CAIO AUGUSTO FUNCK DE LIMA

**Avaliação econômica do processo de produção de celulase através de
cultivo em meio sólido**

**São Paulo
2011**

CAIO AUGUSTO FUNCK DE LIMA

Avaliação econômica do processo de produção de celulase através de cultivo em meio sólido

**Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Engenharia**

**Área de Concentração:
Engenharia Química**

**Orientador:
Dra. Beatriz Vahan Kilikian**

**São Paulo
2011**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Caio Augusto Funck de

Avaliação econômica do processo de produção de celulase através de cultivo em meio sólido / C.A.F. de Lima. -- São Paulo, 2011.

135 p.

Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Química.

1. Enzimas celulolíticas 2. Fermentação industrial 3. Cultivo em substrato I. Universidade de São Paulo. Escola Politécnica. Departamento de Engenharia Química II. t.

CAIO AUGUSTO FUNCK DE LIMA

**Avaliação econômica do processo de produção de celulase, através
de cultivo em meio sólido**

**Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Engenharia**

**São Paulo
2011**

Nome: LIMA, Caio Augusto Funck de

Título: Avaliação econômica do processo de produção de celulase, através de cultivo em meio sólido.

**Dissertação apresentada à Escola
Politécnica da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Mestre em Engenharia**

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico esta dissertação a toda minha família, que meu deu incentivo e forças para seguir até o fim. Aos meus amigos pessoais e profissionais, pela paciência e apoio durante a elaboração deste trabalho. À minha orientadora, Beatriz V. Kilikian, pela compreensão, perseverança e persistência no desenvolvimento do projeto.

AGRADECIMENTOS

À Dr. Beatriz Vahan Kilikian, que durante os anos de convivência, muito me ensinou e colaborou com o meu desenvolvimento acadêmico e desenvolvimento científico.

À Escola Politécnica da USP, que me concedeu a oportunidade de realização do curso de mestrado.

Ao Engenheiro Luís Ricardo Martins de Oliveira, que muito contribuiu com informações técnicas, durante a realização do projeto.

À empresa Nitro Química, por acreditar no desenvolvimento intelectual de seus funcionários e incentivar o crescimento pessoal e profissional continuamente.

“Nenhum homem realmente produtivo pensa como se estivesse
escrevendo uma dissertação.”

Albert Einstein

RESUMO

LIMA, C. A. F. **Avaliação econômica do processo de produção de celulase através de cultivo em meio sólido**. 2011. 135 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Na produção do etanol 2G, as celulases representam um componente importante do custo. Com base em informações da literatura e resultados obtidos no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola Politécnica da USP, foi feito um estudo do custo de produção das celulases via fermentação em estado sólido (FES) em escala industrial. Foram consideradas as seguintes variáveis no processo de produção das celulases, denominadas “cenários de produção”: concentração das celulases no meio de cultura de 1 a 150 FPU/gms; produtividade em celulases em 0,11 e 0,45FPU/gms.h; atividade de celulase na hidrólise de bagaço de cana-de-açúcar entre 7 e 30 FPU/g de substrato seco; massa de bagaço de cana a ser hidrolisada entre 5 e 30% do bagaço gerado numa usina sucroalcooleira de referência (1.000.000 ton de cana-de-açúcar /ano); custo dos substratos para a FES variando entre US\$6,00 a US\$12,00 por tonelada para o bagaço de cana-de-açúcar (80% da massa do meio) e US\$80,00 a US\$110,00 por tonelada para o farelo de trigo (20% da massa do meio); capacidade volumétrica dos reatores de FES variando entre 5 e 50 m³. Os impactos das variáveis consideradas foram: concentração de celulases no meio de cultura, acima de 45FPU/gms causam reduções menores que 5% no custo de produção; produtividades iguais em celulases (0,45FPU/gms.h), apresenta um processo 11% menos custoso para aquela com maior produção de enzimas, em relação ao tempo de fermentação; destinação de até 10% do bagaço gerado pela usina, reduz em 7% o custo de produção das celulases e a dosagem de celulase não causa redução significativa nos custos de produção, assim como o custo das matérias-primas; o aumento da capacidade dos reatores de FES causam redução de até 47% no custo de produção das celulases. A análise de regressão linear das variáveis apresentadas indica qual o impacto percentual sobre o custo de produção das celulases: quantidade de bagaço de cana-de-açúcar destinado à hidrólise (0,6%), atividade enzimática para a reação de hidrólise (0,3%), produção de celulase (73,4%), volume dos reatores de inóculo (0,5%), volume dos reatores de FES (2,7%), tempo de crescimento do inóculo (0,1%), tempo de fermentação (3,7%), custo do bagaço de cana-de-açúcar (0,9%), custo do farelo de trigo (0,6%) e outras variáveis não analisadas (17,2%). Conclui-se que, com os dados atuais sobre FES, a probabilidade de se obter um processo em escala industrial com custo de produção de celulase menor que US\$0,50/100.000FPU é de 15%. Desenvolvimento de culturas microbianas mais produtivas em celulases e tecnologias mais avançadas de reatores de grande escala, são necessárias à viabilidade da produção das celulases via FES para aplicação na hidrólise de celulose.

Palavras-chave: Celulase, Fermentação em Estado Sólido, Produção Industrial.

ABSTRACT

LIMA, C. A. F. **Economic evaluation of the process of production of cellulase by cultivation on solid medium.** 2011. 135 p. Dissertation (Masters) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

In ethanol 2G production, cellulases are an important component of the cost. Based on information from literature and results obtained in the Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola Politécnica da USP, a study was made of the production cost of cellulases via solid state fermentation (SSF) on industrial scale. The following variables were considered in the production of cellulases, called "production scenarios": the concentration of cellulase in the culture medium from 1 to 150 FPU / gms; productivity cellulases in 0.11 and 0.45 FPU / gms.h; cellulase activity in the hydrolysis of bagasse from sugar cane between 7 and 30 FPU / g substrate dry mass; cane bagasse hydrolyzed to be between 5 and 30% of sugarcane bagasse generated in a reference plant (1,000,000 ton of cane sugar per year) and the cost of substrates for SSF ranging from \$ 6.00 to \$ 12.00 per ton for the sugarcane bagasse (80% by weight of medium) and \$ 80, 00 to \$ 110.00 per ton for wheat bran (20% of the mass medium); volumetric capacity of the reactors of FES ranged between 5 and 50 m³. The impacts of the variables considered were: concentration of cellulase in the culture medium above 45FPU/gms cause reductions of less than 5% of the cost of production; for equal productivities of cellulose (0.45 FPU / gms.h) shows a process 11% less costly when the production of enzymes is higher in relation to fermentation time; using up to 10% of sugarcane bagasse generated by the reference plant, reduces by 7% the cost of production of cellulases and cellulase dosage does not cause significant reduction in production costs as well as the cost of raw materials; increasing the capacity of the reactors of FES cause a reduction of up to 47% on cost of production of cellulases. The linear regression analysis of the variables presented indicates what percentage impact the production cost of cellulases: The amount of bagasse cane sugar for the hydrolysis (0.6%), enzymatic activity for the hydrolysis reaction (0, 3%), production of cellulase (73.4%), the reactor volume of inoculum (0.5%), volume of the reactors of FES (2.7%), time of growth of the inoculum (0.1%) fermentation time (3.7%), cost of sugarcane bagasse (0.9%), cost of wheat bran (0.6%) and other variables not analyzed (17.2%). It was concluded that with current data on FES, the probability of obtaining a process on an industrial scale with production cost of cellulase less than \$ 0.50/100.000FPU is 15%. Development of microbial cultures more productive in cellulases and more advanced technologies for large-scale reactors are necessary for the viability of the production of cellulases for FES for application in the hydrolysis of cellulose.

Keywords: Cellulase, Solid State Fermentation, Industrial Production.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – ESQUEMA DOS PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE BIOMASSA VEGETAL. SHF (HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO EM ETAPAS SEPARADAS), SSF (HIDRÓLISE E FERMENTAÇÃO SIMULTÂNEAS). ADAPTADO DE SENDELIUS (2005).	28
FIGURA 2 - ESQUEMA DA HIDRÓLISE DE CELULOSE AMORFA E MICROCRISTALINA PELO SISTEMA DE CELULASE “NÃO COMPLEXO” (A) E COMPLEXO (B). OS QUADRADOS PREENCHIDOS REPRESENTAM OS TERMINAIS REDUTORES E OS QUADRADOS SEM PREENCHIMENTO REPRESENTAM OS TERMINAIS NÃO-REDUTORES. AS REGIÕES AMORFA E CRISTALINA ESTÃO INDICADAS NO ESQUEMA. CELULOSE, ENZIMAS E PRODUTOS HIDROLISADOS NÃO SÃO MOSTRADOS EM ESCALA (LYND <i>ET AL.</i> , 2002).....	32
FIGURA 3 – CURVA DE CORRELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE FPU E A QUANTIDADE DE PROTEÍNA RESPECTIVA (DECKER <i>ET AL.</i> , 2003).	34
FIGURA 4 - ATIVIDADE MÉDIA FP DO <i>TRICHODERMA HARZIANUM</i> RIFAI EM DIFERENTES SUBSTRATOS.	43
FIGURA 5 - FOTO DO BIORREATOR DE ESCALA PRÉ-PILOTO, COM AERAÇÃO FORÇADA E SEM AGITAÇÃO (DURAND, 2003).	45
FIGURA 6 - FOTO DO REATOR RETANGULAR UTILIZADO NA PRODUÇÃO DO MOLHO DE SOJA (DURAND, 2003).	46
FIGURA 7 - EVOLUÇÃO DOS SISTEMAS DE PROCESSAMENTO DE BIOMASSA POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA (LYND <i>ET AL.</i> , 2002).	48
FIGURA 8 - DIAGRAMA DE BLOCOS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DA CELULASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO.....	64
FIGURA 9 - DIAGRAMA DE BLOCOS DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE INÓCULO.	72
FIGURA 10 - DIAGRAMA DE CUSTO DE COMPRA POR VAZÃO DE SÓLIDOS (KG/S) E TIPO DE MISTURADOR (PETERS; TIMMERHAUS; WEST, 2003).	80
FIGURA 11 - CUSTO DE AQUISIÇÃO DE REATORES ENCAMISADOS E AGITADOS (PETERS; TIMMERHAUS; WEST, 2003).	85
FIGURA 12 - CUSTO DE AQUISIÇÃO DE COMPRESSORES DE UM ESTÁGIO E COMPRESSORES DE AR (PETERS; TIMMERHAUS; WEST, 2003).	86
FIGURA 13 - ILUSTRAÇÃO DA PLANILHA UTILIZADA PARA OBTENÇÃO DE DADOS DE PROCESSO, PROJETO E DADOS DE VIABILIDADE ECONÔMICA.	90
FIGURA 14 - CURVA DE VARIAÇÃO DO CUSTO FINAL DE PRODUÇÃO DAS CELULASES X VARIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASE, MEDIDA EM ATIVIDADE ENZIMÁTICA.	93
FIGURA 15 - CURVA DE VARIAÇÃO DO CUSTO FINAL DE PRODUÇÃO DAS CELULASES X VARIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CELULASE, MEDIDA EM ATIVIDADE ENZIMÁTICA.	93

FIGURA 16 - CURVA DE VARIAÇÃO DO CUSTO FINAL DE PRODUÇÃO DAS CELULASES X VARIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE DA CELULASES.	94
FIGURA 17 - FLUXO DE CAIXA PARA INVESTIMENTO EM PLANTA DE PRODUÇÃO DE CELULASE VIA FES, COM PRODUÇÃO DE INÓCULO NA FORMA DE CÉLULAS VEGETATIVAS E CUSTO DE MATÉRIAS-PRIMAS ABAIXO DO VALOR ATUAL.....	99
FIGURA 18 - VARIAÇÃO DO CUSTO FINAL DE PRODUÇÃO DAS CELULASES CONFORME ALTERADA A QUANTIDADE DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR A SER HIDROLISADO.	102
FIGURA 19 - VARIAÇÃO DO CUSTO FINAL DE PRODUÇÃO DAS CELULASES CONFORME ALTERADA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.	102
FIGURA 20 - FLUXO DE CAIXA PARA INVESTIMENTO EM PLANTA DE PRODUÇÃO DE CELULASE VIA FES, COM PRODUÇÃO DE INÓCULO NA FORMA DE CÉLULAS VEGETATIVAS, 10% DO BAGAÇO GERADO DESTINADO PARA HIDRÓLISE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE HIDRÓLISE EM 10FPU/GMS.....	103
FIGURA 21 - VARIAÇÃO DO PREÇO DO CUSTO DE PRODUÇÃO DA CELULASE QUANDO VARIADOS OS VOLUMES DOS BIORREATORES E TANQUES DE INÓCULO DO PROCESSO.	105
FIGURA 22 - DISTRIBUIÇÃO DO CUSTO DE PRODUÇÃO DA CELULASE.	107
FIGURA 23 - GRÁFICO DE SETORES DA PORCENTAGEM QUE CADA VARIÁVEL ADOTADA NA ANÁLISE INFLUENCIA O CUSTO DE PRODUÇÃO DA CELULASE.....	109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - COMPOSIÇÃO DE VÁRIAS ESPÉCIES DE PLANTAS (EM % MASSA).....	24
TABELA 2 - COMPOSIÇÃO DA CELULASE PROVENIENTE DE FUNGOS AERÓBICOS E A MANEIRA COMO AGEM SOBRE A CADEIA DE CELULOSE.....	33
TABELA 3 - PRODUÇÃO DE CELULASES VIA FERMENTAÇÃO EM MEIO SÓLIDO (FES) E FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FSM).....	41
TABELA 4 - PERCENTUAIS ATRIBUÍDOS AOS ITENS DO PROJETO, PARA ESTIMATIVA DO CAPITAL DE INVESTIMENTO, BASEADO EM CUSTO DE EQUIPAMENTO ENTREGUE NO LOCAL DE INSTALAÇÃO.....	53
TABELA 5 - PERCENTUAIS ATRIBUÍDOS AOS ITENS DO PROJETO, PARA ESTIMATIVA DO CUSTO OPERACIONAL, BASEADO EM CUSTO DE MÃO-DE-OBRA OPERACIONAL E CAPITAL FIXO DE INVESTIMENTO.....	57
TABELA 6 – VALORES ADOTADOS DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA NA HIDRÓLISE DE CELULOSE. ..	68
TABELA 7 - VARIAÇÃO DOS CUSTOS DE MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DA CELULASE.	68
TABELA 8 – PRODUTIVIDADE EM CELULASE OBTIDA EM CULTIVOS EM MEIO SÓLIDO.....	69
TABELA 9 - QUANTIDADE DE CANA-DE-AÇÚCAR E BAGAÇO GERADOS NA SAFRA DE UMA USINA PADRÃO.....	70
TABELA 10 - INDICAÇÃO DAS CORRENTES DE ENTRADA E SAÍDA DE CADA ETAPA DO PROCESSO, PARA A PRODUÇÃO DE CELULASES.	78
TABELA 11 - FATORES DE CÁLCULO DO NÚMERO DE OPERADORES PARA CADA EQUIPAMENTO.	87
TABELA 12 - ESTIMATIVA DE CUSTO DE PRODUÇÃO DE CELULASE, CUSTO DE AQUISIÇÃO DOS EQUIPAMENTOS, CUSTO DE CAPITAL DE INVESTIMENTO E CUSTO OPERACIONAL.	95
TABELA 13 - ESTIMATIVA DE CUSTO DE PRODUÇÃO DE CELULASE, CUSTO DE AQUISIÇÃO DOS EQUIPAMENTOS, CUSTO DE CAPITAL DE INVESTIMENTO E CUSTO OPERACIONAL, PARA UMA PRODUTIVIDADE DE 0,45 FPU/GMS.H.....	96
TABELA 14 - IMPACTO DA VARIAÇÃO DO CUSTO DE MATÉRIA-PRIMA SOBRE O CUSTO DE PRODUÇÃO DE CELULASE E CUSTO OPERACIONAL TOTAL.	98
TABELA 15 - CUSTOS DE PRODUÇÃO DE CELULASE, AQUISIÇÃO DE EQUIPAMENTOS, CAPITAL DE INVESTIMENTO E OPERACIONAL, PARA PROPORÇÕES DE BAGAÇO DE CANA-DE- AÇÚCAR A SER HIDROLISADO.....	100
TABELA 16 - CUSTOS DE PRODUÇÃO DE CELULASE, AQUISIÇÃO DE EQUIPAMENTOS, CAPITAL DE INVESTIMENTO E OPERACIONAL, PARA DIFERENTES VALORES DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	101

TABELA 17 - COMPARAÇÃO DOS CUSTOS DE PRODUÇÃO, DE AQUISIÇÃO DOS EQUIPAMENTOS, INVESTIMENTO E CUSTO OPERACIONAL TOTAL DO PROCESSO, CONFORME VARIAÇÃO DA CAPACIDADE VOLUMÉTRICA DOS EQUIPAMENTOS.....	104
TABELA 18 - ÍNDICE DE CORRELAÇÃO (P) DE CADA VARIÁVEL ADOTADA NO PROCESSO INDICANDO O IMPACTO NO CUSTO DE PRODUÇÃO DA CELULASE INDIVIDUALMENTE E EM CONJUNTO.	106
TABELA 19 - COEFICIENTE DE DETERMINAÇÃO PARA CADA VARIÁVEL DO PROCESSO.....	108
TABELA 20 - RESUMO DAS CONCLUSÕES PARA CADA CENÁRIO.	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFEX	Ammonia Fiber Explosion (Explosão da Fibra com Amônia);
CBM	Carbohydrate-Binding Module;
CEPCI	Chemical Engineering Plant Cost Index;
CMCase	Carboximetil Celulase;
EBTIDA	Earnings Before Interest, Taxes, Depreciation and Amortization (Resultados Antes de Juros, Impostos, Depreciação e Amortização);
FPA	Filter Paper Activity (Atividade de celulase em Papel de Filtro);
F_{Sm}	Fermentação Submersa;
FES	Fermentação Semi Sólida ou Fermentação em Estado Sólido;
MTBE	Metil-ternário-butil-éter;
NREL	National Renewable Energy Laboratory;
SHF	Separate Hydrolysis and Fermentation (Hidrólise e Fermentação em Etapas Separadas);
SSCF	Simultaneous Saccharification and CoFermentation (Hidrólise e Cofermentação Simultâneas);
SSF	“Simultaneous Saccharification and Fermentation” (Hidrólise e Fermentação Simultâneas);
TIR	Taxa Interna de Retorno;
TMA	Taxa Mínima de Atratividade;
UNICA	União da Indústria de Cana-de-Açúcar;
VPL	Valor Presente Líquido.

SUMÁRIO

<u>1. INTRODUÇÃO</u>	<u>18</u>
<u>2. OBJETIVO</u>	<u>21</u>
<u>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</u>	<u>22</u>
3.1. Novos Paradigmas da Energia	22
3.2. Composição do Material Lignocelulósico.....	23
3.2.1. Celulose	24
3.2.2. Hemicelulose	25
3.2.3. Lignina.....	25
3.3. Processo de Produção de Etanol	25
3.3.1. Etanol de 1ª Geração	26
3.3.2. Etanol 2G	27
3.4. Produção de Enzimas	29
3.4.1. Celulase.....	29
3.4.2. Microrganismos e meios de cultura	35
3.4.3. Cultivo em meio líquido	37
3.4.4. Cultivo em meio sólido.....	39
3.4.5. Vantagens e desvantagens da FSm e FES	40
3.4.6. Produção das celulasas medida como atividade enzimática	41
3.4.7. Reatores de fermentação sólida	43
3.5. Processos Simultâneos de Produção de Celulasas e Etanol	47
3.6. Aspectos Econômicos	48
3.6.1. Estimativa de custos.....	51
3.6.2. Componentes do custo de capital de investimento	52
3.6.3. Estimativa do custo operacional	56
3.6.4. Análise econômica	57
3.6.5. Aspectos econômicos de processos fermentativos	59
3.7. Conceitos Estatísticos	62
<u>4. MATERIAIS E MÉTODOS</u>	<u>63</u>
4.1. Definição do Processo.....	63
4.2. Premissas do Projeto.....	67
4.3. Balanços de Massa	69
4.3.1 Balanço de massa da etapa de cultivo na produção de celulasas	69

4.3.2 Balanço de massa da etapa de produção de inóculo	72
4.3.3. Balanço de massa da etapa do reator de produção de enzimas	75
4.3.4. Produto final – Celulase	77
4.3.5. Correntes do processo	77
4.5. Especificações dos Equipamentos do Processo	78
4.5.1. Tanques de armazenamento de matéria-prima e produto final	78
4.5.2. Misturador	79
4.5.4. Reator de produção de enzimas	82
4.5.5. Compressores	83
4.6. Obtenção dos Dados Econômicos	84
4.6.1. Custos dos equipamentos	84
4.6.2. Custos de investimento e mão-de-obra	86
4.6.3. Custo de Produção, Fluxo de Caixa, TIR e “Pay-back”	88
<u>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>91</u>
5.1. Cenário 1 – Variações na concentração de celulasas no meio fermentado	91
5.2. Cenário 2 – Variação na produtividade da celulase	94
5.3. Cenário 3 – Variação no custo do substrato	97
5.4. Cenário 4 – Alteração na proporção de bagaço a ser hidrolisado e na atividade enzimática necessária para hidrólise	99
5.5. Cenário 5 – Alteração dos volumes dos reatores de produção de enzimas	103
5.6. Cenário 6 – Análise estatística das variáveis adotadas no processo	105
<u>6. CONCLUSÕES</u>	<u>111</u>
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>113</u>
<u>ANEXO A</u>	<u>122</u>
<u>ANEXO B</u>	<u>126</u>

1. INTRODUÇÃO

Industrialização, desenvolvimento sustentável, energias renováveis são temas amplamente discutidos globalmente. Fatores econômicos, geopolíticos e ambientais fizeram com que o mundo focasse atenção para novas fontes de energia.

Notícias sobre invasões territoriais, guerras e mortes tornaram-se assunto do dia a dia das pessoas. Um motivo, que explica esses problemas, é a disputa pelo petróleo, fonte de energia finita e matéria-prima utilizada na geração de energias.

Segundo MATTOSO (2008), embora as reservas de petróleo sejam finitas, sua duração dependerá do preço que a sociedade está disposta a pagar por ele. Isso quer dizer que o preço do petróleo se elevará de maneira a atingir valores não comercializáveis, conforme a demanda aumente e o estoque diminua. Nos últimos 40 anos o preço do barril de petróleo (barril = 159 litros) variou de 3,00 a 140,00 dólares.

Novas fontes de energia e seus métodos de obtenção vêm sendo estudados. O uso do etanol no Brasil é hoje o melhor exemplo da introdução de energia renovável com uma grande escala de produção, já que consegue atender a demanda nacional. Para os países industrializados, comprometidos com as metas do Protocolo de Kyoto, o uso de biocombustíveis representa uma das formas mais efetivas de reduzir as emissões líquidas de gases de efeito estufa associadas ao consumo energético no setor de transporte, garantindo a sustentabilidade (MACEDO, 2007).

A partir da observação de que se apresenta uma considerável gama de substratos e subprodutos, resíduos ou águas residuárias, especialmente de origem industrial ou agropecuária, com ótima composição em carbono, nitrogênio, vitaminas e sais minerais, materiais esses que, despejados provocavam problemas ambientais; alguns pesquisadores passaram a utilizá-los, com vista ao seu aproveitamento, com consequente benefício ao meio ambiente. Esses substratos, além da disponibilidade em quantidade, apresentam um custo baixo, insignificante, possibilitando uma boa relação custo/benefício, minimizando o custo final de produção.

A facilidade de cultivo da cana-de-açúcar no Brasil cria uma expectativa no aumento da produção de etanol. O etanol deixa de ser encarado como um produto

utilizado com foco no setor de transportes, e começa a ser encarado como fonte de matéria-prima na fabricação de outros produtos químicos, como produção de solventes em formulações de produtos farmacêuticos.

Bioetanol corresponde a produção de etanol utilizando biomassa lignocelulósica residual como matéria-prima, por exemplo, o bagaço, as pontas e as palhas da cana-de-açúcar. A produção de etanol com base na biomassa lignocelulósica pode utilizar processos químicos (hidrólise ácida) ou hidrólise enzimática para a quebra das macromoléculas de celulose em açúcares fermentescíveis, para então obter o etanol por meio de processo fermentativo alcoólico. A via microbiana para conversão de celulose a etanol representa uma perspectiva importante de aumento da produção de enzimas.

Constatou-se que um dos fatores importantes no custo de produção de etanol de biomassa lignocelulósica é o custo das enzimas utilizadas no processo, denominadas celulasas. Atualmente, as celulasas são obtidas por fermentação submersa, em um processo consolidado. No entanto, o processo de fermentação em estado sólido (FES) apresenta vantagens significativas na produção de enzimas sendo a principal delas a utilização dos resíduos de materiais lignocelulósicos como meio de crescimento microbiano.

Comercialmente, os principais resultados no desenvolvimento da tecnologia de hidrólise enzimática foram alcançados pela Iogen, empresa canadense de biotecnologia, com faturamento anual de US\$ 15 milhões, que tem ampliado recursos para pesquisas em resultado ao estabelecimento de parcerias com empresas como a Shell Global Solutions e a PetroCanada, além de recursos do governo canadense, já tendo resultado em patentes depositadas. O processo, desenvolvido até a escala piloto, compreende tratamento prévio do material lignocelulósico (palha de cevada, trigo, aveia, arroz e bagaço de cana-de-açúcar), o desenvolvimento de uma linhagem melhorada com base na modificação genética de um fungo tropical, o *Trichoderma reesei*, com vistas a hiperproduzir as enzimas que hidrolisam a celulose. A planta de demonstração consome 30 toneladas de biomassa e tem capacidade de produção de 1 milhão de galões de etanol / ano (BROWN, 2006).

Segundo Rossell, no trabalho apresentado na 60ª Reunião Anual da SBPC, ocorrida na UNICAMP (2008), há excedente de bagaço e palha de cana-de-açúcar da ordem de 75% do total gerado. Parte do bagaço excedente é utilizado como fonte de energia em caldeiras de biomassa, gerando vapor e energia elétrica. Mesmo assim, uma porcentagem do bagaço gerado é descartada. A porcentagem descartada pode ser destinada à produção de celulase.

Adotou-se neste projeto, a construção de uma planta de produção de celulases capaz de atender uma usina padrão, que utiliza milhões de toneladas de cana-de-açúcar por ano na produção de açúcar e etanol. A planta de celulase almeja atender a usina padrão na produção de etanol de 2ª geração (etanol 2G), através da utilização da biomassa lignocelulósica gerada na produção de açúcar e álcool.

As estimativas de custos de capital de investimento, custos fixos e custos variáveis foram obtidas utilizando-se a metodologia de estimativa consignada, proposta por Peters, Timmerhaus e West (2003).

Esta dissertação visa contribuir com o desenvolvimento de processos de produção de celulases, via FES, em escala industrial, e melhora na rentabilidade da produção de bioetanol.

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é determinar o impacto de diferentes variáveis do processo de fermentação em estado sólido sobre o custo de produção de celulasas e custo de investimento da planta produtiva.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesta seção, apresentam-se informações referentes à crise energética mundial, que geraram interesse na busca por fontes alternativas de energia, em relação ao petróleo. Pesquisas indicam o etanol como uma fonte de energia renovável promissora e estudos apontam a produção do bioetanol (etanol produzido a partir de resíduos de materiais lignocelulósicos) como alternativa às atuais rotas de produção alcoólica.

Além disso, nesta seção apresentam-se informações sobre as celulases, vantagens e desvantagens entre os processos de produção de celulases por fermentação submersa (FSm) e fermentação em estado sólido (FES) e os aspectos econômicos no ramo da biotecnologia.

3.1. Novos Paradigmas da Energia

No início do século XX, combustíveis derivados do petróleo começaram a surgir e, rapidamente, dominaram o mercado. Os baixos preços persistiram durante muitas décadas, até a ocorrência da crise do petróleo na década de 1970. Esta crise destacou a importância das fontes de energias alternativas, estando o etanol entre elas, dando origem a iniciativas tais como o Programa Nacional de Álcool no Brasil – Pró-álcool – e o programa “gasohol” nos Estados Unidos (VOCA *et al.*, 2009; ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001).

A elevada e entusiasta expectativa durante a década de 70, de que a celulase poderia contribuir substancialmente para resolver o problema iminente da energia e dos resíduos da humanidade não foram cumpridas, principalmente porque o preço do petróleo bruto não aumentou conforme o previsto (ESTERBAUER *et al.*, 1991).

O consumo de energia tem aumentado muito no último século, assim como a população mundial e a industrialização (SUN; CHENG, 2002). O petróleo tem sido o maior recurso para suprir o aumento dessa demanda de energia. Campbell e Laherrère (1998) estimaram que o consumo de petróleo aumente significativamente até por volta do ano de 2014, quando então o preço do barril subirá a tal ponto que haverá recesso.

As reservas mundiais de petróleo esgotarão dentro dos próximos 100 anos e a produção de petróleo declinará em 80% por volta do ano de 2050.

Entre as diversas fontes de energias renováveis, a biomassa é vista como a mais interessante por várias razões. A principal delas é que a bioenergia, como o bioetanol, pode contribuir para o desenvolvimento sustentável da região que a utiliza, além dos recursos estarem frequentemente disponíveis no próprio local de produção da bioenergia e o investimento de capital para a conversão em energia ser baixo (MONIQUE *et al.*, 2003). A energia proveniente de biomassa pode desempenhar uma função importante na redução das emissões de gases do efeito estufa, já que a biomassa é produzida por meio da fotossíntese.

Diferente de combustíveis fósseis, etanol obtido por fermentação de açúcares é oriundo de materiais renováveis, podendo ser utilizado como combustível de transporte, sendo também uma alternativa segura do metil-ternário-butil-éter (MTBE), o mais comum aditivo para gasolina, utilizado para proporcionar uma produção limpa. MTBE é um composto químico tóxico e tem sido encontrado em lençóis freáticos contaminados (SUN; CHENG, 2002; VOCA *et al.*, 2009; ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001).

O processo de produção de bioetanol a partir de sacarose de cana-de-açúcar e amido de grãos de milho encontra-se estabelecido. No entanto, a utilização de substratos mais baratos, como materiais lignocelulósicos, tornaria o bioetanol competitivo com os combustíveis fósseis.

3.2. Composição do Material Lignocelulósico

Material lignocelulósico consiste de principalmente três diferentes tipos de polímeros, denominados celulose, hemicelulose e lignina, os quais são associados uns com os outros (HENDRIKS; ZEEMAN, 2008).

A dificuldade de se converter os materiais lignocelulósicos em insumos químicos é atribuída às suas características químicas. Esses materiais são constituídos de microfibrilas de celulose envolvidas em uma matriz amorfa de polioses, que formam a hemicelulose, e lignina. Essa matriz amorfa age como uma barreira natural ao ataque

de microrganismos e/ou enzimas e torna esses materiais estruturalmente rígidos e pouco reativos (FENGEL; WEGENER, 1989).

A proporção de cada componente difere de planta para planta (tabela 1). Outros compostos em menor quantidade correspondem aos extrativos, amido, proteínas, cinzas inorgânicas e ácidos graxos.

Tabela 1 - Composição de várias espécies de plantas (em % massa).

	Celulose	Hemiceluloses				Lignina
		Manana	Xilana	Galactana	Arabinana	
Madeira dura						
Bétula ("Birchwood")	38,2	1,2	18,5	-	n.d.	22,8
Salgueiro	36,8	1,9	12,7	n.d.	1,2	20,7
Álamo ("Aspen")	43,2	0,2	15,1	-	-	16,7
Madeira Mole						
Pinheiro	37,7	7	3,6	-	-	27,5
Abeto ("Spruce")	41,9	14,3	6,1	-	1,2	27,1
Casca de Abeto	27,3	3,2	3,2	-	4,1	37,1
Gramínea						
Bagaço de cana	42,7	-	21	-	0,6	18,6
Palha de Trigo	36,5	0	18,4	-	2,2	17,6

HAYN *et al.*, 1993.

3.2.1. Celulose

A celulose é constituída de subunidades de D-glicose conectadas pelas ligações β -1,4 glicosídicas (HENDRIKS; ZEEMAN, 2008).

A celulose na planta consiste de partes com uma estrutura cristalina (organizada) e partes com uma estrutura amorfa (não organizada). As cadeias da celulose estão "agregadas" e formam as chamadas fibras de celulose. Estas fibras de celulose são, na sua maioria, independentes e fracamente vinculadas por pontes de hidrogênio (HENDRIKS; ZEEMAN, 2008; LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005).

3.2.2. Hemicelulose

Hemicelulose é uma estrutura complexa de carboidratos, pois consiste de diferentes polímeros, a saber, polímeros de pentoses (xilose e arabiose), e polímeros de hexoses (manose, glicose e galactose), além de ácidos. O componente dominante da hemicelulose de madeira dura e plantas agrícolas, como grama e palha, é o xilano, enquanto para madeiras coníferas é a manana.

Hemicelulose tem um peso molecular menor do que a celulose e ramificações com cadeias laterais curtas, que consistem de diferentes açúcares, que são polímeros facilmente hidrolisados (HENDRIKS; ZEEMAN, 2008). Hemicelulose serve como um conector entre a lignina e as fibras de celulose, propiciando mais rigidez à rede inteira de celulose-hemicelulose-lignina (LAUREANO-PEREZ *et al.*, 2005).

3.2.3. Lignina

Lignina é, depois da celulose e hemicelulose, um dos mais abundantes polímeros da natureza e está presente nas paredes celulares de certos tecidos como, por exemplo, as células do xilema e do esclerênquima das plantas. Lignina é um heteropolímero amorfo constituído de três diferentes unidades de fenilpropano, que são mantidas juntas por diferentes tipos de ligações. O principal propósito da lignina é dar um suporte estrutural à planta, impermeabilidade e resistência a ataques microbianos. O heteropolímero amorfo é também não-solúvel em água, fazendo com que a degradação da lignina seja muito mais difícil (HENDRIKS; ZEEMAN, 2008).

3.3. Processo de Produção de Etanol

O etanol pode ser produzido a partir de uma variada fonte de biomassa, como a cana-de-açúcar, milho, beterraba, através de uma série de rotas de conversão, p. ex., hidrólise ácida, hidrólise enzimática, etc. (TAYLOR, 2008). O etanol é produzido em grande escala através da fermentação de açúcares extraídos de plantas. O etanol

fermentado é separado do mosto, através de um processo de destilação (KIM; DALE , 2004; WHEALS *et al.*, 1999). Nas seções seguintes apresentam-se os processos de produção de etanol de 1ª e 2ª geração.

3.3.1. Etanol de 1ª Geração

No Brasil, a produção de etanol de 1ª geração utiliza como matéria-prima o caldo da cana-de-açúcar, que é obtido através do esmagamento da cana. A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) é uma cultura tropical e subtropical que contém 12 – 17 % de açúcares, do peso em base úmida, para 68 – 72 % de umidade. Desses açúcares, 10% são frutose ou glicose e 90% são sacarose. O esmagamento da cana-de-açúcar para obtenção do caldo tem, em média, uma eficiência de extração de 95%, sendo o caldo rico em sacarose e açúcares redutores (WHEALS *et al.*, 1999).

O processo de produção de etanol consiste de, principalmente, três etapas, denominadas: inoculação do mosto (caldo de cana-de-açúcar), fermentação e destilação.

Inicialmente, faz-se a correção do caldo de cana-de-açúcar, para oferecer à levedura condições de nutrição, que normalmente não se encontram no caldo inicial em doses suficientes. Essas correções tratam-se da adição de fosfatos, sais de amônio e vitaminas. A inoculação ocorre com a mistura entre a levedura e o mosto. A levedura é obtida sob a forma úmida e prensada, ou seca e granulada. Partindo-se de uma quantidade média de 10 a 20 gramas de levedura para cada litro de mosto, obtém-se o inóculo.

Tão logo se mistura o inóculo ao mosto nas dornas de produção, inicia-se o processo de fermentação alcoólica dos açúcares fermentescíveis. O processo de fermentação alcoólica pode ser dividido em três fases: (1) fase lag ou fase preliminar; (2) fase tumultuosa; (3) fase complementar. A fase lag caracteriza-se por multiplicação celular intensa, pequena elevação de temperatura e pequeno desprendimento de dióxido de carbono. A fase tumultuosa caracteriza-se pelo desprendimento volumoso e intenso de dióxido de carbono, consequência da existência de um número suficiente de células para desdobrar os açúcares fermentescíveis do mosto. A fase complementar

caracteriza-se pela diminuição da intensidade do desprendimento de dióxido de carbono, por menor agitação do líquido e diminuição da temperatura.

O processo é controlado pelo tempo de fermentação, temperatura, densidade do mosto e açúcares presentes no mosto. Na fase complementar o substrato é separado do inóculo, através de centrifugação ou decantação. O inóculo é alimentado com novo mosto. O substrato fermentado, denominado vinho, segue para destilação. Na destilação separa-se o etanol, em grau de pureza e concentrações variáveis, da vinhaça, que é composta de alcoóis amílico, isoamílico, propílico, butílico, aldeídos, ácidos, furfurool, ésteres e ácidos orgânicos (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

O etanol obtido da destilação apresenta uma concentração máxima de 92%, pois forma um azeótropo com a água. Técnicas de desidratação do etanol com absorventes regeneráveis ou peneiras moleculares permitem aumentar a concentração do etanol a 99%.

3.3.2. Etanol 2G

A produção de etanol 2G utiliza como matéria-prima a biomassa lignocelulósica residual (bagaço de cana-de-açúcar) proveniente da produção de etanol de 1ª geração.

A biomassa residual é composta em sua estrutura de celulose, hemicelulose e lignina em diferentes porcentagens. Um problema existente nesta biomassa residual é o fato de não estar adequada para possível ataque enzimático, apresentando dificuldade de solubilizar alguns de seus constituintes (WHEALS *et al.*, 1999).

A etapa crucial deste processo é o pré-tratamento do material lignocelulósico. O propósito do pré-tratamento é remover a lignina e hemicelulose, reduzir a cristalinidade da celulose e aumentar a porosidade do material. O pré-tratamento deve atender as seguintes necessidades: (1) melhorar a formação de açúcares (hidrólise ácida) ou a capacidade para subsequentemente formar açúcares pela hidrólise enzimática; (2) evitar a degradação ou perda de carboidratos; (3) evitar a formação de subprodutos inibidores dos subsequentes processos de hidrólise e fermentação; (4) ter custo efetivo, que não impacte o custo final do álcool.

Existem diferentes processos de pré-tratamento para os materiais lignocelulósicos, tais como: processos físicos (comutação mecânica e pirólise), físico-químicos (explosão a vapor [auto-hidrólise], AFEX Ammonia fiber explosion [explosão da fibra com amônia], explosão CO_2), químicos (ozonólise, hidrólise ácida, hidrólise alcalina, delignificação oxidativa, processo “organosolv”) e biológicos (SUN; CHENG, 2002).

A figura 1 mostra os dois principais caminhos para produzir etanol a partir de materiais lignocelulósicos, identificados como “1” e “2”. No primeiro caminho a hidrólise do material é feita por ácidos concentrados ou diluídos, já o segundo é realizado através de enzimas. A via de conversão (1) é mais rápida, porém apresenta grandes limitações incluindo a corrosão dos equipamentos, a formação de subprodutos tóxicos, a dificuldade em separar o ácido do hidrolisado e o baixo rendimento comparado ao da hidrólise enzimática (KELLER, 1996). A via (2) tem uma característica de flexibilidade, já que pode ser executada com SHF (hidrólise e fermentação em etapas separadas) ou SSF (hidrólise e fermentação simultâneas).

Figura 1 – Esquema dos processos de produção de etanol a partir de biomassa vegetal. SHF (hidrólise e fermentação em etapas separadas), SSF (hidrólise e fermentação simultâneas). Adaptado de Sendelius (2005).

Segundo Santos & Gouveia (2009) e Sun & Cheng (2002), a quantidade de atividade enzimática da celulase para a hidrólise da celulose, comumente utilizada, varia entre 7 e 33 FPU/g de substrato. Mais *et al.* (2002) afirmam que atividade enzimática necessária para hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar é da ordem de 10FPU/g de substrato.

Santos & Gouveia (2009) utilizaram 17,2 FPU/g de bagaço de cana-de-açúcar para avaliar a conversão da celulose em glicose, utilizando uma amostra de bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado e uma amostra de bagaço pré-tratado e deslignificado. A conversão de celulose em glicose foi maior para a amostra de bagaço pré-tratado deslignificado, porém, quando adicionada mais atividade enzimática na solução, o teor de glicose não aumentou.

3.4. Produção de Enzimas

Diversas rotas ácidas e enzimáticas vêm sendo testadas, sempre em busca de processos eficientes para converter a celulose e a hemicelulose de resíduos, em hexoses e pentoses fermentáveis.

Uma das dificuldades da hidrólise é que a lignina restringe o acesso dos reagentes à celulose e, eventualmente, o processo de remoção da lignina pode atacar os açúcares formados da hidrólise da celulose e hemicelulose, impondo técnicas complexas e multifásicas para a remoção da mesma (MACEDO; NOGUEIRA, 2004). Em muitos processos, a conversão enzimática da biomassa lignocelulósica em açúcares redutores requer um estágio de pré-tratamento para quebrar a estrutura da lignina e solubilizar, parcialmente, os polissacarídeos (KELLER; HAMILTON; NGUYEN, 2003). Após o pré-tratamento a conversão enzimática da biomassa lignocelulósica ocorre através da ação das celulasas.

3.4.1. Celulase

Segundo Sant'anna Jr. (2001), enzimas são proteínas que apresentam atividade catalítica. A complexa estrutura molecular enzimática é majoritariamente constituída por

uma parte protéica, porém a ela podem estar integradas outras moléculas, como carboidratos e lipídeos.

Celulase é um sistema de enzimas induzidas, ou seja, são enzimas geradas por microrganismos que as liberam sobre a celulose para reduzi-las em açúcares e obter fonte de energia. As celulasas são as principais enzimas envolvidas no processo de sacarificação (MEKALA *et al.*, 2008).

Para os microrganismos hidrolisarem e metabolizarem celulose insolúvel, celulasas extracelulares devem ser produzidas. Componentes do sistema de celulase foram primeiramente classificados baseados no modo de ação catalítica. Atualmente, os componentes de celulase têm sido classificados baseados nas propriedades de suas estruturas (LYND *et al.*, 2002).

Três principais tipos de atividade enzimática foram encontrados:

- a. Endogliconases ou 1,4- β -D-glucan-4-gliconahidrolases (EC 3.2.1.4);
- b. Exogliconases, incluindo 1,4- β -D-glucan gliconohidrolases, também conhecida como celodextrinases (EC 3.2.1.74) e 1,4- β -D-glucan celobiohidrolases, conhecida como celobiohidrolases (EC 3.2.1.91);
- c. B-glicosidades ou β -glicosídio glicohidrolases (EC 3.2.1.21).

Endogliconases hidrolisam de forma aleatória as cadeias de polissacarídeos na região interna amorfa da celulose, gerando oligossacarídeos de vários comprimentos e, conseqüentemente, novos finais de cadeias. Exogliconases atuam de uma maneira processiva sobre os terminais de cadeias, podendo ser nos terminais redutores e não-redutores dos polissacarídeos da celulose, liberando tanto glicose (gliconohidrolases) ou celobiose (celobiohidrolase) como os principais produtos. Exogliconases também podem atuar na celulose microcristalina, presumivelmente hidrolisando as cadeias de celulose da estrutura microcristalina superficialmente. β -glicosidases hidrolisam celodextrinas solúveis e celobiose à glicose (LYND *et al.*, 2002).

Celulasas são distinguidas de outras hidrolases glicosídicas pela sua capacidade de hidrolisar as ligações β -1-4-glicosídica entre os resíduos glicosídicos. A quebra das ligações β -1-4-glicosídicas na celulose ocorre através de um mecanismo de hidrólise ácida, utilizando um próton doador e um nucleófilo ou base.

A natureza insolúvel e recalcitrante da celulose representa um desafio para o sistema de celulases. Uma característica geral da maioria das celulases é frequentemente apresentar uma estrutura modular, que consiste em um módulo catalítico, geralmente vinculado (ligado) a um módulo de ligação à celulose, em inglês “carbohydrate-binding modules” (CBMs).

Os efeitos do CBM são vinculados à superfície da celulose, sendo responsável pela ligação da enzima ao substrato, presumivelmente para facilitar a hidrólise da celulose, trazendo o domínio catalítico (enzima específica para hidrólise da celulose) na proximidade do substrato (celulose insolúvel). A presença de CBMs é particularmente importante para a iniciação e produtividade das exogliconases, conforme está ilustrado na figura 2, trecho A (LYND *et al.*, 2002).

Os sistemas de celulase apresentam maior atividade coletiva do que a soma das atividades de cada enzima. Este fenômeno é conhecido como sinergismo. Quatro formas de sinergismo foram relatadas:

- a. Sinergia endo-exo, entre endogliconases e exogliconases;
- b. Sinergia exo-exo, entre exogliconases, transformação a partir dos terminais redutores e não-redutores das cadeias de celulose;
- c. Sinergia entre exogliconases e β -glicosidases, que removem a celobiose (e celodextrina) como produto final das primeiras duas enzimas;
- d. Sinergia intramolecular entre domínios catalíticos e CBMs (DIN *et al.*, 1994).

Sistemas de celulase não são meramente um aglomerado de enzimas, representando três grupos de enzimas (endogliconases, exogliconases e β -glicosidases, com ou sem CBMs), mas um sistema que age de forma coordenada para hidrolisar a celulose. Microrganismos têm adaptado diferentes abordagens para a eficaz hidrólise da celulose, que ocorrem naturalmente em partículas insolúveis ou incorporadas dentro dos polímeros de hemicelulose e lignina (TOMME; WARREN; GILKES, 1995).

Fungos filamentosos celulolíticos têm a capacidade de penetrar substratos celulósicos através de extensões de hifas, apresentando assim, seus sistemas de celulases confinados em cavidades dentro de partículas celulósicas (ERIKSSON;

BLANCHETTE; ANDER,1990). Nestas condições, a produção de celulases livres, com ou sem CBMs, podem ser suficiente para a hidrólise eficiente da celulose. As enzimas neste sistema celulase não formam um complexo de alta massa molecular estável e, por isso, são chamadas de sistemas “não-complexos”, quando comparados com o sistema de produção de celulase por bactérias anaeróbias, que não conseguem penetrar o material celulolítico, conforme mostrado na figura 2 (LYND *et al.*, 2002).

Figura 2 - Esquema da hidrólise de celulose amorfa e microcristalina pelo sistema de celulase “não complexo” (A) e complexo (B). Os quadrados preenchidos representam os terminais redutores e os quadrados sem preenchimento representam os terminais não-redutores. As regiões amorfa e cristalina estão indicadas no esquema. Celulose, enzimas e produtos hidrolisados não são mostrados em escala (LYND *et al.*, 2002).

Os fungos filamentosos do gênero *Trichoderma reesei* produzem um sistema de celulase não-complexo (LYND *et al.*, 2002).

O sistema celulase dos fungos pode ser caracterizado através da maneira que este age sobre a cadeia celulósica (tabela 2).

Tabela 2 - Composição da celulase proveniente de fungos aeróbicos e a maneira como agem sobre a cadeia de celulose.

Tipo da Enzima	Código EC	Sinônimo	Referência
Endo-(1-4)-β-D-gliconase	EC 3.2.1.4	Endogliconase ou endocelulase	$\begin{array}{c} \text{---G---G---G---G---} \\ \uparrow \quad \quad \uparrow \\ \text{Quebra ligações aleatoriamente} \end{array}$
Exo-(1-4)-β-D-gliconase	EC 3.2.1.91	Celobiohidrolase ou exocelulase	$\begin{array}{c} \text{G---G---G---G---G---G---} \\ \uparrow \\ \text{Libera celobiose tanto dos terminais} \\ \text{redutores quanto dos terminais não-} \\ \text{redutores} \end{array}$
Tipo da Enzima	Código EC	Sinônimo	Referência
Exo-(1-4)-β-D-gliconase	EC 3.2.1.74	Exocelulase ou glucohidrolase	$\begin{array}{c} \text{G---G---G---G---G---G---} \\ \uparrow \\ \text{Libera glicose de terminais não-} \\ \text{redutores} \end{array}$
B-glucosidase	EC 3.2.1.21	Celobiase	$\begin{array}{c} \text{G-G,} \quad \quad \text{G-G-G-G} \\ \uparrow \quad \quad \uparrow \\ \text{Libera glicose da celobiose e cadeia} \\ \text{curta celo-oligossacarídea} \end{array}$

Bhat e Bhat (1997).

A atividade enzimática de uma enzima é uma medida de velocidade de reação e é expressa em unidades de atividade. É definida como unidade internacional IU, que considera uma unidade de atividade como a quantidade de enzima que catalisa a transformação de um micromol de substrato por minuto em condições de ensaio definidas. Além dessa unidade, é possível utilizar a atividade específica, que é expressa em unidades (IU) por massa de proteína.

A medida da atividade enzimática da celulase é determinada através do método proposto por Ghose (1987), que padronizou o procedimento de determinação da atividade da celulase produzida por *Trichoderma reesei*.

Embora não existam métodos de medição da atividade da celulase que sejam utilizados universalmente, os mais comuns são o atividade papel de filtro (FPA – filter paper activity) e o carbóximetil celulose (CMCase). O método “filter paper” indica a capacidade de ação da enzima através da liberação dos açúcares da celulose do papel de filtro. Este método é particularmente apropriado para celulase de *Trichoderma*. O

método CMCase indica a capacidade de produção da enzima através da redução de açúcares da CMC solúvel. A unidade internacional de FPA, também denominada FPAase, é definida como FPU (“filter paper unit”) e representa a quantidade de enzima capaz de liberar 1 μmol de açúcar redutor por minuto (SEHNEM *et al.*, 2009).

Decker *et al.* (2003) determinaram que a atividade enzimática FPU está rigorosamente correlacionada com uma quantidade específica de proteína. Análises de preparações de celulases de *Trichoderma reesei* disponíveis comercialmente e produzidas em laboratório demonstraram uma vasta variação na quantidade de proteína e na atividade enzimática. Uma comparação direta dessas duas propriedades rendeu uma correlação entre a unidade de atividade enzimática (FPU) e a quantidade de proteína (mg). A figura 3 apresenta a curva de conversão de unidades.

Figura 3 – Curva de correlação entre a atividade FPU e a quantidade de proteína respectiva (DECKER *et al.*, 2003).

Castellanos, Sinitsyn e Vlasenko (1995) encontraram uma proporção entre a atividade enzimática FPU e a quantidade de enzimas. Os resultados encontrados, para celulase preparada a partir de *Trichoderma reesei*, foram 0,32 FPU/mg de proteína e 0,41 FPU/mg de proteína, para as enzimas preparadas na Privolzhski Fermentation Plant na Rússia e pela Genencor, respectivamente.

3.4.2. Microrganismos e meios de cultura

O potencial dos microrganismos compreende a habilidade para produzir enzimas para quase todas as conversões de substratos orgânicos aquo-solúveis (isto incluindo compostos de solubilidade muito baixa, como hidrocarbonetos e esteróides), através de complexas seqüências de reações.

Existem diferentes rotas para obtenção de microrganismos, que possam ter interesse industrial, tais como:

- Isolamento a partir de recursos naturais, tais como solo, água, plantas, etc. Trata-se de uma atividade que envolve muito trabalho experimental, tem custo elevado, mas que pode levar ao isolamento de novas e melhores linhagens produtoras de um determinado produto;
- Compra em coleções de culturas;
- Obtenção de mutantes naturais. Durante a proliferação de uma dada célula, existe a possibilidade de surgimento de mutantes naturais, os quais podem ser isolados objetivando a sua potencialidade de produção;
- Obtenção de mutantes induzidos por métodos convencionais, como submeter suspensões de células ou esporos à radiação ultravioleta ou substâncias químicas mutagênicas, como a nitrosoguanidina;
- Obtenção de microrganismos recombinantes por técnicas de engenharia genética, por tecnologia de DNA recombinante, obtendo células mais produtivas, ou células produtoras de substâncias normalmente não produtoras.

Segundo Schmidell (2001a), dentre as fontes de obtenção de microrganismos citadas acima, a obtenção por tecnologia de DNA recombinante tem um potencial

enorme, pois soluciona o problema de reagentes limitantes de uma reação, permitindo o aumento da reação metabólica estudada.

O crescimento de microrganismos pode ser avaliado pelo aumento de massa celular ou pelo número de células, e é o resultado de uma série de eventos altamente coordenados e enzimaticamente catalisados.

Para um processo economicamente viável, é desejável isolar linhagens que demandem curtos tempos de cultivo, ou seja, tenham elevada velocidade específica de crescimento, tenham exigência de aeração reduzida, exibam espumação (liberação de CO₂) decrescente durante o processo de fermentação, ou que sejam capazes de metabolizar substratos de baixo custo (MORAES, 2001).

Crescimento vegetativo (células vegetativas) dos fungos filamentosos na natureza ocorre na forma de hifas que se espalham sobre o substrato ou penetram o substrato. O crescimento da hifa envolve a extensão da parede da célula e, portanto, envolve a biosíntese dos componentes celulares do microrganismo. Os fungos consomem nutrientes através do crescimento vegetativo. Células vegetativas podem ser produzidas em grandes quantidades em fermentadores (CARLILE, WATKINSON, GOODAY, 2001).

As células vegetativas continuarão crescendo, enquanto as condições do meio forem ideais para o crescimento vegetativo. A falta de nutrientes no meio resulta em queda na velocidade de crescimento para um valor baixo ou zero, causando o início de uma sequência de etapas de reprodução que levam a esporulação (CARLILE, WATKINSON, GOODAY, 2001).

Para que ocorra uma boa formação de esporos de culturas de fungos, leva-se em média de 6 a 7 dias de cultivo, em condições ideais. Em um período entre 7 e 8 dias (168 a 172 horas), os esporos germinam na ordem de 100 vezes a quantidade inicial (CARVALHO, SATO, 2001). No entanto, na produção de inóculo em escala industrial, existe uma maior probabilidade de crescimento de subculturas (contaminantes), que em alguns casos leva a degeneração da cultura principal. Uma alternativa para redução no número de formação de subculturas no processo de produção de inóculo é a redução da capacidade do reator (LONSANE *et al.* 1992).

No processo de fermentação semi-sólida, o preparo do inóculo na forma de esporos é mais indicada devido à facilidade na mistura entre os esporos e o substrato sólido úmido (LONSANE *et al.*, 1992; ROUSSOS *et al.*, 1991).

Segundo dados do laboratório de Engenharia Bioquímica na Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, após a obtenção do inóculo e inoculação do substrato, a produção de celulasas no meio inoculado com esporos ou com células vegetativas pode ser considerada a mesma.

Trichoderma, que pertence ao grupo deuteromicetos (fungos imperfeitos), está hábil a crescer em meios inorgânicos, suplementados com uma fonte de carbono orgânica (ESTERBAUER *et al.*, 1991).

A maioria das celulasas de *Trichoderma* também contém enzimas com atividade para hidrolisar a hemicelulose, como xilanase, β -xilosidase, glucomananase, galactomananase, acetilesterase, glicosidase. (ESTERBAUER *et al.*, 1991).

3.4.3. Cultivo em meio líquido

Para obtenção de inóculo, uma alíquota de uma cultura estoque pura do microrganismo é utilizada em meio líquido esterilizado, adequado para o desenvolvimento microbiano. Após incubação da suspensão microbiana, à temperatura e tempo definidos, transfere-se a mesma para frascos com maior volume de meio nutriente esterilizado, e assim sucessivamente, até que se atinja massa de células suficiente para inocular o reator principal. Geralmente, o volume da suspensão de inóculo para o reator final, representa de 1 a 10% do volume de meio do reator principal (CARVALHO; SATO, 2001; MORAES, 2001; TOLAN; FOODY, 1999).

Um aspecto a ser considerado quando se trata da produção de enzimas em escala industrial é o fato da esterilização do sistema produtivo não ser absoluta. Dessa maneira, o inóculo deve ser suficientemente grande para que o microrganismo possa competir e reprimir qualquer contaminante.

A produção de celulase é realizada em culturas aeróbias e assépticas. O volume dos fermentadores usados para produção de celulase varia de 95 a 285 m³. Na fermentação, o oxigênio filtrado é fornecido a uma taxa de 0,3 a 1,2 do volume do

tanque por minuto. O reator é projetado e operado de maneira a otimizar a transferência de oxigênio e agitação. O calor gerado pelo metabolismo microbiano é removido através de um sistema de resfriamento que pode ser uma camisa de troca térmica (externa) ou serpentina (interna). Defletores são instalados próximos a parede do reator para aumentar a eficiência de agitação e prevenir a formação de vórtices. A esterilização do equipamento é feita antes da inoculação e ocorre através de aquecimento do sistema até 121 °C, durante 20 minutos.

O meio de crescimento no cultivo submerso inclui nutrientes na forma de sais, fonte de carbono orgânica, que é, em geral, um carboidrato simples como açúcar, e atua como fonte de energia e também como indutora da síntese das enzimas, e surfactantes para controle da espuma. Do ponto de vista industrial, os meios sintéticos têm alto valor agregado, e a opção geralmente é feita por meios que contenham matérias-primas provenientes da agroindústria. Os sais comumente usados são fosfato de potássio, nitrato de amônia, sulfato de amônia, cloreto de cálcio e sulfato de magnésio. Os nutrientes são, frequentemente, 5 a 25 g/L de milho macerado e extrato de levedura, por serem fontes de carbono e nitrogênio. Os surfactantes utilizados podem ser óleo de soja e óleo de palma. Os indutores podem conter açúcares solúveis e insolúveis, incluindo soro de leite (lactose).

O processo, até a etapa citada acima, é denominado “upstream”. Após esta etapa, tem-se a etapa “downstream”.

No final da fermentação, a massa celular e as enzimas são separadas por filtração utilizando-se um filtro rotativo a vácuo. A concentração da enzima crua é frequentemente menor do que a adequada para aplicações comerciais. Assim, para aumentar a concentração é utilizada a ultrafiltração.

As etapas finais de produção consistem em purificações e acabamentos (forma que será vendida – suspensa em líquido ou na forma sólida). O concentrado líquido pode ser considerado um produto bruto comercializável e pode ser preferível a obtenção de um preparado enzimático bruto na forma sólida, o qual é seco a vácuo ou por atomização (“spray drying”) (BORZANI, 2001; SANT’ANNA JR, 2001; SCHMIDELL, 2001; URENHA; PRADELLA; RODRIGUES, 2001).

3.4.4. Cultivo em meio sólido

O cultivo em meio sólido ou em substrato sólido é caracterizado pelo crescimento microbiano e formação de produtos a partir de materiais sólidos (substratos insolúveis) com propriedades para absorver água, porém em baixas porcentagens em sua composição (PANDEY *et al.*, 2001).

No cultivo em meio sólido, enzimas e outros metabólitos não enzimáticos são secretados pelos fungos e atuam diretamente sobre a matriz lignocelulósica. O complexo enzimático extracelular, que fungos decompositores geralmente produzem, inclui as enzimas hidrolíticas, responsáveis pela degradação dos polissacarídeos e as oxidativas, responsáveis pela degradação da lignina (SOUZA-CRUZ *et al.*, 2004).

O substrato sólido deve atuar tanto como suporte fisiológico, quanto como fonte de nutrientes na ausência de água livre (SHRESTHA *et al.*, 2009).

A disponibilidade restrita de água pode estimular a produção de algumas enzimas específicas, que não seriam produzidas pelo mesmo organismo na fermentação submersa.

O processo de cultivo desses microorganismos em meio sólido necessita de uma fonte de nutrientes, que permita o crescimento microbiano e quebra do material lignocelulósico. Na formulação do meio de fermentação várias fontes de carbono são utilizadas, sendo que entre elas existem: farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de cevada, bagaço de cana-de-açúcar, torta de coco, entre outras. Além disso, é possível incorporar alguma fonte de carbono opcional que induzam a produção das enzimas.

No processo de fermentação em meio sólido, assim como no processo de fermentação submersa, deve-se levar em consideração alguns aspectos importantes como a seleção do microrganismo, a escolha do substrato, a otimização dos parâmetros de processo, dentre outros fatores (PANDEY *et al.*, 2001).

A produção comercial de celulasas através do *Trichoderma sp.* é realizada nos processos de fermentação em meio líquido e em estado sólido. O farelo de trigo é um dos substratos que preferencialmente apresentam maiores valores de atividade na fermentação em estado sólido (SMITS *et al.*, 1996b). Chandra *et al.* (2009) relata a alta produção extracelular do sistema celulase a partir do *Trichoderma reesei* e a

necessidade existente de suplementações para aumentar a taxa de hidrólise da celulose.

3.4.5. Vantagens e desvantagens da FSm e FES

A fermentação em estado sólido (FES) é um eficiente método em escala laboratorial, apresentando algumas vantagens sobre o cultivo submerso (MANIMARAN *et al.*, 2008; SUKUMARAN *et al.*, 2009). Assim, a FES ganha mais atenção nas publicações especializadas, tais como: *aplicação na modernização de utilização de derivados agrícolas (águas residuárias e resíduos agrícolas, como bagaço de cana-de-açúcar, por exemplo)*, produtos de química fina (ingredientes farmacêuticos ativos e seus derivados) e produção de enzimas utilizadas em processos de menor valor agregado, como a produção de álcool (SMITS *et al.*, 1996a).

FES é um processo favorecido do reduzido teor de água, pois, gera reduzido ou nenhum volume de água residual. Em escala laboratorial e piloto, devido à menor quantidade de água empregada no processo de FES, o volume do reator deve ser sempre bem menor que a operação similar em processo FSm, o que pode reduzir os custos de operação e de capital investido, assim como o espaço ocupado necessário ao processo.

Segundo Bianchi, Moraes e Capalbo (2001), as seguintes diferenças entre FES e FSm são as mais importantes:

- Difusão de oxigênio e outros gases, são maiores em FES, devido aos interstícios existentes entre as partículas de substrato, sendo facilmente acessível ao microrganismo;
- Condução do calor é menor em FES;
- A utilização de agitação contínua em FES raramente é necessária, podendo ser empregada ocasionalmente.

Em comparação com fermentação em meio líquido, a FES é mais vantajosa, pois apresenta baixo custo de produção e alta produtividade (KAGLIWAL; SURVASE; SINGHAL, 2009), maior produtividade volumétrica (MOO-YOUNG; MOREIRA; TENDERDY, 1983). No entanto, essas informações são baseadas em processos com

reatores em escala laboratorial ou piloto. Devido à falta de reatores de grande escala, não é possível afirmar que a FES apresenta baixo custo de produção, quando comparada com a FSm.

Bianchi, Moraes e Capalbo (2001) relatam as desvantagens do processo de FES em relação ao FSm, tais como:

- Queda do rendimento em produção devido às características do meio, como granulometria e porosidade, e do tipo de reator empregado, devido a dificuldade em dissipar o calor gerado no processo e, em alguns casos de compactação do meio, em dissipar os gases gerados;
- Dificuldade de acompanhamento e controle dos parâmetros operacionais, tais como temperatura, umidade, aeração e crescimento de microrganismos.

3.4.6. Produção das celulasas medida como atividade enzimática

Vários pesquisadores publicaram diferentes valores de produção de celulase, medida como atividade enzimática, através de vários métodos de obtenção das mesmas. A tabela 3 apresenta informações sobre os dados de produção de celulase.

Tabela 3 - Produção de celulasas via fermentação em meio sólido (FES) e fermentação submersa (FSm).

Autores	Substrato	Microrganismo	FPU/gms (FES)	FPU/mL (FSm)
Mekala <i>et al.</i> (2008)	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	25,6	----
Sukumaran <i>et al.</i> (2009)	Bagaço de cana-de-açúcar	<i>Trichoderma reesei</i> RUT C30	22,8	1,14
Camassola e Dillon (2007)	Farelo de trigo + bagaço de cana-de-açúcar	<i>Penicillium echinulatum</i>	32,04	1,2
Chahal (1985)	Palha de trigo tratada	<i>Trichoderma reesei</i> QMY-1	405 U/g celulose	250U/g celulose
Chahal (1985)	Palha de trigo tratada	<i>Trichoderma reesei</i>	310 U/g celulose	

Foram obtidas celulasas através da fermentação em estado sólido do farelo de trigo utilizando o *Trichoderma reesei* RUT C30 e verificada a possibilidade de melhoria através da melhoria das condições de fermentação (MEKALA *et al.*, 2008).

Mekala *et al.* (2008) utilizaram bagaço de cana-de-açúcar como substrato para a produção de celulase utilizando *Trichoderma reesei* RUT C30 e otimizaram parâmetros para aumentar a produção. A produção da celulase se deu através fermentação em estado sólido. Resultados preliminares mostraram o maior nível de produção de celulase, atingindo valores de 25,6 FPU/g de substrato seco, onde a concentração do indutor foi de 0,331 mL/gms e a temperatura de incubação e tempo foram respectivamente 33 °C e 67 horas.

Sukumaran *et al.* (2009) produziram celulase através de fermentação em estado sólido, utilizando *Trichoderma reesei* RUT C30 e conseguiram atingir valores de atividade na ordem de 22,8 FPU/gms, equivalentes a 1,14 FPU/mL. Concentrando a enzima, Sukumaran *et al.* (2009) atingiram valores de 13,65 FPU/mL.

Além dos autores citados acima, Chahal (1985) conseguiu obter rendimentos de 250 a 430 IU/ g de celulose fazendo aproximações do método de fermentação semi-sólida, utilizando palha de trigo com *Trichoderma reesei* WMY-1. A metodologia utilizada para quantificação das enzimas é diferente da metodologia proposta por Ghose (1987), que padroniza a atividade sobre o papel de filtro. A literatura sobre produção de enzimas indica que vários mutantes de *Trichoderma reesei* são capazes de produzir 160 a 250 IU/g de celulose pura, na fermentação submersa. Altos valores de atividade de celulose de 8,6 IU/mL poderiam ser dobrados (17,2 IU/mL) extraíndo as celulasas com metade da quantidade de água.

Souza e Kilikian (2009) obtiveram 5,4 FPU/gms em meio de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar (proporção de 40% farelo de trigo e 60% de bagaço de cana-de-açúcar), com 2 dias de cultivo. Os autores sugerem que a fermentação deve ser encerrada com 2 dias de cultivo, garantindo uma maior produtividade. A figura 4 indica as curvas de concentração de celulasas ao longo do tempo:

Figura 4 - Atividade média FP do *Trichoderma harzianum rifai* em diferentes substratos.

Camassola e Dillon (2009) obtiveram 32,04 FPU/gms em meio de bagaço de cana-de-açúcar “in natura”, com 6 dias de cultivo. No entanto, os autores afirmam que os resultados obtidos são estatisticamente similares nos 3º e 4º dias de cultivo, sendo que no quinto e sexto eles atingem o valor de máxima atividade. O valor obtido por Reczey *et al.* (1996) se aproxima dos valor obtido por Camassola e Dillon (2009), porém com a utilização de *Trichoderma reesei* ao invés de *Penicillium echinulatum*, no mesmo tempo de fermentação.

3.4.7. Reatores de fermentação sólida

Esta seção apresenta alguns tipos de reatores de fermentação, também denominados biorreatores, suas vantagens e desvantagens, para fermentação em estado sólido. A maioria dos reatores de FES demonstra bom desempenho em escala laboratorial, com pequenas quantidades de meio. Uma grande dificuldade na ampliação de escala destes reatores está relacionada ao calor gerado no processo e heterogeneidade do sistema.

Segundo Durand (2003), existem duas categorias de biorreatores para o processo de FES: biorreatores em escala laboratorial, utilizando poucas gramas a

poucos quilos de meio sólido seco; e em escala piloto e industrial, onde muitos quilogramas a muitas toneladas são utilizados. Existem vários “designs” para a categoria de reatores em escala laboratorial, enquanto para a categoria de escala piloto e industrial existe uma pouca variedade de reatores.

Os reatores de fermentação em escala laboratorial, tais como, placas de Petri, frascos de Erlenmeyer de boca larga e garrafas Roux. Detalhes sobre os reatores em escala laboratorial não serão discutidos neste trabalho, pois o foco do projeto está no desenvolvimento de um processo em escala industrial.

Os motivos da menor quantidade de tipos de reatores em escala piloto e industrial para a FES são:

- Dependendo da quantidade de substrato utilizado no processo, a remoção de calor se torna muito difícil. A compactação do meio sólido pode criar canais preferenciais de passagem do ar, afetando a transferência de calor;
- As propriedades dos microrganismos relacionadas a resistência à agitação mecânica, à necessidade de oxigênio e ao range de temperatura;
- A natureza do substrato e a necessidade de pré-tratamento ou não, necessidade de esterilização ou não.

Os reatores em escala piloto e industrial em 4 categorias principais: biorreatores sem aeração forçada, biorreatores com aeração forçada, biorreatores com agitação contínua e com circulação de ar e biorreatores com aeração forçada e agitação intermitente.

Os reatores sem aeração forçada são fermentadores de bandejas. As bandejas podem ser feitas de madeira, metal ou plástico, perfurados ou não, tendo uma profundidade máxima de 15 cm. As bandejas recebem o meio sólido e são alocadas em salas termoeestáticas, uma acima da outra com um espaçamento de alguns centímetros entre elas. O processo de FES com bandejas é muito utilizado em países da Ásia. Esta tecnologia requer extensas áreas para disposição das bandejas e muita mão-de-obra.

Os reatores com aeração forçada são reatores de leito fixo, com a introdução de ar através de uma tela que suporta o substrato. Este tipo de reator foi desenvolvido em escala pré-piloto de modo a serem definidas estratégias de controle e otimização da temperatura do ar de entrada, a vazão de entrada de ar e adição de água durante o

processo. Este tipo de reator pode ser esterilizado através da passagem de vapor pelo mesmo. Trata-se de um reator simples que opera com poucos quilogramas de meio sólido seco. Estes reatores foram desenvolvidos sem um sistema de agitação. A figura 5 apresenta uma foto do reator de escala pré-piloto.

Figura 5 - Foto do biorreator de escala pré-piloto, com aeração forçada e sem agitação (DURAND, 2003).

A partir deste tipo de reator, foram desenvolvidos outros tipos, utilizando como informações de reatores de escala laboratorial. Durand (2003) cita reatores com um sistema de serpentinas internas ao vaso, de modo a melhorar o controle de temperatura e reatores com um sistema de agitação intermitente.

Os reatores de produção contínua compreendem os tambores rotativos, para processos em que agitação contínua é necessária para maximizar a exposição das partículas do substrato com a circulação de ar.

Os reatores com aeração forçada e agitação intermitente são descritos como reatores de leito com ar passando através do mesmo. Um sistema de agitação é

utilizado periodicamente para misturar o meio e um sistema de adição de água é utilizado de modo a manter a umidade do sistema.

Durand (2003) cita que para processos onde não existe necessidade de esterilização, por exemplo, na produção do molho de soja, utilizou-se um reator retangular com alguns metros de altura não especificado, onde toneladas de substrato pré-tratado e inoculado foram colocadas sobre uma tela de arame e ar condicionado forçado a passou através do meio. Um agitador de carrinho (agitador “trolley”) misturou o meio sólido periodicamente. A figura 6 apresenta o reator citado.

Figura 6 - Foto do reator retangular utilizado na produção do molho de soja (DURAND, 2003).

Segundo Durand (2003) em Dijon (França) pesquisadores desenvolveram uma estratégia para o processo não esterilizado baseada no controle de temperatura e umidade do meio através da regulação da temperatura, umidade relativa e taxa de vazão do ar de entrada, de modo que o microrganismo cresça nas condições ótimas, evitando o desenvolvimento de subculturas. O sistema do reator retangular tem sido constantemente melhorado através da aplicação de modelos matemáticos de controle

de processo, mantendo a umidade do meio durante o processo, verificando a perda de umidade por evaporação, devido à aeração do meio.

Durand (2003) afirma que para os processos esterilizados, os reatores têm o mesmo princípio dos não esterilizados, porém com capacidades menores. Durand (2003) patenteou um reator de FES, que é fechado, tem sistema de agitação e é controlado por um computador durante as diferentes etapas do processo, tais como: esterilização do biorreator quando vazio, esterilização do meio, controle do processo durante a fermentação e armazenamento de dados.

3.5. Processos Simultâneos de Produção de Celulases e Etanol

Quatro eventos biologicamente mediados ocorrem no curso da conversão da biomassa celulolítica em combustíveis e produtos químicos:

- a. Produção de celulases;
- b. Hidrólise da celulose e hemicelulose;
- c. Fermentação alcoólica dos hidrolisados de celulose (hexoses);
- d. Fermentação alcoólica de produtos de hemicelulose (hexoses e pentoses).

Alternativas de configurações de processo:

- Hidrólise (sacarificação) e fermentação separadas (SHF) compreende: produção de celulase; hidrólise da celulose; fermentação alcoólica do hidrolisado de celulose; fermentação alcoólica do hidrolisado de hemicelulose;
- Hidrólise (sacarificação) e fermentação simultâneas (SSF) compreende: produção de celulase; hidrólise (sacarificação) e fermentação alcoólica simultâneas do hidrolisado de celulose; fermentação alcoólica do hidrolisado de pentoses;
- Hidrólise (sacarificação) e cofermentação simultâneas (SSCF) compreende: produção de celulase; hidrólise da celulose e hemicelulose, e fermentação alcoólica simultânea dos hidrolisados;

- Bioprocesso consolidado (CBP) compreende: produção de celulase, hidrólise da celulose e hemicelulose, e fermentação alcoólica simultâneas dos hidrolisados.

A figura 7 apresenta um diagrama de blocos das quatro alternativas de processo (LYND et al., 2002).

Figura 7 - Evolução dos sistemas de processamento de biomassa por hidrólise enzimática (LYND *et al.*, 2002).

3.6. Aspectos Econômicos

A Engenharia Econômica compreende um conjunto de princípios e técnicas necessárias para a tomada de decisões relativas à aquisição e à disposição de bens de capital, na iniciativa privada e em órgãos governamentais (VILLEN, 2001).

A motivação de um empreendimento comercial é o lucro, o qual compreende a diferença entre o custo de produção e o valor de venda de um produto. De maneira geral, pode-se definir o lucro como sendo Receita Bruta de acordo com a equação 1:

$$RB = \text{Vendas} - \text{Custos} \quad \text{Eq. 1}$$

onde:

- Vendas (V) valor aferido pelas vendas, constituído pela quantidade vendida multiplicada pelo preço unitário de venda;;
- Custos (C) valor constituído pela soma dos valores atribuídos a matérias-primas, custos de fabricação, despesas administrativas, industriais e comerciais, impostos, taxas;
- RB é a receita bruta.

Além dos “custos” da equação 1, existe a despesa inicial para instalação do empreendimento industrial a qual é denominada investimento (I) (VILLEN, 2001).

Ao longo do tempo de funcionamento de uma indústria, a instalação sofre redução de seu valor e, essa perda do valor do investimento (I) é denominada depreciação (D) e pode ser calculada conforme a equação 2:

$$D = (I - VR) * d \quad \text{Eq. 2}$$

onde:

- D é a depreciação anual;
- I o valor do investimento;
- VR é valor residual do investimento, após o período de amortização;
- d é a taxa de depreciação anual.

A amortização (A) significa a recuperação do investimento sob a forma de um custo, para ser deduzido da receita bruta. A amortização é descrita conforme equação 3. O tempo de amortização para equipamentos em indústrias químicas é definido em 10 anos, o que representa uma taxa de amortização anual de 10%.

Eq. 3

$$A = \beta * I$$

onde:

- β é a taxa de amortização anual.

A taxação do governo sobre a renda auferida pelas empresas é denominada Imposto de Renda (IR). Essa taxação incide sobre o lucro tributável (LT), conforme a equação 4:

Eq. 4

$$IR = \alpha * LT$$

onde:

- α é a taxação do governo em porcentagem/100.

O lucro tributável, sujeito ao imposto de renda, é então:

Eq. 5

$$LT = RB - A$$

Reunindo as equações 1 e 5:

Eq. 6

$$LT = V - (C + A)$$

Lucro líquido (LL), conforme equação 7, é representado pela diferença entre o lucro tributável e o imposto de renda apurado:

Eq. 7

$$LL = LT - IR$$

Reunindo a equação 7, com as equações 4 e 6, tem-se a equação 8:

Eq. 8

$$LL = (1 - \alpha) * [V - (C + A)]$$

Dessa maneira, o lucro líquido da equação 8 pode ser descrito:

$$LL = (1 - \alpha) * [V - (C + \beta * I)] \quad \text{Eq. 9}$$

Das equações 3, 4 e 6, se obtém para o imposto de renda:

$$IR = \alpha * [V - (C + \beta * I)] \quad \text{Eq. 10}$$

As equações acima apresentadas são utilizadas no cálculo de viabilidade econômica, que se trata de uma estimativa e análise de desempenho financeiro do produto resultante do projeto. A análise de viabilidade econômica necessita de informações de receita da empresa, depreciação, amortização e valor de investimento.

3.6.1. Estimativa de custos

De acordo com Peters, Timmerhaus e West (2003), existem diferentes tipos de estimativa de capital de investimento para um projeto. A estimativa de capital de investimento pode variar desde a estimativa de um projeto baseado em pouca informação ("pré-design"), até uma estimativa detalhada em desenhos e especificações completas do projeto, variando a precisão do valor total de investimento. Essas estimativas são divididas em 5 categorias principais:

1. Estimativa de razão (fim-de-magnitude): baseada em dados de custo similar a projetos anteriores, com margem de erro de custo de investimento de mais ou menos 30%;
2. Estimativa consignada: baseada no conhecimento dos principais itens de equipamentos do projeto, com margem de erro de custo de investimento de até 30%;
3. Estimativa preliminar (estimativa de orçamento): baseada em dados suficientes para permitir aprovação de um orçamento, com margem de erro de custo de investimento de 20%;

4. Estimativa definitiva (estimativa de controle do projeto): baseada em dados do projeto quase completo (antes da conclusão dos desenhos e especificações), com margem de erro de custo de investimento de 10%;
5. Estimativa detalhada (estimativa de contrato): baseada em desenhos de engenharia completos, especificações e pesquisas no local, com margem de erro do custo de investimento de mais ou menos 5%.

3.6.2. Componentes do custo de capital de investimento

Capital de investimento é a soma de recursos financeiros necessária para realizar um empreendimento físico, adicionada a quantia de recursos financeiros para colocar o empreendimento em funcionamento.

Segundo Peters, Timmerhaus e West (2003), o custo do capital de investimento pode ser dividido em duas classificações: custos diretos e custos indiretos.

Os custos diretos são aqueles relacionados à realização física do projeto, tais como: aquisição do terreno, instalações prediais, aquisição e instalação de equipamentos, instrumentação e controle, tubulações para as utilidades, sistemas elétricos.

Os custos indiretos são aqueles referentes aos aspectos legais do projeto, tais como: engenharia e supervisão na instalação das edificações, despesas legais, taxas de contratos e contingências.

Os equipamentos compreendem os equipamentos de processo, de armazenamento de matéria-prima e armazenamento do produto final. As especificações dos equipamentos, tais como capacidade e tipo de material impactam no custo.

Para atualização do custo dos equipamentos até 2009, em relação aos valores de 2001, utilizou-se o método de índice de custos (CEPCI – “*Chemical Engineering plant cost index*”), conforme a equação 11:

Eq. 11

$$Custopresente = custooriginal * \left(\frac{CEPCI2009}{CEPCI2001} \right)$$

onde:

- CEPCI é o valor do índice de custo para o respectivo ano.

A cotação dos equipamentos comumente não inclui o valor do frete.

Existem diferentes métodos para estimativa do capital de investimento. A escolha do método depende da categoria que o processo se encaixa, ou seja, da precisão desejada para estimativa; e depende da quantidade de informações detalhadas disponíveis. Peters, Timmerhaus e West (2003) citam sete métodos de estimativa do custo de capital de investimento: estimativa pormenorizada, estimativa do custo unitário, estimativa a partir do percentual dos equipamentos, “Fatores de Lang” para aproximação do capital de investimento, fator de potência aplicada à capacidade da planta, custo de investimento por capacidade da unidade e estimativa pela taxa de rotatividade.

Este projeto tem categoria de estimativa consignada, conforme apresentada na seção 3.6.1. A metodologia adotada no projeto é a de estimativa por percentual do custo de aquisição dos equipamentos, a qual necessita do custo dos equipamentos entregues no local de execução do projeto. Os componentes do custo de capital de investimento são estimados como porcentagens do custo dos equipamentos adquiridos.

Segundo Peters, Timmerhaus e West (2003) os fatores percentuais utilizados para a estimativa dos custos diretos e indiretos são determinados com base no tipo de processo (processo com sólidos, processo líquido-sólido, processo líquido). Para o processo de cultivo em meio sólido (processo com sólidos) a estimativa é dada de acordo com os dados da tabela 4:

Tabela 4 - Percentuais atribuídos aos itens do projeto, para estimativa do capital de investimento, baseado em custo de equipamento entregue no local de instalação.

<i>Percentual dos Custos Diretos e Indiretos, a partir do Custo de Equipamento Entregue</i>	
Custos diretos	
Aquisição de equipamentos	100%
Instalação de equipamentos adquiridos	39%
Instrumentação e controle	26%
Tubulação	31%
Sistemas elétricos	10%

Instalações prediais	29%
Melhorias da área	12%
Serviços de instalações	55%
Sub-total	302%
Custos indiretos	
Engenharia e supervisão	32%
Despesas de edificações	34%
Despesas legais	4%
Taxas de contratos	19%
Contingências	37%
Sub-total	126%
Capital Fixo de Investimento	428%
Mão-de-obra	75%
Capital de Investimento Total	503%

(PETERS; TIMMERHAUS; WEST, 2003)

Segundo Turton *et al.* (2007), os custos de aquisição dos equipamentos podem ser obtidos conforme a equação 12.

Eq. 12

$$\log_{10} C_p^0 = K_1 + K_2 * \log_{10}(A) + K_3 [\log_{10}(A)]^2$$

onde:

- C_p^0 é o custo de aquisição do equipamento, em aço carbono, operado a pressão ambiente;
- A é o parâmetro de capacidade do equipamento;
- K_1 , K_2 , K_3 são constantes de cada equipamento, de acordo com a capacidade e tamanho do equipamento. Os valores das constantes são encontrados na tabela A.1 do anexo A.

A equação 12 gera o custo de aquisição de equipamentos em aço carbono. Para obter o custo de aquisição de um equipamento que não seja em aço carbono, deve-se fazer uma correção para o material utilizado, de acordo com a equação 13 (módulo de Bare):

$$C_{BM} = C_p^0 * F_{BM} = C_p^0 * (B_1 + B_2 * F_M * F_p) \quad \text{Eq. 13}$$

onde:

- C_{BM} é o custo de aquisição do equipamento produzido com material diferente de aço carbono;
- F_{BM} é o fator de Bare para material e pressão de operação do equipamento;
- B_1 , B_2 são as constantes para o fator do módulo de Bare. Os valores dessas constantes são encontrados na tabela A.3, no anexo A deste trabalho;
- F_M é a constante do material do equipamento. O valor de F_M pode ser obtido através do número de identificação da tabela A.2, para o tipo de tanque desejado e, em seguida, na figura A.1, do anexo A;
- F_p é a constante de pressão do equipamento.

Para tanques, o fator F_p é igual a 1 (Turton *et al.*, 2007).

A relação entre o custo de equipamento adquirido e o custo de um equipamento similar, porém de capacidade diferente, é dada pela equação 14:

$$\left(\frac{I_1}{I_0} \right) = \left(\frac{C_1}{C_0} \right)^m \quad \text{Eq. 14}$$

onde:

- I_1 é a custo do equipamento na escala desejada (\$);

- I_0 é o custo do equipamento identificado a partir da capacidade inicial utilizada (\$);
- C_1 é a capacidade do equipamento na escala desejada (m^3);
- C_0 é a capacidade do equipamento na escala inicial (m^3);
- m é o fator de potência específico do equipamento em análise (TURTON *et al.*, 2007).

Para reatores em aço inoxidável, o valor do coeficiente m é 0,56 (PETERS; TIMMERHAUS, WEST, 2001).

3.6.3. Estimativa do custo operacional

Custo operacional, ou custo total do produto, tem como componente importante para a análise econômica, a soma de todos os custos de funcionamento da unidade, a venda de produtos e a recuperação do capital de investimento.

Todas as despesas diretamente ligadas com a operação de fabricação do produto ou aos equipamentos físicos da planta de processo estão incluídas nos custos de produção. Os custos de produção são divididos em três classificações: Custos variáveis de produção, custos fixos e custos indiretos da planta.

Os custos variáveis de produção incluem despesas diretamente associadas com a operação de fabricação. Estes tipos de custos envolvem matérias-primas, mão-de-obra operacional, mão-de-obra de supervisão, utilidades, manutenção, operação de testes, encargos de laboratório, patentes e royalties.

Os custos fixos são despesas independentes do nível ou taxa de produção. Impostos, seguros, depreciação, aluguel são geralmente classificados nesta categoria. Todos estes encargos tendem a variar com a inflação, exceto a depreciação, uma vez que a mesma é estabelecida em acordos regulatórios.

Os custos indiretos da planta referem-se às despesas como, benefícios para empregados, seguros de vida, planos de saúde e odontológicos, férias e bonificações (TURTON, 2007).

A estimativa do custo operacional pode ser determinada como porcentagens médias, conforme apresentado por Peters, Timmerhaus e West (2003), do custo de capital fixo de investimento e custo de mão-de-obra operacional total.

Tabela 5 - Percentuais atribuídos aos itens do projeto, para estimativa do custo operacional, baseado em custo de mão-de-obra operacional e capital fixo de investimento.

<u>Percentual dos custos a partir de custos definidos</u>	
Custos de operação	
Custos variáveis	
Mão-de-obra de supervisão	10% do custo de mão-de-obra operacional
Utilidades	5% do custo operacional total
Manutenção	7% do capital fixo de investimento
Encargos de laboratório	15% do custo de mão-de-obra operacional
Patentes e royalties	3% do custo operacional
Custos fixos	
Depreciação	10% do capital fixo de investimento
Seguros	2% do capital fixo de investimento
Impostos locais	1% do capital fixo de investimento
Custos indiretos da planta	60% do custo de mão-de-obra operacional
Despesas gerais	
Despesas administrativas	20% do custo de mão-de-obra operacional
Serviços de vendas, distribuição e marketing	2% do custo de mão-de-obra operacional

(PETERS; TIMMERHAUS; WEST, 2003)

3.6.4. Análise econômica

Como já visto anteriormente, subtraindo-se da receita (vendas x preço unitário) o custo de venda e os impostos que incidem sobre o produto, obtém-se a receita líquida. Subtraindo-se da receita líquida os custos operacionais, obtém-se a margem operacional. A diferença entre a margem operacional e os custos fixos é conhecida por caixa gerado, que descontada a depreciação, gera o resultado operacional.

A diferença entre o caixa gerado e o investimento é o que se denomina fluxo de caixa. Para avaliar o retorno do investimento, deve-se avaliar o fluxo de caixa, pois, ele é a base para avaliação da rentabilidade. Para a determinação do fluxo de caixa deve-se fixar o tempo de vida do projeto.

O fluxo de caixa é obtido a partir da equação 15:

Eq. 15

$$FC = (1 - \alpha) * (V - C) + \alpha * \beta * I$$

A decisão sobre um investimento é tomada com base na Taxa Mínima de Atratividade (TMA), que é uma taxa de juros mínima que o investidor se propõe a ganhar. A TMA é dividida em três componentes: custo de oportunidade, risco do negócio e liquidez.

O método da taxa interna de retorno tem o objetivo de determinar qual é a taxa de juros, que aplicada ao investimento, gerará o fluxo de caixa resultante do projeto, de acordo com a Taxa Mínima de Atratividade.

Valor presente líquido (VPL) considera que se aceite qualquer oportunidade de investimento, cujo valor presente líquido seja superior a zero. O VPL pode ser definido pela equação 16:

Eq. 16

$$VPL = \sum_{t=0}^n \frac{FC_t}{(1 + TMA)^t}$$

onde:

- FC_t é o fluxo de caixa por período (\$/ano);
- t é o tempo total do projeto (anos);
- n é o período (anos).

O critério da Taxa Interna de Retorno (TIR) considera que se aceite qualquer oportunidade de investimento cuja taxa interna de retorno seja superior à taxa exigida. Matematicamente, a TIR é a taxa de juros que torna o valor presente das entradas de caixa igual ao valor presente de saídas de caixa do projeto de investimento.

“Pay back” se refere ao tempo de retorno sobre o valor de investimento. Esse tempo é calculado conforme a equação 17:

$$T_{payback} = \frac{I}{FC_{médio}} \quad \text{Eq. 17}$$

O valor do custo de produção é obtido através da equação 18:

$$CP = CV - \left(\frac{RB}{P} \right) \quad \text{Eq. 18}$$

onde:

- CP é o custo de produção;
- CV é o preço de venda;
- P é a produção.

3.6.5. Aspectos econômicos de processos fermentativos

Segundo Villen (2001), os objetivos comumente buscados no desenvolvimento de processos fermentativos são: seleção de microrganismos com elevada produtividade e rendimento; matérias-primas de baixo custo; reator para o cultivo e equipamentos periféricos com baixo investimento de capital, mas, com elevado grau de automação do processo, para redução de mão-de-obra e elevado grau de reprodutibilidade da qualidade do produto. Atualmente, são essências também os aspectos relacionados às questões ambientais, como a minimização de descarga de efluentes e uso de água.

Essas características gerais são importantes, pois, causam impacto no custo de produção. Apresentar elevada eficiência na conversão do substrato em produto aumenta a produtividade. Além disso, permitir o acúmulo do produto no meio e não produzir substâncias incompatíveis com o produto melhora a qualidade e facilita a recuperação do produto. Apresentar constância quanto ao comportamento fisiológico, permite o aumento de escala produtiva e manutenção da qualidade do produto.

Para produtos microbianos de baixo valor agregado, como por exemplo, o etanol, o custo de produção é significativamente impactado pelo custo da matéria-prima, custos fixos, utilidades e mão-de-obra. Entretanto, para produtos microbianos de elevado valor agregado, tais como os produtos para aplicação em tratamentos terapêuticos e produção de kits para diagnósticos, o elevado grau de pureza necessário desloca a maior parte do custo do produto para a etapa de purificação (Pessoa e Kilikian, 2005).

Himmel, Ruth e Wyman (1999) simularam um processo de produção de celulasas via FSm para aplicação na produção de etanol de madeira (2000 toneladas de madeira seca por dia) com o objetivo de estimar o impacto do custo (capital e operacional) da enzima no custo do etanol. O simulador utilizado foi o “Aspen”, para determinar o fluxo de alimentação de substrato (madeira hidrolisada como fonte de carbono e indutora) para produção da celulase e o número de fermentadores necessários no processo, de modo que a celulase seja produzida continuamente. O custo de produção das enzimas variou entre US\$0,415 a 0,442/100.000FP (U) em função de aumento no custo da madeira em até 62%, e, conseqüente impacto no custo do meio de cultura. Simulações quanto ao aumento da produtividade em enzimas, desde 50 até 200 FP/L.h, resultaram redução do custo da enzima até 0,2/100.000FP (U).

Os resultados obtidos concluem que: fermentadores que operam sobre pressão aumentam o custo de produção do etanol sobre os que operam sobre pressão atmosférica; o aumento da produção da celulase reduz significativamente o custo de produção do etanol, enquanto o aumento da produtividade na causa o mesmo impacto no custo do etanol; o custo da matéria-prima utilizada no processo não impacta no custo do etanol. Os autores afirmam que com o aumento da produção de enzimas por microrganismos e tratamento prévio da biomassa são maneiras de reduzir o custo de produção da mesma, resultando em redução no custo do álcool.

Os autores afirmam que os resultados obtidos na simulação sugerem vantagens para aumentar a capacidade da planta com melhorias na tecnologia de produção da celulase e que configurações alternativas de fermentadores deveriam ser consideradas para melhorar o custo de produção.

Piccolo e Bezzo (2009) fizeram uma comparação técnico-econômica entre duas tecnologias para produção de etanol de material lignocelulósico. Uma das tecnologias foi o processo de hidrólise enzimática de cavacos de madeira e fermentação sólida dos açúcares redutores provenientes da celulose e hemicelulose dos cavacos de madeira. O processo foi simulado no “software Aspen Plus v. 13.2, para cálculo dos balanços de massa e energia. Considerou-se que a celulase necessária no processo é comprada. Os autores concluem que uma variável determinante no custo do bioetanol é a celulase. Eles afirmam que se a celulase for produzida pela própria empresa produtora do bioetanol, o custo final do bioetanol pode ter uma redução média de 15%.

Pradella *et al.* (2009) e Wooley *et al.* (1999), simularam o processo de produção de etanol 2G com o objetivo de estimar o custo de investimento, custo operacional e custo de produção do etanol, utilizando enzimas na hidrólise da biomassa celulolítica.

Wooley *et al.* (1999) mostraram que é possível obter uma redução no custo do etanol utilizando um processo de hidrólise da biomassa lignocelulósica através do cultivo em meio sólido de serragem de madeira, da ordem de 20%, quando comparado com processos de hidrólise ácida. No processo simulado, os autores estimaram que o processo de produção das celulases inserido dentro do processo de produção do bioetanol representa 11% do custo final. Wooley *et al.* (1999) indicam que é possível chegar a reduções maiores, com melhorias tecnológicas no processo, nas etapas de pré-tratamento da matéria-prima e produção de celulase ou no custo dos equipamentos.

Von Sivers e Zacchi (1996) afirmam que o aumento da capacidade de uma planta de produção de bioetanol com hidrólise enzimática, reduz o custo do produto final e que a etapa de produção da enzima representa 24% do custo do bioetanol. Os dados apresentados diferem-se dos dados apresentados por Wooley *et al.* (1999), pois as variáveis do processo e capacidade de produção adotados como premissa são diferentes.

Pradella *et al.* (2009) afirmam que quanto maior for a concentração das celulases, menor é o custo de produção do etanol 2G. Afirmam também, que o aumento na produção de celulases, medida em atividade enzimática, em relação ao volume de etanol produzido por dia, tem um perfil assintótico e que para valores de acima de

300FPU/L.h, em 120 horas de fermentação, não trazem benefícios adicionais ao custo relativo de produção de etanol nem ao custo absoluto de produção de enzima.

3.7. Conceitos Estatísticos

Nesta seção são citados alguns conceitos estatísticos utilizados no projeto.

Em estatística existem testes que analisam a correlação entre variáveis “x” e resultados “y”. A definição de correlação é baseada no fato de duas (ou mais) variáveis apresentarem tendência conjunta. O coeficiente de correlação linear (r) mede o quão próximos estão os pontos de uma reta, ou seja, r é uma medida numérica da força da relação entre duas variáveis que representam dados quantitativos.

Segundo Triola (2008), existem “softwares” de cálculos estatísticos que fazem análise de correlação entre as variáveis de uma equação. No “software” Minitab, a maneira de interpretar a correlação existente entre as variáveis está diretamente ligada ao valor de P . Se o valor de P calculado for menor ou igual ao nível de significância, deve-se concluir que há uma correlação linear entre as variáveis. Caso contrário, não há evidência suficiente para apoiar a conclusão de uma correlação linear. O nível de significância comumente utilizado é de 95% de certeza, ou seja, se o valor de P for menor do que 0,05, conclui-se que há correlação linear entre uma variável “x” e um resultado “y”.

Após definido a correlação entre as variáveis, busca-se determinar quão influente a variável é sobre o resultado final. Isso é determinado através do coeficiente de determinação (R^2), obtido pelo quadrado do coeficiente de correlação (r). O coeficiente de determinação diz quanto (em porcentagem) da variável de saída pode ser explicada pelo modelo envolvendo a variável de entrada “x”. O restante da variação é causado por outras variáveis. Analisando-se a equação de cada variável “x” sobre uma variável “y”, através da linearização, é possível determinar o peso da influência.

No “software” Minitab, o resultado do coeficiente de determinação é determinado por $R\text{-sq}$.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção definem-se o processo, apresentam-se as premissas adotadas e os balanços de massa para determinação das massas pertinentes aos cálculos, além das ferramentas de cálculos para a análise técnico-econômica de viabilidade da implantação da planta industrial de produção da celulase, através de fermentação em estado sólido.

A ferramenta utilizada para os cálculos de custo de produção da celulase e viabilidade econômica foi o “software” Microsoft Excel 2003, onde equações de engenharia econômica, conforme apresentado na seção 3.6 deste trabalho, foram inseridas e, a partir de dados de entrada, a planilha gerou dados de saída, tais como: custo de produção de celulase, Taxa Interna de Retorno (TIR), “Pay-back” e gráficos do fluxo de caixa. A ferramenta utilizada nas análises estatísticas foi o “software” MiniTab 15, que gerou informações de correlação entre as variáveis definidas no processo e o custo de produção das celulasas, distribuição normal do custo de produção e impacto de cada variável sobre o custo de produção.

4.1. Definição do Processo

A primeira etapa do trabalho foi a definição do processo de produção de celulase por fermentação em estado sólido.

As etapas básicas do processo compreendem armazenamento de matérias-primas, mistura das diferentes matérias-primas gerando o substrato, produção de inóculo, fermentação ou etapa de cultivo para produção das enzimas e armazenamento da celulase aderida ao substrato. O diagrama de blocos da figura 8 apresenta o processo de produção de celulase de acordo com as etapas descritas e os números indicam as correntes do processo e serão explicados na seção 4.3.5 deste trabalho.

Figura 8 - Diagrama de blocos do processo de produção da celulase por fermentação em estado sólido.

O processo apresentado no diagrama de blocos da figura 8 está dividido nas seguintes operações:

- No bloco “bagaço de cana-de-açúcar” é a localização do bagaço de cana-de-açúcar “in natura”, recebido diretamente da usina padrão;
- No bloco “tq farelo de trigo” ocorre o armazenamento do farelo de trigo ou outro substrato utilizado para a produção de celulase e produção de inóculo;
- No bloco misturador, ocorre a mistura do bagaço de cana-de-açúcar com o farelo de trigo, que compõem o meio de cultivo;
- No bloco “vapor para esterilização” ocorre a produção de vapor, gerado em caldeira de média pressão na própria usina, a 121°C, durante 30 minutos, para esterilizar os reatores do processo;
- No bloco “reatores de produção de inóculo” ocorre o crescimento vegetativo do microrganismo que inoculará o meio de cultivo;
- No bloco “água” ocorre a captação de água filtrada que será adicionada nos reatores de produção de inóculo e reatores de fermentação (biorreatores) para o meio de cultivo atingir 60% de umidade;

- g. No bloco “compressor de ar” ocorre a geração de ar comprimido que alimentará os reatores do processo, na taxa de 5mL/min.gms, de acordo com os dados da PhD Iara Rebouças Pinheiro (2009), aluna do Laboratório de Engenharia Bioquímica da USP;
- h. No bloco “biorreatores” ocorre o processo de fermentação em estado sólido, gerando as celulasas;
- i. No bloco “tq de celulase” ocorre o armazenamento da celulase aderida à matriz lignocelulósica em um tanque de armazenagem.

O preparo do inóculo ocorre em duas etapas. A primeira ocorre em laboratório, onde os esporos são cultivados em meio constituído por farelo de trigo, sendo a inoculação desse meio na base de 10^7 esporos/gms e com tempo de duração de 24 horas (ROUSSOS *et al*, 1991). Nessa etapa os esporos germinam, dando início ao crescimento em estado vegetativo. Na segunda etapa, 100 g de meio de farelo de trigo serão inoculados com 1 g do meio da primeira etapa. A segunda etapa ocorre no reator de produção de inóculo, denominado germinador, e tem tempo de duração de 48 horas. Ao término desta etapa, a concentração de células é da ordem de 0,2g/gms (FERREIRA, 2008).

Para o cultivo de produção das enzimas adotou-se meio constituído por bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, inoculação deste meio com a cultura de células em estado vegetativo obtida no germinador, na proporção de 0,002 g/gms.

O processo opera de maneira descontínua, porém ininterrupta, pois, enquanto um reator está em limpeza e esterilização, outro está sendo drenado, outro sendo preenchido e os outros estão em processo de fermentação. Dessa maneira, a alimentação de substrato e microrganismo, assim como a produção de celulase, ocorre 24 horas por dia.

Os reatores considerados na produção das enzimas são tanques fechados, com sistema de agitação intermitente e um sistema de troca térmica através de uma camisa de troca térmica (externa), para controle de temperatura. O ar utilizado no processo tem a umidade e a temperatura controladas, da mesma maneira que o ar de saída dos reatores, com objetivo de melhorar o controle dos parâmetros do processo de fermentação.

Com base nos estudos de Lonsane *et al.* (1992) e Roussos *et al.* (1991) a capacidade volumétrica adotada dos reatores de produção de inóculo é de 1 m³, pois, Roussos *et al.* (1991), conseguiram produzir, em escala piloto, inóculo composto por 21 kg de farinha de mandioca úmida com *Trichoderma harzianum*, com 5,0E10 conidioesporos/g de farinha, que foram suficientes para inocular 5 toneladas de farinha de mandioca ou bagaço de cana-de-açúcar com farelo de trigo no processo de fermentação em estado sólido. Lonsane *et al.* (1992) afirmam que a ampliação de um processo em escala piloto para escala industrial deve ser de 200 a 500 vezes a maior. Para o processo definido com bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, e baseado na informação de que 0,002g de meio de inóculo são necessários para inocular 1 g de substrato seco, o reator de 1 m³ está adequado ao processo, pois está abaixo da capacidade máxima permitida na ampliação.

Com base nos estudos de Durand (2003), Lonsane *et al.* (1992) e Roussos (1991) a capacidade volumétrica dos reatores para produção das enzimas adotada é de 5 m³, pois, segundo esses autores, volumes superiores a 5 m³ dificultam o controle do processo quanto a temperatura, umidade e distribuição homogênea do micélio, resultando redução na produtividade das celulasas.

Parâmetros de processo tais como temperatura, pH, aeração, agitação e tempo de esterilização foram considerados como sendo controlados nos valores apresentados por Castellanos, Sinitsyn e Vlasenko (1995), considerou-se pH entre 4,5 e 5,0, temperatura entre 30 °C e umidade em 60%, pois apresentou os melhores rendimentos de produção de celulasas e hidrólise do material lignocelulósico pelos microrganismos *Penicillium* e *Trichoderma*.

O transporte do substrato das estocagens de matérias-primas para os reatores de produção de inóculo e reatores de fermentação ocorre através de roscas transportadoras, utilizadas atualmente nas usinas sucroalcooleiras.

Neste projeto não foi realizado o balanço energético do processo, pois se trata de um processo com as equações cinéticas pouco claras.

O projeto adotou como premissa que todo calor gerado no processo será controlado através do fluxo de ar através do meio de fermentação e por uma camisa de troca térmica nos reatores de produção de inóculo e de produção de enzimas, de modo

que não exista variação de temperatura e o meio de fermentação esteja operando na temperatura ótima durante todo o processo. A energia gerada pela agitação intermitente do meio de cultivo nos reatores é desprezível, assim como as energias potenciais e cinéticas na FES.

4.2. Premissas do Projeto

A massa de cana de açúcar processada nas principais usinas do país em uma dada safra foi obtida do banco de dados da União da Indústria de Cana-de-Açúcar (UNICA).

Uma usina sucroalcooleira padrão opera com milhões de toneladas de cana-de-açúcar durante o período de safra. A usina considerada padrão neste trabalho considera a moagem de 1.000.000 de toneladas de cana-de-açúcar/ano, quantidade obtida da média da safra de cana utilizada por três grandes usinas sucroalcooleiras (Santa Inês, Albertina e São Francisco).

Este projeto toma por referência uma usina sucroalcooleira padrão, na qual, a prática atual de destinar a maior parte do bagaço de cana para a geração de energia térmica e elétrica é mantida e, parte da fração residual de bagaço, é destinada à produção de etanol 2G. É possível considerar a destinação de porcentagens entre 5 e 30% do bagaço de cana-de-açúcar para a hidrólise e fermentação alcoólica.

Uma vez que a planta de produção de celulase é instalada junto à usina, haverá disponibilidade de bagaço para compor o meio sólido de cultura, e disponibilidade de vapor e energia elétrica para a esterilização dos equipamentos e matérias-primas.

Ainda, por serem as enzimas destinadas à aplicação na produção de etanol no mesmo local, não são considerados custos de distribuição, vendas e marketing na composição do custo de produção da enzima.

A unidade de produtiva opera 330 dias ao ano e o rendimento adotado para o processo de produção de celulase foi de 90%, ou seja, do total de celulasas que deveriam ser produzidas, 10% serão perdidas devido contaminações.

As atividades enzimáticas para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar adotadas são apresentadas na tabela 6.

Tabela 6 – Valores adotados de atividade enzimática na hidrólise de celulose.

Atividade enzimática (FPU/g de substrato)	7	10	20	30
---	---	----	----	----

Dispondo-se da massa de bagaço de cana a ser hidrolisada e da atividade enzimática a ser aplicada, determinou-se a quantidade de celulase necessária para atender a usina produtora de etanol 2G.

Para determinação do custo do meio de cultura para produção das enzimas, considerou-se o emprego de bagaço “in natura”. Há diferença entre as duas matérias-primas quanto ao custo das mesmas. O custo do bagaço de cana-de-açúcar é, em média, R\$15,00/ton, conforme informação dada pela Usina Albertina, localizada em Ribeirão Preto (SP) e Nogueira (2005). O custo do farelo de trigo é, em média, R\$160,00/ton, conforme informa o site da corretora de mercados <http://www.corretoramercado.com.br/website/index.asp>. A variação dos custos de aquisição é apresentada na tabela 7:

Tabela 7 - Variação dos custos de matéria-prima para produção da celulase.

Matéria-prima		Custo (R\$/ton)	
Farelo de trigo	80,00	95,00	110,00
Bagaço de cana-de-açúcar	6,00	9,00	12,00

Variaram-se os custos de matéria-prima, de modo a verificar se oscilações de custos no mercado agrícola causam impacto significativo nos custos do processo de produção das celulases.

Na composição do meio de cultura adotaram-se os seguintes valores: 20% de farelo de trigo, 80% de bagaço de cana-de-açúcar, umidade inicial de 12% e 8,45%, respectivamente para o farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar. De acordo com Chen *et al.* (1988), a média da densidade aparente do farelo de trigo é de 0,41g/cm³. Rasul, Rudolph e Carsky (1999) afirmaram que a densidade do bagaço de cana-de-açúcar é de 0,53g/cm³. A densidade média do substrato úmido é de 0,59 g/cm³, obtida no laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola Politécnica.

Avaliou-se os custos do processo, quando aumentada a capacidade volumétrica dos reatores de fermentação. As capacidades adotadas para análise dos custos do processo produtivo foram 10, 25 e 50 m³. Os volumes úteis dos reatores adotados no processo foram de 65%, pois o processo necessita de agitação intermitente e boa difusividade do ar, e volumes úteis acima de 65% dificultam a movimentação do meio e consequente aeração.

Para a etapa de produção das enzimas, a faixa de valores de concentração de enzimas (expressas em atividade enzimática por massa de meio) e o intervalo de tempo de cultivo, foram adotados com base em resultados apresentados por Souza e Kilikian (2009), e Camassola e Dillon (2009), os quais encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 – Produtividade em celulase obtida em cultivos em meio sólido.

	Souza e Kilikian (2009)	Camassola e Dillon (2009)
Produção de celulase (FPU/gms)	5,4	32,04
Tempo de cultivo (h)	48	72
Produtividade (FPU/gms.h)	0,11	0,45

4.3. Balanços de Massa

O objetivo desta seção é apresentar as equações que determinam as vazões mássicas das correntes apresentadas na figura 8.

4.3.1 Balanço de massa da etapa de cultivo na produção de celulasas

Foi realizado balanço de massa macroscópico, considerando-se a operação do processo em regime permanente, ou seja, as vazões e propriedades das matérias-primas e produto do processo não se alteram com o decorrer do tempo.

A determinação das massas de substrato e volume de água para que o substrato atinja 60% de umidade para a etapa do cultivo para produção das enzimas, depende da quantidade de atividade enzimática necessária à hidrólise, da massa de bagaço que será hidrolisada e da concentração em enzimas alcançada no meio de cultura.

A atividade enzimática de celulase para hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar é determinada através das equações 19, 20 e 21.

As equações 19 e 20, utilizadas para quantificar a massa de bagaço de cana-de-açúcar, foram baseadas na informação de que na produção de açúcar e etanol, o bagaço gerado no processo representa cerca de 28% da cana-de-açúcar gerada na safra de uma usina padrão (ROSSELL, 2008; NOGUEIRA, 2005; Atlas de Energia Elétrica do Brasil, 2ª ed.).

Eq. 19

$$Bagaço_{úmido} = 0,28 * Safra$$

Eq. 20

$$Bagaço_{seco total} = Bagaço_{úmido} * (1 - U)$$

onde:

- $Bagaço_{úmido}$ é a massa de bagaço (ton);
- $Safra$ é a massa de cana-de-açúcar colhida adotada em uma safra (ton);
- $Bagaço_{seco total}$ é a massa total de bagaço de cana-de-açúcar seco (ton);
- U é a umidade do bagaço de cana-de-açúcar (%).

A tabela 9 apresenta a produção de cana-de-açúcar e a massa de bagaço gerado (base úmida e base seca), em toneladas, considerando que o bagaço tenha 50% de umidade, em média.

Tabela 9 - Quantidade de cana-de-açúcar e bagaço gerados na safra de uma Usina Padrão.

<i>Unidade</i>	<i>Usina Padrão</i>
Safra Padrão	1.000.000
Umidade do Bagaço (%)	50%
Bagaço - base úmida (ton/safra)	280.000
Bagaço - base seca (ton/safra)	140.000

Com base na quantidade de bagaço de cana-de-açúcar, base seca, gerado pela usina Padrão é possível obter a quantidade de bagaço de cana-de-açúcar que será destinado para a hidrólise enzimática e posterior produção do bioetanol.

Determinada a quantidade de bagaço de cana-de-açúcar é possível determinar a quantidade de atividade enzimática de celulase necessária para hidrolisá-lo, através da equação 21. Para determinação da quantidade total de atividade enzimática, adotaram-se os valores de atividade enzimática FPU/gms (“filter paper unit”/grama de massa seca) apresentados na tabela 6. A equação 21 foi empregada no cálculo da quantidade de atividade enzimática total:

Eq. 21

$$Atividade_{total} = Bagaço_{seco} * a_{hidrólise}$$

onde:

- $Atividade_{total}$ é a atividade enzimática necessária para hidrolisar o total de bagaço de cana-de-açúcar;
- $Bagaço_{seco}$ é a quantidade de bagaço que sofrerá hidrólise (ton);
- $a_{hidrólise}$ é a atividade enzimática da enzima aplicada na reação de hidrólise (FPU/ton).

A produtividade em atividade enzimática em FPU/h, considerando 330 dias de operação por ano, é dada pela equação 22:

Eq. 22

$$At_{produtividade} = \frac{Atividade_{total}}{330 * 24}$$

Uma vez definida a produtividade em FPU/h, é possível calcular as vazões mássicas do substrato e vazões volumétricas da água necessárias para o meio de cultura atingir a umidade de 60% no processo.

A vazão mássica de substrato para gerar as celulases é obtida conforme a equação 23:

Eq. 23

$$Substrato = \frac{Atividade_{produtividade}}{produção_{enzima}}$$

onde:

- *Substrato* é a vazão mássica de substrato necessário para produção das celulasas para atingir o valor de atividade produtividade para hidrólise (ton/h);
- $produção_{enzima}$ é a concentração final de enzimas, medida em atividade enzimática, no substrato sólido (FPU/ton).

4.3.2 Balanço de massa da etapa de produção de inóculo

As etapas básicas do processo de produção do inóculo compreendem armazenamento de uma cultura estoque de microrganismo, inoculação de um substrato com esporos deste microrganismo, inoculação de um substrato puro com as células vegetativas do meio inoculado com os esporos e inoculação do substrato que será o meio de fermentação para produção de enzimas. O diagrama de blocos da figura 9 apresenta o processo de produção de inóculo.

Figura 9 - Diagrama de blocos do processo de produção de inóculo.

A etapa de obtenção de esporos ocorre em escala laboratorial e o tempo não foi contabilizado no processo, pois considera-se que o laboratório mantém um estoque de culturas gerando os esporos.

Os esporos do estoque são cultivados no laboratório em meio de farelo de trigo, durante um período de 24 horas, em laboratório, para produção do pré-inóculo, indicada pela corrente 1 no diagrama de blocos da figura 9.

Após esta etapa, as células são inoculadas no reator de produção de inóculo, o qual opera por 2 dias (48 horas), tempo suficiente para colonização do meio. A proporção utilizada nesta etapa, indicada pela corrente 2 na figura 9 é de 0,01 g de meio de pré-inóculo para cada g de substrato do reator de produção de inóculo.

A seguir, retira-se alíquota de 0,002g de meio do reator de produção de inóculo para cada g de substrato seco no reator de produção das enzimas. No diagrama de blocos da figura 9, esta etapa está indicada pela corrente 3.

Partindo das informações acima, sobre a produção de inóculo, calcula-se a vazão de meio para produção de inóculo conforme equação 24:

Eq. 24

$$Meio_{total} = substrato * CM_1$$

onde:

- $Meio_{total}$ é a vazão mássica do substrato Farelo de Trigo para o reator de produção de inóculo (ton/h);
- CM_1 é a proporção mássica entre inóculo e substrato no reator de produção de enzimas de 0,002 g de meio/gms.

Após definida a quantidade de meio para produção de inóculo, $Meio_{total}$, é calculada a quantidade de substrato onde os esporos serão germinados, ou seja, a massa de substrato (farelo de trigo) para o reator de pré-inóculo, conforme equação 25. Adota-se que uma alíquota de 1g de meio do laboratório/g de meio total é utilizado no reator de produção de inóculo (germinador).

Eq. 25

$$Meio_{laboratório} = Meio_{total} * CM_2$$

onde:

- $Meio_{laboratório}$ é a vazão mássica do inóculo que deverá ser adicionado no germinador (ton/h);
- CM_2 é a proporção mássica entre massa de pré-inóculo e substrato no reator de produção de inóculo de 0,01 g de meio/gms.

Uma vez definida a vazão mássica do farelo de trigo para os reatores de produção de inóculo ($Meio_{total}$) para o reator de inóculo, determina-se a quantidade de água a ser adicionada no reator para que o substrato atinja uma umidade de 60%, conforme equações 26 e 27:

Eq. 26

$$m_{H_2O}(I) = \left(Meio_{total} * \frac{100}{40} \right) - \left(\frac{Meio_{total} * 100}{100 - u_f} \right)$$

Eq. 27

$$V_{H_2O}(I) = \frac{m_{H_2O}(I)}{\rho_{H_2O}}$$

onde:

- $m_{H_2O}(I)$ é a vazão mássica de água utilizada para o substrato atingir 60% de umidade (ton/h), no reator de produção de inóculo;
- u_f é a umidade do farelo de trigo antes da adição de água (%);
- $V_{H_2O}(I)$ é a vazão volumétrica de água utilizada para o substrato atingir 60% de umidade (m³/h), no reator de produção de inóculo;
- ρ_{H_2O} é a densidade da água (ton/m³).

A vazão mássica total (farelo de trigo seco e água) no reator de inóculo é dada pela equação 28:

Eq. 28

$$substrato_{inóculo_{úmido}} = Meio_{total} + m_{H_2O}(I)$$

onde:

- $substrato_{inóculo_{úmido}}$ é a vazão mássica de meio do reator de inóculo, com células vegetativas (ton/h).

4.3.3. Balanço de massa da etapa do reator de produção de enzimas

A vazão de substrato (mistura de farelo de trigo e bagaço de cana de açúcar), que será carregado no reator de produção de enzimas, antes de ocorrer a inoculação, é a quantidade de substrato total necessária no processo de produção das celulasas, subtraída a vazão de farelo de trigo destinado à produção de inóculo ($Meio_{total}$). A equação 29 demonstra a vazão mássica de substrato que é direcionada para o reator de fermentação, antes da inoculação:

Eq. 29

$$SB = substrato - Meio_{total}$$

onde:

- SB é a vazão mássica de substrato no reator de produção de enzimas (ton/h).

A vazão mássica de cada matéria-prima no substrato que é direcionado ao reator de fermentação é definida pelas equações 30, 31:

Eq. 30

$$BCA_B = X_{BCA} * substrato$$

Eq. 31

$$FT_B = (X_{FT} * substrato) - Meio_{total}$$

onde:

- BCA_B é a vazão mássica de bagaço de cana-de-açúcar no reator de produção de enzimas (ton/h);
- FT_B é a vazão mássica farelo de trigo no substrato no reator de produção de enzimas (ton/h);

- X_{BCA} é a proporção de bagaço de cana-de-açúcar no substrato;
- X_{FT} é a proporção de farelo de trigo no substrato.

Depois de definida a quantidade de cada matéria-prima no substrato, determina-se a vazão mássica e volumétrica de água a ser adicionada no reator para que o substrato atinja uma umidade de 60%, conforme equações 32 e 33:

$$m_{H_2O}(B) = \left[\left(BCA_B * \frac{100}{40} \right) - \left(\frac{BCA_B}{1 - u_b} \right) \right] + \left[\left(FT_B * \frac{100}{40} \right) - \left(\frac{FT_B}{1 - u_f} \right) \right] \quad \text{Eq. 32}$$

$$V_{H_2O}(B) = \frac{m_{H_2O}(B)}{\rho_{H_2O}} \quad \text{Eq. 33}$$

onde:

- $m_{H_2O}(B)$ é a vazão mássica de água utilizada para o substrato atingir 60% de umidade (ton/h) no reator de produção de enzimas;
- u_b é a umidade do bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado, antes da adição de água (%);
- $V_{H_2O}(B)$ é a quantidade de água utilizada para o substrato atingir 60% de umidade (m³/h), no reator de produção de enzimas.

A vazão mássica total (substrato e água) nos reatores de produção de enzimas é dada pela equação 34:

$$SB_{úmido} = BCA_B + FT_B + m_{H_2O}(B) \quad \text{Eq. 34}$$

onde:

- $SB_{úmido}$ é a vazão mássica de substrato nos reatores de produção de enzimas com umidade de 60% (ton/h).

Em seguida, é adicionada a massa proveniente do reator de inóculo no reator de produção de enzimas. Logo, a vazão mássica global no reator de produção de enzimas, que será a massa que terá as celulasas aderidas ao substrato, é dada pela equação 35:

Eq. 35

$$M_{final} = SB_{úmido} + substrato_{inóculo\ úmido}$$

onde:

- M_{final} é a vazão mássica de substrato global no reator de produção de enzimas no início da fermentação (ton/h).

4.3.4. Produto final – Celulase

O sistema de enzimas denominado celulasas está aderido ao substrato. A relação entre quantidade de substrato e enzimas é dado pela equação 36:

Eq. 36

$$M_{celulase} = \frac{x_{FPU}}{produção_{enzima} * (1 - U)}$$

onde:

- $M_{celulase}$ é a vazão mássica de meio de cultura com enzimas (ton/h);
- x_{FPU} é a quantidade de enzimas requeridas (FPU/h).

4.3.5. Correntes do processo

Com as informações apresentadas nas seções anteriores gerou-se a tabela 10, que apresenta as equações para determinação das vazões mássicas indicadas pelos correntes da figura 6, do processo de produção das celulasas:

Tabela 10 - Indicação das correntes de entrada e saída de cada etapa do processo, para a produção de celulases.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Bagaço de cana-de-açúcar	----	Eq. 30	----	----	Eq. 30	----	Eq. 30	----	----	----	Eq. 30
Farelo de Trigo	Eq. 24 + Eq. 31	----	Eq. 24	Eq. 31	Eq. 31	Eq. 24	Eq. 24 + Eq. 31	----	----	----	Eq. 24 + Eq. 31
Celulase	----	----	----	----	----	----	Eq. 36	----	----	----	Eq. 36
Água	----	----	----	----	----	Eq. 26	Eq. 26 + Eq. 32	----	Eq. 26	Eq. 32	Eq. 26 + Eq. 32

4.5. Especificações dos Equipamentos do Processo

4.5.1. Tanques de armazenamento de matéria-prima e produto final

Considerou-se a utilização de bagaço de cana-de-açúcar “in natura”, isto é, vindo da usina padrão continuamente para uso no processo de produção das enzimas.

O farelo de trigo, por ser mais suscetível a contaminações, é armazenado em um tanque de aço carbono e será submetido a processo de esterilização nos reatores de produção de inóculo e enzimas. Considerou-se que não haverá distribuição do farelo de trigo nos finais de semana, sendo necessário um estoque de farelo de trigo para 2 dias de operação da planta.

A planta disporá de apenas um tanque para armazenamento do farelo de trigo, cuja capacidade volumétrica necessária para garantir alimentação ininterrupta ao processo é dada pela equação 37:

$$Q_{FT_{aparente}} = \frac{X_{FT} * substrato}{\rho_{FT_{aparente}}} \quad \text{Eq. 37}$$

onde:

- $Q_{FT_{aparente}}$ é a vazão do farelo de trigo úmido, destinada ao tanque de armazenamento (m³/h);

- $\rho_{FT_{aparente}}$ é a densidade aparente do farelo de trigo (0,41 g/cm³);

A capacidade do tanque é dada equação 38:

$$V_{TQ_{FT}} = Q_{FT_{aparente}} * tempo_{s / recebimento(h)} \quad \text{Eq. 38}$$

onde:

- $V_{TQ_{FT}}$ é a capacidade volumétrica do tanque de armazenamento do farelo de trigo (m³).

Considerou-se um tanque de armazenamento do meio de cultura contendo celulase, com capacidade para 2 dias de operação da planta de produção. Através das equações 39 e 40 determinam-se a vazão volumétrica do meio de cultura contendo celulase e o volume do tanque preenchido até 90% da capacidade, respectivamente.

$$Q_{celulase} = \frac{M_{celulase}}{\rho_{substrato_{aparente}}} \quad \text{Eq. 39}$$

$$V_{TQ_{FT}} = \frac{Q_{FT_{aparente}} * tempo_{s / recebimento(h)}}{C_{TQ_{FT}}} \quad \text{Eq. 40}$$

onde:

- $Q_{celulase}$ é vazão volumétrica do substrato com a celulase aderida a sua matriz (m³/h);
- $\rho_{substrato_{aparente}}$ é a densidade aparente do substrato (0,59 ton/m³);
- $C_{TQ_{FT}}$ é capacidade útil de operação do tanque (0,9).

4.5.2. Misturador

O misturador tem a função de homogeneizar as duas matérias-primas, que são o bagaço de cana-de-açúcar e o farelo de trigo, em regime contínuo. Segundo Peters,

Timmerhaus e West (2003), devem-se utilizar misturadores Muller para homogeneizar uniformemente sólidos granulares úmidos. O material do misturador será aço carbono.

Definida a vazão de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo que serão misturados, determina-se pela figura 10 o custo do misturador.

Para as vazões calculadas para os diferentes cenários propostos, o tipo de misturador adotado foi o “Pug mill extruder”.

Figura 10 - Diagrama de custo de compra por vazão de sólidos (kg/s) e tipo de misturador (PETERS; TIMMERHAUS; WEST, 2003).

4.5.3. Reator de inóculo

Os reatores de produção de inóculo têm a função de propiciar o crescimento do microrganismo para posterior inoculação do substrato nos reatores de produção das

enzimas. Os reatores têm a capacidade de 1m³, conforme premissa adotada na seção 4.2. O material considerado é o aço inox, pois este material apresenta uma superfície mais lisa e resistente do que o aço carbono, melhorando o processo de esterilização do ambiente, tornando-o menos suscetível ao crescimento de microrganismos contaminantes. Os reatores possuem: sistema de “camisa” para troca térmica, de modo a garantir a temperatura ótima do processo; agitadores operando intermitentemente, com a função de homogeneizar o meio.

Através das equações 41, 42 e 43, determina-se o número de reatores de produção de inóculo necessários no processo para que a produção de celulase ocorra continuamente.

Eq. 41

$$Q_{substrato_{inóculo}} = \frac{substrato_{inóculo_{úmido}}}{\rho_{FT_{aparente}}}$$

Eq. 42

$$V_{TQ_{inóculo}} = V_{det er min ado} * Capacidade_{útil}$$

Eq. 43

$$N^o_{TQ_{inóculo}} = \frac{Q_{substrato_{inóculo}} * t_{crescimento}}{V_{TQ_{inóculo}}}$$

onde:

- $Q_{substrato_{inóculo}}$ é a vazão volumétrica do substrato para o tanque de inóculo (m³/h);
- $substrato_{inóculo_{úmido}}$ é a vazão mássica de farelo de trigo que é direcionada para o reator de produção de inóculo (ton/h);
- $Capacidade_{útil}$ é a capacidade máxima de ocupação do reator (0,65);
- $t_{crescimento}$ é o tempo de crescimento do microrganismo (48 h);
- $N^o_{TQ_{inóculo}}$ é o número de reatores de produção de inóculo necessários no processo.

Considerou-se um reator em “stand-by” quando da necessidade de manutenção em um reator em processo.

4.5.4. Reator de produção de enzimas

Os reatores para produção das celulasas têm a capacidade de 5m³, conforme premissa adotada na seção 4.2. O material considerado é o aço inox, pois este material apresenta uma superfície mais lisa e resistente do que o aço carbono, melhorando o processo de esterilização do ambiente, tornando-o menos suscetível ao crescimento de microrganismos contaminantes. Os reatores possuem um sistema de “camisa” para troca térmica, de modo a garantir a temperatura ótima do processo; e possuem agitadores operando intermitentemente, com a função de homogeneizar o meio.

Através das equações 44, 45 e 46, determina-se o número de reatores necessários para que a produção de celulase ocorra continuamente.

Eq. 44

$$Q_{substrato_{biorreator}} = \frac{M_{final}}{\rho_{aparente_{substrato}}}$$

Eq. 45

$$V_{TQ_{biorreator}} = V_{det er min ado} * Capacidade_{útil}$$

Eq. 46

$$N^{\circ}_{TQ_{biorreator}} = \frac{Q_{substrato_{biorreator}} * t_{fermentação}}{V_{TQ_{biorreator}}}$$

onde:

- $Q_{substrato_{biorreator}}$ é a vazão volumétrica do substrato para o reator de produção de enzimas (m³/h);
- $V_{TQ_{biorreator}}$ é o volume útil do tanque de produção de inóculo (m³);
- $Capacidade_{útil}$ é a capacidade máxima de ocupação do reator (0,65);
- $t_{fermentação}$ é o tempo de fermentação do meio e liberação das celulasas pelo microrganismo (h);

- $N_{TQ_{\text{biorreator}}}$ é o número de reatores de produção de enzimas necessários no processo.

Considerou-se um reator em “stand-by” quando da necessidade de manutenção em no reator em processo.

4.5.5. Compressores

Os compressores são utilizados para fazer a aeração dos reatores de produção de inóculo e enzimas. O tipo de compressor foi definido conforme a vazão de ar necessária para garantir a aeração ótima do processo de fermentação. Definiu-se como compressor no projeto o “air compressor”, pois este compressor gera vazões de ar de 1000 ft³/s, permitindo a aquisição de um menor número de compressores. A vazão de ar necessária no processo é dada pela equação 47. Após definida a vazão de ar total no processo, obtém-se o número de compressores de 1000 ft³/h necessários para atender a demanda, através da equação 48.

$$Q_{ar} = T_{\text{alimentação}} * \left(\text{substrato}_{\text{inóculo}_{\text{úmido}}} * t_{\text{crescimento}_{\text{célula}_{\text{vegetativa}}}} + M_{\text{final}} * t_{\text{fermentação}} \right) * (1 - U) \quad \text{Eq. 47}$$

$$N_{\text{compressores}} = \frac{Q_{ar}}{Q_{\text{compressor}}} \quad \text{Eq. 48}$$

onde:

- Q_{ar} é a vazão de ar necessária no processo (m³/s);
- $Q_{\text{compressor}}$ é a vazão do compressor (m³/s);
- $t_{\text{crescimento}_{\text{célula}_{\text{vegetativa}}}}$ é o tempo de crescimento das células vegetativas (48h);
- $T_{\text{alimentação}}$ é a taxa de alimentação de ar (m³/s.ton base seca).

4.6. Obtenção dos Dados Econômicos

A metodologia utilizada para estimativa do custo de capital de investimento e análise de viabilidade econômica foi apresentada por Peters, Timmerhaus e West (2003). As equações de engenharia econômica, apresentadas na seção 3.6, assim como as equações de balanço de massa do processo e especificação dos equipamentos, foram inseridas no “software” Microsoft Excel 2003, criando-se planilhas de cálculo de balanço de massa, custos operacionais, custos fixos e dados de análise de viabilidade econômica.

4.6.1. Custos dos equipamentos

Os custos dos tanques de armazenamento de matéria-prima e produto foram obtidos através das equações 11, 12 e 13 apresentadas na seção 3.6. Os valores de das constantes K_1 , K_2 , K_3 e foram obtidos na tabela A.1 (Anexo A), de acordo com a capacidade volumétrica de cada tanque. Da mesma maneira ocorreu com a constante F_{BM} , utilizando-se a tabela A.2 (Anexo A).

O custo dos reatores de produção de inóculo foi obtido a partir da figura 11. A partir da informação de capacidade volumétrica do reator (1m^3) e o material especificado (aço inox), estima-se o valor do custo unitário. Multiplicando-se o número de reatores necessários no processo pelo valor encontrado no gráfico, obtém-se o custo total.

Figura 11 - Custo de aquisição de reatores encamisados e agitados (PETERS; TIMMERHAUS; WEST, 2003).

Utilizando-se a equação 11 é possível obter o preço de aquisição de cada reator para produção de inóculo (1m³) e enzimas (5m³), de capacidades volumétricas 1m³ e 5m³, os quais têm os preços de aproximadamente US\$ 25.800,00 e US\$64.500,00, respectivamente.

Para obtenção do preço dos reatores de capacidade volumétrica maior que 10m³, utilizou-se um fator de escala, apresentado por Peters, Timmerhaus e West (2002) e por Turton *et al.* (2007), conforme apresentado na equação 14. O fator m para reatores encamisados e agitados é 0,56.

O custo de aquisição do misturador foi obtido a partir da figura 10 apresentada na seção 4.5.2.

O custo de aquisição dos compressores foi obtido através da figura 12, a partir da vazão total determinada no processo.

Figura 12 - Custo de Aquisição de compressores de um estágio e compressores de ar (PETERS; TIMMERHAUS; WEST, 2003).

Nas estimativas de custo obtidas através das equações sugeridas por Turton *et al.* (2007), os valor de CEPCI médio utilizado, para o ano de 2009 foi de 592, obtido através do site <http://www.che.com/>.

4.6.2. Custos de investimento e mão-de-obra

Obteve-se o custo de investimento no projeto com base nos dados da tabela 4, apresentada na seção 3.6.2.

A mão de obra necessária para operação da planta é obtida a partir do número de equipamentos utilizados no processo. O cálculo do número de operadores necessários na operação da planta é apresentado na equação 49:

$$N_{\text{Operadores}_{\text{turno}}} = f_{\text{equipamento}} * N_{\text{equipamento}}$$

Eq. 49

onde:

- $f_{equipamento}$ é um fator referente a cada equipamento e tanque do processo.

A tabela 11 apresenta os fatores referentes aos equipamentos utilizados no processo de produção de celulase.

Tabela 11 - Fatores de cálculo do número de operadores para cada equipamento.

<i>Equipamento</i>	<i>Fator</i>
Compressor	0,15
Reator	1,00
Biorreator	0,50

(PETERS; TIMMERHAUS; WEST, 2003).

O cálculo do número total de operadores é dado pela equação 50:

Eq. 50

$$N_{total\,operadores} = \frac{H_{total}}{H_{operador}}$$

onde:

- H_{total} é o número de horas total trabalhados no ano por turno (h/ano). Essa variável pode ser calculada multiplicando-se o número de dias de trabalho no ano pelo número de horas de um dia e pelo número de operadores por turno;
- $H_{operador}$ é o número de horas que um operador trabalha em um ano (h/operador.ano). Essa variável pode ser calculada através da multiplicação entre número de semanas existentes no período de trabalho e o número máximo de horas que um operador pode trabalhar por semana (40 horas).

Depois de determinado o número de operadores necessários para operação da unidade produtiva, calcula-se o custo de mão-de-obra operacional anual. Adotou-se que

o salário dos operadores é R\$ 900,00 e os mesmos seguem o regime CLT (Consolidação das Leis Trabalhistas). O cálculo do custo da mão-de-obra operacional anual é dado pela equação 51:

$$C_{MO} = N_{total\,operadores} * 900 * 13$$

Eq. 51

onde:

- C_{MO} é o custo operacional total (R\$/ano).

Utilizou-se a tabela 5, da seção 3.6.3, para estimativa do custo operacional total. Neste projeto não foi considerada a porcentagem referente aos serviços de vendas, distribuição e marketing, pois assumimos que a planta produtiva atende à usina padrão, produtora de etanol, “in loco”.

Neste projeto, considerou-se que os trabalhadores serão contratos para o ano todo e trabalharão em 3 turnos.

O custo da tonelada do farelo de trigo é de R\$ 160,00 <<http://www.corretoramercado.com.br/website/index.asp>>. O valor da tonelada do bagaço de cana-de-açúcar é de R\$ 15,00 (NOGUEIRA, 2005). O custo da água foi obtido, através da usina Santa Inês, que informou que o custo é de R\$0,75/m³.

Todos os custos obtidos foram em dólares (US\$). Para os dados em reais utilizou-se a taxa de câmbio de 1,6530, da fonte <<http://economia.uol.com.br/>>, de 7 de outubro de 2010.

4.6.3. Custo de Produção, Fluxo de Caixa, TIR e “Pay-back”

A obtenção do custo de produção da celulase e da viabilidade econômica de implantação do processo ocorreu a partir de dados de entrada a seguir definidos:

- Dosagem de enzimas necessárias para hidrólise (FPU/ton);
- Porcentagem de bagaço de cana-de-açúcar utilizado no processo obtido da quantidade gerada pela usina padrão (%);

- Produção de celulase, medida em atividade enzimática – concentração final de enzimas no substrato sólido (FPU/ton);
- Tempo de Operação da planta (dias);
- Porcentagem de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo no substrato;
- Custo da matéria-prima (US\$/ton).

A partir dos dados de entrada a planilha gerou os seguintes dados de saída:

- Número de equipamentos necessários no processo;
- Tabela resumo dos custos variáveis e tabela de custos fixos de implementação do processo;
- Custo do de produção da celulase (US\$/100.000FPU);
- Investimento (US\$);
- “Pay back” (anos).

Para obtenção dos dados de saída, foram utilizadas as equações apresentadas na seção 3.6. A taxa mínima de atratividade utilizada no ramo químico utilizada foi de 13%, obtida com a equipe de controladoria do Grupo Votorantim Química.

Com essa ferramenta foi possível analisar variáveis impactantes no custo de produção da celulase. A figura 13 ilustra a planilha onde são inseridos os dados de entrada e obtidos os principais dados de saída:

<u>Bagaço Residual Gerado na Safra de Cana-de-Açúcar de uma Usina Padrão</u>		
Unidades	Usina Padrão	TOTAL
Usina de Referência	1.000.000,00	1.000.000,00
Umidade do Bagaço (%) - [U]	50,00%	50,00%
Bagaço - base úmida (ton/safra) - [Bagaço _{úmido}]	280.000,00	280.000,00
Bagaço - base seca (ton/safra) - [Bagaço _{seco} total]	140.000,00	140.000,00
<u>Bagaço Hidrolisado</u>		
Unidades	Usina Padrão	TOTAL
Porcentagem do bagaço hidrolisado (%)	5,00%	5,00%
Massa de bagaço a ser hidrolisado (ton/ano) - [Bagaço _{seco}]	7.000,00	7.000,00
<u>Dados de Entrada</u>		
Dosagem de enzimas necessárias p/ hidrólise (FPU/ton) - [$\alpha_{hidrólise}$]	10.000.000,00	
Produção de Enzimas - Concentração final de enzimas no substrato sólido (FPU/ton) - [produção _{enzima}]	32.040.000,00	
Tempo de Operação da Planta (dias)	330	
Tempo para produção do inóculo (horas)	48	
Porcentagem de bagaço de cana-de-açúcar tratado, na mistura (%)	80,00%	
Porcentagem de farelo de trigo na mistura (%)	20,00%	
<u>Dados de Saída</u>		
Custo de Produção (US\$/100.000FPU)	6,01	
Investimento (US\$)	14.201.889,43	
"Pay-back" (anos)	1,32	
Número de Biorreatores	28	
Número de Tanques de Inóculo	2	
Número de Compressores	4	
Dados de entrada: células com fundo cinza, escritas em azul.		

Figura 13 - Ilustração da planilha utilizada para obtenção de dados de processo, projeto e dados de viabilidade econômica.

No anexo B são apresentadas as planilhas utilizadas para os cálculos de Custo de Produção da celulase: Balanços de Massa do Processo, Dimensionamento de Equipamentos, Estimativa de Custos de Investimento e Operacional e Análise Econômica. As fórmulas inseridas no programa foram baseadas nas informações apresentadas na seção 3.6 e 4 deste trabalho.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes cenários foram propostos visando avaliar quais as variáveis impactantes no processo de produção da celulase via FES.

Nas seções 5.3 a 5.5 avaliou-se a viabilidade econômica do investimento, baseado na informação de que o custo de produção da celulase, que corresponde a 20% do custo do etanol, é US\$0,38/100.000FPU. Segundo Vintila *et al.* (2008), o custo de produção de celulase foi obtido através de avaliações pela NREL (National Renewable Energy Laboratory – E.U.A), para a celulase produzida “in situ”, ou seja, em uma planta de produção de etanol 2G. Vintila *et al.* (2009), afirmam que o preço de US\$16,00/100.000FPU são proibitivos para comercialização das celulases comerciais ou para utilização na produção de etanol 2G, pois aumentariam o custo de produção do etanol.

Na primeira etapa da análise determinou-se o custo de produção, apresentado nas seções 5.1 a 5.6, o qual foi baseado no processo estabelecido nas seções 4.1 e 4.2. Partindo do custo determinado, US\$/100.000FPU, buscou-se identificar quais são as variáveis que mais impactam no custo de produção e de que maneira podemos amenizar este impacto.

O objetivo não é comparar os processos de FES e FSm para obtenção de celulases, mas indicar possíveis adequações do processo de FES que viabilizem a produção de etanol 2G por hidrólise enzimática.

Os resultados para diferentes cenários são apresentados na forma de tabelas com dados de entrada e dados de saída retornados pelas planilhas de cálculo.

5.1. Cenário 1 – Variações na concentração de celulases no meio fermentado

Neste primeiro cenário busca-se avaliar qual é o impacto causado no custo de produção da celulase, no investimento na planta produtiva e no custo operacional, quando variada a concentração da celulase (medida em atividade enzimática) no meio de cultura.

Fixaram-se as seguintes variáveis: porcentagem do bagaço de cana-de-açúcar a ser hidrolisado, atividade enzimática para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, proporção de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar do substrato e as capacidades volumétricas dos reatores de produção de inóculo e reatores de produção de enzimas. A seguir é apresentado um resumo dos valores fixados para cada variável referente ao processo, com base nas informações apresentadas na seção 4.1.

- 5% do bagaço de cana-de-açúcar, gerado pela usina padrão, será hidrolisado para produção de etanol 2G;
- A atividade enzimática de celulasas para hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar é de 10FPU/gms, de acordo com Mais *et al.* (2002);
- Proporção de 20% e 80% de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar no substrato;
- Tempo de fermentação de 72 horas;
- Volume de 1m³ e 5m³, conforme explicado na seção 4.1, para os reatores de produção de inóculo e enzimas respectivamente, com operação do nível do reator em 65% de sua capacidade.

Estipularam-se diferentes concentrações de celulasas no meio de cultura, para avaliar o impacto causado nos custos do processo. A figura 14 mostra o gráfico com a relação entre o custo final de produção das celulasas (US\$/100.000FPU) e a produção da celulase medida em atividade enzimática e a figura 15 mostra o mesmo gráfico, com o custo de produção em US\$/kg de proteína. O fator de conversão a FPU / mg de proteína foi baseado numa atividade específica de 0,50 FPU/mg com base nos dados apresentados por Decker *et al.* (2003) e Castellanos, Sinitsyn e Vlasenko (1995).

Figura 14 - Curva de variação do custo final de produção das celulases X variação da produção de celulase, medida em atividade enzimática.

Figura 15 - Curva de variação do custo final de produção das celulases X variação da produção de celulase, medida em atividade enzimática.

Figura 16 - Curva de variação do custo final de produção das celulases X variação da produtividade da celulases.

De acordo com as figuras 14 e 15, nota-se que a curva formada é uma assíntota, ou seja, por mais que seja aumentado o valor da concentração de enzimas no meio de cultivo, o custo final de produção não sofrerá uma redução significativa a partir de 45FPU/gms. Caso no eixo das abscissas sejam inseridos valores de produtividade enzimática, o gráfico terá o mesmo comportamento, conforme figura 16. O valor do custo final de produção de celulase sofre uma redução menor do que 4%, a partir de 45FPU/gms, o que não representa alterações significativas no custo de produção.

Essa informação também foi observada por Himmel *et al.* (1999) e Pradella *et al.* (2009). Com os dados utilizados no projeto, mesmo aumentando a concentração de celulases no meio de cultura, o custo de produção de US\$0,38/100.000 FPU, que representa 20% do custo do etanol 2G, não será atingido.

5.2. Cenário 2 – Variação na produtividade da celulase

Neste cenário, busca-se analisar o impacto da produtividade da celulase sobre os custos do processo. Analisaram-se os custos de produção das celulases, custos de investimento e custo operacional para as produtividades obtidas por Camassola e Dillon

(2009) e Souza e Kilikian (2009), tomando por base dois valores de produtividade de celulasas.

Camassola e Dilon obtiveram uma produção de celulase, medida em atividade enzimática, de 32,04 FPU/gms, em um período de 72 horas, enquanto Souza e Kilikian obtiveram uma produção de celulase de 5,4 FPU/gms, em um período de 48 horas. As produtividades nos dois processos foram de 0,45 FPU/gms.h e 0,11 FPU/gms.h, respectivamente.

Mantendo as premissas apresentadas no cenário 1, obtiveram-se os dados apresentados na tabela 12:

Tabela 12 - Estimativa de custo de produção de celulase, custo de aquisição dos equipamentos, custo de capital de investimento e custo operacional.

Produção de celulase e tempo de fermentação	5,4 FPU/gms / 48h (SOUZA, KILIKIAN, 2009)	32,04 FPU/gms / 72h (CAMASSOLA, DILON, 2009)
Custo de produção (US\$/100.000FPU)	21,54	6,01
Custo de produção (US\$/kg de proteína)	107,70	30,05
Custo total de aquisição dos equipamentos (MMUS\$)	9,94	2,82
Custo Total de Investimento (MMUS\$)	50,01	14,20
Custo Operacional Total (MMUS\$)	13,57	3,78

Verifica-se que a produtividade das celulasas é um fator que altera os custos do processo. Os dados da tabela 12 indicam que um aumento na produtividade das celulasas de 300% causa uma redução de 72,1% no custo de produção e redução média de 72% nos custos de investimento e operacional da planta produtiva.

Baseando-se nos dados obtidos, verificou-se qual das duas variáveis que compõem a produtividade causam o maior impacto nos custos do processo de produção das celulasas. Para tanto, adotou-se que a produtividade inicial foi a obtida

por Camassola e Dillon (2009), de 0,45 FPU/gms.h. Partindo desse valor e da concentração de celulase no meio de cultivo, obtida por Souza e Kilikian (2009), foi possível calcular qual o tempo de fermentação necessário para atingir a produtividade de 0,45 FPU/gms.h. Mantendo uma produção de 5,4 FPU/gms, em um período de fermentação de 12h, têm-se uma produtividade de 0,45 FPU/gms.h. Em seguida, manteve-se constante o tempo de fermentação de 48 horas e obteve-se uma concentração de celulases no meio de cultivo de 21,6 FPU/gms, para que a produtividade da celulase fosse de 0,45 FPU/gms.h.

Inserindo esses valores na planilha de cálculo, obtiveram-se os dados apresentados na tabela 13:

Tabela 13 - Estimativa de custo de produção de celulase, custo de aquisição dos equipamentos, custo de capital de investimento e custo operacional, para uma produtividade de 0,45 FPU/gms.h.

Produtividade da celulase – 0,45 FPU/gms.h	5,4 FPU/gms / 12h	21,6 FPU/gms / 48h
Custo de produção (US\$/100.000FPU)	6,81	6,04
Custo de produção (US\$/kg de proteína)	25,9	22,55
Custo total de aquisição dos equipamentos (MMUS\$)	2,96	2,82
Custo Total de Investimento (MMUS\$)	14,89	14,17
Custo Operacional Total (MMUS\$)	4,29	3,81

Verifica-se que mantendo uma dada produtividade, porém com concentração e tempo de cultivo diferentes, o custo do processo de produção das celulases via FES, não serão os mesmos. Nota-se através dos dados da tabela 13 que para uma dada produtividade, quanto maior o valor de concentração de enzimas no meio de cultivo em relação ao tempo de fermentação, menores serão os custos de produção das celulases, de investimento na planta produtiva e operacional. Essa afirmação é confirmada

quando comparados os custos da tabela 13 com os custos estimados com os dados de produtividade obtidos por Camassola e Dillon (2009), indicando que o aumento da concentração de celulasas no meio de cultivo em relação ao tempo de fermentação, reduz os custos do processo.

As diferenças identificadas nos custos, dada uma mesma produtividade, são pequenas frente a algumas vantagens do processo que devem ser analisadas, tais como: para um menor tempo de fermentação tem-se menor probabilidade de contaminações do meio; para maiores concentrações de celulasas no meio de cultivo tem-se maior facilidade na concentração das celulasas.

5.3. Cenário 3 – Variação no custo do substrato

Neste cenário fixaram-se as variáveis abaixo, alterando apenas os custos das matérias-primas que compõem o substrato, conforme tabela 14:

- 5% do bagaço de cana-de-açúcar, gerado pela usina padrão, será hidrolisado para produção de bioetanol;
- A atividade enzimática de celulasas para hidrolisar o bagaço de cana-de-açúcar é de 10FPU/gms;
- Proporção de 20% e 80% de farelo de trigo e bagaço de cana-de-açúcar no substrato;
- Tempo de fermentação de 72 horas;
- Produção de celulasas de 32,04 FPU/gms;
- Volume de 1m³ e 5m³.

Efetuaram-se variações no custo do substrato, conforme apresentado na tabela 14, tomando por referência os custos de mercado (US\$9,00 e US\$95,00 por tonelada de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, respectivamente) e considerando um custo de tratamento do bagaço de cana-de-açúcar.

Tabela 14 - Impacto da variação do custo de matéria-prima sobre o custo de produção de celulase e custo operacional total.

Custo substrato		Variáveis de saída	
Custo do bagaço de cana-de-açúcar de trigo (US\$/ton)	Custo do farelo de trigo (US\$/ton)	Custo de produção (US\$/100.000FPU)	Custo Operacional Total (MMUS\$)
9,00	95,00	6,01	3,78
9,00	110,00	6,02	3,79
9,00	80,00	5,99	3,78
6,00	95,00	6,00	3,78
12,00	95,00	6,02	3,79
6,00	80,00	5,98	3,77
12,00	110,00	6,03	3,80

Nota-se, através dos custos apresentados na tabela 14, que a alteração do custo de matéria-prima, não altera o custo operacional total e, conseqüentemente, o custo de produção da celulase.

Verifica-se que, para uma redução ou aumento de, aproximadamente, 15% no custo do farelo de trigo, gera uma variação de aproximadamente 0,25% no custo de produção da celulase. No caso de alteração do valor do bagaço de cana-de-açúcar, uma redução ou aumento de, aproximadamente, 33% no custo do mesmo, gera uma variação de, aproximadamente, 0,17% no custo de produção.

Quando foram alterados os custos das duas matérias-primas, observou-se que para uma variação de 15% no custo do farelo de trigo e 33% no custo do bagaço de cana-de-açúcar gerou uma variação de 0,42%, caracterizando baixo impacto no custo de produção da celulase.

Mesmo reduzindo o custo das matérias-primas do processo, o investimento em uma planta de produção de celulases via FES só é viável se a celulase for vendida a US\$20,00/100.000FPU, aproximadamente. No entanto, de acordo com Vintila *et al.* (2009), o preço de venda superior a US\$16,00/100.000FPU, para celulase comercial, é proibitivo, pois, não compete com o preço atual de mercado. O fluxo de caixa do projeto com redução do custo das matérias-primas é apresentado na figura 17.

Figura 17 - Fluxo de caixa para investimento em planta de produção de celulase via FES, com produção de inóculo na forma de células vegetativas e custo de matérias-primas abaixo do valor atual.

O “pay-back” é de 9 anos e a TIR 13,5%, indicando um longo período até o retorno total do investimento.

A variação do custo de produção da celulase, quando variado o custo do bagaço de cana-de-açúcar, é ligeiramente maior, pois é a matéria-prima em maior proporção na mistura do substrato (80%).

Conclui-se que, o custo da matéria-prima, para as condições de processo apresentadas, tem baixo impacto no custo de produção da celulase, indicando que outras variáveis causam o impacto nos custos de um projeto de uma planta de produção de celulase via FES.

5.4. Cenário 4 – Alteração na proporção de bagaço a ser hidrolisado e na atividade enzimática necessária para hidrólise

Este cenário consiste em avaliar o impacto causado pelo aumento na quantidade de bagaço a ser hidrolisado e quantidade de atividade enzimática necessária para hidrólise, sobre os custos de investimento, operacional e de produção.

Nesta análise, fixaram-se a proporção de 20% de farelo de trigo e 80% de bagaço de cana-de-açúcar no substrato, a concentração de celulases no meio de cultivo de 32,04FPU/gms, tempo de fermentação de 72 horas e volume dos reatores de inóculo e reatores de produção de enzimas em 1 m³ e 5 m³, respectivamente.

As análises foram baseadas na variação da massa de bagaço de cana-de-açúcar a ser hidrolisado, de 5 em 5% em relação a massa total de bagaço gerado numa safra, até atingir a porcentagem de 30%. Foi fixado o valor de atividade enzimática para hidrólise de 10 FPU/gms. Em seguida, fixou-se o valor de bagaço destinado para hidrólise em 10% e variou-se a atividade enzimática destinada para hidrólise em 7, 20 e 30 FPU/g de substrato, para avaliação da variação dos custos de produção da enzima.

As tabelas 15 e 16 apresentam os custos de investimentos, operacional, de aquisição dos equipamentos e produção de celulase para as diferentes proporções de bagaço de cana-de-açúcar a ser hidrolisado e para as diferentes atividades enzimáticas necessárias para que ocorra a hidrólise do bagaço.

Tabela 15 - Custos de produção de celulase, aquisição de equipamentos, capital de investimento e operacional, para proporções de bagaço de cana-de-açúcar a ser hidrolisado.

Produção Enzimática	Porcentagem	Custo de produção (US\$/100.000FPU)	Custo total de aquisição dos equipamentos (MMUS\$)	Custo Total de Investimento (MMUS\$)	Custo Operacional Total (MMUS\$)
	de bagaço de cana-de-açúcar a ser hidrolisado.				
32,04FPU/gms	10%	5,58	5,22	26,23	7,03
	15%	5,43	7,60	38,24	10,27
	20%	5,36	9,99	50,24	13,50
	25%	5,31	12,37	62,23	16,74
	30%	5,28	14,75	74,21	19,97

Tabela 16 - Custos de produção de celulase, aquisição de equipamentos, capital de investimento e operacional, para diferentes valores de atividade enzimática de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

Produção Enzimática	Atividade enzimática necessária para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar	Custo de produção (US\$/100.000FPU)	Custo total de aquisição dos equipamentos (MMUS\$)	Custo Total de Investimento (MMUS\$)	Custo Operacional Total (MMUS\$)
32,04FPU/gms	7	5,76	3,78	19,02	3,78
	10	5,58	5,22	26,23	7,03
	20	5,36	9,99	50,24	13,50
	30	5,28	14,75	74,21	19,97

Observa-se nos dados das tabelas 15 e 16 que, tanto o aumento na quantidade de bagaço de cana-de-açúcar a ser destinado para hidrólise quanto o aumento da dosagem de atividade enzimática necessária para hidrólise do substrato causam uma redução no custo de produção e um aumento no custo de investimento e custo operacional.

Isso ocorre, pois quando se aumenta a quantidade de bagaço para hidrólise ou a quantidade de atividade enzimática necessária para hidrólise, aumenta-se a demanda pela celulase. Com o aumento da demanda por celulase é necessário que a capacidade produtiva da planta aumente, o que causa conseqüente aumento no investimento e no custo operacional.

O aumento na estrutura física da unidade produtiva automaticamente torna o projeto inviável, pois, para a destinação de 30% do bagaço de cana-de-açúcar gerado pela usina padrão e uma atividade enzimática para hidrólise do bagaço de 30 FPU/g de substrato, necessita-se de 336 biorreatores e 63 compressores, o que demanda uma área grande para a construção da planta. Além disso, a redução do custo de produção de celulase é pequena frente ao aumento nos custos de investimento e operacional.

É possível afirmar que para uma quantidade de bagaço a ser hidrolisado acima de 10% não há variações significativas no custo de produção das celulases, pois, o custo tem reduções menores que 4%, enquanto os custos de investimento e operacional aumentam aproximadamente 45%. O aumento na dosagem de atividade

enzimática para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar causa reduções de 4% no custo de produção das celulases, enquanto os custos de investimento e operacional aumentam em até 90%, aproximadamente.

As figuras 18 e 19 representam o comportamento do custo de produção de celulase conforme aumentada a quantidade de bagaço de cana-de-açúcar a ser hidrolisado e atividade enzimática necessária para hidrólise, respectivamente. Verifica-se que o aumento da demanda por celulase reduz o custo de produção de maneira assintótica.

Figura 18 - Variação do custo final de produção das celulases conforme alterada a quantidade de bagaço de cana-de-açúcar a ser hidrolisado.

Figura 19 - Variação do custo final de produção das celulases conforme alterada a atividade enzimática para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

Neste cenário, a combinação ideal está com a destinação de 10% do bagaço gerado destinado para hidrólise e uma atividade enzimática de 10FPU/gms. Partindo dessas informações, avaliou-se a viabilidade do investimento na planta produtiva. Neste caso, a celulase pode ser vendida por um preço de US\$18,50/100.000FPU, gerando uma TIR de 15,88%, acima da TMA de 13,5%, e um “pay-back” de 9 anos. O investimento neste cenário não é viável, já que o preço de venda da celulase não seria competitivo no mercado.

A figura 20 representa o fluxo de caixa do investimento nas condições citadas.

Figura 20 - Fluxo de caixa para investimento em planta de produção de celulase via FES, com produção de inóculo na forma de células vegetativas, 10% do bagaço gerado destinado para hidrólise e atividade enzimática de hidrólise em 10FPU/gms.

5.5. Cenário 5 – Alteração dos volumes dos reatores de produção de enzimas

Neste cenário é analisada a utilização de reatores de produção de enzimas com capacidade maior do que a capacidade determinada na seção 4.1. Nos cenários anteriores, o volume adotado para os reatores foi de 5 m³.

Os volumes analisados serão de 10, 25 e 50 m³. Fixou-se a proporção de 20% de farelo de trigo e 80% de bagaço de cana-de-açúcar no substrato, a concentração de celulasas no meio de cultivo de 32,04FPU/gms, tempo de fermentação de 72 horas, 10% de bagaço de cana-de-açúcar gerado destinado para hidrólise e atividade enzimática para hidrólise em 10 FPU/g de substrato.

A tabela 17 mostra os custos de produção das celulasas, de investimento e operacionais.

Tabela 17 - Comparação dos custos de produção, de aquisição dos equipamentos, investimento e custo operacional total do processo, conforme variação da capacidade volumétrica dos equipamentos.

Volume dos biorreatores (m ³)	5	10	25	50
Custo de produção (US\$/100.000FPU)	5,58	4,16	3,29	2,95
Custo total de aquisição dos equipamentos (MMUS\$)	5,22	4,26	3,68	3,40
Custo Total de Investimento (MMUS\$)	26,23	21,44	18,49	17,09
Custo Operacional Total (MMUS\$)	7,03	5,24	4,15	3,71

A partir da figura 21, é possível afirmar que, se adotado uma capacidade maior dos reatores de produção de enzimas, ocorre uma redução no custo de produção de celulasas, no investimento, no custo total de aquisição dos equipamentos e no custo operacional. É possível atingir reduções de 47% no custo de produção das celulasas e no custo operacional, e 35% no custo de investimento, aumento a capacidade dos reatores de 5 m³ para 50 m³.

Nota-se que o aumento da capacidade volumétrica dos reatores de produção de enzimas apresenta uma tendência ao perfil assintótico, tendo um valor limite de ampliação de escala e impacto nos custos do processo.

Figura 21 - Variação do preço do custo de produção da celulase quando variados os volumes dos biorreatores e tanques de inóculo do processo.

5.6. Cenário 6 – Análise estatística das variáveis adotadas no processo

Neste cenário avaliou-se estatisticamente o impacto das variáveis adotadas no processo sobre o custo de produção de celulases. As variáveis consideradas na análise estatística foram: quantidade de bagaço destinado a hidrólise, atividade enzimática destinada a hidrólise, concentração de enzimas no meio de cultura (medida em atividade enzimática), tempo de fermentação, tempo de crescimento de inóculo, volume dos biorreatores e custo da matéria-prima.

A análise aplicada nesta etapa baseou-se na utilização do “software” MiniTab 15, que utiliza a ferramenta de linearização das variáveis adotadas no processo com o valor do custo de produção das celulases. Estipularam-se diferentes valores para as variáveis do processo, de modo a ter os dados em uma distribuição triangular.

A primeira análise verificou a correlação existente entre as variáveis e o custo de produção da celulase. A tabela 18 apresenta as variáveis adotadas no processo e o valor de “p”, que indica a correlação ou não da variável com o custo de produção da celulase.

Tabela 18 - Índice de correlação (p) de cada variável adotada no processo indicando o impacto no custo de produção da celulase individualmente e em conjunto.

Variáveis	p-value
Quantidade de bagaço destinado à hidrólise (ton)	0,240
Atividade enzimática para hidrólise do bagaço (FPU/g de substrato seco)	0,307
Produção de celulases, medida em atividade enzimática (FPU/gms)	0,000
Volume dos reatores de produção de inóculo (m ³)	0,183
Volume dos biorreatores (m ³)	0,000
Tempo do crescimento vegetativo (h)	0,474
Tempo de fermentação (h)	0,000
Custo do bagaço de cana-de-açúcar (US\$/ton)	0,004
Custo do farelo de trigo (US\$/ton)	0,603

Pode-se afirmar que na avaliação da correlação, ou seja, na verificação da existência de uma tendência conjunta entre a variável de processo e o custo de produção da celulase, existe uma correlação das seguintes variáveis com o custo da celulase: quantidade de bagaço destinado à hidrólise, produção de celulases (medida em atividade enzimática), volume dos biorreatores (reatores de produção de enzimas), tempo de fermentação e custo do bagaço de cana-de-açúcar com o custo final de produção, pois possuem um “p-value” maior que 0,05. O “p-value” sendo menor do 0,05 indica que a correlação da variável com o custo de produção das celulases tem significância de 95%.

Verifica-se que existe relação do custo do bagaço de cana-de-açúcar com o custo de produção das celulases. Os resultados gerados pelo “software” foram baseados numa faixa de variação do custo do bagaço de cana-de-açúcar de US\$5,00 a US\$20,00 a tonelada. Além disso, variou-se a quantidade de bagaço de cana-de-açúcar

destinado a hidrólise. Conclui-se que dependendo da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar destinado à hidrólise, a variável custo do bagaço de cana-de-açúcar impacta no custo de produção das celulasas.

Analisou-se a probabilidade do custo de produção das celulasas estar abaixo de US\$0,50/100.000FPU, através dos resultados gerados na simulação. A figura 22 representa a distribuição dos dados de custo de produção da celulase, gerada pelo “software” MiniTab.

Figura 22 - Distribuição do custo de produção da celulase.

Verifica-se que a probabilidade de se ajustar as variáveis de processo de modo a se obter um custo menor do que US\$0,50/100.000FPU é de 15%. Verificou-se, nos dados gerados pelo programa, que o menor custo de produção obtido foi de US\$0,19/100.000FPU. Este custo foi meio de uma simulação na qual destina-se 20% do bagaço de cana-de-açúcar gerado para hidrólise, necessitando de 32,06 FPU/g de substrato seco para hidrólise. A produção de enzimas medida em atividade enzimática foi de 177,54 FPU/gms, com os reatores de inóculo de 2,35 m³ e reatores de 27,11 m³.

O tempo de crescimento do inóculo de 57 horas e tempo de fermentação de 25 horas. Os custos das matérias-primas foram de US\$8,46/ton e US\$103,31/ton de bagaço de cana-de-açúcar e farelo de trigo, respectivamente.

Os valores de produção de celulase e tempo de fermentação para atingir o custo de US\$0,19/100.000FPU nunca foram reportados. Portanto, essas informações reforçam a necessidade de estudos no aumento da produção enzimática e viabilizar reatores para FES com volumes da ordem de 27m³.

A última análise estatística consistiu em avaliar qual o peso percentual de cada uma das variáveis adotadas no processo sobre o custo de produção das celulases. Esta análise baseia-se em efetuar uma regressão linear de cada variável com o custo de produção. A tabela 19 apresenta os dados de R-Sq (R²) de cada variável adotada na análise.

Tabela 19 - Coeficiente de determinação para cada variável do processo.

Variáveis	R-Sq (%)
Quantidade de bagaço destinado à hidrólise (ton)	0,6
Atividade enzimática para hidrólise do bagaço (FPU/g de substrato seco)	0,3
<i>Produção de celulases, medida em atividade enzimática (FPU/gms)</i>	<i>73,4</i>
Volume dos reatores de produção de inóculo (m ³)	0,5
<i>Volume dos biorreatores (m³)</i>	<i>2,7</i>
Tempo do crescimento vegetativo (h)	0,1
<i>Tempo de fermentação (h)</i>	<i>3,7</i>
Custo do bagaço de cana-de-açúcar (US\$/ton)	0,9
Custo do farelo de trigo (US\$/ton)	0,6
Variáveis não analisadas neste processo	17,2

O R^2 é o coeficiente de determinação. Esse valor representa a influência, medida em porcentagem, que a variável tem sobre custo de produção da celulase. Estes dados confirmam que a principal variável no custo de produção de celulase é a concentração da enzima no meio de cultura. A figura 23 representa em um gráfico de setores a influência de cada variável no custo final.

Figura 23 - Gráfico de setores da porcentagem que cada variável adotada na análise influencia o custo de produção da celulase.

Pode-se concluir das análises estatísticas que existem vários fatores que afetam os custos da construção e operação de uma planta de produção de celulases. No entanto, para se viabilizar uma planta produtiva via FES, os esforços devem estar voltados ao desenvolvimento de melhores culturas microbianas, que produzam maiores quantidades de celulases em um menor tempo de fermentação. Além disso, deve-se aplicar esforços na área de design específicos de reatores de produção de enzimas,

associados a um sistema de controle e automação de processos de fermentação em estado sólido aprimorados, pois isso permite melhores ampliações de escala, otimizando os custos de investimento e operação.

6. CONCLUSÕES

As conclusões obtidas, a partir das análises de custo de produção de celulase, custo de investimento e custo operacional, via fermentação em estado sólido, foram:

1. A concentração de celulase no meio de produção, medida como atividade enzimática, causa impacto significativo no custo final de produção da enzima. Aumentos desta concentração desde 1 até 45FPU/gms causam redução do custo de produção. Entretanto, para valores superiores a 45FPU/gms, mantidas as demais variáveis de processo, não se verifica redução do custo de produção, pois, a função tem comportamento assintótico.
2. A produtividade da celulase impacta nos custos do processo produtivo. No entanto, o maior impacto ocorre quando o aumento da produtividade ocorre devido ao aumento da produção da celulase pelo microrganismo e não pela redução do tempo de fermentação;
3. Os custos das matérias-primas não têm impacto significativo sobre o custo da celulase, já que apresentam uma variação média de 0,3% no custo final;
4. A quantidade de bagaço a ser hidrolisada causa um aumento na quantidade de celulase que deve ser produzida e, conseqüentemente, redução no seu custo de produção. Destinar 10% do bagaço de cana-de-açúcar gerado por uma indústria padrão pode reduzir em até 7% os custos de produção. O aumento da carga de atividade enzimática para a reação de hidrólise (7 a 30 FPU/g de substrato seco), que provoca aumento na atividade enzimática a ser produzida e, causa reduções menores do que 5% no custo de produção, enquanto os custos de capital de investimento podem sofrer aumentos de 90%, não sendo vantajoso o aumento desta variável;
5. Aumento no volume dos biorreatores causa uma redução no custo final de produção de celulase, já que diminui o custo operacional total e o custo de investimento na planta produtiva.

De maneira geral, o projeto permite concluir que a tecnologia de fermentação em estado sólido, dados os volumes considerados neste trabalho e a realidade de processos industriais serem conduzidos em bandejas, há que se considerar a vital necessidade de se ter reatores mais eficientes.

A concentração de atividade enzimática no meio da FES é a variável mais impactante no custo de produção de celulasas. Desenvolvimento na obtenção de culturas microbianas que produzam mais enzimas é importante para tornar o custo de produção das celulasas viável para a produção de etanol 2G, porém nota-se que isto está longe de ser alcançado.

A tabela 20 apresenta um resumo dos resultados obtidos nos diferentes cenários analisados.

Tabela 20 - Resumo das conclusões para cada cenário.

Cenário 1	Cenário 2	Cenário 3	Cenário 4	Cenário 5	Cenário 6
A produção de celulase (medida em atividade enzimática) impacta no custo final de forma assintótica. Concentrações no meio de cultivo acima de 45FPU/gms, causam reduções menores que 4% no custo de produção.	A produtividade da celulase impacta nos custos de investimento, operacionais e de produção. No entanto, a produtividade melhorada através do aumento da produção de celulase é melhor do que através da diminuição do tempo de fermentação.	Variações de 15% no custo do farelo de trigo ou de 33% no custo do bagaço de cana-de-açúcar causam variações de 0,2 a 0,5% no custo de produção das celulasas.	O aumento na quantidade de bagaço de cana-de-açúcar destinado à hidrólise acima de 10%, causam reduções menores do 5% no custo de produção das celulasas e aumento de 45% nos custos de investimento. Aumento na dosagem de atividade enzimática para hidrólise acima de 10 FPU/gms causa aumento de até 90% nos custos de investimento.	O aumento da capacidade volumétrica dos biorreatores de 5m³ para 50 m³ reduz o custo de produção da celulase e custo operacional em 35%, e reduz 47% o custo de investimento.	A probabilidade de atingir custos de produção de celulase menores do que US\$0,15/100.000FPU é de 15%, para as condições de processo atualmente alcançadas. A variável mais impactante no custo de produção da celulase é a produção enzimática.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**. 1997. v. 15, p. 583-620.

BIANCHI, V. L. D.; MORAES, I. O.; CAPALBO, D. M. F. Fermentação em Estado Sólido. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1ª edição. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. v. 2, cap. 13, p. 247-276.

BORZANI, W. Esterilização de meios de fermentação por aquecimento com vapor. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1ª edição. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. v. 2, cap. 4, p. 39-62.

BROWN, S.F. Biorefinery breakthrough. **Magazine Fortune**. Estados Unidos da América. 06/02/2006. p. 88. Disponível em <http://money.cnn.com/magazines/fortune/fortune_archive/2006/02/06/8367962/index.htm>.

CAMPBELL, C. J.; LAHERRÉRE, J. H. The end of cheap oil. **Scientific American**. 1998, v.60.

CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. Biological pretreatment of sugar cane bagasse for the production of cellulases and xylanases by *Penicillium echinulatum*. **Elsevier: Industrial crops and products**. 2009. v. 29, p. 642-647.

CARLILE, M.; WATKINSON, S.; GOODAY, G. In: **The Fungi**. Second edition. Editora Elsevier. 2001. caps. 4-5.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1ª edição. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. v. 2, cap. 9, p. 193-204.

CASTELLANOS, O. F.; SINITSYN, A. P.; VLASENKO E. Yu. Comparative evaluation of hydrolytic efficiency toward microcrystalline cellulose of *Penicillium* and *Trichoderma* cellulases. **Bioresource Technology**. 1995. v. 52, p. 119-124.

CHAHAL, D. S. Solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* for cellulose production. **Applied and Environmental Microbiology**. 1985. v. 49, p. 205-210.

CHANDRA, M.; KALRA, A.; SHARMA, P. K.; SANGWAN, R. S. Cellulase production by six *Trichoderma* ssp. Fermented on medicinal plant processing. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 2009. v. 36, p. 605-609.

CHEN, H.; RUBENTHALER, G. L.; LEUNG, H. K.; BARANOWSKI, J. D. Chemical, Physical, and Baking Properties of Apple Fiber Compared with Wheat and Oat Bran. **Cereal Chemistry**. 1988. v.65, p. 244-247.

COELHO, M. A. Z.; LEITE, S. G. F.; ROSA, M. F.; FURTADO, A. A. L. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde**. B. CEPPA. Curitiba. 2001. v.19, n.1, p. 33-42.

CORRETORA DE MERCADOS. Disponível em:
<<http://www.corretoramercado.com.br/cotacoes/cotacoes2.asp?IDproduto=22&FOBCIF=1>>. Acesso em 24 de abril de 2010.

DECKER, S. R.; WILLIAM, S. A.; JENNINGS, E.; VINZANT, T. B., HIMMEL, M. E. Automated Filter Paper Assay for Determination of Cellulase Activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 2003. v. 105-108, p. 689-703.

DIN, N.; DAMUDE, H. G.; GILKES, N. R.; MILLER, R. C.; WARREN, R. A. J.; KILBURN, D. G. C₁-C_x revisited: intramolecular synergism in a cellulose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 1994. v. 91, p. 11383-11387.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**. 2003. v. 13, p. 113-125.

ERIKSSON, K. E. L.; BLANCHETTE, R. A.; ANDER, P. Microbial and enzymatic degradation of wood and wood components. **Wood Science and Technology**. 1990. v. 25, p. 402-403.

ESTERBAUER, H.; STEINER, W.; LABUDOVA, I.; HAYN, M. Production of *Trichoderma* in Laboratory and Pilot Scale. **Bioresource Technology**. 1991. v. 36, p. 51-65.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood Chemistry, Ultrastructure, reactions**. Walter de Gruyter, Berlin. 1989.

FERREIRA, R.G. Estudo de substratos para produção de celulases por fermentação semi-sólida. 2008. Relatório de Iniciação Científica – Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC CNPq.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulose activities. **Pure & Applied Chemistry**. 1987. v. 59, nº 02, p. 257-268.

HAYN, M.; STEINER, W.; KLINGER, R.; STEINMÜLLER, H.; SINNER, M.; ESTERBAUER, H. Basic Research and Pilot Studies on the Enzymatic Conversion of Lignocellulosics. In: SADDLER, J. N. **Bioconversion of Forest and Agricultural Plant Residues**. 1993. cap. 2, p. 33-72.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**. 2008. v. 100, p. 10-18.

HENRISSAT, B.; TEERI, T. T.; WARREN, R. A. J. A scheme for designating enzymes that hydrolyse the polysaccharides in the cell walls of plants. **FEBS Letters**. 1998. v. 425, p. 352-354.

HIMMEL, M. E.; RUTH, M. F.; WYMAN, C. E. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. **Current opinion in biotechnology**. 1999. v. 10. p. 358-364.

KAGLIWAL, L. D.; SURVASE, S. A.; SINGHAL, R. S. A novel medium for the production of cephamycin by *Nocardia lactamdurans* using solid-state fermentation. **Bioresource Technology**. 2009. v. 100. p. 2600-2606.

KELLER, F. A.; HAMILTON, J. E.; NGUYEN, Q. A. Microbial Pretreatment of biomass: potential for reducing severity of thermochemical biomass pretreatment. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 2003. v. 105-108, p. 27-41.

KELLER, F. A. Integrated bioprocess development. In: WYMAN, C. E., TAYLOR & FRANCIS. **Handbook on Bioethanol: Production and Utilization**. 1996. Washington. cap. 17, p. 381-394.

KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crops residues. **Biomass & Bioenergy**. 2004. v. 26, p. 361-375.

LAUREANO-PEREZ, L.; TEYMOURI, F.; ALIZADEH, H.; DALE, B. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 2005. v. 121-124, p. 1081-1100.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C., AMORIM, H.V. Produção de etanol. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. 2ª edição. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. v. 3, cap. 1, p. 1-43.

LONSANE, B. K.; SAUCEDO-CASTANEDA, G.; RAIMBAULT, M.; ROUSSOS, S.; VINIEGRA-GONZALES, G.; GHILDYAL, N. P.; RAMAKRISHNA, M.; KRISHNAIAH, M. M. Review: Scale-up strategies for solid state fermentation systems. **Process Biochemistry**. 1992. v. 27, p. 259-273.

LYND, L. R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H.; PRETORIUS, I. S. Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. 2002. v. 66, p. 506-577.

MACEDO, I. C. Situação atual e perspectivas do etanol. **Estudos Avançados** 21. 2007, v. 59, p. 157-165.

MACEDO, I. C.; NOGUEIRA, L. A. H. Avaliação da expansão de etanol no Brasil. **Centro de Gestão e Estudos Estratégicos – Prospecção Tecnológica Biocombustíveis**. 2004.

MAIS, U.; ESTEGHLALIAN, A. R.; SADDLER, J. N.; MANSFIELD S. D. Enhancing the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using simultaneous ball milling. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 2002. v. 98-100, p. 815-832.

MANIMARAN, A.; KUMAR, K. S.; PERMAUL, K.; SINGH, S. Hyper production of cellulase-free xylanase by *Thermomyces lanuginosus* SSBP on bagasse pulp and its application in biobleaching. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2009. v. 81, p. 887-893.

MATTOSO, S. Q. Reflexões sobre a duração das jazidas de petróleo em função do consumo e do que pode ser feito para reduzir o consumo do petróleo. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**. 2008, v. 1, nº. 1, p. 122-126.

MEKALA, N. K.; SINGHANIA, R. R.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Cellulase production under solid-state fermentation by *Trichoderma reesei* RUT C30: Statistical Optimization of Process Parameters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 2008. v. 151, p. 122-131.

MONIQUE, H.; FAAJI, A.; VAN DEN BROEK, R.; BERNDES, G.; GIELEN, D.; TURKENBURG, W. Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy. **Biomass Bioenergy**. 2003. v. 25, p.119-133.

MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A. R.; TENGGERDY, R. P. Principles of solid-substrate fermentation. In: SMITH, J. E.; **The Filamentous Fungi**. London: Ed. Edward Arnold, 1983. v. 4.

MORAES, I.O. Produção de microrganismos. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. 2ª edição. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. v. 3, cap. 9, p. 199-217.

NOGUEIRA, A. **Bagaço de cana será utilizado para produção de papel**. Folha da Região. 2005. Disponível em: <http://www.folhadaregiao.com.br/noticia?49623>. Acesso em 24 de abril de 2010.

O GLOBO – ECONOMIA. **Álcool combustível do Brasil para o mundo**. 2005. Disponível em: <http://pib.socioambiental.org/pt/noticias?id=31424>. Acesso em 24 de abril de 2010.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; RODRIGUEZ-LEON, J. A.; NIGAM, P. Solid-state fermentation in biotechnology: fundamentals and applications. **New Delhi: Asiatech**. 2001. 221 p.

PESSOA JR., A.; KILIKIAN, B. V. Introdução. In: **Pessoa Jr., A.; Kilikian, B. V.** Purificação de Produtos Biotecnológicos. 1ª edição. Barueri, S.P., Editora. Manole, 2005 cap.1.

PETERS, M. S.; TIMMERHAUS, K. D.; WEST, R. E. In: **Plant Design and Economics for Chemical Engineers**. 5ª edição. New York. Editora McGraw-Hill. 2003. p. 196-278.

PICCOLO, C.; BEZZO, F. A Techno-economic comparison between two Technologies for bioethanol production from lignocellulose. **Biomass and Bioenergy**. 2009. v. 33, p. 478-491.

PRADELLA, J. G. C.; ROSSELL, C. E. V.; SCANFIFIO, M. I. G.; CUNHA, M. P.; PINHO, M. G. O.; BONOMI, A. Estudo Preliminar do Custo de Produção de Celulases na Biorrefinaria de Etanol de Segunda Geração. **XVII SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS**. (2009).

RECZEY, K.; SZENGYEL, Zs.; EKLUND, R.; ZACCHI, G. Cellulase production by *T. reesei*. **Bioresource Technology**. 1996. v. 57, p. 25-30.

RASUL, M. G.; RUDOLPH, V.; CARSKY, M. Physical properties of bagasse. **Fuel**. 1999. v. 78, p. 905-910.

ROSSELL, C.E.V. Evolução Tecnológica da Produção de Etanol. Expectativas futuras: Destilarias Otimizadas, Etanol da Hidrólise de Bagaço. **60ª REUNIÃO ANUAL DA SBPC**. UNICAMP. Campinas. 2008.

ROUSSOS, S.; OLMOS, A.; RAIMBAULT, M.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; LONSANE, B. K. Strategies for Large Scale Inoculum Development for Solid State Fermentation System: Conidiospores of *Trichoderma harzianum*. **Biotechnology Techniques**. 1991. v. 5, n. 6, p. 415-420.

SANT'ANNA JR., G.L. Produção de enzimas microbianas. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. 2ª edição. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. v. 3, cap. 14, p. 351-362.

SANTOS, J. R. A.; GOUVEIA, E. R. Produção de Bioetanol de Bagaço de Cana-de-Açúcar. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**. 2009. v. 11, n. 1, p. 27-33.

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**: Engenharia Bioquímica. 1ª edição. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001a. v. 2, cap. 2, p. 5-18.

SCHMIDELL, W. Esterilização de ar. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**: Engenharia Bioquímica. 1ª edição. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001b. v. 2, cap. 5, p. 63-91.

SEHNEM, N. T.; BITTENCOURT, L. R.; CAMASSOLA, M.; DILLON, A. J. P. **Produção de celulasas por *Penicillium echinulatum* em meio de cultura contendo lactose**. 2009. Sinaferm. Disponível em: <
http://www.eng.ufsc.br/eventos/sinaferm/trabalhos_completos/t280.doc. Acesso em 03/08/2010 > 09:33.

SENDELIUS, J. **Steam Pretreatment Optimisation for Sugarcane Bagasse in Bioethanol Production**. 2005. 58 p. Tese de Doutorado. Suécia: Universidade de Lund / Departamento de Engenharia Química.

SHRESTHA, P.; KHANAL, S. K.; POMETOIII, A. L.; VAN LEEUWEN, J. H. Enzyme production by wood-rot and soft-rot fungi cultivated on corn fiber followed by simultaneous saccharification and fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2009. v. 57, p. 4156-4161.

SMITS, J. P.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; SCHLÖSSER, E. E.; KNOL, W. Accurate determination of process variables in a solid-state fermentation system. **Process Biochemistry**. 1996a. v. 31, p. 669-678.

SMITS, J. P.; RINZEMA, A.; TRAMPER, J.; VAN SONSBECK, H. M.; KNOL, W. Solid-state fermentation of wheat bran by *Trichoderma reesei* QM9414: substrate composition changes, C balance, enzyme production, growth and kinetics. **Applied Microbiology and Biochemistry**. 1996b. v. 46, p. 489-496.

SOUZA, T. F. C.; KILIKIAN, B. V. Seleção de microrganismos produtores de celulase e xilanases em cultivos semi-sólidos. Relatório obtido no departamento de engenharia bioquímica da Escola Politécnica (USP). 2009. São Paulo.

SOUZA-CRUZ, P. B.; FREER, J.; SIIKA-AHO, M.; FERRAZ, A. Extraction and determination of enzymes produced by *Ceriporiopsis subvermispota* during biopulping of *Pinus taeda* wood chips. **Enzyme and Microbial Technology**. 2004. p. 228-234.

SUKUMARAN, R. K.; SINGHANIA, R. R.; MATHEW, G. M.; PANDEY, A. Cellulase production using biomass feed stock and its application in lignocellulose saccharification for bio-ethanol production. **Elsevier: Renewable Energy**. 2009. v. 34, p. 421-424.

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

TAYLOR, G. Biofuels and biorefinery concept. **Energy Policy**. 2008. v. 36, p. 4406-4409.

TOLAN, J. S.; FOODY, B. Cellulase from submerged fermentation. **Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology**. 1999. v. 65, p. 41-67.

TOMME, P.; WARREN, R. A. J.; GILKES, N. R. Cellulose hydrolysis by bacteria and fungi. **Advances in Microbial Physiology**. 1995. v. 37, p. 1-81.

TRIOLA, M. F. **In: Introdução à Estatística**. 10ª edição. Rio de Janeiro. Editora LTC. 2008. p. 408-458.

TURTON, R.; BAILIE, R. C.; WHITING, W. B.; SHAEIWITZ, J. A. **In: Analysis, Synthesis, and Design of Chemical Processes**. 2nd ed. New Jersey. Ed. Prentice Hall. 2007. p. 141-260.

UNICA. **Biomassa pouco aproveitada**. 2004. Disponível em: <
<http://www.unica.com.br/opiniao/show.asp?msgCode={82ABCB59-E737-4E60-ACE0-E46AA24F8EA3}>>. Acesso em 10/05/2009.

URENHA, L. C.; PRADELLA, J. G. C.; RODRIGUES, M. F. A. Esterilização do Equipamento. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1ª edição. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. v. 2, cap. 3, p. 19-38.

USDA. **Ethanol Rephases the Corn Market**. BAKER, A.; ZAHNISER, S. Disponível em: <<http://www.ers.usda.gov/AmberWaves/April06/pdf/EthanolFeatureApril06.pdf>>. Acesso em 23/06/2009.

VILLEN, R. A. Aspectos Econômicos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. 1ª edição. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. v. 2, cap. 22, p. 523-541.

VINTILA, T.; BICA ADINA, N.; TOTH, S.; DRAGOMIRESCU, M. Study Concerning Production of Cellulase Enzymes in Solid State Cultures of *Trichoderma viride*. *Lucrări științifice Zootehnie și Biotehnologii*. 2008. v. 41, p. 188-194.

VINTILA, T.; DRAGOMIRESCU, M.; JURCOANE, S.; VINTILA, D.; CAPRITA, R.; MANIU, M. Production of cellulase by submerged and solid-state cultures and yeasts selection for conversion of lignocellulose to ethanol. **Romanian Biotechnological Letters**. 2009. v. 14. n. 2. p. 4275-4281.

VOCA, N.; VARGA, B.; KRICKA, T.; CURIC, D.; JURISIC, V.; MATIN, A. Progress in ethanol production from corn kernel by applying cooking pre-treatment. **Bioresource Technology**. 2009. v. 100, p. 2712-2718.

Von Sivers, M.; Zacchi, G. Ethanol from lignocellulosics: a review of the economy. **Bioresource Technology**. 1996. v. 56, p.131-140.

WHEALS, A. F.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIN, H. V. Fuel ethanol after 25 years. **Trends Biotechnology**. 1999. v. 17, p. 482-486.

WOOLEY, R.; RUTH, M.; GLASSNER, D.; SHEEHAN, J. Process Design and Costing of Bioethanol Technology: A Tool for Determining the Status and Direction of Research and Development. **Biotechnology Progress**. 1999. v. 15, p. 794-803.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2001. v. 56, p. 17-34.

ANEXO A

Tabela A. 1- Dados de custo de equipamentos para serem utilizados na equação 12.

Equipment Type	Equipment Description	K_1	K_2	K_3	Capacity, Units	Min Size	Max Size
Compressors	centrifugal, axial, and reciprocating	2.2897	1.3604	-0.1027	fluid power, kW	450	3000
	rotary	5.0355	-1.8002	0.8253	fluid power, kW	18	950
Drives	gas turbine	-21.7202	13.2175	-1.5279	shaft power, kW	7500	23,000
	intern comb. engine	2.7635	0.8574	-0.0098	shaft power, kW	10	10,000
	steam turbine	2.6250	1.4398	-0.1776	shaft power, kW	20	7500
	electric—explosion proof	2.4604	1.4191	-0.1798	shaft power, kW	75	2600
	electric—totally enclosed	1.9560	1.7142	-0.2282	shaft power, kW	75	2600
	electric—open/drip proof	2.9506	1.0688	-0.1315	shaft power, kW	75	2600
Evaporators	forced circulation (pumped)	5.0238	0.3425	0.0703	area, m ²	5	1000
	falling film	3.9119	0.8627	-0.0088	area, m ²	50	500
	agitated film (scraped wall)	5.0000	0.1490	-0.0134	area, m ²	0.5	5
	short tube	5.2366	-0.6572	0.3500	area, m ²	10	100
	long tube	4.6420	0.3698	0.0025	area, m ²	100	10,000
Fans	centrifugal radial	3.5391	-0.3533	0.4477	gas flowrate, m ³ /s	1	100
	backward curve	3.3471	-0.0734	0.3090	gas flowrate, m ³ /s	1	100
	axial vane	3.1761	-0.1373	0.3414	gas flowrate, m ³ /s	1	100
	axial tube	3.0414	-0.3675	0.4722	gas flowrate, m ³ /s	1	100
Furnaces	reformer furnace	3.0680	0.6597	0.0194	duty, kW	3000	100,000
	pyrolysis furnace	2.3859	0.9721	-0.0206	duty, kW	3000	100,000
	nonreactive fired heater	7.3488	-1.1666	0.2028	duty, kW	1000	100,000
Heat exchangers	scraped wall	3.7803	0.8569	0.0349	area, m ²	2	20
	Teflon tube	3.8062	0.8924	-0.1671	area, m ²	1	10
	bayonet	4.2768	-0.0495	0.1431	area, m ²	10	1000
	floating head	4.8306	-0.8509	0.3187	area, m ²	10	1000
	fixed tube	4.3247	-0.3030	0.1634	area, m ²	10	1000
	u-tube	4.1884	-0.2503	0.1974	area, m ²	10	1000

Continua...

Continuação...

	kettle reboiler	4.4646	-0.5277 *	0.3955	area, m ²	10	100
	double pipe	3.3444	0.2745	-0.0472	area, m ²	1	10
	multiple pipe	2.7652	0.7282	0.0783	area, m ²	10	100
	flat plate	4.6656	-0.1557	0.1547	area, m ²	10	1000
	spiral plate	4.6561	-0.2947	0.2207	area, m ²	1	100
	air cooler	4.0336	0.2341	0.0497	area, m ²	10	10000
	spiral tube	3.9912	0.0668	0.2430	area, m ²	1	100
Heaters	diphenyl heater	2.2628	0.8581	0.0003	duty, kW	650	10750
	molten salt heater	1.1979	1.4782	-0.0958	duty, kW	650	10750
	hot water heater	2.0829	0.9074	-0.0243	duty, kW	650	10750
	steam boiler	6.9617	-1.4800	0.3161	duty, kW	1200	9400
Packing	loose (for towers)	2.4493	0.9744	0.0055	volume, m ³	0.03	628
Process vessels	horizontal	3.5565	0.3776	0.0905	volume, m ³	0.1	628
	vertical	3.4974	0.4485	0.1074	volume, m ³	0.3	520
Pumps	reciprocating	3.8696	0.3161	0.1220	shaft power, kW	0.1	200
	positive displacement	3.4771	0.1350	0.1438	shaft power, kW	1	100
	centrifugal	3.3892	0.0536	0.1538	shaft power, kW	1	300
Towers	tray and packed	3.4974	0.4485	0.1074	volume, m ³	0.3	520
Tanks	API—fixed roof	4.8509	-0.3973	0.1445	volume - m ³	90	30000
	API—floating roof	5.9567	-0.7585	0.1749	volume - m ³	1000	40000
Trays	sieve	2.9949	0.4485	0.3961	area, m ²	0.07	12.30
	valve	3.3322	0.4838	0.3434	area, m ²	0.70	10.50
	demisters	3.2353	0.4838	0.3434	area, m ²	0.70	10.50
Turbines	axial gas turbines	2.7051	1.4398	-0.1776	fluid power, kW	100	4000
	radial gas/liquid expanders	2.2476	1.4965	-0.1618	fluid power, kW	100	1500
Vaporizers	internal coils/jackets	4.0000	0.4321	0.1700	volume, m ³	1	100
	jacketed vessels	3.8751	0.3328	0.1901	volume, m ³	1	100

Tabela A. 2 - Número de identificação das constantes do material do equipamento, para ser utilizada com a figura A.1.

Identification Number	Equipment Type	Equipment Description	Material of Construction
1	Heat exchanger	double pipe, multiple pipe,	CS-shell/CS-tube
2		fixed tube sheet, floating head,	CS-shell/Cu-tube
3		U-tube, bayonet, kettle reboiler, scraped	Cu-shell/Cu-tube
4		wall, and spiral tube	CS-shell/SS-tube
5			SS-shell/SS-tube
6			CS-shell/Ni alloy tube
7			Ni alloy, shell/Ni alloy-tube
8			CS-shell/Ti-tube
9			Ti-shell/Ti-tube
10	Process vessels	air cooler	CS tube
11		air cooler	Al tube
12		air cooler	SS tube
13		flat plate and spiral plate	CS (in contact with fluid)
14		flat plate and spiral plate	Cu (in contact with fluid)
15		flat plate and spiral plate	SS (in contact with fluid)
16		flat plate and spiral plate	Ni alloy (in contact with fluid)
17		flat plate and spiral plate	Ti (in contact with fluid)
18		horizontal, vertical (including towers)	CS
19		horizontal, vertical (including towers)	SS clad
20		horizontal, vertical (including towers)	SS
21		horizontal, vertical (including towers)	Ni alloy clad
22		horizontal, vertical (including towers)	Ni alloy
23		horizontal, vertical (including towers)	Ti clad
24		horizontal, vertical (including towers)	Ti
25	Pumps	reciprocating	Cast iron
26		reciprocating	Carbon steel
27		reciprocating	Cu alloy
28		reciprocating	SS
29		reciprocating	Ni alloy
30		reciprocating	Ti
31		positive displacement	Cast iron
32		positive displacement	Carbon steel
33		positive displacement	Cu alloy
34		positive displacement	SS
35		positive displacement	Ni alloy
36		positive displacement	Ti
37		centrifugal	Cast iron
38		centrifugal	Carbon steel
39		centrifugal	SS
40		centrifugal	Ni alloy

Figura A. 1 - Diagrama das constantes do material do equipamento.

Tabela A. 3 – Constantes para o fator do módulo de Bare, para ser utilizada na equação 13.

Equipment Type	Equipment Description	B_1	B_2
Heat exchangers	double pipe, multiple pipe, scraped wall, and spiral tube	1.74	1.55
	fixed tube sheet, floating head, U-tube, bayonet, kettle reboiler, and Teflon tube	1.63	1.66
	air cooler, spiral plate, and flat plate	0.96	1.21
Process vessels	horizontal	1.49	1.52
	vertical (including towers)	2.25	1.82
Pumps	reciprocating	1.89	1.35
	positive displacement	1.89	1.35
	centrifugal	1.89	1.35

ANEXO B

<u>Bagaço Residual Gerado na Safra de Cana-de-Açúcar de uma Usina Padrão</u>		
Unidades	Usina Padrão	TOTAL
Usina de Referência	1.000.000,00	1.000.000,00
Unidade do Bagaço (%) - [U]	50,00%	50,00%
Bagaço - base úmida (ton/safra) - [Bagaço _{úmido}]	280.000,00	280.000,00
Bagaço - base seca (ton/safra) - [Bagaço _{seco}]	140.000,00	140.000,00
<u>Bagaço Hidrolisado</u>		
Unidades	Usina Padrão	TOTAL
Porcentagem do bagaço hidrolisado (%)	5,00%	5,00%
Massa de bagaço a ser hidrolisado (ton/ano) - [Bagaço _{seco} total]	7.000,00	7.000,00
<u>Dados de Entrada</u>		
Dosagem de enzimas necessárias p/ hidrólise (FPU/ton) - [a _{hidrólise}]	10.000.000,00	
Produção de Enzimas - Concentração final de enzimas no substrato sólido (FPU/ton) - [produção _{enzima}]	32.400.000,00	
Tempo de Operação da Planta (dias)	330	
Tempo para crescimento das Células Vegetativas (horas)	48	
Porcentagem de bagaço de cana-de-açúcar tratado, na mistura (%)	80,00%	
Porcentagem de farelo de trigo na mistura (%)	20,00%	
<u>Dados de Saída</u>		
Custo de Produção (US\$/100.000FPU)	5,40	
Investimento (US\$)	14.247.971,90	
"Pay-back" (anos)	1,15	
Número de Biorreatores	28	
Número de Tanques de Inóculo	2	
Número de Compressores	3	
<i>Dados de entrada: células com fundo cinza, escritas em azul.</i>		

Figura B. 1 – Ilustração da planilha utilizada para cálculo da quantidade de bagaço de cana-de-açúcar (base seca), gerada por uma usina de referência, que será destinada para hidrólise e planilha com os campos dos dados de entrada e apresentação dos dados de saída.

Balanço de Massa de Processo

Estimativa de Celulase

Dosagem de enzimas necessárias para hidrólise (FPU/ton) - [a _{hidrólise}]	10.000.000,00
Atividade Total Necessária (FPU/ano) - [Atividade _{total}]	7,00E+10
Produtividade da Atividade (FPU/h) - [At _{produtividade}]	5,09E+09

Produção de Enzimas no Biorreator

Produção de Enzimas - Concentração final de enzimas no substrato sólido (FPU/ton) - [produção _{enzima}]		3,24E+07
Tempo de Produção (dias)		330
Qtdade de substrato necessária p/ gerar as celulases (base seca) - 80% de bagaço de cana-de-açúcar e 20% de farelo de trigo - [substrato]	ton/ano	2.160,49
	ton/dia	6,55
	ton/h	0,27
	kg/h	272,79

Produção de Inóculo no Reator de Inóculo - células vegetativas

Produção de esporos no laboratório (esporos/ton)		1,00E+15
Quantidade necessária para inoculação (esporos/ton) - [CPE]		1,00E+13
Tempo de Operação da planta (dias)		330
Qtdade de substrato p/ inocular (ton/ano) - [substrato]		2.160,49
Qtdade de esporos (esporos/ano) - [esp]		2,16E+16
Qtdade de substrato, no tanque de inóculo, necessária p/ gerar os esporos pretendidos - [substrato _{inóculo}]	ton/ano	4,32
	ton/dia	0,01
	ton/h	0,00
	kg/h	0,55
Concentração do meio (ton de meio/ton massa seca) - [CM _{CV}]		0,002

Premissas de Projeto

Mistura			Biorreator				Tanque de Inóculo				
Substrato	Umidade (%) - [u]	Porcentagem na mistura	Símbolo	Qtdade seca (ton/ano)	Qtdade seca (kg/h)	Qtdade úmida (kg/h)	Símbolo	Qtdade seca (ton/ano)	Qtdade seca (kg/h)	Qtdade úmida (kg/h)	
Bagaço de cana-de-açúcar tratado - [BCA]	[u _b]	8,45%	80,00%	[BCA _B]	1.728,40	218,23	238,37	-----	0,00	0,00	0,00
Farelo de trigo - [FT]	[u _f]	12,00%	20,00%	[FT _B]	427,78	54,01	61,38	[Meio _{prod}]	4,32	0,55	0,62
Água (para atingir 60% de umidade) - [m _{H2O}]	-----	-----	-----	[m _{H2O} (B)]	-----	-----	380,86	[m _{H2O} (I)]	-----	-----	0,74

Processo

	Base seca	Símbolo	Base úmida	
Substrato - farelo de trigo + bagaço de cana (kg/h)	272,24	[SB _{CV}]	299,75	Reator de fermentação
Inóculo (kg/h)	0,55	[Meio _{prod}]	0,62	
Água (kg/h) para atingir umidade de 60%	-----	[m _{H2O} (B)]	381,60	
Meio Fermentado (kg/h)	272,79	[SB _{CV, fermentado}]	681,97	
Substrato - farelo de trigo + bagaço de cana (kg/h)	0,55	[Meio _{prod}]	0,62	Reator de produção de inóculo
Água (kg/h) para atingir umidade de 60%	-----	[m _{H2O} (I)]	0,74	
Inóculo (kg/h)	0,55	[substrato inoculo medio (CV)]	1,36	

Figura B. 2 – Planilha de balanço de processo de produção da celulase com base nos dados da planilha da figura B.1.

Cálculo de Dimensionamento dos Equipamentos		
Tanque de Armazenamento de Farelo de Trigo		
Dados	Base Seca	Base Úmida
Tempo de Residência (h)	48	
Farelo Utilizado (kg/h) - [FT]	54,56	62,00
Volume Útil do Tanque (%)	90,00%	
Densidade Aparente do Farelo de Trigo (kg/m³) - [p _{FT} aparente]	74,10	
Capacidade (kg)	2.618,78	2.975,89
Capacidade (m³)	35,34	40,16
Volume Total do Tanque (m³) - [V _{TQ FT}]	39,27	44,62
Tanque de Armazenamento de Celulase		
Dados		
Tempo de Residência (h)	48	
Volume Útil do Tanque (%)	90,00%	
Densidade Aparente do Fermentado (kg/m³) - [p _{substrato} aparente]	590,00	
Vazão do Fermentado (m³/h) - [Q _{substrato}]	1,16	
Capacidade (m³)	55,48	
Volume Total do Tanque (m³) - [V _{TQ celulase}]	61,65	
Misturador do Bagaço de Cana e Farelo de Trigo		
Dados	Base Seca	Base Úmida
Bagaço Utilizado (kg/h)	272,79	300,37
Volume Usual (m³)	1,50	
Reator de Inóculo - células vegetativas		
Dados		
Ciclo de Fermentação (h) - [t _{crecimento}]	48	
Volume Útil do Tanque (%) - [Capacidade _{util}]	65,00%	
Densidade Aparente do Substrato (kg/m³) - [p _{substrato} aparente]	590,00	
Volume dos Reatores de Inóculo (m³) - [V _{determinado}]	1,00	
Vazão (m³/h) - [Q _{substrato inóculo}]	0,00	
Volume Útil dos Reatores de Inóculo (m³)	0,65	
Número de Reatores Necessários - [N ^o _{TQ inóculo}]	0	
Número de Reatores Necessários	2	
Reatores de fermentação		
Dados		
Ciclo de Fermentação (h) - [t _{fermentação}]	72	
Volume Útil dos Biorreatores (%) - [Capacidade _{util}]	65,00%	
Densidade Aparente do Substrato (kg/m³) - [p _{substrato} aparente]	590,00	
Volume do Biorreator (m³) - [V _{determinado}]	5,00	
Vazão (m³/h) - [Q _{substrato biorreator}]	1,16	
Volume Útil dos Biorreatores de Inóculo (m³)	3,25	
Número de Biorreatores Necessários - [N ^o _{TQ biorreator}]	26	
Número de Biorreatores Necessários	28	
Compressor		
Dados		
Taxa de Alimentação de Ar (mL/min.gms) - [T _{alimentação}]	5	
Quantidade de massa seca (ton)	19,71	
Vazão de ar no Compressor (m³/s) - [Q _{ar}]	1,64	
Vazão de ar no Compressor (ft³/min)	3.479,61	
Número de compressores de 1000 ft³/min - [N ^o _{compressores}]	3	

Figura B. 3 – Planilha de cálculo das capacidades dos tanques e do número de equipamentos necessários no processo.

Custos Variáveis

Matéria-prima

Matéria-prima	2008/2009 (US\$/ton)	2008/2009 (R\$/ton)
Farelo de Trigo	96,79	160,00
Bagaço de Cana Tratado	9,07	15,00
Água (R\$/m³)	0,45	0,75

Mão-de-obra de Operação

Equipamento	Quantidade de Equipamentos	Fator	Número de Operadores / Turno
Compressor	3	0,15	0,5
Reator	28	0,50	13,8
Tanque de Inóculo	2	0,50	1,1
Total de Número de Operadores por Turno			15

Operadores / Turno	15	Semanas / (Operador * Ano)	47
Horas / Operador	8	Horas / Semana	40
Dias / Ano	330	Horas / (Operador * Ano)	1.885,71
Turnos / Dia	3	Número Total de Operadores	65
Horas / Ano	122.257,81	Custo Anual (R\$/ano)	758.554,13
		Custo Anual (US\$/ano)	458.895,42

Câmbio1,653http://economia.uol.com.br/7/10/2010

Figura B. 4 – Planilha de cálculo do custo de mão-de-obra operacional e inserção de custo de matéria-prima.

Custo dos Equipamentos

Equipamentos	Capacidade		Descrição	Quantidade	Preço Unitário (US\$)	Total (US\$)
Reator de fermentação	5,00	m³	Reator em Aço Inox (345kPa), agitado e encamisado	28	64.483,63	1.783.525,88
Compressor	1.000,00	ft³/min	Air compressor	3	193.450,88	673.133,83
Misturador	0,08	kg/s	Pug mill extruder	1	51.586,90	51.586,90
Tanque de Armazenamento (Horizontal)	61,65	m³	Aço Inox	1	218.335,39	218.335,39
Tanque de Armazenamento de Farelo de Trigo	44,62	m³	Fixed roof	1	50.026,53	50.026,53
reator de Inóculo	1,00	m³	Reator em Aço Inox (345kPa), agitado e encamisado	2	25.793,45	55.990,25
					TOTAL (US\$)	2.832.598,79

Equação para Cálculo dos Equipamentos

$$\log_{10}C_p^0 = K_1 + K_2*\log_{10}(A) + K_3*[\log_{10}(A)]^2$$

Equipamentos	K ₁	K ₂	K ₃	Tamanho mínimo	Tamanho máximo	A	Preço (C _p ⁰)
Tanque de Armazenamento de Farelo de Trigo (m³)	4,8509	-0,3973	0,1445	90	30.000	45	38.790,10
Tanque de Armazenamento Horizontal (m³)	4,8509	-0,3973	0,1445	90	30.000	62	40.060,39

Correção 1

Equipamentos	B ₁	B ₂	F _M	F _P	C _{9M}
Tanque de Armazenamento Horizontal (m³)	1,4900	1,5200	1,8000	1,0000	169.295,2183

Equipamentos	Custo Unitário Atualizado	Preço Total Atualizado	Quantidade
Tanque de Armazenamento de Farelo de Trigo (m³)	50.026,5309	50.026,5309	1
Tanque de Armazenamento Horizontal (m³)	218.335,3949	218.335,3949	1

Figura B. 5 – Planilha de cálculo dos custos dos equipamentos no processo de produção de celulase e correções no custo conforme o ano de análise.

<u>Resumo Custos Variáveis</u>		
<u>Custos Operacional</u>		<u>Custo (US\$)</u>
<u>Custos Variáveis</u>		
Matéria-prima		64.659,58
Água		1.373,95
Mão-de-obra da Operação		470.661,97
Mão-de-obra da Supervisão	10% dos custos de mão-de-obra de operação	47.066,20
Utilidades	5% de custos de produção	185.501,93
Manutenção	7% do capital fixo de investimento	848.646,60
Encargos de Laboratório	15% dos custos de mão-de-obra de operação	70.599,30
Patentes e Royalties	3% dos custos de produção	111.301,16
<u>Custos Fixos</u>		
Depreciação	10% do capital fixo de investimento	1.212.352,28
Seguros	2% do capital fixo de investimento	242.470,46
Impostos Locais	1% do capital fixo de investimento	121.235,23
Custos Indiretos da Planta	60% dos custos de mão-de-obra total	310.636,90
<u>Despesas Gerais</u>		
Despesas Administrativas	20% dos custos de mão-de-obra da operação	94.132,39
<u>Custo Operacional Total</u>		3.780.637,94

Figura B. 6 – Planilha de estimativa de custo operacional total.

<u>Resumo dos Custos Fixos</u>		
<u>Custos de Investimento</u>	<u>Porcentagem dos custos dos equipamentos</u>	<u>Custo (US\$)</u>
<u>Custos Diretos</u>		
Aquisição de Equipamentos	100,00%	2.832.598,79
Instalação de Equipamentos Adquiridos	39,00%	1.104.713,53
Instrumentação e Controle	26,00%	736.475,68
Tubulação	31,00%	878.105,62
Sistemas Elétricos	10,00%	283.259,88
Instalações Prediais	29,00%	821.453,65
Melhorias da Área	12,00%	339.911,85
Service Facilities	55,00%	1.557.929,33
Sub-total	302,00%	8.554.448,34
<u>Custos Indiretos</u>		
Engenharia e Supervisão	32,00%	906.431,61
Despesas de Edificações	34,00%	963.083,59
Despesas Legais	4,00%	113.303,95
Taxas de contratos	19,00%	538.193,77
Contingências	37,00%	1.048.061,55
Sub-total	126,00%	3.569.074,47
<u>Capital Fixo de Investimento</u>	428,00%	12.123.522,81
<u>Mão-de-obra</u>	75,00%	2.124.449,09
<u>Capital de Investimento TOTAL</u>	503,00%	14.247.971,90

Figura B. 7 – Planilha de estimativa de custo de capital de investimento total.

Análise de Viabilidade Econômica

Fórmulas Utilizadas nos Cálculos

1) Receita gerada pela operação da planta:

Receita anual de vendas (\$/ano) = Σ[(preço unitário do produto)*(vendas)]

F = (1-i) x (S-E-D) + D = (1-i) x (S-E) + txD

F = Formação de caixa;	654678,3142	80068979,69	102646068,5	113895754,8	113818038,6	113740322,4	113662606,2	113584890	113507173,8	79447250,01	79369533,8
i = Imposto de renda federal (% sobre o lucro);	30,00%	30,00%	30,00%	30,00%	30,00%	30,00%	30,00%	30,00%	30,00%	30,00%	30,00%
S = Receitas no período;	0,00	127.033.389,58	163.328.643,75	181.476.270,83	181.476.270,83	181.476.270,83	181.476.270,83	181.476.270,83	181.476.270,83	127.033.389,58	127.033.389,58
E = Despesas que envolvem desembolso de caixa;	0,00	13.759.364,45	17.690.611,44	19.656.234,93	19.656.234,93	19.656.234,93	19.656.234,93	19.656.234,93	19.656.234,93	13.759.364,45	13.759.364,45
D = Valor anual da depreciação.	2.849.594,38	2.590.540,35	2.331.486,31	2.072.432,28	1.813.378,24	1.554.324,21	1.295.270,17	1.036.216,14	777.162,10	518.108,07	259.054,03

2) Depreciação

D = FIC x (n+1-y) / (n/2) x (n+1)

d = Depreciação	2.849.594,38	2.590.540,35	2.331.486,31	2.072.432,28	1.813.378,24	1.554.324,21	1.295.270,17	1.036.216,14	777.162,10	518.108,07	259.054,03
FIC = Valor fixo do investimento	14.247.971,90	14.247.971,90	14.247.971,90	14.247.971,90	14.247.971,90	14.247.971,90	14.247.971,90	14.247.971,90	14.247.971,90	14.247.971,90	14.247.971,90
n = vida útil a ser depreciada (anos)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
y = período anual	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Preço Inicial Adotado (US\$/ton)	6480,00	1,15
Preço Inicial Adotado (US\$/FPU)	50,00	

Aproveitamento da capacidade da planta	Período Anual	Produção anual (ton/ano)	Receitas líquidas (US\$/ano)	Custos operacionais (US\$/ano)	EBITDA (US\$/ano)	Custo do produto (US\$/ton) unidade considerada	Custo do produto (US\$/100.000 FPU)
0%	-2	0,00	0,00	0,00	0,00	-----	-----
0%	-1	0,00	0,00	0,00	0,00	-----	-----
0%	0	0,00	0,00	0,00	0,00	-----	-----
70%	1	3.780,86	24.500.000,00	2.646.446,56	21.853.553,44	699,96	5,40
90%	2	4.861,11	31.500.000,00	3.402.574,15	28.097.425,85	699,96	5,40
100%	3	5.401,23	35.000.000,00	3.780.637,94	31.219.362,06	699,96	5,40
100%	4	5.401,23	35.000.000,00	3.780.637,94	31.219.362,06	699,96	5,40
100%	5	5.401,23	35.000.000,00	3.780.637,94	31.219.362,06	699,96	5,40
100%	6	5.401,23	35.000.000,00	3.780.637,94	31.219.362,06	699,96	5,40
100%	7	5.401,23	35.000.000,00	3.780.637,94	31.219.362,06	699,96	5,40
100%	8	5.401,23	35.000.000,00	3.780.637,94	31.219.362,06	699,96	5,40
70%	9	3.780,86	24.500.000,00	2.646.446,56	21.853.553,44	699,96	5,40
70%	10	3.780,86	24.500.000,00	2.646.446,56	21.853.553,44	699,96	5,40

Informações adicionais:			
32.400.000,00	FPU/ton massa seca		
1	tonelada de massa úmida	0,4	ton de massa seca
2,5	tonelada de massa úmida	1	ton de massa seca
Dessa maneira:			
2,5	tonelada de massa úmida	32.400.000,00	
1	tonelada de massa úmida	12.960.000,00	

Continuação...

3) Amortização e Juros

Cálculo de Amortização - Tabela Price

taxa

6,25%

Prestação Constante					
<i>Período Anual</i>	<i>Juros</i>	<i>Prestação</i>	<i>Amortização</i>	<i>Saldo Devedor</i>	<i>Base de Cálculo para o próximo ano</i>
-2	0,00	0,00	0,00	14.247.971,90	15.138.470,15
-1	890.498,24	1.722.825,17	832.326,92	13.415.644,98	14.254.122,79
0	838.477,81	1.722.825,17	884.347,35	12.531.297,63	13.314.503,73
1	783.206,10	1.722.825,17	939.619,06	11.591.678,56	12.316.158,47
2	724.479,91	1.722.825,17	998.345,26	10.593.333,31	11.255.416,64
3	662.083,33	1.722.825,17	1.060.741,83	9.532.591,47	10.128.378,44
4	595.786,97	1.722.825,17	1.127.038,20	8.405.553,27	8.930.900,35
5	525.347,08	1.722.825,17	1.197.478,09	7.208.075,19	7.658.579,88
6	450.504,70	1.722.825,17	1.272.320,47	5.935.754,72	6.306.739,39
7	370.984,67	1.722.825,17	1.351.840,50	4.583.914,22	4.870.408,86
8	286.494,64	1.722.825,17	1.436.330,53	3.147.583,69	3.344.307,68
9	196.723,98	1.722.825,17	1.526.101,19	1.621.482,51	1.722.825,17
10	101.342,66	1.722.825,17	1.621.482,51	0,00	0,00
TOTAL	6.425.930,09	20.673.901,99	14.247.971,90		

Despesas Financeiras e Impostos					
<i>Período Anual</i>	<i>Investimentos</i>	<i>Depreciação</i>	<i>Amortização</i>	<i>Lucro Líquido antes do imposto de renda</i>	<i>IR (%)</i>
-2	284.959,44	0,00	0,00	-284.959,44	0,00%
-1	9.118.702,02	0,00	2.077.829,24	-11.196.531,25	0,00%
0	4.844.310,45	0,00	2.003.621,05	-6.847.931,50	0,00%
1	0,00	2.590.540,35	1.929.412,86	17.333.600,23	30,00%
2	0,00	2.331.486,31	1.855.204,67	23.910.734,87	30,00%
3	0,00	2.072.432,28	1.780.996,49	27.365.933,30	30,00%
4	0,00	1.813.378,24	1.706.788,30	27.699.195,52	30,00%
5	0,00	1.554.324,21	1.632.580,11	28.032.457,74	30,00%
6	0,00	1.295.270,17	1.558.371,93	28.365.719,96	30,00%
7	0,00	1.036.216,14	1.484.163,74	28.698.982,18	30,00%
8	0,00	777.162,10	1.409.955,55	29.032.244,40	30,00%
9	0,00	518.108,07	1.335.747,37	19.999.698,01	30,00%
10	0,00	259.054,03	1.261.539,18	20.332.960,23	30,00%

Continua...

Continuação...

Figura B. 8 - Planilha para análise de viabilidade econômica, com cálculos de Receita, EBTIDA, custo de produção, Investimento, Depreciação, Impostos, Amortização, Valor Presente Líquido, Taxa Interna de Retorno, Fluxo de Caixa e "Pay-back".