

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**PROPOSTA DE PROCESSOS QUÍMICOS PARA MELHOR RECUPERAÇÃO  
DE HIDROCARBONETO DE ALTO VALOR AGREGADO DE UMA  
INDÚSTRIA DE BIOTECNOLOGIA**

**Renato Franco de Camargo Bento**

Trabalho de Graduação apresentado ao  
Departamento de Engenharia Química  
da Universidade Federal de São Carlos

Orientador DEQ: Prof. Paulo Waldir Tardioli

Orientador Externo: Eduardo Bruno Lopes

São Carlos – SP

2021

## **BANCA EXAMINADORA**

Trabalho de Graduação apresentado no dia 08 de abril de 2021 perante a seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Paulo Waldir Tardioli, DEQ/UFSCar

Convidado: Prof. João Paulo Silva Queiroz, DEQ/UFSCar

Professor da Disciplina: Rosineide Gomes da Silva Cruz, DEQ/UFSCar

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Pai Celestial por ter me acompanhado nos caminhos que decidi percorrer e abençoado todas minhas conquistas.

Aos meus pais, Edson e Nilsa, e ao meu irmão José Luiz, por tudo: pelo carinho, afeto, apoio, oportunidades e paciência. Obrigado por nunca duvidarem de mim, por serem exemplos a ser seguido, por me mostrarem sempre o que é certo e errado e que a educação é o principal meio para transformar nosso mundo para melhor.

Agradeço a todos os profissionais da educação que tive o prazer de ter contato até o momento e que contribuíram com a minha formação, em especial aos professores do ensino médio Ricardo e Sabino (Matemática), Basílio (Física) e Matheus (Biologia), amigos e exemplo de pessoas que somaram muito para meu crescimento pessoal e para minhas escolhas.

Serei eternamente grato à EQ Júnior - Consultoria e Projetos, empresa júnior de engenharia química da UFSCar e a todo o Movimento Empresa Júnior. Ao professor Dr. Paulo Tardioli, orientador de minha iniciação científica, e a todo o Laboratório de Engenharia de Processos Enzimáticos II: Ana Carolina, Ediane, Laiane, Leticia, Rafael e Renato. Obrigado por me permitir vivenciar e aprender o que não tive oportunidade em sala de aula.

Agradeço a todos os integrantes que fazem parte da história da República “Copacabana”: Caio, Felipe Galimberti, Felipe González, Gabriel Bazzo, Gabriel Peliteiro, Jair, João Pedro, Luis Augusto e Pedro, pela irmandade, anos de convívio, e por tornarem a graduação mais prazerosa.

Agradeço aos meus gestores de estágio Bruna Poli e Eduardo Lopes por todo o exemplo de humildade, liderança e comprometimento. Muito obrigado pela amizade, oportunidades e aprendizagens, que definitivamente têm contribuído para minha formação pessoal e profissional.

Por fim, a todos meus familiares, a banda “Os Pinguins”, ao Capítulo “Filhos da Luz”, a amigos e conhecidos, por fazerem de mim quem sou hoje: muito obrigado!

## RESUMO

A indústria biotecnológica estudada produz um hidrocarboneto ramificado de cadeias longas como um de seus principais produtos de alto valor agregado e precursor de vários produtos químicos de interesse comercial. Esse hidrocarboneto é produzido por respiração aeróbica de um microrganismo geneticamente modificado, e parte dele é perdida durante a etapa de purificação. A fração do bioproduto perdida nas etapas *downstream*, se recuperada, poderia impactar positivamente no rendimento global do bioprocessamento e, por conseguinte, na lucratividade da empresa. Neste contexto, esse trabalho teve por objetivo avaliar as características das correntes efluentes das etapas de recuperação e purificação do hidrocarboneto (óleo) e, a partir da quantificação da sua concentração nessas correntes e da sua forma de associação com os demais subprodutos, propor alternativas para a sua recuperação e reaproveitamento. Para esse estudo, foram utilizados os dados de produção industrial de 2020, e a análise estatística dos dados quantitativos das correntes efluentes identificou dois pontos importantes de perdas do óleo. A primeira perda ocorre na etapa de separação das células do caldo fermentado (etapa de separação 1), em que 4,21% do hidrocarboneto produzido é perdido, ou por emulsificação com a vinhaça ou por associação interna com as células microbianas. A segunda perda ocorre na separação das fases oleosa e aquosa (etapa de separação 2), em que aproximadamente 12% do hidrocarboneto alimentado é perdido, ou por emulsificação com a fase aquosa ou por emulsificação com células mortas ainda presentes na corrente de alimentação (< 1%). A partir desse levantamento, propõe-se que as células sejam separadas (etapa 1) por uma filtração de fluxo cruzado ou centrifugação, seguida do rompimento celular por homogeneização de alta pressão para a extração do óleo, auxiliada por um solvente orgânico apolar. Para a etapa de separação 2, propõe-se a separação das células, remanescentes da etapa 1, por filtração de fluxo cruzado ou filtrações em série utilizando membranas com poros de tamanhos adequados. O filtrado, majoritariamente contendo uma fase aquosa, seria então enviado a uma coluna de extração líquido-líquido para a separação da fase oleosa. Alternativamente, se a corrente de alimentação da etapa de separação 2 contiver menos óleo emulsificado, a recuperação do óleo poderia dar-se por evaporações em estágios a baixas pressões para a evaporação da água (primeiro estágio) e do óleo (segundo estágio), restando ao final no evaporador os sólidos. Conclui-se, portanto, que as etapas de *downstream* da indústria estudada poderiam ser modificadas para a recuperação das

frações perdidas do produto de interesse, aumentando-se assim o rendimento global do processo. Entretanto, as propostas de modificações requerem estudos futuros de viabilidade econômica e pureza requerida ( $> 97\%$ ) do produto final pelo mercado consumidor para a tomada de decisões.

## ABSTRACT

The biotechnology industry studied produces a long-chain branched hydrocarbon as one of its main products with high added value and precursor to various chemicals of commercial interest. This hydrocarbon is produced by aerobic respiration of a genetically modified microorganism, and part of the target product during the purification step. The fraction of the bioproduct lost in the downstream step, if recovered, could have a positive impact on the overall bioprocess performance and, therefore, on the company's profitability. This work proposes to evaluate the characteristics of the effluent streams of the hydrocarbon (oil) recovery and purification steps, based on the quantification of their concentration in these streams and their association form with the other by-products, to propose alternatives for its recovery. The industrial production data from 2020 were used for this study, and the statistical analysis of the quantitative data of the effluent stream identified two important point of oil losses. The first one occurs in the fermentation broth cell separation step (separation step 1), which 4.21% of the hydrocarbon is lost either by emulsification with vinasse or by microbial cells internal association. The second one occurs in the oil/water separation phase (separation step 2), which approximately 12% of the hydrocarbon fed is lost either by emulsification with the aqueous phase or by emulsification with dead cells still present in the feed stream (<1%). From ~~the~~<sup>this</sup> study, it is proposed that cells be separated (step 1) by cross-flow filtration or centrifugation, followed by cell disruption by high pressure homogenization for oil extraction aided by an apolar organic solvent. For the separation step 2, it is proposed to separate the cells remaining from step 1 by cross-flow filtration or by series membrane filtration with appropriate sized pores. then the filtrate, mostly containing an aqueous phase would be sent to a liquid-liquid extraction column for the separation of the oil phase. As an alternative, if the separation step 2 feed stream contains less emulsified oil, it could be recovered by evaporations in steps at low pressures for water evaporation (first step) and oil evaporation (second step), remaining the solids in the evaporator. It is concluded the downstream steps of the studied industry could be modified to increasing the overall yield of the process by recovering the lost fraction of the interested product. However, the modification proposed requires future studies of economic viability and process capability to achieve the final product required purity (>97%) to decision making.

## SUMÁRIO

Banca examinadora.....	2
Agradecimento.....	3
Resumo.....	4
Abstract.....	6
Lista de Figuras.....	8
Lista de Tabelas e Quadros.....	9
Nomenclatura.....	10
1. Introdução e Objetivos.....	11
2. Fundamentação.....	13
2.1. A Unidade Industrial de estudo.....	13
2.2. Descrição do Processo Produtivo.....	13
2.2.1. Esterilidade da Planta Industrial.....	14
2.2.2. Processo de <i>Upstream</i> .....	19
2.2.3. Processo Produtivo.....	21
2.2.4. Processo de <i>Downstream</i> .....	23
2.3. Alternativas de Recuperação do Produto Final.....	25
2.3.1. Centrifugação.....	26
2.3.2. Filtração.....	26
2.3.3. Filtração com Fluxo Cruzado.....	27
2.3.4. Extração por Solvente.....	28
2.3.5. Evaporação.....	29
2.3.6. Cristalização.....	29
2.3.7. Ruptura Celular.....	30
3. Materiais e Métodos.....	31
4. Resultados Obtidos.....	31
4.1. Etapa de Separação 1.....	31
4.2. Etapa de Separação 2.....	33
4.3. Impacto de Contaminação no Processo de <i>Downstream</i> .....	34
4.4. Proposta de Recuperação do Óleo Perdido em <i>Downstream</i> .....	35
4.4.1. Recuperação Etapa de Separação 1.....	35
4.4.2. Recuperação Etapa de Separação 2.....	39
5. Conclusões e Sugestões.....	41
Revisão Bibliográfica.....	42

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxo simplificado do processo produtivo instalação industrial estudada	14
Figura 2	Métodos de esterilização	16
Figura 3	Efeitos da esterilização e da temperatura no Fator de Del	17
Figura 4(a)	Efeito do tempo de esterilização no rendimento da etapa de fermentação subsequente.	18
Figura 4(b)	Efeito da Energia de ativação de esporos de microrganismos e da destruição da quantidade dos nutrientes	18
Figura 5	Processo simplificado de <i>upstream</i> da instalação industrial estudada	19
Figura 6	Fluxograma de um processo de esterilização térmica contínua UHT com injeção de vapor	20
Figura 7	Fluxograma simplificado do processo de fermentação instalação industrial estudada	21
Figura 8	Ilustração dos períodos da curva de crescimento de microrganismos na etapa de fermentação	22
Figura 9	Fluxograma simplificado do processo de <i>Downstream</i> instalação industrial estudada	24
Figura 10	Operação de filtração direta e de fluxo cruzado	27
Figura 11	Exemplos de extratores não-agitados	29
Figura 12	Análise de capilar da vinhaça produzida pela etapa de separação 1	31
Figura 13	Rendimento diário da campanha de 2020 da etapa de separação 1	32
Figura 14	Análise de capilar da vinhaça produzida pela etapa de separação 2	33
Figura 15	Rendimento diário da campanha de 2020 da etapa de separação 2	33
Figura 16	Proposta do fluxo de processo para recuperação do produto de interesse a partir da corrente de descarte da primeira etapa de separação	38
Figura 17	Proposta do fluxo de processo para recuperação do produto de interesse a partir da corrente de descarte da segunda etapa de separação	40



## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Efeito da tempo de esterilização à uma temperatura de 121°C na concentração final de glicose	18
Tabela 2	Correlação entre temperatura (°C) e tempo de residência (s) para se atingir um fator de Del de 45,7	21
Tabela 3	Espectro de separação de filtração com fluxo cruzado	28
Tabela 4	Comparação de filtração de fluxo cruzada com as demais tecnologias	36

## NOMENCLATURA

CIP	<i>Clean in place</i>
SIP	<i>Sterilization in place</i>
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
OGM	Organismo Geneticamente Modificado

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A grande vantagem da utilização de microrganismos na indústria é a possibilidade de obtenção de biomoléculas de interesse comercial e alto valor agregado a partir de seu metabolismo celular. Nos últimos anos, sustentabilidade e mudanças climáticas são temas de grande preocupação e constante debate nas esferas públicas e privadas, e a utilização de recursos renováveis para a obtenção de produtos químicos com alto valor agregado e combustíveis têm ganhado atenção (LIAN *et al*, 2018).

Nesse sentido, microrganismos selvagens e modificados geneticamente são largamente explorados como agentes de produção de biomoléculas de interesse via homeostase de suas rotas metabólicas. A engenharia metabólica é a ciência que, através de uma atuação na genética do microrganismo, permite manipular a taxa de conversão e a produtividade da biomolécula alvo, modificar a aceitação do microrganismo por um substrato específico, produzir compostos que naturalmente não fazem parte da rota metabólica do microrganismo, modificar as propriedades celulares e até a tolerância a compostos estressantes ao metabolismo celular (LIAN *et al*, 2018).

Além do desenvolvimento da rota de produção de um produto de interesse por rota metabólica de um microrganismo específico, seja ele modificado geneticamente ou não, a etapa de recuperação/enriquecimento do produto principal é tão importante quanto o rendimento e produtividade do processo biotecnológico, uma vez que concentrar produtos impuros e diluídos, como geralmente são formados em processo com essa característica, pode ser o principal desafio para tornar a rota de produção renovável viável em escala industrial (CUELLAR, 2020).

A etapa de recuperação, conhecida como *downstream*, de um processo biotecnológico se inicia no instante do processo em que o microrganismo utilizado não precisa ser mais mantido vivo e passa a ser considerado material residual, e é entendida como um conjunto de operações unitárias que consideram os parâmetros químicos e físicos do processo para o enriquecimento do produto de interesse. Uma vez que os produtos de interesse são misturados com outros de propriedades muito diferentes, os processos industriais baseados em metabolismo celular são de grande complexidade. Assim, a separação ocorre de maneira gradual, de acordo com propriedades físicas e químicas, e posteriormente, por diferença de natureza dos compostos cada vez mais delicada, até que se atinja a especificação de pureza do produto final (GOTTSCHALK, 2011).

A primeira etapa de *downstream* é conhecida como colheita (*harvesting*) e objetiva a separação de todo o material biológico da corrente principal. A segunda etapa é conhecida como clarificação, entendido como o processo de remoção de produtos indesejados em grande volume. Caso o produto de interesse seja secretado no meio de cultura, essa etapa pode ser integrada à colheita, e caso seja intracelular, compreende a ruptura celular e remoção de contaminantes. Por fim, as etapas de refino são conhecidas como captura e polimento. A primeira compreende a ligação entre um ligante específico e seletivo com o produto de interesse, sendo os contaminantes descartados, e a segunda, o oposto, ou seja, contaminantes são capturados e o produto de interesse liberado no fluxo do processo (GOTTSCHALK, 2011).

A etapa de *Downstream* podem representar entre 50 e 90% do custo total do processo de produção, e depende de diversos fatores para apresentar a melhor combinação de operações que tornam o processo produtivo viável: é totalmente dependente da etapa de fermentação, uma vez que a natureza do microrganismo, do substrato e do processo utilizado podem interferir na escolha dos equipamentos, assim como o produto de interesse (intra ou extracelular), suas propriedades químicas e físicas, e sua aplicação, ou seja, grau de pureza (PAIS *et al.*, 2016)

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar as características de correntes não reaproveitadas de um processo de recuperação/enriquecimento (*downstream*) de um hidrocarboneto de cadeia longa e ramificada de alto valor agregado, produzido por um processo fermentativo de uma indústria de biotecnologia que utiliza um microrganismo geneticamente modificado e xarope de cana-de-açúcar como substrato. Nesse sentido, esse trabalho visa propor alternativas de recuperação do bioproduto a fim de se minimizar perdas e, portanto, contribuir para melhorar a produtividade do processo.

## 2. FUNDAMENTAÇÃO

### 2.1. A Unidade Industrial de estudo

A indústria de biotecnologia estudada pertence a uma multinacional líder nas áreas de saúde, nutrição e vida sustentável. Na América Latina atua nas áreas de produtos nutricionais, nutrição e saúde humana e animal, alimentos e bebidas, cuidados pessoais, materiais de proteção, plásticos de engenharia e produtos e serviços de base biológica.

Pertencendo anteriormente à uma startup americana cuja missão é produzir moléculas personalizadas a partir de fontes renováveis de carbono através de engenharia genética, a instalação industrial, localizada em um complexo industrial no interior do estado de São Paulo, foi adquirida em 2017 e opera com processos biotecnológicos fermentativos, tendo o xarope de cana-de-açúcar como substrato para o cultivo de microrganismos geneticamente modificados.

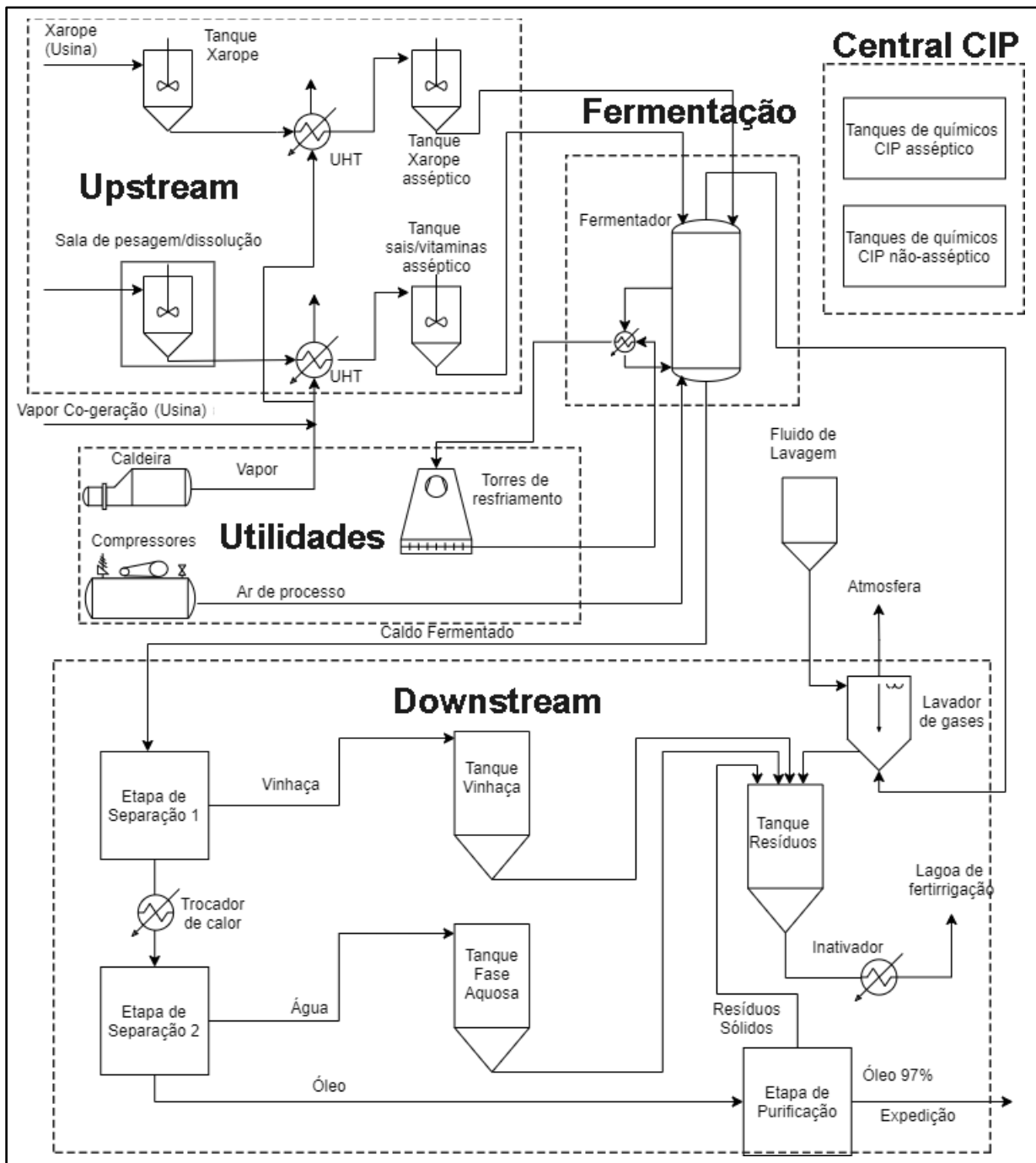
### 2.2. Descrição do processo

O principal produto produzido é um hidrocarboneto de cadeia longa e ramificada, com alto potencial redutor e de alto valor de mercado, sendo precursor de adesivos, fragrâncias, surfactantes, estabilizadores, resinas, revestimentos, selantes, emulsificantes, vitaminas, oligômeros e polímeros.

Por se tratar de um processo biotecnológico, o qual é centralizado no metabolismo de um microrganismo geneticamente modificado, outros microrganismos presentes em meio externo são capazes de contaminar o meio fermentativo. Dessa forma, a instalação industrial tem infraestrutura e procedimentos para garantir a esterilidade do interior dos equipamentos e do meio reacional, fator de muita importância para garantir o sucesso da produção de uma empresa de biotecnologia (KUMAR *et al.*, 2021)

Dessa forma, pode-se dizer que a planta industrial tem seu processo produtivo baseado em quatro pilares: esterilidade da planta, *upstream*, fermentação e *downstream* (Figura 1). A biomolécula alvo é obtida ao final da cadeia produtiva (Figura 1) com uma pureza de 95-97%, dependendo das demandas de exportação.

Figura 1 - Fluxo simplificado do processo produtivo da instalação industrial estudada



Fonte: Acervo pessoal

### 2.2.1. Esterilidade da planta

O tempo para a esterilização em uma escala industrial é entre 3 e 6 horas de duração. Para a limpeza das linhas e equipamentos utiliza-se a tecnologia CIP (*clean-in-place*), a qual é

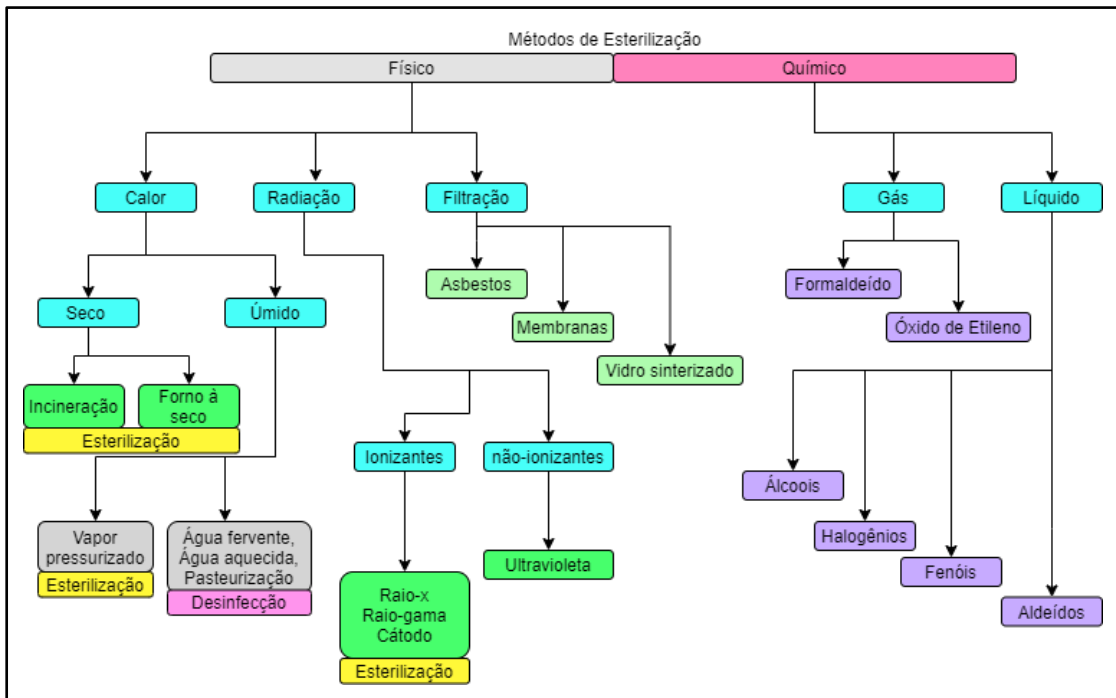
muito utilizada em sistemas fechados em indústrias de alimentos processados, bebidas, laticínios, cosmética e produtos farmacêuticos. Esse procedimento deve garantir a remoção de substâncias que possam incrustar no interior dos equipamentos, as quais podem reduzir sua eficiência, causar entupimentos e contribuir fortemente com contaminações (LI *et al.*, 2019).

Um procedimento de CIP será eficiente se satisfizer parâmetros fundamentais, tais como, tempo suficiente de recirculação das soluções utilizadas; temperatura ótima de operação (temperaturas baixas podem contribuir com ocorrência de sedimentação gravitacional dos particulados limpos devido redução de solubilidade dos mesmos no meio, e temperaturas altas podem contribuir para a mistura intensa entre as partículas suspensas e a solução, esta última adquirindo característica coloidal e perdendo sua eficiência); turbulência do fluido de limpeza para aumentar o atrito entre solução e incrustação, a qual pode ser obtida com alta velocidade de escoamento do fluido ( $Reynolds > 10.000$ ), natureza e concentração da solução química utilizada (PIEPIÓRKA-STEPUK *et al.*, 2019).

O CIP realizado nos equipamentos industriais obedece às seguintes etapas: enxágue com água quente, seguido de recirculação com solução de hidróxido de sódio, enxágue com água quente, recirculação com solução de ácido nítrico e enxague com água quente. Para a limpeza interna de todos os equipamentos que necessitam ser estéreis (*upstream* e fermentação), utiliza-se uma central de tanques químicos dedicada aos mesmos. As etapas de separação, recuperação e purificação do produto de interesse (*downstream*) não requerem assepsia de linha e equipamentos, dessa forma, há uma segunda central de produtos químicos, segregada da primeira mencionada, dedicada apenas a limpeza interna dos equipamentos e tubulações que compõem essa etapa, evitando incrustações e garantindo operabilidade dos mesmos.

O meio estéril pode ser garantido de diversas maneiras, as quais podem ser combinadas ou não. Dentre os diferentes métodos de esterilização (Figura 2), destacam-se métodos que utilizam calor, produtos químicos, irradiação, alta pressão e filtração (ou secagem a quente), irradiação ultravioleta e gases esterilizantes (KUMAR *et al.*, 2021).

Figura 2 - Métodos e mecanismos de esterilização



Fonte: Adaptado de MOONDA *et al.*, 2018

Para garantir que todo o processo fermentativo esteja estéril, para maior produtividade dos fermentadores, é necessário que o xarope de cana-de-açúcar (substrato) e todo o meio de cultura dos fermentadores (solução de sais, vitaminas e metais) estejam assépticos, toda a linha de *upstream* e de transferência e os fermentadores estejam limpos e esterilizados antes de cada inoculação, e mantidos protegidos de qualquer contaminação proveniente do meio-ambiente durante operação.

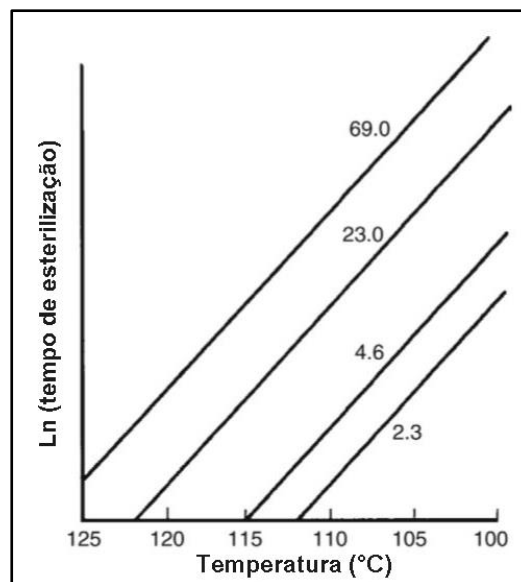
Conforme já comentado e ilustrado na Figura 2, as tecnologias de esterilização diferem quanto a seus métodos, e podem ser macro-classificadas como métodos físicos e químicos. Segundo RIFNA *et al.* (2019), as novas tecnologias de esterilização (radiação, filtração e métodos químicos) promovem a maior preservação das qualidades de nutrientes em comparação com os métodos térmicos tradicionais utilizando calor, porém a ciência ainda carece de estudos mais aprofundados para o aumento de escala a nível industrial para suas aplicações de modo que seja viável em termos financeiros e de processo. Para a assepsia de matéria-prima, meio de cultura, interior das tubulações e dos fermentadores, utiliza-se na planta industrial a inativação térmica dos microrganismos com vapor saturado, o método mais convencional, capaz de inativar microrganismos, enzimas e constituintes fundamentais de células, caso satisfaça condições adequadas de tempo de exposição e quantidade de energia térmica (MOONDA *et al.*, 2018).



A Figura 3, mostra que o mesmo grau de esterilidade (chamado de Fator de Del, logaritmo natural da razão entre microrganismos viáveis no início da etapa de esterilização e microrganismos viáveis após o período de tratamento) pode ser atingido variando tempo e temperatura (cujo eixo é representado de maneira decrescente) do processo. O mesmo resultado com processo em alta temperaturas e período curto pode também ser atingido com temperatura mais amena compensada com período estendido (STANBURY, WHITAKER E HALL, 2017).

Apesar do Fator de Del poder ser obtido por diversas combinações de temperatura e tempo de tratamento, no que diz respeito à matéria-prima e meio de cultura, deve-se levar em consideração a degradação dos mesmos quando submetidos ao processo de esterilização. Vitaminas, aminoácidos e proteínas podem ser degradados a depender do tempo de exposição e da carga térmica, reduzindo a qualidade dos nutrientes e promovendo a degradação de matéria-prima, favorecendo o acúmulo de compostos que podem inibir o crescimento do microrganismo utilizado no processo industrial (STANBURY, WHITAKER E HALL, 2017).

Figura 3 - Efeito da esterilização e da temperatura para Fator de Del de 69.0, 23.3, 4.6 e 2.3

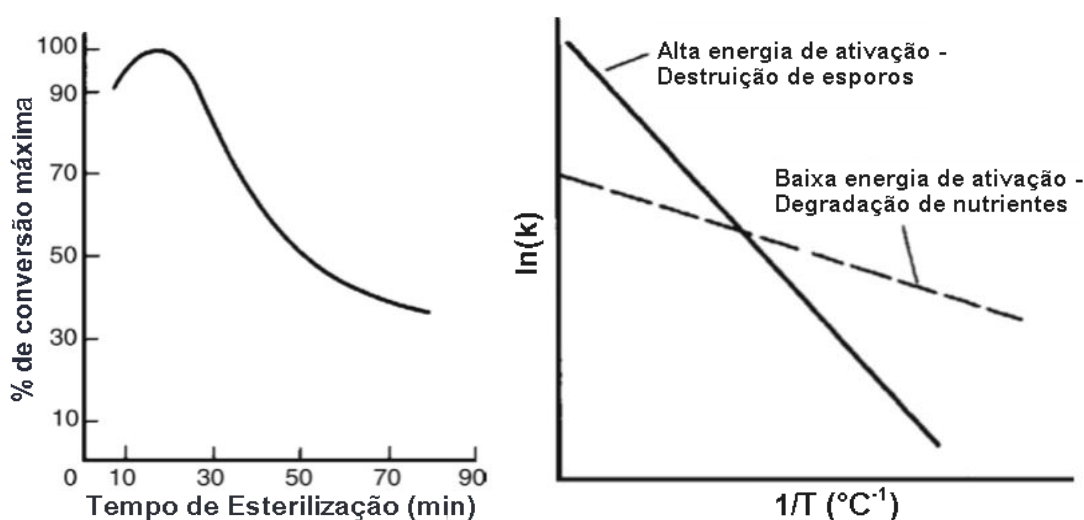


Fonte: Adaptado de STANBURY, WHITAKER E HALL (2017)

Na Figura 4(a), apresenta-se o efeito do tempo de esterilização na degradação do meio de cultura, refletida no rendimento do produto da fermentação subsequente à esterilização, e na Figura 4(b), o efeito da temperatura na energia de ativação para destruição de esporos de microrganismos contaminantes e para a destruição de nutrientes essenciais do meio de cultura. Complementarmente, apresenta-se na Tabela 1 o efeito do tempo de esterilização de um meio

contendo licor de milho à temperatura de 121°C na porcentagem final de glicose remanescente, sugerindo que para uma mesma temperatura, quanto maior o tempo do processo de esterilização, maior será o grau de degradação do substrato.

Figura 4 (a) - Efeito do tempo de esterilização no rendimento da etapa de fermentação subsequente. (b) Efeito da energia de ativação de esporos de microrganismos e da destruição da qualidade dos nutrientes.



Fonte: Adaptado de STANBURY, WHITAKER E HALL (2017)

Tabela 1 - Efeito do tempo de esterilização à temperatura de 121°C na concentração final de glicose

Tempo a 121°C (min)	Quantidade adicionada de glicose remanescente (%)
60	35
40	46
30	64

Fonte: Adaptado de STANBURY, WHITAKER E HALL (2017)

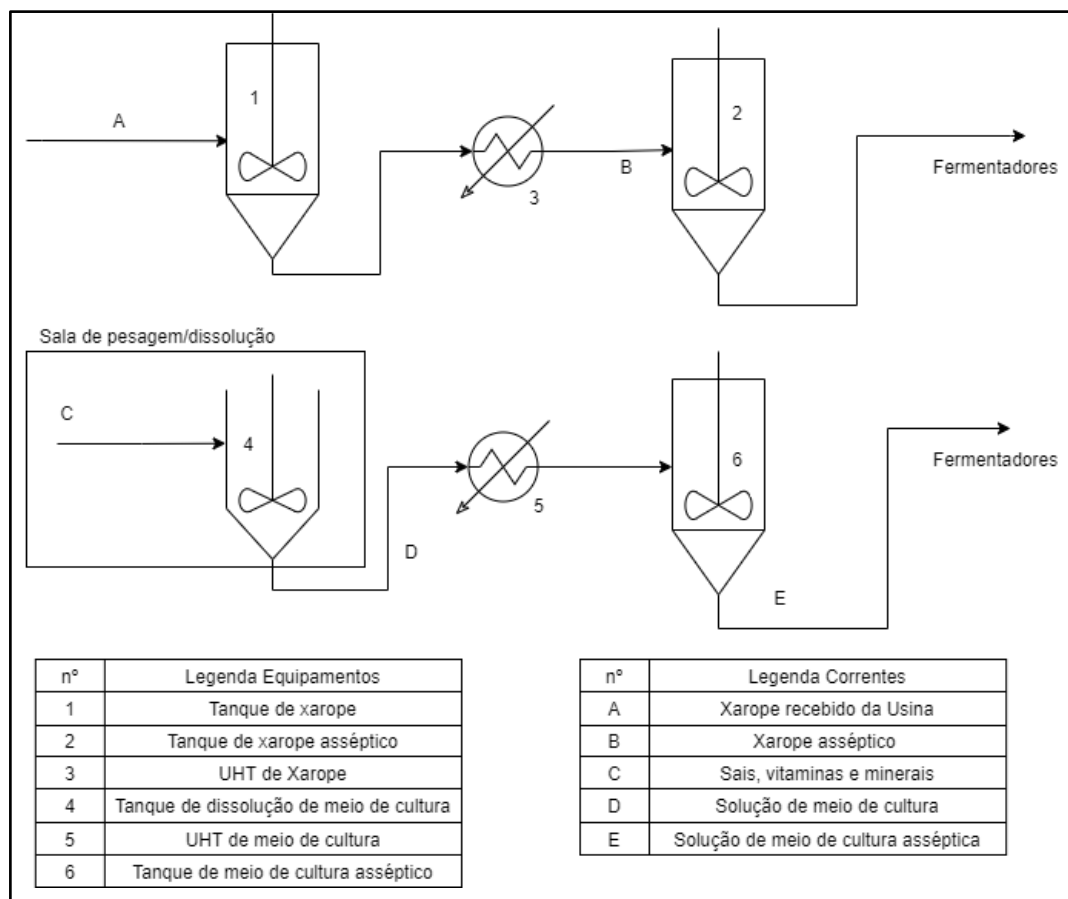
Dessa forma, para esterilidade do interior de equipamentos e tubulação, utiliza-se injeção de vapor saturado, até que temperatura de tanques, válvulas e tubulação atinjam 120°C para iniciar a contagem do processo de esterilização, que pode variar de 30-90 minutos, a depender do tamanho do tanque a ser esterilizado. No que diz respeito à esterilização de matéria-prima e nutrientes, utiliza-se da tecnologia UHT (*ultra-high-temperature*), ao injetar

diretamente vapor saturado (pressão de 3 bar) à solução para que haja a garantia que sua temperatura se eleve rapidamente à temperatura alvo, a solução permaneça tempo suficiente para garantir total esterilização, e então resfriada rapidamente, evitando assim, cenários de degradação do xarope de cana-de-açúcar, de vitaminas e nutrientes.

### 2.2.2. Processo de *Upstream*

Corresponde ao recebimento e esterilização da matéria-prima (xarope de cana-de-açúcar), dissolução de vitaminas, sais e minerais para o preparo e posterior esterilização de todo o meio de cultura para que a fermentação aconteça em condições favoráveis ao microrganismo geneticamente modificado. O fluxograma simplificado da etapa de *upstream* é apresentado na Figura 5.

Figura 5 - Processo simplificado de *upstream* da instalação industrial estudada

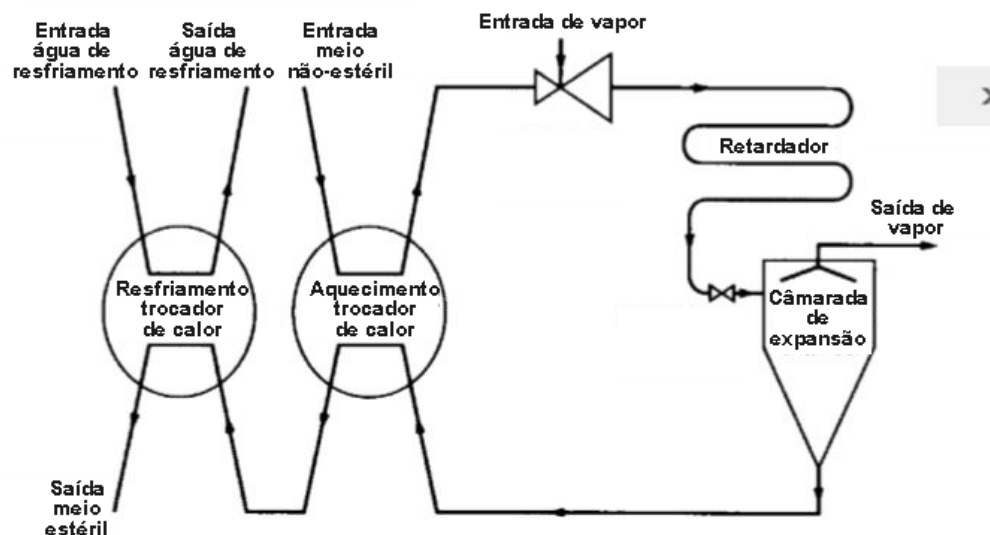


Fonte: Acervo pessoal

A instalação industrial estudada situa-se estrategicamente ao lado de uma usina dedicada à produção de açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar, a qual fornece à empresa estudada o xarope de cana-de-açúcar, o qual é armazenado no Tanque de Xarope, alimentando um sistema UHT dedicado para sua esterilização, e armazenado posteriormente em Tanque de Xarope Asséptico, pronto para alimentar os fermentadores. Paralelamente na etapa de *upstream*, há a sala de dissolução, onde operadores dissolvem vitaminas, sais e minerais que compõem os nutrientes do meio de cultura dos fermentadores em um tanque de dissolução. Dessa forma, o meio de cultura preparado é enviado a um sistema UHT dedicado para a esterilização dos nutrientes, armazenado posteriormente em um tanque de nutrientes e enviado aos fermentadores para serem inoculados.

A Figura 6 representa o funcionamento do sistema UHT, tanto para esterilização do xarope de cana-de-açúcar quanto para a receita de nutrientes. O meio não-asséptico é pré-aquecido em um trocador de calor pelo meio asséptico, havendo uma regeneração energética do processo, e posteriormente aquecido à temperatura de esterilização por injeção direta de vapor. Posteriormente, o meio aquecido percorre um retardador, cujo tempo de residência equivale ao tempo de esterilização necessário para a temperatura de operação. Esterilizado o meio, o mesmo é conduzido ao trocador de calor para pré-aquecer o meio não asséptico, e posteriormente, tem sua temperatura ainda mais reduzida por água à temperatura ambiente, para evitar, conforme discutido anteriormente, degradação de fonte de açúcar, vitaminas e nutrientes. Na Tabela 2 apresenta-se o tempo de residência necessário do retardador, em função da temperatura, para que se atinja o Fator de Del de 55,7 ao final do procedimento.

Figura 6 - Fluxograma de um processo de esterilização térmica contínua UHT com injeção de vapor



Fonte: Adaptado de STANBURY, WHITAKER E HALL (2017)

Tabela 2 - Correlação entre temperatura (°C) e tempo de residência (s) para se atingir um fator de Del de 55,7

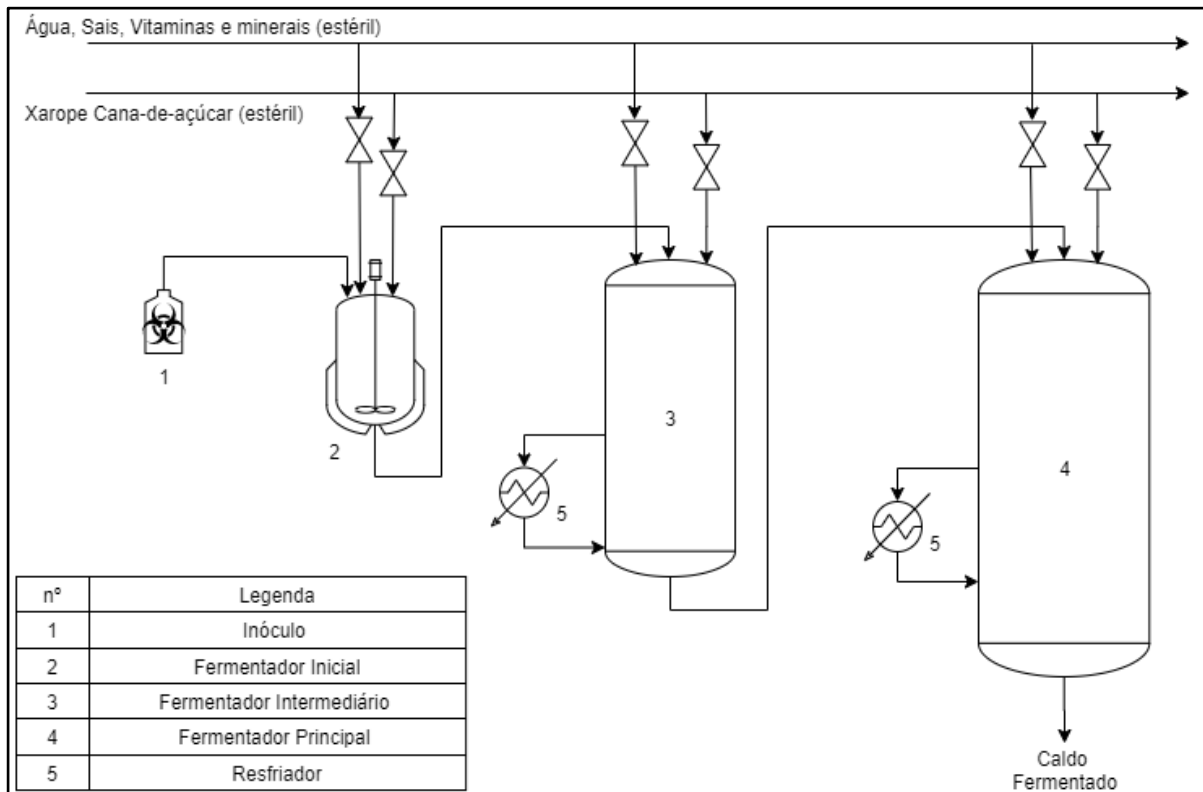
Temperatura (°C)	Tempo de residência
150	2,7 segundos
140	18,9 segundos
135	51,9 segundos
130	146,4 segundos

Fonte: Adaptado de Stanbury, Whitaker e Hall (2017)

### 2.2.3. Processo produtivo

O fluxograma do processo produtivo, o qual possui o xarope de cana-de-açúcar como matéria-prima, é apresentado na Figura 7.

Figura 7 - Fluxograma simplificado do processo de fermentação da instalação industrial estudada



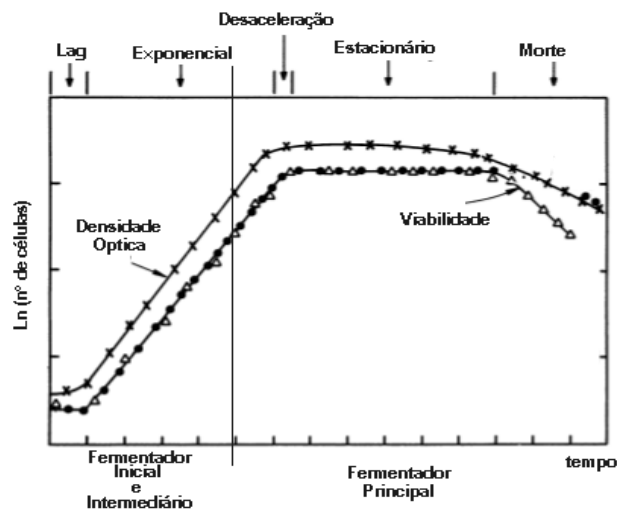
Fonte: Acervo pessoal

A tecnologia de produção empregada para o escalonamento do processo é conhecida como método de cultura de múltiplos estágios, ou *seed-train*. Nesta, o cultivo é dividido em duas macro-etapas, sendo a primeira com o meio de cultura dedicado exclusivamente ao crescimento celular e aumento de biomassa, permitindo a escalabilidade para a segunda etapa, cujo meio de cultura favorece tanto a manutenção da cultura celular quanto a produção do metabólito de interesse (TAKAYAMA, 2014). A Figura 8 ilustra a curva de crescimento do microrganismo geneticamente modificado nos múltiplos estágios do método *seed-train*.

O processo produtivo inicia-se com o preparo do inóculo do microrganismo geneticamente modificado, preparado em laboratório de microbiologia em condições assépticas. Este é armazenado no interior de uma bazuca estéril, com conteúdo total de 2L, a qual inocula o fermentador inicial, responsável pela propagação do microrganismo e geração de biomassa. Atingidas as condições de transferência, as quais dizem respeito à concentração de biomassa e viabilidade do microrganismo, transfere-se todo o conteúdo do Fermentador Inicial para o fermentador intermediário. Nessa etapa, o objetivo principal é a concentração de biomassa, para ter seu conteúdo transferido, após atingir concentração e viabilidade

necessárias, para o fermentador principal. Este último, após inoculado, possui a finalidade de finalizar a etapa de crescimento do microrganismo e ativar a rota de produção. Apesar de haver associação do hidrocarboneto de interesse no interior do microrganismo geneticamente modificado, o produto é majoritariamente acumulado em meio extracelular.

Figura 8 - Ilustração dos períodos da curva de crescimento de microrganismos na etapa de fermentação



Fonte: Adaptado de SHULER e KARDI, 1992

O fermentador inicial é caracterizado por ser batelada, enquanto os demais, batelada alimentada, sendo todos os três fermentadores aerados. O ar de processo é comprimido e conduzido à uma etapa de pré-filtração e filtração, atingindo pressão de linha mais que suficiente para vencer a pressão de coluna de líquido dos fermentadores e garantindo assepsia dos mesmos. Temperatura e pH são mantidos constantes em faixa ótima para crescimento e produtividade do microrganismo geneticamente modificado, e os fermentadores são operados pressurizados (por meio dos aeradores), promovendo maior solubilidade dos gases de processo e contribuindo para preservação da esterilidade do meio.

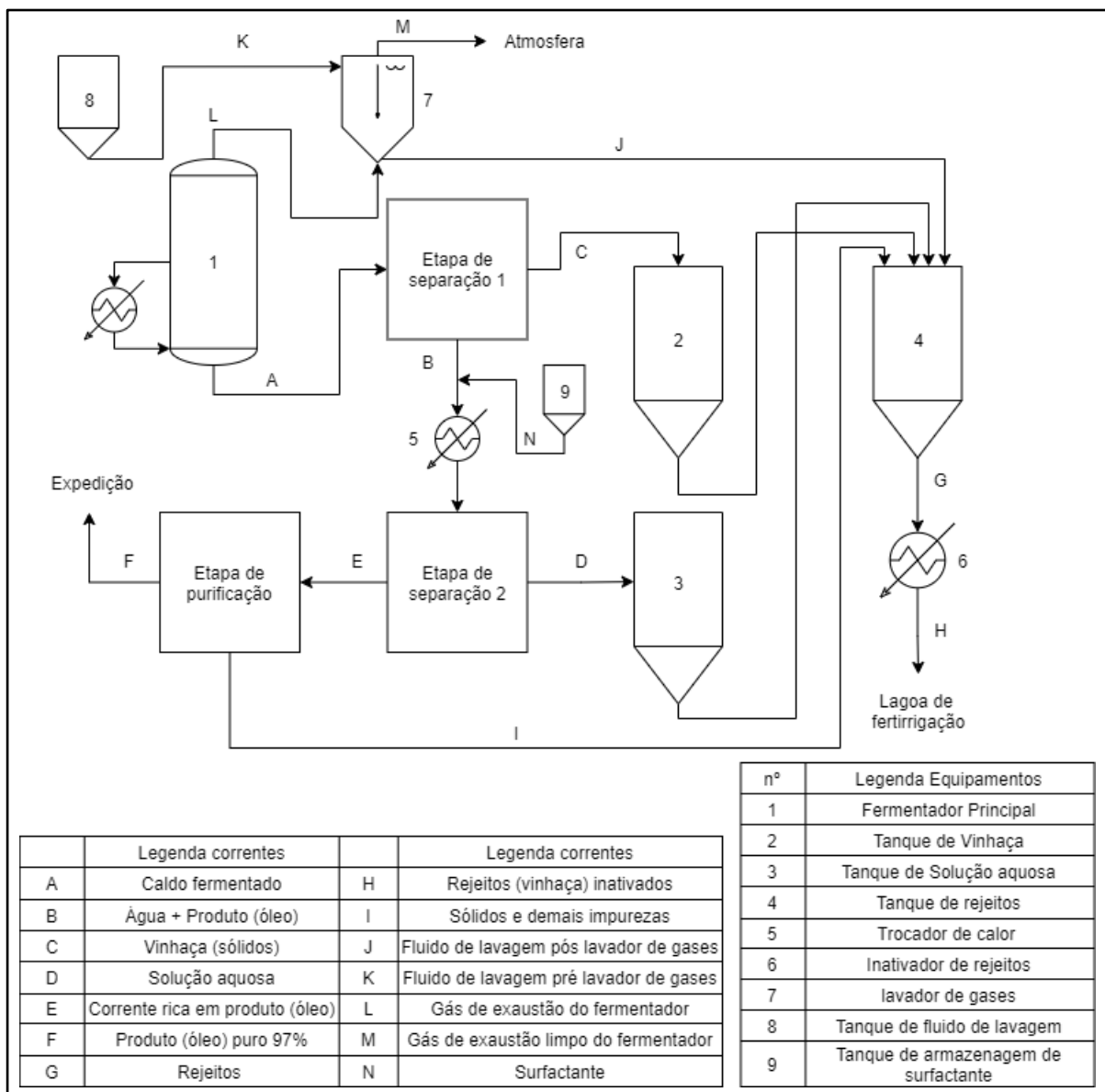
#### 2.2.4. Processo de *Downstream*

Finalizada a fermentação, faz-se necessário separar, recuperar e purificar o produto de interesse, para que este atinja o requisito de pureza de 95-97% para sua comercialização.

O caldo fermentado apresenta uma composição de 16% (m/v) do óleo (hidrocarboneto) de interesse, além de vinhaça, sólidos (células vivas e mortas do microrganismo geneticamente

modificado, e sólidos provenientes do xarope da cana-de-açúcar) e uma fase aquosa. Este conteúdo é conduzido à etapa de separação 1, o qual objetiva separar vinhaça e sólidos do caldo fermentado. Posteriormente, a corrente de interesse é conduzida à etapa de separação 2 após ser submetida à uma dosagem de surfactante, com a finalidade de controlar a formação de espuma, e aquecida a 80°C, para haver maior eficiência dessa etapa, ou seja, recuperar a fase oleosa (de interesse) da fase aquosa. Por fim, a fase oleosa é submetida a uma etapa de purificação, atingindo sua pureza comercial (95-97%). O processo de *downstream* é esquematizado na Figura 9.

Figura 9 - Fluxograma simplificado do processo de *Downstream* da instalação industrial estudada



Fonte: Acervo pessoal



De acordo com a Lei de Biossegurança nº 11.105/05, Art.3º, a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança, OGM (Organismo Geneticamente Modificado) caracteriza-se como qualquer “organismo cujo material genético – ADN/ARN tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética” (BRASIL, 2005). Conforme publicado na Resolução nº 18, de 23 de Março de 2018 no diário oficial da União, conforme consta no Artigo 13, “antes de qualquer descarte, o OGM, seus derivados e os efluentes sólidos e líquidos devem ser inativados para impedir sua replicação ou multiplicação e potenciais efeitos adversos à saúde humana, animal e ao meio ambiente” (BRASIL, 2018).

Após submissão das etapas de separação, recuperação e purificação, os fluxos de matérias pobres no produto de interesse (vinhaça e fase aquosa) são armazenados em um tanque de resíduos. Este último também recebe todo o conteúdo proveniente da lavagem dos gases de exaustão dos fermentadores, uma vez que esses também são considerados derivados de OGM. Assim, o conteúdo do tanque de resíduos é conduzido ao processo de inativação, semelhante ao processo descrito em esterilização contínua por UHT, representado na Figura 6, para que todo o efluente possa ser, por lei, descartado. Os efluentes são despejados na lagoa de fertirrigação da usina alcooleira, que será posteriormente reaproveitado na cultura de cana-de-açúcar.

### **2.3. Alternativas de recuperação do produto final**

A etapa de *downstream* de um caldo fermentado, a qual possui a finalidade de enriquecer o fluxo de corrente principal com o produto de interesse, pode ser dividida em cinco etapas: remoção de células do caldo fermentado, ruptura celular (ou remoção de detritos celulares), separação primária, enriquecimento de produto e isolamento final (DORAN, 2013).

Para uma indústria com tecnologia de fermentação, é muito comum que não satisfaça as cinco etapas de *downstream*, uma vez que um alto grau de pureza pode não ser requisito para a comercialização do produto de interesse, ou este seja concentrado totalmente em ambiente extracelular, não sendo necessária a ruptura das células cultivadas.

A etapa de remoção de células é a primeira etapa de separação, e agrega com ela a retirada de diversas impurezas do caldo fermentado, refletindo muito positivamente nas etapas subsequentes de *downstream*. Centrifugação, filtração e microfiltração são etapas comuns desse processo. A etapa de ruptura celular objetiva extrair o produto intracelular acumulado nas células cultivadas, e os destroços celulares causados por essa etapa podem ser separados também por centrifugação, filtração e microfiltração (DORAN, 2013).

A etapa de separação primária dedica-se à remoção de produtos com propriedades significativamente diferentes. As operações unitárias que podem satisfazer esse processo são: extração líquido-líquido, precipitação e ultrafiltração. E por fim, as etapas de enriquecimento de produto e isolamento final são focadas em obter um produto de interesse com alto grau de pureza em operações de separação com alto grau de seletividade. Muito comum em indústrias farmacêuticas, um alto grau de pureza pode ser obtido com ultrafiltração de líquidos, cristalização seguida por centrifugação ou filtração, ou secagem para produtos sólidos (DORAN, 2013).

### **2.3.1. Centrifugação**

O processo de centrifugação é baseado em um maquinário que amplifica a força da gravidade com o objetivo de separar duas fases por diferença de densidade, muito similar ao princípio de sedimentação. As centrífugas possuem um vaso que rotacionam em torno de um eixo central a uma velocidade suficiente para produzir uma força centrífuga superior à gravidade. Uma força contrária à centrífuga, de mesma magnitude, atuam sobre os sólidos da corrente de alimentação, acumulando-os na parede do vaso, e formando uma camada de líquido no topo. Essa operação também pode ser utilizada para separação de dois líquidos, desde que estes tenham diferença de densidade suficientes para separação de fases. (TODARO, 2014).

### **2.3.2. Filtração**

Filtração é a operação unitária mais econômica para a separação de células e sólidos do caldo fermentado. O princípio básico para a filtração acontecer é forçar a passagem do caldo fermentado por um meio filtrante adequado. Ao longo do processo há a deposição de células e sólidos junto ao meio filtrante, formando uma torta. O líquido, então, flui pelos canais formados pela deposição das partículas na torta (SHULER, 1992).

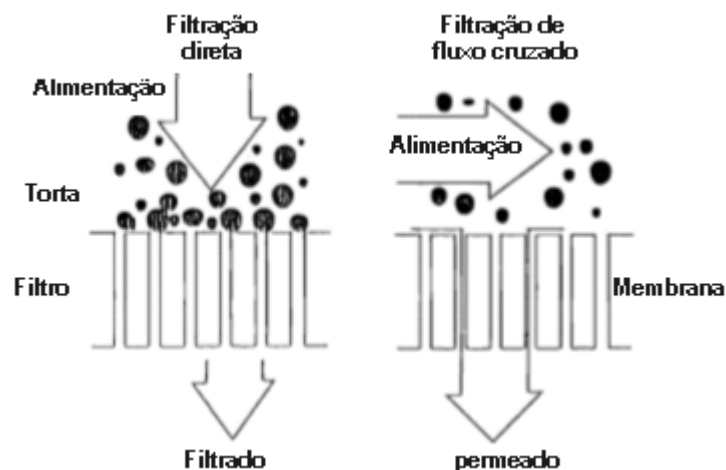
O cuidado com esse tipo de operação é o aumento da espessura da torta formada por células e sólidos, que aumenta a perda de carga e reduz a operabilidade do equipamento. Filtros rotativos contínuos ou filtros pré-revestidos a vácuo rotativos são comumente usados na indústria de fermentação (TODARO, 2014).

### 2.3.3. Filtração com fluxo cruzado

Filtração com fluxo cruzado, caracterizada pela filtração tangencial ao meio filtrante, começou a ser desenvolvida para aplicação de osmose reversa, tendo então sua aplicação estendida para microfiltração e ultrafiltração. Para a primeira aplicação citada, é muito comum a utilização de membranas poliméricas para operação, enquanto que para micro e ultrafiltração, o meio filtrante pode ser constituído por membranas poliméricas, metálicas e cerâmicas (BHAVE, 2014).

A Figura 10 ilustra a diferença do funcionamento entre a filtração com fluxo cruzado e filtração com fluxo direto, e a Tabela 3 apresenta o espectro de separação da tecnologia de filtração com fluxo cruzado.

Figura 10 - Operação de filtração direta e de fluxo cruzado



Fonte: Adaptado de BHAVE, 2014

Tabela 3 - Espectro de separação de filtração com fluxo cruzado

Dimensão nominal das espécies	Exemplos de produtos separados	Processo
100 - 500 Dalton	Ácidos orgânicos, aminoácidos, ácido acético, ácido cítrico	Ultrafiltração (produto permeado) Osmose reversa (produto concentrado)
200 - 2.000 Dalton	Antibióticos, penicilina, cefalosporina	Micro e ultrafiltração (produto permeado)
10.000 - 2.000.000 Dalton	Proteínas e polissacarídeos	Ultrafiltração (retenção das espécies na membrana)
0.01 - 0.3µm	Vírus	Ultrafiltração (retenção das espécies)
0.1 - 10 µm	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas diminuta</i> , células de mamíferos, microrganismos do ar e emulsões oleosas	Microfiltração e Ultrafiltração (espécies retidas_)
1 - 100µm	Bactérias e células	Microfiltração (espécies retidas)

Fonte: Adaptado de BHAVE, 2014

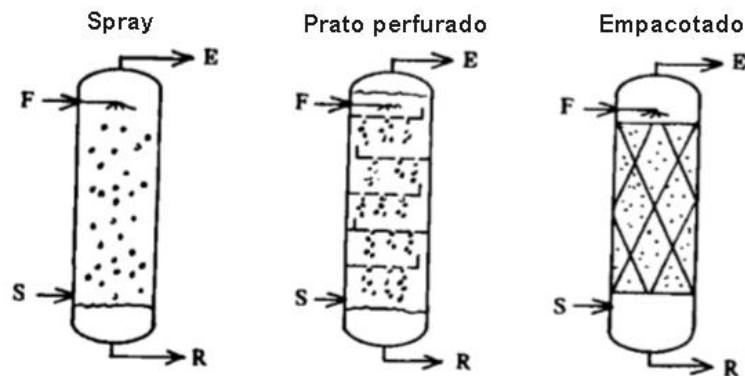
#### 2.3.4. Extração por solvente

A extração líquido-líquido é uma operação que objetiva capturar um produto desejado de uma solução (proveniente do processo produtivo) para outra (líquido solvente), facilitando a recuperação do produto principal. Ela também pode ser empregada para remoção de impurezas da corrente principal do processo. O solvente então, enriquecido do produto de interesse após extração, deixa o extrator, seguindo para etapa de recuperação, e dando seguimento à etapa de *downstream* (TODD, 2014).

Para a seleção do solvente, a natureza do produto de interesse e do líquido de alimentação devem ser levadas em consideração, do contrário, o solvente escolhido pode não ter seletividade em remover o produto de interesse, ou pode ser miscível com a corrente de alimentação, dificultando e encarecendo as posteriores etapas de recuperação. Outros fatores a serem considerados na escolha do solvente são: viscosidade (caso elevada, pode dificultar transferência de massa), toxicidade (saúde e segurança operacional), poder corrosivo (garantir operabilidade dos equipamentos) e de fácil recuperação (TODD, 2014).

Colunas de extração podem ser agitadas ou não, e para exemplificação, apresenta-se na Figura 11 tipos de extratores não agitados, cuja corrente de alimentação (F), rica no produto de interesse, entra em contato com o solvente. Por transferência de massa, o solvente realiza a extração do produto de interesse, e é retirado da coluna (E), enquanto a corrente de alimentação, mais pobre no produto principal, deixa o leito (R).

Figura 11 - Exemplo de Extratores não-agitados



Fonte: Adaptado de TODD, 2014

### 2.3.5. Evaporação

O processo de evaporação como etapa de separação objetiva separar um líquido de uma mistura em forma de vapor. De modo geral, a maioria das aplicações de evaporadores para etapas de *downstream* concentram o produto de interesse no fundo do equipamento, em estado líquido, e o solvente, na maioria das vezes, água, evaporado, porém o contrário também pode ser válido, a depender da natureza dos componentes. Para uma boa operabilidade, pressão, temperatura, vazão de processo e propriedades físicas e termodinâmicas devem ser levadas em consideração, pois o processo de concentração do produto de interesse pode alterar a temperatura de ebulição da mistura, formar espuma (por substâncias orgânicas), criar condições corrosivas e até mesmo perder a qualidade do produto final (FREESE, 2014).

### 2.3.6. Cristalização

A cristalização é considerada uma das últimas etapas no processo de purificação de bioprodutos, e com alto potencial de recuperação de produtos sólidos em solução. É comumente utilizada em indústrias farmacêuticas para que se atinja alto grau de pureza, como é o caso dos

antibióticos. Para sua operação, é necessário o entendimento da curva de saturação do produto de interesse no solvente em função da temperatura, para que, reduzindo a temperatura do sistema em condição de saturação ou evaporando o solvente do sistema para que se ultrapasse o ponto de saturação, forme-se cristais uniformes do produto de interesse, para posteriormente, ser submetido a uma etapa de secagem ou centrifugação com filtro (GLASGOW, 2014).

### **2.3.7. Ruptura celular**

Após a separação de todo o conteúdo celular do caldo fermentado, caso o produto de interesse esteja intracelular, sua extração pode ser conduzida com a ruptura das células cultivadas. As maneiras mais conhecidas para se realizar essa recuperação são: moagem por esferas, homogeneização por alta pressão, extração por ultrassom, microondas e por fluidos supercríticos (KOUBAA *et al.*, 2020).

Em uma moagem por esferas, a ruptura celular acontece devido às forças de cisalhamento produzidas. Em uma câmara, esferas de materiais sólidos entram em movimento por rotação do eixo central do equipamento em velocidade suficiente para promover colisão, trituração, e abrasão das células. Em um processo de homogeneização de alta pressão, a corrente de células é submetida à alta pressão e por meio de uma válvula, fenda ou bocal, há uma redução brusca de pressão resultando no cisalhamento celular e em um fluido homogêneo. Podendo ser operado entre 150 e 400 MPa, o homogeneizador de alta pressão possui como vantagem sua escalabilidade, podendo processar até 50.000 L/h (KOUBAA *et al.*, 2020).

Utilizada em escala laboratorial, em uma extração por ultrassom, energia é fornecida ao meio celular através de um gerador de vibrações, gerando uma onda intensa que fornece energia suficiente ao interior celular para resultar em pequenas regiões com vapor de água que crescem ao longo do processo, implodindo e causando a destruição celular. Similarmente, a extração por microondas é baseada na ruptura celular pelo aumento de temperatura do meio de estudo, e tem se mostrado mais promissor como um mecanismo de suporte para outros métodos de ruptura celular, não como principal. Por fim, a utilização de fluidos supercríticos tem ganhado atenção nos últimos anos, como uma alternativa promissora para poupar algumas etapas de separação ao substituir solventes, que muitas vezes são tóxicos. A utilização de gás carbônico supercrítico tem se mostrado promissora para ruptura celular, resultando em recuperações de óleos de leveduras na ordem de 10% (KOUBAA *et al.*, 2020).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Para elaboração de proposta de alternativa de recuperação do produto de interesse a partir das correntes descartadas de *downstream*, fez-se um descritivo de todo o processo produtivo da empresa estudada em conjunto com o levantamento quantitativo das características das correntes de perdas.

. Para a apresentação dos dados quantitativos da composição das correntes de descarte, originadas das etapas de separação 1 e 2, conforme ilustrado pela Figura 12 e 14, foram utilizados dados de análises de capilar conduzidas pelo time do laboratório de controle de qualidade a partir de amostras diárias dessas correntes. Para essa análise, uma alíquota da amostra estudada, previamente homogeneizada, é inserida em um capilar de vidro, em que uma de suas extremidades é tampada com uma massa. O capilar, com sua extremidade tampada disposta no raio externo do eixo de rotação, é colocado em centrífuga apropriada, a qual opera em rotação de 5.000 rpm por 5 minutos. Com a amostra centrifugada, uma medição das fases é realizada com um paquímetro, e a porcentagem de cada fase é obtido ao dividir-se cada medida pela soma medida de todas as fases.

A pureza das amostras de processo, obtidas em porcentagem massa/volume, tanto para acompanhamento da fermentação quanto para cálculo do desempenho do processo de *downstream* é obtida por análise de cromatografia gasosa. Os rendimentos diários das etapas de separação são calculados a partir da razão entre a quantidade de produto remanescente na corrente de interesse do processo pela quantidade total de produto contido na corrente de alimentação da respectiva etapa. Para o tratamento de dados de rendimento do processo de *downstream* da instalação industrial estudada para o ano de 2020, foi utilizado o software de análise estatística JMP.

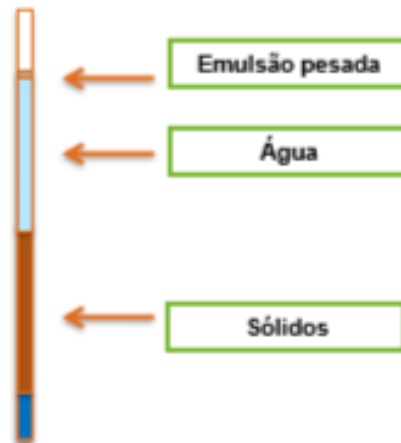
### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **4.1. Etapa de separação 1**

A primeira etapa de *downstream*, conforme afirmado por DORAN (2013), objetiva retirar todas as impurezas do caldo fermentado. Dessa forma, a corrente de vinhaça produzida por esse processo de separação possui entre 60 e 70% (v/v) de sólidos, de 30-40% (v/v) de água e aproximadamente 1% (v/v) de emulsão pesada. A figura 12 ilustra a disposição de todo o

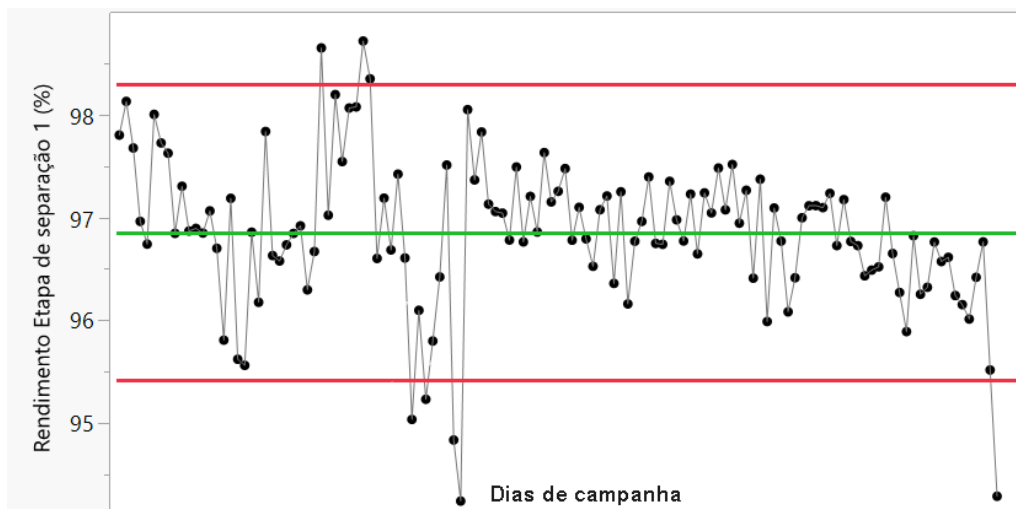
conteúdo contido na vinhaça após centrifugação em tubo capilar, metodologia empregada para caracterização das correntes de processo em laboratório de controle de qualidade.

Figura 12 – Representação da análise de capilar da vinhaça produzida pela etapa de separação 1



Fonte: Acervo pessoal

Figura 13 - Rendimento diário da campanha de 2020 da etapa de separação 1



Fonte: Acervo pessoal

A etapa de separação 1 no ano de 2020 apresentou um rendimento médio diário de 96,66% (Figura 13), e um rendimento anual de 95,79%. Isso equivale dizer que 4,21% de todo o produto de interesse produzido pela fermentação é perdido na vinhaça. Dessa porcentagem perdida, cerca de 42,26% é perdido por emulsão pesada, caracterizada pela emulsão do óleo de

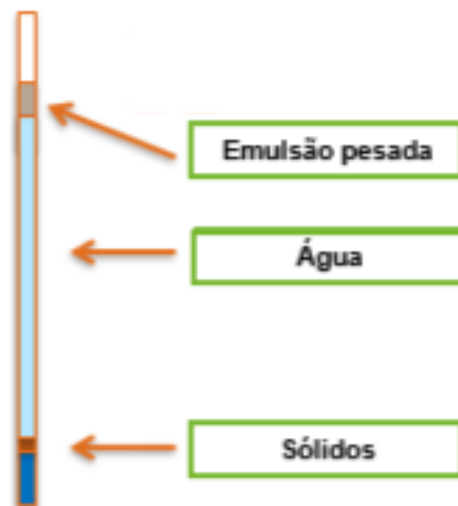


interesse com a vinhaça, e o restante, 57,74%, por associação dos produtos no interior das células retiradas do processo, que se encontram na fase de sólidos.

#### 4.2. Etapa de separação 2

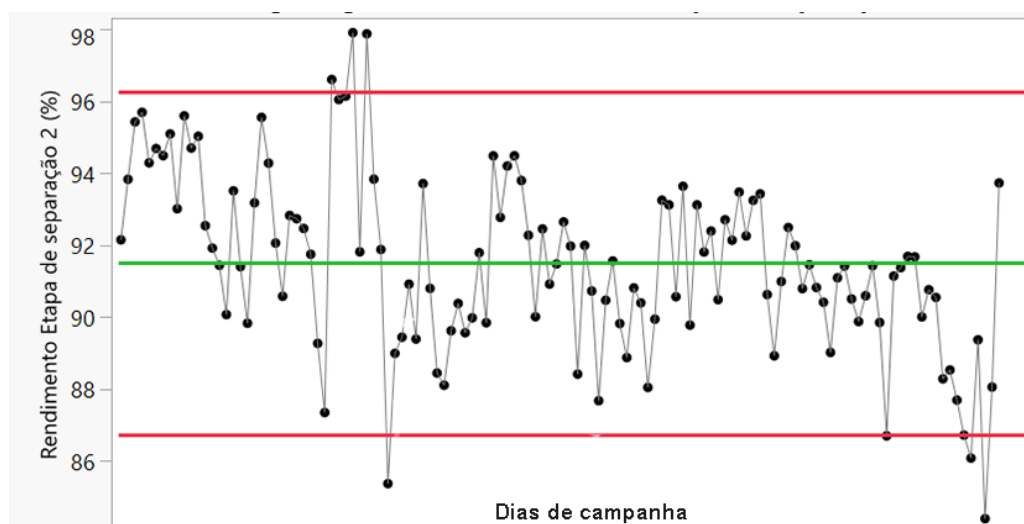
A corrente de alimentação da etapa de separação 2 possui, por controle operacional da etapa 1, menos de 1% (v/v) de sólidos em sua composição, de 10-20% (v/v) de fase oleosa (de interesse), 75-90% (v/v) de fase aquosa, e de 0-10% de emulsão. A corrente de perda gerada por esse processo de separação possui até 2% (v/v) de sólidos, de 90-95% (v/v) de água e até 5% (v/v) de emulsão pesada (Figura 14). Seu objetivo, como uma etapa de separação primária, descrita por DORAN (2013), é separar produtos que possuem propriedades físicas diferentes. Nesta etapa, o objetivo é toda a água da alimentação ser retirada na corrente de descarte, deixando a corrente de interesse com 99% (v/v) de fase oleosa e 1% (v/v) de sólidos remanescentes.

Figura 14 – Representação da análise de capilar da corrente de descarte produzida pela etapa de separação 2



Fonte: Acervo pessoal

Figura 15 - Rendimento diário da campanha de 2020 da etapa de separação 2



Fonte: Acervo pessoal

A etapa de separação 2 no ano de 2020 apresentou um rendimento diário médio de 91,25% (Figura 15), e um rendimento anual acumulado de 88,01%. Isso equivale afirmar que 11,99% de todo produto de interesse contido na corrente de alimentação dessa etapa foi perdido no processo, no ano de 2020. Desses, 13,69% são perdidos por emulsão com a fase aquosa, e o restante, 86,31%, por emulsão do óleo de interesse com células mortas do processo.

#### 4.3. Impacto de contaminação no processo de *Downstream*

É sabido que a contaminação do processo fermentativo com bactérias e leveduras prejudicam o desempenho do microrganismo geneticamente modificado, uma vez que há a competição pelo substrato e há a presença de metabólitos secundários no meio reacional que podem ser prejudiciais para a produção do hidrocarboneto de interesse (KUMAR *et al.*, 2021). Na campanha de 2020 houveram lotes de fermentadores contaminados que tiveram suas produtividades diárias reduzidas, em média, em 24,31%.

Além da perda de desempenho produtivo na etapa de fermentação, é observado na prática que o processo de downstream do caldo fermentado também é impactado: há perdas maiores de rendimento na etapa de separação 1 por associação do óleo no interior das células cultivadas, em decorrência do estresse que o microrganismo possa ser submetido em meio contaminado (KUMAR *et al.*, 2021), e também perdas de rendimento na etapa de separação 2, uma vez que os contaminantes contribuem para uma maior emulsão do óleo com as células

mortas do processo. O impacto das contaminações na campanha de 2020 resultou em um aumento médio de associação do produto intracelular na ordem de 46,84% e um aumento de perda por emulsão em média de 12,04%, respectivamente, para etapa de separação 1 e 2.

#### **4.4. Proposta de recuperação do óleo perdido em *Downstream***

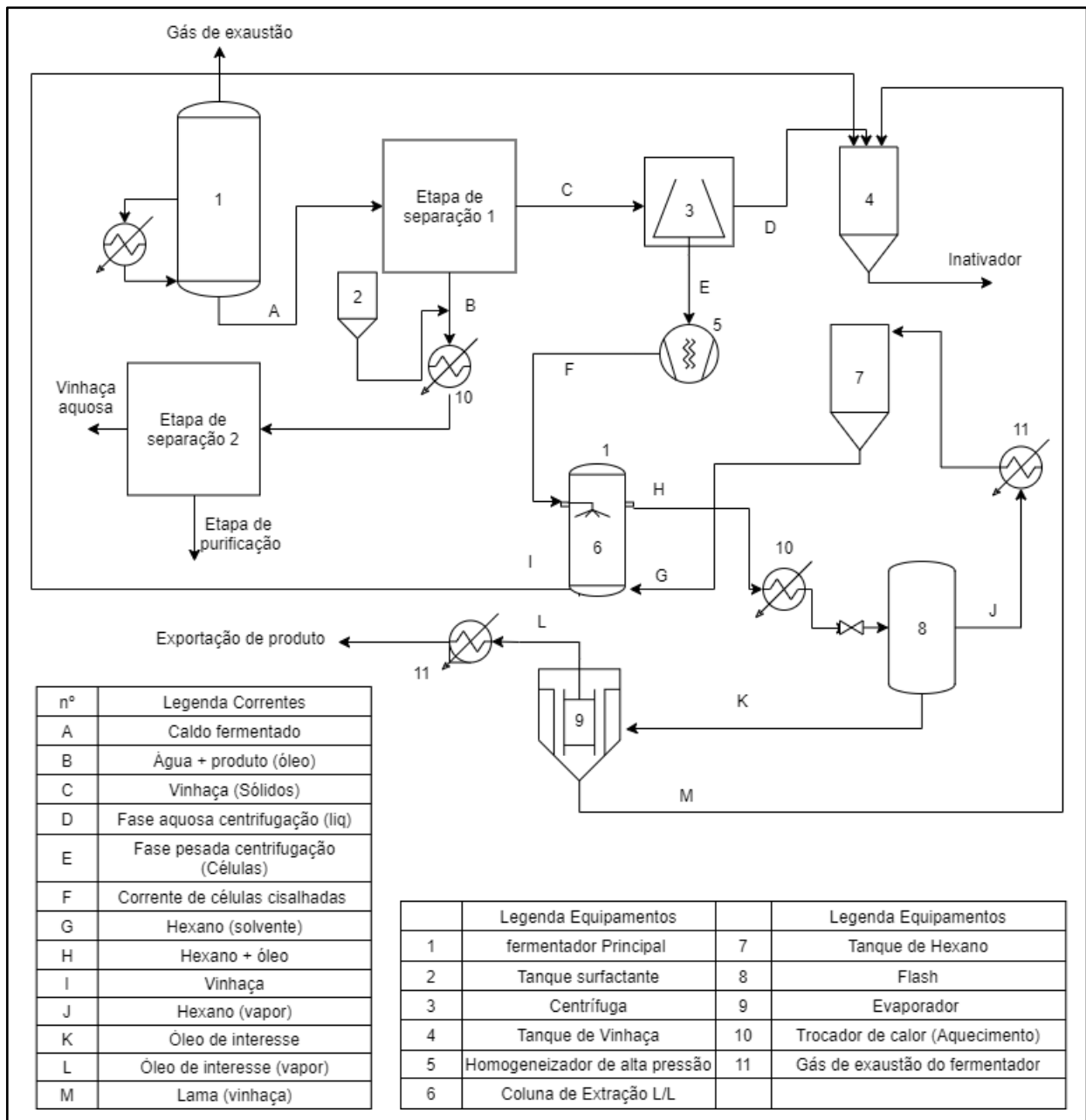
##### **4.4.1. Recuperação de óleo na etapa de separação 1**

A maior parte de óleo perdido na etapa de recuperação 1, na vinhaça, é por associação intracelular de produto pelos microrganismos cultivados, a qual é ainda mais expressiva no tratamento de caldo contaminado. Dessa forma, o sucesso da sua recuperação pode contornar parte dos impactos causados por possíveis contaminações dos fermentadores.

A Figura 16 mostra um fluxograma de processo proposto para a recuperação do óleo perdido na etapa de separação 1, no qual a corrente de interesse é submetida a uma etapa de filtração, ou centrifugação, para enriquecimento da corrente de interesse com sólidos, possibilitando a extração do produto de interesse intracelular por homogeneização de alta pressão seguida de uma extração líquido-líquido. Posteriormente óleo de interesse e líquido extrator podem ser separados por uma etapa de *flash*, e a pureza do produto final pode ser refinada por uma etapa de evaporação à vácuo.

Para que os sólidos separados da corrente de vinhaça, a proposta é a utilização do processo de filtração de fluxo cruzado, ou centrifugação. A Tabela 4, segundo BHAVE (2014), compara o desempenho do processo de filtração por fluxo cruzado com as demais tecnologias (filtração direta, filtração com pré-revestimento e centrifugação) conhecidas para diversos tipos de separação. Dessa forma, há indícios de que o processo de filtração por fluxo cruzado pode não ser economicamente viável para correntes com porcentagem volumétrica de sólidos maiores que 25% (Tabela 4). Em contrapartida, o custo de equipamento, instalação e manutenção de uma centrífuga é bastante elevado, decisão que pode ser tomada após testes em escala piloto ou com avaliação econômica.

Figura 16 - Proposta do fluxo de processo para recuperação do produto de interesse a partir da corrente de descarte da primeira etapa de separação



Fonte: Acervo pessoal

Tabela 4 - Comparação de filtração de fluxo cruzado com as demais tecnologias

Condição de processo	Filtração fluxo cruzado	Filtração direta	Filtragem de pré-revestimento	Centrifugação
Baixo teor de sólidos 0 - 1 % (v/v)	Atende eficientemente (necessita de um alto fluxo para o custo ser efetivo)	Pode atender eficientemente  Baixo custo	Pode atender eficientemente  Baixo custo	Pode atender  Alto custo
Médio teor de sólidos 1 - 10% (v/v)	Atende adequadamente (eficaz a depender do fluxo)	Não atende bem	Pode atender eficientemente  Baixo custo	Pode atender adequadamente e economicamente
Alto teor de sólidos 10 - 70% (v/v)	Pode não ser econômico para > 25% de sólidos para processos contínuos	Não atende bem	Pode atender com alto custo de operação	Pode atender alto teor de sólidos  Alto investimento e manutenção
Líquidos emulsificados	Atende eficientemente	Não atende bem	Não atende bem	Não atende bem
Pequena diferença de densidade ou partículas finas	Bem adequado (depende dos diâmetros dos poros)	Pode atender adequadamente	Não atende bem	Não pode atender eficientemente
Separação de solutos macromoleculares	Muito eficiente	Não atende bem	Não atende bem  Baixo rendimento	Não factível
Solventes	Adequados usando membranas quimicamente resistentes	Não atende bem	Não atende bem em sistemas abertos	Pode ser difícil de atender
Frações contínuas de sólidos	Não muito adequado	Pode atender, com performance bem sensível	Não factível	Pode atender adequadamente

Fonte: Adaptado de BHAVE, 2014.

Separados os sólidos da vinhaça, é necessário a realização da ruptura celular para que o óleo de interesse possa ser extraído. Dessa forma, utiliza-se o processo de homogeneização de alta pressão, o método mais utilizado em escala industrial para ruptura celular. Apesar do moedor de esferas ser uma operação que possui tecnologia efetiva suficiente para ser aplicada em larga escala, o processo de homogeneização de alta pressão apresenta melhores rendimentos (KOUBAA *et al.*, 2020).

Em um estudo de extração de óleo da levedura *Yarrowia lipolytica*, o maior rendimento de extração (83,8%) foi observado pela tecnologia de homogeneização de alta pressão (DRÉVILLON *et al.*, 2019 *apud* KOUBAA *et al.*, 2020). Em extração de óleos do fungo *Cryptococcus curvatus*, a porcentagem de rendimento utilizando moagem com esferas foi de 45,5%, contra 47,3% por homogeneização de alta pressão (YU *et al.*, 2014 *apud* KOUBAA *et al.*, 2020).

A etapa de ruptura celular pode ser complementada com extração líquido/líquido. Pelo produto de interesse ser um hidrocarboneto de cadeia longa e ramificada, um solvente orgânico apolar deve ser adequado pela similaridade química com o composto de interesse, como o hexano. THIRU *et al.*, (2011) e SANKH *et al.*, (2013) conseguiram reduzir o custo de extração do óleo da levedura *Pichia kudriavzevii* em 60%, submetendo o material de estudo à uma homogeneização de alta pressão auxiliada por extração com n-hexano. BRENNAN e REGAN (2020) relataram que no processo de extração de ácidos graxos de *Nannochloropsis sp.* por ultrassom, o solvente orgânico que melhor contribuiu para extração de ácidos graxos poli-insaturados (que melhor se assemelha ao produto de interesse do trabalho) foi o hexano com recuperação de 50,2%.

Como o hexano possui temperatura de ebulição, 68,95°C (chemicalbook, 2021), inferior a temperatura do produto de interesse, para uma mesma pressão de operação, o óleo pode ser separado do hexano em uma operação de *flash* à pressão inferior à atmosférica. Sequencialmente, uma etapa de evaporação à vácuo pode ser conduzida objetivando ebulir todo o óleo de interesse, sob pressão manométrica de -850 mbar, para posterior condensação, com a finalidade de concentrar possíveis sólidos que poderiam acompanhar o processo de extração no fundo do evaporador, obter o produto de interesse na pureza desejada e evitar degradação térmica do produto ao operar o evaporador com pressão reduzida, refletindo diretamente na redução de sua temperatura de ebulição.

#### 4.4.2. Recuperação de óleo na etapa de separação 2

As perdas do óleo de interesse na etapa de recuperação 2 do processo produtivo acontecem por emulsão do óleo com a fase aquosa, e também por emulsão do óleo com células mortas (podendo essas ser as cultivadas no processo, geneticamente modificadas, ou de microrganismos contaminantes, indesejáveis).

A Figura 17 mostra um fluxograma de processo proposto para a recuperação do óleo perdido na etapa de separação 2, no qual a corrente de interesse é submetida a uma etapa de filtração de fluxo cruzado visando reter a quantidade de células da corrente e reduzir a emulsão das mesmas com o produto de interesse. Posteriormente, a corrente de interesse é submetida a etapas de evaporação em cadeia, objetivando enriquecer a corrente de interesse ao evaporar água, e em sequência, evaporando o hidrocarboneto, separando-o de possíveis sólidos remanescentes no evaporador, e condensado para comercialização.

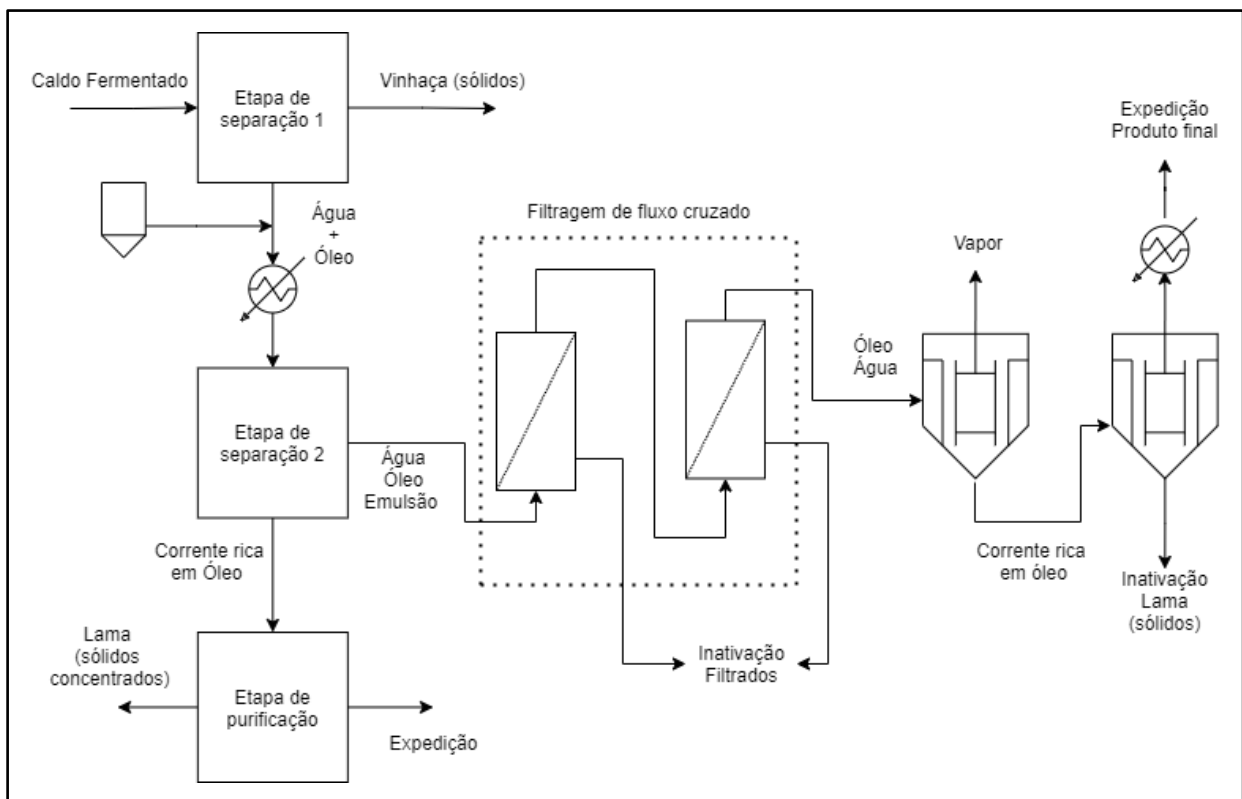
A primeira proposta de separação dessa corrente será a separação de emulsão. BHAVE (2014) comparou o desempenho do filtro de fluxo cruzado com demais etapas de separação de fases conhecidas, já apresentado na Tabela 4. Pode-se observar que o desempenho do filtro de fluxo cruzado é bem avaliado para operações com fluidos emulsificados e separação de solutos macromoleculares. Dessa forma, uma etapa de filtração de fluxo cruzado ou filtrações em série, com redução dos poros das membranas conforme a direção do fluxo do processo, podem ser factíveis para a retenção das células presente nessa corrente, e reduzindo a emulsão causada pelas mesmas.

Após a etapa de filtração de fluxo cruzado, a corrente de interesse seria composta pelo hidrocarboneto de interesse, uma quantidade muito pequena de sólidos e por, majoritariamente, fase aquosa. Dessa forma, a etapa de separação subsequente poderá ser similar à etapa de separação da fase 1, ou seja, submeter a corrente de interesse em uma coluna de extração líquido-líquido, separando o óleo da emulsão com fase aquosa, recuperação do solvente por uma etapa de flash, e evaporação do hidrocarboneto a pressões reduzidas para concentração e separação dos sólidos do produto final.

Outro método que poderia ser adotado, uma vez que a corrente de interesse tenha mais óleo disponível (menos emulsificado) comparada à corrente de interesse da etapa 1 de separação (o qual foi submetido a uma etapa de homogeneização por alta pressão para ruptura celular), é separar a fase aquosa da corrente de interesse por evaporação a baixas pressões, e subsequentemente, evaporação do óleo a uma pressão inferior à primeira (uma vez que o hidrocarboneto é menos volátil que a água), separando-o dos sólidos formados. O principal

argumento para essa sequência de evaporação é que, posteriormente, toda a água condensada (maior quantidade de matéria desse processo de recuperação) e os sólidos concentrados deverão ser submetidos a uma etapa de inativação térmica. Dessa forma, as etapas de evaporação serviriam, além de operações para purificar o produto final, como pré-aquecimento para estes efluentes, o que pode tornar o processo viável e mais verde, pela não utilização de solvente.

Figura 17 - Proposta do fluxo de processo para recuperação do produto de interesse a partir da corrente de descarte da segunda etapa de separação



Fonte: Acervo pessoal



## 5. CONCLUSÃO E RECOMENDAÇÕES

Após estudo dos processos que podem compor as etapas de *downstream* de uma planta com tecnologia de fermentação, é possível concluir que há a possibilidade de se aproveitar melhor o produto principal de interesse, produzido por rota fermentativa por microrganismo geneticamente modificado, através de etapas de refino de correntes que são, frequentemente, descartadas e utilizadas para fertirrigação.

Por o processo dos fermentadores principais se tratarem de batelada alimentada, os processos sugeridos podem ser de natureza contínua ou batelada, devendo, de qualquer forma, ser respeitado tempo máximo de operação para interromper o processo e realizar CIP dos equipamentos, evitando assim, incrustações e perda de vida útil. O propósito das rotas sugeridas é atribuir para a planta estudada maior capacidade de recuperação de produto final. O estudo de uma possível substituição de alguma etapa do processo de *downstream* demandaria ainda mais estudos teóricos e práticos, uma vez que a planta industrial estudada processa e enriquece outros produtos biotecnológicos secundários, e essas possíveis substituições devem também atender a esses produtos não explorados nesse trabalho.

Apesar de se propor alternativas de melhor aproveitamento do produto de interesse, não significam que são, nem as melhores alternativas/propostas que o mercado pode oferecer, uma vez que a literatura embasada para as seleções não abordam os parâmetros da indústria à que esse trabalho se refere, ou mesmo ao hidrocarboneto produzido, nem que são economicamente viáveis, com o destaque principal à primeira rota de separação, com eficiência superior à 97%, cuja porcentagem de produto perdido pode não ser suficiente para tornar sua recuperação viável.

Dessa forma, como sugestão para trabalhos futuros, recomenda-se realizar um estudo aprofundado envolvendo quantidade e custo do produto final produzido, que para esse trabalho são informações sigilosas, para desenvolver uma análise econômica da aplicabilidade dessas etapas de recuperação. Paralelamente, um estudo melhor orientado, se possível em escala laboratorial, ou em escala piloto, devem ser conduzidos para avaliar se realmente, para o produto de interesse, o hexano se comporta como um melhor solvente em comparação aos orgânicos polares oferecidos pelo mercado, qual o melhor material para as membranas do processo de micro/ultrafiltração ser confeccionada, assim como o quão eficiente cada etapa proposta promete ser para que o produto final atinja as especificações de mercado com 97% de pureza.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BHAVE, Ramesh R.. Cross-Flow Filtration. Fermentation And Biochemical Engineering Handbook, [S.L.], p. 149-180, 2014.

BRASIL. Decreto-lei no 11.105, de 24 de março de 2005. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2004-2006/2005/lei/111105.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111105.htm)>. Acesso em 07 de mar. de 2021.

BRASIL. Diário Oficial da União, Resolução n° 18, de 23 de março de 2018. Disponível em: <[https://www.in.gov.br/materia/-/asset\\_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/7889749/do1-2018-03-26-resolucao-n-18-de-23-de-marco-de-2018-7889745](https://www.in.gov.br/materia/-/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/7889749/do1-2018-03-26-resolucao-n-18-de-23-de-marco-de-2018-7889745)>. Acesso em 07 de mar. de 2021.

BRENNAN, Brian; REGAN, Fiona. In-situ lipid and fatty acid extraction methods to recover viable products from *Nannochloropsis* sp. *Science Of The Total Environment*, [S.L.], v. 748, p. 142464-142473, dez. 2020.

CHEMICALBOOK, Hexane properties. Disponível em: <[https://www.chemicalbook.com/ProductList\\_en.aspx?kwd=hexane](https://www.chemicalbook.com/ProductList_en.aspx?kwd=hexane)>. Acessado em 14 de Mar. de 2021.

CUELLAR, Maria C; STRAATHOF, Adrie Jj. Downstream of the bioreactor: advancements in recovering fuels and commodity chemicals. *Current Opinion In Biotechnology*, [S.L.], v. 62, p. 189-195, abr. 2020.

DORAN, Pauline M.. Unit Operations. *Bioprocess Engineering Principles*, [S.L.], p. 445-595, 2013.

DRÉVILLON, Lucie; KOUBAA, Mohamed; NICAUD, Jean-Marc; VOROBIEV, Eugène. Cell disruption pre-treatments towards an effective recovery of oil from *Yarrowia lipolytica* oleaginous yeast. *Biomass And Bioenergy*, [S.L.], v. 128, p. 105320-105327, set. 2019.

FREESE, Howard L.. Evaporation. Fermentation And Biochemical Engineering Handbook, [S.L.], p. 239-265, 2014.

GLASGOW, Stephen M.. Crystallization. Fermentation And Biochemical Engineering Handbook, [S.L.], p. 309-318, 2014.

GOTTSCHALK, U. Overview of Downstream Processing in the Biomanufacturing Industry. Comprehensive Biotechnology, [S.L.], p. 669-682, 2011.

KOUBAA, Mohamed; IMATOUKENE, Nabila; DRÉVILLON, Lucie; VOROBIEV, Eugène. Current insights in yeast cell disruption technologies for oil recovery: a review. Chemical Engineering And Processing - Process Intensification, [S.L.], v. 150, p. 107868-107878, abr. 2020.

KUMAR, Vinod; AHLUWALIA, Vivek; SARAN, Saurabh; KUMAR, Jitendra; PATEL, Anil Kumar; SINGHANIA, Reeta Rani. Recent developments on solid-state fermentation for production of microbial secondary metabolites: challenges and solutions. Bioresource Technology, [S.L.], v. 323, p. 124566-124580, mar. 2021.

LI, Guozhen; TANG, Llewellyn; ZHANG, Xingxing; DONG, Jie. A review of factors affecting the efficiency of clean-in-place procedures in closed processing systems. Energy, [S.L.], v. 178, p. 57-71, jul. 2019.

LIAN, Jiazhang; MISHRA, Shekhar; ZHAO, Huimin. Recent advances in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*: new tools and their applications. Metabolic Engineering, [S.L.], v. 50, p. 85-108, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymben.2018.04.011>.

MOONDRA, Shruti; RAVAL, Nidhi; KUCHE, Kaushik; MAHESHWARI, Rahul; TEKADE, Muktika; TEKADE, Rakesh K.. Sterilization of Pharmaceuticals. Dosage Form Design Parameters, [S.L.], p. 467-519, 2018.

PAIS, C.; FRANCO-DUARTE, R.; SAMPAIO, P.; WILDNER, J.; CAROLAS, A.; FIGUEIRA, D.; FERREIRA, B.s.. Production of Dicarboxylic Acid Platform Chemicals Using Yeasts. *Biotransformation Of Agricultural Waste And By-Products*, [S.L.], p. 237-269, 2016.

PIEPIÓRKA-STEPUK, Joanna; MIERZEJEWSKA, Sylwia; STERCZYŃSKA, Monika; JAKUBOWSKI, Marek; MARCZUK, Andrzej; ANDREJKO, Dariusz; SOBCZAK, Paweł. Analysis and modelling of the regeneration process of chemical solutions after brewing equipment cleaning in a Cleaning in Place system based on changes in turbidity. *Journal Of Cleaner Production*, [S.L.], v. 237, p. 117745-117754, nov. 2019.

RIFNA, E.J.; SINGH, Sushil Kumar; CHAKRABORTY, Snehasis; DWIVEDI, Madhuresh. Effect of thermal and non-thermal techniques for microbial safety in food powder: recent advances. *Food Research International*, [S.L.], v. 126, p. 108654-108675, dez. 2019.

SANKH, Santosh; THIRU, Meikandhan; SARAN, Saurabh; RANGASWAMY, Vidhya. Biodiesel production from a newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain. *Fuel*, [S.L.], v. 106, p. 690-696, abr. 2013.

SHULER, M. L.; KARGI, F. - *Bioprocess Engineering Basic Concepts* , Editora Prentice-Hall International Inc., Englewood Cliffs, 1992

STANBURY, Peter F.; WHITAKER, Allan; HALL, Stephen J.. *Sterilization. Principles Of Fermentation Technology*, [S.L.], p. 273-333, 2017.

TAKAYAMA, Shinsaku. *Bioreactors for Plant Cell Tissue and Organ Cultures. Fermentation And Biochemical Engineering Handbook*, [S.L.], p. 25-36, 2014.

THIRU, Meikandhan; SANKH, Santosh; RANGASWAMY, Vidhya. Process for biodiesel production from *Cryptococcus curvatus*. *Bioresource Technology*, [S.L.], v. 102, n. 22, p. 10436-10440, nov. 2011.

TODARO, Celeste M.. *Centrifugation. Fermentation And Biochemical Engineering Handbook*, [S.L.], p. 267-281, 2014.

TODARO, Celeste M.. Filtration. Fermentation And Biochemical Engineering Handbook, [S.L.], p. 137-148, 2014.

TODD, David B.. Solvent Extraction. Fermentation And Biochemical Engineering Handbook, [S.L.], p. 225-238, 2014.

*YU, Xiaochen; DONG, Tao; ZHENG, Yubin; MIAO, Chao; CHEN, Shulin.* Investigations on cell disruption of oleaginous microorganisms: hydrochloric acid digestion is an effective method for lipid extraction. European Journal Of Lipid Science And Technology, [S.L.], v. 117, n. 5, p. 730-737, 28 dez. 2014.