



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
***CAMPUS* ALTO PARAÓPEBA**

WILLER FERREIRA DA SILVA JUNIOR

PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Aspergillus niger* EM UM BIORREATOR DE BAIXO CUSTO

OURO BRANCO
2015

WILLER FERREIRA DA SILVA JUNIOR

PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Aspergillus niger* EM UM BIORREATOR DE BAIXO CUSTO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Departamento de Química,
Biotecnologia e Engenharia de
Bioprocessos, UFSJ/CAP, como requisito
parcial para a obtenção do título de Bacharel
em Engenharia de Bioprocessos

Profº Edson Romano Nucci (orientador)

**OURO BRANCO
2015**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO JOÃO DEL-REI
CAMPUS ALTO PARAÓPEBA

WILLER FERREIRA DA SILVA JUNIOR

PRODUÇÃO DE LIPASES POR *Aspergillus niger* EM UM BIORREATOR DE BAIXO CUSTO

BANCA EXAMINADORA

Pro. Dr. Edson Romano Nucci
Orientador (UFSJ/DQBIO)

Prof. Dr. Boutros Sarrouh
Prof. convidado (UFSJ/DQBIO)

Prof. Dr. Ênio Nazaré de Oliveira Júnior
Prof. convidado (UFSJ/DQBIO)

OURO BRANCO
2015

DEDICATÓRIA

"... que é muito difícil você vencer a injustiça secular, que dilacera o Brasil em dois países distintos: o país dos privilegiados e o país dos despossuídos." (Ariano Suassuna)

Dedico esse trabalho especialmente à minha mãe, amiga, professora- e de vez em quando, aluna-, Maria Beatriz da Silva, a qual sempre priorizou o estudo de seus filhos, desde nossas infâncias.

Dedico-o também

Aos cidadãos brasileiros

A todos os professores

À “menina do bolo”, minha grande amiga, que me alimentou durante esses anos com reflexões, críticas e esperança, ensinando-me que o que separa a utopia da fantasia é a ação

Àqueles que sonharam em chegar até aqui, mas tiveram seus planos impossibilitados por interpéries da vida

Àqueles que almejavam obter uma educação de qualidade e construir sua carreira, mas foram excluídos e/ou marginalizados da/pela sociedade

Aos que lutam por um Brasil melhor, com a promoção e democratização da educação libertadora e de qualidade, respeito aos direitos humanos e extinção das desigualdades sociais.

AGRADECIMENTOS

“Poucos rios surgem de grandes nascentes, mas muitos crescem recolhendo filetes de água”. (Ovídio)

Ao Prof^o Edson Romano Nucci pela orientação atenciosa no desenvolvimento desse trabalho, por sua alegria, entusiasmo e dedicação ao curso, por suas risadas que me alegraram; por tudo que me ensinou

Aos meus pais/padrinhos José Carlos de Magalhães, Daniela Leite Fabrino e Bruna Mara Aparecida de Carvalho pelos ensinamentos, suporte e pelas inúmeras portas que me abriram ao longo da graduação

Aos professores da UFSJ/CAP pelo empenho em nos fornecer uma base sólida para que possamos nos aventurar nos desafios da profissão

Aos professores Marcel Otavio Cerri e Jorge Fernando Brandão Pereira (UNESP-Araraquara) pelas ricas sugestões sobre esse trabalho

Aos técnicos (Gicele, Priscila) e amigos de laboratório (Lorena, Katialaine, Maria Rita, Mayara, Viníciusn, Ana) que facilitaram esse trabalho e compartilharam ideias, frustrações e risadas

A Arianne Souza, por ter me ajudado inúmeras vezes e por ter aguentado minhas loucuras no laboratório

Aos amigos que me cativaram e fizeram esses cinco anos mais suaves e prazerosos

Às inesquecíveis Lafaietes, pela amizade e força em cada momento da engenharia

A minha família da república Calculistas (Thamires, Heloisa, Paola e Andreia) pela amizade, solidariedade e a experiência única de viver aquilo que pojetamos para a sociedade brasileira

Ao Programa de Educação Tutorial (PET-DPCFC) por ter me levado à reflexão inúmeras vezes; reflexões essas que me ajudaram a amadurecer como cidadão-profissional crítico e consciente do contexto social ao nosso redor

Aos idealizadores e implementadores das políticas de ações afirmativas pela busca da inserção das minorias nos diversos setores sociais e da igualdade social.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior (CAPES) e ao Ministério da Educação (MEC) pelas bolsas concedidas durante a graduação

A todos que levaram um pouco de mim e deixaram um pouco de si.

EPÍGRAFE

“Não basta saber, é preferível saber aplicar. Não é bastante querer, é preciso saber querer”. (Goethe)

«La machine n’isole pas l’homme des grands problèmes de la nature mais le plonge plus profondément
en eux.»

Antoine de Saint-Exupéry dans *Terre des Hommes*, 1939

RESUMO

Embora muitos estudos em biocatálise tenham sido feitos na área de fabricação de ésteres, poucas empresas já utilizam enzimas ou micro-organismos para a síntese desses produtos. Na catálise enzimática, isso se deve principalmente ao alto custo do biocatalisador, o que inviabiliza o seu uso na fabricação de produtos de baixo valor agregado, como o biodiesel. Nesse trabalho, estudou-se estratégias de minimização do preço de obtenção da enzima. Para tanto, construiu-se um reator de 5 L não-asséptico feito de PVC de *design* flexível, podendo ser operado no modo coluna de bolhas e tanque agitado (STR, do inglês *Stirred Tank Reactor*), cujo custo total foi de R\$ 84,87. O sistema de agitação do reator (modo tanque agitado) foi projetado para utilizar a força promovida pela saída do ar de tubos propulsores posicionados nos impelidores como fonte de potência; rotações de até 0,149 rps foram obtidas utilizando-se vazões de ar de 20 litros por minuto (LPM). A modelagem do sistema de agitação desenvolvido apresentou acurácia considerável mesmo quando regime de escoamento laminar do fluido foi assumido e sua extrapolação mostrou que rotações da ordem de 16 rps podem ser alcançadas a vazões de 0,0006 m³/s. No modo coluna de bolhas, alcançaram-se coeficientes globais de transferência de oxigênio da ordem de 0,002918 s⁻¹ para 20 LPM e 0,005573 s⁻¹ para 28 LPM. Esse modo de operação foi escolhido realizar cultivos de *Aspergillus niger* para produção de lipase, utilizando-se 20 LPM de ar, alimentação contínua de solução salina a 8,496 mL/h e óleo de soja a uma taxa de 2,833 mL/h após 48 h de batelada. Dentre as três composições de meio analisadas (0% óleo e 2% sacarose, 2% óleo e 1% sacarose, 4% óleo e 0% sacarose), a melhor produtividade volumétrica, maior concentração de enzima e menor custo por unidade de atividade enzimática (16,20 U/L.h, 1944,44 U/L e 0,008 R\$/U, respectivamente) foram obtidas no cultivo com 2% de óleo e 1% de sacarose. Um cultivo utilizando-se condições industriais ainda foi feito e mostrou o crescimento do *A. niger* em meio contendo 1% de óleo de soja usado não esterelizado previamente; embora a atividade enzimática tenha sido da ordem de seis vezes mais baixa que na condição ótima de produção, esse cultivo mostrou a possibilidade de reutilização do óleo de soja e de produção de lipase em condições não-assépticas. Uma modelagem do processo utilizando balanços de massa para a biomassa, substrato e produto (para a condição de maior produção de enzima) foi feita e a solução das equações diferenciais mostrou boa concordância com dados experimentais da evolução da biomassa.

Palavras-chave: Biorreatores, lipase, modelagem e simulação de processos

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Divisão do mercado global de ésteres de ácidos graxos	15
Figura 2- Estruturas químicas de ésteres utilizados em cosméticos	18
Figura 3- Produção de biodiesel no ano de 2014	21
Figura 4- Reação simplificada de glicerólise	24
Figura 5- Comparação entre métodos convencionais e enzimáticos de produção de ésteres	25
Figura 6- Representação do sistema de produção contínua de biodiesel catalisado por lipase	28
Figura 7- Desenho do projeto do reator	29
Figura 8- Experimento para medida do diâmetro médio das bolhas	31
Figura 9- Vista frontal e superior do sistema de agitação (primeiro <i>design</i>) do reator	35
Figura 10- Visão geral do biorreator montado (a) e em funcionamento (b)	36
Figura 11- Segundo <i>design</i> do impelidor com propulsores	37
Figura 12- Diagrama de forças sobre o tubo capilar e deslocamento do ar	39
Figura 13- Cinética de crescimento de <i>A. niger</i> e produção de lipase	44
Figura 14- Morfologia tipo <i>pellet</i> /flocos do <i>A. niger</i> em biorreator de coluna de bolhas e filme de óleo	44
Figura 15- Planta de uma biorrefinaria hipotética com produção de lipase	47
Gráfico 1- Validação da acurácia do modelo desenvolvido	41
Gráfico 2- Correlação entre a velocidade do impelidor e a vazão volumétrica de ar	42
Gráfico 3- Extrapolação do modelo para vazões de ar maiores	42

Gráfico 4- Valores simulados e experimentais dos componentes do sistema	51
Gráfico 5- Gráfico 5- Simulação da produção de lipase nos níveis -1 e +1 de um experimento composto central	52
Quadro 1- Produtos da Evonik Industries fabricados com tecnologia sustentável	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Efeito da concentração de ésteres nas características sensoriais de formulações de cremes	18
Tabela 2- Efeito da concentração de ésteres na viscosidade de cremes	19
Tabela 3- Custo total do reator	35
Tabela 4- Coeficientes de transferência de oxigênio para diferentes condições de operação	37
Tabela 5- Dados das frequências do impelidor obtidas por medição com tacômetro	40
Tabela 6 – Estimativa do custo de produção da enzima e o custo por unidade de atividade enzimática	46
Tabela 7- Dados da cinética de produção de lipase de <i>A. niger</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B5, B20 e B100	Diesel com 5, 20 e 100% de biodiesel, respectivamente
BES	Ácido bis(hidroxietil)amino etanosulfônico
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CADC	Cultura de Alta Densidade Celular
D.C.	Depois de Cristo
DCOG	1,3-dicicloexil-2-noctilguanidina
EPA	Environmental Protection Agency
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>)
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HLB	<i>Hydrophilic-Lipophilic Balance</i>
IEA	International Energy Agency
LCA	<i>Life Cycle Assessement</i>
LCCA	<i>Life Cycle Cost Analysis</i>
LPM	Litros por minuto
NO _x	Óxidos de nitrogênio
PEG	Polietilenoglicol
P&G	Procter & Gamble
pH	Potencial hidrogeniônico
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
PVC	Policloreto de vinila
SO _x	Óxidos de Enxofre
STR	<i>Stirred Tank Reactor</i>
TBD	Triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno
TCG	1,2,3-tricicloexilguanidina
TES	Ácido tris(hidroximetil)metilamino etanosulfônico
TMR	<i>Tranparency Market Research</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

A	Área do fluido sobre a qual a tensão de cisalhamento é aplicada	m^2
C	Concentração de oxigênio dissolvido na fase líquida	ppm
C^*	Concentração de saturação do oxigênio na fase líquida	ppm
D	Taxa de diluição	h^{-1}
D_b	Diâmetro médio da bolha de ar	m
D_i	Diâmetro do impelidor	m
f_{aL}	Fator de correção para o regime laminar	-
f_{aT}	Fator de correção para o regime turbulento	-
F_t	Força tangencial	N
g	Aceleração da gravidade	$9,81 \text{ m.s}^{-2}$
k_l	Constante de proporcionalidade para o regime laminar	70
K_s	Coefficiente de saturação	$g.L^{-1}$
k_La	Coefficiente volumétrico de transferência de massa	s^{-1}
N_i	Velocidade de rotação do impelidor	rps
N'_p	Número de potência	5-6
ω	Velocidade angular	$rad.s^{-1}$
p	Concentração do produto	$g.L^{-1}$
p_1 e p_2	Pressões no ponto 1 e 2, respectivamente	Pa
P	Quantidade de produto	U
P_c	Potência do motor empregado na agitação do fluido	W
P_g	Potência gerada pelo sistema de agitação com tubos propulsores	W
p_{max}	Concentração de produto máxima	$U.L^{-1}$
p_i	Concentração de produto inicial	$U.L^{-1}$
π	Pi	3.14
ρ	Densidade do fluido	$Kg.m^{-3}$
Q	Vazão de alimentação	$m^3.s^{-1}$
Q_v	Produtividade volumétrica	$g.L^{-1}.h^{-1}$
r	Comprimento do tubo propulsor	m

Re	Número de Reynolds	-
s	Concentração de substrato	$g.L^{-1}$
S	Quantidade de substrato	g
$\dot{S}$	Vazão mássica de substrato na alimentação	$g.h^{-1}$
t	Tempo	h
T	Torque	N
τ	Tensão de cisalhamento	Pa
μ	Taxa de crescimento específica	h^{-1}
μ_L	Viscosidade do fluido	Pa.s
μ_{max}	Taxa de crescimento específica máxima	h^{-1}
U	Unidade de atividade enzimática	$\mu mol.min^{-1}$
v	Velocidade de escoamento do ar	$m.s^{-1}$
v_b	Velocidade com que a bolha sai dos tubos propulsores	$m.s^{-1}$
v_t	Velocidade de ascensão da bolha de ar	$m.s^{-1}$
V	Volume	L
V_s	Velocidade terminal do gás	$m^3.s^{-1}$
x	Concentração de biomassa	$g.L^{-1}$
X	Quantidade de biomassa	g
y	Altura entre pontos onde a a velocidade de saída da bolha é máximo e mínimo	m
$Y_{p/s}$	Rendimento do produto por substrato consumido	-
$Y_{x/s}$	Rendimento da biomassa por substrato consumido	-
γ	Peso específico	$N.m^{-3}$
z_1 e z_2	Alturas no ponto 1 e 2, respectivamente, a partir de um ponto de referência	m

SUMÁRIO

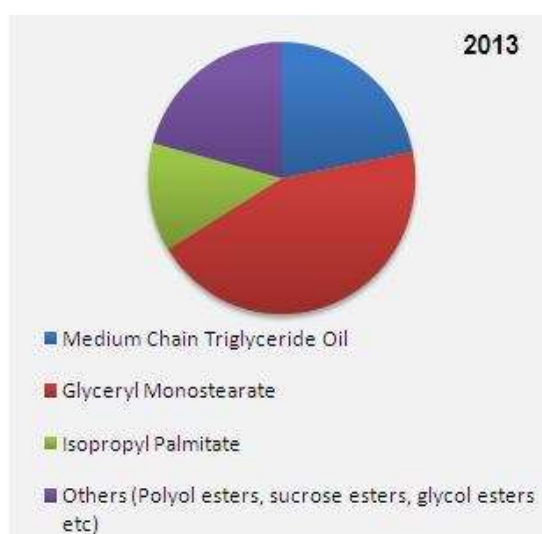
1. INTRODUÇÃO	15
1.2. APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE ÉSTERES	
1.2.1. Ésteres utilizados em cosméticos	16
1.2.2. Biodiesel	20
1.3. PRODUÇÃO DE ÉSTERES	22
1.3.1. Emprego de enzimas na produção de ésteres para cosméticos.....	24
1.3.2. Emprego de enzimas na produção biodiesel.....	27
2. METODOLOGIAS	
2.1. <i>DESIGN</i> E CONSTRUÇÃO DO REATOR	29
2.2. CARACTERIZAÇÃO E MODELAGEM DO REATOR	30
2.3. PRODUÇÃO DE LIPASES POR <i>A. niger</i>	
2.3.1. Preparo da cultura estoque	31
2.3.2. Otimização do processo	32
2.4. MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO	
2.4.1. Quantificação da enzima	33
2.4.2. Quantificação da biomassa	33
2.5. SIMULAÇÕES DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASE	34
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	
3.1. BIORREATOR	
3.1.1. Análise e caracterização do biorreator	34
3.1.2. Modelagem e simulação do propulsor	38
3.2. PRODUÇÃO DE LIPASE DE <i>A. niger</i>	
3.2.1. Otimização do processo	43
3.2.2. Modelagem e simulação da produção de lipase	48
4. CONCLUSÕES	51
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO A- ALGORITMO PARA SIMULAÇÃO DA VELOCIDADE DO IMPELIDOR	59
ANEXO B- ALGORITMO DE SIMULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE	61

1. INTRODUÇÃO

Ésteres são empregados em diversos processos produtivos para conferir aroma, textura ou miscibilidade aos produtos, bem como na geração de energia. Alguns exemplos são o butil butirato, usado na indústria de alimentos (aroma similar ao de abacaxi), o biodiesel, o meristil meristato, isopropil palmitato, gliceril oleato, os quais são utilizados em cosméticos como emolientes- confere sensação de hidratação- e/ou emulsificante-promove mistura entre as fases aquosas e orgânica- (ANSORGE-SCHUMACHER; VERÍSSIMO et al, 2015; THUM, 2013). Novas tendências do mercado têm direcionado as indústrias para a produção de ésteres funcionais, como o retinil palmitato, que apresenta atividade antioxidante (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013).

Em 2013, o mercado de ésteres de ácidos graxos atingiu a demanda de 1.088.800 toneladas; com uma taxa de crescimento anual composta de 4,1% durante 2014 e 2020, estima-se que tal mercado valerá 2,24 bilhões de dólares no ano de 2020 de acordo com a *Transparency Market Research* (TMR) (2015a). Essa estimativa otimista deve-se a ampla aplicação dos ésteres nos diversos segmentos da indústria, mas principalmente, devido à indústria de alimentos e de produtos de cuidado pessoal. Entretanto, o alto preço das matérias-primas parece ser um obstáculo que empresas como a Cargill Incorporated, KLK OLEO and Procter & Gamble (P&G) Chemicals, Faci Asia Pacific Pte Ltd e Fine Organics terão de enfrentar para atender as demandas do mercado. A Figura 1 mostra o mercado de ésteres segmentado nos principais produtos no ano de 2013 (TMR, 2015a).

Figura 1- Divisão do mercado global de ésteres de ácidos graxos



Adaptado de: TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2015a.

Tradicionalmente, esses ingredientes são extraídos de fontes naturais ou produzidos sinteticamente, gerando impactos ambientais revelantes (desmatamento de áreas nativas, grande uso de solventes orgânicos, geração de efluentes ácidos). Entretanto, com o desenvolvimento da biotecnologia, a pressão de órgãos ambientais e as novas tendências de mercado, as indústrias têm buscado meios de produção menos agressivos ao ambiente. Visto esse cenário, lipases têm sido empregadas na produção desses ésteres e mostrado vantagens, como a redução de gastos energéticos, de emissão de CO₂ e do teor de fosfato em efluentes (HOLM, 2007).

A principal fonte de obtenção de lipases tem sido os micro-organismos, mas elas podem ser obtida também a partir de vegetais e animais. As enzimas microbianas produzidas por fungos têm recebido especial destaque por serem liberadas no meio extracelular, facilitando o processo *downstream*. Atualmente, os fungos filamentosos que têm sido mais utilizados são os dos gêneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Geotrichum* e *Fusarium* (COLLA, et al, 2012). O *A. niger* é um fungo aeróbio, classificado como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*), cujas características de crescimento permitem que o seu cultivo seja feito em reatores e meios alternativos mais baratos. Além disso, as lipases desse fungo têm sido empregadas na produção de alguns ésteres, como o butil butirato (VERÍSSIMO, et al., 2015).

Embora o uso de lipases se mostre bastante atrativo, deve-se levar em conta o custo da enzima (produção *in situ* ou a sua aquisição de um fornecedor), economia de energia, eficiência do processo enzimático, necessidade de modificações da planta de produção, dentre outros, para que o processo enzimático se torne viável (THUM; OXENBØLL, et al., 2008). A minimização do custo da enzima, é dessa forma, um fator relevante na implementação de vias enzimáticas de obtenção de ésteres.

1.2. APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DE ÉSTERES

1.2.1. Ésteres utilizados em cosméticos

O uso de ésteres em preparações para a pele já era feito pela sociedade egípcia através de óleos vegetais e/ou gorduras animais, como o óleo de oliva, de gergelim, amêndoa, amendoim, e abacate, manteiga do coco, palma e chocolate, cera de abelha, bem como gordura de castor, urso e ganso. Em 150 D.C. o primeiro creme frio, cuja base foram os óleos de oliva e amêndoa, foi elaborado pelo médico Galen (BERDICK, 1972). Entretanto, a formulação de cosméticos tem sido mudada ao longo dos anos no que tange os ésteres utilizados, inicialmente com a substituição de gorduras animais

por óleos vegetais, posteriormente pela introdução de ésteres sintéticos e mais recentemente pelo uso de ésteres funcionais (anti-oxidantes, vitaminas, dentre outros) (GALLARATE et al., 1999).

Em formulações de cremes, por exemplo, ésteres são os componentes não aquosos majoritários da base do produto, agindo principalmente como emolientes (até 10% da formulação), emulsificante (até 4% da formulação), fragrâncias e aromas (IWATA; SHIMADA, 2013). Agentes emolientes amaciam e suavizam a pele, fragrâncias dão aroma ao produto, enquanto que emulsificantes “promovem a formação de misturas íntimas de líquidos não miscíveis, alterando a tensão interfacial” (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA-ANVISA, 2012).

O efeito da presença dessas moléculas nas propriedades sensoriais do produto depende das características químicas e moleculares do éster e por isso, pode ser correlacionado – até certo ponto – com parâmetros físico-químicos e reológicos dos mesmos; por exemplo, ésteres de cadeia ramificada e insaturada proporcionam sensações de hidratação e maciez, respectivamente, maiores que ésteres de cadeia linear. Esses atributos podem ser relacionados à viscosidade dos ésteres (LOUBAT-BOULEUC, 2014), que por outro lado, deve-se à força das interações hidrofóbicas entre as moléculas (ésteres de cadeia ramificada são menos viscosos porque as suas moléculas dificilmente se pareiam, reduzindo as forças de interação hidrofóbica). As Tabelas 1 e 2 mostram como as concentrações de determinados ésteres afetam as propriedades sensoriais e reológicas de cremes.

À guisa de exemplificação, ésteres lineares de cadeias longas, tais como cetil-palmitato e estearil estearato (Figura 2 a) conferem sensações de seco, leveza e firmeza em formulações de cremes. Por outro lado, ésteres que possuem tanto a cadeia do ácido quanto a do álcool ramificada- por exemplo, miristil-etilexanoato e etil-exilpalmitato (Figura 2b) –, dão uma sensação de maciez e suavidade ao produto, embora os do segundo tipo levem também a sensação de oleosidade; ésteres com ambas as cadeias ramificadas, como o isononil-isononato (Figura 2c), promovem sensação de leveza e delicadeza; ésteres de ácidos diméricos dão à formulação uma sensação viscosa e de liga forte, bem como uma sensação favorável persistente; já os ésteres de pentaeritritol (Figura 2d) dão sensação de hidratação a cremes, devido a complexidade de sua estrutura, que retém moléculas de água (IWATA; SHIMADA, 2013).

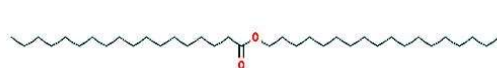
Tabela 1- Efeito da concentração de ésteres nas características sensoriais de formulações de cremes

	Ingrediente	Porcentagem na formulação (100g)		
		(a) ¹	(b) ¹	(c) ¹
1	Ácido esteárico	5,6	5,6	5,6
2	Cera de abelha	—	—	1,2
3	Gliceril estearato	1,2	—	1,2
4	Cetil palmitato	—	—	2,4
5	Cetil etil-exanoato	2,4	4,8	1,6
6	Miristil álcool	0,6	—	—
7	Cetoestearil álcool	1,8	—	—
8	Behenil álcool	—	2,4	3,6
9	Esqualano	0,6	2,4	0,6
10	Tocopherol	0,1	0,1	0,1
11	Dimeticona 6cs	1,2	1,2	1,2
12	PEG-40 estearato	1,2	1,2	1,2
13	PEG-25 estearato	0,4	0,4	0,4
14	Metil parabeno	0,2	0,2	0,2
15	Propil parabeno	0,1	0,1	0,1
16	Hidróxido de sódio 10%	2	2	2
17	Polímero de carboxivinila	0,2	0,2	0,2
18	Goma xantana	0,1	0,1	0,1
19	Glicerina	3	4	2
20	BG	3	3	2
	Água purificada	76,3	72,3	74,3

¹Cremes (a) leve, (b) hidratante e (c) não oleoso e não escorregadio

Fonte: Adaptado de IWATA; SHIMADA, 2013.

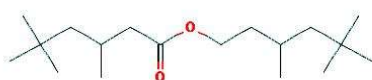
Figura 2- Estruturas químicas de ésteres utilizados em cosméticos



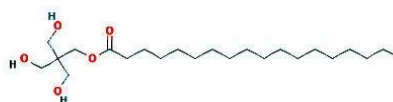
Estearil estearato (a)



Etil-exilpalmitato (b)



Isononil-isononato (c)



Gruenau S (d)

Fonte: Adaptado de PUBCHEM, [ca. 2014].

Tabela 2- Efeito da concentração de ésteres na viscosidade de cremes

Ingrediente		Porcentagem na formulação (100g)			
1	Ácido esteárico	5,4	5,4	5,4	5,4
2	Cetil etilexanoato	4	4	4	4
3	Cetil palmitato	0,8	0,8	0,8	0,8
4	Squalano	1,8	1,8	1,8	1,8
5	Behenil álcool	2,4	2,4	2,4	2,4
6	Polisorbato 80	2,4	—	2,4	—
7	Polisorbato 60	—	2,4	—	2,4
8	Sorbitan oleato	0,8	0,8	—	—
9	Sorbitan estearato	—	—	0,8	0,5
10	Dimeticona 6cs	0,8	0,5	0,5	0,5
11	Metil parabeno	0,2	0,1	0,1	0,1
12	Propil parabeno	0,1	0,1	0,1	0,1
13	Glicerina	2,4	3	3	3
14	Hidróxido de sódio 10%	2	2	2	2
Viscosidade pH	Água purificada	p/ 100g	p/ 100g	p/ 100g	p/ 100g
	Nº 4 12rpm, 30s	7000	8000	10000	13500
		7,2	7,2	7,2	7,2

Fonte: Adaptado de IWATA; SHIMADA, 2013.

Além da viscosidade, outro parâmetro avaliado é o Balanço Hidrofílico- Lipofílico (HLB, do inglês *Hydrophilic-Lipophilic Balance*), que indica se o éster é lipofílico (HLB de 0 a 10) ou hidrofílico (HLB de 10 a 20) e afeta diretamente a formação de emulsões estáveis. Valores de HLB entre 9 e 12 são ideais para processos de emulsificação; polioxietileno (20) sorbitan tri-oleato (Tween85) (um emulsificante), por exemplo, possui HLB de 11 (GANI et al., 2011; LOUBAT-BOULEUC, 2014). Dessa forma, uma das principais tarefas do departamento de desenvolvimento de produtos cosméticos de uma empresa é encontrar as proporções entre esses ingredientes que forneçam as características sensoriais desejadas.

Outros exemplos de emolientes comumente utilizados são o caprilato de glicerol, palmitato de isopropila, miristato de isopropila, palmitato de etilhexila, stearato de etilhexila, cocoato de etilhexila e isononanoato de cetearila; enquanto que os ésteres surfactantes frequentemente encontrados em formulações são: mono-, di- e triésteres de glicerol; mono- e distearato de glicerol, oleato de glicerol, mono- e dilaurato de glicerol; laurato, estearato, oleato de PEG 300; estearato de PEG 300, PEG 400 e PEG 1500; dicaprilato/dicaprato de PEG (LOUBAT-BOULEUC, 2004). Cerca de 490 ésteres emolientes são listados na base de dados da Comissão Européia de Segurança da Saúde e de Alimentos,

contra 480 emulsificantes, sendo que muitos deles possuem ambas propriedades (European Commission, [ca. 2010]).

Cabe-se citar também a “recente” introdução de ésteres de açúcar (sucroésteres) e ésteres funcionais em formulações cosméticas. Os sucroésteres são ésteres surfactantes obtidos da transesterificação de açúcares com ésteres de metila ou esterificação direta açúcar-ácido, sendo considerados naturais; exemplos dos mesmos são o α -butilglicosídeo linoleato e sacarose estearato (BOUSQUET et al., 1998; LOUBAT-BOULEUC, 2004; PAULA et al., 2005). Na classe de ingredientes funcionais, ésteres de vitaminas e antioxidantes são os mais frequentes. Retinil palmitato, retinil acetato (derivados da vitamina A), ascorbil palmitato (derivado da vitamina C), tocoferol acetato (derivado da vitamina E) são adicionados a formulações cosméticas para conferir tanto as bioatividades dessas vitaminas (fortificação da pele e cabelo, ação anti-inflamatória e efeito rejuvenecedor, respectivamente) quanto ação anti-oxidante (GUARATINI; GIANETI; CAMPOS, 2006; LUPO, 2001).

Uma vez que a maioria desses compostos são produzidos a partir de óleos vegetais e produtos petroquímicos, pode-se concluir que a indústria tem desenvolvido várias formas de sintetizá-los.

1.2.2. Biodiesel

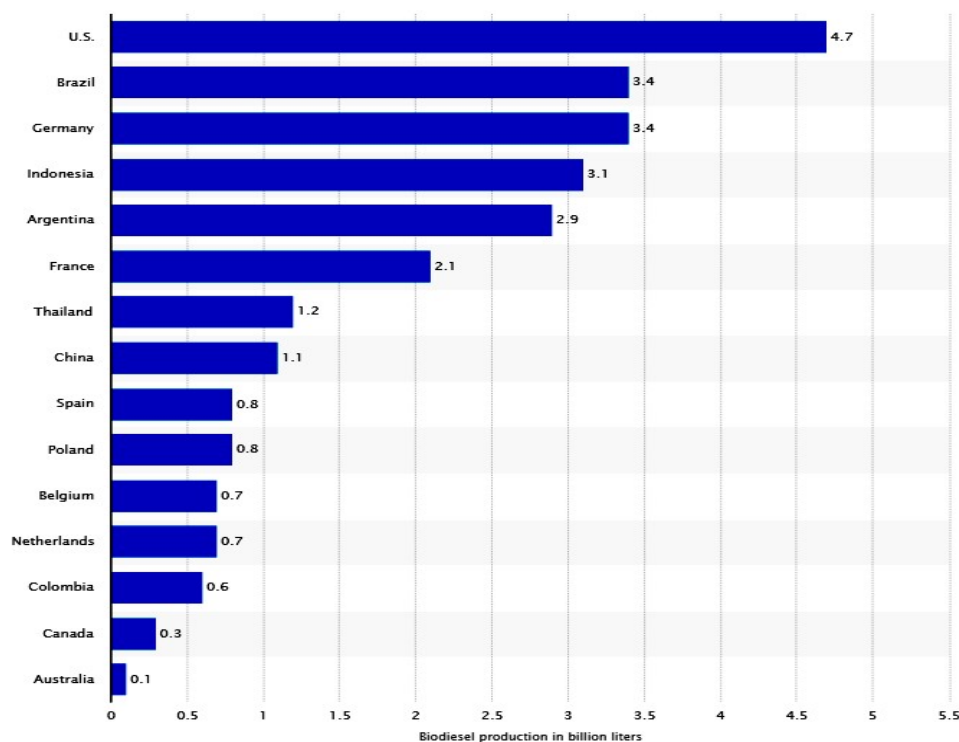
O biodiesel é um combustível biodegradável e fonte de energia renovável que substitui parcial (B5 e B20) ou totalmente (B100) o diesel comum proveniente do petróleo (BRASIL, [2005a]). Tradicionalmente, ele é classificado como metilésteres, embora recentemente o bioetanol tenha sido utilizado como substituto do metanol para tornar o biodiesel mais sustentável e barato (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY-IEA, 2007), dando origem a etilésteres. Com a aplicação direta em motores a diesel, a qualidade e parâmetros físico-químicos do biocombustível são fatores importantes que devem ser compatíveis com as tecnologias presentes nesses motores.

As principais matérias primas da produção do biodiesel são óleos vegetais como o da canola (Canadá), milho, girassol (EUA), dendê, mamona, soja e pinhão (Brasil), embora muitas pesquisas tenham sido desenvolvidas para a reutilização de óleo de cozinha e gorduras animais, sendo que processos industriais envolvendo a aplicação dessa última matéria prima já existem (BRASIL, [2005a]; JBS, 2015). No Brasil, o desenvolvimento desse biocombustível se deu principalmente a partir de 2004, quando foi lançado o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) pelo Governo Federal, que visa a ampliação da produção desse produto com consequente redução do seu custo, da dependência do petróleo e da importação de diesel de outros países, bem como o desenvolvimento

regional e social das comunidades próximas às usinas de produção através da inserção da agricultura familiar na cadeia produtiva do biodiesel (BRASIL, [2005b]). Quarenta e cinco das 65 usinas autorizadas pela Receita Federal já possuem o selo Combustível Social, que qualifica as empresas que praticam tal inserção. Com produção anual de 152,9 milhões de litros de biodiesel, a Usina de Biodiesel Darcy Ribeiro da Petrobras, por exemplo, trabalha com aproximadamente nove mil agricultores familiares para o suprimento de oleaginosas (PETROBRAS, 2015).

Em meados de 2007, a Alemanha era a maior produtora de biodiesel do mundo, enquanto o Brasil tinha apenas uma pequena participação no fornecimento mundial (IEA, 2007). Hoje, o Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial, juntamente com a antiga maior produtora (Figura 3), ficando atrás apenas dos Estados Unidos, o que deve ter decorrido do aumento obrigatório do teor de biodiesel no diesel comum em 2008, no Brasil. Além disso, a projeção é que o mercado de biodiesel continue aumentando até o final de 2015 (STATISTA, 2015).

Figura 3- Produção de biodiesel no ano de 2014



Fonte: ESTATISTA, 2015.

Metas mundiais para redução da “petrodependência” e redução de emissão de gases estufa têm sido estabelecidas em encontros como o RIO20 e a Conferência de Comércio e Desenvolvimento das Organizações Unidas. Dentre os benefícios ambientais do biodiesel estão a redução de poluentes SO_x e de 40 a 60% na emissão de CO_2 , bem como menor carga orgânica em efluentes municipais (quando óleo usado é empregado na fabricação do biocombustível) (IEA, 2007; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY- EPA, 2015). Além disso, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA estima que 3,2 unidades de energia são produzidas para cada unidade energética oriunda de combustíveis fósseis empregada na cadeia produtiva do biodiesel, contra apenas 0,8 para o diesel convencional.

Entretanto, três principais impactos socio-ambientais da produção do biodiesel devem ser destacados: o uso de terra para o plantio de matéria prima do biocombustível *versus* o plantio de alimentos, o desconhecimentos sobre os níveis de emissão de NO_x a partir da combustão do mesmo e a geração excessiva de glicerina (cerca de 10% da produção do biocombustível), que é maior que a sua demanda (EPA, 2015; PINHEIRO et al., 2010). Enquanto estudos estão sendo feitos para comprovar os níveis de emissão de NO_x , outras aplicações para a glicerina e novas fontes de ácidos graxos de cadeia longa devem ser encontradas. Nesse contexto, o uso de sebo e óleo usado, embora possuam disponibilidade limitada, custo adicional de pré-processamento e possam levar a rendimentos mais baixos, pode reduzir bastante a demanda de óleos vegetais e o custo de produção (o custo de matéria prima corresponde a cerca de 80% do custo de produção) (ANDERSON et al., 2003), enquanto que o emprego da glicerina na fabricação de ésteres emolientes e surfactantes minimiza o impacto das toneladas de subproduto geradas.

1.3. PRODUÇÃO DE ÉSTERES

As vias tradicionais de produção de ésteres são a esterificação de ácidos graxos e álcoois, transesterificação e hidrólise de triacilgliceróis utilizando-se catalisadore químicos. Entretanto, o emprego de enzimas como catalisadores dessas reações, bem como a melhora de seus rendimentos vêm sendo bastante estudados com o intuito de minimizar o preço de produção de ésteres. É previsto, por exemplo, que o alto custo tanto das matérias-primas quanto dos complexos processos de obtenção dessas substâncias poderá desacelerar o crescimento do mercado global de ésteres (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, [ca. 2015b]).

No que tange os processos químicos industriais, a esterificação de ácidos graxos com álcoois é feita pela esterificação de Fischer. Essa reação ocorre na presença de sais metálicos com aletos de alquila ou de anidridos de ácidos com álcoois, bem como pela reação de álcoois com ácidos em refluxo a altas temperaturas, na presença de agentes secantes e/ou catalisadores químicos (MONTEFIORE MEDICAL CENTER, 1983).

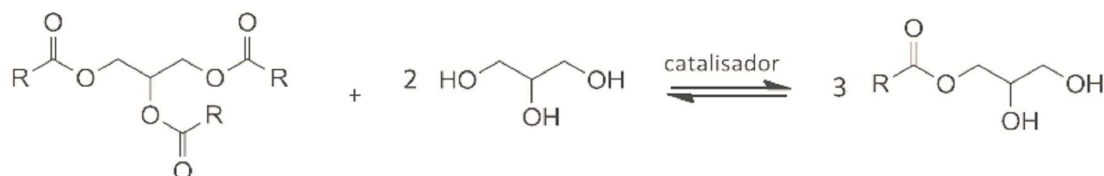
Ansmann e Dierker (COGNIS IP MANAGEMENT GMBH, 2011) desenvolveram um método para síntese de ésteres de exildecanol e ácidos de cadeia curta usando o catalisador químico Fascat® 2001 (um composto organometálico de fórmula C_2O_4Sn produzido pela PMC Organometallix™) a temperatura de aproximadamente 240°C. Young (ZENITH COSMETIC TECHNOLOGIES LLC, 2001), por outro lado, inventou um novo processo de produção de ésteres de ácidos graxos, como o ácido oleico, em meio aquoso sem a utilização de compostos halogenados. O processo envolveu a mistura de ácido tris(hidroximetil)metilamino etanosulfônico (TES) ou ácido bis(hidroxietil)amino etanosulfônico (BES) com o ácido oleico em meio aquoso, sob atmosfera de nitrogênio e adição de base, a temperatura inicial de 95°C; a temperatura foi aumentada até 150°C e o rendimento final foi de 48 a 55%.

Por outro lado, monoacil gliceróis (importantes emulsificantes e emolientes) são frequentemente produzidos a partir da hidrólise, glicerólise ou transesterificação de triglicerídeos extraídos de gordura animal ou óleos vegetais, bem como pelas reações de ácidos graxos com álcool (neste caso, o glicerol) descritos anteriormente. No primeiro caso, triglicerídeos são hidrolisados pela injeção de vapor d'água em contracorrente, a altas temperaturas e pressão, gerando uma mistura de di e monogliceróis, bem como glicerina e ácidos graxos, o que leva ao baixo rendimento do processo (SANTOS; REZENDE, 2012).

A glicerólise (Figura 4) é um caso particular de transesterificação, onde um éster (triglicerídeo) “transfere” um radical alquil para o álcool adicionado a reação (glicerol). O processo ocorre a temperaturas próximas de 250°C na presença de catalisadores básicos ($NaOH$, KOH , $Ca(OH)_2$) e uso de agitação intensa, durante aproximadamente quatro horas; o rendimento do processo é próximo de 40% (TEMELLI et al., 1996). Entretanto, o uso de outros catalisadores tem sido estudado, tanto para se aumentar o rendimento e seletividade das reações, quanto para tornar o processo de síntese mais sustentável e menos agressivo aos equipamentos utilizados. Alguns exemplos são os catalisadores homogêneos do tipo guanidina (triazabicyclo[4.4.0]dec-5-eno (TBD), 1,3-dicicloexil-2-noctilguanidina

(DCOG) e 1,2,3-tricicloexilguanidina (TCG)) e os heterogêneos Al-Mg Hidrotalcita, Clinoptilolita (Zeólita), resina K1481 e Montmorillonita-Li (SANTOS; REZENDE, 2012).

Figura 4- Reação simplificada de glicerólise



Fonte: SANTOS; REZENDE, 2012.

Esse é o mesmo processo empregado na obtenção do biodiesel- metanol ou etanol substitue o glicerol nesse caso-, também chamado de alcóólise. Embora seja possível a sua fabricação por esterificação de ácidos graxos com metanol (ou etanol), essa via não é tão viável quanto a transesterificação de ésteres vegetais e animais por consumir grande quantidade de ácido (catalisador), apresentar menor rendimento, bem como formação de sabão e água, resultando em baixa qualidade do biocombustível. Plantas modernas de produção de biodiesel utilizam soda cáustica ou metilato de sódio como catalisadores e são operadas em modo contínuo, uma vez que essa forma leva a melhor utilização de energia, melhor separação da glicerina e recuperação do excesso de metanol, bem como menor custo por unidade de produto. Os rendimentos de conversão são da ordem de 98% se as especificações de qualidade da matéria prima são atendidas (ANDERSON et al., 2003).

Hillion e colaboradores (2003), entretanto, desenvolveram um processo onde as matérias primas passam por dois reatores de leito fixo contendo óxidos de zinco e alumínio imobilizados para atingir uma conversão de 99%. Além disso, os autores registraram outras vantagens como maior pureza do glicerol (cerca de 98%), dispensa de neutralização do co-produto e recuperação do catalisador sem perda da sua atividade, além da versatilidade do uso de óleos contendo ácidos graxos livres, uma vez que ocorre esterificação concomitantemente à transesterificação.

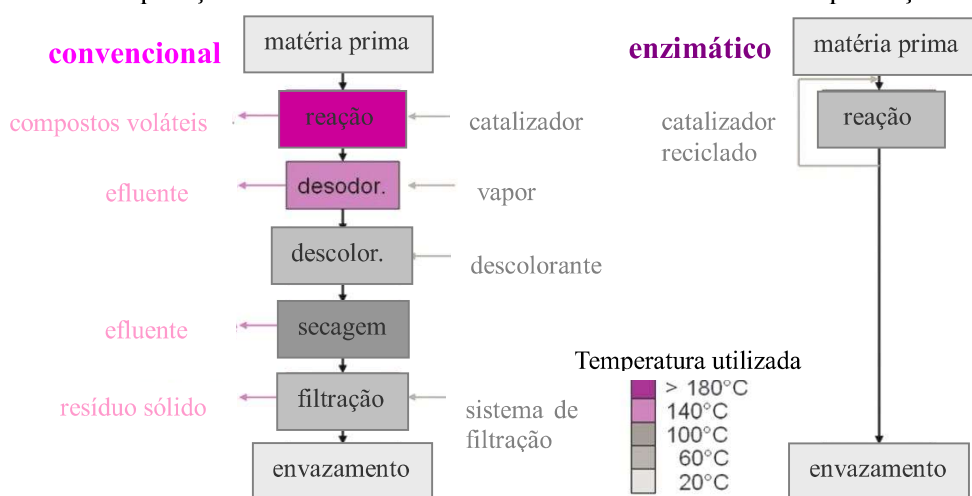
1.3.1. Emprego de enzimas na produção de ésteres para cosméticos

Nos últimos anos, muitos pesquisadores têm estudado a catálise enzimática de reações como des/trans/esterificação. Dentre as principais vantagens da sua utilização estão a especificidade do catalisador, gerando um produto mais puro, e o uso de condições mais brandas de temperatura e

pressão (30-60°C, enquanto que os processos químicos são ocorrem à 100-250°C) (Figura 5), reduzindo o gasto energético. Além disso, elimina-se a formação de produtos secundários e características organolépticas indesejáveis (aroma desagradável e cor), o que representa economia de operação unitárias (THUM; OXENBELL, 2008). Na Análise do Ciclo de Vida (*Life Cycle Assessment- LCA*) feita por Thum e Oxenbell (2008) para o meristil meristato produzido química e enzimaticamente, por exemplo, o processo enzimaticamente catalisado levou a reduções de 62, 88, 74 , 76 e 62% no consumo de energia elétrica, na acidificação e carga de fosfato do efluente, na formação de fumaça e emissão de CO₂, respectivamente; a análise foi feita para uma escala de 5 toneladas de produto e adotou os processos químicos atualmente utilizados, bem como o processo enzimático desenvolvido pela Evonik Industries.

Gani e colaboradores (2011) utilizaram a Lipozyme® para a esterificação de ácidos graxos provenientes das sementes de engkabang (uma árvore encontrada em Borneo, Indonésia, rica em óleo de palmitato, óleo de estearato e óleo de oleato); o processo ocorreu a 40°C por 5 horas e obteve 93,67% de rendimento. Rahman e colaboradores (2011) executaram uma reação, com heptano e hexano como meios reacionais, em um reator de tanque agitado de 500 mL e avaliaram o efeito da temperatura, razão molar óleo álcool: óleo de engkabang, enzima imobilizada e velocidade de agitação, através do método de superfície-resposta baseado num delineamento composto central. Nesse experimento, o rendimento máximo de 96,2% foi obtido a 53,9°C, velocidade do impelidor de 309,5 rpm, 4,82 g de enzima e razão de 3,39:1 (óleo álcool: óleo de engkabang).

Figura 5- Comparação entre métodos convencionais e enzimáticos de produção de ésteres



Adaptado de: ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013.

Lipozima RM IM também foi usada na reação de alcóolise do óleo de palma com álcool oleico levando a conversões dos reagentes maiores que 80% após 5 h de reação (KENG et al., 2009). O experimento foi feito em reatores de tanque agitado com capacidade de 0,9 L a 50°C e 242 rpm. Novozym SP435 (lipase de *Candida antarctica* adsorvida em resina de acrílico) e Lipozyme IM (lipase de *R. miehei* adsorvida em resina macroporosa de troca aniônica) foram adotadas como catalisadores na síntese de sucroésteres de ácido oleico. As reações foram feitas em meio orgânico e aquoso a 65°C e chegaram a conversões de 99,5 e 94,4% para Novozyme e Lipozyme, respectivamente (BUSQUET et al., 2009).

Embora muitas pesquisas tenham sido desenvolvidas para a utilização de lipases para a obtenção de ésteres, poucas empresas já adotam tal tecnologia em suas linhas de manufatura devido ao alto custo da enzima em comparação com o valor de catalisadores químicos e longo tempo de reação em alguns casos (CLENDENNEN; BOAZ, 2008). Dessa forma, o desenvolvimento de estratégias mais baratas de fabricação de lipases, bem como o de sistemas de reutilização dessas enzimas, pode causar um grande impacto na Análise do Custo do Ciclo de Vida (*Life Cycle Cost Analysis- LCCA*) desses ésteres. Empresas como a EASTMAN e a Evonik Industries vêm produzindo ésteres enzimaticamente a partir de recursos renováveis para emprego na formulação de cosméticos. O quadro 1 mostra alguns dos cosméticos da empresa Evonik compostos de ésteres produzidos enzimaticamente.

Quadro 1- Produtos da Evonik Industries fabricados com tecnologia sustentável

TEGOSOFT® AC	Esterificação Enzimática	Estético	Derivado de recursos naturais
TEGOSOFT® CR	Esterificação Enzimática		Derivado de recursos naturais
TEGOSOFT® DC		Estético	Derivado de recursos naturais
TEGOSOFT® MM	Esterificação Enzimática	Estético	Derivado de recursos naturais
TEGOSOFT® OER	Esterificação Enzimática		Derivado de recursos naturais
TEGOSOFT® PC 31	Condensação de glicerina	Concentrado	Derivado de recursos naturais
TEGOSOFT® PC 41	Condensação de glicerina	Concentrado	Derivado de recursos naturais
TEGOSOFT® XC		Estético	Parcialmente derivado de recursos naturais

Adaptado de: Evonik Industries, [2014].

1.3.2. Emprego de enzimas na produção biodiesel

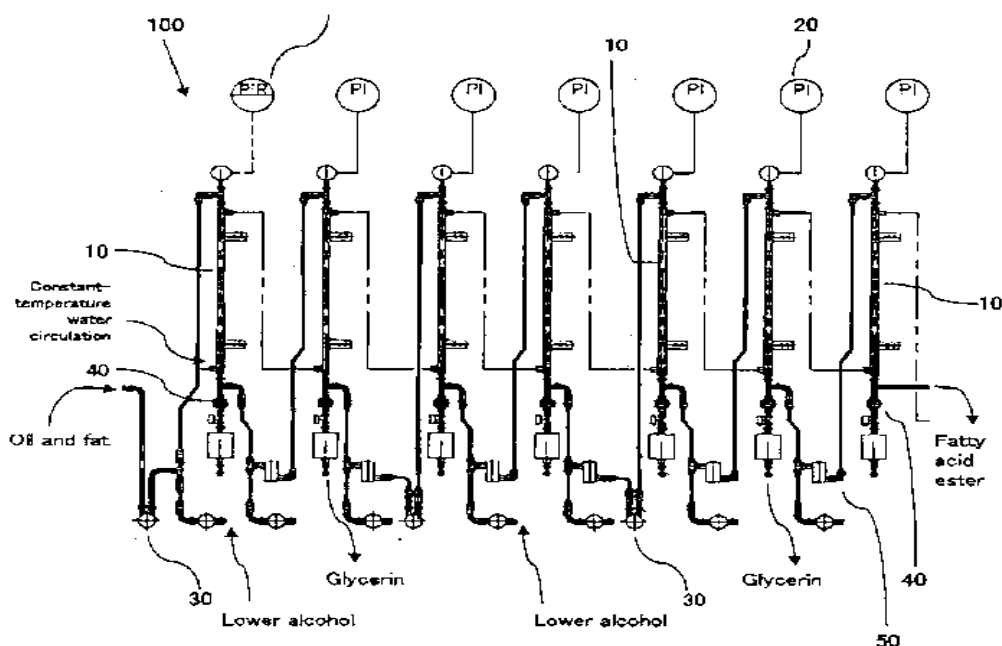
O uso de lipases na produção de biodiesel também tem sido proposto devido às vantagens de redução de impactos ambientais, formação de sabão (o que dificulta a separação do biodiesel) e esterificação de ácidos graxos livres, resultando em altos rendimentos. Pandey (2009, citado por RIBEIRO et al., 2011) relatou um rendimento de 90,4% na produção de metilésteres catalisado por lipases de *C. antarctica* imobilizadas em reator de leito fixo, tendo como matéria prima óleo reciclado contendo 1.980 ppm de água e 2,5% de ácidos graxos livres. Nouredini e colaboradores (2005) mostraram que a viabilidade do processo está intrinsicamente ligada com a imobilização da enzima, uma vez que essa metodologia estabiliza a atividade da lipase e possibilita a sua recuperação. Nesse trabalho, as condições ótimas para a obtenção de metil e etilésteres foram 35 °C, razão óleo-metanol de 1:7,5, 0,5 g de água, 475 mg de lipase e 35 °C, razão óleo-etanol de 1:15,2, 0,3g de água, 4.751 ng de lipase de *Pseudomonas cepacia*, respectivamente, levando a produção de 67 e 65% (base molar) de metil e etilésteres em 1h.

Estudos de LCA realizados por Nielsen e colaboradores (2008, citado por RIBEIRO et al., 2011) mostraram que a viabilidade da utilização de lipase imobilizada na produção de biodiesel só é alcançada se a enzima permanece estável durante a produção de 1200 a 7400 kg de biodiesel por kg de enzima empregada, sendo que o tipo de matéria prima afeta diretamente tal resultado. Em termos de impactos ambientais, a LCA desenvolvida por Raman e coautores (2011) mostrou que o emprego de lipase imobilizada pode reduzir o impacto nas mudanças climáticas e camada de ozônio, bem como na demanda de matéria prima durante a produção de biodiesel de óleo de palma. Esse estudo comparou o uso de catalisador químico alcalino, enzima livre e imobilizada e considerou etapas adicionais, como a imobilização da enzima, no fluxograma dos processos. Um inconveniente do uso de lipase, entretanto, é a necessidade da adição de solventes (p.ex., hexano, octanol, éter de petróleo, butanol), para se atingir altos rendimentos (RIBEIRO et al., 2011); tal necessidade decorre da grande diferença de polaridade entre o etanol/metanol e óleo.

Uma patente sobre o uso de lipase na produção contínua de biodiesel foi recentemente depositada pela empresa Kansai Chemical Engineering Co., Ltd. (2015). O sistema proposto consiste em vários estágios reacionais (reatores tubulares de leito fixo) contendo lipases imobilizadas, por onde a mistura de alquiléster, óleo não transesterificado e ácido graxo livre oriundo do estágio anterior é misturado com o álcool em um misturador e bombeado para o topo do estágio seguinte. O produto de fundo de cada estágio é concomitantemente separado do biodiesel (Figura 6), diminuindo assim, o

custo da separação do produto. Ao fim do décimo estágio, foram obtidos efluentes contendo 95% (m/m) de metiléster quando a vazão de alimentação do sistema foi 540 mL/h.

Figura 6- Representação do sistema de produção contínua de biodiesel catalisado por lipase



Fonte: Kansai Chemical Engineering Co. Ltd., 2015.

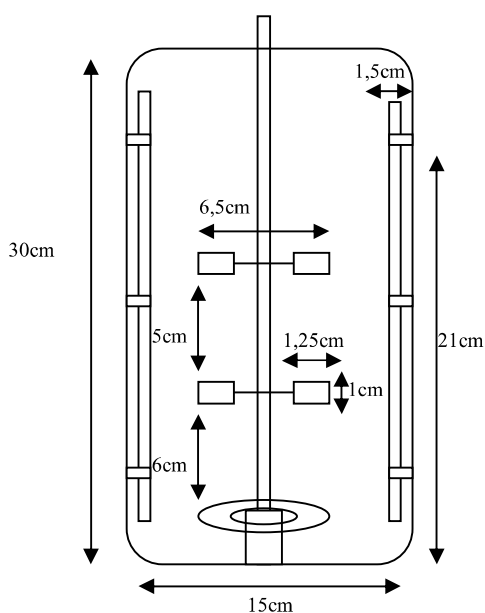
Uma vez que o custo de produção da lipase é um dos maiores fatores que tem impedido a redução dos impactos ambientais através da catálise enzimática, conforme discutido anteriormente, esse trabalho teve como objetivo desenvolver métodos de redução do custo de produção da lipase para a viabilização de seu uso na produção industrial de ésteres. As estratégias utilizadas para tais fins foram: i) projeto e construção de um reator de baixo custo para a produção de lipases de *A. niger* e ii) modelagem, simulação e otimização do processo de produção da enzima usando os softwares SciLab, MiniTab e Excel. Outros resultados esperados foram: i) estimar o custo de produção da lipase, ii) avaliar qualitativamente os impactos do processo de obtenção da enzima e medidas de mitigação e iii) propor uma planta de produção para uma biorrefinaria baseada nos resultados obtidos.

2. METODOLOGIAS

2.1. *DESIGN* E CONSTRUÇÃO DO REATOR

Um reator de PVC de 5 L com 15 cm de diâmetro e 30 cm de altura foi construído de acordo com o desenho mostrado na figura 6, tomando como base as dimensões citadas em Wilde et al (2014). O biorreator conteve 4 chicanas e dois impelidores tipo Rushton de 1,5 e 6,5 cm de largura, respectivamente (feitos de PVC), entradas para sensor de pH e temperatura, bem como para injeção de meio e retirada de amostra. A aeração foi feita pela base do tanque utilizando-se ar comprimido. O aspensor foi inicialmente confeccionado de mangueira de silicone e cano de PVC, e conectado ao eixo dos impelidores por um rolamento de modo que o ar ascendesse pelo eixo (oco) e saísse por tubos capilares posicionados tangencialmente às turbinas, impulsionando a rotação das mesmas. Entretanto, o design do biorreator possibilitou a sua operação tanto como um STR quanto como coluna de bolhas, sendo que este último modelo foi adotado durante os cultivos por questões de praticidade. Para montagem do sistema de agitação, quatro tubos capilares de cobre de 5 cm de comprimento e 3 mm de diâmetro foram posicionados embaixo do impelidor inferior, bem como quatro capilares de 0,5 mm x 5 mm foram alocados debaixo da turbina superior. Os materiais acima citados foram adquiridos em empresas locais.

Figura 7- Desenho do projeto do reator



Fonte: O Autor, 2015.

2.2. CARACTERIZAÇÃO E MODELAGEM DO REATOR

O biorreator foi caracterizado quanto à sua capacidade de transferir oxigênio para o meio ($k_L a$), a potência entregue pelo sistema de agitação e o número de Reynolds. O $k_L a$ foi medido em água pelo método dinâmico utilizando um sensor de O₂ (METTLER TOLEDO) e o software TEC-BIO e calculado pela inclinação da reta da seguinte equação (GARCIA-OCHOA; GOMEZ, 2009):

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

Onde C é a concentração de oxigênio medida, C^* é a concentração de oxigênio de saturação e t é o tempo. A potência entregue ao sistema de agitação (meio gaseificado) e o número de Reynolds foram calculados pelas equações seguintes (JUNKER, 2004; DORAN, 1995):

$$P_g = k_1 \mu_L N_i^2 D_i^3, \text{ para } Re < 10 \quad (2)$$

$$P_g = N'_P \rho N_i^3 D_i^5, \text{ para } Re > 10^3 \quad (3)$$

$$Re = \frac{N_i D_i^2 \rho}{\mu_L} \quad (4)$$

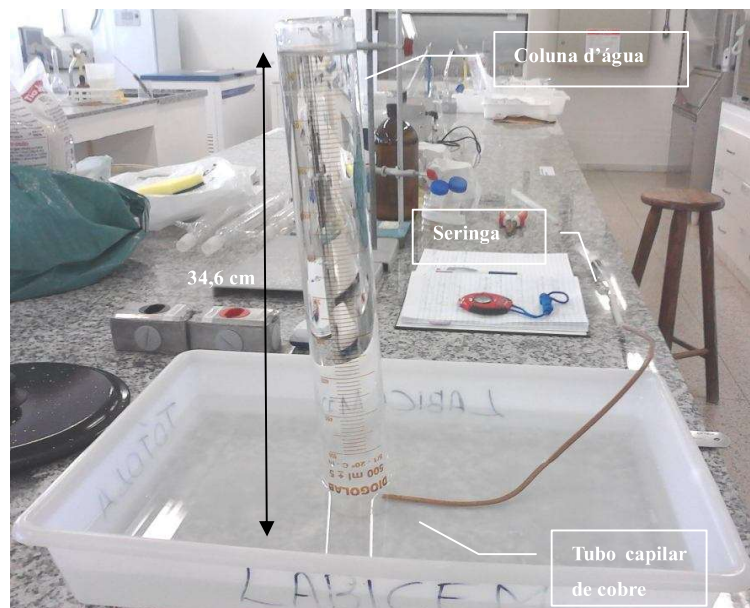
Onde N'_P e k_1 são o número de potência (igual a 5-6 para impelidores do tipo Rushton de 6 pás) e constante de proporcionalidade (igual a 70 para impelidores do tipo Rushton de 6 pás) respectivamente, ρ e μ_L são a densidade e viscosidade do meio, N_i e D_i são a velocidade e diâmetro do impelidor, respectivamente. N_i foi medido com um tacômetro digital (INSTRUTHERM TD-812) utilizando-se três fitas refletoras e correlacionado com a vazão de ar do compressor (TECNAL).

Para modelar o sistema de agitação desenvolvido, foi necessário determinar o diâmetro médio das bolhas que saem dos capilares através de suas velocidades terminais (v_t) em uma coluna de líquido (WANG et al., 2010). Para tanto, montou-se um sistema (Figura 8) contendo uma proveta de 500 mL cheia de água (altura da coluna d'água = 34,6 cm) com canos de cobre de 3 mm de diâmetro e 0,5 mm x 5 mm (diâmetros e material iguais aos utilizados na fabricação dos tubos propulsores), posicionados na base da proveta. O ar foi injetado cuidadosamente com uma seringa através do tubo capilar, o tempo gasto pelas bolhas para atingir o topo da coluna d'água a partir da base foi obtido com o auxílio de um cronômetro (INSTRUTHERM CD-2800) e o diâmetro da bolha foi calculado por (WANG et al., 2010):

$$D_b = \sqrt{\frac{v_t 18 \mu_L}{g(\rho_{\text{água}} - \rho_{\text{bolha}})}} \quad (5)$$

Onde D_b é o diâmetro da bolha, g é a aceleração gravitacional, $\rho_{\text{água}}$ e ρ_{bolha} são as densidades da água e da bolha, respectivamente. A temperatura da água de teste foi 25°C; SciLab foi usado para simular os valores de N_i em função da vazão de alimentação de ar (Q) e dos dados experimentais da velocidade do impelidor.

Figura 8- Experimento para medida do diâmetro médio das bolhas



Fonte: O Autor, 2015.

2.3. PRODUÇÃO DE LIPASES POR *A. niger*

2.3.1. Preparo da cultura estoque

Aspergillus niger (ATCC 9642) foi gentilmente doado da Coleção de Culturas Tropical da Fundação Adré Torsello por intermédio do Prof. Dr. Ênio de Nazaré do Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos (UFSJ/CAP). Aproximadamente 1 mL de solução de esporos do fungo foi inoculado em quatro placas de petri contendo 1) ágar sabouraud 2%; meios mínimos compostos por 1,92% (m/v) de ácido cítrico, 0,1% (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1% (m/v) de MgSO_4 heptahidratado, 0,5% (v/v) de Tween 20, 1,5% (m/v) de ágar ágar, pH 5.0 e 2) 2% (m/v) de óleo de soja mais 1% (m/v) de sacarose comercial; 3) 3% (m/v) de óleo mais 0,5% (m/v) de sacarose; 4) 4% (m/v) de óleo, para selecionar células com maior capacidade de produção de lipase. Esporos da placa 3 foram inoculados em 100 mL de meio de mesma composição da placa 4 (com exceção do ágar) em um

erlenmeyer de 500 mL, que foi incubado a 25°C e 180 rpm por 2 dias e 30°C por mais dois dias. A cultura foi criopreservada em tubos eppendorfs na concentração de 7,44 mg/mL com a adição de 23% de glicerol e subsequente estocagem a -18°C.

2.3.2. Otimização do processo

A razão óleo:sacarose no meio de cultura da fase batelada foi avaliada como parâmetro de otimização do processo. Para tanto, 7,8 mL da cultura estoque foram inoculados em um erlenmeyer de 500 mL contendo 350 mL do meio a ser utilizado na fase batelada, o qual foi incubado a 28°C, 180 rpm por 96 h. Em seguida, o inóculo foi vertido no reator contendo 3,15 L de meio de contendo 0,67% (m/v) de ácido cítrico, 1,91% (m/v) de citrato de sódio tribásico, 0,06% (m/v) de (NH₄)₂SO₄, 0,06% (m/v) de MgSO₄ heptahidratada, 0,28% (v/v) de Tween 20, pH = 5,1 ± 0,5 e diferentes razões de concentração óleo:sacarose; 0:2 (0% de óleo e 2% de sacarose), 2:1 (2% de óleo e 1% de sacarose) e 4:0 (4% de óleo e 0% de sacarose). A biorreação ocorreu a 29,9 ± 0,1°C (com o auxílio de uma placa aquecedora) durante aproximadamente 120 hs de forma não aséptica, com o início da fase de batelada alimentada a 48 hs de cultivo utilizando-se uma solução contendo as mesmas concentrações de sais e tampão descritas acima a 8,496 mL/h e óleo de soja a uma taxa de 2,833 mL/h ($D \approx 0,00354 \text{ h}^{-1}$). A vazão de ar utilizada foi 20 LPM.

Um cultivo em condições industriais foi feito com meio não esterelizado, preparado com água de torneira, com a mesma composição descrita anteriormente, com exceção do tampão (0,01 mol/L citrato/ácido cítrico) e a fonte de carbono (1% de óleo de soja usado). As respostas avaliadas foram a produtividade volumétrica (Q_v) (SCHILLING, 2000) e o custo de produção por unidade de atividade enzimática (PETERS et al., 2003) no tempo de produtividade máxima:

$$Q_v = \frac{p_{\max} - p_i}{\Delta t} \quad (6)$$

$$R\$/U = \frac{\text{custo}_{\text{var iável}}}{(p_{\max} - p_i) \cdot V} \quad (7)$$

Onde $p_{\max}$ e p_i são as concentrações máxima e inicial do produto (lipase) no meio reacional, V é o volume do reator e Δt é o tempo gasto até se atingir a concentração máxima de produto. Os custos fixos foram desprezados para essa análise por serem iguais nas diferentes condições de cultivo; dessa

forma, apenas o custo variável (matéria-prima e operação de equipamentos) foi responsável pela diferenciação do custo de produção nos três casos.

2.4. MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO

2.4.1. Quantificação da enzima

A quantificação de enzimas produzidas foi feita pela medição de sua atividade de esterificação, por titulometria de ácidos livres no meio. Foram adicionados 10 mL de tampão fosfato 0,1 mol/L (pH 5) contendo 1 mmol/L de CaCl_2 e MgCl_2 , 750 mmol/L de glicerol e 500 mmol/L de ácido propiônico a 10 mL do sobrenadante da biorreação (após filtração). A biorreação foi agitada no agitador magnético a $37 \pm 3^\circ\text{C}$ por 1h e parada com aquecimento a 70°C . Os ésteres formados foram extraídos com éter de petróleo e a fase aquosa foi titulada com NaOH 0,1 mol/L. O número de mols de ácido consumido ($N_{ac.consumido}$) (para a formação de ésteres) foi calculada por:

$$N_{ac.consumido} = (V_{NaOH-branco} - V_{NaOH-amostra}) \cdot 10^{-3} \cdot 0,1 \quad (8)$$

Onde o branco é uma solução idêntica à amostra, exceto pelo fato de que ela foi submetida à desnaturação térmica acima de 70°C antes da biorreação; os volumes das amostras e do branco são dados em mL. Dessa forma, a atividade enzimática foi expressa em unidade de atividade enzimática por mL de caldo fermentado (U/mL), onde U é definido como a quantidade (em μmols) de ácido consumido por minuto por mL de amostra:

$$U = \frac{N_{ac.consumido} \cdot 10^6 \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{mol}} \right)}{60\text{min} \cdot 15\text{mL}} \cdot 2 \quad (9)$$

2.4.2. Quantificação da biomassa

Amostras de 35 mL foram coletadas do reator a cada 24 hs e filtradas a vácuo em papel filtro previamente pesado, que posteriormente foi deixado na estufa a 80°C por dois dias e então pesados novamente. A biomassa da amostra foi determinada pela diferença entre o peso após secagem e o peso do papel filtro.

2.5. SIMULAÇÕES DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE LIPASE

O processo foi modelado a partir de balanços de massa para o sistema, gerando equações diferenciais que foram resolvidas através de funções do SciLab (ANEXO B) na faixa de tempo de 0 a 120h. A concentração de substrato solubilizado no meio, bem como a constante de saturação (K_s) e taxa específica de crescimento máxima (μ_{max}) foram estimadas com o auxílio da ferramenta SOLVER do Excel®, adotando-se a equação de Monod (DORAN, 1995) como modelo crescimento do *A. niger*. A função objetivo utilizada no SOLVER foi a minimização dos desvios entre as taxas de crescimento calculadas a partir de dados experimentais e os valores simulados utilizando o modelo de Monod.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. BIORREATOR

3.1.1. Análise e caracterização do biorreator

O design e escolha do reator pode ter grande peso no desenvolvimento de processos, bem como no seu custo; para essas decisões, vários fatores devem ser levados em conta, como as limitações do reator e exigências do produto a ser obtido (Boas Práticas de Fabricação –BPF), sistema de controle de temperatura e a via de produção, bem como a velocidade, da reação (PETERS, 2003). Nesse trabalho, buscou-se construir um biorreator de baixo custo capaz de proporcionar as condições operacionais adequadas para o cultivo de *A. niger*. O custo total do reator foi em torno de R\$ 85,00 (Tabela 3), preço este muito abaixo dos reatores *single use* de empresas como a Eppendorf (R\$ 673,33 para o vaso descartável BioBLU® de 5L). Entretanto, deve-se ressaltar que a capacidade do reator desenvolvido não se compara com a de reatores comerciais nos quesitos assepsia e controle de processos. As figuras 9 e 10 mostram o *design* do biorreator após a sua montagem.

Dois fatores críticos no projeto de reatores, além do volume do mesmo, é o material empregado e a espessura das paredes do tanque, uma vez que eles devem respeitar as legislações relacionadas ao bioproduto a ser obtido e afetam diretamente a disponibilidade de construção do reator, seu custo, segurança e resistência às condições empregadas nas biorreações.

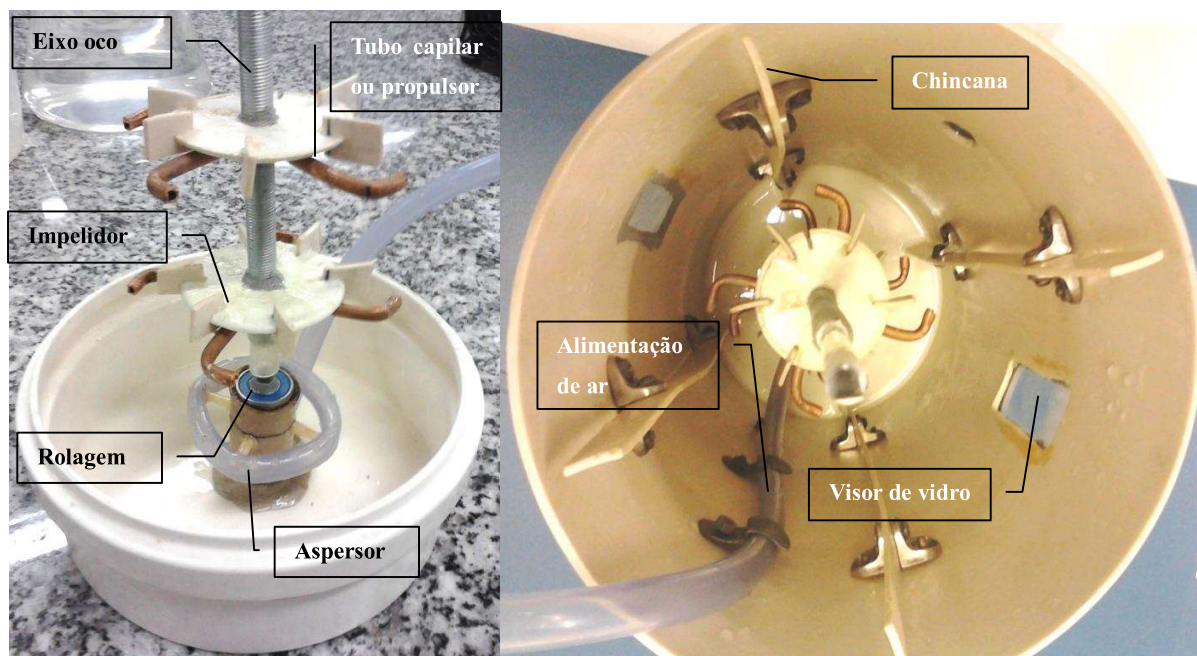
A aplicação do PVC na construção do reator em escala laboratorial foi satisfatória, apresentando baixo custo, baixa ou nenhuma degradação do material e maleabilidade para a construção do tanque; além disso, outro ponto positivo do PVC é que ele é reciclável, tornando-se então uma alternativa sustentável.

Tabela 3- Custo total do reator¹

Descrição	Preço Unitário (R\$)	Quantidade	Preço Total (R\$)
Cano PVC 15 cm x 30 cm c/ tampas	15,00	1	15,00
Cano PVC 10 cm x 30 cm	5,00	1	5,00
Cano PVC 4 cm x 30 cm	0,97	1	0,97
Suporte de 2 furos	0,40	16	6,40
Parafuso	0,10	18	1,80
Porca	0,10	18	1,80
Anel de vedação m 01	0,60	18	10,80
Suporte 2	0,30	2	0,60
Porca garra ¼	0,50	1	0,50
Cola epox	3,70	1	3,70
Fita veda-rosca	1,80	1	1,80
Cano de aço 0,5 cm x 100 cm	15,00	1	15,00
Cano de cobre 0,3 cm x 100 cm	14,00	1	14,00
Rolamento VTO 2 cm	7,50	1	7,50
Total (R\$)			84,87

¹O custo de materiais disponibilizados pelo laboratório, como tubo falcon, não foi contabilizado. Fonte: O Autor, 2015.

Figura 9- Vista frontal e superior do sistema de agitação (primeiro *design*) do reator



Fonte: O Autor, 2015.

Os materiais metálicos utilizados, entretanto, sofreram corrosão ao longo dos processos (provavelmente devido ao meio ácido), mas não prejudicaram os cultivos, com exceção ao rolamento. Como essa peça não era feita de aço inoxidável, a mesma sofreu corrosão o que, somado ao acúmulo de gordura entre as esferas contidas no rolamento, levou o impelidor a parar de girar. Esse foi o principal fator que levou a escolha do uso do reator no modo coluna de bolhas durante os cultivos de otimização da produção da enzima; neste caso, o eixo com os impelidores foi removido e a saída de ar pelo rolamento foi obstruída, fazendo-o sair somente pelos orifícios do arpersor de gás.

Figura 10- Visão geral do biorreator montado (a) e em funcionamento (b)



Fonte: O Autor, 2015.

Para corrigir os problemas mencionados, o *design* do eixo contendo os impelidores e propulsores foi refeito, de modo que o rolamento não entrasse em contato com o líquido (posicionando-o na tampa do reator) (Figura 11). Esse modelo foi usado para comparar a taxa de transferência de oxigênio em água no reator operado no modo STR e coluna de bolhas (Tabela 4).

Figura 11- *Design* do impelidor com propulsores para redução do contato do rolamento com o meio



Fonte: O Autor, 2015.

Tabela 4- Coeficientes de transferência de oxigênio para diferentes condições de operação

Modo de Operação	$k_L a$ (s ⁻¹)
Coluna de Bolhas 20 LPM	0,002918
Coluna de Bolhas 28 LPM	0,005573
STR 28 LPM ¹	0,002203

¹A vazão de gás no reator foi menor que 28 LPM, uma vez que houve perda de massa de ar pelo rolamento.

Fonte: O Autor, 2015.

Como pode ser visto, houve uma dependência do k_{La} com a vazão de ar, o que está de acordo com o descrito na literatura para biorreatores do tipo coluna de bolhas. Comparando-se correlações empíricas do k_{La} em reatores STR e coluna de bolhas (equações 10 e 11, respectivamente), o tanque agitado produz melhor transferência de oxigênio no líquido (para reatores –STR e coluna de bolhas- de dimensões similares e mesma velocidade superficial do gás) por promover a quebra as bolhas de ar, aumentando assim a área de contato do ar com o líquido e o tempo de retenção da bolha no fluido (GARCIA-OCHOA, GOMEZ, 2009); essa melhora é representada pela potência entregue ao fluido (P/V). Entretanto, o STR desenvolvido nesse trabalho apresentou uma transferência de oxigênio menor que o modelo coluna de bolhas, provavelmente devido ao escapamento de ar pelos interstícios do rolamento, o que levou a vazão real de ar durante a análise ser menor que 28 LPM. Um fato que corrobora tal hipótese é que a rotação do impelidor (segundo *design*) durante o experimento de k_{La} foi muito menor que nos experimentos realizados para a modelagem do sistema de agitação (primeiro *design*) a vazões de ar iguais.

$$k_L a = c.V_s^a .(P_c / V)^b .\mu_L^c \quad (10)$$

$$k_L a = c.V_s^b .\mu_L^a \quad (11)$$

A principal motivação para o desenvolvimento do sistema propulsor discutido nesse trabalho é a redução de consumo de energia, uma vez que o gasto energético em STRs pode corresponder a boa parte do custo do produto, principalmente quando meios viscosos (emulsões, cultura de alta densidade celular, cultivo de fungos) são agitados. Segundo Träger e coautores (1989), reatores airlift utilizam um terço da energia consumida por tanques agitados. Assim, o sistema de agitação proposto (quando construído com material adequado), deve apresentar as vantagens dos modelos tanque agitado (quebra das bolhas de ar) e coluna de bolhas/airlift (economia de energia).

3.1.2. Modelagem e simulação do propulsor

Em biorreatores de tanque agitado (STR, do inglês *Stirred Tank Reactor*), a potência do motor requerida para agitar o fluido, ou em outras palavras, a energia necessária para fazer com que a turbina gire em uma determinada frequência mesmo frente a resistência do meio, é dada pelas equações (2) e (3). Considerando as forças de atrito do rolamento usado no sistema de agitação e sobre os tubos propulsores, as equações (2) e (3) podem ser re-escritas como:

$$P_c = k_1 \mu_L N_i^2 D_i^3 f_{aL}, \text{ para } Re < 10 \quad (12)$$

$$P_c = N'_p \rho N_i^3 D_i^5 f_{aT}, \text{ para } Re > 10^3 \quad (13)$$

Onde f_{aL} e f_{aT} são fatores de correção (que englobam o atrito provocado pelo fluido contra os propulsores) quando o fluido se encontra no regime laminar e turbulento, respectivamente.

Por outro lado, a potência gerada (P_g) pela força tangencial a rotação do impelidor (F_t) que empurra os propulsores (Figura 12) pode ser descrita como (HALLIDAY et al., 2009):

$$P_g = T \cdot \omega = F_t \cdot r \cdot \omega \quad (14)$$

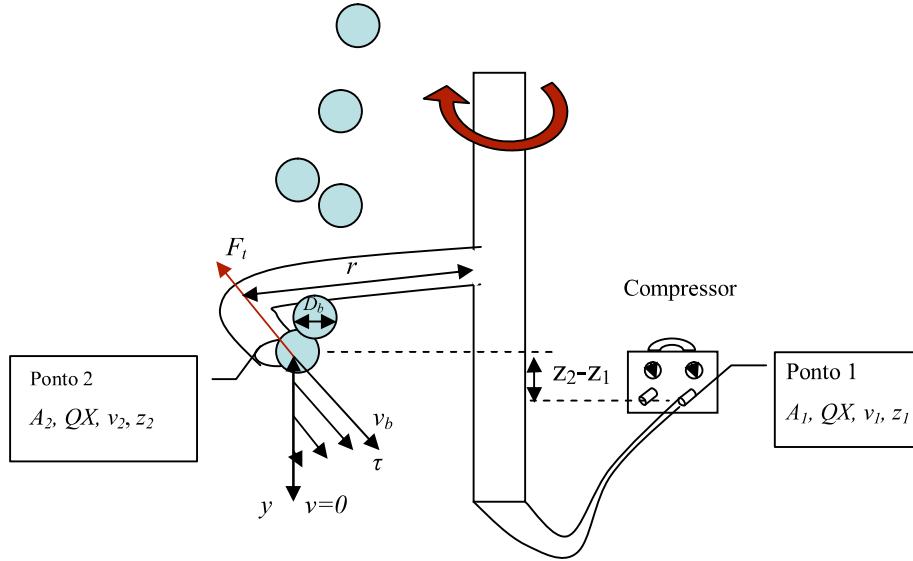
$$P_g = F_t \cdot r \cdot 0,16 \cdot N_i \quad (15)$$

Onde T é o torque, r é a distância do eixo oco até o ponto onde a força tangencial é aplicada, ω é a velocidade angular e 0,16 é o fator de conversão da velocidade do impelidor de rad/s para rps.

Considerando que a força tangencial é a força de reação à tensão de cisalhamento (τ) provocada pela bolha que sai do propulsor sobre o fluido, temos que:

$$-F_t = \tau \cdot A = A \cdot \mu_L \frac{dv}{dy} \quad (16)$$

Figura 12- Diagrama de forças sobre o tubo capilar e deslocamento do ar



Fonte: O Autor, 2015.

Onde A é a área do fluido sobre a qual a tensão de cisalhamento atua, μ_L é a viscosidade do fluido e dv/dy é a taxa de cisalhamento. Considerando A corresponde a área crosseccional da bolha de diâmetro D_b , reescrevemos (16) como:

$$-F_t = \pi \left(\frac{D_b}{2} \right)^2 \mu_L \frac{dv}{dy} \quad (17)$$

Rearranjando a equação (17) e integrando de 0 (ponto onde a bolha sai do tubo capilar com velocidade v_b) a y (ponto abaixo da saída do propulsor onde a velocidade do fluido é nula), obtemos:

$$-F_t \int_0^y dy = \pi \left(\frac{D_b}{2} \right)^2 \mu_L \int_{v_b}^0 dv \quad (18)$$

$$-F_t y = -\pi \left(\frac{D_b}{2} \right)^2 \mu_L v_b \quad (19)$$

Onde a velocidade da bolha pode ser calculada pela equação de Bernoulli, considerando que não há compressão do ar do ponto 1 até 2 (Figura 12) (BRUNETTI, 2008):

$$v_b = v_2 = \sqrt{\left[\left(\frac{p_1 - p_2}{\gamma} \right) + \frac{1}{2g} v_1^2 + (z_1 - z_2) \right] 2g} \quad (20)$$

Logo, a potência gerada é dada por:

$$P_g = 0,16.r.N_i.\frac{1}{y}.\pi.\left(\frac{D_b}{2}\right)^2 \mu_L \sqrt{\left[\left(\frac{p_1 - p_2}{\gamma}\right) + \frac{1}{2g}v_1^2 + (z_1 - z_2)\right]2g} \quad (21)$$

Para que o impelidor se mova, a potência gerada deve ser maior ou igual a potência consumida ($P_g \geq P_c$); logo, a velocidade do impelidor em função da vazão de de ar durante o regime turbulento (22) e laminar (23), respectivamente, pode ser calculada por:

$$N_i \leq \sqrt{\frac{0,16.r.\frac{1}{y}.\pi.\left(\frac{D_b}{2}\right)^2 \mu_L \sqrt{\left[\left(\frac{p_1 - p_2}{\gamma}\right) + \frac{1}{2g}v_1^2 + (z_1 - z_2)\right]2g}}{N'_P \rho D_i^5 f_{aT}}} \quad (22)$$

$$N_i \leq \frac{0,16.r.\frac{1}{y}.\pi.\left(\frac{D_b}{2}\right)^2 \sqrt{\left[\left(\frac{p_1 - p_2}{\gamma}\right) + \frac{1}{2g}v_1^2 + (z_1 - z_2)\right]2g}}{k_1 D_i^3 f_{aL}} \quad (23)$$

Os resultados obtidos a partir das simulações (ANEXO I) com SciLab empregando-se a equação para escoamento em regime turbulento apresentaram valores de N_i da ordem de dez vezes menor que os dados experimentais. Isso provavelmente deve-se ao fato de que o escoamento da água para as velocidades do impelidor obtidas varia do regime laminar ao de transição (Tabela 5); dessa forma, o modelo para regime turbulento não pode ser empregado nessa faixa de vazão de ar. O gráfico 1 mostra a correlação entre os valores da velocidade do impelidor simulados em função dos dados experimentais utilizando-se a equação para escoamento laminar.

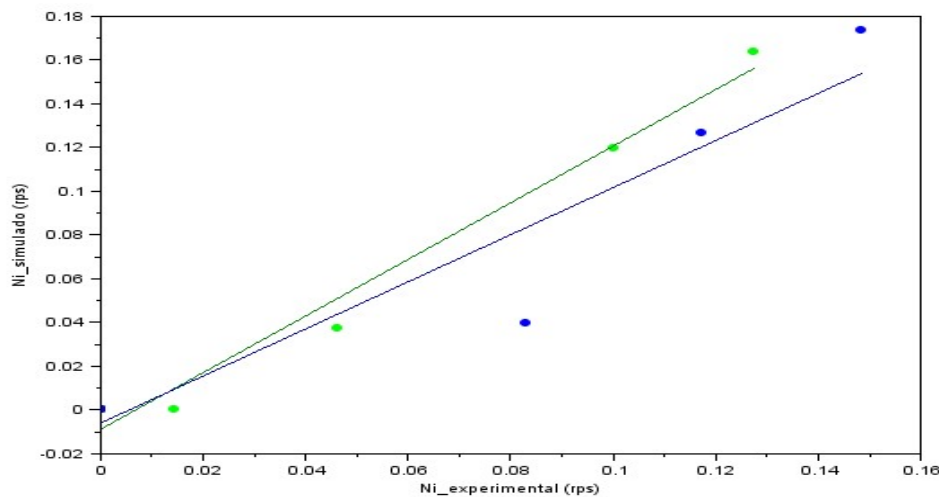
Tabela 5- Dados das frequências do impelidor obtidas por medição com tacômetro

Área corseccional dos propulsores					
7,07 mm ²			2,5 mm ²		
x¹	s²	Re	x¹	s²	Re
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,014	0,010	67,707	0,000	0,000	0,000
0,046	0,011	218,899	0,083	0,009	392,660
0,100	0,010	474,610	0,117	0,008	555,683
0,128	0,012	603,451	0,149	0,015	702,931

¹x é a média das velocidades do impelidor medidas (rps) e s² é o seu desvio. Fonte: O Autor, 2015.

Como pode ser visto, o modelo foi mais acurado para o propulsor com área crosseccional maior (a equação da reta para este foi $N_{i \text{ simulado}} = 1,954062 * N_{i \text{ experimental}} - 0,0087887$) uma vez que o seu erro foi uniforme e próximo de $\pm 20\%$, o que faz sentido, uma vez que uma de suas considerações feitas no desenvolvimento das equações é que os oito capilares são iguais. O gráfico 2 mostra a correlação entre a rotação do impelidor (valores simulados e teóricos) e a vazão de ar que alimenta o reator. Pode-se perceber que os valores simulados se afastam dos experimentais a medida que a rotação do impelidor aumenta e o escoamento do fluido se aproxima do regime turbulento; nesse caso, o fator de atrito deve ser menor que 1 para corrigir esse desvio.

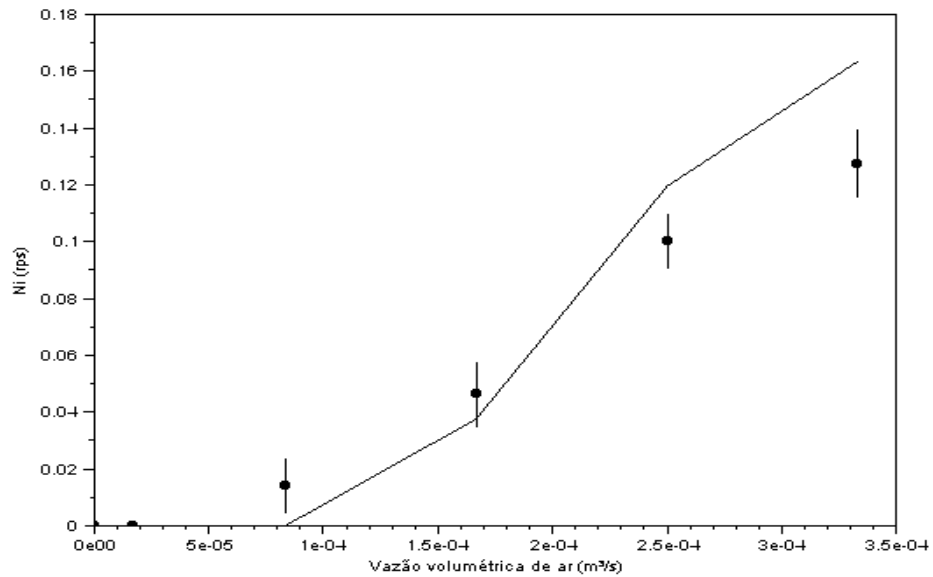
Gráfico 1- Validação da acurácia do modelo desenvolvido



(●) representa os valores simulados de N_i enquanto que (—) corresponde à regressão linear para área transversal do propulsor igual a $7,07 \text{ mm}^2$. (●) e (—) são os valores simulados de N_i e regressão linear para área transversal do propulsor igual a $2,5 \text{ mm}^2$. f_{aL} foi convencionado como igual a 1. Fonte: O Autor, 2015.

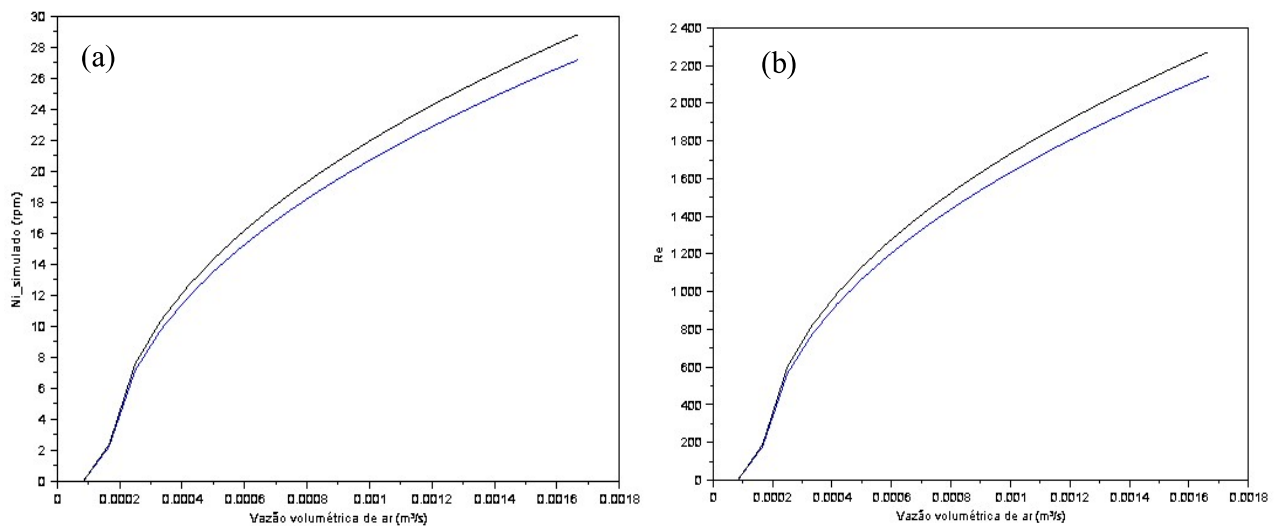
Simulações para vazões maiores de ar utilizando a equação (23) mostraram que a velocidade de impelidor cresce a taxas cada vez menores. Entretanto, esses valores podem estar superestimados, uma vez que nessas condições o número de Reynolds se torna maior que 1000 (Gráfico 3).

Gráfico 2-Correlação entre a velocidade do impelidor e a vazão volumétrica de ar



Fonte: O Autor, 2015.

Gráfico 3- Extrapolação do modelo para vazões de ar maiores



(a) Valores de velocidade do impelidor e (b) número de Reynolds simulados a vazões de ar maiores. Fonte: O Autor, 2015.

3.2. PRODUÇÃO DE LIPASE DE *Aspergillus niger*

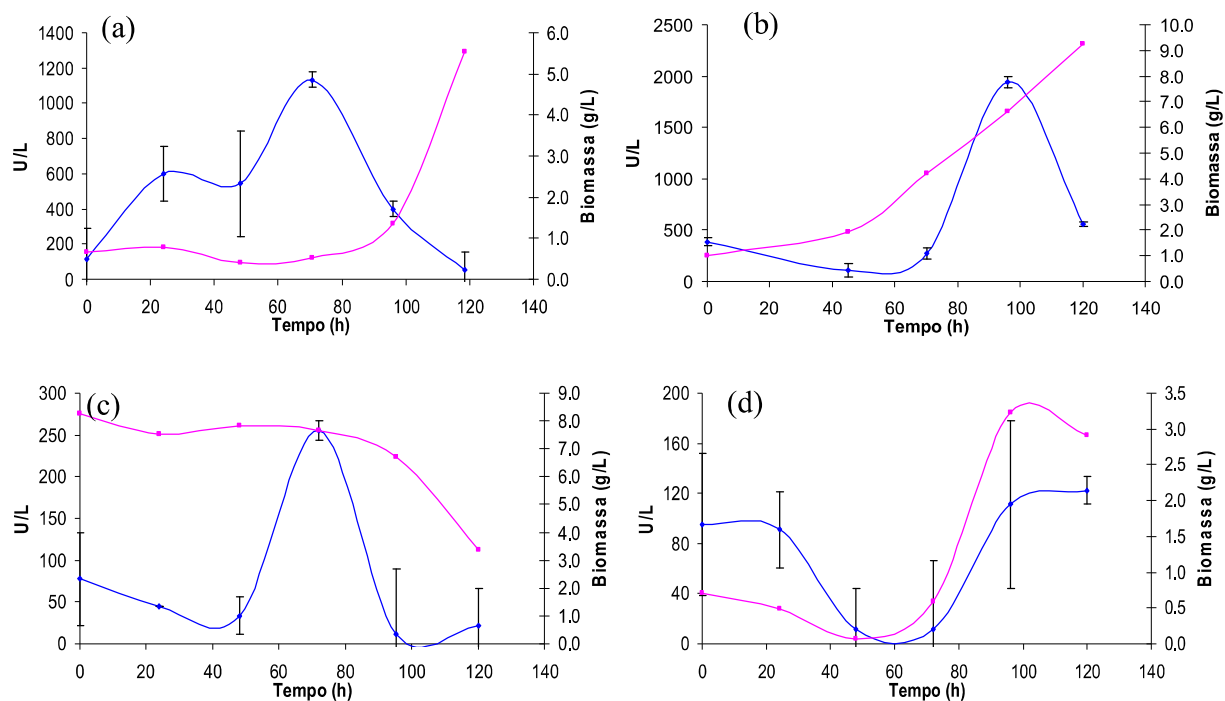
3.2.1. Otimização do processo

Os gêneros *Candida*, *Rhizopus* e *Pseudomonas* são os mais amplamente utilizados na produção industrial de lipase atualmente, sendo *Candida rugosa* o micro-organismo mais frequentemente empregado na produção dessa enzima (FREIRE; CASTILHO, 2008). Gerritse e colaboradores (1998) produziram a enzima em questão através de *Pseudomonas alcaligenes* geneticamente modificada em reatores de 10, 100, 4.000 e 100.000 L a 35°C, pH 7. Tampão fosfato (PBS) foi utilizado para controle inicial do pH, ácido cítrico foi adicionado como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio; o meio ainda foi enriquecido com cofatores como magnésio, cálcio, cobalto, manganês, ferro, zinco, ferro e cobre e alimentado com óleo de soja em um sistema *feedback* após a exaustão do ácido cítrico. Atividade máxima de 55.300 U/L foi atingida após 70 h de processo.

Uma vez que o foco desse trabalho foi reduzir o custo de produção, decidiu-se utilizar um meio com poucos sais e nutrientes. A Figura 13 mostra a cinética de produção da lipase nas condições avaliadas. Como pode ser visto pela Tabela 6, o meio de cultura (fase batelada) contendo 2% (m/v) de óleo e 1% (m/v) de sacarose foi a melhor condição dentre as estudadas (Figura 13b), com a maior produtividade volumétrica e menor custo por unidade de produto. A baixa produção no cultivo contendo 0% de óleo e 2% de sacarose (Figura 13a) pode ser explicada pelo fato de que o *A. niger* utilizado foi previamente selecionado em placa contendo somente óleo de soja como fonte de carbono, conferindo-lhe então, especificidade por esse substrato.

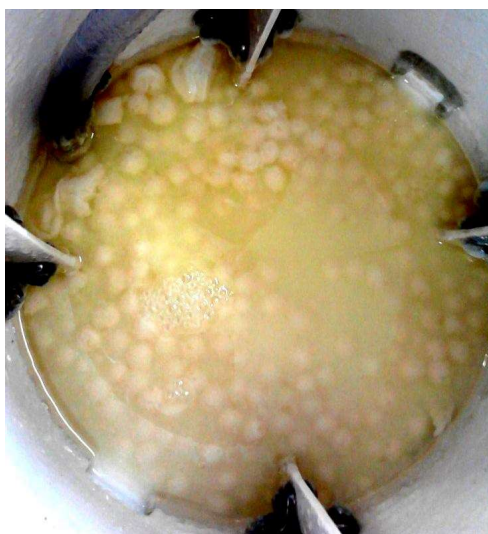
Por outro lado, grandes quantidades de óleo no meio (Figura 13c) podem ter levado a inibição da excreção da lipase para o meio e redução do k_{La} a valores abaixo do coeficiente de transferência de oxigênio crítico do micro-organismo (SALEHMIN et al., 2013), o que é evidenciado pela queda no crescimento celular, principalmente após o início da alimentação. A transferência de oxigênio para o interior das células deve ter sido dificultada ainda mais pela formação de filme de triglicerídeo/ácido graxo oxidado em torno dos flocos de *Aspergillus niger* (Figura 14).

Figura 13- Cinética de crescimento de *A. niger* e produção de lipase



A barra de erros refere a medida da atividade enzimática. (—) representa a biomassa e (—) a atividade enzimática nos cultivos feitos nas condições (a) 2% de sacarose, (b) 2% de óleo e 1% de sacarose, (c) 4% de óleo e (d) 1% de óleo (condições industriais). Fonte: O Autor, 2015.

Figura 14- Morfologia tipo *pellet*/flocos do *A. niger* em biorreator de coluna de bolhas e filme de óleo



Fonte: O Autor, 2015.

O uso de reator STR na produção de metabólitos extracelulares, como ácido itacônico, tem se mostrado menos eficiente que o airlift, devido ao estresse celular e quebra das hifas do fungo causados pelas altas rotações do impelidor (OKABE et al., 2009 citado por HAJIAN; YUSOFF, 2015). No caso da produção de lipase por *A. niger*, da mesma forma, a produção da enzima torna-se maior quando a velocidade do impelidor é aumentada ($k_L a$ aumenta), até o ponto onde o cisalhamento das hifas se torna muito alto, levando a redução da biomassa e produção da enzima durante o processo. Ainda assim, reatores tipo tanque agitado são quase unânimamente utilizados na produção de lipases (SALEHMIN et al., 2013), o que torna esse trabalho inovador na área de produção de lipase por avaliar a aplicação de reatores tipo coluna de bolhas na obtenção dessa enzima.

Do ponto de vista de produção industrial, as condições baixo pH e ausência de sacarose são particularmente interessantes para reduzir a chance de prevalência de outros micro-organismos nos cultivos da cepa de *A. niger* utilizada, principalmente por eles serem não-assépticos. Por outro lado, o uso do reator tipo coluna de bolhas e baixas concentrações de óleo (por exemplo, 1% m/v) é interessante por reduzir o custo de produção da enzima e levar a taxas mais altas de produção da lipase (maior taxa de transferência de oxigênio). Além disso, há o benefício de se poder separar a biomassa por decantação devido a morfologia de floco do fungo nesse reator. Nessas condições, a produção de enzima é melhorada quando o processo é conduzido na forma batelada alimentada.

Entretanto, o cultivo em condições industriais (Figura 13d) resultou na menor produtividade volumétrica e maior custo por unidade de produto (Tabela 6). O uso da água de torneira pode ter tido grande impacto no crescimento do fungo e atividade da enzima devido a presença de metais como magnésio, cálcio e ferro, oriundos das tubulações. Esses metais inibem a atividade da lipase se suas concentrações excederam 1 mM, conforme demonstrado por Pokorny e colaboradores (1996), o que pode ser visto durante os 3 primeiros dias de cultivo quando a molaridade de tampão citrato/ácido cítrico (agente quelante) foi baixa. A figura 13d indica queda na biomassa e atividade enzimática até as 72h de cultivo; ao longo do processo, o *A. niger* pode ter produzido ácido cítrico (subproduto da sua via metabólica), o qual quelou os metais em solução, permitindo assim a ação da lipase e consequente crescimento celular.

Além disso, sugere-se para experimentos futuros o aumento da concentração do sulfato de amônio e tampão (usar 0,1M) e substituição do tampão citrato/ácido cítrico por ácido cítrico/fosfato, uma vez que a disponibilidade de nitrogênio e fosfato no meio podem ter limitado o crescimento do fungo (VAN DER WERF et al., 2009, citado por HAJIAN; YUSOFF, 2015).

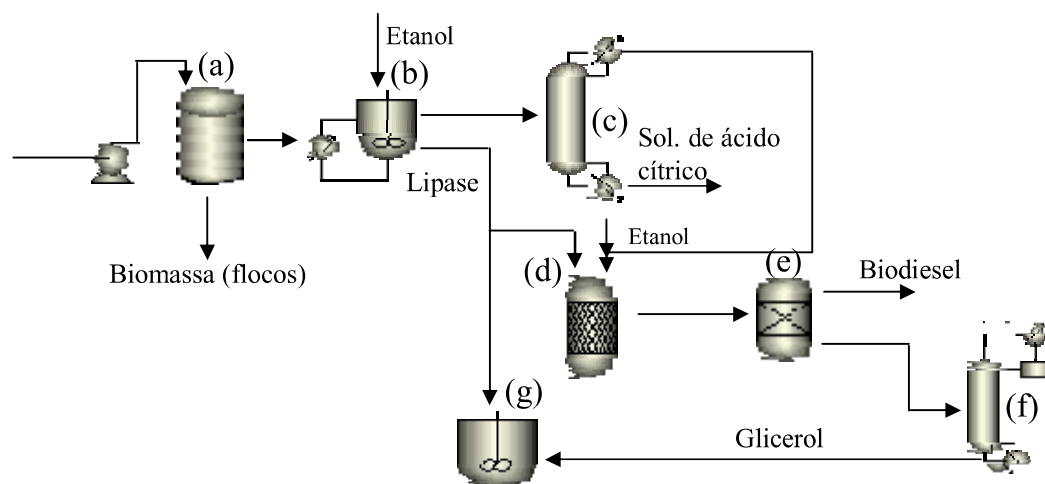
Tabela 6 – Estimativa do custo de produção da enzima e o custo por unidade de atividade enzimática

Descrição ¹	Unidade	Custo (R\$) por unidade	Quantidade			
			0:2	2:1	4:0	Cond.
			(óleo:sacarose)	(óleo:sacarose)	(óleo:sacarose)	Industriais
Citrato de sódio tribásico	g	0,0320	70,56	74,53	70,64	7,79
Ácido cítrico	g	0,0289	24,83	26,23	24,85	2,74
Sulfato de amônio	g	0,0398	2,06	2,17	2,06	2,27
Sulfato de magnésio heptahidratado	g	0,0189	2,06	2,17	2,06	2,27
Tween 20	mL	0,0700	9,73	9,73	9,73	9,73
Óleo de soja commercial	mL	0,0028	63,74	207,62	205,16	0,00
Sacarose commercial	g	0,0022	70,00	35,00	0,00	0,00
Aquecimento	KWh	0,5547	45,83	62,40	46,80	78,00
Compressor	KWh	0,5547	10,58	14,40	10,80	18,00
Bomba peristáltica	KWh	0,5547	1,98	4,14	2,02	5,98
Óleo vegetal usado	mL	0,0010	0,00	0,00	0,00	232,75
Total (R\$)			36,49	49,50	37,42	57,95
R\$/U			0,010	0,008	0,045	0,135
Q_v (U/L.h)			14,50	16,20	2,47	0,28

¹O preço dos reagentes foram pesquisados no site Synth.com para 1000g de matéria prima, com exceção do Tween 20, açúcar e óleo, cujos preços foram pesquisados no site EMFAL Especialidades Químicas e Supermercados Extra, respectivamente. Fonte: O Autor, 2015.

A partir dos dados apresentados e outros encontrados na literatura, propõe-se que a produção de lipase por *A. niger* seja feita em conjunto com a de outros produtos, constituindo assim, uma biorrefinaria (Figura 15) (KING, 2013). O ácido cítrico por exemplo, pode ser obtido do cultivo de *Aspergillus niger* em vários substratos, uma vez que aproximadamente 140 metabólitos de outras vias metabólicas podem interagir com 25 intermediários da via glicolítica/ácido tricarboxílico (SUN et al., 2007). Kim e colaboradores (2002), por exemplo atingiram altos níveis de produções de ácido cítrico por *A. niger* imobilizado em alginato de cálcio usando efluente de laticíneos como meio de cultura a pH 4 e temperatura igual a 30°C, condições essas similares as utilizadas nesse trabalho. Esse metabólito tem alta demanda da indústria de alimentos, com produção anual de 500 toneladas por ano e é também usado na síntese do poliéster de citrato de glicerol (com a aplicação na produção de batom), patentado pela empresa Phoenix Research Corporation (2005). Dessa forma, o ácido cítrico pode ser visto como um produto de alto valor obtido da produção de lipase.

Figura 15- Planta de uma biorrefinaria hipotética com produção de lipase



(a) Reator de coluna de bolhas em batelada alimentada, (b) cristalizador, (c) coluna de destilação para recuperação de etanol e concentração do ácido cítrico (para etapas de purificação posteriores), (d) reator de leito fixo para produção de biodiesel, (e) separador, (f) coluna de destilação para recuperação de glicerol, (g) STR para produção de ésteres de (emolientes, surfactantes, poliéster de citrato de glicerol). Fonte: O Autor, 2015.

A planta da biorrefinaria deveria conter uma unidade de produção de etilésteres (biodiesel), onde parte do etanol utilizado seria recuperado da etapa de precipitação e concentração da lipase. Além disso, o glicerol gerado na produção do biodiesel poderia ser também usado na fabricação de ésteres

emolientes e surfactantes por via enzimática, reduzindo assim o impacto gerado por esse subproduto. Um grande benefício desse modelo é o fato de que tanto o biodiesel quanto o ácido cítrico e lipase utilizam o mesmo tipo de matéria-prima, sendo que óleos residuais da produção de etilesteres (no caso de catálise enzimática) poderiam ser usados como meio de alimentação no cultivo de *A. niger*.

3.2.2. Modelagem e simulação da produção de lipase

O processo em batelada alimentada possui duas etapas características; a primeira é a fase batelada, onde o substrato é praticamente todo exaurido e a biomassa é aumentada, e a segunda etapa onde há entrada do substrato limitante continuamente. Esse modo de operação possui diversas vantagens, como o controle da taxa de crescimento, redução da inibição do seu crescimento por excesso de substrato ou formação de co-produtos inibidores (SALEHMIN, 2013). Nesse trabalho, a alimentação também teve o papel de repor sais e nitrogênio, bem como tentar controlar a redução do volume de trabalho devido à perda de água pela saída de ar saturado, uma vez que o reator não possui condensador.

O balanço de massa para cada componente (*i*) durante a fase batelada pode ser escrito como:

$$\text{variação}_i = \cancel{\text{entrada}_i} - \cancel{\text{saída}_i} + \text{geração}_i - \text{consumo}_i \quad (24)$$

Para a biomassa, essa equação é reescrita como:

$$\frac{dX}{dt} = \frac{d(x.V)}{dt} = V \frac{dx}{dt} + x \frac{dV}{dt} = \mu.x.V \quad (25)$$

$$\frac{dx}{dt} = \frac{1}{V} \left(\mu.x.V - x \frac{dV}{dt} \right) \quad (26)$$

Onde *X* é a massa de fungo, *x* é a concentração de biomassa, *V* é o volume do líquido no reator e μ é a taxa de crescimento específico do *A. niger* nas condições analisadas. De forma similar, o balanço de massa para o substrato é definido por:

$$\frac{dS}{dt} = \frac{d(s.V)}{dt} = V \frac{ds}{dt} + s \frac{dV}{dt} = -\frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dx}{dt} V \quad (27)$$

$$\frac{ds}{dt} = -\frac{1}{V} \left(\frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dx}{dt} V + s \frac{dV}{dt} \right) \quad (28)$$

$$Y_{x/s} = -\frac{x(t_j) - x(t_{j-1})}{s(t_j) - s(t_{j-1})} = -\frac{\Delta x}{\Delta s} \quad (29)$$

Onde S é a massa de óleo, s é a concentração de óleo na j -ésima hora (t_j) e $Y_{x/s}$ é o rendimento de biomassa por unidade de substrato consumido em cada intervalo de tempo. Por fim, o balanço de massa para o substrato é escrito como:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{d(p.V)}{dt} = V \frac{dp}{dt} + p \frac{dV}{dt} = Y_{p/x} \cdot \frac{dx}{dt} V \quad (30)$$

$$\frac{dp}{dt} = \frac{1}{V} \left(Y_{p/x} \cdot \frac{dx}{dt} V - p \frac{dV}{dt} \right) \quad (31)$$

$$Y_{p/x} = \frac{p(t_j) - p(t_{j-1})}{x(t_j) - x(t_{j-1})} = \frac{\Delta p}{\Delta x} \quad (32)$$

Onde P é a unidade de atividade enzimática (U) em um dado tempo, p é a unidade de atividade enzimática por unidade de volume na j -ésima hora (t_j) e $Y_{p/x}$ é o rendimento de produto por unidade de biomassa gerada em cada intervalo de tempo. Como não há entrada de biomassa nem de produto pelo fluido de alimentação, os seus balanços de massa para o período de batelada alimentada são iguais aos mencionados anteriormente (fase batelada). Por outro lado, a modelagem para o componente substrato nesse período é:

$$\frac{dS}{dt} = V \frac{ds}{dt} + s \frac{dV}{dt} = \dot{S} - \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dx}{dt} V \quad (33)$$

$$\frac{ds}{dt} = \frac{1}{V} \left(\dot{S} - \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{dx}{dt} V - s \frac{dV}{dt} \right) \quad (34)$$

Onde $\dot{S}$ é a vazão mássica de substrato na alimentação. Durante os experimentos, o volume do reator não se manteve constante. Por isso, utilizou-se o Excel® para correlacionar o volume do líquido ao longo do processo, obtendo-se a seguinte relação:

$$V(t) = 9 \times 10^{-5} \cdot t^2 - 0,0114 \cdot t + 3,4957 \quad (35)$$

$$\frac{dV}{dt} = 1,8 \times 10^{-4} \cdot t - 0,0114 \quad (36)$$

A tabela 7 mostra que os rendimentos $Y_{p/x}$ e $Y_{x/s}$ variaram ao longo do processo, diferentemente do que geralmente é assumido (rendimentos constantes). Isso é plausível, uma vez que tais valores calculados são rendimentos reais e dependem de fatores como estresse celular, taxa de manutenção celular e disponibilidade de substratos (DORAN, 1995). Outros autores também já reportaram o mesmo durante processos em batelada alimentada (GERRITSE, 1998).

Tabela 7- Dados da cinética de produção de lipase de *A. niger*

t (h)	x (g/L)	p (U/L)	s (g/L)	V (L)	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ ¹	$Y_{p/x}$
0	1,00	388,89	30,000	3,50	0,00000	0,031	0,000
24	1,47	250,00	15,008	3,32	0,00950	0,031	-294,613
45	1,94	111,11	0,016	3,15	0,00950	0,031	-294,613
70	4,22	277,78	0,079	3,15	0,02158	-35,929	73,191
96	6,62	1944,44	0,029	3,23	0,01462	47,467	693,619
120	9,27	555,56	0,028	3,41	0,01343	3717,709	-525,526
K_s (g/L)		0,03373		μ_{max} (h ⁻¹)		0,030148	

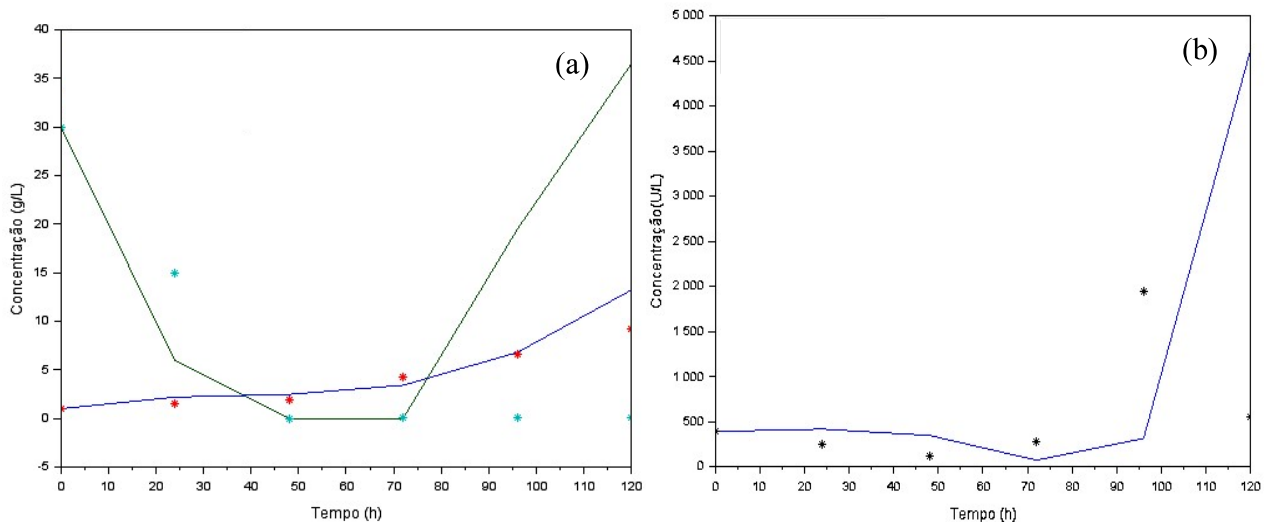
¹O rendimento biomassa/substrato foi considerado constante durante a fase batelada, uma vez que não é possível dividir um número por zero. Fonte: O Autor, 2015.

O gráfico 4 mostra os resultados da simulação do processo. Como pode ser observado, o modelo apresentou grande acurácia com relação ao crescimento celular, com desvio bastante baixo entre os dados experimentais e simulados. As curvas de consumo de substrato mostram um dado interessante: enquanto a concentração de óleo no reator depois do início da alimentação aumenta (valores de substrato simulados), a sua concentração efetiva no líquido- ou seja, a quantidade de óleo vegetal dissolvida e disponível para consumo do *A. niger*- se mantém muito baixa atingindo um estado *quasi*-estacionário. Embora o óleo de soja tenha sido adicionado continuamente a partir das 72 horas, sua solubilidade no meio e consumo pelo micro-organismo são condicionados pela concentração de surfactante e enzima no caldo fermentado, respectivamente, e um balanço de massa de substrato mais acurado deveria levar em conta esses dois fatores. O estado *quasi*-estacionário é então atingido uma vez que a quantidade de substrato consumido é instantaneamente repostada pelo excesso de óleo no reator.

Os valores simulados da concentração de enzima estão de acordo com a literatura (ABRAHAM et al., 2011) e mostram a relação produto-biomassa esperada, uma vez que a lipase é um produto diretamente ligado ao crescimento celular. Entretanto, o fato de sua quantidade no meio ter sido medida indiretamente pela atividade de esterificação pode ter gerado erros como no tempo igual a 120 h, onde a atividade enzimática caiu enquanto a biomassa aumentou (valores experimentais). Lipases são hidrolases que catalisam diversas reações, tais como desesterificação, esterificação, transesterificação e interesterificação (RIBEIRO et al., 2011), sendo que o tipo de reação catalisada depende do tipo de substrato no meio e as condições do processo (quantidade de água, substrato e

temperatura, por exemplo). Assim, concentrações maiores de óleo ao fim do processo pode ter favorecido reações de desesterificação, diminuindo a atividade de esterificação medida; além disso, o pH caiu ligeiramente no tempo de 120 horas, de 4,96 para 4,71.

Gráfico 4- Valores simulados e experimentais dos componentes do sistema na produção de lipase



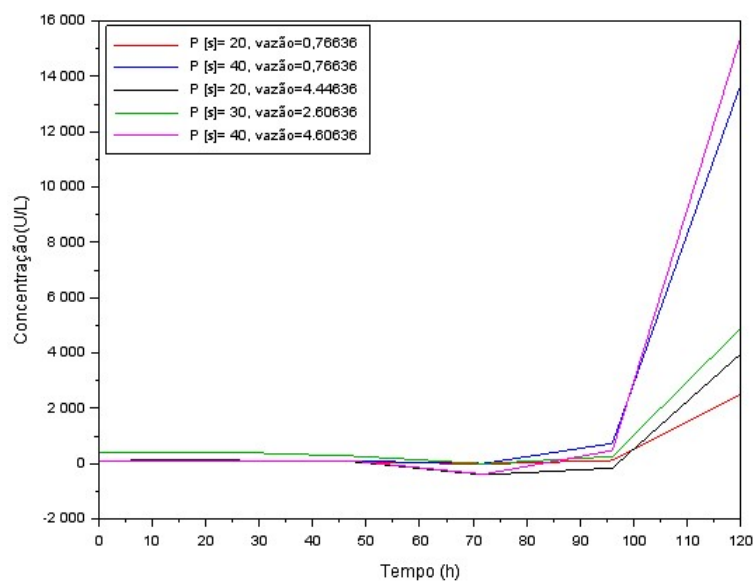
Nota: no gráfico (a), (--) e (*) são as concentrações de biomassa (g/L) simuladas e experimentais, respectivamente, enquanto que (--) e (*) são as concentrações de substrato (g/L) simuladas e experimentais, respectivamente. No gráfico (b), (--) corresponde à concentração de enzima simulada e (*) à concentração de lipase experimental. Fonte: O Autor, 2015.

Utilizando-se os dados cinéticos (valores iniciais de substrato, biomassa e produto) obtidos nas 4 condições de cultivos descritas anteriormente, a produção de lipase foi simulada em cinco condições geradas pelo software MiniTab® para um planejamento fatorial de dois fatores (concentração inicial de substrato e vazão mássica de alimentação do reator) com um ponto central – condição de maior produção de enzima. O gráfico 5 mostra que a maior atividade enzimática (15.419,9 U/L) seria obtida nos níveis mais altos de concentração inicial de óleo e vazão de alimentação, provavelmente porque nessa condição a concentração de biomassa inicial foi maior (Figura 13c); dessa forma, a sua concentração final, bem como a de enzima, deveria ser bem mais alta.

Entretanto, conforme discutido anteriormente, os alto valores de biomassa no meio oleoso pode ter sido devido ao acúmulo de óleo oxidado em volta dos flocos. Um outro resultado relevante da simulação do planejamento experimental é a limitação do modelo de Monod na modelagem do

crescimento microbiano em sistema multifásico oleoso para produção de lipase. Altas concentrações de óleo no meio reduz a taxa de transferência de oxigênio e a excreção da enzima (SALEHMIN et al., 2013), podendo limitar o crescimento microbiano. Os resultados o gráfico 5 se contrapõem ao da figura 15c e indicam que um modelo de inibição por substrato deve ser utilizado em trabalhos futuros.

Gráfico 5- Simulação da produção de lipase nos níveis -1 e +1 de um experimento composto central



Nota: Os fatores avaliados foram a concentração inicial de substrato no meio de cultura (s) e vazão de alimentação de substrato durante a fase de batelada alimentada ($\dot{S}$). Os níveis avaliados no experimento composto central foram: (---) $s = 2\%$ (m/v) e $\dot{S} = 0,76636$, (---) $s = 4\%$ (m/v) e $\dot{S} = 0,76636$, (---) $s = 2\%$ (m/v) e $\dot{S} = 4,44636$, (---) $s = 3\%$ (m/v) e $\dot{S} = 2,60636$ e (---) $s = 4\%$ (m/v) e $\dot{S} = 4,60636$. Fonte: O Autor, 2015.

4. CONCLUSÕES

Projeções para o mercado de ésteres indicam que o mesmo continuará crescendo a uma taxa de 4,1% ao ano até 2020, sendo que grande parte da demanda desses compostos é oriunda das indústrias de alimentos e farmacêuticas. Atualmente, a grande maioria dos ésteres, como o biodiesel e ésteres de glicerol utilizados em cosméticos ainda são produzidos por via química, mesmo sabendo-se que a via enzimática pode reduzir grandemente os impactos causados pela produção industrial desses insumos. Uma vez que o custo da lipase tem sido o gargalo da implementação da catálise enzimática, esse trabalho buscou estratégias de redução desses custos.

O biorreator de PVC construído para os experimentos se mostrou até sete vezes mais barato que tanques de agitação tipo *single-use* vendidos no mercado e foi eficiente na promoção de condições de cultivo de *A. niger*, apresentando k_La da ordem de $0,002918 \text{ s}^{-1}$ quando operado no modo coluna de bolhas a 20 LPM. Além do benefício de ser feito de material barato e reciclável, o tanque foi construído um *design* versátil que o permite ser operado como STR. Para esse caso, um novo sistema de agitação utilizando a areação como fonte de energia foi desenvolvido e modelado. O modelo demonstrou acurácia razoável e indicou que velocidades do impelidor da ordem de 16 rps podem ser alcançadas quando vazões de ar de $0,0006 \text{ m}^3/\text{s}$ são usadas, alcançando assim, um regime de escoamento turbulento.

Foi possível produzir lipase de *Aspergillus niger* no reator não-asséptico (modo coluna de bolhas), sendo que a maior concentração de enzima (1944,44 U/L), produtividade líquida (16,20 U/L.h) e menor custo por unidade de atividade enzimática (0,008 R\$/U) foram obtidos no meio contendo 2% de óleo de soja e 1% de sacarose. O fungo cresceu na forma de flocos (*pellet*), pH baixo e ausência de sacarose, o que traz inúmeras vantagens em termos de aplicações industriais. Esse cultivo foi modelado através de balanços de massa, cujas soluções computacionais apresentaram resultados bastante próximos aos dados experimentais.

Finalmente, pode-se concluir também que o desenvolvimento de equipamentos através do uso de materiais alternativos, como o PVC, é uma excelente estratégia de ensino-aprendizado para os alunos do curso, ajudando-os a entender e apreender o conteúdo discutido em sala e dando a eles mais prática em cálculos de dimensionamento de equipamentos e processos. Além disso, ferramentas para simulação como o SciLab®, Excel® e MiniTab® são muito úteis, senão imprescindíveis, no desenvolvimento e otimização de processos, uma vez que fornecem informações valiosas em tempo curto e baixo custo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S.; KAMINI, N. R.; GOWTHAMAN, M.K. Process Strategies for Alkaline Lipase Production Using *Aspergillus niger* MTCC 2594. **J App Pharm**, v. 1, n. 3, p. 126- 133, 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **O que é INCI?**. Apresenta informações sobre a nomenclatura de ingredientes de cosméticos, onde se encontra um link para o documento que contém as funções dos ingredientes cosméticos, bem como para a Nota Técnica que trata do INCI no Brasil e no mundo. 2012. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Cosmeticos/Assuntos+de+Interesse/Nomenclatura+de+Ingredientes+INCI/O+que+e+INCI>> . Acesso em: 31 jul. 2015

ANDERSON, D.; MASTERSON, D.; MCDONALD, B.; SULLIVAN, L. Industrial Biodiesel Plant Design and Engineering: Practical Experience. 2003, Putrajaya. In: International Palm Oil Conference (PIPOC). Disponível em: < <http://europacrown.com/userImages/Biodiesel.pdf>>. Acessos em: 8 nov. 2015.

ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 6475-6490, 2013.

BERDICK, M. The Role of Fats and Oils in Cosmetics. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, v. 49, p. 406-408, 1972.

BOUSQUET, M. Enzymatic Synthesis of Unsaturated Fatty Acid Glucoside Esters for Dermo-Cosmetic Applications. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 6, p. 730-736, 1999.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Sobre o biodiesel. Disponível em: < http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/o_biodiesel.html>. Acesso em: 8 nov. 2015

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Sobre o biodiesel. Disponível em: < http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/selo_combustivel_social.html>. Acesso em: 8 nov. 2015.

BRUNETTI, F. **Mecânica dos Fluidos**. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2008.

CLENDENNEN, S. K.; BOAZ, N. W. The Value of Green Processing. **GCI**, p. 56-57. Disponível em: < <http://www.gcimagazine.com/>>. Acesso em: 13 ago. 2015.

COGNIS IP MANAGEMENT GMBH. Achim Ansmann, Markus Dierker. **Ester of hexyldecanol having short-chained fatty acids**. EP2136776 B1, 17 abr. 2008, 26 out. 2011.

COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V.; REINEHR, C. O. Aplicações e produção de lipases microbianas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 4, p. 1-13, 2012.

EUROPEAN COMMISSION. **CosIng**. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/consumers/cosmetics/cosing/index.cfm?fuseaction=search.advanced>> . Acesso em: 2 ago. 2015.

FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R. Lipases em Biocatálise. In:_____. **Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008, p. 369–385.

GALLARATE, M.; CARLOTTI, M. E.; TROTTA, M.; BOVO, S. On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 188, p. 233–241, 1999.

GANI, S. S. A. et al. Engkabang Fat Esters for Cosmeceutical Formulation. **J Surfact Deterg**, v. 14, p. 227–233, 2011.

GARCIA-OCHOA, F.; GOMEZ, E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 153–176, 2009.

GERRITSE, G.; HOMMES, R. W. J.; QUAX, W. J. Development of a Lipase Fermentation Process That Uses a Recombinant *Pseudomonas alcaligenes* Strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 2644–2451, 1998.

GUARATINI, T.; GIANETI, M. D.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Stability of cosmetic formulations containing esters of Vitamins E and A: Chemical and physical aspects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 327, p. 12–16, 2006.

HAJIAN, H.; YUSOFF, W. M. W. Itaconic Acid Production by Microorganisms: A Review. **Current Research Journal of Biological Sciences**, v. 7, n. 2, p. 37-42, 2015.

HALLIDAY, D.; RESNICK, R.; WALKER, J. **Fundamentos de Física**. 8ª ed., Rio de Janeiro: LTC, 2009.

HILLION, G.; DELFORT, B.; PENNEC, D.; BOURNAY, L.; CHODORGE, J. Biodiesel production by a continuous process using a heterogeneous catalyst. **Prepr. Pap.-Am. Chem. Soc., Div. Fuel Chem.** v. 48, n. 2, p. 636-638, 2003.

HOLM, H. C. (2007). Making creams and lipsticks greener. Disponível em: <<https://personal-care.evonik.com>>. Acesso em: 3 abr. 2015.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY. Biofuel Production. **IEA Energy Technology Essentials**. P. 1-4, 2007. Disponível em: < <https://www.iea.org/publications/freepublications/publication/essentials2.pdf>>. Acesso em: 8 nov. 2015.

IWATA, H.; SHIMADA, K. Developing the Formulations of Cosmetics. In:_____. **Formulas, Ingredients and Production of Cosmetics: Technology of Skin- and Hair-Care Products in Japan**. Japan:Springer, 2013. cap 1. p. 3-19.

JBS. Biodiesel. Disponível em: < <http://www.jbs.com.br/pt-br/content/biodiesel>>. Acesso em: 8 nov. 2015.

JUNKER, B. H. Scale-Up Methodologies for Escherichia coli and Yeast Fermentation Processes. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, n. 6, p. 347–364, 2004.

KANSAI CHEMICAL ENGINEERING CO., LTD. (US). Nobuyuki Kuratani; Shinji Hama; Hideo Noda; Hideki Fukuda. **Continuous Production of Biodiesel Fuel by Enzymatic Method**. 14741755, 17 jun. 2015, 08 out. 2015.

KENG, P. S. et al., Newly synthesized palm esters for cosmetics industry. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 37–44, 2009.

KING, D. **The Future of Industrial Biorefineries**. Geneva, CH: World Economic Forum, 2003.

LOUBAT-BOULEUC, N. Les esters en cosmétologie : généralités et fonctionnalités. **OCL**, v. 11, n. 6, p. 454-456, 2004.

LUPO, M. P. Antioxidants and Vitamins in Cosmetics. **Clinics in Dermatology**, v. 19, p. 467–473, 2001.

MONTEFIORE MEDICAL CENTER. Iraj Lalezari. **Process for the synthesis of esters and amides of carboxylic acids**. US4780542 A, 26 set. 1983, 25 out. 1988.

- NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R.S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 769-777, 2005.
- PAULA, A. V.; BARBOZA, J. C. S.; CASTRO, H. F. Estudo da Influência do Solvente, Carboidrato e Ácido Graxo na Síntese Enzimática de Ésteres de Açúcares. **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 792-796, 2005.
- PETERS, M. S.; TIMMERHAUS, K. D.; WEST, R. E. **Plant design and economics for chemical engineers**. 5^a Ed. New York, NY: McGraw-Hill, 2003. 988p. (Chemical Engineering Series).
- PETROBRAS. Montes Claros. Disponível em: < <http://www.petrobras.com.br/pt/nossas-atividades/principais-operacoes/usinas-de-biodiesel/montes-claros.htm>>. Acesso em: 8 nov. 2015.
- PHOENIX RESEARCH CORPORATION (US). John Imperante; Somerville. **GLYCERYL CITRATE POLYESTERS IN PERSONAL CARE**. US 6,861,498 B1, 23 jan. 2003, 01 mar. 2005.
- PINHEIRO, R. S.; CÉSAR, A. S.; BATALHA, M. O. Impactos da produção de glicerina derivada de biodiesel em outros setores: um estudo multi-casos. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, 30., 2010, São Carlos. **Anais eletrônicos da Associação Brasileira de Engenharia de Produção**. São Paulo: ENEGEP, 2010. p. 1-11.
- POKORNY, D.; CIMERMAN, A.; STEINER, W. *Aspergillus niger* lipases: induction, isolation and characterization of two lipases from a MZKI A1 16 strain. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 2, p. 215-222, 1997.
- PUBCHEM. Banco de dados para pesquisa de estrutura molecular de compostos químicos. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/search.cgi>>. Acesso em: 8 ago. 2015.
- RAHMAN, N. F. A et al. High yield lipase-catalyzed synthesis of Engkabang fat esters for the cosmetic industry. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2168–2176, 2011.
- RAMAN, J. K.; TING, V. F. W.; POGAKU, R. Life cycle assessment of biodiesel production using alkali, soluble and immobilized enzyme catalyst processes. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, p. 4221-4229, 2011.
- RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-16, 2011.

SALEHMIN, M. N. I.; ANNUAR, M. S. M.; CHISTI, Y. High cell density fed-batch fermentations for lipase production: feeding strategies and oxygen transfer. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 36, p. 1527–1543, 2013.

SANTOS, N. B. L.; REZENDE, M. J. C. Produção de Monoacilgliceróis: Rotas e Catalisadores. **Rev. Virtual Quim.**, v. 4, n. 2, p. 118-129, 2012.

SCHILLING, B. M. *Sclerotium rolfsii* ATCC 15205 in continuous culture: Economical aspects of scleroglucan production. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 57-61.

STATISTA. The world's biggest biodiesel producers in 2014, by country (in billion liters). Disponível em: < <http://www.statista.com/statistics/271472/biodiesel-production-in-selected-countries/>>. Acesso em: 8 nov. 2015.

STATISTA. Biodiesel production in the European Union from 2010 to 2025 (in million gallons)*. 2015. Disponível em: < <http://www.statista.com/statistics/202236/eu-biodiesel-production-from-2010/>>. Acesso em: 8 nov.

SUN, J.; LU, X.; RINAS, U.; ZENG, A. P. Metabolic peculiarities of *Aspergillus niger* disclosed by comparative metabolic genomics. **Genome Biology**, v. 8, n. 9, p. 1-13, 2007.

TRÄGER, M.; QAZI, G. N.; ONKEN, U.; CHOPRA, C. L. Comparison of airlift and stirred reactors for fermentation with *Aspergillus niger*. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 68, p. 112-116, 1989.

TEMELLI, F.; KING, J. W.; LIST, G. R. Conversion of oils to monoglycerides by glycerolysis in supercritical carbon dioxide media. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 6, p. 699-706, 1996.

THUM, O.; OXENBELL, K. M. Biocatalysis – A Sustainable Method for the Production of Emollient Esters. **SÖFW-Journal**, v. 134, n. 1, p. 44-47, 2008.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. Fatty Acid Esters Market is Expected to Reach US\$ 2.24 Bn by 2020. Nova York, 18 fev. 2015a. Disponível em: <<http://www.transparencymarketresearch.com/pressrelease/fatty-acid-esters-market.htm>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. Esters Market - Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast, 2014 - 2020. Nova York, [2015b]. Disponível em: < <http://www.transparencymarketresearch.com/esters-market.html>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. Benefits and Concerns. Disponível em: < <http://www3.epa.gov/region9/waste/biodiesel/benefits.html>>. Acesso em 8 nov. 2015.

VERÍSSIMO, L. A. A. et al. Optimization of flavor ester synthesis catalyzed by *Aspergillus niger* lipase. **African Journal Of Microbiology Research**, v. 9, n. 13, p. 922-928, 2015.

WANG, L. K. et al. **Flotation Technology**. Local: LLC, 2010. p. 49-83. v. 12.

WILDE, D.; DREHER, T.; ZAHNOW, C.; HUSEMANN, U.; GRELLER, G.; ADAMS, T.; FENGE, C. Superior Scalability of Single-Use Bioreactors. **BioProcess International**, v. 12, n. 8, p. 1- 8.

ZENITH COSMETIC TECHNOLOGIES LLC. John M. Young. **Process for the manufacture of compounds containing a fatty acid moiety**. US 6274748 B1, 14 abr. 2000, 14 ago. 2001.

ANEXOS

ANEXO A- ALGORITMO PARA SIMULAÇÃO DA VELOCIDADE DO IMPELIDOR

```
//-----//
//Modelagem considerando os fatores de atrito do regime turbulento e laminar igual a 1
//-----//
// Descrição do código: Simula a velocidade do impelidor a diferentes vazões de ar
// Implementado por: Willer Ferreira da Silva Junior
// Versão: Final
// Data: 7/11/2015
//-----//
//          PR É - P R O C E S S A M E N T O
//-----//
close
clc
clear
//-----//
//          P R O G R A M A   P R I N C I P A L
//-----//
// Variáveis de entrada:

u=8.9*10^-4; // P.s
g=9.81 ; // m/s^2
water_density=997 ; // Kg/m^3
bubble_density=1.2 ; //Kg/m^3
vt_A1=0.249 ; // m/s (MEDIDO EXPERIMENTALMENTE)
vt_A2=0.264; // m/s (MEDIDO EXPERIMENTALMENTE)
r=0.04 ; // m
y=0.002 ; // m (VALOR SUPOSTO)
A1=%pi*(0.005/2)^2; //m^2 (VALOR MEDIDO)
z1=0.055 ; // m
z2=0.11 ; // m
Q_exp=[0 1 5 10 15 20]*0.000016666667; // m^3/s
P2=water_density*g*(0.19-(z2+0.05))+89900; //Pa (pressão atm + coluna d'água)
x=0.9; // valor suposto
As1=%pi*(0.003/2)^2; // m^2
As2=0.0005*0.005; //m^2
gama=11.61 ; // N/m3
Np=5.5;
k1=70;
Di=0.065; // m
faL=1 ; //fator de atrito para o regime laminar
faT=1 ; //fator de atrito para o regime turbulento
Ni=0;
coef=0; //vetor de coeficientes da regressão Ni_simulado versus Ni_exp
reg=0; //equação da reta da regressão Ni_simulado versus Ni_exp
Re=0;

A12=[As1 As2];
Ni_exp=[0 0 0.014305556 0.04625 0.100277778 0.1275
0 0 0.082962963 0.117407407 0.148518519]; //rps

D1=sqrt((vt_A1*18*u)/(g*(water_density-bubble_density))); // cálculo do diâmetro da bolha
D2=sqrt((vt_A2*18*u)/(g*(water_density-bubble_density))); // cálculo do diâmetro da bolha
Db=[D1 D2];

// Resolução do problema:

for i=1:2
    D=Db(1,i);
    for j=1:1:6
        Q=Q_exp(1,j);
        P1= 2.3892e+008*Q^0.90035; //equação obtida pela correlação entre a pressão estática de vazão nula a cada vazão de ar
        if Q < 30*1.6*10^-5 // vazão na qual se atinge o regime turbulento
            Ni(i,j)=(8*0.16*r*(1/y)*%pi*(D/2)^2*sqrt(((P1-P2)/gama+(1/(2*g))*(Q*x/A1)^2+(z1-z2)*2*g))/(faL*k1*Di^3);
            if Ni(i,j)==%i then
```

```

        Ni(i,j)= 0;
    else
    end
else
Ni(i,j)=sqrt((8*r*0.16*(1/y)*%pi*(D/2)^2*u*sqrt(((P1-P2)/gama+(1/(2*g))*(Q*x/A1)^2+(z1-z2))*2*g))/(faT*Np*water_density*Di^5));
    if Ni(i,j)==%i then
        Ni(i,j)= 0;
    else
    end
end
Re(i,j)=(Ni(i,j)*water_density*Di^2)/u;

end
[a,b]=reglin(Ni_exp(i,1:1:6),Ni(i,1:1:6));
reg= a*Ni_exp(i,1:1:6)+b;
subplot(211)
plot(Ni_exp(i,1:1:6),reg,"black")
end

//-----//
//          G R Á F I C O S
//-----//

subplot(211)
plot(Ni_exp(1,1:1:6),Ni(1,1:1:6),"o", Ni_exp(2,1:1:6),Ni(2,1:1:6),"*")
xlabel('Ni_experimental (rps)', 'fontsize',2 )
ylabel('Ni_simulado (rps)', 'fontsize',2)
legend("reg1","reg2",'Área maior','Área menor',['in_upper_left'])

subplot(212)
plot(Q_exp,Ni(1,1:1:6),"red", Q_exp,Ni(2,1:1:6),"black", Q_exp,Ni_exp(1,1:1:6),"o", Q_exp,Ni_exp(2,1:1:6),"*")
xlabel('Vazão (m³/s)', 'fontsize',2 )
ylabel('Velocidade do impelidor (rps)', 'fontsize',2)
legend("Ni1","Ni2",'Área maior','Área menor',['in_upper_left'])

```

ANEXO B- ALGORITMO DE SIMULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPASE

```
//-----//
//          D E S C R I Ç Ã O
//-----//
// Descrição do código: Simula a cinética de produção de lipase de A. niger (meio 2:1)
// Implementado por: Willer Ferreira da Silva Junior (Adaptado de códigos cedidos pelo Prof. Edson Romano Nucci)
// Versão: Final
// Data: 21/11/2015
//-----//
//          P R É - P R O C E S S A M E N T O
//-----//
close
close
clc
clear
mode(0)
lines(0)
//-----//
//          F U N Ç Õ E S
//-----//

function dy=funcao(t, y, v, u, x, s, Yxs, Ypx, Y1, Y2, umax, Ks, m, p, j)
dy = zeros(size(y)); //Vetor dy
v=(9*10^-5)*t^2 -0.0114*t + 3.4957; //Correlação obtida pelo plot Volume x tempo
x=y(2);
s=y(3);
p=y(4);
u=(umax*s)/(Ks+s); //Modelo de Monod
j=t/24+1;
Y1=[0.047180291 0.047180291 0.047180291 -35.92903855 47.46696613 3717.709176]; //Obtido de dados experimentais
Y2=[0 -294.6127946 -294.6127946 73.19113342 693.6187079 -525.5255255]; //Obtido de dados experimentais
Yxs=Y1(j,1);
Ypx=Y2(j,1);

// BALANÇOS DE MASSA
dy(1)=(1.8*10^-4)*t-0.0114; //dy(1)=dv/dt
dy(2)=(x/v)*(u*v-dy(1)); //dy(2)=dx/dt
if t <= 48 then
    dy(3)=-(1/v)*(s*dy(1)+(1/Yxs)*dy(2)*v); //dy(3)=ds/dt, fase batelada
else
    dy(3)=(1/v)*(m -s*dy(1)-(1/Yxs)*dy(2)*v); //dy(3)=ds/dt, fase batelada alimentada
end
dy(4)=(1/v)*(Ypx*dy(2)*v -p*dy(1)); //dy(4)=dp/dt
endfunction

//-----//
//          P R O G R A M A   P R I N C I P A L
//-----//
// Variáveis de entrada:

t=[0:24:120];
umax=0.030148523;
Ks=0.033734639;
m=2.833*0.92;

// Resolução do problema:

t0=0; //Condição inicial de tempo
y0=[3.5 1 30 388.88]; //Condição inicial em t0 (v0, x0, s0, p0)
y=ode(y0,t0,t,list(funcao, t))//Resolver PVI

//-----//
//          G R Á F I C O S
//-----//
X=[1.00 1.47 1.94 4.22 6.62 9.27]; //Dados experimentais
P=[388.89 250 111.11 277.78 1944.44 555.56]; //Dados experimentais
S=[30.00000 15.007935 0.01587 0.07925 0.02863 0.02791]; //Dados experimentais
```

```

scf(1)
plot(t,y(4,:),t,P,'*')
legend('P simulado','P experimental',['in_upper_left'])
xlabel('Tempo (h)','fontsize',2)
ylabel('Concentração(U/L)','fontsize',2)

scf(2)
plot(t,y(2,:), t,y(3,:), t,X,'*', t,S,'*')
legend('X simulado','S simulado','X experimental','S experimental',['in_upper_left'])
xlabel('Tempo (h)','fontsize',2)
ylabel('Concentração (g/L)','fontsize',2)
//Fim do programa

```