

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

DESENVOLVIMENTO DE UM DETERGENTE ENZIMÁTICO ÁCIDO PARA LIMPEZA
DE ORDENHADEIRAS E AVALIAÇÃO DE SUA VIABILIDADE ECONÔMICA DE
PRODUÇÃO

Dissertação de Mestrado

Fabricio Ferreira Luz

Porto Alegre, 2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

DESENVOLVIMENTO DE UM DETERGENTE ENZIMÁTICO ÁCIDO PARA LIMPEZA
DE ORDENHADEIRAS E AVALIAÇÃO DE SUA VIABILIDADE ECONÔMICA DE
PRODUÇÃO

Fabricio Ferreira Luz

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-graduação em Biologia Celular e
Molecular do Centro de Biotecnologia da
UFRGS como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre

ORIENTADORA: Marilene Henning Vainstein

Porto Alegre, 2007

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Sydnei Mitidieri Silveira, pelo apoio, confiança, incentivo e por todos os ensinamentos passados durante estes anos.

À minha orientadora, Profa. Dra. Marilene Henning Vainstein, pela confiança e apoio em tudo que foi necessário.

Às alunas de iniciação científica Marcia Rodrigues Sandri, Fernanda Cortez Lopes e Ana Paula Bonzanini pela amizade, grande ajuda e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Luciano Saucedo e Silvia Regina Centeno, pelo apoio e ajuda no decorrer do mestrado.

Aos amigos Alexandre e Cristiano Costa dos Santos, pela receptividade em sua propriedade e pelas valiosas informações e ensinamentos.

À amiga Dra. Arlete Becker Ritt, pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho, por estar sempre disposta a ajudar, e por todos os ensinamentos.

À Profa. Dra. Maria Inez de Moura Sarquis do Laboratório de Coleção de Culturas de Fungos da Fundação Oswaldo Cruz pela identificação do fungo filamentosos utilizado neste trabalho.

À Profa. Dra. Simone Flores e ao economista Rodrigo Leiria Schneider pelas sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.

À todos os colegas que passaram ou que ainda trabalham na BioPlus, pelo trabalho em equipe e ajuda no que foi preciso, em especial aos farmacêuticos Marcos Motta Marquardt, Antônio Veiga Machado Jr. e Maria Lionzo, e à técnica em química Rosemari Dias.

Ao colega Ms. Walter Orlando Beys da Silva, pela ajuda e ensinamentos, principalmente no início deste trabalho, e aos demais colegas do laboratório da Profa. Marilene.

Aos meus pais, Marcelo e Oneides, pelo apoio e incentivo durante toda a minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E UNIDADES	6
LISTA DE FIGURAS.....	7
LISTA DE TABELAS	10
1. RESUMO.....	15
2. INTRODUÇÃO	16
2.1 Mercado do Leite	16
2.2 Sistema Tradicional de Higienização de Ordenhadeiras.....	18
2.3 Higienização de Ordenhadeiras Utilizando o Detergente Enzimático	20
2.4 Detergentes	20
2.5 Composição de Detergentes.....	21
2.5.1 Surfactantes	21
2.5.2 Dispersantes poliméricos	25
2.5.3 Quelantes	26
2.5.4 Solventes.....	26
2.5.5 Componentes minoritários.....	27
2.6 Detergentes enzimáticos.....	27
2.7 Formulação de enzimas em detergentes líquidos.....	28
2.8 Lipases.....	29
2.9 Microrganismos produtores de lipase	31
2.10 Meios de cultura de produção de lipase.....	33
2.11 Produção de lipase	36
3. OBJETIVOS	38
3.1 Objetivo Geral	38
3.2 Objetivos Específicos.....	38
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
4.1 Microrganismos.....	39
4.2 Meio de cultura de produção de lipase	39
4.3 Condições de cultivo	40
4.4 Efeito da adição de surfactantes	40
4.5 Ensaio enzimático de lipase.....	40
4.6 Ensaio enzimático de protease	41
4.7 Otimização dos parâmetros do bioprocessamento de produção de lipase.....	41
4.8 Produção de lipase em escala piloto.....	43
4.8.1 Inóculo.....	43
4.8.2 Bioprocessamento em reator de 100 litros	44
4.8.3 Determinação de massa seca	45
4.8.4 Determinação de glicose	45
4.9 Formulação do detergente enzimático.....	45
4.10 Avaliação dos processos de limpeza de ordenhadeiras à campo.....	45
4.10.1 Determinação da dureza da água	46

4.10.2 Análise do desgaste dos insufladores através de microscopia eletrônica de varredura	46
4.10 Análise de viabilidade econômica na produção do detergente enzimático para ordenhadeiras	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 Escolha do microrganismo	50
5.2 Efeito da adição de surfactantes	51
5.3 Identificação do microrganismo	52
5.4 Escolha do meio de produção de lipase	52
5.5 Otimização dos parâmetros do bioprocessamento de produção de lipase	52
5.6 Produção de lipase em escala piloto.....	60
5.7 Formulação do Detergente Enzimático	63
5.8 Ensaio de Utilização do Detergente Enzimático a Campo	69
5.8.1 Tempo de limpeza do equipamento	69
5.8.2 Consumo de água	70
5.8.3 Consumo de energia elétrica.....	71
5.8.4 Impacto Ambiental.....	73
5.8.5 Desgaste dos Insufladores	73
5.9 Análise de Viabilidade Econômica de Produção do Detergente Enzimático Ácido para Limpeza de Ordenhadeiras.....	76
5.9.1 Análise de Viabilidade Econômica de Produção do Detergente Enzimático Ácido para Limpeza de Ordenhadeiras Considerando a Compra das Enzimas.....	77
5.9.2 Análise de Viabilidade Econômica de Produção do Detergente Enzimático Ácido para Limpeza de Ordenhadeiras Considerando a Produção das Enzimas ..	90
6. CONCLUSÕES	103
7. PERSPECTIVAS	105
8. REFERÊNCIAS	106
ANEXO 1.....	114
ANEXO 2.....	130

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E UNIDADES

°C	Graus Celsius
g	Gramma
mg	Miligramma
W	Watt
Kwh	Quilo watt hora
M	Molar
mM	Milimolar
h	Hora
L	Litro
mL	Mililitro
min	Minuto
DO	Densidade ótica em absorbância em comprimento de onda
Nm	Nanômetro
p-NPP	para-Nitrofenilpalmitato
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
U	Unidade de atividade enzimática
Tris	2-amino-2-hidroximetilpropano-1,3-diol
Triton X-100	Éter octilfenólico de decaetilenoglicol
Tween	Polisorbitano
SDS	Dodecilsulfato de sódio
CMC	Concentração Micelar Crítica
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
EDTA	Ácido etilnodiaminotetracético, sal sódico
TIR	Taxa interna de retorno
VAL	Valor atual líquido
VPL	Valor presente líquido
DRE	Demonstrativo de Resultados

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estrutura do LAS.....p.23
- Figura 2:** A. biorreator de 100 litros. B. Turbinas Rushton. C. Filtros de entrada e saída de ar.....p.44
- Figura 3:** A. Sala de ordenha da Fazenda do Araçá em Viamão, RS, onde foram realizados os ensaios a campo. B. Conjunto de insufladores durante realização da ordenha. C. Insufladores.....p.46
- Figura 4:** Atividade de lipase em pH 5,0 e 8,0 dos diferentes microrganismos testados.p.50
- Figura 5:** Extração da enzima pela adição de surfactantes após o cultivo de *Penicillium aurantiogriseum*, em Erlenmeyer.....p.51
- Figura 6:** Atividade de lipase de *Penicillium aurantiogriseum* em diferentes óleos. A, B: barras com as mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).....p.53
- Figura 7:** Gráfico de Pareto considerando todos os efeitos.....p.54
- Figura 8:** Superfície de resposta da produção de lipase em função da temperatura e concentração de óleo de soja.....p.56
- Figura 9:** Projeção da superfície de resposta da atividade de lipase em função da temperatura e concentração de óleo de soja no plano.....p.56

Figura 10: Superfície de resposta da atividade de lipase em função do pH e da concentração de óleo de soja.....p.57

Figura 11: Projeção da superfície de resposta da atividade de lipase em função do pH e da concentração de óleo de soja no plano.....p.57

Figura 12: Superfície de resposta da atividade de lipase em função do pH e temperatura.....p.58

Figura 13: Projeção da superfície de resposta da atividade de lipase em função do pH e temperatura.....p.58

Figura 14: Bioprocesso de produção de lipase por *Penicillium aurantiogriseum*, em escala piloto de 100 litros.....p.63

Figura 15: Visualização do precipitado formado após 13 dias da formulação do detergente DE2609/5.....p.64

Figura 16: Perda da atividade de protease em três formulações ao longo do tempo.....p.66

Figura 17: Perda da atividade de lipase em três formulações ao longo do tempo.....p.66

Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura dos insufladores: A. insuflador novo. B. insuflador do ensaio acelerado de degradação com detergente enzimático. C. insuflador do ensaio acelerado de degradação com detergentes tradicionais. D. insuflador utilizado por seis meses na Fazenda do Araçá.....p.75

Figura 19: Fase de sucção (esquerda) e massagem (direita) dos insufladores no equipamento de ordenha.....p.76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais países produtores de leite em 2005.....	p.17
Tabela 2: Exemplos de surfactantes utilizados em formulações de detergentes.....	p.24
Tabela 3: Aplicações industriais de lipases.....	p.30
Tabela 4: Microrganismos testados para produção de lipase.....	p.39
Tabela 5: Matriz dos experimentos da análise fatorial.....	p.42
Tabela 6: Matriz dos experimentos de análise fatorial com os valores utilizados nos bioprocessos.....	p.43
Tabela 7: Atividade de lipase de <i>Penicillium aurantiogriseum</i> nas condições testadas.....	p.53
Tabela 8: Concentração das variáveis no ponto de máxima atividade lipolítica, conforme a equação obtida através da metodologia de superfície de resposta.....	p.60
Tabela 9: Composição das formulações realizadas.....	p.67
Tabela 10: Tempo de cada etapa de limpeza do equipamento utilizando o Sistema Tradicional de limpeza de ordenhadeiras e o Detergente Enzimático.....	p.69

Tabela 11: Volume de água utilizado em cada etapa de limpeza do equipamento utilizando o Sistema Tradicional de limpeza de ordenhadeiras e o Detergente Enzimático.....p.71

Tabela 12: Temperatura das soluções em cada etapa de limpeza do equipamento utilizando o Sistema Tradicional de limpeza de ordenhadeiras e o Detergente Enzimático.....p.72

Tabela 13: Investimento inicial para análise de viabilidade econômica do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a compra das enzimas.....p.79

Tabela 14: Mão-de-obra para produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a compra das enzimas.....p.80

Tabela 15: Custos com depreciação, manutenção e seguros para a produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a compra das enzimas.....p.80

Tabela 16: Impostos, comissões e perdas para produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a compra das enzimas.....p.81

Tabela 17: Previsão de vendas do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras para cinco anos.....p.81

Tabela 18: Custos fixos mensais para produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a compra das enzimas.....p.82

Tabela 19: Custos variáveis de produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a compra das enzimas.....p.82

Tabela 20: Necessidade de capital de giro para a produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a compra das enzimas.....p.83

Tabela 21: Cálculo do preço de venda sugerido para análise de viabilidade econômica do detergente enzimático ácido para limpeza considerando a compra das enzimas.....p.84

Tabela 22: Demonstrativo de resultados da produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a compra das enzimas.....p.86

Tabela 23: Fluxo de caixa para o cálculo da TIR, VAL e PAYBACK, em cinco anos, para a produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a compra das enzimas.....p.87

Tabela 24: Simulações de diminuição do preço de venda (1), diminuição do volume de vendas (2), aumento do custo das enzimas (3) e aumento dos custos fixos (4) para avaliação da sensibilidade do projeto do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a compra das enzimas.....88

Tabela 25: diminuição do custo com matéria-prima, água e energia elétrica para produção de lipase com o aumento da atividade enzimático no reator de 30 m³p.91

Tabela 26: Investimento inicial para análise de viabilidade econômica do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a produção das enzimas.....p.94

Tabela 27: Custos com depreciação, manutenção e seguros para análise de viabilidade econômica do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a produção das enzimas.....p.95

Tabela 28: Custos fixos mensais para análise de viabilidade econômica do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a produção das enzimas.....p.96

Tabela 29: Custos com matéria-prima e embalagem para análise econômica do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a produção das enzimas.....p.100

Tabela 30: Necessidade de capital de giro para análise econômica do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a produção das enzimas.....p.100

Tabela 31: Formação do preço de venda sugerido para análise econômica do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a produção das enzimas.....p.101

Tabela 32: Demonstrativo de resultados da produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a produção das enzimas.....p.102

Tabela 33: Fluxo de caixa para o cálculo da TIR, VAL e PAYBACK, em cinco anos, para a produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a compra das enzimas.....p.104

Tabela 34: Simulações de diminuição do preço de venda (1), diminuição do volume de vendas (2), aumento do custo das enzimas (3) e aumento dos custos fixos

(4) para avaliação da sensibilidade do projeto do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a produção das enzimas.....p.105

1. RESUMO

A produção de leite no Brasil apresentou um crescimento de 131% em 15 anos e foi de 25,7 bilhões de litros em 2006, e para que este setor continue em crescimento, boas condições higiênico-sanitárias na cadeia de produção são indispensáveis. A higienização dos equipamentos de ordenha é de particular importância para a qualidade da matéria-prima que chega aos laticínios. A limpeza de ordenhadeiras, tradicionalmente, é realizada com um detergente alcalino para remoção dos resíduos de lipídios e proteínas, logo em seguida, utiliza-se um detergente ácido para solubilizar os sais de cálcio que precipitam em pH alcalino e acabam formando incrustações no interior da ordenhadeira. O objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento e produção de um detergente enzimático ácido, constituído de enzimas hidrolíticas, para limpeza de ordenhadeiras, e avaliação de sua viabilidade econômica de produção. Foram testados 12 microrganismos produtores de lipase, e o melhor foi *Penicillium aurantiogriseum*, da coleção da empresa BioPlus – Desenvolvimento Biotecnológico LTDA. Foi selecionado óleo de soja como fonte de carbono para indução da lipase. Através da metodologia de superfície de resposta, a temperatura de produção de lipase foi otimizada em 29° C, a concentração do óleo de soja em 15 g/L, e o pH em 6,5, no início do processo. Foi realizado um bioprocesso de produção de lipase em escala piloto de 100 litros, e a atividade foi 6,8 vezes maior do que em Erlenmeyer, atingindo 32 U/mL na quadragésima hora. Os testes de formulação do produto foram realizados com enzimas comerciais, e se mostraram estáveis por uma semana. O detergente formulado foi utilizado na Fazenda do Araçá, e promoveu economia de tempo (42,8%), água (42,8%), energia elétrica (48%), em comparação com o sistema tradicional, e os ensaios de desgaste dos insufladores sugerem que sua utilização promove um menor desgaste destas peças. A análise de viabilidade econômica mostra que a produção do detergente é viável, considerando a compra das enzimas (TIR = 35,6%), e que, para a produção destas matérias-primas, é necessário uma maior atividade enzimática e produção em biorreatores de 30 m³ (TIR = 34,7%).

2. INTRODUÇÃO

2.1 Mercado do Leite

A produção de leite no Brasil apresentou um crescimento de 131% em 15 anos e foi de 25,7 bilhões de litros em 2006, transformando o país de tradicional importador em exportador de lácteos (EMBRAPA, 2006).

O inédito superávit na balança comercial de lácteos, em 2004, foi de U\$ 11,4 milhões (NOGUEIRA, 2006). No mercado internacional, os preços continuam aumentando, superando os U\$ 4.000,00 por tonelada de leite em pó (MILKPOINT, 2007c), devido à crescente demanda na China e na América Latina e a menor oferta de tradicionais produtores que não conseguem manter o ritmo de aumento de 3% no consumo anual de leite (MILKPOINT, 2007b). No entanto, a sobrevalorização da moeda nacional em relação à norte-americana diminui a competitividade do produto brasileiro (FIGUEIRÓ, 2006).

No Rio Grande do Sul foram anunciados investimentos no setor leiteiro da ordem de R\$ 460 milhões pela Nestlé, Embaré e CCGL (GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, 2006) e pela ITALAC (MILKPOINT, 2007a) para instalação de suas fábricas no estado o que deve aumentar a demanda por leite *in natura* uma vez que as três empresas devem processar juntas cerca de quatro milhões de litros de leite por dia (EMBRAPA, 2006). Como a produção do estado é de 6,8 milhões litros de leite por dia (BALDE BRANCO, 2007) a expectativa é de aumento nos preços pagos aos produtores.

Conforme mostra a Tabela 1, o Brasil é o sétimo maior produtor mundial de leite, no entanto, o país é 17º colocado no que diz respeito à produtividade das vacas. Apesar de o rebanho de leite brasileiro ser mais de duas vezes o tamanho do rebanho dos Estados Unidos, este apresenta uma produção mais de três vezes maior que a brasileira (EMBRAPA).

Tabela 1: Principais países produtores de leite em 2005

País	Produção de leite (mil t)
1º Estados Unidos	80.150
2º Índia	38.500
3º Rússia	30.600
4º Alemanha	27.600
5º França	25.282
6º China	24.530
7º Brasil	23.320

Fonte: EMBRAPA (2007).

A maior parte do leite produzido no Brasil é proveniente de pequenas propriedades, sendo a falta de profissionalização um grave problema do setor.

A gestão da propriedade leiteira é complexa e exige capacidade gerencial e administrativa do produtor, pois para desenvolver a atividade principal de manejar e ordenhar as vacas o produtor precisa também executar outras atividades como a produção de volumosos, suplementação com concentrados, o manejo reprodutivo e sanitário, a mecanização, as instalações, o melhoramento genético, a criação dos bezerros e a comercialização do produto (LIMA & NORONHA, 2006).

Além disso, a falta de profissionalização é um dos motivos para a baixa produtividade apresentada pelo rebanho de leite brasileiro, uma vez que esta depende da genética dos animais, do manejo do rebanho e de condições de higiene na ordenha das vacas.

Uma das principais fontes de contaminação do leite são os utensílios (baldes e latões) e equipamentos (ordenhadeira mecânica e tanques de resfriamento), mas a higienização adequada destes materiais é ainda considerada de difícil realização pelos produtores, que na maioria das vezes desconhecem os procedimentos básicos para uma limpeza eficaz (PINHEIRO, 2006).

A higienização adequada dos equipamentos de ordenha deve ser realizada pelos produtores sendo o fator mais importante para a produção de uma matéria-prima de qualidade para os laticínios (KLEIN, 2006), e a entrada em vigor, em 2005, da

Instrução Normativa N° 51 do Ministério da Agricultura reforça esta preocupação. Esta instrução define os procedimentos no manejo do leite e a necessidade de análises para avaliação de sua qualidade (MAPA, 2002).

A Instrução Normativa N° 51 está em vigor desde julho de 2005 nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do país, no entanto, um balanço sobre a qualidade do leite mostrou resultados fora do estipulado pela IN51. A região Sul apresentou qualidade microbiológica do leite inferior ao restante do país, mas contribuiu para este resultado o fato de ser a região com maior número de amostras. Nas demais regiões do país a IN51 entrará em vigor em julho de 2007. O Nordeste enfrenta inúmeros problemas e entre os desafios dos produtores estão a falta de água (33% das propriedades não dispõem desse recurso) e de energia elétrica (13,7% não têm), sendo que 85% das propriedades não possuem qualquer sistema de resfriamento de leite (TAVARES, 2006).

A qualidade deve ser buscada com obstinação, seja por questões de saúde pública e segurança alimentar, seja pela melhoria na qualidade da matéria-prima para processos industriais mais eficientes, ou ainda para a conquista de mercados internacionais (KLEIN, 2006).

2.2 Sistema Tradicional de Higienização de Ordenhadeiras

O sistema tradicional de higienização de ordenhadeiras consiste de cinco etapas: pré-enxágue, limpeza com a utilização de detergente alcalino, enxágüe, limpeza com a utilização de detergente ácido, e sanitização.

Este sistema é utilizado tanto para limpeza de ordenhadeiras com sistema aberto e sem lavador automático, como para sistemas de ordenhadeiras fechadas com lavador automático. A única diferença no procedimento de limpeza dos dois equipamentos consiste na temperatura de utilização do detergente alcalino, que no sistema fechado é mais elevado, e pode chegar a 80° C.

O pré-enxágüe tem a finalidade de retirar o excesso de resíduos de leite do equipamento, e é realizado com água a 40° C. Nesta etapa a água passa por todas as

tubulações e depois é descartada por uma mangueira, sendo aproveitada para a limpeza do piso da sala de ordenha.

Em seguida, são utilizados detergentes alcalinos, que possuem maior poder de limpeza, pois removem com mais facilidade gorduras e proteínas, principalmente em temperatura mais elevada. Os detergentes alcalino-clorados também são bastante utilizados, uma vez que o cloro atua como coadjuvante da limpeza na remoção de depósitos protéicos e incrustações biológicas. O processo de limpeza inicia-se com temperatura de cerca de 75° C e pH acima de 11,0, sendo que o tempo de lavagem é de aproximadamente 10 minutos, em sistema fechado (KLEIN, 2006). Entretanto, o meio alcalino provoca a precipitação de sais. As águas utilizadas para o processo de limpeza possuem média a alta dureza (presença de sais, principalmente carbonatos) e o leite é uma grande fonte de cálcio. O pH alcalino do detergente provoca a precipitação destes sais e conseqüente depósito no interior da ordenhadeira.

Após a lavagem com detergentes alcalinos é feito o enxágüe, no qual ocorre a retirada de resíduos de detergente alcalino, proteínas e gorduras, com água a temperatura ambiente, que também é descartada e aproveitada para limpeza do piso da sala de ordenha.

O detergente ácido é utilizado, tradicionalmente, para solubilizar os sais precipitados pela ação do detergente alcalino. A lavagem ácida é realizada com temperaturas de aproximadamente 40° C e pH abaixo de 3,0 por aproximadamente 10 minutos, em sistema fechado.

A última etapa é a de sanitização, para a diminuição da carga microbiana. Esta etapa é realizada antes da próxima ordenha. A solução sanitizante é composta por cloro (130mg/L) ou iodo (25mg/L), e deve circular por pelo menos cinco minutos no equipamento de ordenha (CBQL, 2002; KLEIN, 2006).

Todos os componentes, principalmente as teteiras, coletores e mangueiras devem ser periodicamente desmontados e escovados para eliminar todas as sujidades.

2.3 Higienização de Ordenhadeiras Utilizando o Detergente Enzimático

Detergentes enzimáticos têm sido propostos como alternativas de limpeza de equipamentos da indústria de laticínios. A patente WO 97/07190 referente a um detergente alcalino que contém enzimas termorresistentes, que atuam no período final de limpeza, quando a temperatura da solução de limpeza que circula no equipamento cai muito, podendo chegar a 35° C. Desta maneira a ação das enzimas aumenta a eficácia de limpeza. As patentes US 4,212,761 e US 5,064,561 também relatam detergentes enzimáticos para utilização em equipamentos da indústria de laticínios, sendo a primeira uma formulação em pó, e a segunda um sistema de limpeza composto de dois produtos, e o controle de dureza realizado através da adição de polifosfatos. Diferentemente destes, o produto proposto neste trabalho, cujo pedido de patente foi depositado no INPI (PI0502880-9 – ANEXO 1), diz respeito a um detergente com pH ácido, cuja ação é potencializada pela presença de duas enzimas hidrolíticas, protease e lipase. A inovação na utilização do detergente enzimático ácido na limpeza de ordenhadeiras consiste em eliminar a etapa de lavagem com detergente alcalino e uma etapa de enxágüe. O detergente enzimático possui um pH ácido, que evita a precipitação de sais do leite e da água. Desta forma a utilização do detergente enzimático para ordenhadeiras proporciona economia de tempo e mão-de-obra, pois elimina dois passos no processo de limpeza, economia de água e energia elétrica para seu aquecimento, economia na reposição de conexões que apresentam menor desgaste pela não utilização de álcalis, e há também a preservação ambiental, pois o volume do efluente líquido gerado é menor.

2.4 Detergentes

Detergentes são produtos que promovem a remoção, dispersão e estabilização de materiais de uma superfície. O desempenho destas funções depende da composição da formulação, das condições de uso, da natureza da superfície a ser tratada, da natureza da substância a ser removida e/ou dispersa e da natureza da fase móvel. A formulação de um detergente é um processo complexo e direcionado pela necessidade específica do consumidor final, pela viabilidade econômica, por questões

ambientais e disponibilidade de princípios ativos que podem proporcionar a funcionalidade requerida (SHOWELL, 2006).

Os detergentes mais comuns são aqueles utilizados para limpeza domiciliar e higiene pessoal, no entanto, outras aplicações de detergentes incluem remediação ambiental (SABATINI *et al.*, 1996; LI, 2004), recuperação de resíduos de óleos, nanoengenharia, formulação de tintas, formulação de polímeros sintéticos, preparação de pesticidas, processamento de produtos têxteis, lubrificantes e aplicações médicas (SHOWELL, 2006).

As duas principais funções dos detergentes são a remoção de materiais de superfícies e a suspensão destas sujidades na fase móvel. A remoção de materiais das superfícies é realizada pela diminuição da energia interfacial entre o substrato e a fase móvel, e a suspensão destas partículas alcançada pelo efeito de repulsão eletrostática ou estabilização polimérica (SHI, 2002).

2.5 Composição de Detergentes

Formulações de detergentes modernas podem conter 20 ou mais ingredientes dependendo da função que o produto precisa desempenhar. As diversas matérias-primas devem ser combinadas em uma proporção específica a fim de obter a melhor relação custo benefício e ainda devem satisfazer os critérios de estabilidade e propriedades físicas. A formulação de detergentes ainda deve ser robusta suficiente para ser produzida em escala industrial e atender às especificações com o mínimo de re-processos.

2.5.1 Surfactantes

Surfactantes são os componentes mais comuns em formulações de detergentes. Sua função principal é modificar a interface entre duas ou mais fases a fim de promover a dispersão de uma fase em outra. Em formulações de limpeza, os surfactantes aumentam a molhabilidade das superfícies e reduzem a tensão superficial da água, para que as sujidades sejam removidas e dispersas na fase aquosa (NOVOZYMES, 2002). A habilidade dos surfactantes em se concentrar nas interfaces é

devida à combinação das porções hidrofílicas e hidrofóbicas presentes na mesma molécula.

A escolha do surfactante vai depender da característica do produto, de sua compatibilidade com os demais componentes da formulação, durante a produção e armazenamento, de sua biodegradabilidade, de sua toxicidade para com o consumidor final e do seu custo. Misturas complexas de surfactantes homólogos ou de diferentes tipos têm uma melhor performance do que formulações contendo apenas um tipo deste componente, por isso, é comum o termo sistemas de surfactantes (NOVOZYMES, 2002).

Acima de uma determinada concentração, os surfactantes formam agregados esféricos com a porção hidrofóbica para dentro do agregado e a porção hidrofílica para o exterior. A concentração acima da qual as micelas são formadas é denominada CMC, “Critical Micelle Concentration” (SABATINI *et al.*, 1996).

Os surfactantes são classificados de acordo com o seu componente hidrofílico como não iônicos, aniônicos, catiônicos ou anfóteros (SHOWELL, 2006).

Surfactantes não iônicos possuem seu componente hidrofílico não ionizado, e polioxietileno, polioxipropileno, alcanolamidas ou ésteres de açúcares são grupos típicos. Em sistemas de surfactantes, contribuem para a emulsificação de óleos e são facilmente formulados em detergentes líquidos, apresentando maior compatibilidade com os demais componentes de formulações em comparação com surfactantes aniônicos. Ainda em comparação com surfactantes aniônicos, os não iônicos apresentam valores de CMC menores.

Como o nome sugere no caso de surfactantes aniônicos o grupo hidrofílico é constituído de um componente aniônico, geralmente sulfato, sulfonato ou carboxilato (SHOWELL, 2006). Normalmente funcionam melhor em pHs altos, entre 9,0 e 11,0, e são bastante utilizados em formulações em pó. LAS (“Linear Alkylbenzenesulfonates”) tem sido o surfactante aniônico dominante por três ou quatro décadas (NOVOZYMES, 2002) e vai continuar sendo muito importante devido a sua boa relação performance/preço. Apesar de apresentar problemas de compatibilidade com água dura, no que diz respeito à biodegradabilidade, as avaliações indicam parecer favorável. Experimentos estão sendo realizados com isômeros LAS com o grupo

sulfonato na porção terminal e adição de grupos metil na cadeia, melhorando a solubilidade, tolerância à dureza da água, performance de limpeza e até compatibilidade com enzimas (NOVOZYMES, 2002). A Figura 1 mostra a estrutura do LAS.

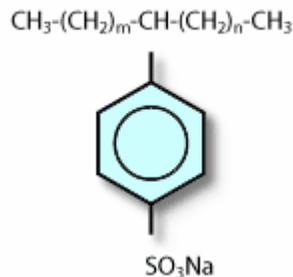


Figura 1: Estrutura do LAS (modificado de ECOSOL, 2007).

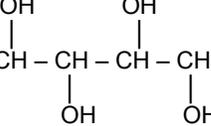
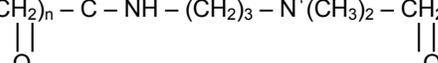
Da mesma maneira que os aniônicos, os surfactantes catiônicos são constituídos de moléculas carregadas positivamente na porção hidrofílica, sendo a principal classe os sais de amônio quaternário. Quando formulados em conjunto com surfactantes aniônicos ocorre uma redução nos benefícios de ambos.

Os surfactantes anfóteros apresentam, em sua porção hidrofílica, componentes com caráter aniônico e catiônico como aminoácidos. Apesar de serem suaves e compatíveis com enzimas, os surfactantes anfóteros são pouco utilizados devido ao elevado custo.

Tipicamente a porção hidrofóbica dos surfactantes é composta de cadeias alquilas entre C10 e C20.

Exemplos de surfactantes são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2: Exemplos de surfactantes utilizados em formulações de detergentes.

<u>Tipo</u>	<u>Estrutura</u>
<u>Aniônico</u>	
Alquil Benzeno Sulfonado Linear	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{CH} - (\text{CH}_2)_m - \text{CH}_3$  SO_3Na
Paraffinsulfonate	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{CH} - (\text{CH}_2)_m - \text{CH}_3$  SO_3Na
Alquil éter sulfonado Sabão de ácido graxo	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{O} - (\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{O})_x \text{SO}_3\text{Na}$
Metil ester sulfonado	 $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n \text{CONa}$  $\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - (\text{CH}_2)_n \text{CO} - \text{CH}_3$ SO_3Na
<u>Catiônico</u>	
Mono alquil cloreto de amônio quaternário	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Cl}^-$
<u>Não-iônico</u>	
Álcool de ácido graxo etoxilado	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{O} - (\text{CH}_2 - \text{CH}_2\text{O})_n \text{H}$
Óxido amino	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{N}(\text{CH}_3)_2 \rightarrow \text{O}$
Alquil mono-etanol amida	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{C} - \text{NH} - \text{CH}_2 \text{CH}_2\text{OH}$ 
N-metilglicosamina	 $\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{C} - \text{N} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH} - \text{CH} - \text{CH}_2\text{OH}$ 
<u>Anfotéricos</u>	
Amido propil betaína	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{C} - \text{NH} - (\text{CH}_2)_3 - \text{N}^+(\text{CH}_3)_2 - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{O}^-$ 
Alquil sulfobetaina	$\text{CH}_3 - (\text{CH}_2)_n - \text{N}^+(\text{CH}_3)_2 - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{SO}_3^-$ 

Fonte: Modificado de Showell, 2006.

Diversos microrganismos produzem biosurfactantes, com uma grande variedade de estruturas moleculares, sendo os glicolípídeos a principal classe. Os glicolípídeos consistem de uma ou duas moléculas de açúcares ligadas a longas

cadeias alifáticas ou ácidos alifáticos hidroxilados. Por serem biodegradáveis apresentam uma vantagem sobre os surfactantes químicos (LANGER *et al.*, 2006).

A maioria dos biosurfactantes conhecidos é produzida por bactérias, e apenas alguns são produzidos por fungos filamentosos e leveduras, e encontram aplicação na indústria têxtil, farmacêutica, de alimentos, papel e de polímeros (KITAMOTO *et al.*, 2002).

2.5.2 Dispersantes poliméricos

A suspensão dos resíduos, após sua remoção das superfícies, é uma importante função da formulação e realizada pelos dispersantes poliméricos. Estes compostos atuam em conjunto com os surfactantes para manter a fase dispersa estável.

Partículas dispersas em um meio apresentam movimentos Brownianos, e, portanto, colidem umas com as outras com frequência. A estabilidade destas partículas será determinada pelas suas interações durante estas colisões. Quando as forças de atração dominarem, as partículas irão formar agregados e precipitar, enquanto que se as forças de repulsão forem as dominantes, o sistema permanecerá estável e disperso (SHI, 2002).

Dois tipos de dispersantes poliméricos são utilizados em formulações de detergentes: polímeros contendo um grupo ionicamente carregado e polímeros não iônicos.

Homopolímeros de ácido acrílico e copolímeros de ácido acrílico e maleico são bastante utilizados como dispersantes poliméricos iônicos em formulações de detergentes em pó. Dispersantes poliméricos contendo grupos carboxil e sulfonato tem sido desenvolvidos para uso em tratamento de água, e carboximetilcelulose é amplamente utilizada em formulações para detergentes para roupas.

Dispersantes catiônicos são menos comuns, enquanto que os anfóteros encontram alguma aplicação na formulação de detergentes para roupas.

Entre os dispersantes poliméricos não iônicos estão o polietileno glicol, álcool polivinílico e copolímeros de etoxi e propoxi.

2.5.3 Quelantes

O controle de metais é uma necessidade freqüente nas formulações de detergentes. A presença de Ca^{2+} na água pode causar precipitação de surfactantes aniônicos, reduzindo sua concentração efetiva para limpeza e pode ainda provocar a precipitação e redeposição de sujidades nas superfícies.

Além dos quelantes, os “builders”, que são compostos cuja função principal é a remoção de íons Ca^{2+} e Mg^{2+} de soluções aquosas, são amplamente utilizados em formulações de diversos detergentes. Tripolifosfato de sódio é o bastante utilizado em detergentes, pois é muito eficiente no controle de cálcio (relação estequiométrica $\text{Ca}^{2+}/\text{P}_3\text{O}_{10}^{5-}$ 1:1) e ainda contribui para melhorar a performance dos surfactantes, pela redução nos valores de CMC (NOVOZYMES, 2002). No entanto, a preocupação ambiental levou ao desenvolvimento de alguns substitutos, dentre os quais o ácido cítrico é um exemplo. O ácido cítrico também é um excelente quelante de metais como cobre, zinco e ferro. Outro quelante bastante utilizado em formulações de detergentes é o etileno diamino tetra acetato (EDTA).

Carbonatos e silicatos de sódio são freqüentemente utilizados em formulações de detergentes em pó, nas quais provocam a precipitação do cálcio e ainda proporcionam uma fonte de alcalinidade. Entretanto, para evitar a incrustação de carbonato/silicato de cálcio, estes componentes são formulados em conjunto com dispersantes poliméricos.

2.5.4 Solventes

A seleção de solventes para uso em formulações de detergentes depende do princípio ativo, da aplicação desejada e do aspecto econômico. A água é o principal solvente na maioria das formulações de limpeza domiciliar, pois tem um menor custo, é mais compatível com as superfícies e é mais fácil de manusear do que solventes de petróleo. No entanto, muitos princípios ativos têm baixa solubilidade em água e requerem adição de outros solventes como etanol, glicerol e 1,2-propanodiol (SHOWELL, 2006).

2.5.5 Componentes minoritários

Dependendo da aplicação a que se destina o detergente, alguns compostos minoritários podem fazer parte da formulação.

Os agentes antiespumantes são utilizados em formulações em que é desejável minimizar a formação de espuma. Eles atuam prevenindo sua formação ou acelerando seu colapso. Em outras aplicações são utilizados compostos que aumentam a quantidade de espuma do produto na hora do uso, e proteínas têm sido utilizadas para promover espuma, principalmente em aplicações para alimentos (SHOWELL, 2006).

É comum a modificação reológica de formulações para determinadas aplicações através de espessantes. Polímeros de alto peso molecular como carboximetilcelulose, goma guar e goma xantana são normalmente utilizados.

2.6 Detergentes enzimáticos

O primeiro detergente contendo enzimas foi introduzido no mercado em 1913, na Alemanha, e era constituído de tripsina de pâncreas de porco. No entanto, apenas em 1963 a comercialização destes produtos passou a ser significativa, com o desenvolvimento, pela Novozymes[®], de um detergente enzimático a base de protease bacteriana. Inicialmente, estes detergentes eram considerados úteis apenas para limpeza de roupas sujas de sangue de hospitais e abatedouros. A partir de 1980 amilases, celulasas e lipases começaram a ser utilizadas como componentes da formulação de detergentes.

O maior segmento de aplicação de enzimas industriais é o de detergentes (HASAN *et al.*, 2006), sendo que o maior volume de detergentes enzimáticos é comercializado para lavagem domiciliar de roupas (NOVOZYMES, 2002). Neste tipo de produto a principal função das enzimas é a remoção de manchas, porém, o cuidado com os tecidos e manutenção das cores são outras vantagens. Muitos detergentes atuais são caracterizados por formulações multi-enzimas. O efeito combinado de

proteases, amilases, lipases e celulases resulta em uma limpeza sinérgica e manutenção das cores.

As enzimas mais comuns em detergentes são as proteases. As proteases hidrolisam proteínas em peptídeos menores, mais solúveis e fáceis de serem dispersos. O maior desafio na formulação de detergentes contendo proteases é evitar a hidrólise da própria enzima. Normalmente utiliza-se um inibidor reversível que libera a enzima após a diluição de uso.

Amilases, mais especificamente as alfa-amilases, são o segundo grupo de enzimas mais utilizadas em detergentes. Elas promovem uma significativa remoção de diversas manchas.

As lipases apresentam um grande potencial para utilização em detergentes, pois os óleos e gorduras, que são suscetíveis para hidrólise através de lipases, normalmente são difíceis de remover utilizando apenas surfactantes. Possuem ainda um efeito anti-redeposição, prevenindo que lipídeos e corantes lipofílicos recontaminem fibras de tecidos. Seu impacto até o momento é limitado devido, principalmente, a necessidade de diversos ciclos para promover algum benefício.

Diferentemente das demais enzimas, a atuação das celulases não é diretamente nas manchas. A hidrólise da ligação β -1,4 da celulose provoca a remoção de uma camada de microfibras do tecido, resultando no desprendimento das manchas e restauração das cores do tecido.

2.7 Formulação de enzimas em detergentes líquidos

O comportamento físico de detergentes líquidos é bastante sensível a pequenas variações da formulação. Comparado as formulações em pó, detergentes líquidos são mais difíceis de formular, pois os componentes interagem diretamente uns com os outros (NOVOZYMES, 2002). Sistemas multienzimas são bastante difíceis de estabilizar.

Uma maneira de obter uma boa estabilidade das enzimas em solução é diminuir a quantidade de água da formulação. Esta diminuição da quantidade de água pode ser conseguida pela adição de monopropilenoglicol, glicerol ou sorbitol, entre

outros compostos. Uma concentração de 20 a 25% de monopropilenoglicol inibe o crescimento microbiano, sendo que em formulações comerciais utiliza-se de 20 a 50%. Quando se utiliza glicerol ou sorbitol é necessário a adição de algum agente antimicrobiano para inibição do crescimento de fungos (NOVOZYMES, 2002).

As enzimas devem ser os últimos componentes a serem adicionados no processo de fabricação, evitando excessos de temperatura e pH. Proteases são adicionadas antes das demais enzimas, permitindo que sejam equilibradas com os estabilizantes e inibidores. Este procedimento impede a hidrólise das demais enzimas que serão adicionadas.

Uma das principais preocupações em formulações de sistemas multienzimáticos em detergentes líquidos é a estabilização e/ou inibição da atividade proteolítica. A adição de borato em conjunto com propilenoglicol inibe a atividade de proteases no detergente concentrado (PRIETO *et al.*, 2002). Proteases também podem ser estabilizadas pela redução da quantidade de água presente na formulação em conjunto com altas concentrações de álcoois. Para uma maior estabilidade das enzimas a concentração de água em detergentes concentrados deve ser menor que 50%.

O tipo de “builder” e seqüestrante influencia na estabilidade de proteases pela remoção de Ca^{2+} . O EDTA é considerado um seqüestrante muito forte, sendo que citratos e poliacrilatos são mais utilizados. É comum a adição de cerca de 0,1% de cloreto de cálcio para assegurar estabilidade. Formato de cálcio e sódio também são utilizados como estabilizantes de enzimas em formulações comerciais, sendo que sua concentração pode variar de 0,1 a 2,5%.

2.8 Lipases

Lipases (acilglicerol acilhidrolase, EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres carboxílicos em tri-, di-, monoacilgliceróis e glicerol, além de reações de esterificação, transesterificação, alcoólise e acidólise. Elas normalmente não catalisam reações paralelas e não requerem co-fatores.

Segundo Jaeger & Eggert (2002), as lipases constituem o grupo de biocatalisadores mais importantes para aplicações biotecnológicas uma vez que são

utilizadas nos mais variados segmentos industriais como a indústria química, de alimentos, coureira, de cosméticos, farmacêutica, do papel, entre outras. Lipases também são utilizadas no tratamento de efluentes industriais (D'ANNIBALE *et al.*, 2005; LANCIOTTI *et al.*, 2005; LEAL *et al.*, 2006) e, quando foi comprovado que lipases permanecem ativas em solventes orgânicos, na década de 1980, tornaram-se uma ferramenta ideal para a química orgânica (ZAKS & KLIBANOV, 1984). Segundo Hasan *et al.*, (2006), o mais importante campo de atuação comercial de lipases é a indústria de detergentes. A Tabela 3 mostra algumas aplicações industriais das lipases.

Tabela 3: Aplicações industriais de lipases.

Indústria	Ação	Produto ou aplicação
Detergentes	Hidrólise de gorduras	Remoção de gorduras
Laticínios	Hidrólise da gordura do leite, modificação da gordura da manteiga	Desenvolvimento de agentes flavorizantes no leite, queijo e manteiga
Panificação	Melhoramento do sabor	Aumento da vida de prateleira
Bebidas	Melhoramento do aroma	Bebidas
Alimentos funcionais	Transesterificação	Alimentos funcionais
Carnes e peixes	Desenvolvimento do sabor	Produtos a base de carne e peixes, remoção de gorduras
Óleos e gorduras	Transesterificação, hidrólise	Manteiga de cacau, margarina, ácidos graxos, glicerol
Química	Enantioseletividade, síntese	Compostos quirais, químicos
Farmacêutica	Transesterificação, hidrólise	Lipídeos especiais,
Cosméticos	Síntese	Emulsificantes
Couro	Hidrólise	Produtos a base de couro
Papel	Hidrólise	Aumento da qualidade do papel
Limpeza	Hidrólise	Remoção de gorduras

Fonte: Modificado de Sharma, *et al.*, (2001).

Lipases são serina hidrolases e contém a seqüência G – X₁ – S – X₂ – G como região catalítica, onde G = glicina, S = serina, X₁ = histidina e X₂ ácido aspártico ou ácido glutâmico. As lipases possuem uma “tampa” hidrofóbica, formada por um oligopeptídeo helicóide, que protege o sítio ativo. Ao interagir com uma superfície hidrofóbica, ocorre a chamada ativação interfacial, na qual o sítio ativo é exposto, permitindo livre acesso ao substrato (REETZ, 2002). No entanto, nem a presença da “tampa” (CYGLER & SCHRAG, 1997), nem a ativação interfacial (JAEGER & REETZ, 1998) são características genéricas de todas as lipases.

Quando adsorvidas na interface óleo-água, o substrato é hidrolisado 1000 vezes mais rápido do que em solução, sendo que a atividade da enzima é maior

quando o substrato é o triacilglicerídio, e menor quando é monoacilglicerídio (GODFREY & WEST, 1996).

Lipases de microrganismos são divididas em dois grupos: as lipases não específicas que liberam ácidos graxos em posições aleatórias, e as que hidrolisam a molécula, preferencialmente, nas posições 1 e 3 (GODFREY & WEST, 1996).

As lipases de *Geotrichum candidum* (STRANSKY *et al.*, 2007) e *Candida rugosa* (MILETO *et al.*, 1998) são consideradas moléculas grandes, com massa molecular de aproximadamente 60 kDa, enquanto que *Streptomyces rimosus* (ABRAMIÉ *et al.*, 1999), *Penicillium camembertii* (TAN *et al.*, 2004), *Penicillium expansum* (BIAN *et al.*, 2005) e *Penicillium abeanum* (SUGIHARA *et al.*, 1996) , produzem lipases com massa molecular de aproximadamente 28 kDa.

2.9 Microrganismos produtores de lipase

Diversos trabalhos relatam a produção de lipases por diferentes microrganismos, entre eles, fungos filamentosos como *Metharizium anisopliae* (SILVA *et al.*, 2005), *Penicillium restrictum* (CASTILHO *et al.*, 2000), *Penicillium aurantiogriseum* (LIMA *et al.*, 2004), *Aspergillus* sp., *Geotrichum* sp. e *Rhizopus* sp. (D'ANNIBALE, *et al.*, 2005), leveduras como *Yarrowia lipolytica* (CORZO *et al.*, 1999) e *Saccharomyces cerevisiae* (CIAFARDINI *et al.*, 2006a), e bactérias como *Bacillus coagulans* (KUMAR *et al.*, 2005), *Staphylococcus xylosus* (MOSBAH *et al.*, 2005) e *Pseudomonas* sp. (KANWAR *et al.*, 2002).

Microrganismos produtores de lipases são encontrados em diversos ambientes, como alimentos (LIMA *et al.*, 2003; CIAFARDINI *et al.*, 2006b), leiras de compostagem (CUNHA-QUEDA *et al.*, 2006), solos de fábricas de processamento de peixes (TAN *et al.*, 2003), de florestas e solos destinados à agricultura (KO *et al.*, 2005), efluentes industriais, fábricas de processamento de óleos vegetais, laticínios e solos contaminados com óleos (SHARMA *et al.*, 1988).

Ciafardini *et al.*, (2006a) isolaram leveduras a partir de óleo de oliva recém produzido e observaram que esta microflora melhora a qualidade do óleo. Entretanto, também foram encontradas leveduras que prejudicam sua qualidade pela hidrólise dos

triglicerídeos através de lipases. Foram isoladas duas leveduras produtoras de lipase: *S. cerevisiae* 1525 e *Williopsis californica* 1639.

Meghwanshi *et al.* (2006) testaram 120 isolados de *Bacillus* e *Pseudomonas*, e identificaram 32 produtores de lipases, sendo que três *Bacillus* e uma *Pseudomonas* produziram lipases 1,3-regioespecíficas e com máxima atividade em pH 9,0.

Lipases com máxima atividade em pHs alcalinos são de grande importância para utilização em detergentes e Wang *et al.* (1995) isolaram *Bacillus* sp. de uma fonte térmica que produz uma lipase com máxima atividade em pH 9,5 e que mantém 100% de atividade após 30 minutos à 75° C, sendo esta termorresistência outra característica desejável para aplicação na indústria de detergentes. Dominguez *et al.* (2005) produziram lipase de *Thermus thermophilus* em biorreator de cinco litros e o microrganismo apresentou temperatura ótima de crescimento de 60° C e de produção de lipase de 70° C, enquanto que a lipase de *Burkholderia multivorans* apresenta atividade ótima em pHs de 9,0 a 11,0 e temperaturas de 70 a 90° C (GUPTA *et al.*, 2007).

Os actinomicetos também produzem lipases (ABRAMIÉ *et al.*, 1999; LARGE *et al.*, 2005), e a produção de antibióticos por estas bactérias pode aumentar quando se utilizam óleos como fonte de carbono no meio de cultura (CHOI *et al.*, 1996).

Ko *et al.* (2005) verificaram, através de testes qualitativos, que a maior população produtora de lipase em solos destinados à agricultura é de actinomicetos, com 55,9% das colônias capazes de produzir lipases extracelulares, enquanto que a proporção de fungos foi de 23,3% e de outras bactérias de 8,5%.

Entre os fungos filamentosos, diversas espécies de *Penicillium* sp. são relatadas como produtoras de lipases, como *Penicillium citrinum* (MIRANDA *et al.*, 1999), *P. aurantiogriseum* (LIMA *et al.*, 2003), *Penicillium camemberti* (TAN *et al.*, 2004) e *Penicillium expansum* (BIAN *et al.*, 2005).

Lima *et al.* (2004) relatam a produção de lipase por *P. aurantiogriseum*, com atividade ótima em pH 8,0 e 60° C. Esta elevada temperatura ótima não é comum em outras espécies de *Penicillium* sp. (MALISZEWSKA & MASTALERZ, 1992; SUGIHARA *et al.*, 1996; BIAN *et al.*, 2005), porém a enzima mantém apenas 32% de sua atividade após 30 minutos à 50° C.

Entre as leveduras produtoras de lipases, a mais bem documentada é a lipase de *C. rugosa*, que é não específica quanto à hidrólise de triglicerídeos (MILETO *et al.*, 1998) e é uma das enzimas mais freqüentemente utilizadas em reações de biotransformação. Problemas de falta de reprodutibilidade evidenciados foram atribuídos a produção de sete isoenzimas, LIP1 – LIP7, que possivelmente possuem diferentes propriedades catalíticas (MARÍA *et al.*, 2006).

2.10 Meios de cultura de produção de lipase

D'annibale, *et al.* (2005) utilizaram efluente de indústrias de processamento de azeite de oliva como meio de cultura para produção de lipase, mas suplementado com fonte de nitrogênio e óleo de oliva. Doze espécies de fungos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Candida*, *Geotrichum*, *Penicillium*. e *Rhizopus* foram selecionados preliminarmente por sua capacidade de crescer e produzir lipase no próprio efluente, sem diluição. A produção da enzima foi aumentada quando o efluente foi suplementado com NH₄Cl. Também foi testada a suplementação com três diferentes óleos: oliva, milho e soja, com concentração de 3 g/L, sendo que a adição de óleo de oliva teve o melhor efeito sobre a produção de lipase.

Objetivando diminuir custos de produção de lipase por *P. citrinum*, Miranda *et al.* (1999) conseguiram uma maior atividade enzimática substituindo azeite de oliva por resíduos de óleo de nozes, em ensaios em Erlenmeyer.

Lanciotti *et al.* (2005), utilizaram 62 linhagens de *Yarrowia lipolytica* para tratar o efluente de indústrias de processamento óleo de oliva. Este efluente apresenta uma Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) entre 12000 a 63000 mg/L, e é um grave problema, principalmente na região do mediterrâneo, responsável por aproximadamente 95% da produção mundial deste óleo. Todas as linhagens foram capazes de crescer em meio de cultura constituído do próprio efluente, sem diluições e houve grande variabilidade na produção de lipase. Vinte linhagens de *Y. lipolytica*, consideradas com maior potencial de crescimento foram cultivadas neste meio e a DBO foi reduzida em até 41,2%.

O azeite de oliva é amplamente utilizado como substrato para produção de lipases (MAHADIK *et al.*, 2002; FICKERS *et al.*, 2006; GUPTA *et al.*, 2007; STRANSKY *et al.*, 2007). No entanto, meios de cultura sem fonte de carbono lipídicas também são relatados para a produção desta enzima (LIN *et al.*, 2005).

Muralidhar *et al.* (2001) utilizaram análise fatorial para otimizar a produção de lipase por *Candida cylindracea* variando apenas a fonte de carbono. A produção otimizada da enzima foi de 17,30 U/mL utilizando glicose e 47,25 U/mL utilizando azeite de oliva. Por outro lado, a produção de lipase por *P. aurantiogriseum* foi inibida quando se utiliza no meio de cultura apenas glicose (LIMA *et al.*, 2003). No caso de *Geotrichum* sp., a adição de glicose no meio de cultura contendo óleo de soja teve efeito negativo na produção de lipase (BURKERT *et al.*, 2004).

Elibol & Ozer (2002) realizaram experimentos utilizando metodologia de superfície de resposta para otimizar a quantidade de glicose e óleo de milho no meio de cultura de produção de lipase por *Rhizopus arrhizus*, e verificaram que a produção é máxima quando se utiliza 1 g/L de glicose e 2,7 g/L de óleo de milho no meio sendo que uma quantidade maior de glicose provoca diminuição na quantidade de lipase produzida.

He & Tan (2006) utilizaram metodologia de superfície de resposta para otimizar um meio de cultura para produção de lipase utilizando óleo de soja como indutor da atividade lipolítica de *Candida* sp. Tan *et al.* (2003) também definiram um meio para a produção de lipase por *Candida* sp. contendo óleo de soja, mas não encontraram diferença comparando com óleo de milho, gergelim e azeite de oliva, já em relação a gorduras animais a atividade lipolítica foi inibida.

A atividade de lipase também foi menor utilizando gordura bovina e de porco se comparado com azeite de oliva, óleo de girassol, arroz, soja e gergelim em ensaios com *M. anisopliae* (SILVA *et al.*, 2005). Já nos ensaios com *Fusarium solani*, realizados por Maia *et al.* (2001), a produção de lipase foi maior quando se utiliza no meio de cultura óleo de gergelim do que quando se utiliza azeite de oliva, óleo de milho, babaçu ou coco. Lima *et al.*, (2003) encontraram maior atividade de lipase quando utilizaram azeite de oliva no meio de cultura em comparação com óleo de milho, soja e girassol, em ensaios com *P. aurantiogriseum*.

A produção de lipase por *Aspergillus carneus* foi otimizada através de metodologia de superfície de resposta resultando em uma atividade 1,8 vezes maior que a otimização pelo método “uma variável por vez”. Óleo de girassol (1%) e glicose (0,8%) foram utilizados como fonte de carbono e peptona (0,8%) como fonte de nitrogênio (KAUSHIK *et al.*, 2006).

Tan *et al.* (2003) otimizaram um meio de cultura para produção de lipase por *Candida* sp. contendo fontes de nitrogênio orgânica, farelo de soja e caseína, e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio inorgânica. Gupta *et al.* (2007) definiram, como fonte de nitrogênio para produção de lipase, extrato de levedura, que apresentou melhores resultados se comparado com outras fontes orgânicas e inorgânicas. Já Lima *et al.* (2003) conseguiram uma maior atividade de lipase por *P. aurantiogriseum* quando utilizaram sulfato de amônio e nitrato de potássio como fonte de nitrogênio.

Com relação à influência de íons, Mg^{2+} , Na^{+} e K^{+} influenciaram positivamente a biossíntese de lipase de *Candida* sp., enquanto que Ca^{2+} , que forma complexo com ácidos graxos, alterando sua solubilidade e modificando o comportamento da interface óleo-água, inibiu a produção da enzima (TAN *et al.*, 2003). No entanto, a adição de 2% de $CaCl_2$ por Fickers (2006) minimizou a perda de atividade por desidratação em uma formulação de lipase de *Y. lipolytica* em pó.

A adição de elementos traço como ferro, magnésio, manganês, potássio, cobre e zinco aumentou em aproximadamente três vezes a produção de lipase por *Fusarium solani* (MAIA *et al.*, 2001). A atividade de lipase de *P.aurantiogriseum* aumentou com a adição de cloretos de magnésio, manganês, zinco e cobalto, e foi inibida por cobre e cálcio (LIMA *et al.*, 2004).

A adição de alguns compostos como os surfactantes aumenta a permeabilidade das células, facilitando a passagem das moléculas através da membrana.

Mahadik *et al.* (2002) aumentaram em duas vezes a quantidade de lipase extraída após fermentação semi-sólida de *Aspergillus niger*, através da adição 0,5% de Triton X-100. Silva *et al.* (2005) realizaram a extração da lipase de *M. anisopliae* após o cultivo submerso deste microrganismo, pela adição de surfactantes, sendo que os melhores resultados foram alcançados pela utilização de 0,25% de SDS e Tween 80.

Outra estratégia é a adição destes compostos no meio de cultura antes do inóculo dos microrganismos. Tan *et al.* (2004) adicionaram Tween 60 no meio de cultura de produção de lipase por *P. camemberti* e houve aumento na quantidade de enzima presente no meio. Corso & Revah (1999), utilizaram Tween 80 no meio de cultura de produção de lipase por *Y. lipolytica* e conseguiram máxima atividade enzimática em concentrações de 0,5 a 2%.

Helistö & Korpela (1998) testaram a influência dos surfactantes não iônicos Triton X-100, Tween 20 e Tween 80, e dos surfactantes aniônicos álcool polivinílico (LALLS) e alquilbenzeno sulfonado linear (LAS) em lipases de diferentes microrganismos e verificaram que as maiores atividades de eucariotos foram em concentrações mais baixas de surfactantes se comparado com as lipases de procariotos.

2.11 Produção de lipase

A produção de lipase é influenciada pelo pH do meio de cultura, temperatura e tipo e concentração das fontes de carbono e nitrogênio. Além disso, os mecanismos que regulam a biossíntese de lipases variam entre os diferentes microrganismos produtores (SHARMA *et al.*, 2001).

Dominguez *et al.* (2005) realizaram cultivo, em reator de 5 litros, de *Thermus thermophilus*, e verificaram que o fornecimento de ar foi necessário para a produção da enzima, porém, quantidades de ar acima de 1L/min não aumentaram a produção de lipase.

Puthli *et al.* (2006) realizaram o crescimento de *C. rugosa* em reator de 2 litros com três hélices e 600 rpm para maximizar o oxigênio dissolvido. Houve aumento da massa seca com o aumento da oxigenação. No entanto, taxas de fornecimento de ar muito elevadas tiveram efeito negativo no crescimento celular. O mesmo comportamento foi observado para produção de lipase.

Elibol & Ozer (2000) também buscaram aumentar a quantidade de lipase produzida aumentando a quantidade de oxigênio dissolvido, pela adição de 10% de

perfluorcarbono no meio de cultura. A quantidade de lipase produzida por *Rhizopus arrhizus* dobrou nestas condições.

Mas o metabolismo de lipases não é estritamente aeróbico. Corzo e Revah (1999) observaram que a produção de lipase por *Y. lipolytica* é maior em meio com menor aeração.

A produção de lipase por *Burkholderia multivorans*, em Erlenmeyer, aumentou 12 vezes após otimização do meio de cultura por métodos estatísticos em comparação com o método “uma variável por vez”, e a produção da enzima em biorreator de 14 litros apresentou valores de atividade enzimática semelhantes (GUPTA *et al.*, 2007). Diferentemente, Dominguez *et al.* (2005), e He & Tan (2006), conseguiram aumentar a quantidade de lipase produzida em reator comparando com a produção em Erlenmeyer, devido a uma maior taxa de aeração. No caso de Gupta *et al.* (2007), uma maior aeração provocou uma diminuição no tempo de cultivo, de 36 para 15 horas, e aumento da biomassa, devido a uma maior taxa de crescimento, sendo que estratégias de batelada alimenta poderiam ser utilizadas visando uma maior atividade lipolítica.

O cultivo de *Acinetobacter radioresistens* para produção de lipase em batelada alimentada em reator de 2,5 litros foi investigado por Li *et al.* (2004). A velocidade específica de crescimento “ μ ” tem influência na quantidade de lipase produzida. A produção da enzima aumentou aproximadamente cinco vezes se comparada com o cultivo em batelada. A atividade específica de lipase foi máxima com $\mu=0,1 \text{ h}^{-1}$ enquanto que a máxima produção de lipase ocorreu com uma taxa $\mu=0,2 \text{ h}^{-1}$.

À medida que aumenta a escala de produção torna-se mais difícil manter a oxigenação no meio de cultura e, conseqüentemente a atividade enzimática. Fickers *et al.* (2006) realizaram com sucesso o escalonamento do bioprocesso de produção de lipase por *Y. lipolytica* em reator de 2000 litros, com agitação de 120 rpm e aeração de 0,7 vvm, para formulação da enzima em pó, atingindo valores de atividade semelhantes aos bioprocessos em reatores de 15 e 500 litros. Tan *et al.* (2003) produziram lipase em escala industrial, a partir de um mutante de *Candida* sp. A produção da enzima foi realizada em um reator de 1500 litros, com 150 rpm de agitação e aeração de 0,5 vvm, e também conseguiram reproduzir os valores de atividade enzimática atingidos em reatores de 30 litros.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento e produção de um detergente enzimático ácido, constituído de enzimas hidrolíticas, para limpeza de ordenhadeiras, e avaliação de sua viabilidade econômica de produção.

3.2 Objetivos Específicos

- a. Selecionar um microrganismo produtor de lipase;
- b. Otimizar o processo de cultivo, em escala de bancada;
- c. Realizar a produção da enzima em biorreator de 100 litros para avaliação do escalonamento;
- d. Propor uma formulação capaz de manter a atividade e estabilidade das enzimas;
- e. Testar a eficiência do detergente a campo;
- f. Analisar a viabilidade econômica de produção do produto.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos

Foram testados 12 microrganismos para seleção do melhor produtor de lipase, entre bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Tabela 4). Todos os microrganismos são provenientes da coleção da empresa BioPlus – Desenvolvimento Biotecnológico Ltda, e foram isolados de amostras de solo e alimentos.

Tabela 4: Microrganismos testados para produção de lipase.

Microrganismos
1. <i>Bacillus</i> sp.
2. MO2*
3. MO3*
4. <i>Penicillium aurantiogriseum</i>
5. <i>Pichia</i> sp.
6. <i>Penicillium restrictum</i>
7. <i>Aspergillus niger</i>
8. <i>B. cereus</i>
9. <i>B. polymyxa</i>
10. <i>B. subtilis</i>
11. <i>B. licheniformis</i>
12. <i>Pseudomonas strutzeri</i>

*Leveduras isoladas de alimentos e não identificadas.

4.2 Meio de cultura de produção de lipase

O crescimento dos microrganismos, para escolha do melhor produtor de lipase, foi realizado em um meio de cultura basal composto de glicose (0,2 g/L), peptona de carne (0,5 g/L), MgSO₄ (0,01 g/L) e Na₂HPO₄ (0,1 g/L) acrescido de 20 g/L de azeite de oliva. Para a determinação da melhor fonte de carbono para a produção de

lipase, o crescimento do microrganismo selecionado foi realizado testando-se a adição de óleo de soja, girassol, arroz e azeite de oliva no meio de cultura basal.

4.3 Condições de cultivo

Os microrganismos foram cultivados em Erlenmeyer de 125 mL com chicanas contendo 25 mL do meio de cultura. Foram incubados em agitador orbital, 180 rpm, por 48 horas à 30° C para fungos filamentosos e leveduras, e por 24 horas à 37° C para bactérias. Fungos filamentosos foram inoculados com 10⁶ esporos/mL e bactérias e leveduras com uma DO de 0,05 (600 nm)

4.4 Efeito da adição de surfactantes

Para extração da enzima, foram adicionados ao meio, após o crescimento do microrganismo selecionado, 0,25% e 0,50% (p/v) de Tween 80, Triton X-100 e dodecil sulfato de sódio (SDS). O efeito de cada surfactante foi testado separadamente.

4.5 Ensaio enzimático de lipase

A atividade enzimática do sobrenadante foi determinada usando p-nitrofenil palmitato (pNPP, Sigma) como substrato. Amostras de 0,1 mL foram misturadas com 0,9 mL de emulsão. A emulsão contém 1 mL do substrato (3 mg/mL de p-NPP em iso-propanol) e 9 mL de solução emulsionante (2g Triton X-100, 0,5g Goma Arábica e 450 mL de tampão Tris-HCl 50mM pH 8,0). Após 30 minutos de incubação à 37° C, a absorbância foi verificada em espectrofotômetro (410 nm) contra um tubo controle sem enzima (MAIA *et al.*, 2001). Para a realização do ensaio em pH 5,0, utilizou-se, na solução emulsionante tampão citrato-fosfato 50 mM pH 5,0, e após o período de incubação adicionou-se 0,960 mL de NaOH 0,05 M. Uma unidade de lipase (U) foi definida como a quantidade de enzima que libera um µmol de p-nitrofenol/mL/hora, nas condições descritas acima.

4.6 Ensaio enzimático de protease

A determinação da atividade proteolítica foi realizada utilizando solução de azocaseína 2% como substrato. Para o ensaio enzimático foi utilizada a seguinte mistura de reação: (1) amostra teste (0,1 mL de substrato; 0,1 mL de amostra; 0,2 mL tampão fosfato 200 mM pH 8,0); (2) branco da amostra (0,1 mL de substrato; 0,8 mL de ácido tricloroacético 20%; 0,1 mL amostra; 0,2 mL de tampão fosfato 200 mM pH 8,0). Os tubos com volume total de 2 mL, contendo a mistura de reação, foram incubados a 37°C por quinze minutos. Transcorrido o tempo de incubação, foram adicionado 0,8 mL de ácido tricloroacético nos tubos contendo as amostras testes. Todos os tubos foram centrifugados por cinco minutos a 5.000 rpm. A leitura da atividade proteolítica foi realizada em espectrofotômetro à 400 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. Uma Unidade Enzimática (U) foi expressa como $1\Delta\text{ODmL}^{-1}\cdot\text{h}^1$.

4.7 Otimização dos parâmetros do bioprocesso de produção de lipase

Para a otimização da produção de lipase pelo microrganismo escolhido, em Erlenmeyer, foi realizada análise fatorial utilizando a metodologia de superfície de resposta. Os parâmetros analisados (variáveis independentes) foram a concentração do óleo, temperatura e pH do bioprocesso. A variável de resposta foi a atividade lipolítica.

O número total de experimentos é dado pela equação:

$$2^k + 2k + n_0$$

Onde:

k = número de variáveis independentes

n_0 = número de pontos centrais

Considerando quatro pontos centrais, e $k=3$ (variáveis independentes), foram realizados 18 experimentos, de acordo com a seguinte matriz representada pela Tabela 5:

Tabela 5: Matriz dos experimentos da análise fatorial.

Experimento	Conc. Óleo	Temperatura	pH
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	-1,68	0	0
14	+1,68	0	0
15	0	-1,68	0
16	0	+1,68	0
17	0	0	-1,68
18	0	0	+1,68

Foram estabelecidos intervalos de concentração do óleo, temperatura e pH (pontos -1 e +1), a partir destes intervalos foram interpolados os pontos centrais e axiais. Os pontos axiais são calculados a partir da seguinte fórmula:

$$(2^k)^{1/4}$$

Onde:

k = número de variáveis independentes

A matriz com os valores utilizados nos bioprocessos é mostrada na Tabela 6:

Tabela 6: Matriz dos experimentos de análise fatorial com os valores utilizados nos bioprocessos.

Experimento	Conc. Óleo (%)	Temperatura(°C)	pH
1	0,8	28,4	4,8
2	2,4	28,4	4,8
3	0,8	35,6	4,8
4	2,4	35,6	4,8
5	0,8	28,4	7,2
6	2,4	28,4	7,2
7	0,8	35,6	7,2
8	2,4	35,6	7,2
9	1,6	32,0	6,0
10	1,6	32,0	6,0
11	1,6	32,0	6,0
12	1,6	32,0	6,0
13	0,2	32,0	6,0
14	3,0	32,0	6,0
15	1,6	26,0	6,0
16	1,6	38,0	6,0
17	1,6	32,0	4,0
18	1,6	32,0	8,0

Os resultados obtidos nos experimentos de otimização de condições do processo foram analisados com o programa STATISTICA® 6.0.

4.8 Produção de lipase em escala piloto

4.8.1 Inóculo

O inóculo para uso no reator de 100 litros foi preparado em frasco de borossilicato com volume de trabalho de 6 litros. A aeração foi feita através da injeção de ar comprimido e a agitação através de agitador magnético. O meio de cultura foi preparado com 20 g/L de glicose, 10 g/L de peptona de carne e 3 mL de antiespumante.

O reator de 6 litros foi inoculado com 10^6 esporos por mL de uma suspensão de esporos de *Penicillium aurantiogriseum*. O inóculo foi incubado por 24 horas à 29° C.

4.8.2 Bioprocesso em reator de 100 litros

A produção de lipase em escala piloto foi realizada em um biorreator de 100 litros de volume de trabalho. A agitação é realizada por um motor de 1 cv, que transfere energia mecânica para o eixo com duas turbinas Rushton. A esterilização é realizada no próprio equipamento, que possui resistências elétricas imersas em óleo em sua camisa. O reator possui 90 cm de altura e 45 cm de diâmetro. A Figura 2 mostra o biorreator de 100 litros, e os dois filtros de entrada e dois filtros de saída de ar comprimido.

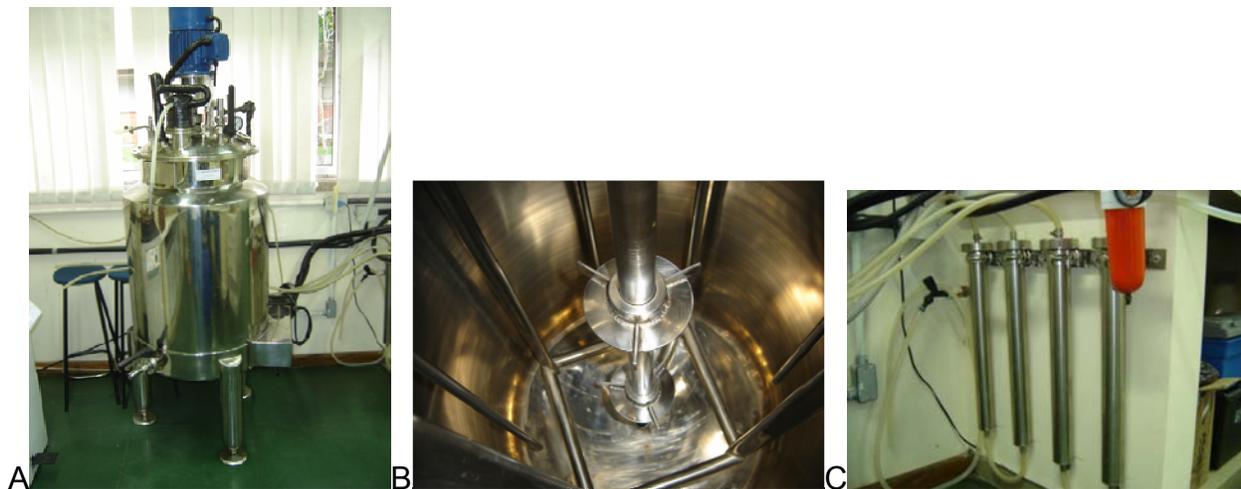


Figura 2: A. biorreator de 100 litros. B. Turbinas Rushton. C. Filtros de entrada e saída de ar.

O meio de produção de lipase utilizado foi o meio basal acrescido de 1,5 L (1,5%) de óleo de soja, esterilizado separadamente, em forno por duas horas à 180°C. O meio de cultura basal teve o pH acertado para 6,5 antes da esterilização por duas horas a 1 atm de pressão.

A temperatura do bioprocesso de produção de lipase foi de 29°C, e agitação de 400 rpm. Alíquotas de 50 mL foram retiradas para as determinações dos parâmetros do processo.

4.8.3 Determinação de massa seca

A massa seca dos pontos do bioprocesso de produção de lipase em escala piloto foi analisada através de filtração de 20 mL da amostra em papel filtro qualitativo previamente pesado. Após a filtração, as células foram “lavadas” com 2 mL de acetona. Os ensaios de determinação de massa seca foram realizados em triplicata e o filtrado foi utilizado para as demais análises do processo. O papel filtro foi colocado na estufa à 60°C até peso constante.

4.8.4 Determinação de glicose

A determinação de glicose foi realizada através do kit de Glicose Oxidase, Bioliquid[®], em que uma alíquota de 0,1 mL foi adicionada a 1 mL do reagente de glicose oxidase e incubado à 37°C, por 10 minutos, sendo a leitura feita em espectrofotômetro a 505 nm, contra um branco sem glicose.

4.9 Formulação do detergente enzimático

Todas as formulações experimentais foram realizadas em 10 gramas, e todos os componentes utilizados são de grau industrial. Os componentes da formulação foram adicionados sob agitação, em agitador magnético, e todas as formulações foram identificadas com um código.

Os tampões utilizados para a diminuição do pH do detergente concentrado apresentavam concentração de 1 M e pH 3,0.

4.10 Avaliação dos processos de limpeza de ordenhadeiras à campo

A avaliação da higienização do equipamento de ordenha com o sistema tradicional e com o detergente enzimático foi realizada na Fazenda do Araçá, em Viamão (RS). Foram avaliados os tempos de cada etapa de limpeza, a quantidade de

água utilizada, as temperaturas e pH das soluções de limpeza. A Figura 3 mostra a sala de ordenha onde foi realizada a avaliação dos processos de limpeza. A figura também mostra em detalhe (parte C) os insufladores, peças que entram em contato diretamente com os tetos das vacas, e utilizadas para avaliação do desgaste pelos detergentes, através de microscopia eletrônica.

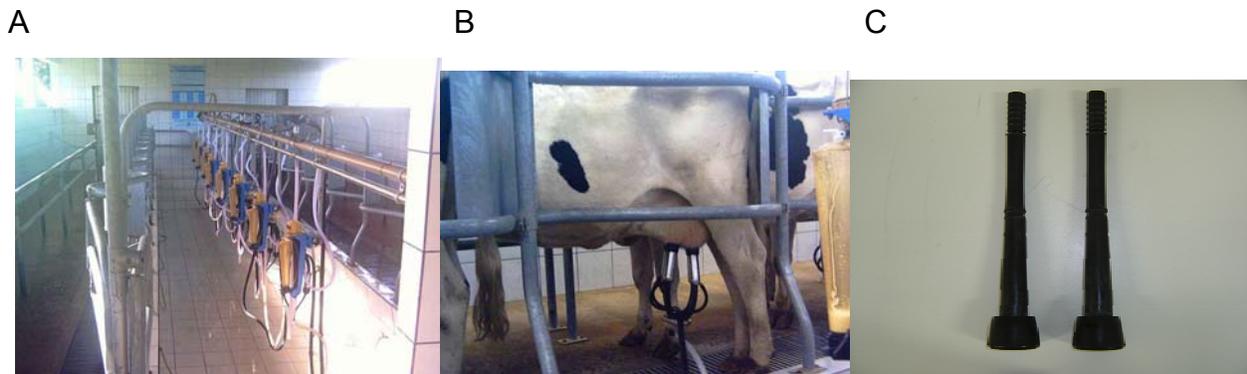


Figura 3: A. Sala de ordenha da Fazenda do Araçá em Viamão, RS, onde foram realizados os ensaios a campo. B. Conjunto de insufladores durante realização da ordenha. C. Insufladores.

4.10.1 Determinação da dureza da água

A determinação da dureza da água utilizada na Fazenda do Araçá foi realizada através de Kit de determinação de dureza total Macherey-Nagel[®].

4.10.2 Análise do desgaste dos insufladores através de microscopia eletrônica de varredura

O desgaste da borracha dos insufladores foi analisado através de microscopia eletrônica de varredura das peças novas, com seis meses de uso dos detergentes tradicionais, na Fazenda do Araçá, e após ensaio acelerado, realizado no laboratório.

Para o ensaio acelerado de desgaste, os insufladores foram imersos nos respectivos detergentes, na diluição, pH e temperatura de uso. No caso do detergente

enzimático, as peças permaneceram imersas por 60 horas, equivalente ao período de seis meses de uso, uma vez que os detergentes permanecem em contato com as peças 20 minutos por dia. Para avaliação do sistema tradicional de limpeza de ordenhadeiras, as peças permaneceram 60 horas imersas no detergente alcalino e 60 horas no detergente ácido.

As amostras dos insufladores foram cortadas e coladas nos suportes de aço inox (“stubs”), pela sua parte externa, ficando a parte interna disponível para as fotografias.

As fotos dos insufladores foram feitas no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS, com microscópio eletrônico de varredura, com aceleração de voltagem de 10 kV e aumento de 1000 vezes.

4.10 Análise de viabilidade econômica na produção do detergente enzimático para ordenhadeiras

A metodologia utilizada foi a tradicional de análise de viabilidade econômico-financeira, com a determinação dos indicadores Valor Atual Líquido (VAL), Taxa Interna de retorno (TIR) e Retorno do investimento (“PAYBACK”) descontado como determinantes para efeito de aceitação ou rejeição técnica da viabilidade econômica do projeto. O prazo de análise foi de 5 anos, sendo os investimentos considerados no ano “zero” e os valores de receita e custos projetados para o período de análise ano a ano.

Os dados e informações foram organizados em planilhas eletrônicas – Excel – conforme abaixo a fim de se obter os indicadores mencionados acima:

1. Investimentos: para uma determinada capacidade de produção em função do mercado, foram definidos valores para os equipamentos necessários ao atendimento desta capacidade e estimados os investimentos em pesquisas realizadas em anos anteriores;

2. Mão-de-obra: dimensionada para a capacidade estimada e projetada para o período de análise, considerando encargos sociais incidentes;

3. Depreciação, manutenção, seguros: em função das taxas legais de depreciação e de percentuais estimados para cálculo de manutenção e seguros levando em consideração os equipamentos envolvidos;

4. Impostos e comissões: serão considerados os impostos incidentes na operação em função do faturamento da empresa;

5. Previsão de vendas: a partir de estimativas de mercado, de produção, de preço de venda e de custo de matéria-prima. Foram elaboradas as previsões de receita e de custo de matéria-prima em função da produção sendo elaborada em planilhas de custos do processo de produção.

Também foram definidos os parâmetros de capacidade de produção em horas, o percentual do preço a ser praticado em relação aos concorrentes, e os percentuais em relação a uma capacidade de produção estipulada como padrão.

Não foram separados os custos de energia e água do custo de matéria-prima. Desta maneira, pôde-se visualizar no demonstrativo de resultados (DRE) o custo geral de produção (matéria-prima+energia+água).

6. Custos fixos: os custos necessários para se manter uma estrutura capaz de amparar produção e vendas estimadas;

7. Preço de venda sugerido: cálculo técnico do preço de venda dos produtos em função da composição dos custos de comercialização, de matéria-prima, dos custos de estrutura e das margens de lucro. Com relação às margens de lucro, as mesmas foram definidas, em função do preço praticado pelo mercado, visualizando-se então que margem se estaria praticando com o alinhamento dos preços sugeridos e de mercado;

8. DRE: ordenação dos dados e informações obtidas com a separação de custos Variáveis e Fixos e apuração do resultado econômico, em um mês anual para os seguintes. Determinação de indicadores de performance e análise vertical;

9. Capital de giro: determinação do valor do capital de giro necessário para dar a rodada inicial no negócio. É considerado para efeito de investimento inicial e “devolvido” ao fluxo de caixa ao final do projeto;

10. Fluxo de caixa para efeito de Valor Atual Líquido (VAL) e Taxa Interna de Retorno (TIR): planilha onde os indicadores mencionados como determinantes para aceitação ou não de projeto são calculados e demonstrados.

Valor atual Líquido – VAL: também chamado de Valor PRESENTE Líquido ou VPL, é o valor resultante dos fluxos de caixa anuais do projeto (após considerarem-se as receitas e os custos envolvidos), trazidos a valor presente (data de elaboração e análise) por uma determinada taxa de custo de capital e líquido do investimento realizado. Em última análise, o VAL mede a riqueza gerada pelo projeto, a valor presente (considerando-se o valor do dinheiro no tempo) descontando-se o investimento realizado. Caso do VAL seja maior que zero, TECNICAMENTE o projeto deve ser aceito, caso contrário não.

A taxa de custo de capital considerará duas variáveis: o custo de oportunidade do empresário, ou seja, a taxa de um investimento alternativo livre de risco e uma taxa de risco, que traduz quanto a mais o empresário exige em remuneração para correr o risco de investir no projeto.

Forma de cálculo:

$$VAL = \frac{\text{Fcaixa ano 1}}{(1+i)^1} + \frac{\text{Fcaixa ano 2}}{(1+i)^2} + \frac{\text{Fcaixa ano 3}}{(1+i)^3} + \frac{\text{Fcaixa ano 4}}{(1+i)^4} + \frac{\text{Fcaixa ano 5}}{(1+i)^5} - INVEST$$

Onde: i = custo de capital

Taxa Interna de Retorno – TIR: a taxa que, utilizada no demonstrativo de cálculo acima, resultar num VAL igual a zero é denominada de TIR. Caso esta taxa seja superior ao custo de capital do projeto, tecnicamente este deve ser aceito, caso contrário não.

“Payback” descontado: levando-se em consideração o fluxo de caixa gerado pelo projeto, pode-se calcular em quantos períodos o investimento é recuperado, Ao se determinar o “payback” considerando-se o fluxo nominal, ou seja, sem deflação, ou seja, sem considerar o valor do dinheiro no tempo, define-se o “payback” simples. Ao se utilizar o fluxo de caixa descontado, ou seja, deflacionado a uma determinada taxa, ou seja, considerando-se o valor do dinheiro no tempo, define-se o “payback” descontado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Escolha do microrganismo

Dos 12 microrganismos testados para seleção do melhor produtor de lipase (Tabela 4), apenas três apresentaram atividade enzimática significativa, uma levedura do gênero *Pichia*, e dois fungos filamentosos, *Penicillium restrictum* e outro fungo que posteriormente foi identificado com *Penicillium aurantiogriseum* (Figura 4). *P. aurantiogriseum*, que foi isolado de bacon, foi o microrganismo escolhido como melhor produtor de lipase, e apresentou atividade de $3,13 \text{ U} \pm 0,20$. A atividade enzimática foi verificada utilizando p-nitrofenilpalmitato como substrato e os ensaios foram realizados em pH 5,0 e 8,0, em triplicata. Os três microrganismos identificados como melhores produtores de lipase apresentaram maior atividade enzimática em pH 5,0, o mesmo pH do detergente enzimático, sendo, portanto, adequadas para a formulação. Os microrganismos 1 e 12, *Bacillus* sp e *Pseudomonas strutzeri*, respectivamente, apresentaram valores de atividade de lipase bem mais baixos, no entanto, são enzimas com características diferentes, com maior atividade em pH 8,0. Falar resultados de aurantiogriseum e restrictum.

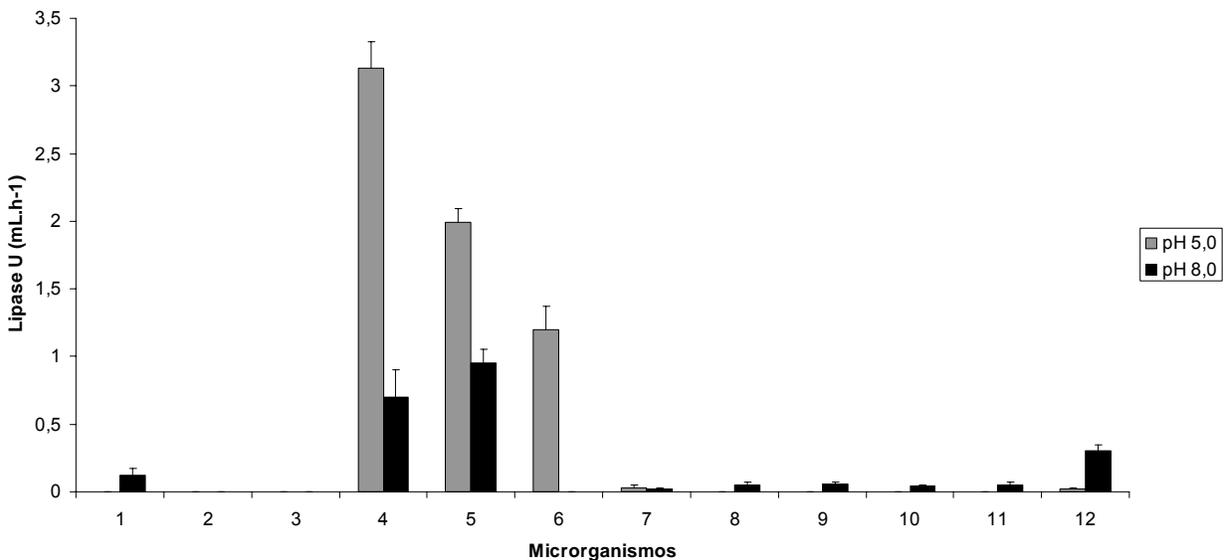


Figura 4: Atividade de lipase em pH 5,0 e 8,0 dos diferentes microrganismos testados.

1. *Bacillus* sp.; 2. MO2*; 3. MO3*; 4. *Penicillium aurantiogriseum*; 5. *Pichia* sp.; 6.

Penicillium restrictum; 7. *Aspergillus niger*, 8. *B. cereus*; 9. *B. polymyxa*; 10. *B. subtilis*; 11. *B. licheniformis*; 12. *Pseudomonas strutzeri*. *microorganismos isolados de alimentos.

5.2 Efeito da adição de surfactantes.

A adição de surfactantes, no final do bioprocesso de produção de lipase por *P. aurantiogriseum*, em Erlenmeyer, foi testada, visando a extração da enzima pelo aumento da permeabilidade das células, o que facilita a passagem das moléculas.

Foram testados Tween 80, Triton X-100 e SDS, nas concentrações de 0,25 e 0,5%.

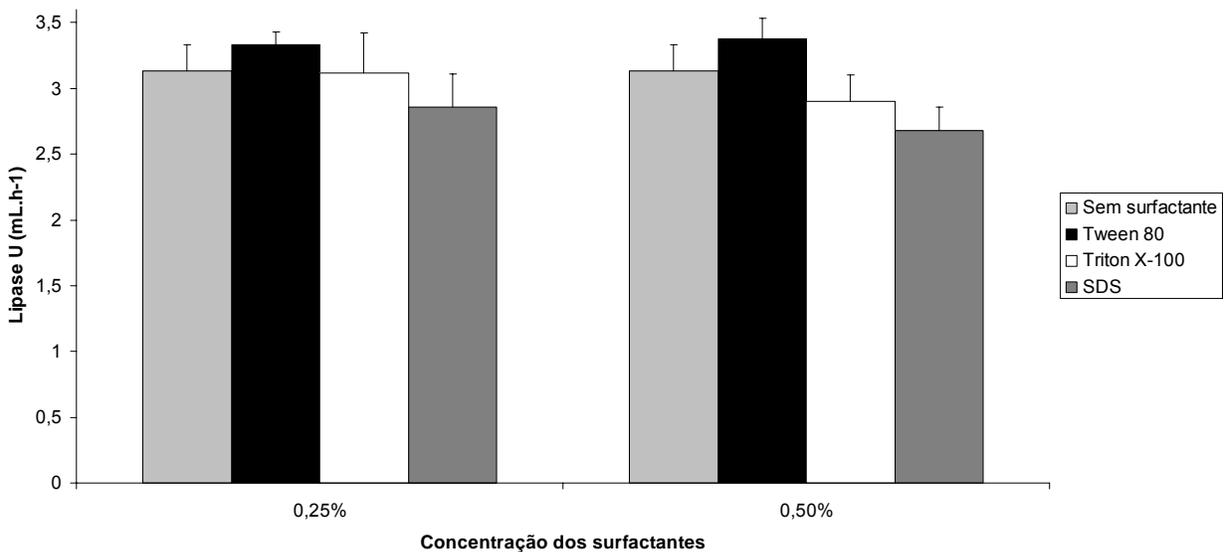


Figura 5: Efeito da adição de surfactantes no meio de cultura após o cultivo de *Penicillium aurantiogriseum*, em Erlenmeyer.

Conforme mostra a Figura 5, não houve diferença significativa na quantidade de lipase obtida com a adição dos surfactantes, indicando que toda a enzima produzida foi secretada para o meio de cultura.

A recuperação da lipase produzida sem adição de surfactantes é mais vantajosa, pois elimina uma etapa no processo de produção industrial.

Diferentemente da produção de lipase por *P. aurantiogriseum*, Silva *et al.* (2005), estabeleceram um protocolo para extração da lipase de *M. anisopliae* com 0,25% de Tween 80, sem o qual não foi detectado atividade enzimática.

5.3 Identificação do microrganismo

O fungo filamentososo MO4, selecionado como melhor produtor de lipase, foi identificado pela Profa. Dra. Maria Inez de Moura Sarquis, do Laboratório de Coleção de Culturas de Fungos da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. O fungo foi identificado como *Penicillium aurantiogriseum*, e está registrado na Coleção do IOC com o número IOC 4517.

5.4 Escolha do meio de produção de lipase

Foram testados quatro óleos vegetais para determinação da melhor fonte de carbono lipídica, óleo de soja, arroz, girassol e azeite de oliva. Para a determinação da atividade de lipase realizou-se ensaio enzimático utilizando p-Nitrofenilpalmitato como substrato. Com um nível de 5% de significância, não houve diferença na atividade de lipase quando se utiliza no meio de cultura óleo de soja, girassol ou azeite de oliva, sendo que com a utilização de óleo de arroz obtém-se uma menor atividade. As atividades enzimáticas foram realizadas em triplicatas, após 48 horas de cultivo de *P. aurantiogriseum*, em agitador orbital. Por razões econômicas escolheu-se o óleo de soja para compor o meio de produção de lipase. A Figura 6 mostra a atividade de lipase do microrganismo nos diferentes óleos.

5.5 Otimização dos parâmetros do bioprocessamento de produção de lipase

A otimização das condições do bioprocessamento de produção de lipase por *Penicillium aurantiogriseum*, em Erlenmeyer, foi realizada através da metodologia de superfície de resposta. Utilizou-se como variáveis independentes a concentração de óleo de soja, que variou de 0,2 a 3,0%, a temperatura, testada na faixa de 26 a 38°C e o pH do meio, cujos valores testados variaram entre 4,0 e 8,0. A variável dependente, ou resposta, foi a atividade lipolítica produzida após 48 horas de processo, expressa em μmol de p-NP liberado/mL/hora. A Tabela 7 mostra os 18 ensaios realizados, sendo

quatro pontos centrais, e a atividade lipolítica de *P. aurantiogriseum* em cada condição testada.

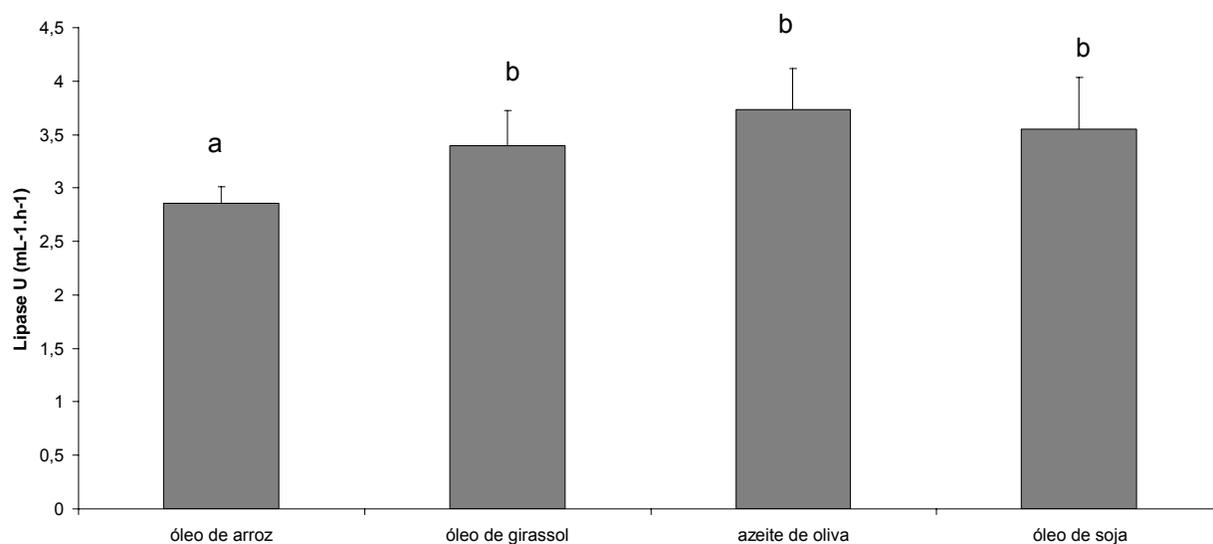


Figura 6: Atividade de lipase de *Penicillium aurantiogriseum* em diferentes óleos. A, B: barras com as mesmas letras não diferem significativamente pelo teste de Tukey ($\alpha = 0,05$).

Tabela 7: Atividade de lipase de *P. aurantiogriseum* nas condições testadas.

Experimento	Concentração de óleo de soja (%)	Temperatura (°C)	pH	Atividade lipolítica (U/mL)
1	0,8	28,4	4,8	3,28
2	2,4	28,4	4,8	3,38
3	0,8	35,6	4,8	0,14
4	2,4	35,6	4,8	0,10
5	0,8	28,4	7,2	0,54
6	2,4	28,4	7,2	0,15
7	0,8	35,6	7,2	0,09
8	2,4	35,6	7,2	0,08
9	1,6	32,0	6,0	4,64
10	1,6	32,0	6,0	3,35
11	1,6	32,0	6,0	4,35
12	1,6	32,0	6,0	4,90
13	0,2	32,0	6,0	0,57
14	3,0	32,0	6,0	1,49
15	1,6	26,0	6,0	1,23
16	1,6	38,0	6,0	0,15
17	1,6	32,0	4,0	4,26
18	1,6	32,0	8,0	0,12

Os resultados apresentados na Tabela 7 foram analisados pelo programa STATISTICA® 6.0 para obtenção das superfícies de resposta.

O gráfico de Pareto, calculado pelo programa a partir da Tabela 7, apresentado na Figura 7, mostra que cinco efeitos foram significativos ($p > 0,05$) e negativos e são apresentados, a seguir, pela ordem de importância: temperatura (quadrático), concentração de óleo de soja (quadrático), pH (linear), pH (quadrático) e temperatura (linear).

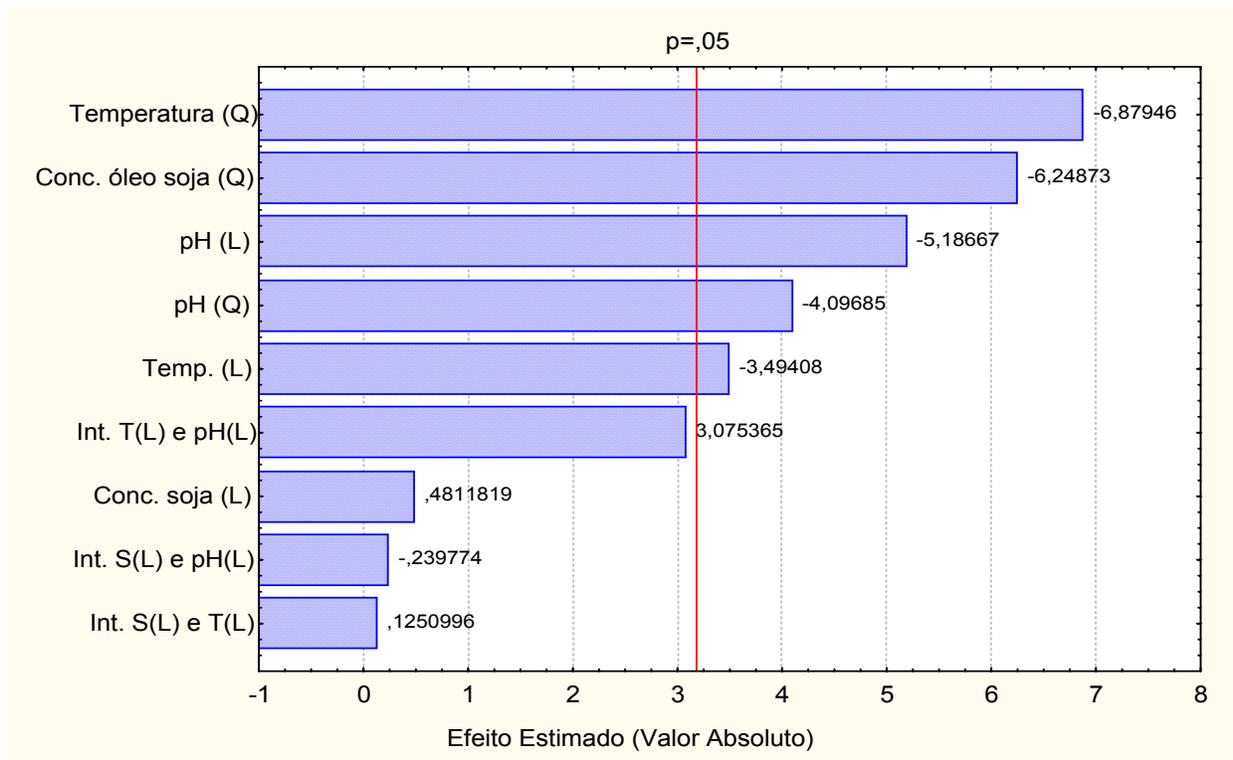


Figura 7: Gráfico de Pareto considerando todos os efeitos.

A equação obtida a partir deste modelo, considerando todos os fatores, apresenta um $R^2 = 0,941$, e a análise de variância mostrou que o modelo é significativo, apresentando o F calculado de 14,3 e o F tabelado de 3,39, 4,2 vezes maior, considerado por Barros *et al* (1995), como um modelo preditivo, no caso de ensaios biológicos. Mas, Barros *et al* (2001), considera um modelo preditivo apenas se o F calculado é 10 vezes maior que o F tabelado. No entanto, para o cálculo da ANOVA, pode-se desconsiderar os efeitos que não foram significativos: interação da temperatura

e pH, concentração de óleo de soja (L), interação da concentração de óleo de soja e pH e interação da concentração de óleo de soja e temperatura.

A equação do modelo considerando apenas os efeitos significativos apresenta um $R^2 = 0,867$, e o valor do F calculado, na análise de variância, foi 5,0 vezes maior que F tabelado, não justificando a utilização desta equação para a modelagem deste bioprocessos.

No entanto, se o efeito da interação da temperatura e pH for considerado no modelo, uma vez que seu valor foi muito próximo do ponto de corte, a equação apresenta $R^2 = 0,939$, e o cálculo da análise de variância mostra que o F calculado é 9,2 vezes maior que o F tabelado. Portanto, escolheu-se estes efeitos para a equação do modelo.

A partir deste modelo, foram geradas as superfícies de resposta para a produção de lipase por *P. aurantiogriseum*, em Erlenmeyer. Os gráficos de superfície de resposta, e suas projeções no plano, apresentam regiões, representadas por diferentes cores, nas quais não há diferença significativa da atividade lipolítica, e são mostrados nas Figuras 8, 9, 10, 11, 12, e 13.

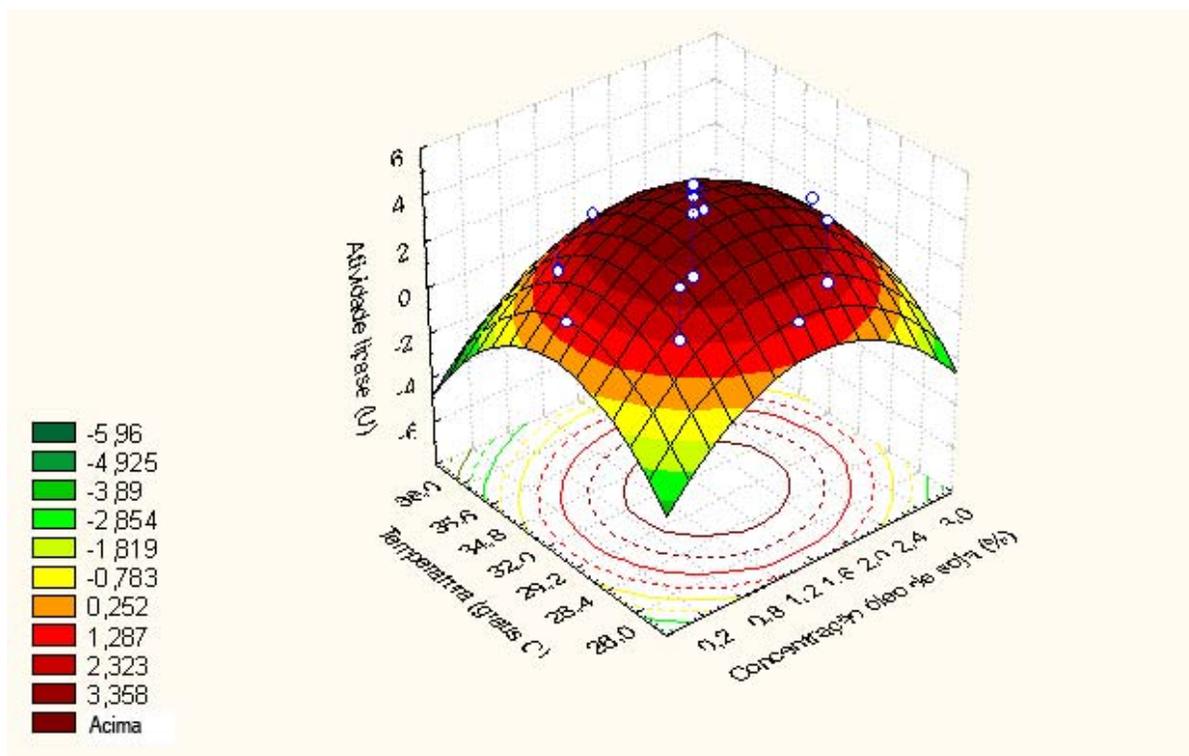


Figura 8: Superfície de resposta da produção de lipase em função da temperatura e concentração de óleo de soja.

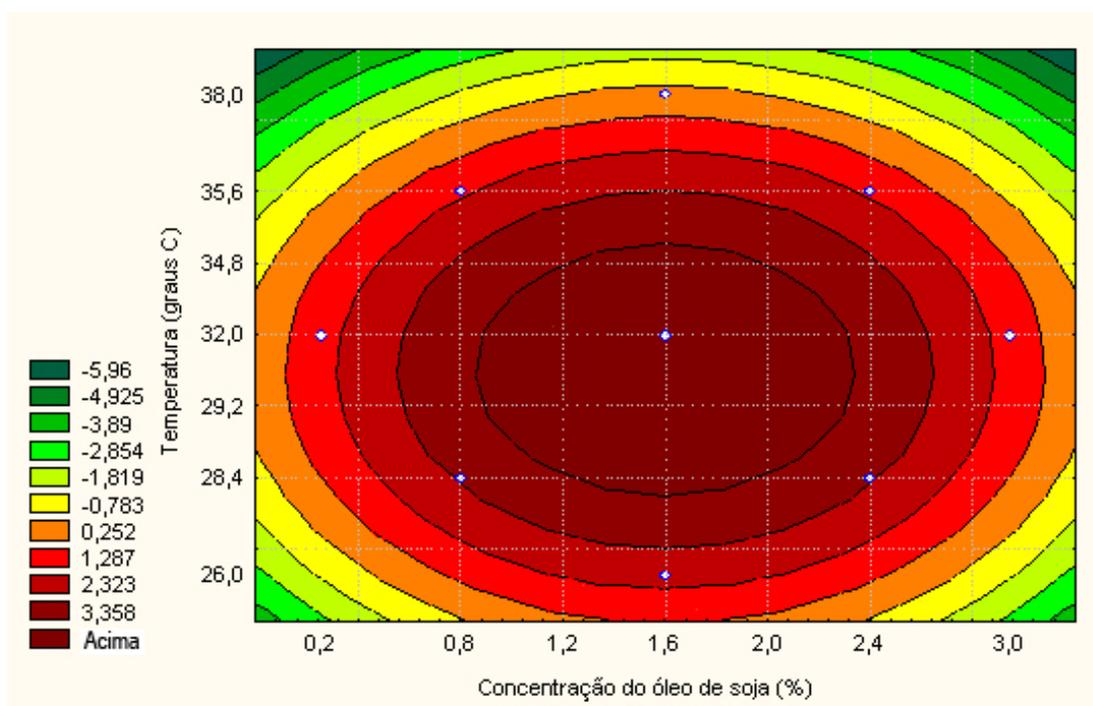


Figura 9: Projeção da superfície de resposta da atividade de lipase em função da temperatura e concentração de óleo de soja no plano.

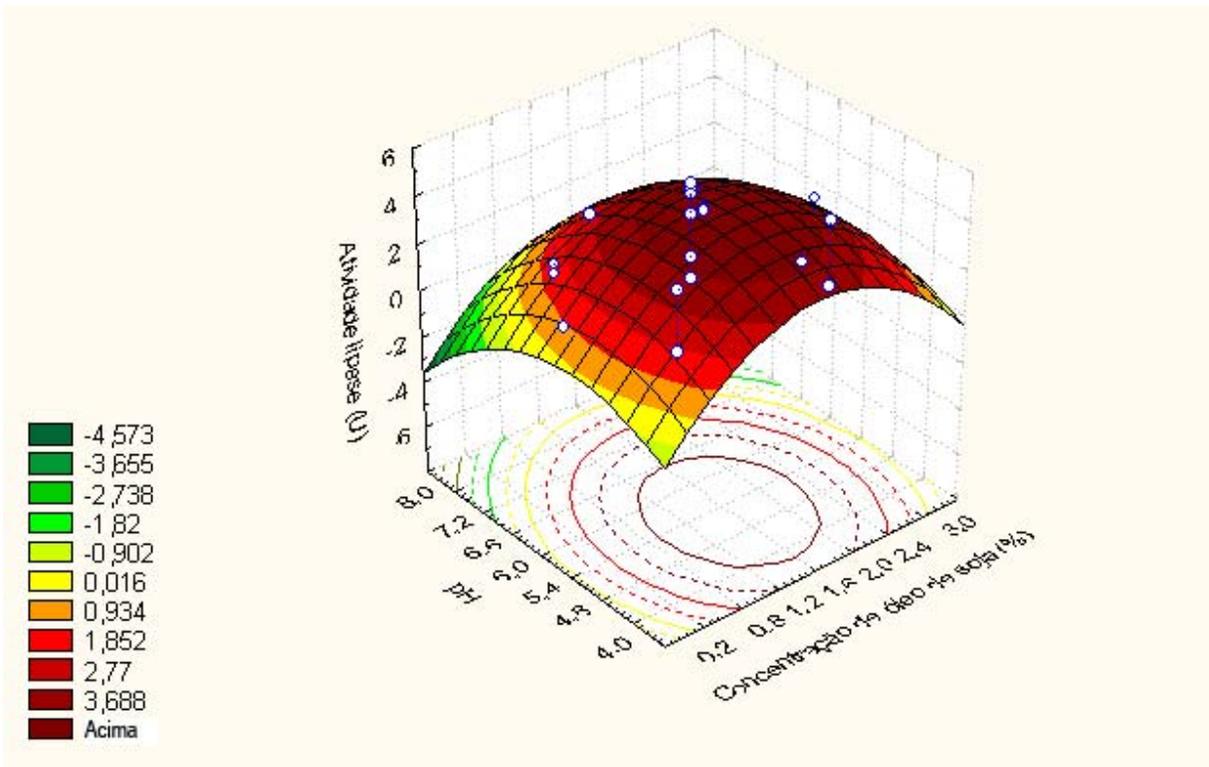


Figura 10: Superfície de resposta da atividade de lipase em função do pH e da concentração de óleo de soja.

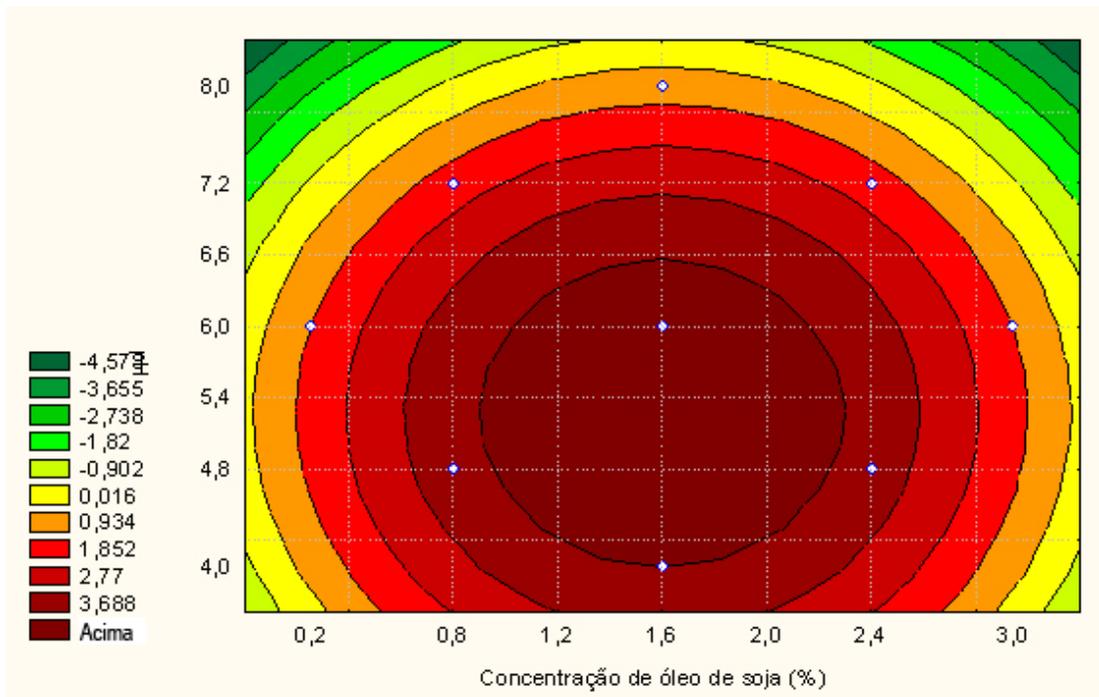


Figura 11: Projeção da superfície de resposta da atividade de lipase em função do pH e da concentração de óleo de soja no plano.

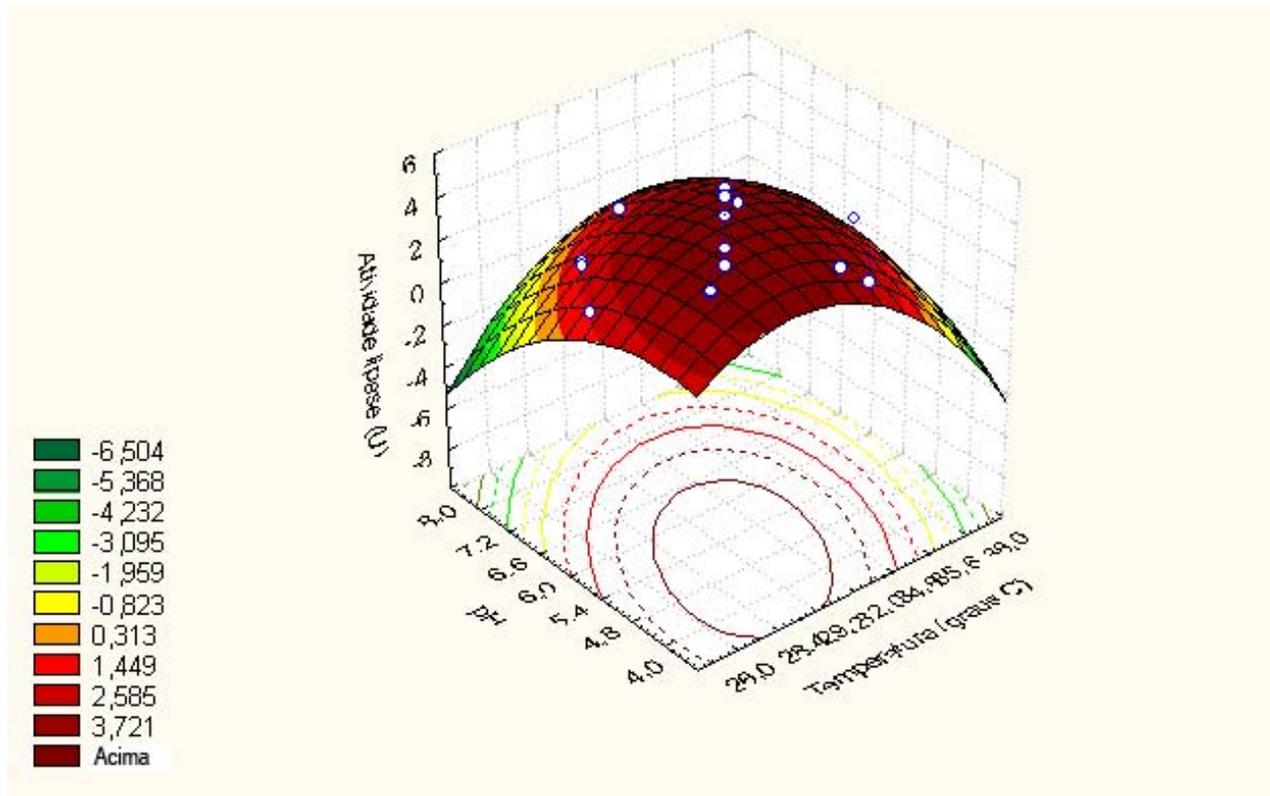


Figura 12: Superfície de resposta da atividade de lipase em função do pH e temperatura.

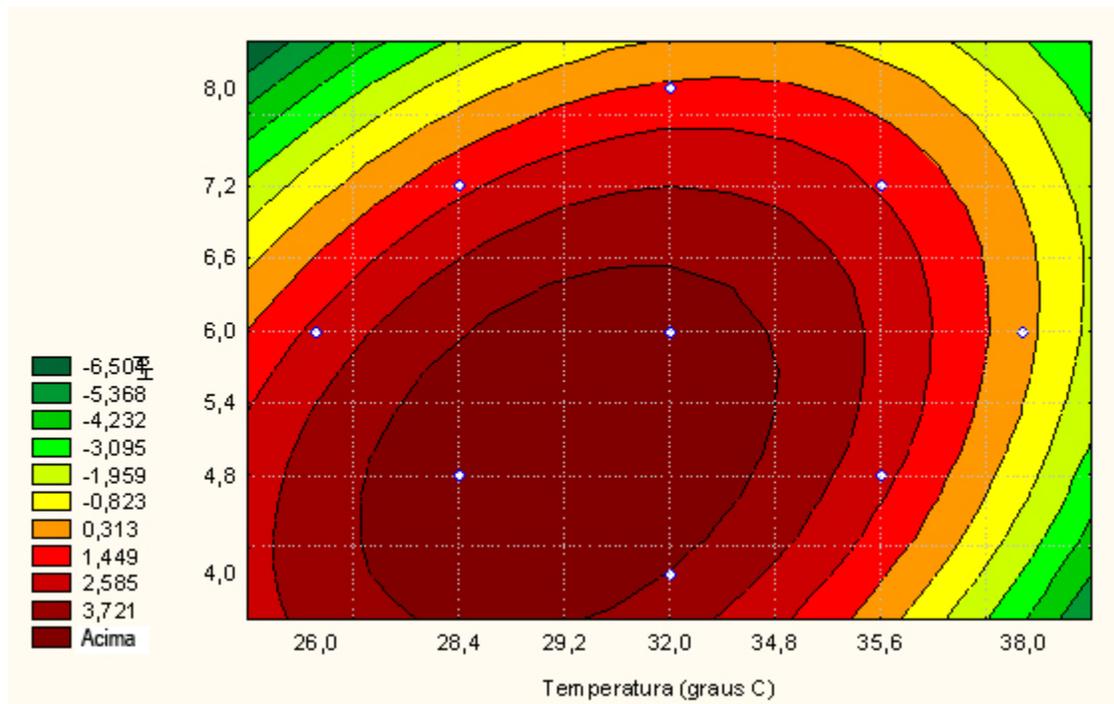


Figura 13: Projeção da superfície de resposta da atividade de lipase em função do pH e temperatura.

Conforme a Figura 9, a atividade lipolítica máxima é obtida quando se adiciona de 0,85 a 2,35% de óleo de soja no meio de cultura. Visando a redução de custos de matéria-prima no aumento de escala de produção, busca-se a menor adição de substrato sem prejuízo dos outros parâmetros. A adição da quantidade mínima de óleo de soja, 0,9%, limita a temperatura a uma faixa de 29,2 a 32° C e, conforme a Figura 11, o pH, a uma faixa de 4,8 a 5,6. Considerando a concentração de óleo adicionada ao meio de cultura de produção de lipase de 1,6%, a faixa de temperatura para a máxima produção da enzima amplia para 28 a 35°C, segundo a Figura 9, e a faixa de pH para 4,0 a 6,5, segundo a Figura 11, o que permite uma maior flexibilidade e menor necessidade de controles no bioprocessamento.

O meio de cultura de produção de lipase testado contém nutrientes como glicose e óleo de soja que, quando metabolizados, tendem a baixar o pH do meio, portanto, escolheu-se, para a otimização das condições do bioprocessamento de produção de lipase por *P. aurantiogriseum*, a temperatura de 29° C, pois, conforme a Figura 13, nesta temperatura tem-se a maior faixa de pH para a produção máxima da enzima. O meio de cultura é tamponado, no entanto, a tendência é de queda nos valores de pH, pela produção de ácidos orgânicos no meio de cultura. Por isso, o pH deve ser ajustado para 6,5 no início do processo para que, no decorrer deste, a possível diminuição do pH não prejudique a produção de lipase.

Portanto, os parâmetros otimizados do processo de produção de lipase por *P. aurantiogriseum*, em Erlenmeyer, são: pH de 6,5 no início de processo, temperatura de 29° C e adição de 1,5% de óleo de soja.

A validação do modelo foi realizada comparando o valor de atividade enzimática obtido experimentalmente e estimado pela equação do modelo, no ponto de máximo.

O cálculo do ponto de máximo foi feito a partir da equação do modelo considerado:

$$Y = 4,32 - 1,19S^2 - 0,64T - 1,31T^2 - 0,95H - 0,78H^2 + 0,74TH$$

Onde:

Y = Atividade lipolítica (U)

S = Concentração de óleo de soja

T = Temperatura

H = pH

Os coeficientes da equação foram obtidos pelo programa STATISCA[®] 6.0 e para o cálculo de atividade enzimática utiliza-se valores de concentração de óleo, temperatura e pH codificados.

Esta equação foi derivada em relação a cada termo, separadamente, e igualada a zero, para obtenção dos pontos de máximo, mostrados na tabela 8.

Tabela 8: Concentração das variáveis no ponto de máxima atividade lipolítica, conforme a equação obtida através da metodologia de superfície de resposta.

Variável	Ponto de máxima atividade lipolítica
Concentração de óleo de soja	1,6%
Temperatura	30° C
pH	5,0

O cálculo da equação no ponto considerado como ótimo resulta em 3,93 U/mL, enquanto que experimentalmente obteve-se 4,68 U/mL. A diferença entre o resultado calculado e o experimental é de 19%, que é aceitável para ensaios biológicos.

5.6 Produção de lipase em escala piloto

Após a escolha do meio de cultura e a otimização dos parâmetros do bioprocessamento, realizou-se a produção da lipase de *P. aurantiogriseum* em escala piloto, no biorreator de 100 litros.

Conforme mostra a Figura 14, não houve atividade enzimática até a décima sexta hora de processo. A partir da vigésima primeira hora ocorreu um rápido aumento na atividade de lipase até a hora 33, alcançando 28,2 U/mL \pm 1,3, sendo que a atividade continuou a aumentar, em menor intensidade, até a hora 40, quando atingiu o

pico de produção de 32 U/mL \pm 1,5. Após a quadragésima hora houve uma estabilização na quantidade de lipase produzida.

Lima *et al* (2003) também realizaram a otimização das condições de cultivo de *P. aurantiogriseum*, em Erlenmeyer, e atingiram 13 U/mL. Miranda *et al* (1999) alcançaram 6,74 U/mL de lipase produzida por *Penicillium citrinum*. Já Fickers *et al* (2006) atingiram 1100 U/mL de lipase produzida por *Yarrowia lipolytica* em bioreator de 2000 litros, mas utilizaram uma linhagem mutante, cujos genes de produção da enzima foram super-expressos.

A produção de lipase no reator de 100 litros foi 6,8 vezes maior que a produção em Erlenmeyer. A maior taxa de aeração do meio de cultura no reator, em comparação com o Erlenmeyer, foi um dos fatores responsáveis por este aumento.

Dominguez *et al.* (2005), também aumentaram quantidade de lipase produzida, em cinco vezes, com a realização do bioprocesso de produção desta enzima por *T. thermophilus* em reator de 5 litros, em comparação com a produção em Erlenmeyer. He & Tan (2006) também constataram este fato para a produção de lipase por *Candida* sp.

No caso de Gupta *et al.* (2007), a quantidade de lipase produzida em reator de 14 litros foi semelhante à produzida em Erlenmeyers, porém o tempo de produção diminuiu de 36 para 15 horas, resultando também em uma maior concentração de biomassa. Este aumento na concentração de biomassa foi provocado por uma alta taxa de aeração, sugerindo que estratégias de produção de lipase com cultivo através de batelada alimentada poderiam ser utilizadas para aumentar a produção desta enzima, através de um crescimento mais lento.

Já Fickers *et al.* (2006) e Tan (2003) fizeram o escalonamento para reatores de 2000 e 1500 litros, respectivamente e mantiveram os níveis de produção de lipase semelhantes aos alcançados em reatores menores. Estes resultados sugerem uma boa expectativa no aumento de escala da produção de lipase por *P. aurantiogriseum*.

O acompanhamento dos valores de pH de um bioprocesso é um importante parâmetro que pode ser rápido e facilmente determinado, e fornece informações sobre o crescimento dos microrganismos e alterações no comportamento normal esperado. No caso do processo de produção de lipase por *P. aurantiogriseum*, no reator de 100

litros, o pH manteve-se praticamente constante, de 5,42, no início do processo, até 4,74, após 48 horas de crescimento. Esta pequena variação nos valores de pH foi devido à presença dos sais que compõem o meio basal, que provocam um efeito tamponante no meio de cultura. De acordo com as figuras 8 e 9, esta faixa de pH está dentro da área que corresponde ao máximo de atividade de lipase, nos ensaios de otimização da produção em Erlenmeyer.

A avaliação do crescimento de *P. aurantiogriseum*, durante o processo de produção de lipase no reator de 100 litros foi realizado através da determinação da massa seca.

Na Figura 14, pode ser observada a fase lag de crescimento de 2 horas, seguida de um rápido crescimento até a hora 13, atingindo 10,5 g/L de massa seca. A partir da décima terceira hora o crescimento se deu com uma menor intensidade até a hora 33, quando atingiu o pico de 14,5 g/L de massa seca. O crescimento do fungo se estabilizou a partir da trigésima terceira hora até o encerramento do bioprocessamento em 48 horas.

O período de duas horas da fase lag do crescimento do fungo coincidiu com o período de duas horas em que a concentração de glicose permaneceu inalterada no meio de cultura, conforme pode ser observado na Figura 14. Durante as horas seguintes a quantidade de glicose no meio de cultura caiu rapidamente até a hora 16, a partir da qual este nutriente não foi mais detectado. A hora em que a quantidade de glicose foi esgotada coincidiu com o início da produção de lipase, mostrando a repressão que este nutriente exerce sobre a síntese da enzima. Apesar disto, sua presença no meio de cultura é importante para o maior desenvolvimento da massa celular do fungo.

Com relação à quantidade de proteína no meio de cultura, esta caiu até a hora 13, e depois passou a aumentar, devido à liberação de proteínas no meio e morte celular.

A atividade de protease, determinada na hora final do bioprocessamento de produção de lipase por *P. aurantiogriseum*, foi de 0,95 U/mL \pm 15. Esta baixa atividade é

interessante sob o ponto de vista de estabilidade da enzima após o término do bioprocesso.

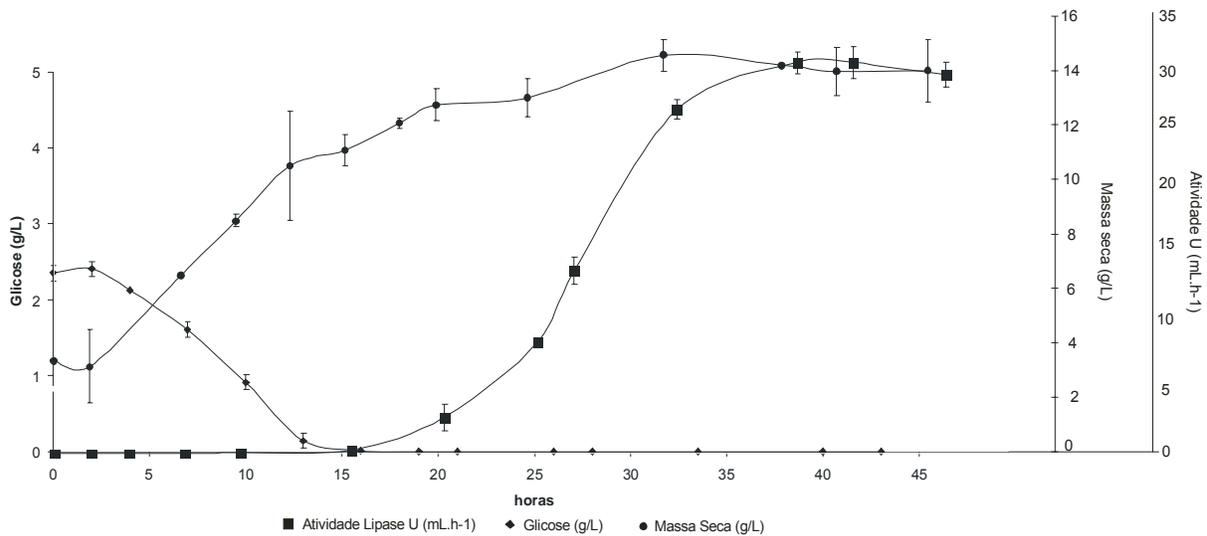


Figura 14: Bioprocesso de produção de lipase por *Penicillium aurantiogriseum*, em escala piloto de 100 litros.

5.7 Formulação do Detergente Enzimático

Os ensaios de formulação do detergente enzimático foram realizados utilizando as enzimas comerciais da Novozymes[®], Lipolase[®] 100L EX e Savinase[®] LBR. Esta decisão foi tomada para agilizar o processo de comercialização do produto, uma vez que a capacidade produtiva da Empresa BioPlus – Desenvolvimento Biotecnológico LTDA, no momento, não é suficiente para a produção das enzimas.

A Tabela 9 mostra a composição de todas as formulações realizadas, sendo a primeira, baseada em uma formulação comercial de detergente enzimático.

Nas primeiras formulações ocorreram problemas de compatibilidade entre alguns componentes, resultando em dificuldades de solubilização, antes mesmo da adição das enzimas. Estes problemas foram solucionados pela alteração da ordem de adição, substituição ou eliminação de determinados componentes da formulação.

Com relação ao pH do produto, a inovação do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras está justamente no caráter ácido da formulação, ao contrário dos detergentes enzimáticos disponíveis no mercado, para diversas

aplicações, que apresentam pH alcalino. A formulação DE2209/5 foi realizada para definição de quantidade de tampão a ser adicionada, que deve ser capaz de manter o pH do detergente, após a diluição de uso (1%), em 5,0. O pH do detergente concentrado (DE2209/5) ficou em 6,33. Após a adição de 30 μ L de tampão Citrato, 1 M, pH 3,0, por mL de detergente concentrado, o pH ficou em 4,36, e, após a diluição de uso, ficou em 5,10. Portanto, a quantidade de tampão a ser adicionada é de 30 μ L/mL, ou 3%. No entanto, neste caso o tampão foi adicionado após a formulação. Já na formulação DE2609/5, utilizou-se a mesma composição, porém com o tampão incorporado no início de processo de formulação, resultando em valores semelhantes de pH. Devido às mudanças ocorridas nas concentrações e nos componentes da formulação, a partir do detergente DE2301/14, a quantidade de tampão adicionado foi corrigida para 50 μ L/mL, ou 5%. A formulação DE1501/13 foi realizada para determinação desta correção.

A formulação DE2609/5 apresentou a formação de um precipitado, conforme pode ser observado na Figura 15, a partir do segundo dia. Este precipitado foi aumentando gradativamente ao longo do tempo, coincidindo com a perda de atividade enzimática, conforme pode ser observado nas figuras 22 e 23.



Figura 15: Visualização do precipitado formado após 13 dias da formulação do detergente DE2609/5.

As formulações seguintes foram testadas visando verificar a influência da concentração dos componentes e diminuir o precipitado formado.

A substituição do tensoativo de baixa espuma, que é composto por álcool laurílico etoxilado e propoxilado, cujo nome comercial é Alkomol, por nonilfenol etoxilado (Renex 95 e Renex 60), na formulação DE0611/10, teve grande influência na formação do precipitado, resultando em uma maior estabilidade do detergente. Apesar de os dois surfactantes serem não-iônicos, seu comportamento na formulação foi bem diferente, indicando que o nonilfenol etoxilado é mais compatível com as características e com os componentes da formulação.

Conforme Prieto *et al.* (2002), a adição de ácido bórico, na concentração de 0,25 a 10%, ajuda a estabilizar proteases em detergentes enzimáticos. Na formulação DE2301/14 foi testada a adição de ácido bórico, mas não se observou a diminuição do precipitado formado. A adição de cloreto de cálcio também foi testada objetivando aumentar a estabilidade nas formulações DE2602/16 e DE2802/17, mas apresentaram o mesmo comportamento.

Nas formulações DE1501/11, DE1501/12 e DE2802/18, testou-se a adição de outras soluções tampão, uma vez que diferentes sais podem influenciar de maneira positiva ou negativa na atividade enzimática. No entanto, estas formulações apresentaram resultados semelhantes em relação à formação de precipitado e atividade das enzimas.

As Figuras 16 e 17 mostram a evolução da estabilidade enzimática de três formulações ao longo do tempo, sendo esta relacionada com a formação de precipitado.

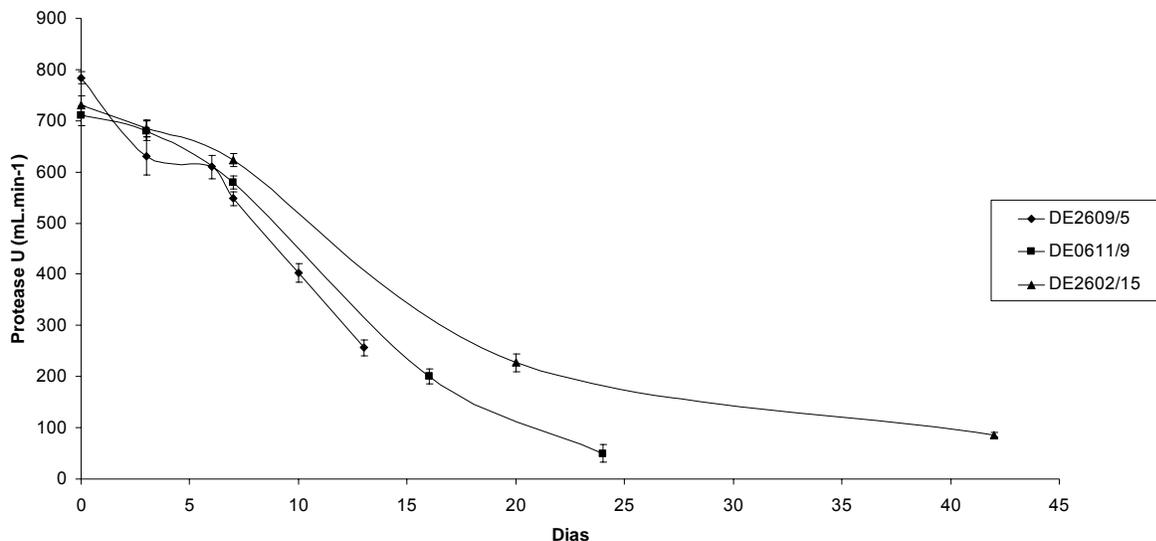


Figura 16: Perda da atividade de protease em três formulações ao longo do tempo.

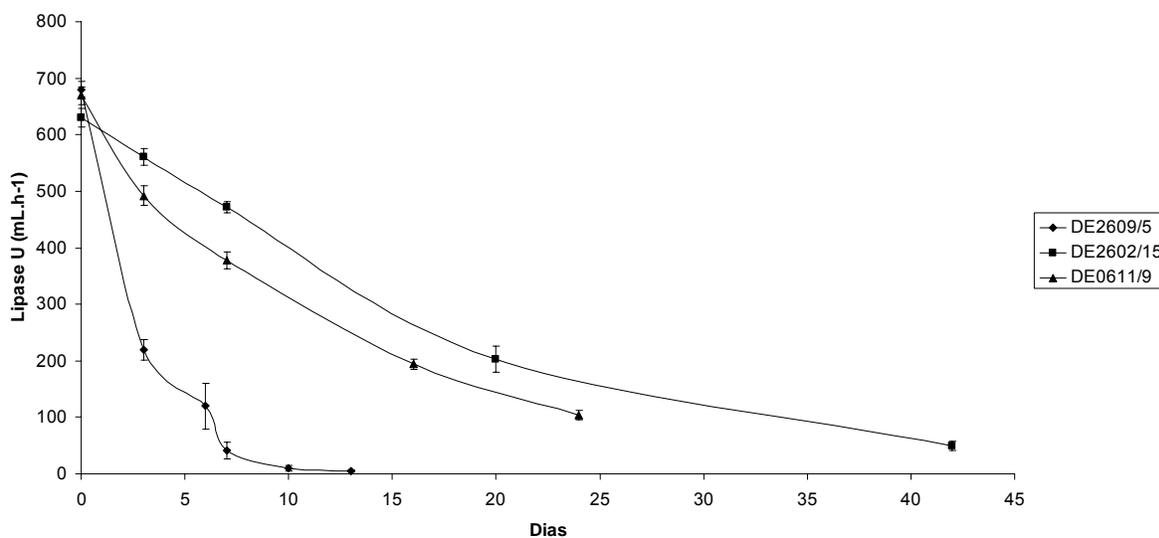


Figura 17: Perda da atividade de lipase em três formulações ao longo do tempo.

A formulação DE2609/5 apresentou a formação de um precipitado em dois dias. Já nas formulações DE0611/9 e DE2602/15 este precipitado foi observado após 5 e 8 dias, respectivamente. A formulação DE2602/15 foi a que apresentou maior estabilidade e por isso foi utilizada nos ensaios a campo, na Fazenda do Araçá. A formulação ainda precisa de ajustes para ser comercializada, mas para os ensaios a campo adicionou-se as enzimas e o detergente, separadamente, no tanque de mistura.

Tabela 9: Composição das formulações realizadas.

Componentes (%)	DE1505/1	DE1505/2	DE1505/3	DE1909/4	DE2209/5	DE2609/5	DE3110/6	DE0111/7	DE0111/8	DE0611/9
Água	42,95	44,85	43,85	34	44	41	41,5	41	45,5	41,5
Tampão Citrato-Fosfato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tampão Citrato	-	-	1	-	-	3	3	3	3	3
Tampão Acetato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tampão Citrato-Acetato	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Isopropanol	10	10	10	20	10	10	10	10	8	10
Butilenoglicol	10	10	10	20	20	20	-	-	-	-
Propilenoglicol	-	-	-	-	-	-	15	15	13	20
Glicerol	10	10	10	15	15	15	20	20	20	15
Tens. baixa espuma (Alkomol)	7	7	7	1	1	1	0,5	1	0,5	0,5
Renex 60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Renex 95	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Antiespumante	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido fosfônico	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1-Metoxi 2-Propanol (Dowanol)	8	8	8	-	-	-	-	-	-	-
Tripollifosfato de Na	-	0,1	0,1	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Bórico	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cloreto de Cálcio	0,05	0,05	0,05	-	-	-	-	-	-	-
Protease	5	5	-	5	5	5	5	5	5	5
Lípase	5	5	-	5	5	5	5	5	5	5

Tabela 9: Composição das formulações realizadas.

Componentes (%)	DE0611/10	DE1501/11	DE1501/12	DE1501/13	DE2301/14	DE2602/15	DE2602/16	DE2802/17	DE2802/18
Água	39,79	39,79	39,79	42,79	37,54	37,8	37,74	37,59	37,79
Tampão Citrato-Fosfato	-	3	-	-	-	-	-	-	-
Tampão Citrato	3	-	-	-	5	5	5	5	-
Tampão Acetato	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Tampão Citrato-Acetato	-	-	3	-	-	-	-	-	-
Isopropanol	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Butilenoglicol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Propilenoglicol	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Glicerol	15	15	15	15	15	15	15	15	15
Tens. baixa espuma (Alkomol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Renex 60	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Renex 95	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Antiespumante	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
1-Metoxi 2-Propanol (Dowanol)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido fosfônico	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tripollifosfato de Na	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Bórico (sol. 1M)	-	-	-	-	0,25	-	-	-	-
Cloreto de Cálcio	-	-	-	-	-	-	0,05	0,2	-
Protease	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Lipase	5	5	5	5	5	5	5	5	5

5.8 Ensaio de Utilização do Detergente Enzimático a Campo

A Fazenda do Araçá, onde foram realizados os ensaios de eficácia do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, localiza-se na Rua Carlindo de Souza Gomes, nº 3100, Estância Grande, Viamão. A fazenda explora leite desde 1970, mas o grande salto de qualidade e produtividade foi dado a partir de 2003, após a parceria feita com a empresa Sulinox Ordenhadeiras, para aquisição de equipamentos e desenvolvimento de um centro de treinamento.

A fazenda possui um equipamento de ordenha com leite canalizado e bombeamento automático, com capacidade para ordenhar 50 vacas por hora, sendo realizadas duas ordenhas por dia. O equipamento possui oito conjuntos de ordenha, e o resfriador, de expansão direta, tem capacidade para armazenar 3000 litros.

A Fazenda do Araçá possui 100 hectares e 120 vacas da raça Holandesa, sendo 45 em lactação, que produzem 850 litros de leite por dia, média de 19 litros por vaca.

5.8.1 Tempo de limpeza do equipamento

A Tabela 10 mostra os tempos de cada etapa de limpeza do equipamento de ordenha utilizando os dois sistemas, na Fazenda do Araçá.

Tabela 10: Tempo de cada etapa de limpeza do equipamento utilizando o Sistema Tradicional de limpeza de ordenhadeiras e o Detergente Enzimático.

Sistema Tradicional		Detergente Enzimático	
Etapa	Tempo (min)	Etapa	Tempo (min)
Pré-enxágüe	5	Pré-enxágüe	5
Detergente alcalino	10	Detergente Enzimático	10
Enxágüe	5	Sanitização	5
Detergente ácido	10		
Sanitização	5		

O tempo total de limpeza do equipamento de ordenha utilizando o sistema tradicional é de 35 minutos por ordenha, sendo que a sanitização é realizada antes da próxima ordenha. No caso da higienização com o detergente enzimático, o tempo total de limpeza é de 20 minutos, o que representa uma redução de 15 minutos, equivalente a 42,8%.

Uma economia no tempo utilizado para a limpeza do equipamento de ordenha pode ser aproveitada para a realização de outras tarefas, na própria sala de ordenha ou mesmo no manejo do rebanho, gerando economia de mão-de-obra.

Após a realização da limpeza do equipamento, o operador ainda realiza a limpeza da parte externa de cada conjunto de ordenha. Esta limpeza é manual e feita com esponja, água e sabão. Além disso, o chão da sala de ordenha também deve ser limpo, no entanto, esta limpeza é realizada com jato de água proveniente da higienização do equipamento de ordenha após cada etapa, e, portanto, realizada simultaneamente. Outra tarefa que demanda mão-de-obra logo após a ordenha é a alimentação das vacas com ração, e das bezerras com o leite ordenhado.

5.8.2 Consumo de água

Uma das condições mais importantes para a limpeza dos equipamentos de ordenha é a abundância de água. É recomendado que se tenha à disposição cerca de 100 litros de água por animal a ser ordenhado e 6 litros de água por litro de leite a ser produzido (IN51, 2002).

É imperativo que a água utilizada para a limpeza dos equipamentos apresente padrão de qualidades físico-químicas e microbiológicas. Em relação às qualidades físicas e químicas, uma das características mais importantes é a determinação da dureza da água, já em relação à qualidade microbiológica, é recomendada sua avaliação duas vezes por ano (KLEIN, 2006).

A água utilizada para consumo e limpeza, na Fazenda do Araçá, é proveniente de poço artesiano, e sua dureza foi determinada através de um kit de determinação de dureza Macherey-Nagel[®]. A água da fazenda apresentou 36 mg/L de CaCO₃, sendo considerada uma água mole.

A Tabela 11 mostra o volume de água utilizado para a limpeza do equipamento de ordenha utilizando os dois sistemas, na Fazenda do Araçá.

Tabela 11: Volume de água utilizado em cada etapa de limpeza do equipamento utilizando o Sistema Tradicional de limpeza de ordenhadeiras e o Detergente Enzimático.

Sistema Tradicional		Detergente Enzimático	
Etapa	Vol. Água (L)	Etapa	Vol. Água (L)
Pré-enxágüe	100	Pré-enxágüe	100
Detergente alcalino	50	Detergente Enzimático	50
Enxágüe	100	Sanitização	50
Detergente ácido	50		
Sanitização	50		

Na Fazenda do Araçá utiliza-se, em média, 2000 litros de água por dia para a limpeza da sala de ordenha, sendo que a limpeza do equipamento de ordenha corresponde a 35% deste total. O restante da água é utilizada para a limpeza das paredes, do chão, da parte externa do equipamento de ordenha, do tanque de refrigeração, das mãos dos operadores e do úbere das vacas.

O volume total de água utilizado para a limpeza do equipamento de ordenha, utilizando-se o sistema tradicional é de 350 litros por ordenha. Como são feitas duas ordenhas diárias, o volume de água utilizado para a limpeza da ordenhadeira é de 700 litros por dia. Já para a limpeza do equipamento utilizando o detergente enzimático são necessários 200 litros de água por ordenha, e 400 litros diários. A economia de água, pela utilização de detergente enzimático é de 300 litros por dia, ou 42,8%.

5.8.3 Consumo de energia elétrica

A energia elétrica é utilizada na sala de ordenha para o aquecimento das soluções de limpeza, acionamento do equipamento de ordenha, resfriamento do leite ordenhado e iluminação da sala.

A Tabela 12 mostra a temperatura de cada uma das soluções de limpeza do equipamento de ordenha utilizando-se os dois sistemas, na Fazenda do Araçá.

Tabela 12: Temperatura das soluções em cada etapa de limpeza do equipamento utilizando o Sistema Tradicional de limpeza de ordenhadeiras e o Detergente Enzimático.

Sistema Tradicional		Detergente Enzimático	
Etapa	Temp. (°C)	Etapa	Temp. (°C)
Pré-enxágüe	40	Pré-enxágüe	40
Detergente alcalino	70-75	Detergente Enzimático	35-40
Enxágüe	Temp. ambiente	Sanitização	Temp. ambiente
Detergente ácido	40-45		
Sanitização	Temp. ambiente		

O cálculo do consumo de energia elétrica para o aquecimento das soluções de limpeza foi feita pela multiplicação do tempo de aquecimento pela potência da resistência elétrica do tanque de aquecimento de água.

O tanque de aquecimento de água possui uma resistência elétrica de 5000 W, que leva, em média, 2 horas para aquecer 100 litros de água à temperatura ambiente até 75° C. A partir destes valores foram feitos os cálculos do consumo de energia elétrica para o aquecimento das soluções de limpeza nas temperaturas mostradas na Tabela 12. A temperatura média da água no ambiente foi considerada 20° C.

Então, para o aquecimento de 50 litros de água até 75° C, para o detergente alcalino, é necessário uma hora, e para o aquecimento de 50 litros de água até 45° C, para o detergente ácido, são necessários 25 minutos. Já para o aquecimento de 100 litros de água para o pré-enxágüe, até 40° C, são necessários 45 minutos. Considerando a potência da resistência elétrica de 5000 W, são necessários 10,85 kWh por ordenha, no sistema tradicional.

Utilizando o detergente enzimático, para o aquecimento de 100 litros de água do pré-enxágüe, até 40° C, são necessários 45 minutos, e para o aquecimento de 50 litros de água, para o detergente enzimático, até 40° C, são necessários 22,5

minutos. Considerando a potência da resistência elétrica de 5000 W, são necessários 5,62 kWh por ordenha.

A economia de energia elétrica é de 48%, e representa R\$ 60,56 por mês, considerando o valor de R\$ 0,193/kWh, na zona rural (CEEE, 2007).

5.8.4 Impacto Ambiental

A utilização do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras gera ainda um menor impacto ambiental, pois as enzimas, que são os princípios ativos, são biodegradáveis. Já a utilização dos detergentes tradicionais e sua disposição, sem tratamento, podem provocar danos ambientais, uma vez que são constituídos de ácidos e bases fortes, com pHs extremos. Após a diluição de uso (0,5 – 1,0%), o pH do detergente alcalino é de aproximadamente 12, e o pH do detergente ácido é de aproximadamente 2,0.

Considerando a diluição de 1%, uma propriedade leiteira do porte da Fazenda do Araçá, lança cerca de 730 litros destes detergentes no ambiente todos os anos.

Esta situação é particularmente preocupante pelo fato de grande parte dos produtores não realizarem nenhum tipo de tratamento do efluente gerado em suas propriedades.

5.8.5 Desgaste dos Insufladores

Os insufladores, depois de certo período de uso, entram em colapso, perdem flexibilidade e não funcionam mais satisfatoriamente, sendo que a borracha pode apresentar rachaduras (KLEIN, 2006). Recomenda-se a troca dos insufladores a cada seis meses ou 2500 ordenhas (CBQL, 2002; KLEIN, 2006; TAVERNA, 2006).

Para comparação do desgaste dos insufladores com o detergente enzimático e com os detergentes utilizados no sistema tradicional de limpeza de ordenhadeiras, foram realizados ensaios de degradação acelerada. A avaliação do desgaste dos insufladores foi verificada através de microscopia eletrônica.

Para a avaliação do detergente enzimático, os insufladores permaneceram imersos no produto, na diluição de uso, em pH 5,0, por 60 horas, à 40° C. Já para a avaliação dos produtos utilizados no sistema tradicional de limpeza de ordenhadeiras, os insufladores permaneceram no detergente alcalino, na diluição de uso, em pH 11, por 60 horas, à 75° C. Após este período, as peças foram imersas no detergente ácido, na diluição de uso, em pH 2, por 60 horas, à 45° C.

O tempo de imersão das peças nos produtos foi calculado considerando que o tempo de contato dos insufladores com os detergentes é de 10 minutos por ordenha e são realizadas duas ordenhas por dia. Então, 20 minutos por dia, vezes 180 dias, em seis meses, é igual a 60 horas.

As fotos dos insufladores provenientes destes ensaios foram comparados com as fotos dos insufladores novos e após seis meses de uso na Fazenda do Araçá, com o sistema tradicional de limpeza de ordenhadeiras, e são mostradas na Figura 18.

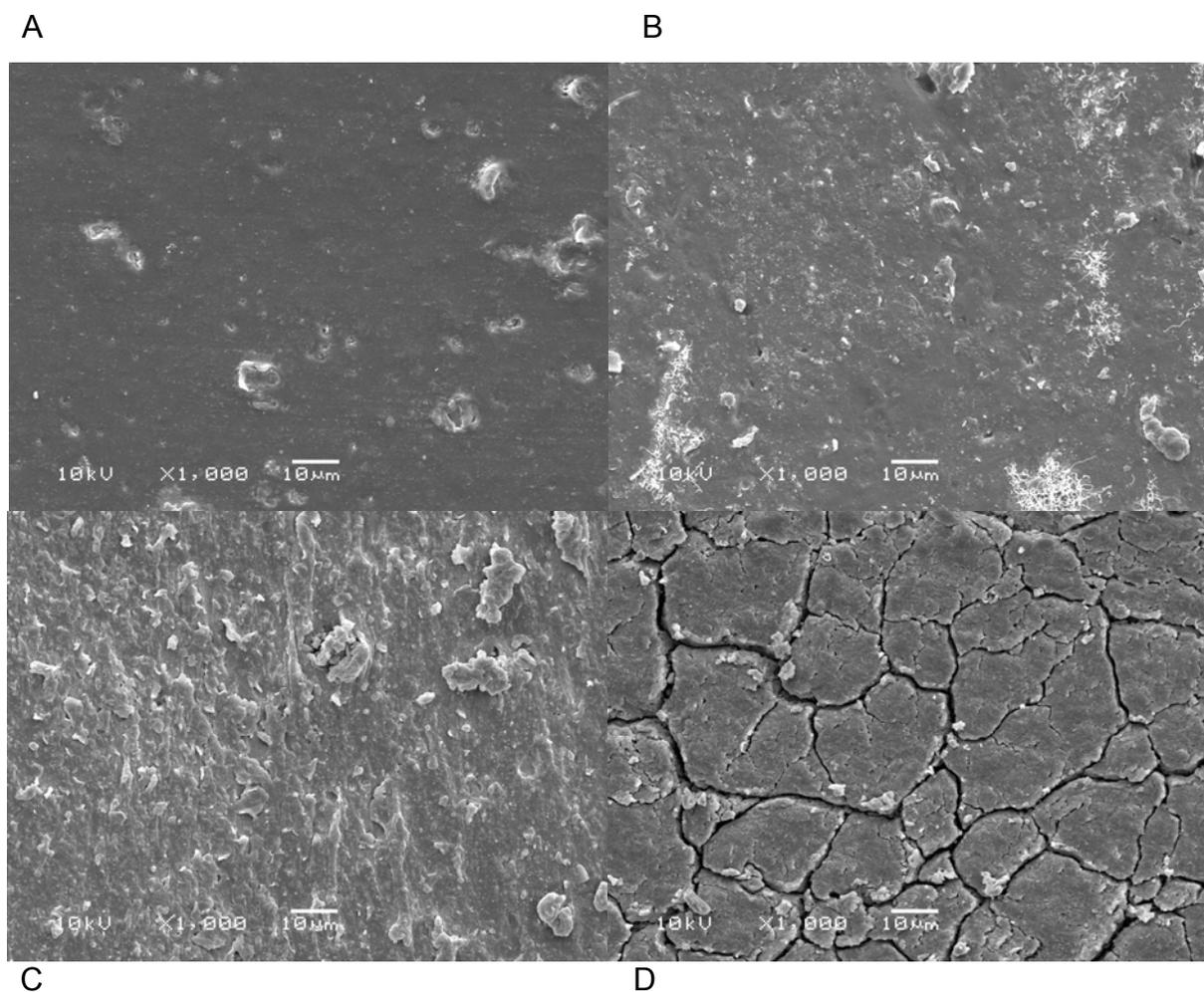


Figura 18: Microscopia eletrônica de varredura dos insufladores: A. insuflador novo. B. insuflador do ensaio acelerado de degradação com detergente enzimático. C. insuflador do ensaio acelerado de degradação com detergentes tradicionais. D. insuflador utilizado por seis meses na Fazenda do Araçá.

Ficou evidenciado, pela análise por microscopia eletrônica, que o insuflador do ensaio acelerado que ficou imerso no detergente enzimático apresentou um menor desgaste da borracha, se comparado com o insuflador que ficou imerso nos detergentes utilizados no sistema tradicional de limpeza de ordenhadeiras, em relação ao insuflador novo. No entanto, o ensaio acelerado não reproduziu as condições encontradas no equipamento de ordenha, uma vez que o insuflador que foi utilizado por seis meses na Fazenda do Araçá apresentou maior desgaste. Possivelmente os

movimentos provocados pelo pulsador, que alterna as fases de sucção (vácuo) e massagem (pressão atmosférica), realizadas pelo insuflador no equipamento de ordenha também influenciam o desgaste das peças. As fases de pulsação são mostradas na Figura 19.

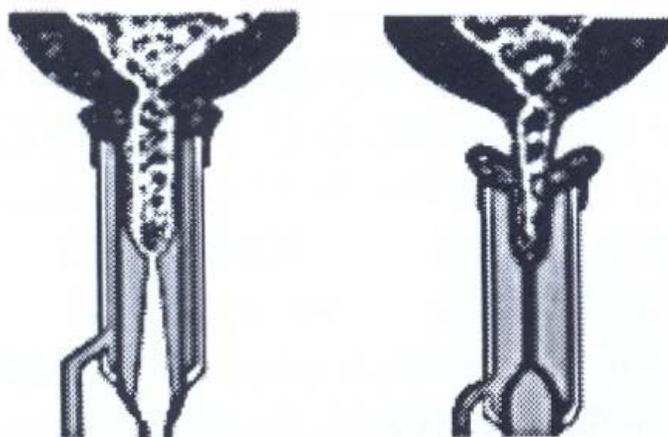


Figura 19: Fase de sucção (esquerda) e massagem (direita) dos insufladores no equipamento de ordenha. (Fonte: Klein, 2005).

Conforme mostra a imagem do insuflador após seis meses de uso na fazenda, existem rachaduras na peça que facilitam a incrustação de resíduos e favorecem a formação de biofilmes, sendo necessária a substituição destas peças.

Apesar de não reproduzir as condições encontradas no equipamento de ordenha, os resultados do ensaio acelerado mostraram que condições mais amenas de temperatura e pH preservam a integridade das peças da ordenhadeira.

5.9 Análise de Viabilidade Econômica de Produção do Detergente Enzimático Ácido para Limpeza de Ordenhadeiras

O primeiro cenário considerado, para análise de viabilidade econômica de produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, foi de produção das enzimas em reator de 1000 litros. No entanto, com as atividades

enzimáticas obtidas experimentalmente e a capacidade produtiva de 5 bioprocessos de produção de lipase e 3 bioprocessos de produção de protease por mês, considerando 4 colaboradores como mão-de-obra direta, seria possível produzir apenas 240 litros do detergente por mês. Por isso, em um primeiro momento, considerou-se um cenário em que a empresa realizaria apenas a mistura dos componentes da formulação, realizando, portanto, a compra das enzimas.

5.9.1 Análise de Viabilidade Econômica de Produção do Detergente Enzimático Ácido para Limpeza de Ordenhadeiras Considerando a Compra das Enzimas

Considerando a compra das enzimas para a fabricação do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, o investimento inicial é de aproximadamente R\$ 300.000,00, conforme mostra a Tabela 13. Não foi considerado investimento em obras civis, pois a empresa BioPlus pretende alugar um pavilhão industrial em um distrito industrial da região metropolitana de Porto Alegre.

A capacidade de produção do detergente, com dois colaboradores trabalhando diretamente no processo produtivo, e com os equipamentos descritos na Tabela 13, é de 20.000 litros por mês, suficiente para atender à previsão de vendas do produto, de 12.000 litros por mês, a partir do quarto ano.

Os custos com depreciação, manutenção e seguros estão mostrados na tabela 15, e os custos tributários foram considerados já pelo novo simples, em vigor desde julho de 2007, e que considera também o valor do ICMS, conforme a Tabela 16. Na Tabela 16 também estão os custos com comissões, inadimplência e despesas com vendas.

As simulações realizadas para a análise econômica foram comparadas com o padrão ouro, que mostra uma previsão de vendas de 12.000 litros do detergente, no quinto ano, que representa 4% do mercado da região Sul do Brasil, segundo pesquisa realizada pela empresa BioPlus – Desenvolvimento Biotecnológico LTDA. Considerou-se um aumento gradativo nas vendas, partindo-se de 4.000 litros por mês no primeiro ano, 8.000 litros por mês no segundo ano, 10.000 litros por mês no terceiro ano, e

atingindo 12.000 litros por mês a partir do quarto ano. A previsão de vendas para um período de cinco anos é mostrada no Tabela 17.

O preço de venda do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, para a análise de viabilidade econômica, no padrão ouro, foi considerado R\$ 16,60/litro. Este valor representa a soma dos valores dos dois detergentes tradicionais, mais 10%, conforme cotação de julho de 2007, da empresa LM Química, de Alvorada, RS. No entanto, segundo Klein (2006), a soma dos dois detergentes pode chegar a R\$ 17,20, no estado.

Os custos fixos mensais, para cinco anos, são mostrados na tabela 18, e os custos de matéria-prima e embalagem para produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a compra das enzimas, é de R\$ 8,95/Kg, conforme mostra a Tabela 19.

A Tabela 20 mostra a necessidade de capital de giro do projeto, que é de R\$ 68.142,00, e a Tabela 21 mostra a formação do preço de venda sugerido. Considerando o volume de vendas de 12.000 litros do detergente por mês, em cinco anos, a margem de lucro é de 12,8%.

Tabela 14: Mão-de-obra para produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a compra das enzimas.

MÃO DE OBRA MENSAL			
Mão-de-obra Indireta			
Função	Qt.	Salário	Total
Auxiliar administrativo	1	800,00	800,00
Auxiliar limpeza	1	400,00	400,00
Responsável técnico	1	3.000,00	3.000,00
			-
Soma			4.200,00
Encargos sociais		80%	3.360,00
Sub-total 1			7.560,00
Pró-labore	1	1.000,00	1.000,00
Encargos sociais		20%	500,00
Sub-total 2			3.000,00
Total			10.560,00
Mão-de-obra Direta			
Função	Qt.	Salário	Total
Auxiliar operacional	1	350,00	350,00
Técnico	1	800,00	800,00
			-
Sub-Total			1.150,00
Encargos sociais		80%	920,00
Total			2.070,00

Valores em R\$

Tabela 15: Custos com depreciação, manutenção e seguros para a produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a compra das enzimas.

Depreciação, Manutenção e seguros							
Taxas anuais							
Discriminação	Invest. Fixo	Depreciação		Manutenção		Seguro	
		Taxa	Valor	Taxa	Valor	Taxa	Valor
Veículos	32.000	20%	6.400,00	1,0%	320,00	10,0%	3.200
Máq./Equip.	58.400	10%	5.840,00	1,5%	876,00	1,0%	584
Móveis/Utensílios	16.500	10%	1.650,00	0,2%	33,00	0,2%	33
P&D	120.000	10%	12.000				
Instalações	7.000	10%	700,00	1,5%	105,00	1,0%	70
Total anual	113.900		14.590,00		1.334,00		3.887
Total mensal	9.491,67		1.215,83		111,17		323,92

Valores em R\$

Tabela 16: Impostos, comissões e perdas para produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a compra das enzimas.

Impostos, Comissões e Perdas					
	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5
Impostos	%	%	%	%	%
Pis					
Cofins					
Simples	8,86%	10,73%	11,82%	12,11%	12,11%
ICMS	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
ISSQN					
IRPJ - Presumido					
CSSLL - Presumido					
Comissões	10,00%	10,00%	10,00%	10,00%	10,00%
Perda/Inadimplência	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%	1,00%
Despesas com vendas	5,00%	5,00%	5,00%	5,00%	5,00%
Total	24,86%	26,73%	27,82%	28,11%	28,11%

Tabela 17: Previsão de vendas do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras para cinco anos.

PREVISÃO DE VENDAS						
VENDAS	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Ano 5	Total
Detergente enzimático						
Quantidade (Litros)	48.000	96.000	120.000	144.000	144.000	720.000
Preço de venda R\$	16,60	16,60	16,60	16,60	16,60	16,60
Total R\$	796.800,00	1.593.600,00	1.992.000,00	2.390.400,00	2.390.400,00	11.952.000,00
CUSTO MATERIA PRIMA						
Detergente enzimático						
Quantidade (L)	48.000	96.000	120.000	144.000	144.000	720.000
Custo matéria-prima (L)	8,94812	8,94812	8,94812	8,94812	8,94812	8,94812
Total R\$	429.509,76	859.019,52	1.073.774,40	1.288.529,28	1.288.529,28	6.442.646,40

Tabela 18: Custos fixos mensais para produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a compra das enzimas.

Custos Fixos Mensais					
	Ano 1 (mês)	Ano 2 (mês)	Ano 3 (mês)	Ano 4 (mês)	Ano 5 (mês)
Custos Fixos	13.740,92	14.340,92	14.940,92	15.540,92	16.140,92
Pró-labore	1.000,00	1.500,00	2.000,00	2.500,00	3.000,00
INSS s/ pró-labore	200,00	300,00	400,00	500,00	600,00
Salários	4.200,00	4.200,00	4.200,00	4.200,00	4.200,00
Encargos	3.360,00	3.360,00	3.360,00	3.360,00	3.360,00
Aluguel/Condomínio	1.200,00	1.200,00	1.200,00	1.200,00	1.200,00
Contador	500,00	500,00	500,00	500,00	500,00
Telefone	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00
Seguros	323,92	323,92	323,92	323,92	323,92
Material expediente	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Material de limpeza	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Sistema informática	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
IPVA	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00
Água	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Manutenção	111,17	111,17	111,17	111,17	111,17
Segurança	1.000,00	1.000,00	1.000,00	1.000,00	1.000,00
Depreciação	2.215,83	2.215,83	2.215,83	2.215,83	2.215,83
Despesas bancárias	120,00	120,00	120,00	120,00	120,00
Outros	-	-	-	-	-

Valores em R\$

Tabela 19: Custos variáveis de produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a compra das enzimas.

Custo matéria -prima e embalagem			
Componentes	Concentração	Custo/Kg MP	Custo/Kg Det.
Glicerol	15%	R\$ 2,25	R\$ 0,34
Isopropanol	10%	R\$ 3,30	R\$ 0,33
Propilenoglicol	20%	R\$ 5,90	R\$ 1,18
Solução tampão 1M	5%	R\$ 6,00	R\$ 0,30
Tensoativo	2%	R\$ 20,00	R\$ 0,40
Antiespumante	0,01%	R\$ 6,20	R\$ 0,0006
Protease	5%	R\$ 55,00	R\$ 2,75
Lipase	5%	R\$ 62,00	R\$ 3,10
Rótulo		R\$ 0,25	R\$ 0,05
Embalagem		R\$ 2,50	R\$ 0,50
		Total	R\$ 8,95

Tabela 20: Necessidade de capital de giro para a produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a compra das enzimas.

Capital de Giro				
ITEM		Valores Anuais (base DRE)	Valores Dia	
Vendas		796.800	2.213	
Fornecedores (mat-prima)		429.510	1.193	
Impostos		70.596	196	
Mobra		24.840	69	
Cfixo		176.891	491	
Composição Capital de giro	Dias previstos de necessidade	Relação	Necessidade dia	Investimento em Capital de Giro
Caixa operacional	2	faturamento	2.213	4.427
Contas a receber	30	faturamento	2.213	66.400
Estoque prod acabados	10	mp+ mo + cf	1.720	17.201
Estoque prod em processo	10		1.720	17.201
Total a ser financiado pela empresa				105.896
Fornecedores	30	mat prima	1.193	(35.792)
Impostos	10	impostos	196	(1.961)
Total financiamento recebido pela empresa				(37.753)
Necessidade de capital de giro estimada (financiamento concedido menos financiamento recebido pela empresa)				68.142

Valores em R\$

Tabela 21: Cálculo do preço de venda sugerido para análise de viabilidade econômica do detergente enzimático ácido para limpeza considerando a compra das enzimas.

CÁLCULO DO PREÇO DE VENDA SUGERIDO		
	Pvenda =	$\frac{\text{Cust Var Unit}}{1 - (\text{CC}\% + \text{ML}\% + \text{CF}\%)}$
Preço de venda de análise		16,60
		Detergente
Preço de Venda Sugerido		16,6011
Pvanálise / pvsugerido		100,0%
Custo Variável unitário		9,1206200
Matéria-prima		8,9481200
Mão-de-obra direta		0,1725000
Custos de Comercialização		24,86%
Margem de Lucro		12,80%
Custos fixos em %		7,40%
Total		45,06%
1 - total		54,94%
Custos Fixos		14.740,92
Previsão de receita Cap Plena		199.200,00
Custos fixos em %		7%

Valores em R\$

A partir dos dados relacionados nas tabelas acima, calculou-se a planilha de demonstrativo de resultados, mostrada na Tabela 22 na qual se pode observar que os custos variáveis variam de 80,88%, no primeiro ano até 82,05%, no quinto ano. Estes custos estão divididos em impostos, que apresentam variação de 8,86 a 12,11%, do primeiro ao quinto ano, devido ao aumento do faturamento considerado, e conseqüente mudança de alíquota na tabela do simples. Os custos com matéria-prima representam 53,9% e os custos com comissões e despesas de comercialização, foram considerados constantes, e representam 10 e 5%, respectivamente. Já os custos com mão-de-obra direta variam de 3,12 a 1,04% do primeiro ao quinto ano.

Para ser calculado fluxo de caixa anual, foi considerado que o custo do capital foi de 25% ao ano, dividido em 10% ao ano de custo de oportunidade e 15% ao ano de risco. Desta forma, considerando o preço e volume de vendas do padrão ouro, o retorno do investimento descontado (“payback descontado”) ocorreria em 4,1 anos. Com este custo de capital e um período de cinco anos, a taxa interna de retorno (TIR) foi de 35,11%, com um valor atual líquido (VAL) de R\$ 95.508,00, conforme a Tabela 23. Esta análise foi feita considerando um período de cinco anos. No entanto, se considerarmos a perpetuidade do projeto, ou seja, trazer os fluxos dos resultados futuros para o valor presente e considerá-los no ano cinco, os indicadores melhoram consideravelmente. O valor residual é de 892.724,00, a TIR é de 53,21%, e o VAL é de 387.878,00.

A partir do padrão ouro foram feitas simulações de possíveis cenários, para avaliação da sensibilidade do projeto. Foram avaliados o impacto da diminuição do preço de venda (simulação 1), diminuição do volume de vendas (simulação 2), aumento do custo das enzimas (simulação 3) e aumentos dos custos fixos (simulação 4).

Tabela 22: Demonstrativo de resultados da produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a compra das enzimas.

Demonstrativo de resultados										
	DRE Ano 1		DRE Ano 2		DRE ano 3		DRE ano 4		DRE ano 5	
	TOTAL	%								
Receita	796.800,00	100%	1.593.600,00	100%	1.992.000,00	100,00%	2.390.400,00	100,00%	2.390.400,00	100,00%
Custos variáveis	644.466,24	80,88%	1.293.892,91	81,19%	1.632.868,91	81,97%	1.961.406,93	82,05%	1.961.407,15	82,05%
Impostos	70.596,48	8,86%	170.993,39	10,73%	235.454,51	11,82%	289.477,65	12,11%	289.477,87	12,11%
Pis/Cofins	0,00	0,00%	0,11	0,00%	0,11	0,00%	0,21	0,00%	0,43	0,00%
Simples	70.596,48	8,86%	170.993,28	10,73%	235.454,40	11,82%	289.477,44	12,11%	289.477,44	12,11%
ICMS	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%
ISSQN	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%
IRPJ - Presumido	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%
CSSLL - Presumido	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%
Custo Matéria Prima	429.509,76	53,90%	859.019,52	53,90%	1.073.774,40	53,90%	1.288.529,28	53,90%	1.288.529,28	53,90%
Comissões	79.680,00	10,00%	159.360,00	10,00%	199.200,00	10,00%	239.040,00	10,00%	239.040,00	10,00%
Energia e Água	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%
Mobra Direta	24.840,00	3,12%	24.840,00	1,56%	24.840,00	1,25%	24.840,00	1,04%	24.840,00	1,04%
Despesas com vendas	39.840,00	5,00%	79.680,00	5,00%	99.600,00	5,00%	119.520,00	5,00%	119.520,00	5,00%
Margem de Contribuição	152.333,76	19,12%	299.707,09	18,81%	359.131,09	18,03%	428.993,07	17,95%	428.992,85	17,95%
Custos Fixos	176.891,00	22,20%	184.091,00	11,55%	191.291,00	9,60%	198.491,00	8,30%	205.691,00	8,60%
Resultado Operacional	-24.557,24	-3,08%	115.616,09	7,26%	167.840,09	8,43%	230.502,07	9,64%	223.301,85	9,34%
Resultado Líquido	-24.557,24	-3,08%	115.616,09	7,26%	167.840,09	8,43%	230.502,07	9,64%	223.301,85	9,34%
Ponto de equilíbrio	925.249,59	0,00%	978.847,10	0,00%	1.061.037,82	0,00%	1.106.015,28	0,00%	1.146.135,11	0,00%
Rentabilidade	-8%		38%		55%		75%		73%	

Valores em R\$

Tabela 23: Fluxo de caixa para o cálculo da TIR, VAL e PAYBACK, em cinco anos, para a produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a compra das enzimas.

FLUXO DE CAIXA ANUAL PARA CÁLCULO DE VAL, TIR E PAY-BACK- PERÍODO: 5 ANOS							
		1	2	3	4	5	
	ANO 0	ANO I	ANO II	ANO III	ANO IV	ANO V	TOTAL
INVESTIMENTO	(237.900)						(237.900)
C. GIRO	(68.142)					68.142	-
LUCRO LÍQUIDO		(24.557)	115.616	167.840	230.502	223.302	772.702,86
DEPRECIAÇÃO		26.590	26.590	26.590	26.590	26.590	132.950
VALOR RESIDUAL						-	-
FLUXO DE CAIXA		2.033	142.206	194.430	257.092	318.034	913.795
FLUXO DE CAIXA LÍQUIDO	(306.042,77)	2.033	142.206	194.430	257.092	318.034	607.753
FLUXO DE CAIXA LÍQUIDO ACUMULADO	(306.042)	(304.009)	(161.803)	32.627	289.719	607.753	
PAYBACK SIMPLES		-	-	2,8	-	-	
FLUXO DE CAIXA DESCONTADO	(306.042)	1.626	90.992	99.516	105.259	104.157	95.508
FC DESCONTADO ACUMULADO	(306.042)	(304.416)	(213.424)	(113.908)	(8.649)	95.508	
PAYBACK DESCONTADO		-	-	-	-	4,1	
	Tx mês	Tx ano					
CUSTO DE OPORTUNIDADE	0,800%	10,0%					
RISCO	1,17%	15,0%					
CUSTO DE CAPITAL	1,97%	25,0%					
VPL	95.508						
Taxa interna de retorno	35,11%						

Valores em R\$

Tabela 24: Simulações de diminuição do preço de venda (1), diminuição do volume de vendas (2), aumento do custo das enzimas (3) e aumento dos custos fixos (4) para avaliação da sensibilidade do projeto do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a compra das enzimas.

	Padrão Ouro	Simulação			
		1	2	3	4
Variáveis					
Custo de Oport.	25,0%	25,0%	25,0%	25,0%	25,0%
Taxa de risco	15,0%	15,0%	15,0%	15,0%	15,0%
Custo de Capital	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%
Preço de venda	100%	95%	100%	100%	100%
Volume de vendas					
ano1	33%	33%	30%	70%	70%
ano2	67%	67%	60%	80%	80%
ano3	83%	83%	75%	90%	90%
ano4	100%	100%	90%	100%	100%
ano5	100%	100%	100%	100%	100%
Cst Enzimas	100%	100%	100%	105%	100%
Cst Fixo	100%	100%	100%	100%	110%
Resultados					
Pback desc (anos)	4,1	0	4,6	4,8	4,5
VAL (mil)	95.508	(62.299)	39.206	20.899	44.264
TIR	35%	17,8%	29%	27,3%	29,7%
Margem de lucro	12,8%	9,0%	12,8%	11,1%	12,1%

Conforme mostra a Tabela 24, uma pequena diminuição no preço de venda (5%) inviabiliza o projeto, considerando um período de cinco anos. Esta simulação mostra que o projeto é bastante sensível quanto ao preço do produto, devendo o empreendedor ficar atento para o caso de possíveis descontos. No entanto, a possibilidade de fornecer algum desconto para os clientes não está descartada, pois considerou-se, nos custos variáveis, uma provisão para inadimplência de 1%, e, se no decorrer do ano for constatado que esta estimativa foi superestimada, este valor estará disponível. Apesar de o projeto ser bastante sensível ao preço de venda, o produto

apresenta um diferencial bem definido no mercado, e é protegido por patente, o que dificulta a entrada de concorrentes e evita que a empresa sofra pressão por preços.

Apesar de o projeto ser inviabilizado, se for considerado uma diminuição de 5% no preço de venda, em um período de cinco anos, este se torna viável se considerarmos a perpetuidade do projeto. Para este caso, deve-se considerar, na análise do fluxo de caixa, o valor residual, que continua trazendo para valor presente os fluxos de caixa no decorrer dos anos, até o valor de convergência. Se o valor residual for considerado, o projeto, considerando uma diminuição no preço de venda de 5%, apresenta TIR de 35% e VAL de R\$ 118.981,00.

Na segunda simulação considerou-se uma diminuição de aproximadamente 10% nas vendas previstas em relação ao padrão ouro. Neste caso a TIR cai de 35 para 29%, mas o projeto continua sendo aprovado. A previsão de vendas, baseada em análise de mercado realizada pela empresa BioPlus, é bastante conservadora e possível de ser alcançada, porém deve se levar em consideração o comportamento de resistência à mudanças, principalmente no caso de produtores rurais.

Com relação ao aumento do custo das enzimas, que representam a maior parte dos custos das matérias-primas, o projeto se mostra bastante sensível. Um aumento de 5% no custo destas matérias-primas provoca uma redução na margem de lucro de 12,8 para 11,1%. O projeto continua sendo aprovado, mas a TIR cai para 27,3%.

Já com relação aos custos fixos, para a situação de produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras com a compra das enzimas, estes são relativamente baixos, uma vez que não são considerados os equipamentos necessários para a produção das enzimas. Com um aumento de 10% nos custos fixos o projeto continua sendo aprovado, com uma TIR de 29,7% e diminuição da margem de lucro para 12,1%.

5.9.2 Análise de Viabilidade Econômica de Produção do Detergente Enzimático Ácido para Limpeza de Ordenhadeiras Considerando a Produção das Enzimas

A partir da análise de viabilidade econômica de produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a compra das enzimas, pôde-se verificar que o volume de produção necessário para viabilidade do projeto é de 12.000 litros de detergente por mês, em cinco anos.

Para uma produção de 12.000 litros do produto terminado, são necessários 600 litros de cada uma das enzimas concentradas, por mês.

A produção de protease para formulação em detergentes foi otimizada pelo nosso grupo de pesquisa no trabalho de Mitidieri *et al.* (2003), no qual obteve-se 100 U/mL de protease de *Bacillus subtilis*, em reator de 400 litros. Já a atividade de lipase, produzida por *P. aurantiogriseum*, em reator de 100 litros, foi de 30 U/mL.

A partir destes dados verificou-se que a necessidade de aquisição de dois biorreatores de 30.000 litros de capacidade, a fim de atingir a produção necessária. Considerando estes equipamentos e cinco colaboradores, como mão-de-obra direta, a capacidade produtiva da empresa é de nove bioprocessos de produção de lipase e cinco bioprocessos de produção de protease por mês.

O custo com matéria-prima, energia elétrica e água, para produção de protease, em reator de 30 m³, é de R\$ 13,55/L, e o custo para produção de lipase é de R\$ 54,38/L. A mão-de-obra direta foi considerada na análise de produção do detergente enzimático. Os custos de produção das enzimas são mostrados, em detalhe, no ANEXO 2.

Para a produção das enzimas o investimento inicial é de aproximadamente R\$ 1.200.000,00, quatro vezes maior do que para a implementação do projeto sem a produção das enzimas.

A atividade enzimática da lipase é relativamente baixa, e um custo de produção de R\$ 54,38 inviabiliza o projeto, se o volume de vendas for mantido. No entanto, uma atividade 66% maior já viabiliza o projeto do detergente enzimático para limpeza de ordenhadeiras considerando o investimento para produção das enzimas.

Com uma produção de 50 U/mL de lipase no reator, o custo da enzima é de R\$ 32,63, e o investimento retorna em 4,9 anos (Payback descontado), com uma TIR de 25,72% e VAL de R\$ 22.286,00.

Este aumento na quantidade de lipase produzida pelo microrganismo pode ser alcançado através do crescimento do *P. aurantiogriseum* em batelada alimentada. Li *et al.* (2004) conseguiram um aumento de cinco vezes na quantidade de lipase produzida por *Acinetobacter radioresistens* utilizando estratégias de batelada alimentada.

Um aumento ainda maior na quantidade de lipase produzida por um microrganismo pode ser atingido através da clonagem e super-expressão dos genes responsáveis pela produção desta enzima em outros microrganismos. Abdell-Fattah & Gaballa (2006) conseguiram um aumento de 4,5 vezes na produção de lipase por *Geobacillus thermoleovorans*, já Fickers *et al* (2006) aumentaram a quantidade de lipase produzida por *Yarrowia lipolytica* em 35 vezes, e Ma *et al.* (2006) aumentaram em 100 vezes a quantidade de lipase produzida por *B. subtilis*, após a super-expressão.

A Tabela 25 mostra a diminuição do custo com matéria-prima, água e energia elétrica para produção de lipase com o aumento na atividade enzimática atingida no biorreator.

Tabela 25: diminuição do custo com matéria-prima, água e energia elétrica para produção de lipase com o aumento da atividade enzimático no reator de 30 m³.

Aumento da atividade de lipase	Custo (R\$)
1X	54,38
5X	10,88
10X	5,44
20X	2,72
30X	1,81

As enzimas são os componentes mais caros da formulação do detergente enzimático para limpeza de ordenhadeiras, impactando de forma considerável nos indicadores da viabilidade do projeto.

Não foi realizado nenhum experimento de batelada alimentada ou de superexpressão da lipase, mas, para análise de viabilidade econômica do detergente enzimático para limpeza de ordenhadeiras, com a produção das enzimas, considerou-se uma atividade de lipase cinco vezes maior, possível de ser alcançada pelas técnicas descritas acima. Considerou-se um investimento de R\$ 120.000,00 para pesquisas nesta área e a produção da enzima em reator de 30 m³.

Para a análise de viabilidade econômica do detergente enzimático com produção das enzimas e atividade de lipase cinco vezes maior, o investimento inicial é de aproximadamente R\$ 1.200.000,00, conforme mostra a Tabela 26.

Os custos com depreciação, manutenção e seguros estão mostrados na Tabela 27. Os custos tributários, despesas com vendas, inadimplência e custos com comissões são os mesmos da análise considerando a compra das enzimas, assim como a previsão de vendas, já mostrados nas tabelas 16 e 17, respectivamente. Manteve-se também o preço de venda do produto em R\$ 16,60.

Os custos fixos mensais, para cinco anos, são mostrados na Tabela 28, e os custos de matéria-prima e embalagem para produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a produção das enzimas, é de R\$ 4,32/Kg, conforme mostra a tabela 29, e são 52% menores do que no caso de compra das enzimas.

A Tabela 30 mostra a necessidade de capital de giro do projeto, que é de R\$ 80.041,00, e a Tabela 31 mostra a formação do preço de venda sugerido. Considerando o volume de vendas de 12.000 litros do detergente por mês, em cinco anos, a margem de lucro é de 36,4%, 2,8 vezes maior que a margem de lucro considerando a compra das enzimas, que é de 12,8%.

A partir dos dados relacionados nas tabelas acima, calculou-se a planilha de demonstrativo de resultados, mostrada na Tabela 32, na qual se pode observar que os custos variáveis representam 55,53%, no quinto ano. Estes custos estão divididos em impostos, que representam 12,11%, no quinto ano, matéria-prima, que representa

26,02%, custos com comissões e despesas de comercialização, que foram considerados constantes, e representam 10 e 5%, respectivamente, e custos com mão-de-obra direta que representam 2,4%, no quinto ano. Observa-se que os custos variáveis diminuem consideravelmente com a produção das enzimas se comparados com a produção do detergente enzimático com a compra das enzimas.

Tabela 26: Investimento inicial para análise de viabilidade econômica do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a produção das enzimas.

INVESTIMENTO INICIAL			
Máquinas/equipamentos	R\$	Móveis/utensílios	R\$
Capela Fluxo Laminar	R\$ 15.000,00	Mesas	3.000,00
Geladeira	R\$ 2.000,00	Cadeiras	2.500,00
Vórtice	R\$ 1.800,00	Armários	3.000,00
pHmetro	R\$ 1.000,00	Bancadas	8.000,00
Banho d'água	R\$ 1.200,00		
Condutivímetro	R\$ 1.400,00		
Sistema de purif. de água	R\$ 5.000,00		
Destilador	R\$ 1.000,00		
Estufa bacteriológica	R\$ 1.500,00		
Estufa de secagem	R\$ 2.000,00		
Agitador orbital	R\$ 6.000,00		
Microondas	R\$ 1.000,00		
Microscópio	R\$ 5.000,00		
Bioreator de 10 litros	R\$ 11.000,00		
Centrífuga de bancada	R\$ 6.000,00		
Balança analítica	R\$ 5.000,00		
Bioreator de 100 litros	R\$ 26.000,00		
Bioreator de 1000 litros	R\$ 35.000,00		
Biorreator de 30000 litros	R\$ 120.000,00		
Centrífuga contínua	R\$ 180.000,00		
Caldeira	R\$ 25.000,00		
Torre de resfriamento de água	R\$ 3.000,00		
Tanque de mist. de 1000 litros	R\$ 8.000,00		
Sist. de concentr. de enzimas	R\$ 32.000,00		
Envasadora de líquidos	R\$ 15.000,00		
Compressor de ar	R\$ 10.000,00		
Sub-total	519.900,00	Sub-total	16.500,00

Veículos	R\$	Membr. de filtração	R\$
Veículo 1.0	32.000,00	Membr. de filtração	300.000,00
Sub-total	32.000,00	Sub-total	300.000,00

Instalações	R\$	Treinamento	R\$
Elétrica	5.000,00	Treinem. em BPF	2.000,00
Ar comprimido	3.000,00	Treinem. utiliz. equip.	2.000,00
Vapor	5.000,00		
Hidráulica	2.000,00		
Sub-total	15.000,00	Sub-total	4.000,00

Outros	R\$	INVESTIMENTO INICIAL	
Pesquisa e Desenvolvimento	240.000,00	USOS (Invest. fixo)	R\$
		Máquinas/equip.	519.900,00
		Móveis/utensílios	16.500,00
		Veículos	32.000,00
		Membr. de filtração	300.000,00
		Instalações	15.000,00
		Treinamentos	4.000,00
		Outros	240.000,00
		Sub-total (Invest. fixo)	1.127.400,00
		Capital de giro (Invest. financeiro)	74.280,52
		Total	1.201.680,52
Sub-total	240.000,00		-

Tabela 27: Custos com depreciação, manutenção e seguros para análise de viabilidade econômica do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a produção das enzimas.

Depreciação, Manutenção e seguros							
Taxas anuais							
Discriminação	Investimento Fixo	Depreciação Taxa	Depreciação Valor	Manutenção Taxa	Manutenção Valor	Seguro Taxa	Seguro Valor
Veículos	32.000,00	20%	6.400,00	1,0%	320,00	10,0%	3.200,00
Máq./Equip.	519.900,00	10%	51.990,00	1,5%	7.798,50	1,0%	5.199,00
Móveis/Utensílios	16.500,00	10%	1.650,00	0,2%	33,00	0,2%	33,00
P&D	240.000	10%	24.000				
Instalações	15.000,00	10%	1.500,00	1,5%	225,00	1,0%	150,00
Total anual	583.400,00		61.540,00		8.376,50		8.582,00
Total mensal	48.616,67		5.128,33		698,04		715,17

Valores em R\$

Tabela 28: Custos fixos mensais para análise de viabilidade econômica do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a produção das enzimas.

Custos Fixos Mensais					
	Ano 1 (mês)	Ano 2 (mês)	Ano 3 (mês)	Ano 4 (mês)	Ano 5 (mês)
Custos Fixos	20.631,54	21.231,54	21.831,54	22.431,54	23.031,54
Pró-labore	1.000,00	1.500,00	2.000,00	2.500,00	3.000,00
INSS s/ pró-labore	200,00	300,00	400,00	500,00	600,00
Salários	4.200,00	4.200,00	4.200,00	4.200,00	4.200,00
Encargos	3.360,00	3.360,00	3.360,00	3.360,00	3.360,00
Aluguel/Condomínio	1.200,00	1.200,00	1.200,00	1.200,00	1.200,00
Contador	500,00	500,00	500,00	500,00	500,00
Telefone	200,00	200,00	200,00	200,00	200,00
Seguros	715,17	715,17	715,17	715,17	715,17
Material expediente	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
Material de limpeza	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Sistema informática	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
IPVA	60,00	60,00	60,00	60,00	60,00
Água	50,00	50,00	50,00	50,00	50,00
Manutenção	698,04	698,04	698,04	698,04	698,04
Segurança	1.000,00	1.000,00	1.000,00	1.000,00	1.000,00
Depreciação	7.128,33	7.128,33	7.128,33	7.128,33	7.128,33
Despesas bancárias	120,00	120,00	120,00	120,00	120,00
Outros	-	-	-	-	-

Valores em R\$

Tabela 29: Custos com matéria-prima e embalagem para análise econômica do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a produção das enzimas.

Custo matéria -prima e embalagem				
Componentes	Concentração	Custo/Kg MP	Custo/Kg Det.	
Glicerol	15%	R\$ 2,25	R\$	0,34
Isopropanol	10%	R\$ 3,30	R\$	0,33
Propilenogllcol	20%	R\$ 5,90	R\$	1,18
Solução tampão 1M	5%	R\$ 6,00	R\$	0,30
Tensoativo	2%	R\$ 20,00	R\$	0,40
Antiespumante	0,01%	R\$ 6,20	R\$	0,0006
Protease	5%	R\$ 13,55	R\$	0,68
Lipase	5%	R\$ 10,88	R\$	0,54
Rótulo		R\$ 0,25	R\$	0,05
Embalagem		R\$ 2,50	R\$	0,50
		Total	R\$	4,32

Tabela 30: Necessidade de capital de giro para análise econômica do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a produção das enzimas.

Capital de Giro				
ITEM		Valores Anuais (base DRE)	Valores Dia	
Vendas		796.800	2.213	
Fornecedores (mat-prima)		207.342	576	
Impostos		70.596	196	
Mobra		57.240	159	
Cfixo		247.579	688	
Composição Capital de giro	Dias previstos de necessidade	Relação	Necessidade dia	Investimento em Capital de Giro
Caixa operacional	2	faturamento	2.213	4.427
Contas a receber	30	faturamento	2.213	66400
Estoque prod acabados	10	mp+ mo + cf	1.423	14227
Estoque prod em processo	10		1.423	14227
Total a ser financiado pela empresa				99280
Fornecedores	30	mat prima	576	(17.278)
Impostos	10	impostos	196	(1.961)
Total financiamento recebido pela empresa				(19.239)
Necessidade de capital de giro estimada (financiamento concedido menos financiamento recebido pela empresa)				80.041

Valores em R\$

Tabela 31: Formação do preço de venda sugerido para análise econômica do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a produção das enzimas.

	Pvenda =	Cust Var Unit
	1 - (CC%+ML%+CF%)	
Preço de venda de análise	16,6000	
Detergente		
Preço de Venda Sugerido	16,6186	
Pvanálise / pvsugerido	99,9%	
Custo Variável unitário	4,7171200	
Matéria-prima	4,3196200	
Mão-de-obra direta	0,3975000	
Custos de Comercialização	24,86%	
Margem de Lucro	36,40%	
Custos fixos em %	10,36%	
Total	71,51%	
1 - total	28,38%	
Mark-Up	3,52	
Custos Fixos	20.631,54	
Previsão de receita Cap Plena	199.200,00	
Custos fixos em %	10%	

Valores em R\$

Tabela 32: Demonstrativo de resultados da produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a produção das enzimas.

Demonstrativo de resultados										
	DRE Ano 1		DRE Ano 2		DRE ano 3		DRE ano 4		DRE ano 5	
	TOTAL	%								
Receita	796.800,00	100%	1.593.600,00	100%	1.992.000,00	100,00%	2.390.400,00	100,00%	2.390.400,00	100,00%
Custos variáveis	454.698,24	57,07%	881.956,91	55,34%	1.109.848,91	55,72%	1327302,93	55,53%	1327303,15	55,53%
Impostos	70.596,48	8,86%	170.993,39	10,73%	235.454,51	11,82%	289.477,65	12,11%	289.477,87	12,11%
Pis/Cofins	0,00	0,00%	0,11	0,00%	0,11	0,00%	0,21	0,00%	0,43	0,00%
Simples	70.596,48	8,86%	170.993,28	10,73%	235.454,40	11,82%	289.477,44	12,11%	289.477,44	12,11%
ICMS	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%
ISSQN	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%
IRPJ - Presumido	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%
CSSLL - Presumido	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%	0,00	0,00%
Custo Matéria Prima	207.341,76	26,02%	414.683,52	26,02%	518.354,40	26,02%	622.025,28	26,02%	622.025,28	26,02%
Comissões	79.680,00	10,00%	159.360,00	10,00%	199.200,00	10,00%	239.040,00	10,00%	239.040,00	10,00%
Mobra Direta	57.240,00	7,18%	57.240,00	3,59%	57.240,00	2,87%	57.240,00	2,39%	57.240,00	2,39%
Despesas com vendas	39.840,00	5,00%	79.680,00	5,00%	99.600,00	5,00%	119.520,00	5,00%	119.520,00	5,00%
Margem de Contribuição	342.101,76	42,93%	711.643,09	44,66%	882.151,09	44,28%	1063097,07	44,47%	1063096,85	44,47%
Custos Fixos	247.578,50	31,07%	254.778,50	15,99%	261.978,50	13,15%	269.178,50	11,26%	276.378,50	11,56%
Resultado Operacional	94.523,26	11,86%	456.864,59	28,67%	620.172,59	31,13%	793.918,57	33,21%	786.718,35	32,91%
Resultado Líquido	94.523,26	11,86%	456.864,59	28,67%	620.172,59	31,13%	793.918,57	33,21%	786.718,35	32,91%
Ponto de equilíbrio	576.642,89	0,00%	570.531,80	0,00%	591.577,99	0,00%	605.254,50	0,00%	621.444,01	0,00%
Rentabilidade	8%		38%		51%		66%		65%	

Valores em R\$

Para ser calculado fluxo de caixa anual, também se considerou o custo do capital que foi de 25% ao ano, dividido em 10% ao ano de custo de oportunidade e 15% ao ano de risco. Desta forma, considerando o preço e volume de vendas do padrão ouro, o retorno do investimento descontado (“payback descontado”) ocorreria em 4 anos, o mesmo período da análise considerando a compra das enzimas, no entanto, com a produção destas, o investimento inicial é quatro vezes maior. Com este custo de capital e um período de cinco anos, a taxa interna de retorno (TIR) foi de 34,55%, próxima a TIR considerando a compra das enzimas, que foi de 35,11%, mas que representa um VAL de R\$ 316.817,00, conforme a Tabela 33.

Da mesma forma que para a análise do projeto considerando a compra das enzimas, o projeto considerando a produção destas matérias-primas foi comparado com quatro cenários possíveis, para avaliação de sua sensibilidade. Foram avaliados o impacto da diminuição do preço de venda (simulação 1), diminuição do volume de vendas (simulação 2), aumento do custo das enzimas (simulação 3) e aumentos dos custos fixos (simulação 4).

Conforme pode ser observado na Tabela 34, o projeto do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras considerando a produção das enzimas é muito menos sensível se comparado com o projeto de compra destas matérias-primas. Nenhuma das simulações inviabilizou o projeto como ocorreu quando se considerou a compra das enzimas. Como pode ser observado, a elevada margem de lucro, devido à diminuição dos custos variáveis, possibilitou esta situação de maior flexibilidade em relação aos parâmetros considerados no padrão ouro.

Tabela 33: Fluxo de caixa para o cálculo da TIR, VAL e PAYBACK, em cinco anos, para a produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a produção das enzimas.

FLUXO DE CAIXA ANUAL PARA CÁLCULO DE VAL, TIR E PAY-BACK- PERÍODO: 5 ANOS							
		1	2	3	4	5	
	ANO 0	ANO I	ANO II	ANO III	ANO IV	ANO V	TOTAL
INVESTIMENTO	(1.127.400)						(1.127.400)
C. GIRO	(80.041)					80.041	
LUCRO LÍQUIDO		94.523	456.865	620.173	793.919	786.718	2.752.197,36
DEPRECIÇÃO		85.540	85.540	85.540	85.540	85.540	427.700
VALOR RESIDUAL						-	-
FLUXO DE CAIXA		180.063	542.405	705.713	879.459	952.299	3.259.938
FLUXO DE CAIXA LÍQUIDO	(1.207.440,52)	180.063	542.405	705.713	879.459	952.299	2.052.497
FLUXO DE CAIXA LÍQUIDO ACUMULADO	(1.207.441)	(1.027.377)	(484.973)	220.740	1.100.198	2.052.497	
PAYBACK SIMPLES		-	-	2,7	-	-	
FLUXO DE CAIXA DESCONTADO	(1.207.441)	144.035	347.064	361.208	360.070	311,881	316.817
FC DESCONTADO ACUMULADO	(1.207.441)	(1.063.405)	(716.342)	(355.134)	4.936	316.817	
PAYBACK DESCONTADO		-	-	-	4,0	-	
	Tx mês	Tx ano					
CUSTO DE OPORTUNIDADE	0,800%	10,0%					
RISCO	1,17%	15,0%					
CUSTO DE CAPITAL	1,97%	25,0%					
VPL	316.817						
Taxa interna de retorno	34,55%						

Valores em R\$

Tabela 34: Simulações de diminuição do preço de venda (1), diminuição do volume de vendas (2), aumento do custo das enzimas (3) e aumento dos custos fixos (4) para avaliação da sensibilidade do projeto do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, considerando a produção das enzimas.

	Padrão Ouro	Simulação			
		1	2	3	4
Variáveis					
Custo de Oport.	25,0%	25,0%	25,0%	25,0%	25,0%
Taxa de risco	15,0%	15,0%	15,0%	15,0%	15,0%
Custo de Capital	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%	10,0%
Preço de venda	100%	95%	100%	100%	100%
Volume de vendas					
ano1	33%	33%	30%	70%	70%
ano2	67%	67%	60%	80%	80%
ano3	83%	83%	75%	90%	90%
ano4	100%	100%	90%	100%	100%
ano5	100%	100%	100%	100%	100%
Cst Enzimas	100%	100%	100%	105%	100%
Cst Fixo	100%	100%	100%	100%	110%
Resultados					
Pback desc (anos)	4	4,4	4,5	4,0	4,2
VAL (mil)	316.817	159.010	159.010	300.696	246.304
TIR	34,55%	29,92%	29,86%	34,09%	32,44%
Margem de lucro	36,40%	34,4%	36,4%	36,0%	35,3%

6. CONCLUSÕES

A adição de surfactantes no final do crescimento de *Penicillium restrictum* não aumentou a quantidade de lipase detectada no ensaio enzimático.

A produção de lipase por *Penicillium aurantiogriseum* não apresenta diferença significativa quando utiliza-se, no meio de cultura basal, óleo de soja, girassol ou azeite de oliva.

Os parâmetros do bioprocessamento de produção de lipase por *Penicillium aurantiogriseum*, otimizados através de superfície de resposta, em Erlenmeyer, são: temperatura de 29° C, pH inicial de 6,5 e concentração do óleo de soja de 15 g/L.

A atividade de lipase produzida por *Penicillium aurantiogriseum*, em biorreator de 100 litros, foi 6,8 vezes maior do que a atividade produzida em Erlenmeyer.

A formulação do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras apresentou o pH correto após a diluição de uso, no entanto, o detergente concentrado não é estável, pois apresenta a formação de um precipitado depois de sete dias da formulação e diminuição da atividade enzimática.

A utilização do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, na Fazenda do Araçá, promoveu economia de tempo (42,8%), água (42,8%), energia elétrica (48%), e os ensaios de degradação acelerada dos insufladores sugerem que sua utilização promove um menor desgaste destas peças.

A análise de viabilidade econômica de produção do detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras mostra que, considerando a compra das enzimas, o projeto apresenta um menor investimento inicial e é viável economicamente, no entanto, apresenta uma maior sensibilidade em relação à

diminuição no preço e volume de vendas e aumento dos custos fixos e variáveis, devido à baixa margem de lucro.

A análise de viabilidade econômica considerando a produção das enzimas mostrou que este projeto só é viável se o volume de produção for muito grande (produção em reatores de 30 m³), e, mesmo assim, a atividade de lipase deve ser 66% maior do que a encontrada experimentalmente, para a viabilidade do projeto.

Considerando uma maior atividade enzimática e produção em biorreator de 30 m³, o projeto apresenta um investimento inicial quatro vezes maior do que considerando a compra das enzimas, mas a margem de lucro passa de 13,3% para 37,3%, tornando o projeto menos sensível à diminuição no preço e volume de vendas, e aumento dos custos fixos e variáveis.

7. PERSPECTIVAS

Realizar experimentos de batelada alimentada para aumento da atividade de lipase produzida por *Penicillium aurantiogriseum*;

Verificar o escalonamento do bioprocesso de produção de lipase por *Penicillium aurantiogriseum* em reator de 1000 litros;

Realizar a purificação e caracterização da lipase produzida;

Realizar novos ensaios buscando a estabilização da formulação quanto à formação de precipitado e atividade enzimática ou desenvolver uma formulação em pó;

Avaliar o desgaste dos insufladores após seis meses de uso na Fazenda.

8. REFERÊNCIAS

- ABDEL-FATTAH, Y. R.; GABALLA, A. A. Identification and over-expression of a thermostable lipase from *Geobacillus thermoleovorans* toshki in *Escherichia coli*. **Microbiological Research** (2006), doi:10.1016/micres.2006.02.004.
- ABRAMIÉ, M.; LESEIÉ, I.; KORICA, T.; VITALE, L.; SAENGER, W.; PIGAC, J. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. **Enzyme and Microbial Technology**. 25:522-529, 1999.
- BALDE BRANCO. Rebanho Gaúcho. **Balde Branco**. No 511, p. 6, 2007.
- BARROS, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos** - Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. São Paulo: Editora da UNICAMP. 2001.
- BARROS, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. São Paulo: Editora da UNICAMP. 1995.
- BIAN, C.; YUAN, C.; LIN, L.; LIN, J.; SHI, X.; YE, X.; HUANG, Z.; HUANG, M. Purification and preliminary cristallographic analysis of a *Penicillium expansum* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1752:99-102, 2005.
- BURKERT, J. F. M.; MAUGERI, F.; RODRIGUES, M. I. Optimization of extracellular lipase production by *Geotrichum* sp. Using factorial design. **Bioresource Technology**. 91:77-84, 2004.
- CASTILHO, L. R.; POLATO, C. M. S.; BARUQUE, E. A.; SANT'ANNA JR, G. L.; FREIRE, D. M. G. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. **Biochemical Engineering Journal**. 4:239-247, 2000.
- CHOI, D. B.; TAMURA, S.; PARK, Y. S.; OKABE, M.; SERIU, Y.; TAKEDA, S. Efficient tylosin production from *Streptomyces fradiae* using rapeseed oil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 82:183-186, 1996.
- COMPANHIA ESTADUAL DE ENERGIA ELÉTRICA. **Custos e Tarifas**. Disponível em: <<http://www.ceee.com.br>>. Acessado em: 21/06/07.
- CONSELHO BRASILEIRO DE QUALIDADE DO LEITE (CBQL). **Equipamentos de Ordenha**: recomendações do Comitê de Equipamentos. Conselho Brasileiro de Qualidade do Leite. São Paulo: Quiron, 2002. 28p.
- CIAFARDINI, G.; ZULLO, B. A.; CIOCCIA, G. IRIDE, A. Lipolytic activity of *Williopsis californica* and *Saccharomyces cerevisiae* in extra virgin olive oil. **Internacional Journal of Food Microbiology**. 107:27-32, 2006a.

- CIAFARDINI, G.; ZULLO, B. A.; IRIDE, A. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. **Food Microbiology**. 23:60-67, 2006b.
- CORSO, G.; REVAH, S. Production and characteristics of lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. **Bioresource Technology**. 70:173-180, 1999.
- CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure as basis for understanding interfacial properties of lipases. **Methods Enzymology**. 284:3-27, 1997.
- CUNHA-QUEDA, A. C.; RIBEIRO, H. M.; RAMOS, A.; CABRAL, F. Study of biochemical and microbiological parameters during composting of pine and eukalyptus bark. **Bioresource Technology** (2006), doi:10.1016/j.biortech.2006.07.006.
- D'ANNIBALE, A.; SERMANI, G. G.; FEDERICI, F.; PETRUCCIOLI, M. Olive-mill wastewaters: a promising substrate for microbial lipase production. **Bioresource Technology**. 97:1828-1833, 2005.
- DOMINGUEZ, A.; PASTRANA, L.; LONGO, M A.; RÚA, M. L.; SANROMAN, M. A. Lipolytic enzyme production by *Thermus thermophilus* HB27 in a stirred tank bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. 26:95-99, 2005.
- ECOSOL. **LAS in a nutshell**. Disponível em: <<http://www.lasinfo.eu>>. Acessado em: 06/06/07.
- ELIBOL, M.; OZER, D. Influence of oxygen transfer on lipase production by *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**. 36:325-329, 2000.
- ELIBOL, M.; OZER, D. Response surface analysis of lipase production by freely suspended *Rhizopus arrhizus*. **Process Biochemistry**. 38:367-372, 2002.
- EMBRAPA. **Congresso Pan-americano do leite é lançado no Rio Grande do Sul**. 2007. Disponível em: <<http://www.cnpqi.embrapa.br/jornaleite/jornaldoleite.php?id=243>>. Publicado em 08/06/2006. Acessado em: 25/05/07.
- FICKERS, P.; ONGENA, M.; DESTAIN, J.; WEEKWRS, F.; THONART, P. Production and down-stream processing of an extracellular lipase from the yeast *Yarrowia lipolytica*. **Enzyme and Microbial Technology**. 38:756-759, 2006.
- FIGUEIRÓ, I. Câmbio trava as exportações de lácteos. **Balde Branco**. 505:58-59, 2006.
- GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial Enzymology**. Nova York: Stockton Press. Segunda Edição. 1996. 609p.

- GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL. **Rigotto abre o 9º Congresso Panamericano do Leite**. 20/06/2007. Disponível em: <<http://www.rs.gov.br>>. Acessado em 25/05/07.
- GUPTA, N.; SAHAI, V.; GUPTA, R. Alkaline lipase from a novel strain *Burkholderia multivorans*: Statistical medium optimization and production in a bioreactor. **Process Biochemistry**. 42:518-526, 2007.
- HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMMED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**. 39:235-251, 2006.
- HE, YAO-QIANG; TAN, TIAN-WEI. Use of response surface methodology to optimize culture medium for production of lipase with *Candida* sp. 99-125. **Journal of Molecular Catalysis**. 43:9-14, 2006.
- HELISTÖ, P.; KORPELA, T. Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoato esters method. **Enzyme and Microbial Technology**. 23:113-117, 1998.
- JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Curr. Opin. Biotechnol.** 13:390-397, 2002.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends Biotechnology**. 16:396-403, 1998.
- KANWAR, L.; GOGOI, B. K.; GOSWAMI, P. Production of a *Pseudomonas* lipase in n-alkane substrate and its isolation using an improved ammonium sulfate precipitation technique. **Bioresource Technology**. 84:207-211, 2002.
- KAUSHIK, R.; SARAN, S.; ISAR, J.; SAXENA, R. K. Statistical optimization of medium components and growth conditions by response surface methodology to enhance lipase production by *Aspergillus carneus*. **Journal of Molecular Catalysis**. 40:121-126, 2006
- KITAMOTO, D.; ISODA, H.; NAKAHARA, T. Function and potential applications of glycolipid biosurfactants – from energy-saving materials to gene delivery carriers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 94:187-201, 2002.
- KLEIN, V. A. **Manual da Ordenha Mecanizada**. Passo Fundo: Editora da Universidade de Passo Fundo. 2006. 92p.
- KO, W. H.; WANG, I. T.; ANN, P. J. A simple method for detection of lipolytic microorganism in soil. **Soil Biology & Biochemistry**. 37:597-599, 2005.

- KUMAR, S.; KIKON, K.; UPADHYAY, A.; KANWAR, S. S.; REENA G. Production, purification and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3. **Protein Expression and Purification**. 41:38-44, 2005.
- LANCIOTTI, R.; GIANOTTI, A.; BALDI, D.; ANGRISANI, R.; SUZZI, G.; MASTROCOLA, D. GUERZONI, M. E. Use of *Yarrowia lipolytica* strains for the treatment of olive mill wastewater. **Bioresource Technology**. 96:317-322, 2005.
- LANGER, O.; PALME, O.; WRAY, V.; TOKUDA, H.; LANGE, S. Production and modification of bioactive biosurfactants. **Process Biochemistry**. 41:2138-2145, 2006.
- LEAL, M. C. M. R.; FREIRE, D. M. G.; CAMMAROTA, M. C.; SANT'ANA, G. L. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**. 41:1173-1178, 2006.
- LI, C.; CHENG, C.; CHEN, T. Fed-batch production of lipase by *Acinetobacter radioresistens* using Tween 80 as the carbon source. **Biochemical Engineering Journal**. 19:25-31, 2004.
- LI, Z. H. Application of cationic surfactant in environmental remediation. **Recent Research Developments in Surface & Colloids**. 1:79-95, 2004.
- LIN, E.; WANG, C.; SUNG, S. Cultivating conditions influence lipase production by the edible Basidiomycete *Antrodia cinnamomea* in submerged culture. **Enzyme and Microbial Technology**. 39:98-102, 2005.
- LIMA, A. C. S.; NORONHA, J. F. Gestão é tecnologia, e como tal deve ser utilizada. **Balde Branco**. 505:40-42, 2006
- LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; MITCHELL, D. A.; FONTANA, J. D. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**. 18:65-71, 2004.
- LIMA, V. M. G.; KRIEGER, N.; SARQUIS, M. I. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS L. P.; FONTANA, J. D. Effect of nitrogen and carbon sources on lipase production by *Penicillium aurantiogriseum*. **Food Technol. Biotechnol.** 41:105-110, 2003.
- MA, J.; ZHANG, Z.; WANG, B.; KONG, X.; WANG, Y.; CAO, S.; FENG, Y. Overexpression and characterization of a lipase from *B. subtilis*. **Protein Expression and Purification**. 45:22-29, 2006.

- MAHADIK, N. D.; PUNTAMBEKAR, U. S.; BASTAWDE, K. B.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Process Biochemistry*. 38:715-721, 2002.
- MAIA, M.M.D.; HEASLEY, A.; CAMARGO DE MORAES, M. M.; MELO, E. H. M.; MORAIS JR., M. A.; LEDINGHAM, W. M.; LIMA FILHO, J. R. Effect of culture conditions on lipase production by *Fusarium solani* in batch fermentation. **Bioresource Technology**. 76:26-27, 2001.
- MALISZEWSKA, I.; MASTALERZ, P. Production and some properties of lipases from *Penicillium citrinum*. **Enzyme and Microbial Technology**. 14:190-193, 1992.
- MARÍA, P. D.; SÁNCHEZ-MONTERO, M; SINISTERRA, J. V.; ALCÂNTARA, A. R. Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview. **Biotechnology Advances**. 24:180-196, 2006.
- MEGHWANSHI, G. K., AGARWAL, L.; DUTT, K.; SAXENA, R. K. Characterization of 1,3-regiospecific lipases from new *Pseudomonas* and *Bacillus* isolates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 40:127-131, 2006.
- MILETO, D.; BROCCA, S.; LOTTI, M.; TAKAGI, M.; ALQUATI, C.; ALBERGHINA, L. Characterization of the *Candida rugosa* lipase system an overexpression of the lip1 isoenzyme in a non-conventional yeast. **Chemistry and Physics of Lipids**. 93:47-55, 1998.
- MILKPOINT. **Italac confirma unidade em Passo Fundo**. 22/05/2007a. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br>>. Acessado em: 25/05/2007.
- MILKPOINT. **Demanda mundial de lácteos ultrapassa ofertas**. 21/05/2007b. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br>>. Acessado em: 25/05/07.
- MILKPOINT. **Preços no mercado mundial continuam aumentando**. 22/05/2007c. Disponível em: www.milkpoint.com.br. Acessado em: 25/05/07.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. BRASIL. **Instrução Normativa No 51**. 18/09/2002. Disponível em: <<http://www.cnpqgl.embrapa.br>>. Acessado em: 25/05/2007.

- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. BRASIL. **EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA**. Disponível em: <<http://www.embrapa.br>>. Acessado em 07/11/2005.
- MIRANDA, O. A.; SALGUEIRO, A. A.; PIMENTEL, M. C. B.; LIMA FILHO, J. L.; MELO, E. H. M.; DURÁN, N. Lipase production by a Brazilian strain of *Penicillium citrinum* using an industrial residue. **Bioresource Technology**. 69:145-147, 1999.
- MITIDIERI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. **Produção de enzimas hidrolíticas para formulação de detergentes bioativos e avaliação da sua viabilidade econômica**. 2003. 203p. Tese (Doutorado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2003.
- MOSBAH, H.; SAYARI, A.; MEJDOUB, H.; DHOUIB, H.; GARGOURI, Y. Biochemical and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1723:282-291, 2005
- MURALIDHAR, R. V.; CHIRUMAMILA, R. R.; MARCHANT, R. NIGAM, P. A response surface approach for the comparison of lipase production by *Candida cylindracea* using two different carbon sources. **Biochemical Engineering Journal**. 9:17-23, 2001.
- NOGUEIRA, M. P. O ano da reviravolta para o leite. **Balde Branco**. 495:18-22, 2006.
- NOVOZYMES. **Enzyme Handbook**. 2002. Disponível em: <<http://www.novozymes.com>>. Acessado em: 03/05/2007.
- NUTAN, D. M., BASTAWDE, K. B.; PUNTAMBEKAR, U. S.; KHIRE, J. M.; GOKHALE, D. V. Production of acidic lipase by a mutant of *Aspergillus niger* NCIM 1207 in submerged fermentation. **Process Biochemistry**. 39:2031-2034, 2004.
- PINHEIRO, A. J. R. Cuidados para obter leite de qualidade. **Balde Branco**. 506:44-47, 2006.
- PRIETO, N.; KOCHAVI, D.; HAMBURGER, R. F.; SKOVGAARD, V. A new stabilizer for liquid detergents. **Surfactants and Detergents**. Vol. 13. 2002.
- PUTHLI, M. S.; RATHOD, V. K.; PANDIT, A. B. Optimization of lipase production in a triple impeller bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**. 27:287-294, 2006.
- REETZ, M. T. Lipases as practical biocatalysts. **Curr. Opin. Chem. Biol.** 6:145-150, 2002.
- SABATINI, D. A.; KNOX, R. C.; HARWELL, J. H. Surfactant-enhanced DNAPL Remediation: Surfactant selection, Hydraulic Efficiency and Economic Factors. **Environmental Research Brief**. 1996. Disponível em:

<<http://www.epa.gov/ada/download/briefs/enhanced.pdf>>. Acessado em: 15/05/2007.

SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa. 2004. 416p.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, UC. Production, purification and characterization and applications of lipase. **Biotechnological Advances**. 19:627-662, 2001.

SHI, J. Steric Stabilization. **Center for Industrial Sensor and Measurements**. 2002. Disponível em: <<http://www.lci.kent.edu/muir/NIM%20Papers/Stabilization%20of%20NP%20Suspensions/2002%20Shi%20steic%20stabilization.pdf>>. Acessado em: 11/05/2007.

SHOWELL, M. S. **Hand Book of Detergents**. Part D: Formulation. Boca Raton: CRC Press. 2006. 530p.

SILVA, W. O. B.; MITIDIARI, S.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**. 40:321-326, 2005.

STRANSKY, K., ZAREVÚCKA, M.; KEJÍK, Z.; WIMMER, Z.; MACKOVÁ, M.; DEMNEROVÁ, K. Substrate specificity, regioselectivity and hydrolytic activity of lipases activated from *Geotrichum* sp. **Biochemical Engineering Journal**. 34:209-216, 2007.

SUGIHARA, A.; SHIMADA, Y.; TAKADA, N.; NAGAO, T.; TOMINAGA, Y. *Penicillium abeanum* lipase: Purification, characterization and its use for docosaheptaenoic acid enrichment of tuna oil. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 82:498-501, 1996.

SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. **Enzyme Microb. Technology**. 10:492-497, 1988.

TAN, T.; ZHANG, M.; XU, J.; ZHANG, J. Optimization of culture conditions and properties of lipase from *Penicillium camembertii* Thom PG-3. **Process Biochemistry**. 39:1495-1502, 2004.

TAN, T.; ZHANG, M.; WANG, B.; YING, C.; DENG, L. Screening of high lipase production *Candida* sp and production of lipase by fermentation. **Process Biochemistry**. 39:459-465, 2003.

TAVARES, E. Qualidade do leite não atende à IN51. **Balde Branco**. 505:69-71, 2006.

TAVERNA, M. Tecnologia de ordenha para um leite de qualidade. **Balde Branco**. 503:56-59, 2006.

WANG, Y.; SRIVASTAVA, K. C.; SHEN, G. J.; WANG, H. Y. Thermostable alkaline lipase from newly isolated thermophilic *Bacillus*, strain A30-1 (ATCC 53841). **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 79:433-438, 1995.

ZAKS, A. & KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in organic media at 100C. **Science**. 224:1249-1251, 1984.

ANEXO 1

Patente do Detergente Enzimático Ácido para Limpeza de Ordenhadeiras depositada no
INPI

Relatório descritivo

DETERGENTE ENZIMÁTICO ÁCIDO PARA LIMPEZA DE ORDENHADEIRAS

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a um detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, contendo duas enzimas, protease e lipase em formulação líquida.

Antecedentes da Invenção

O sistema de higienização atualmente utilizado consiste de 6 etapas, pré-enxágue, limpeza com a utilização de detergente alcalino, segundo enxágüe para retirar os resíduos de detergente alcalino, limpeza com a utilização de detergente ácido, terceiro enxágüe e sanitização.

O sistema é utilizado tanto para limpeza de ordenhadeiras com sistema aberto e sem lavador automáticos, assim como para sistemas de ordenhadeiras fechadas com lavador automático. A única diferença entre os dois equipamentos consiste na temperatura de utilização do detergente alcalino, que no sistema fechado é mais elevado, e pode chegar a 80° C.

O primeiro enxágüe tem a finalidade de retirar o excesso de resíduos de leite da tubulação.

Em seguida são utilizados detergentes alcalinos que possuem maior poder de limpeza, pois removem com mais facilidade gorduras e proteínas, principalmente em temperatura mais elevada. Entretanto o meio alcalino provoca a precipitação de sais. As águas utilizadas para o processo de limpeza possuem média a alta dureza (presença de sais, principalmente carbonatos) e o leite é uma grande fonte de cálcio. O pH alcalino do detergente provoca a precipitação destes sais e conseqüente depósito no interior da ordenhadeira.

No segundo enxágüe ocorre a retirada de resíduos de detergente alcalino, proteínas e gorduras. Este enxágüe deve remover todo o resíduo de detergente, pois o pH alcalino causa desgaste nas borrachas das conexões e teteiras das ordenhadeiras.

O detergente ácido possui uma capacidade de remoção de proteínas e gorduras inferior ao detergente alcalino, mas seu uso é necessário para solubilizar os sais precipitados pela ação do detergente alcalino.

O terceiro enxágüe é utilizado para a remoção de resíduos, do detergente ácido e sais solubilizados.

Embora este sistema seja amplamente utilizado, seria mais adequado, em termos de economia de recursos, a utilização de apenas um produto, que realize uma limpeza eficiente, a exemplo do detergente alcalino utilizado no atual sistema, mas sem a precipitação de sais causada pelo elevado pH.

Detergentes enzimáticos tem sido propostos para utilização na higienização na indústria de laticínios. A patente WO 97/07190 diz respeito a um detergente enzimático para utilização em linhas de leite que utiliza apenas protease, o pH do produto é alcalino e sua formulação é em pó. A adição da enzima neste produto visa aumentar a eficiência do detergente alcalino no final da linha, onde ocorre uma diminuição da temperatura. As enzimas resistem à temperatura do início da linha, que chega a 75°C, mas desempenham seu papel quando esta cai para em torno de 35° C, no final da linha. Diferentemente, o produto dos requerentes, que é constituído por uma lipase além da protease, apresenta pH na faixa ácida e possui formulação líquida, visa aumentar a eficiência do detergente ácido, impedindo a precipitação de sais pela utilização de produto com baixo pH.

Outro produto em pó é relatado na patente US 4,212,761, mas o controle da precipitação de sais, que se faz necessário, uma vez que o pH do produto é alcalino, se dá pela adição de polifosfatos, enquanto que no produto BioPlus ORDELAV este controle é realizado através do próprio pH ácido, sem adição de nenhum outro componente.

Produtos com formulações líquidas também são relatados. A patente US 4,243,543 refere-se a um sistema de limpeza cujo produto é fracionado, e suas duas porções devem ser misturadas na hora do uso, dificultando a utilização deste sistema, principalmente em propriedades rurais.

Este sistema de dois produtos também é apresentado na patente US 5,064,561, cujo método de higienização é muito semelhante com o tradicional, utilizando um detergente alcalino com um controlador de dureza seguindo de um detergente enzimático.

Em relação às patentes apresentadas, o produto BioPlus ORDELAV, entre outros fatores, difere pela utilização de um pH ácido. A patente US 6,472,199 também possui esta característica, no entanto, as enzimas são empregadas em um pré-tratamento, só então utiliza-se um detergente ácido.

Os requerentes, através desta invenção, sugerem a utilização de um detergente enzimático ácido para solucionar o problema da precipitação de sais evitando a utilização de agentes controladores de dureza, ou a utilização de um outro produto após a lavagem com detergente alcalino, e que possua a mesma eficácia na remoção de resíduos que os produtos tradicionais.

A inovação na utilização do detergente enzimático BioPlus ORDELAV para ordenhadeiras consiste em eliminar a etapa de lavagem com detergente alcalino. O detergente enzimático possui um pH ácido, que evita a precipitação de sais do leite e da água.

Apresenta um poder de limpeza semelhante ao detergente ácido, mas a remoção da proteína do leite e sua gordura são potencializadas pelo uso de uma protease e uma lipase ácidas.

Desta forma a utilização do detergente enzimático para ordenhadeiras proporciona economia de tempo e mão-de-obra, pois elimina dois passos no processo de limpeza, economia de água e energia elétrica para seu aquecimento, economia na reposição de conexões que apresentam menor desgaste pela não utilização de álcalis, e há também a preservação ambiental, pois o volume do efluente líquido gerado é menor.

Sumário da invenção

Proteases

Proteases são uma classe de enzimas com importantes funções em processos biológicos essenciais digestivos e regulatórios.

As proteases têm também uma variedade de aplicações principalmente na indústria de detergentes e de alimentos. Com a tendência mundial no uso de tecnologias não poluentes, as proteases começaram a ser usadas em larga escala no tratamento do couro, em substituição aos compostos tóxicos e poluentes até então usados, principalmente sulfeto de sódio. Na indústria farmacêutica, as proteases são usadas em pomadas cicatrizantes e têm um uso potencial para outros medicamentos.

Historicamente a classificação dessas enzimas foi bastante dificultada devido à falta de especificidade por substratos definidos, não sendo inicialmente possível realizá-la de modo sistemático. As denominações foram primeiramente baseadas na origem de extração, por exemplo: papaína, extraída do *Carica papaya*, pancreatina, extraído do pâncreas, pepsina, extraída de estômago de animais (do grego *dépsisis*: digestão), bromelina, extraída do *Ananás comosus*, da família *Bromeliaceae*, ficina, extraído do *Ficus glabrata*, e subtilisina, produzido a partir do *Bacillus subtilis*. Também foram utilizadas as denominações "exo" ou "endoproteases", de acordo com localização na célula produtora .

O termo peptidase é sinônimo de peptídeo hidrolase e protease, o que inclui todas enzimas que clivam ligações peptídicas. Segundo a Comissão de Enzimas da União Internacional de Bioquímica, elas são classificadas como E.C. 3.4. As proteases podem ser exopeptidases (E.C. 3.4.11-19), cuja ação é dirigida para a porção amino ou carboxi terminal do peptídeo ou endopeptidases (E.C. 3.4.21-24), também denominadas proteinases, que clivam ligações peptídicas internamente, resultando em peptídeos.

A partir de Hartley em 1960, foi proposto um sistema prático de classificação para as proteases. Nesta classificação, as carboxipeptidases e as endopeptidases são divididas em subclasses, tendo como base o seu mecanismo catalítico. As carboxipeptidases foram subdivididas em serino, metalo e cisteíno carboxipeptidases e

as endopeptidases em serino endopeptidases (E.C. 3.4.21), cisteíno endopeptidases (E.C. 3.4.22), aspártico endopeptidases (E.C. 3.4.23) e metaloendopeptidases (E.C. 3.4.24). Serino peptidases possuem um resíduo de serina em seu centro ativo, enquanto as aspártico peptidases têm duas unidades de ácido aspártico no centro catalítico. As cisteíno peptidases apresentam um resíduo de cisteína no centro ativo e as metaloproteases usam um íon metal no seu mecanismo catalítico.

As exopeptidases atuam somente nas extremidades das cadeias polipeptídicas nas regiões (N) ou (C)-terminal. Aquelas que atuam na região amino terminal livre liberam um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidil-peptidases). As exopeptidases que atuam na região C terminal livre liberam um único aminoácido (carboxipeptidases) ou um dipeptídeo (peptidil-dipeptidases). Algumas exopeptidases são específicas para dipeptídeos (dipeptidases) ou removem resíduos terminais que são substituídos, ciclizados ou ligados por ligações isopeptídicas .

As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal. A presença de grupos amino terminal ou carboxi terminal próximos têm um efeito negativo na atividade da enzima. As enzimas cujo mecanismo de ação não está completamente elucidado são classificadas em uma subclasse específica (E.C. 3.4.99).

As proteases de serina, cisteína e aspartato recebem estes nomes devido aos aminoácidos presentes no sítio catalítico, os quais atuam como nucleófilos na hidrólise protéica . As metaloproteases também atuam de maneira semelhante, mas o íon (Zn^{2+} , Ca^{2+} e Mn^{2+}) é necessário para ativar uma determinada carbonila de uma amida presente no sítio ativo. As aspartato proteases, por possuírem grupos carboxílicos em seus centros ativos, são ativas apenas em pH inferior a 5, sendo por isto também denominadas proteases ácidas.

As estruturas moleculares de proteases representativas de cada grupo já foram determinadas por análise de seqüência de aminoácidos, cristalografia de raios-X e ressonância nuclear magnética - NMR. A caracterização dos sítios catalíticos de várias proteases evidenciou uma fenda presente na superfície destas moléculas. O substrato polipeptídico se posiciona ao longo da fenda do sítio ativo, sendo estabilizado em

ambos os lados por subsítios que comportam as cadeias laterais dos seus resíduos de aminoácidos, ou as suas próprias ligações peptídicas. As similaridades estruturais levaram à proposição de que grupos de proteases evoluíram a partir de uma única proteína, ou seja, pertencem a uma superfamília.

As famílias de serina proteases I e II são encontradas em organismos superiores e microrganismos, respectivamente. Os centros ativos das duas famílias apresentam os mesmos aminoácidos, que são asparagina, serina e histidina. A diferença encontra-se nas seqüências de aminoácidos e arranjo terciário nas regiões ao redor do centro catalítico. As proteases desta subclasse possuem uma serina como nucleófilo em seu centro ativo, mas precisam utilizar um segundo aminoácido (anel imidazol da histidina) para ativar a hidroxila de seu resíduo de serina. Isto ocorre devido a menor acidez e nucleofilia do átomo de oxigênio em relação ao de enxofre, pois na subclasse das cisteíno endopeptidases, não é necessário auxílio na ativação.

As enzimas secretadas (exoenzimas) apresentam maior interesse biotecnológico, pois a sua extração e purificação são menos complexas e onerosas. É comum a sua utilização sob a forma de extratos, ou mesmo a adição do microrganismo produtor da protease diretamente no produto a ser transformado. São encontradas nos vírus e em vários microrganismos, como bactérias, protozoários, leveduras e fungos. A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas tem levado a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana.

Os microrganismos representam uma excelente fonte de proteases devido a sua grande diversidade bioquímica e facilidade de manipulação genética. As proteínas são hidrolisadas por microrganismos, que utilizam os produtos de degradação como nutrientes para sua multiplicação celular. A degradação é iniciada por endopeptidases secretadas pelos microrganismos, seguida de hidrólise posterior por exopeptidases em um sítio extra- ou intracelular. Numerosas proteinases são produzidas por microrganismos distintos, dependendo da espécie, ou mesmo por diferentes cepas de uma mesma espécie. Proteinases diferentes também podem ser produzidas pela mesma cepa, em resposta à variação nas condições de cultura. A maioria das serina proteinases comerciais, principalmente as alcalinas e neutras, são produzidas por

organismos que pertencem ao gênero *Bacillus*. As subtilisinas são as representantes deste grupo. Enzimas similares também são produzidas por outras bactérias, como por exemplo, bactérias do gênero *Clostridium*, *Haemophilus*, *Aeromonas*, *Lactobacillus* e *Serratia*. Os fungos também produzem serina proteinases; principalmente por várias linhagens de *Aspergillus oryzae*. As cisteíno endopeptidases não são encontradas tão amplamente como as serino- e as aspártico endopeptidases. As proteases microbianas representam cerca de 40% da venda total mundial de enzimas.

Lipases

Lipases são serina hidrolases e contém a seqüência G-X₁-S-X₂-G como meio catalítico, onde G=glicina, S=serina, X₁=histidina e X₂=ácido aspártico ou glutâmico. Elas normalmente não catalisam reações paralelas (SAID, 2004), são estáveis em altas temperaturas, na presença de solventes orgânicos e não requerem co-fatores.

Lipases catalisam a hidrólise de acilgliceróis em ácidos graxos, di-acilgliceróis, mono-acilgliceróis e glicerol, e são ativas apenas quando adsorvidas na interface óleo-água. Segundo Godfrey & West, na interface, o substrato é hidrolisado 1000 vezes mais rápido que em solução, sendo que a atividade da enzima é maior quando o substrato é o triacilglicerídeo, e menor quando é monoacilglicerídeo. A principal diferença entre lipases e esterases é que as esterases se associam com maior atividade com substratos em solução e lipases exibem uma maior atividade com substratos em emulsão.

Como produtos da reação, ácidos carboxílicos e álcoois com um número menor de ésteres são liberados. Lipídeos e mesmo moléculas sintéticas, como ésteres, podem sofrer vários tipos de transformações catalisadas por lipases.

Lipases de microrganismos são divididas em dois grupos: não específicas, que liberam ácidos graxos em posições aleatórias, e as que hidrolisam a molécula, preferencialmente, nas posições 1 e 3.

Uma particularidade deste tipo de enzima é que podem também realizar a reação reversa da síntese de triacilgliceróis a partir de ácidos graxos livres e glicerol. Esta propriedade é extensivamente utilizada nas reações de trans e interesterificação em

solventes orgânicos para produzir acilgliceróis. Abbas diz que estas reações ocorrem em meio não aquoso.

Fontes de lipases

Lipases são produzidas por muitos microrganismos e eucariotes superiores, incluindo mamíferos, plantas, fungos e bactérias.

A maioria das lipases comerciais é de origem microbiana, sendo que os fungos são reconhecidos como os melhores produtores de lipase para aplicações industriais.

Microrganismos produtores de lipase têm sido isolados de diversos ambientes como, por exemplo, efluentes industriais, fábricas de processamento de óleos vegetais, solos contaminados com óleo, laticínios, sistemas de compostagem e fontes térmicas.

FORMULAÇÃO DE DETERGENTES

Os modernos detergentes (de + tergere = de o latim esfregar fora, limpar fora) são produtos sofisticados que contêm um grande número de ingredientes com uma variedade de funções individuais ao longo do processo de limpeza e freqüentemente também com uma inter-relação complexa entre os mesmos. Diferentes condições devem ser levadas em consideração para uma boa formulação de um detergente, como atuação em diferentes áreas geográficas, onde a temperatura influi em muito a vida de prateleira do produto, a dureza da água, isto é, a concentração de sais de cálcio, tipos de material a ser limpos e equipamentos usados para a limpeza.

Um detergente ideal deve apresentar várias características, tais como: poder de emulsificação, molhagem da superfície, poder de penetração, suspensão de materiais sólidos, alta capacidade de enxaguar o próprio detergente, capacidade de abrandamento, alta solubilidade em água, não ser corrosivo aos equipamentos, possuir segurança ao manipulador do produto e não ser um grande poluidor do ambiente.

Os primeiros detergentes estavam baseados em uma combinação de um componente alcalino, sais de sódio e potássio e gorduras vegetais e animais, pela reação de saponificação. Este sabão realiza a emulsificação das gorduras e quebra da

tensão superficial da água, dando capacidade de molhagem e penetração do produto de limpeza.

Componentes à base de fosfatos, como ortofosfatos e polifosfatos, também são usados com a função de aumentar a solubilidade, diminuir a dureza da água e evitar a redeposição de material na superfície. Entretanto, os álcalis e os fosfatos são produtos altamente agressivos ao ambiente e aos materiais, além de trazerem riscos aos operadores em função das concentrações utilizadas. Com o objetivo principal de redução do uso destes produtos, passou-se a adicionar enzimas nas formulações de detergentes. Contudo, não existe uma única substância química com capacidade de apresentar todas estas funções. Por este motivo, os detergentes são uma formulação de vários produtos. Várias substâncias são utilizadas para a formulação de um detergente. A principal delas são os surfactantes, que podem ter um caráter iônico ou não iônico. Para diminuir a dureza da água também são utilizados agentes complexantes, como EDTA, ácido nitrilotriacético e gluconato de sódio.

Diversos outros produtos também são adicionados aos detergentes para proporcionar características específicas de acordo com o uso, tais como, dispersantes, amaciantes, umectantes, anti-umectantes, branqueadores ópticos, alvejantes e antiespumantes.

Surfactantes

A água tende a adotar uma forma que minimize sua área de superfície, numa tentativa de manter as moléculas com uma maior coesão possível. Suas gotas tendem a assumir a forma esférica, pois a esfera é a forma geométrica com a menor razão superfície/volume. Para perturbar a superfície desta gota é necessário a realização de algum trabalho. Este fenômeno confere ao líquido uma "casca" de moléculas na superfície, produto de um desbalanceamento das forças intermoleculares no líquido. A tensão superficial da água é diminuída pela adição de surfactantes.

As moléculas de surfactantes possuem duas regiões distintas: uma delas apolar e outra polar ou iônica. Os surfactantes podem ser neutros ou iônicos. Os iônicos podem ser catiônicos ou aniônicos ou, ainda, anfóteros, quando ambas cargas estão presentes no surfactante.

Após uma certa concentração, as moléculas de surfactantes em solução formam agregados denominados micelas, onde as regiões hidrofóbicas formam um núcleo apolar, e são mantidas afastadas das moléculas de água, que interagem somente com a camada externa da micela, formada pelos grupos hidrofílicos do surfactante.

Processo de micelização

Uma das características comum a todos os surfactantes é a capacidade de formar agregados em solução aquosa a partir de uma determinada concentração. A micela se forma quando a concentração de moléculas de surfactante alcança a chamada concentração crítica micelar (cmc) que é uma propriedade intrínseca e característica do surfactante. A razão que leva os monômeros de surfactante a se associarem sobre a forma de micelas é a diminuição da área de contato entre as cadeias hidrocarbônicas do surfactante e a água. A formação do agregado, porém, leva o surfactante a uma situação onde os grupos hidrofílicos estão muito próximos, gerando uma repulsão eletrostática que se opõe ao processo de micelização. Os contra-íons desempenham um papel fundamental: quando em concentração suficiente (proveniente da própria ionização do surfactante ou, ainda, como aditivos à solução), blindam a carga do agregado, diminuindo o potencial elétrico e a repulsão entre as cabeças dos monômeros.

Dentre os modelos mais aceitos de formação de micela está o modelo de Stigter, onde os monômeros se organizariam em forma esférica, onde todas as porções hidrofóbicas do surfactante estariam voltadas para o centro, formando o núcleo, e os grupamentos hidrofílicos na superfície da esfera, formando a interface com a água. O diâmetro do núcleo da micela varia com o tamanho da cauda do surfactante. Em volta deste núcleo existe uma camada intermediária, denominada camada de Stern. A camada de Stern compreende a parte compacta da dupla camada elétrica que circunda a superfície externa da esfera micelar. Esta é formada pelas cabeças iônicas do surfactante e seus respectivos contra-íons não dissociados, onde existe uma quantidade apreciável de água.

Outra camada, mais difusa, a qual contém os íons remanescentes, é denominada de camada de Gouy-Chapman, onde a micela exerce uma atração eletrostática sobre

os contra-íons em solução, criando um gradiente de concentração de contra-íons a sua volta.

Os surfactantes iônicos possuem dois tipos de comportamento em solução aquosa. Abaixo da cmc os monômeros comportam-se como eletrólito forte. Após a micelização, cada monômero adicionado contribui para a formação de micelas. A micela não é completamente ionizada, e apenas uma fração de íons fica livre na solução.

AS ENZIMAS NA FORMULAÇÃO DE DETERGENTES

O ramo industrial de produção de detergentes representa cerca de 60% do consumo mundial de enzimas. Os detergentes atualmente apresentam um espectro de ação e de utilização bastante amplo, havendo, conseqüentemente, a necessidade de especialização das formulações. A principal vantagem da formulação de detergentes contendo enzimas é a substituição de produtos cáusticos, ácidos e solventes.

Röhm (1913) desenvolveu o primeiro método de lavagem de tecidos com detergentes que continham enzimas, fabricando a primeira formulação destes detergentes. A empresa de Röhm patenteou o produto em 1913 e a preparação foi comercializada até os anos sessenta. A formulação do produto baseava-se na enzima pancreática, tripsina. O produto não obteve grande sucesso, pois a tripsina não era suficientemente ativa em formulações fortemente alcalinas, obtidos após a diluição do detergente.

Em 1959, ocorreu um desenvolvimento marcante na indústria de detergentes. O químico suíço Jaag, que trabalhou para a companhia de detergentes Gebrüder Schnyder em Biel, Suíça, desenvolveu um produto novo denominado Bio 40 que continha uma protease bacteriana em substituição à tripsina. Embora a protease bacteriana fosse mais adequada ao propósito, este ainda não era o produto ideal. Em 1962, a empresa Novo Nordisk® lançou no mercado um produto denominado Alcalase®. A ação desta protease alcalina não era afetada por outros componentes do detergente em pó e era eficaz nas temperaturas desejadas.

O primeiro grande sucesso de mercado de um detergente formulado com enzimas foi o Biotex que continha Alcalase® e foi produzido pela KORTMAN & SCHULTE (atualmente Kortman Intradal) em colaboração com Gebrüder Schnyder. O

sucesso deste produto marcou uma real inovação na utilização de enzimas em detergentes.

O uso de enzimas para propósitos industriais progrediu rapidamente após 1965, devido, principalmente, ao uso crescente de enzimas em detergentes. Entretanto, houve um retrocesso temporário no início da década de setenta quando se averiguou que as enzimas, assim como todas as outras proteínas, poderiam causar reações alérgicas.

Por iniciativa do "Food and Drug Administration" (FDA), a "National Academy of Science" (NAS) efetuou uma investigação completa deste assunto. A NAS, em seu relatório de 1971, concluiu que aquelas enzimas utilizadas nos detergentes não só são inofensivas aos consumidores, como também provêm vantagens tecnológicas definidas. A indústria de detergentes ainda é a maior consumidora de enzimas industriais e constantemente estão sendo desenvolvidos produtos novos de enzimas para uso em detergentes. A principal inovação neste campo foi à introdução, em 1988, de uma formulação com lipase.

A preocupação crescente com o ambiente fez com que os fabricantes de detergente reavaliassem as formulações existentes. Um exemplo está na fabricação de detergentes de máquinas de lavar louças automáticas no mercado europeu. A substituição de muitos dos ingredientes que agrediam o meio ambiente por enzimas tornou possível a manutenção do mesmo desempenho. Estas enzimas têm a grande vantagem de serem 100% biodegradáveis. Uma nova geração destes produtos sem fosfato e cloro alvejante, contendo apenas enzimas com formulação mais segura e menos cáustica, foi introduzida na Europa. Espera-se, futuramente, que combinações biológicas enzimáticas substituam, cada vez mais, os ingredientes menos aceitáveis do ponto de vista ambiental nas formulações de detergentes.

Os processos enzimáticos proporcionam economia de energia e não necessitam investimento em equipamento especial resistente a calor, pressão ou corrosão. Devido à sua eficiência, ação específica, condições moderadas nas quais atuam e à alta biodegradabilidade, as enzimas são ferramentas importantes para uma extensiva aplicação industrial.

O uso de enzimas, em particular as amilases, em processos industriais, satisfaz às exigências das normas de ISO 9000 e ISO 14000 de baixo impacto ambiental, além da redução de gastos energéticos associados ao aumento da qualidade do produto. O Brasil vem gastando muito na importação de enzimas, principalmente as amilolíticas.

As projeções indicam que combinações biológicas enzimáticas venham a substituir, cada vez mais, os ingredientes menos aceitáveis do ponto de vista ambiental nas formulações de detergentes. A interação de empresas com grupos e centros de pesquisa irá, certamente, acelerar este processo. Atualmente, a indústria enfrenta um enorme desafio: tem a obrigação de proteger o ambiente, enquanto produz bens, serviços e empregos necessários para a sociedade. Como a conservação de recursos naturais e a proteção ao meio ambiente adquirem cada vez maior importância, a aplicação de novas enzimas para uma gama extensiva de indústrias surge como uma solução econômica e ecologicamente viável.

Reivindicações

DETERGENTE ENZIMÁTICO ÁCIDO PARA LIMPEZA DE ORDENHADEIRAS

1. Detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras.
2. Detergente enzimático, conforme reivindicação 1, caracterizado pela presença de duas enzimas, protease e lipase.
3. Detergente enzimático, conforme reivindicação 1, caracterizado pelo pH de utilização na faixa de 5,0 a 7,0.
4. Detergente enzimático, conforme reivindicação 1, caracterizado pela temperatura de utilização na faixa de 35 a 50° C.
5. Detergente enzimático, conforme reivindicação 1, caracterizado pela utilização de surfactantes iônicos e não iônicos como tensoativo.
6. Composição de limpeza contendo lipase e protease ácidas.
7. Composição de limpeza, conforme reivindicação 5, caracterizadas pela utilização de outras enzimas como amilases, celulasas, proteases e lipases.
8. Composição de limpeza, conforme reivindicação 5, caracterizada pela utilização na higienização de resfriadores, linhas de leite e equipamentos em geral da indústria, e de uso doméstico.
9. Método de limpeza compreendendo o seguinte procedimento:
 - I) Preparo da solução detergente colocando o produto em água;
 - II) Aquecimento da solução detergente entre 35 e 50° C;
 - III) Imersão de objetos no tanque.
10. Método de limpeza compreendendo o seguinte procedimento:
 - I) Pré-lavagem da tubulação com água;
 - II) Preparo da solução detergente colocando o produto em água;
 - III) Introdução da solução detergente no sistema.
11. Método de limpeza, conforme reivindicação 10, cuja solução detergente é bombeada para o sistema de ordenha.

Resumo

DETERGENTE ENZIMÁTICO ÁCIDO PARA LIMPEZA DE ORDENHADEIRAS

Detergente enzimático ácido para limpeza de ordenhadeiras, contendo duas enzimas, protease e lipase em formulação líquida. A precipitação de sais da água de limpeza e conseqüente acúmulo na ordenhadeira é evitada pelo pH do detergente, na faixa de 5,0 a 7,0.

ANEXO 2

Detalhamento dos custos com matéria-prima, energia elétrica e água para produção das enzimas

Custo de produção de protease em 30 m³.

Etapa 1 Manutenção do microrganismo							
Material de consumo							
Materia Prima	Concent. (%)	Vol ml	Quant.	Unidade	Preço mat. Prima	Custo	
Meio de Cultura	Peptona	2	50	0,0010	kg	R\$ 180,00	R\$ 0,18000
Meio de Cultura	Glicose	1	50	0,0005	kg	R\$ 14,00	R\$ 0,00700
Meio de Cultura	Glicerol	20	10	0,0020	kg	R\$ 24,00	R\$ 0,04800
Plásticos	Tubos de criog.			50,0000	peça	R\$ 0,50	R\$ 25,00000
Vidraria	Erlenmeyer		250	0,0500	peça	R\$ 7,00	R\$ 0,35000
Total						R\$ 25,58500	
Água							
Lavagem Refrig. destilador				5,0000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,01430
Destilada Dest. p/ autoclave				0,8000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00229
				0,0600	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00017
				0,1000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00029
Total						R\$ 0,01705	
Energia Elétrica							
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh	Custo
Refr. com freezer	50kWh/mês			150,0000		R\$ 0,2806	R\$ 42,08550
Autoclave	4.000	60,00	1,00	4,0000		R\$ 0,2806	R\$ 1,12228
Destilador	4.000	1,92	0,03	0,1280		R\$ 0,2806	R\$ 0,03591
Incub. orbital Capela Fluxo Lâminar	800	2.880,00	48,00	38,4000		R\$ 0,2806	R\$ 10,77389
Centrifuga	500	60,00	1,00	0,5000		R\$ 0,2806	R\$ 0,14029
Microondas	250	30,00	0,50	0,1250		R\$ 0,2806	R\$ 0,03507
Microscópio	1.000	10,00	0,17	0,1667		R\$ 0,2806	R\$ 0,04676
	15	10,00	0,17	0,0025		R\$ 0,2806	R\$ 0,00070
Total						R\$ 54,24040	
Teste de éster..							
Material de consumo							
Materia Prima	Concent. (%)	Vol	Quant.	Unidade	Preço mat. Prima	Custo	
Reagente	Solução Violeta de Genciana		0,0050	L	R\$ 16,00	R\$ 0,08000	
Reagente	Lugol		0,0050	L	R\$ 24,00	R\$ 0,12000	
Reagente	Acetona		0,0003	L	R\$ 13,50	R\$ 0,00338	
Reagente	Álcool		0,0003	L	R\$ 2,00	R\$ 0,00050	
Reagente	Solução de Safranina		0,0050	L	R\$ 22,00	R\$ 0,11000	
Meio de cultura	Peptona	0,5	50	0,0003	kg	R\$ 160,00	R\$ 0,04000
Meio de cultura	Extrato de carne	0,3	50	0,0002	kg	R\$ 612,00	R\$ 0,09180
Meio de cultura	Ágar	2	50	0,0010	kg	R\$ 254,00	R\$ 0,25400
Plástico	Placa de Petri			2,0000	peça	R\$ 0,40	R\$ 0,80000
Vidraria	Lâmina de vidro			1,0000	peça	R\$ 0,05	R\$ 0,05000
Total						R\$ 1,54968	
Água							
Lavagem Refr. destilador				5,0000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,01430
Destilada Dest. p/ autoclave				0,7500	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00215
				0,0500	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00014
				0,1000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00029
Total						R\$ 0,01687	
Energia Elétrica							

Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh	Preço kWh	Custo
Estufa	150	60,00	1,00	0,1500	R\$ 0,2806	R\$ 0,04209
Autoclave	4.000	60,00	1,00	4,0000	R\$ 0,2806	R\$ 1,12228
Destilador	4.000	1,80	0,03	0,1200	R\$ 0,2806	R\$ 0,03367
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500	R\$ 0,2806	R\$ 0,07014
Microondas	1.000	5,00	0,08	0,0833	R\$ 0,2806	R\$ 0,02338
Microscópio	15	5,00	0,08	0,0013	R\$ 0,2806	R\$ 0,00035
Total						R\$ 1,29191
Total para 50 ependorff						R\$ 82,70090
TOTAL P/ 1 ependorff						R\$ 1,6540

Etapa 2 Ativação de células							
Mat. de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume ml	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima	Custo
Meio de Cultura	Extrato de carne	0,3	20	0,0001	kg	R\$ 612,00	R\$ 0,03672
Meio de Cultura	Peptona	0,5	20	0,0001	kg	R\$ 160,00	R\$ 0,01600
Vidraria	Tubo de ensaio		50	0,1000	peça	R\$ 0,30	R\$ 0,03000
Total						R\$ 0,08272	
Água							
Lavagem				2,0000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00572
Refri. destilador				0,6000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00172
Destilada				0,0200	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00006
Dest. p/ autoclave				0,1000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00029
Total						R\$ 0,00778	
Energia Elétrica							
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh	Preço kWh	Custo	
Destilador	4.000	1,44	0,02	0,0960	R\$ 0,2806	R\$ 0,02693	
Incub. orbital	800	1.440,00	24,00	19,2000	R\$ 0,2806	R\$ 5,38694	
Autoclave	4.000	60,00	1,00	4,0000	R\$ 0,2806	R\$ 1,12228	
Capela Fluxo Laminar	500	30,00	0,50	0,2500	R\$ 0,2806	R\$ 0,07014	
Total						R\$ 6,60630	
Teste de esterilid.							
Mat. de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima	Custo
Reagente	Solução Violeta de Genciana			0,0050	L	R\$ 16,00	R\$ 0,08000
Reagente	Lugol			0,0050	L	R\$ 24,00	R\$ 0,12000
Reagente	Acetona			0,0003	L	R\$ 13,50	R\$ 0,00338
Reagente	Álcool			0,0003	L	R\$ 2,00	R\$ 0,00050
Reagente	Solução de Safranina			0,0050	L	R\$ 22,00	R\$ 0,11000
Vidraria	Lâmina de vidro			1,0000	peça	R\$ 0,05	R\$ 0,05000
Total						R\$ 0,36388	
Água							
Lavagem				1,0000	L	R\$ 0,0025	R\$ 0,00250
Total						R\$ 0,00250	
Energia Elétrica							
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh	Preço kWh	Custo	
Capela Fluxo Lâminar	500	30,00	0,50	0,2500	R\$ 0,2806	R\$ 0,07014	
Microscópio	15	5,00	0,08	0,0013	R\$ 0,2806	R\$ 0,00035	
Total						R\$ 0,07049	
Total para 2 tubos 20 ml						R\$ 7,1337	

Etapa 3 Inóculo da Pré-produção							
Mat. de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Vol. ml	Quant.	Unidade	Preço mat. Prima	Custo
Meio de Cultura	proteína de soja	2	200	0,0040	kg	R\$ 4,16	R\$ 0,01664
Vidraria	Erlenmayer	1	1000	0,0500	peça	R\$ 12,00	R\$ 0,60000
						Total	R\$ 0,61664
Água							
Lavagem				5,0000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,01430
Refrig. destilador				1,5000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00429
Destilada				0,2000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00057
Desti. p/ autoclave				0,1000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00029
						Total	R\$ 0,01945
Energia Elétrica							
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh	Custo
Destilador	4.000	3,60	0,06	0,2400		R\$ 0,2806	R\$ 0,06734
Incubadora orbital	800	720,00	12,00	9,6000		R\$ 0,2806	R\$ 2,69347
Autoclave	4.000	60,00	1,00	4,0000		R\$ 0,2806	R\$ 1,12228
Capela Fluxo Laminar	500	30,00	0,50	0,2500		R\$ 0,2806	R\$ 0,07014
						Total	R\$ 3,95323
Teste de esterilid.							
Mat. de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima	Custo
Reagente	Solução Violeta de Genciana			0,0050	L	R\$ 16,00	R\$ 0,08000
Reagente	Lugol			0,0050	L	R\$ 24,00	R\$ 0,12000
Reagente	Acetona			0,0003	L	R\$ 13,50	R\$ 0,00338
Reagente	Álcool			0,0003	L	R\$ 2,00	R\$ 0,00050
Reagente	Solução de Safranina			0,0050	L	R\$ 22,00	R\$ 0,11000
Vidraria	Lâmina de vidro			1,0000	peça	R\$ 0,05	R\$ 0,05000
						Total	R\$ 0,36388
Água							
Lavagem				1,0000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00286
						Total	R\$ 0,00286
Energia Elétrica							
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh	Custo
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$ 0,2806	R\$ 0,07014
Microscópio	15	5,00	0,08	0,0013		R\$ 0,2806	R\$ 0,00035
						Total	R\$ 0,07049
						Total para 1 Erlenmayer c/ 200ml	R\$ 5,0265

Etapa 4 Pré-produção em 10 litros							
Material de consumo							
	Materia Prima	Conc. (%)	Vol. ml	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima	Custo
Meio de Cultura	proteina de soja	2	10000	0,2000	kg	R\$ 4,16	R\$ 0,83200
Reagente	Anti-espumante	0,05	10000	0,0050	L	R\$ 6,20	R\$ 0,03100
Reagente	NaOH	0,04	10000	0,0040	Kg	R\$ 12,70	R\$ 0,05080
						Total	R\$ 0,91380
Água							
Lavagem				20,0000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,05720
Refrig. destilador				50,5000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,14443
Destilada				10,0000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,02860
Dest. p/ autoclave				0,1000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00029
						Total	R\$ 0,23052
Energia Elétrica							
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh	Custo
Destilador	4.000	121,20	2,02	8,0800		R\$ 0,2806	R\$ 2,26701
Compressor	5.500	11,25	0,19	1,0313		R\$ 0,2806	R\$ 0,28934
Fermentador	200	720,00	12,00	2,4000		R\$ 0,2806	R\$ 0,67337
Autoclave	4.000	60,00	1,00	4,0000		R\$ 0,2806	R\$ 1,12228
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$ 0,2806	R\$ 0,07014
						Total	R\$ 4,42213
Teste de esterilid.							
Mat. de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima	Custo
Reagente	Solução Violeta de Genciana			0,0050	L	R\$ 16,00	R\$ 0,08000
Reagente	Lugol			0,0050	L	R\$ 24,00	R\$ 0,12000
Reagente	Acetona			0,0003	L	R\$ 13,50	R\$ 0,00338
Reagente	Álcool			0,0003	L	R\$ 2,00	R\$ 0,00050
Reagente	Solução de Safranina			0,0050	L	R\$ 22,00	R\$ 0,11000
Vidraria	Lâmina de vidro			1,0000	peça	R\$ 0,05	R\$ 0,05000
						Total	R\$ 0,36388
Água							
Lavagem				1,0000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00286
						Total	R\$ 0,00286
Energia Elétrica							
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh	Custo
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$ 0,2806	R\$ 0,07014
Microscópio	15	5,00	0,08	0,0013		R\$ 0,2806	R\$ 0,00035
						Total	R\$ 0,07049
						Total para 1 reator 10 L	R\$ 6,0037

Etapa 5		Pré-produção em 100 litros						
Mat. de consumo	Materia Prima	Conc. (%)	Volume ml	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima		Custo
Meio de Cultura	proteína de soja	2	100000	2,0000	kg	R\$ 4,16	R\$	8,32000
Reagente	Anti-espumante	0,05	100000	0,0500	L	R\$ 6,20	R\$	0,31000
Reagente	NaOH	0,04	100000	0,0400	Kg	R\$ 12,70	R\$	0,50800
						Total	R\$	9,13800
Água								
Lavagem				1400,0000	L	R\$ 0,0029	R\$	4,00400
						Total	R\$	4,00400
Energia Elétrica								
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh		Custo
Compressor	5.500	45,00	0,75	4,1250		R\$ 0,2806	R\$	1,15735
Fermentador	735	720,00	12,00	8,8200		R\$ 0,2806	R\$	2,47463
Caldeira	6	60,00	1,00	6,0000		R\$ 1,8000	R\$	10,80000
Capela Fluxo Laminar	500	30,00	0,50	0,2500		R\$ 0,2806	R\$	0,07014
						Total	R\$	14,50212
Teste de esterilid.								
Mat. de consumo	Materia Prima	Conc. (%)	Volume	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima		Custo
Reagente	Solução Violeta de Genciana			0,0050	L	R\$ 16,00	R\$	0,08000
Reagente	Lugol			0,0050	L	R\$ 24,00	R\$	0,12000
Reagente	Acetona			0,0003	L	R\$ 13,50	R\$	0,00338
Reagente	Álcool			0,0003	L	R\$ 2,00	R\$	0,00050
Reagente	Solução de Safranina			0,0050	L	R\$ 22,00	R\$	0,11000
Vidraria	Lâmina de vidro			1,0000	peça	R\$ 0,05	R\$	0,05000
						Total	R\$	0,36388
Água								
Lavagem				1,0000	L	R\$ 0,0029	R\$	0,00286
						Total	R\$	0,00286
Energia Elétrica								
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh		Custo
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$ 0,2806	R\$	0,07014
Microscópio	15	5,00	0,08	0,0013		R\$ 0,2806	R\$	0,00035
						Total	R\$	0,07049
						Total para 1 reator 100 L	R\$	28,0813

Etapa 6		Produção em 1000 L						
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume ml	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima		Custo
Meio de Cultura	proteína de soja	2	1000000	20,0000	kg	R\$ 4,16	R\$	83,20000
Reagente	Anti-espumante	0,05	1000000	0,5000	L	R\$ 6,20	R\$	3,10000
Reagente	NaOH	0,04	1000000	0,4000	Kg	R\$ 12,70	R\$	5,08000
						Total	R\$	91,38000
Água								
Lavagem				2500,0000	L	R\$ 0,0029	R\$	7,15000
						Total	R\$	98,53000
Energia Elétrica e consumo caldeira								
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh		Custo
Compressor	5.500	360,00	6,00	33,0000		R\$ 0,2806	R\$	9,25881
Fermentador	1.470	720,00	12,00	17,6400		R\$ 0,2806	R\$	4,94925
Caldeira	6	180,00	3,00	18,0000		R\$ 1,8000	R\$	32,40000
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$ 0,2806	R\$	0,07014
						Total	R\$	46,67821
Teste de esterilidade								
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima		Custo
Reagente	Solução Violeta de Genciana			0,0050	L	R\$ 16,00	R\$	0,08000
Reagente	Lugol			0,0050	L	R\$ 24,00	R\$	0,12000
Reagente	Acetona			0,0003	L	R\$ 13,50	R\$	0,00338
Reagente	Álcool			0,0003	L	R\$ 2,00	R\$	0,00050
Reagente	Solução de Safranina			0,0050	L	R\$ 22,00	R\$	0,11000
Vidraria	Lâmina de vidro			1,0000	peça	R\$ 0,05	R\$	0,05000
						Total	R\$	0,36388
Água								
Lavagem				1,0000	L	R\$ 0,0029	R\$	0,00286
						Total	R\$	0,00286
Energia Elétrica								
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh		Custo
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$ 0,2806	R\$	0,07014
Microscópio	15	5,00	0,08	0,0013		R\$ 0,2806	R\$	0,00035
						Total	R\$	0,07049
Total para 1 reator 1000 L							R\$	237,0254

Etapa 7		Produção em 30000 L						
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume L	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima		Custo
Meio de Cultura	proteina de soja	2	30000	600,0000	kg	R\$ 4,16	R\$	2.496,00000
Reagente	Anti-espumante	0,05	30000	15,0000	L	R\$ 6,20	R\$	93,00000
Reagente	NaOH	0,04	30000	12,0000	Kg	R\$ 12,70	R\$	152,40000
						Total	R\$	2.741,40
Água								
Lavagem				36.000	L	R\$ 0,0029	R\$	102,96000
						Total	R\$	2.844,36
Energia Elétrica e consumo caldeira								
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh		Custo
Compressor	5.500	1.440,00	24,00	132,0000		R\$ 0,2806	R\$	37,03524
Fermentador	11.000	1.440,00	24,00	264,0000		R\$ 0,2806	R\$	74,07048
Caldeira	6	360,00	6,00	36,0000		R\$ 1,8000	R\$	64,80000
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$ 0,2806	R\$	0,07014
						Total	R\$	175,97586
Teste de esterilidade								
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima		Custo
Reagente	Solução Violeta de Genciana			0,0050	L	R\$ 16,00	R\$	0,08000
Reagente	Lugol			0,0050	L	R\$ 24,00	R\$	0,12000
Reagente	Acetona			0,0003	L	R\$ 13,50	R\$	0,00338
Reagente	Álcool			0,0003	L	R\$ 2,00	R\$	0,00050
Reagente	Solução de Safranina			0,0050	L	R\$ 22,00	R\$	0,11000
Vidraria	Lâmina de vidro			1,0000	peça	R\$ 0,05	R\$	0,05000
						Total	R\$	0,36388
Água								
Lavagem				1,0000	L	R\$ 2,8600	R\$	0,00286
						Total	R\$	0,00286
Energia Elétrica								
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh		Custo
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$ 0,2806	R\$	0,07014
Microscópio	15	5,00	0,08	0,0013		R\$ 0,2806	R\$	0,00035
						Total	R\$	0,07049
Total para 1 reator 1000 L							R\$	3.020,7731

Etapa 8							
Controle de atividade enzimática							
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume ml	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima	Custo
Reagente	Azocaseína	2	1,2	0,0000	kg	R\$ 12.500,00	R\$ 0,30000
Reagente	Tampão fosfato 0,2 M pH 8,0		2,4	0,0024	L	R\$ 1,00	R\$ 0,00240
Reagente	TCA	14	96	0,0134	Kg	R\$ 255,00	R\$ 3,42720
Plástico	Cubeta			3,0000	peça	R\$ 0,45	R\$ 1,35000
Plástico	Ponteiras P200			6,0000	peça	R\$ 0,10	R\$ 0,60000
Plástico	Ponteiras P1000			3,0000	peça	R\$ 0,10	R\$ 0,30000
Total							R\$ 5,97960
Água							
Lavagem				1,0000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00286
Refr. destilador				60,0000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,17160
Destilada				12,0000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,03432
Total							R\$ 0,20878
Energia Elétrica							
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh	Custo
Banho d'água	200	10,00	0,17	0,0333		R\$ 0,2806	R\$ 0,00935
Centrifuga	250	5,00	0,08	0,0208		R\$ 0,2806	R\$ 0,00585
Total							R\$ 0,01520
Total para 1 reator 100 L							R\$ 6,2036

Etapa 9							
Centrifugação							
Energia Elétrica							
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	KwH		Preço kWh	Custo
Centrif. 30000 L	2.000,00	1.800,00	30,00	60,0000		R\$ 0,2806	R\$ 16,83420
Água							
Lavagem				500,0000	L	R\$ 0,0029	R\$ 1,43000
TOTAL P/ 1000 L							R\$ 18,26420

Etapa 10							
Concentração							
Energia Elétrica							
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	KwH		Preço kWh	Custo
Bomba Conc. 30000L	3.675,00	2.880	48	176,4000		R\$ 0,2806	R\$ 49,49255
Água							
Lavagem				3000,0000	L	R\$ 2,8600	R\$ 8,58
TOTAL P/ 1000 L							R\$ 58,07255

Custo total de produção de protease em reator de 30 m³: R\$ 3.388,24

Custo por litro de enzima: R\$ 13,55

Custo de produção de lipase em 30 m³.

Etapa 1							
Manutenção do microrganismo							
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume ml	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima	Custo
Meio de Cultura	Peptona	1	50	0,0005	kg	R\$ 8,00	R\$ 0,00400
Meio de Cultura	Glicose	2	50	0,0010	kg	R\$ 14,00	R\$ 0,01400
Meio de Cultura	Glicerol	20	10	0,0020	kg	R\$ 24,00	R\$ 0,04800
Plástico	Tubos para criogenia			50,0000	peça	R\$ 0,50	R\$ 25,00000
Vidraria	Erlemeyer		250	0,0500	peça	R\$ 7,00	R\$ 0,35000
Água						Total	R\$ 25,41600
Lavagem				5,0000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,01430
Refr. Dest.				0,8000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00229
Destilada				0,0600	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00017
Dest. autoclave				0,1000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00029
						Total	R\$ 0,01705
Energia Elétrica							
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh	Custo
Refr. com freezer	50kWh/mês			150,0000		R\$ 0,2806	R\$ 42,08550
Autoclave	4.000	60,00	1,00	4,0000		R\$ 0,2806	R\$ 1,12228
Destilador	4.000	1,92	0,03	0,1280		R\$ 0,2806	R\$ 0,03591
Incub. orbital	800	2.880,00	48,00	38,4000		R\$ 0,2806	R\$ 10,77389
Capela Fluxo	500	60,00	1,00	0,5000		R\$ 0,2806	R\$ 0,14029
Centrifuga	250	30,00	0,50	0,1250		R\$ 0,2806	R\$ 0,03507
Microondas	1.000	10,00	0,17	0,1667		R\$ 0,2806	R\$ 0,04676
Microscópio	15	10,00	0,17	0,0025		R\$ 0,2806	R\$ 0,00070
						Total	R\$ 54,24040
Teste de estéril.							
Mat. De cons.	Materia Prima	Concent. (%)	Volume	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima	Custo
Reagente	Solução Violeta de Genciana			0,0050	L	R\$ 16,00	R\$ 0,08000
Reagente	Lugol			0,0050	L	R\$ 24,00	R\$ 0,12000
Reagente	Acetona			0,0003	L	R\$ 13,50	R\$ 0,00338
Reagente	Álcool			0,0003	L	R\$ 2,00	R\$ 0,00050
Reagente	Solução de Safranina			0,0050	L	R\$ 22,00	R\$ 0,11000
Meio de cultura	Peptona	0,5	50	0,0003	kg	R\$ 160,00	R\$ 0,04000
Meio de cultura	Extrato de carne	0,3	50	0,0002	kg	R\$ 612,00	R\$ 0,09180
Meio de cultura	Ágar	2	50	0,0010	kg	R\$ 254,00	R\$ 0,25400
Plástico	Placa de Petri			2,0000	peça	R\$ 0,40	R\$ 0,80000
Vidraria	Lâmina de vidro			1,0000	peça	R\$ 0,05	R\$ 0,05000
Água						Total	R\$ 1,54968
Lavagem				5,0000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,01430
Refr. destilador				0,7500	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00215
Destilada				0,0500	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00014
Dest. autoclave				0,1000	L	R\$ 0,0029	R\$ 0,00029
						Total	R\$ 0,01687
Energia Elétrica							
Equip.	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh	Custo
Estufa	150	60,00	1,00	0,1500		R\$ 0,2806	R\$ 0,04209
Autoclave	4.000	60,00	1,00	4,0000		R\$ 0,2806	R\$ 1,12228
Destilador	4.000	1,80	0,03	0,1200		R\$ 0,2806	R\$ 0,03367
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$ 0,2806	R\$ 0,07014

Microondas	1.000	5,00	0,08	0,0833		R\$ 0,2806	R\$	0,02338
Microscópio	15	5,00	0,08	0,0013		R\$ 0,2806	R\$	0,00035
Total para 50 tubos de criogenia							R\$	82,53190
TOTAL P/ 1 tubo de criogenia							R\$	1,6506

Etapa 2 Preparação da suspensão de esporos								
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume ml	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima		Custo
Meio de Cultura	Glicose	2	100	0,0020	kg	R\$	14,00	R\$ 0,02800
Meio de Cultura	Peptona	1	100	0,0010	kg	R\$	8,00	R\$ 0,00800
Meio de Cultura	Agar	1,5	100	0,0015	kg	R\$	390,00	R\$ 0,58500
Plástico	Falcon 50 mL			1,0000	peça	R\$	0,80	R\$ 0,80000
Plástico	Placa de Petri plástica			5,0000	peça	R\$	0,40	R\$ 2,00000
Total							R\$	3,42100

Água

Lavagem				2,0000	L	R\$	2,8600	R\$ 0,00572
Refr. destilador				0,6000	L	R\$	2,8600	R\$ 0,00172
Destilada				0,0200	L	R\$	2,8600	R\$ 0,00006
Dest. autoclave				0,1000	L	R\$	2,8600	R\$ 0,00029
Total							R\$	0,00778

Energia Elétrica

Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh		Custo
Destilador	4.000	1,44	0,02	0,0960		R\$	0,2806	R\$ 0,02693
Estufa Bact.	150	8.640,00	144,00	21,6000		R\$	0,2806	R\$ 6,06031
Autoclave	4.000	60,00	1,00	4,0000		R\$	0,2806	R\$ 1,12228
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$	0,2806	R\$ 0,07014
Total							R\$	7,27967

Teste de esterilidade

Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima		Custo
Reagente	Solução Violeta de Genciana			0,0050	L	R\$	16,00	R\$ 0,08000
Reagente	Lugol			0,0050	L	R\$	24,00	R\$ 0,12000
Reagente	Acetona			0,0003	L	R\$	13,50	R\$ 0,00338
Reagente	Álcool			0,0003	L	R\$	7,20	R\$ 0,00180
Reagente	Solução de Safranina			0,0050	L	R\$	22,00	R\$ 0,11000
Vidraria	Lâmina de vidro			1,0000	peça	R\$	0,05	R\$ 0,05000
Total							R\$	0,36518

Água

Lavagem				1,0000	L	R\$	0,0025	R\$ 0,00250
							R\$	0,00250

Energia Elétrica

Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh		Custo
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$	0,2806	R\$ 0,07014
Microscópio	15	5,00	0,08	0,0013		R\$	0,2806	R\$ 0,00035
Total							R\$	0,07049
Total para 2 tubos 20 ml							R\$	11,1466

Etapa 3								
Pré-produção em 10 litros								
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume ml	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima		Custo
Meio de Cultura	Glicose	2	10000	0,2000	kg	R\$	14,00	R\$ 2,80000
Meio de Cultura	Peptona	1	10000	0,1000	kg	R\$	8,00	R\$ 0,80000
Reagente	Anti-espumante	0,05	10000	0,0050	L	R\$	6,20	R\$ 0,03100
							Total	R\$ 3,63100
Água								
Lavagem				20,0000	L	R\$	0,0029	R\$ 0,05720
Refr. destilador				50,5000	L	R\$	0,0029	R\$ 0,14443
Destilada				10,0000	L	R\$	0,0029	R\$ 0,02860
Dest. autoclave				0,1000	L	R\$	0,0029	R\$ 0,00029
							Total	R\$ 0,23052
Energia Elétrica								
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh	Preço kWh		Custo	
Destilador	4.000	121,20	2,02	8,0800	R\$	0,2806	R\$ 2,26701	
Compressor	5.500	22,50	0,38	2,0625	R\$	0,2806	R\$ 0,57868	
Fermentador	200	1.440,00	24,00	4,8000	R\$	0,2806	R\$ 1,34674	
Autoclave	4.000	60,00	1,00	4,0000	R\$	0,2806	R\$ 1,12228	
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500	R\$	0,2806	R\$ 0,07014	
							Total	R\$ 5,38484
Teste de esterilidade								
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima		Custo
Reagente	Solução Violeta de Genciana			0,0050	L	R\$	16,00	R\$ 0,08000
Reagente	Lugol			0,0050	L	R\$	24,00	R\$ 0,12000
Reagente	Acetona			0,0003	L	R\$	13,50	R\$ 0,00338
Reagente	Álcool			0,0003	L	R\$	7,20	R\$ 0,00180
Reagente	Solução de Safranina			0,0050	L	R\$	22,00	R\$ 0,11000
Vidraria	Lâmina de vidro			1,0000	peça	R\$	0,05	R\$ 0,05000
							Total	R\$ 0,36518
Água								
Lavagem				1,0000	L	R\$	0,0029	R\$ 0,00286
							Total	R\$ 0,00286
Energia Elétrica								
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh	Preço kWh		Custo	
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500	R\$	0,2806	R\$ 0,07014	
Microscópio	15	5,00	0,08	0,0013	R\$	0,2806	R\$ 0,00035	
							Total	R\$ 0,07049
							Total para 1 reator 10 L	R\$ 9,6849

Etapa 4 Pré-produção em 100 litros								
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume ml	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima		Custo
Meio de Cultura	Glicose	2	100000	2,0000	kg	R\$	14,00	R\$ 28,00000
Meio de Cultura	Peptona	1	100000	1,0000	kg	R\$	8,00	R\$ 8,00000
Reagente	Anti-espumante	0,05	100000	0,0500	L	R\$	6,20	R\$ 0,31000
							Total	R\$ 36,31000
Água								
Lavagem				400,0000	L	R\$	0,0029	R\$ 1,14400
							Total	R\$ 1,14400
Energia Elétrica								
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh		Custo
Compressor	5.500	90,00	1,50	8,2500		R\$	0,2806	R\$ 2,31470
Fermentador	1.000	1.440,00	24,00	24,0000		R\$	0,2806	R\$ 6,73368
Caldeira	6	60,00	1,00	6,0000		R\$	1,8000	R\$ 10,80000
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$	0,2806	R\$ 0,07014
							Total	R\$ 19,91853
Teste de esterilidade								
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima		Custo
Reagente	Solução Violeta de Genciana			0,0050	L	R\$	16,00	R\$ 0,08000
Reagente	Lugol			0,0050	L	R\$	24,00	R\$ 0,12000
Reagente	Acetona			0,0003	L	R\$	13,50	R\$ 0,00338
Reagente	Álcool			0,0003	L	R\$	7,20	R\$ 0,00180
Reagente	Solução de Safranina			0,0050	L	R\$	22,00	R\$ 0,11000
Vidraria	Lâmina de vidro			1,0000	peça	R\$	0,05	R\$ 0,05000
							Total	R\$ 0,36518
Água								
Lavagem				1,0000	L	R\$	0,0029	R\$ 0,00286
							Total	R\$ 0,00286
Energia Elétrica								
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh		Custo
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$	0,2806	R\$ 0,07014
Microscópio	15	5,00	0,08	0,0013		R\$	0,2806	R\$ 0,00035
							Total	R\$ 0,07049
							Total para 1 reator 100 L	R\$ 57,8111

Etapa 5								
Produção em 1000 L								
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume L	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima	Custo	
Meio de Cultura	Glicose	0,2	1000	2,0000	kg	R\$ 14,00	R\$	28,00000
Meio de Cultura	Peptona	0,5	1000	5,0000	kg	R\$ 8,00	R\$	40,00000
Reagente	Anti-espumante	0,05	1000	0,5000	L	R\$ 6,20	R\$	3,10000
						Total	R\$	71,10
Água								
Lavagem				1200,0000	L	R\$ 2,8600	R\$	3,43200
						Total	R\$	3,43
Energia Elétrica								
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh	Custo	
Compressor	5.500	720,00	12,00	66,0000		R\$ 0,2806	R\$	18,51762
Fermentador	1.470	1.440,00	24,00	35,2800		R\$ 0,2806	R\$	9,89851
Caldeira	6	180,00	3,00	18,0000		R\$ 1,8000	R\$	32,40000
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$ 0,2806	R\$	0,07014
						Total	R\$	60,88627
Teste de esterilidade								
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima	Custo	
Reagente	Solução Violeta de Genciana			0,0050	L	R\$ 16,00	R\$	0,08000
Reagente	Lugol			0,0050	L	R\$ 24,00	R\$	0,12000
Reagente	Acetona			0,0003	L	R\$ 13,50	R\$	0,00338
Reagente	Álcool			0,0003	L	R\$ 7,20	R\$	0,00180
Reagente	Solução de Safranina			0,0050	L	R\$ 22,00	R\$	0,11000
Vidraría	Lâmina de vidro			1,0000	peça	R\$ 0,05	R\$	0,05000
						Total	R\$	0,36518
Água								
Lavagem				1,0000	L	R\$ 0,0029	R\$	0,00286
						Total	R\$	0,00286
Energia Elétrica								
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh	Custo	
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$ 0,2806	R\$	0,07014
Microscópio	15	5,00	0,08	0,0013		R\$ 0,2806	R\$	0,00035
						Total	R\$	0,07049
						Total para 1 reator 1000 L	R\$	135,8568

Etapa 6							
Produção em 30000 L							
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume ml	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima	Custo
Meio de Cultura	Glicose	0,2	30000	60,0000	kg	R\$ 14,00	R\$ 840,00000
Meio de Cultura	Peptona	0,5	30000	150,0000	kg	R\$ 8,00	R\$ 1.200,00000
Meio de Cultura	Óleo de Soja	1,5	30000	450,0000	kg	R\$ 2,80	R\$ 1.260,00000
Reagente	Anti-espumante	0,05	30000	15,0000	L	R\$ 6,20	R\$ 93,00000
						Total	R\$ 3.393,00
Água							
Lavagem				36000,00	L	R\$ 2,8600	R\$ 102,96000
						Total	R\$ 102,96
Energia Elétrica							
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh	Custo
Compressor	5.500	2.880,00	48,00	264,0000		R\$ 0,2806	R\$ 74,07048
Fermentador	11.000	2.880,00	48,00	528,0000		R\$ 0,2806	R\$ 148,14096
Caldeira	6	360,00	6,00	36,0000		R\$ 1,8000	R\$ 64,80000
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$ 0,2806	R\$ 0,07014
						Total	R\$ 287,08158
Teste de esterilidade							
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima	Custo
Reagente	Solução Violeta de Genciana			0,0050	L	R\$ 16,00	R\$ 0,08000
Reagente	Lugol			0,0050	L	R\$ 24,00	R\$ 0,12000
Reagente	Acetona			0,0003	L	R\$ 13,50	R\$ 0,00338
Reagente	Álcool			0,0003	L	R\$ 7,20	R\$ 0,00180
Reagente	Solução de Safranina			0,0050	L	R\$ 22,00	R\$ 0,11000
Vidraria	Lâmina de vidro			1,0000	peça	R\$ 0,05	R\$ 0,05000
						Total	R\$ 0,36518
Água							
Lavagem				1,0000	L	R\$ 2,8600	R\$ 0,00286
						Total	R\$ 0,00286
Energia Elétrica							
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh	Custo
Capela Fluxo	500	30,00	0,50	0,2500		R\$ 0,2806	R\$ 0,07014
Microscópio	15	5,00	0,08	0,0013		R\$ 0,2806	R\$ 0,00035
						Total	R\$ 0,07049
						Total para 1 reator 1000 L	R\$ 3.783,48

Etapa 7		Controle de atividade enzimática					
Material de consumo	Materia Prima	Concent. (%)	Volume ml	Quantidade	Unidade	Preço mat. Prima	Custo
Reagente	p-NPP	0,003	3,6	0,000108	g	R\$ 103,50	R\$ 0,01118
Reagente	Tampão citrato-fosfato 0,05 M pH 5,0	89,5	3,6	0,00322	L	R\$ 1,00	R\$ 0,00322
Reagente	Goma Arábica	0,1	3,6	0,0000036	Kg	R\$ 91,20	R\$ 0,00033
Reagente	Triton X-100	0,4	3,6	0,0000144	Kg	R\$ 98,80	R\$ 0,00142
Reagente	Isopropanol	10	3,6	0,00036	Kg	R\$ 13,50	R\$ 0,00486
Plástico	Cubeta			4,0000	peça	R\$ 0,45	R\$ 1,80000
Plástico	Ponteiras P200			6,0000	peça	R\$ 0,10	R\$ 0,60000
Plástico	Ponteiras P1000			3,0000	peça	R\$ 0,10	R\$ 0,30000
Total							R\$ 2,72101
Água							
Lavagem				1,0000	L	R\$ 2,8600	R\$ 0,00286
Refrigeração destilador				60,0000	L	R\$ 2,8600	R\$ 0,17160
Destilada				12,0000	L	R\$ 2,8600	R\$ 0,03432
Total							R\$ 0,20878
Energia Elétrica							
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	kWh		Preço kWh	Custo
Banho d'água	200	10,00	0,17	0,0333		R\$ 0,2806	R\$ 0,00935
Centrífuga	250	5,00	0,08	0,0208		R\$ 0,2806	R\$ 0,00585
Total							R\$ 0,01520
Total para 1 reator 1000 L							R\$ 2,9450

Etapa 8		Centrifugação					
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	KwH		Preço kWh	Custo
Centrifugação 30000 L	2.000,00	1.800,00	30,00	60,0000		R\$ 0,2806	R\$ 16,83420
Água							
Lavagem				500,0000	L	R\$ 2,8600	R\$ 1,43000
TOTAL P/ 1000 L							R\$ 18,26420

Etapa 9		Concentração					
Equipamento	Potência (W)	min.de uso	Nº h	KwH		Preço kWh	Custo
Bomba Concentrador 30000 L	3.675,00	2.880	48	176,4000		R\$ 0,2806	R\$ 49,49255
Água							
Lavagem				3000,0000	L	R\$ 2,8600	R\$ 8,58000
TOTAL P/ 1000 L							R\$ 58,07255

Custo total de produção de lipase em reator de 30 m³: R\$ 4.078,91

Custo por litro de enzima: R\$ 54,38