa, e o desempenho do investimento sob o ponto de vista dos indicadores apresentados.

Vale ressaltar que as condições operacionais não foram otimizadas, e portanto, melhores resultados podem ser alcançados ao se realizar a otimização do processo como um todo.

Com os índices econômicos dentro de valores aceitáveis referentes à literatura, o investimento nesse projeto é seguro, sendo viável a construção da indústria a partir da planta simulada no presente estudo.

Capítulo VI. Conclusão

Conclui-se com este trabalho que o processo de produção de lipase a partir de ácido oléico, como descrito no presente estudo, é viável para aplicação industrial.

Com os bons indicadores econômicos apresentados na análise do processo, pode-se prever uma produção de lipase em larga escala competitiva. Este empreendimento passaria então a fornecer lipase a preços competitivos tanto no mercado interno quanto externo, movimentando o mercado dos bicomcombustíveis.

O investimento realizado neste tipo de empreendimento ajuda a difundir o conceito de biorrefinaria, ao reaproveitar o ácido oléico para a produção de um catalisador das reações de transesterificação de óleos vegetais, fundamentais para a produção de biodiesel.

Mesmo com os positivos resultados da análise, há ainda alguns desafios na implementação real do projeto: a pequena oferta de mão-de-obra especializada na indústria de processos biotecnológicos no Brasil, a falta de experiência que os grupos investidores brasileiros têm no tema e o pequeno volume de dados com os quais contam os analistas de mercado para prever aumento ou diminuição de volume de vendas, preços, aspectos legais e de regulação, são os principais.

Considerando que não foi levada em conta a otimização temporal e de recursos do processo, que apresenta ainda certos gargalos na produção, os resultados positivos são bastante significativos. Focando os estudos nestes aspectos, ao estudar melhores formas do processo fermentativo e utilizando conhecimentos de engenharia de processos para se chegar ao fluxograma ótimo, resultados ainda melhores poderão ser encontrados.

Sugestões para estudos futuros incluem o estudo e a otimização dos parâmetros da fermentação, que possui grande influência na lucratividade do processo, obtendo rendimentos melhores, além de buscar fatores intrínsecos à planta, como integração energética, reuso da água e dos sais de lavagem, tratamento de efluentes e trocas gasosas. E ainda dentro da parte de otimização, poderia ser feita uma análise de sensibilidade, ao estimar erros de 10 a 40% nos cálculos para mais ou para menos, verificando a simulação.

Bibliografia

ALONSO, F.O.M. **Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica***. Rio de Janeiro: 2001. Dissertação de mestrado. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. **Lipase Catalyzed Modification of Milkfat**. *Biotechnol. Adv.*, v. 16, p. 309, 1998.

BORKAR, P. S.; BODADE, R. G.; RAO, S. R.; KHOBRAGADE, C. N.. **Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9**. *Braz. J. Microbiol.*. 2009, vol.40, n.2, pp. 358-366.

BURKERT, J.F.de M. **Otimização das Condições de Produção da Lipase por *Geotrichum candidum* NRRL-Y552**. Campinas: 2002. Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA JR., G. L.; FREIRE, D. M. G. **Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid state and submerged fermentations**. *Biochemical Engineering Journal*, v. 4, p. 239-247, 2000.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. **Modificação de óleos e gorduras por biotransformação**. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

COSTA, V. E. U., AMORIM, H. L.N. **O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente**. *Química Nova*, vol 22, p. 6, 1999.

CHAUVEL, A.; FOURNIER, G.; RAIMBAULT, C. **Manual of Process Economic Evaluation**. Paris, Editions Technip, 2001.

DALMAU, E.; MONTESINOS, J.L.; LOTTI, M.; CASAS, C. **Effect of different carbon source on lipase production by *Candida rugosa***. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 26, p. 657-663, 2000.

DEIVE, F.J.; COSTAS, M.; LONGO, M.A. **Production of a thermostable extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus***. *Biotechnology letters*, v. 25, p. 1403-1406, 2003.

DOMINGUEZ, A.; COSTAS, M.; LONGO, M.A.; SANROMÁN, A. **A novel application of solid culture: production of lipases by *Yarrowia lipolytica*.** *Biotechnology Letters*, v.25, p. 1225-1229, 2003.

DZIEZAK, J.D. **Enzymes: catalyses for food processes.** *Food technology.*, v. 45, p. 78-85, 1991.

EVANGELISTA, R.L.; KUSNADI, A.R.; HOWARD, J.A.; NIKOLOV, Z.L.. **Biotechnol. Prog.** 14 (1998) 607–614.

FABER, K. **Biotransformation in Organic Chemistry.** 4 ed. Berlin: Springer-Verlag, 2000.

FALONY, G.; ARMAS, G. C.; MENDOSA, J. C. D.; HERNÁNDEZ, J. L. M. **Production of extracellular lipase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation.** *Food Technol. Biotechnol*, vol 44. p. 235 – 240, 2006.

FERREIRA, J.S.G.; CASTILHO, L.R.; PAIVA, S.P.; **Produção de pectinases para a indústria de bebidas.** Escola de Química/Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1995.

FREIRE, M. G. D.; CASTILHO, R. L. **Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido.** *Rev. Bras. Farm.*, Rio de Janeiro, v.81, p.48-56, 1999.[

GANDHI, N. N. **Applications of lipase.** *JAOCs*, v. 74, p. 621-634, 1997.

GATFIELD, I. L. **Generation of Flavor and Aroma Components by Microbial Fermentation and Enzyme Engineering Technology.** In: PARLIAMENT, T. H.; CROTEAU, R. Biogeneration of Aromas. Washington, DC: American Chemical Society, 1986. p. 310-322. (ACS Symposium Series 317).

GOMBERT, A. K.; LOPES, A.; CASTILHO, L. R.; FREIRE, D.M.G. **Lipase production by *Penicillium restrictum* in a solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate.** *Proc. Biochem.*, v. 35, p. 85-90, 1999.

GORDILLO, M.A.; MONTESINOS, J.L.; CASAS, C.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLA, C. **Improving lipase production from *Candida rugosa* by a biochemical engineering approach.** *Chemistry and Physics of Lipids* 93, p. 131–142, 1998.

HADEBALL, W. **Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*.** *Acta Biotechnology*, v. 11, p.159-167, 1991.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMMED, A. **Industrial application of microbial lipases.** *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. **Lipases and Their Industrial Applications.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 118, p.155-170, 2004.

JAEGER, K.E.; RANASK, S.; KOCH, H.B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B.W. **Bacterial lipases.** *EMS Microbiol. Rev.*, v. 15, p. 29-63, 1994.

JOHNSON-GREEN, P. In: **Introduction to food biotechnology.** New York: CRC Press LLC, 2002. p. 293.

KOBLITZ, M.; PASTORE, G. **Purificação parcial, por dois diferentes métodos cromatográficos, da lipase produzida por *Rhizopus sp.*** *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, p. 288, abr.-jun. 2004.

LIMA, U. de A. **Biotecnologia industrial.** São Paulo: Edgard Blücher Ltda, 2001. v. 4, p.225-253.

LIU, C-H., LU, W-B., CHANG, J-S. **Optimizing lipase production of *Burkholderia sp.* by response surface methodology.** *Process Biochemistry*, vol. 41, p. 1940-1944, 2006.

LOTTI, M.; MONTICELLI, S.; MONTESINOS, J.L.; BROCCA, S.; VALERO, F.; LAFUENTE, J. **Physiological control on the expression and secretion of *Cândida rugosa* lipase.** *Chemistry and physics of lipids*, v. 93, p. 143-148, 1998.

LUCCIO, M.D.; BORGES, C.P; ALVES, T.L.M.. **Economic analysis of ethanol and fructose production by selective fermentation coupled to pervaporation: effect of membrane costs on process economics.** *Desalination* 147, 161–166, 2002.

MACEDO, G. **Síntese de ésteres de aroma por lipases microbianas em meio livre de solvente orgânico.** 1997. 143f. Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1997.

MAIA, M.M.D.; MORAIS, M.M.C.; MORAIS JR., M.A.; MELO, E.H.M.; LIMA FILHO, J.L. **Production of extracellular lipase by phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1.** *Revista de Microbiologia*, v. 30, p. 304-309, 1999.

MAHADIK, N.D.; BASTAWDE, K. B.; PUNTAMBEKAR, U. S.; GOKHALE, D. V. **Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation.** *Process Biochemistry*, vol. 39, p. 2031-2034, 2004.

MALDONADO, R. R. **Produção, purificação e caracterização da lipase de *Geotrichum candidum* obtida a partir de meios industriais.** Campinas: 2006. Dissertação de Mestrado. Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Campinas, Faculdade de engenharia de alimentos.

MARTINS, T. S. **Produção e purificação de lipases de *Yarrowia lipolytica*.** Dissertação de mestrado. Rio de Janeiro: 2001. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MATARAZZO, Dante C. **Análise Financeira de Balanços – Abordagem Básica e Gerencial.** 4.ed. São Paulo: Atlas, 1997.

MATOS, F. **Margem bruta de lucro das empresas brasileiras.** Pesquisa Deloitte Touche Tohmatsu, 2003. [http://www.deloitte.com/assets/Dcom-Brazil/Local%20Assets/Documents/Pesquisa%20margem%20bruta%20de%20Lucros%20port\(2\).pdf](http://www.deloitte.com/assets/Dcom-Brazil/Local%20Assets/Documents/Pesquisa%20margem%20bruta%20de%20Lucros%20port(2).pdf) (Acessado em 04/10/2011)

MAZIN, A.P.R.; de ANDRÉA, T.V. **Estudo de viabilidade econômica de produção de glucoamilase por fermentação no estado sólido a partir de rejeito agroindustrial.** Rio de Janeiro, 2010. Monografia. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MELO, A.F. **Produção de lipase e sua aplicação na obtenção de biodiesel e na construção de um biossensor para monitorar a qualidade do biocombustível.** Rio de Janeiro, 2010. Tese De Doutorado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MONTESINOS, J.L.; OSBRADORS, N.; GORDILLO, M.A.; VALERO, F.; LAFUENTE, J.; SOLÀ, C. **Effect of nitrogen sources in batch and continuous cultures to lipase production by *Candida rugosa*.** *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 59, p.25-37, 1996.

OBRADORS N.; MONTESINOS, J.L.; VALERO, F.; LAFUENTE, F.J.; SOLÀ, C. **Effects of different fatty acids in lipase production by *Candida rugosa*.** *Biotechnology letters*.v. 15, p. 357-360, 1993.

OLIVEIRA, D.T.M. **Lipase extracelular de fungo filamentoso: Isolamento e**

caracterização parciais. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2000. 152 p. (Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos).

PALEKAR, A. A.; VASUDIVAN, P. T.; YAN, S. **Purification of Lipase: a Review.** *Biocatalysis and Biotransformation*, v. 18, nº 3, p. 177-2000, 2000.

PATEL, R.N. **Microbial / enzymatic synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals.** *Enz. Microbial Technol.*, v. 31, p. 804-826, 2002.

PERLINGEIRO, C.A.G. **Engenharia De Processos - Análise, Simulação, Otimização e Síntese de Processos.** 1ª Ed. Edgard Blucher. 208p. 2005.

PERNAS, M.A.; LOPEZ, C.; PASTRANA, L.; RUA, M.L. **Purification and characterization of Lip2 and Lip3 isoenzymes from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation.** *Journal Biotechnology* 2000; 84:163–74.

PETERS, M.A.; TIMMERHAUS, K.D. **Plant Design and Economics for Chemical Engineers.** 4ª ed. McGraw-Hill. 910p. 1991.

PINHEIRO, T.L.F., **Produção de lipases por fermentação em estado sólido e fermentação submersa utilizando *Penicillium verrucosum* como microorganismo.** Erechim: 2006. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada.

PITT, J.I.; HOCKING, A.D. **Fungi and food spoilage.** 2. ed. Maryland: Aspen, 1999. 593p.

PIZARRO, A.V.L.; PARK, E.Y. **Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth.** *Process Biochemistry*, v.38, p. 1077-1082, 2003.

REED, G. **Enzymes in food processing.** 2. ed. Wisconsin: Academic Press, 1975. 573 p.

RUDD, D.F.; WATSON, C.C.. **Strategy of Process Engineering,** John Wiley and Sons, 1968.

SABUQUILLO, P.; REINA, J.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. **Interfacial affinity chromatography of lipases: Separation of different fractions by selective adsorption on supports activated with hydrophobic groups.** *Biochimica and Biophysica Acta*, Amsterdam, v.1388, p.337-348,1998.

SANROMAN, M.A.; COUTO, S.R. **Application of solid-state fermentation to food industry-A review.** *Journal of Food Engineering* 76, 291–302, 2006.

SHARMA,R.;CHISTI,Y.;BANERJEE,U.C. **Production, purification, characterization, and applications of lipases.** *Biotechnology Advances*, vol 19, p. 627-662, 2001.

SHIRAZI, S.H.; RAHMAN, S.R.; RAHMAN, M.M. **Short communication: production of extracellular lipases by *Saccaromyces cerevisiae*.** *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 14, p. 595-597, 1998.

TAN, S.; APENTEN, R. K. O. **Low temperature organic phase biocatalysis using psychrotroph derived lipase.** In: BIOFLAVOUR 95, Dijon. Lectures and posters. Paris: INRA Editions, 1995. v. 1. p. 361.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. **Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches.** *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.9, p.113-148, 2000.

VULFSON, E. N. **Industrial applications of lipases.** In WOOLLEY, P.; PETERSEN, S. B. **Lipases: their structure, biochemistry and application.** Great Britain: Cambridge University Press, 1994, p. 271.

YANG, X., WANG, B.; CUI, F.; TAN, T. **Production of lipase by repeated batch fermentation with immobilized *Rhizopus arrhizus*.** *Process Biochemistry*, vol. 40, p.2095-2103, 2005.

ZHUANG, J. **Economic Analysis of Cellulase Production Methods for Bio Ethanol: Comparison of Liquid Versus Solid State Cultivation Approaches Using SuperPro Designer.** Project Report, 2006.

Anexo 1

DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

- **Quantificação do Crescimento Celular**

O crescimento celular foi acompanhado através de medidas de absorvância em espectrofotômetro marca Quimis a 600 nm e esses valores foram convertidos para mg p.s. cél/mL utilizando-se o fator de conversão obtido pela curva de peso seco, que é apresentada na Figura 4. A curva de peso seco é obtida através de uma suspensão de células em solução salina (água destilada com 0,9% (p/v) de NaCl). Desta suspensão, foi retirada uma alíquota de amostra (10 mL), filtrada em papel de filtro Millipore (0,45 µm), seca em luz de infravermelho por 30 minutos e, em seguida, pesada. Da mesma suspensão foram realizadas diferentes diluições, de modo a se obter concentrações celulares distintas, sendo então, determinada a absorvância destas amostras em espectrofotômetro a 600 nm, obtendo-se a curva de peso seco. (Melo, 2010)

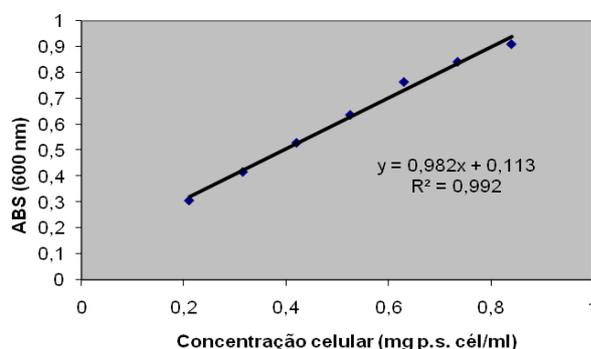


Figura 6 - Curva de peso seco obtida com células de *Candida rugosa*.

- **Determinação da Atividade Lipásica**

A atividade da enzima lipase foi medida através do método, espectrofotométrico. Este método é mais simples e rápido e, portanto, foi adotado para este projeto:

- Método Espectrofotométrico - Atividade Hidrolítica em p-Nitrofenil Laurato

Neste presente estudo, a reação de hidrólise de p-nitrofenil laurato (0,18 g/L) foi catalisada pela enzima livre (Figura 5) e realizada em tampão fosfato de

potássio a 50 mM e pH 7 (Amaral *et al.*, 2006). A massa de p-nitrofenil laurato foi dissolvida em dimetilsulfóxido (sempre na proporção 0,018g:1mL) e então diluída em tampão. Em 1,8 mL de substrato a 37°C, foram adicionados 0,2 mL de solução da enzima livre e, através da variação de absorvância (medida em espectrofotômetro a 410 nm contra um branco de reação), foi monitorada a quantidade de produto formado durante 100 segundos.

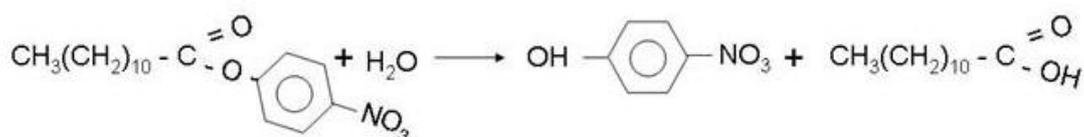


Figura 7 – Reação de hidrólise do p-nitrofenol laurato (Brígida 2010)

O cálculo da atividade da enzima lípase pelo método espectrofotométrico foi realizado através da equação a seguir.

$$A = \frac{\Delta Abs * D * f * V_R}{\Delta t * V_A}$$

sendo:

A - atividade da enzima (U/L), onde (U) corresponde a uma unidade de atividade enzimática hidrolítica que é definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de p-nitrofenol por minuto nas condições do ensaio;

ΔAbs - variação de absorvância no intervalo de tempo (Δt em minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear dos valores de absorvância;

D - diluição realizada para a leitura da solução enzimática;

f - fator de conversão dos valores de absorvância para a concentração de p-nitrofenol, obtido através da construção de uma curva padrão de p-NFL em concentração variando entre 0,01 e 0,2 $\mu\text{mol.mL}^{-1}$.

Δt - o tempo decorrido de análise, em minutos;

V_A - o volume (L) da solução enzimática utilizada no ensaio e

V_R - o volume (L) do meio reacional total.