

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**INOVAÇÕES NA PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS DE SOJA: MODELAGEM E
ANÁLISE ECONÔMICA DE PROCESSO**

CRISTINE DE PRETTO

**SÃO CARLOS – SP
2012**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**INOVAÇÕES NA PRODUÇÃO DE HIDROLISADOS DE SOJA: MODELAGEM E
ANÁLISE ECONÔMICA DE PROCESSO**

CRISTINE DE PRETTO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos

**ORIENTADORA: PROFA. DRA. CALIANE BASTOS BORBA COSTA
COORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO DE CAMPOS GIORDANO**

**SÃO CARLOS – SP
2012**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P942ip

Pretto, Cristine De.

Inovações na produção de hidrolisados de soja :
modelagem e análise econômica de processo / Cristine De
Pretto. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

137 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2012.

1. Engenharia química. 2. Processos químicos. 3.
Bioprocessos. 4. Enzimas. 5. Proteínas. 6. Modelagem
matemática. I. Título.

CDD: 660 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **CRISTINE DE PRETTO** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 25 DE ABRIL DE 2012.

BANCA EXAMINADORA:


Caliane Bastos Borba Costa
Orientadora, UFSCar


Roberto de Campos Giordano
Co-orientador, UFSCar


Miriam Maria de Resende
UFU


Ruy de Sousa Junior
UFSCar

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha orientadora Caliane e ao meu coorientador Roberto por toda a paciência do mundo e tempo que gastaram comigo. Também aos professores Paulo W. Tardioli, Raquel De Lima Carmargo Giordano e Ruy de Sousa Jr. por toda ajuda prestada.

Gostaria de agradecer também a todos os colegas de laboratório pela ajuda e companheirismo.

A toda minha família, principalmente meus pais.

A IMCOPA.

E finalmente, ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Agradecimentos	4
Sumário	5
Lista de figuras	8
Lista de tabelas	11
Resumo	12
Abstract.....	13
1 Introdução.....	14
1.1 Objetivos.....	18
2 Modelagem matemática da reação de hidrólise enzimática das proteínas do farelo de soja concentrado.....	19
2.1 Revisão da literatura.....	19
2.1.1 As proteínas	19
2.1.2 A hidrólise de proteínas.....	22
2.1.3 Cinética enzimática.....	25
2.1.4 Perfil peptídico	30
2.1.5 Redes neurais.....	33
2.1.6 A Soja e as proteínas da soja	37
2.1.6.1 A história da soja	37
2.1.6.2 A soja em números	38
2.1.6.3 Composição da soja	39
2.1.6.4 Proteínas da soja	41
2.1.6.5 Produtos da soja.....	44
2.1.6.6 Processo de produção do óleo e farelo de soja	45
2.2 Materiais e métodos.....	47
2.2.1 Materiais	47
2.2.2 Equipamentos	47
2.2.3 Procedimento	48
2.2.3.1 Análise das condições de hidrólise.....	48
a) Relação enzima/substrato	48
b) Influência da agitação	50
c) Influência da temperatura.....	50

d) Influência do pH.....	51
2.2.3.2 Modelagem matemática da reação de hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado	52
a) Modelagem matemática por Michaelis-Menten com inibição do número de ligações peptídicas hidrolisadas em função do tempo.....	53
b) Modelagem matemática por redes neurais da concentração dos pseudocomponentes em função do grau de hidrólise	54
2.3 Resultados e discussões	54
2.3.1 Análise das condições de hidrólise e dos perfis peptídicos	54
2.3.1.1 Relação enzima/substrato	54
2.3.1.2 Influência da agitação	55
2.3.1.3 Influência da temperatura	56
2.3.1.4 Influência do pH	57
2.3.1.5 Conclusões parciais	63
2.3.2 Modelagem matemática da reação de hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado.....	63
2.3.2.1 Padrões.....	64
2.3.2.2 Reprodutibilidade	65
2.3.2.3 Modelagem matemática das ligações hidrolisadas em função do tempo por Michaelis-Menten com inibição e das concentrações dos pseudocomponentes em função do grau de hidrólise por redes neurais	67
2.3.2.4 Modelagem matemática por Michaelis-Menten com inibição	68
2.3.2.5 Cromatogramas do farelo hidrolisado	75
2.3.2.6 Modelagem matemática das concentrações dos pseudocomponentes em função do grau de hidrólise por redes neurais	76
3 Análise econômica de um projeto preliminar da fabricação de um produto a base de hidrolisado proteico de soja.....	81
3.1 Revisão da literatura.....	81
3.1.1 Operações unitárias envolvidas na reação de hidrólise das proteínas	81
3.1.1.1 Introdução	81
3.1.1.2 Reação de hidrólise.....	83
3.1.1.3 Concentração e secagem.....	84
3.1.1.4 Concentração de misturas sólido-líquidas	85
3.1.1.5 Secagem.....	85

3.1.1.6 Concentração e secagem usadas em conjunto	91
3.1.2 Projeto de processos	95
3.1.3 Custo de equipamentos	98
3.1.4 Análise de investimento.....	99
3.1.5 Taxa básica de juros	101
3.1.6 Custo Brasil	101
3.2 Materiais e métodos.....	101
3.2.1 Matérias-prima.....	102
3.2.2 Produto	102
3.2.3 Arranjo do processo produtivo	103
a) Reator	103
b) Secador rotativo	104
c) Resfriador	104
3.2.4 Custos dos equipamentos	105
3.2.5 Custos fixos	105
a) Custo fixo total (CFT).....	106
b) Custos fixos diretos (CD).....	106
c) Custos fixo indiretos (CI).....	107
d) Outros custos (OC).....	107
3.2.6 Custos operacionais	107
3.2.7 Taxa SELIC	108
3.2.8 Custo Brasil	108
3.3 Resultados e discussões.....	108
4- Conclusões e sugestões para trabalhos futuros	113
Referências	116
Anexo 1.....	124
Anexo 2.....	125
Anexo 3.....	128

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Participação do Brasil no mercado mundial de carnes.....	14
Figura 1.2 – Custos de produção de suínos para abate.....	15
Figura 1.3 – Custos de produção de frango na agroindústria.....	16
Figura 1.4 – Custos de produção de peixes tilápia.....	16
Figura 1.5 – Processo de concentração de proteína no farelo de soja.....	18
Figura 2.1 – Comportamento ácido ou básico de um aminoácido em uma solução.....	19
Figura 2.2 – Curva de titulação para a glicina.....	20
Figura 2.3 – Esquema da reação de hidrólise de uma proteína ou de um peptídeo.....	23
Figura 2.4 – Estados de ionização dos grupos carboxila e amina em função do pH.....	24
Figura 2.5 – Representação da seqüência de uma reação do tipo Michaelis-Menten.....	26
Figura 2.6 – Representação da reação do tipo Michaelis-Menten com inibição competitiva..	28
Figura 2.7 – Esquema de uma reação de hidrólise catalisada por uma serina-protease.....	29
Figura 2.8 – Coluna de filtração em gel.....	31
Figura 2.9 – Estrutura de um neurônio.....	35
Figura 2.10 – Arquitetura de uma rede to tipo MLP com duas camadas ocultas.....	35
Figura 2.11 – Países para o qual o Brasil exporta produtos do complexo produtivo da soja...39	
Figura 2.12 – Proteínas da soja.....	42
Figura 2.13 – Estrutura da glicinina.....	43
Figura 2.14 – Estrutura de uma β -conglucina.....	43
Figura 2.15 – Cadeia produtiva da soja.....	44
Figura 2.16 – Processo extração do óleo bruto e do farelo de soja.....	46
Figura 2.17 – Sistema utilizado para a realização da hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado pela enzima Novo-Pro D.....	50
Figura 2.18 – Hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado variando-se a relação enzima/substrato sob as condições de 90% de umidade, 55 °C, pH 8, agitação entre 400 e 500 rpm, durante três horas de hidrólise.....	55
Figura 2.19 – Hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado variando-se a agitação. Condições da reação: 90% de umidade, 0,5% (m_{enz}/m_s), 55 °C, pH 8, por três horas.....	56
Figura 2.20 – Hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado variando-se a temperatura. Condições da reação: 90% de umidade, 0,5% (m_{enz}/m_s), pH 8, por três horas.....	57
Figura 2.21 – Hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado variando-se o pH. Condições da reação: 90% de umidade, 0,5% (m_{enz}/m_s), 55 °C, três horas de reação.....	58

Figura 2.22 – Hidrólise ou solubilização das proteínas do farelo de soja concentrado variando-se o pH, sem a adição de enzima. Condições da reação: 90% de umidade, 55 °C, três horas de reação.....	58
Figura 2.23- Cromatograma do sobrenadante do meio reacional submetido a diferentes pHs, por três horas, com 90% de umidade, a 55 °C.....	59
Figura 2.24 – Cromatograma da mistura (sobrenadante + sólido) submetida a diferentes pHs, por três horas, com 90% de umidade, a 55 °C, extraído com solução de SDS e DTT	61
Figura 2.25- Cromatogramas do farelo de soja hidrolisado (extraídos com SDS e DTT) em diferentes pHs, mas com amostras injetadas com o mesmo grau de hidrólise, a 55 °C, 90% de umidade e 0,5% (m_{enz}/m_s).....	62
Figura 2.26 – Padrões de massa molecular conhecida e seus tempos de retenção.....	64
Figura 2.27 – Reprodutibilidade do ensaio do grau de hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado em função do tempo (pH = 9, T = 55°C, 0,5% (m_{enz}/m_s), 90% de umidade)	65
Figura 2.28 – Reprodutibilidade para os diferentes graus de hidrólise	66
Figura 2.29 – Esquema da metodologia proposta para a modelagem da hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado	67
Figura 2.30 – Ajuste inicial dos parâmetros K_M , $V_{m\acute{a}x}$ e K_i por Levenberg-Marquardt. $K_M = 159,5$ mmol/L, $V_{m\acute{a}x} = 0,11$ mmol/(L.s), $K_i = 1,66$ mmol/L, $[NH_0] = 514$ mmol/L.....	69
Figura 2.31 – Ajuste dos parâmetros K_M , $V_{m\acute{a}x}$ e K_i por Recozimento simulado. $K_M = 2,38$ mmol/L, $V_{m\acute{a}x} = 0,25$ mmol/(L.s), $K_i = 0,01$ mmol/L, $[NH_0] = 514$ mmol/L.....	69
Figura 2.32 – Região de confiança para K_m e V_{max} feito por Recozimento Simulado. $K_M = 2,38$ mmol/L, $V_{m\acute{a}x} = 0,25$ mmol/(L.s), $K_i = 0,01$ mmol/L, $[NH_0] = 514$ mmol/L.....	70
Figura 2.33 – Ajuste tentando-se primeiro ajustar os dados iniciais e depois os finais. Ajuste por Recozimento Simulado. $K_M = 251,0$ mmol/L, $V_{m\acute{a}x} = 0,23$ mmol/(L.s), $K_i = 1,50$ mmol/L, $[NH_0] = 514$ mmol/L.	70
Figura 2.34 – Hidrólise por aproximadamente 7 horas (25.000 s) das proteínas do farelo de soja, a 55°C, pH 9, 0,5% (m_{enz}/m_s).	71
Figura 2.35 – Ajuste por Recozimento Simulado. $K_M = 434,2$ mmol/L, $V_{m\acute{a}x} = 0,50$ mmol/(L.s), $K_i = 10,2$ mmol/L, $[NH_0] = 110$ mmol/L.	72
Figura 2.36 – Região de confiança linear. Par K_M e $V_{m\acute{a}x}$	72
Figura 2.37 – Região de confiança não-linear. Par K_M e $V_{m\acute{a}x}$	73
Figura 2.38 – Região de confiança linear. Par K_i e K_M	73
Figura 2.39 – Região de confiança não-linear. Par K_i e K_M	73
Figura 2.40 – Região de confiança linear. Par K_i e $V_{m\acute{a}x}$	74

Figura 2.41 – Região de confiança não-linear. Par K_i e $V_{m\acute{a}x}$.	74
Figura 2.42 – Hidrolisados das proteínas do farelo de soja concentrado, após extração das proteínas em solução de SDS e DTT, em 8 diferentes graus de hidrólise, a 55 °C, pH 9, 90% umidade e 0,5% (m_{enz}/m_s).	75
Figura 2.43 – Concentração do pseudocomponente 1 (peptídeos maiores ou iguais a 66.000 Da) em função do grau de hidrólise.	76
Figura 2.44 – Concentração do pseudocomponente 2 (peptídeos com tamanho entre 65.999 e 29.000 Da) em função do grau de hidrólise.	76
Figura 2.45 – Concentração do pseudocomponente 3 (peptídeos com tamanho entre 28.999 e 14.175 Da) em função do grau de hidrólise.	77
Figura 2.46 – Concentração do pseudocomponente 4 (peptídeos com tamanho entre 14.174 e 5.733 Da) em função do grau de hidrólise.	77
Figura 2.47 – Concentração do pseudocomponente 5 (peptídeos com tamanho entre 5.732 e 238 Da) em função do grau de hidrólise	78
Figura 2.48 – Concentração do pseudocomponente 6 (peptídeos com menores do que 238 Da) em função do grau de hidrólise.	78
Figura 2.49 – Concentração dos pseudocomponentes gerados pelo modelo neural	80
Figura 2.50 – Dispersão dos dados de teste nas predições	80
Figura 3.1 – Esquema proposto para processo de hidrólise do farelo de soja desengordurado	83
Figura 3.2 – Exemplo de reatores para hidrólise enzimática em escala industrial	84
Figura 3.3 – Processos mais indicados para determinadas porcentagens de sólidos existentes no início e desejadas no fim do processo	85
Figura 3.4 Algoritmo de Van't Land para seleção de secadores em batelada	88
Figura 3.5 – Algoritmo de Van't Land para a seleção de secadores contínuos	89
Figura 3.6 – Esquema de um secador rotativo com aquecimento indireto	90
Figura 3.7 – Processo de produção de farinha de peixe	92
Figura 3.8 – Balanço de massa para o processo de produção de farinha de peixe	93
Figura 3.9 – Aparência do produto final de um hidrolisado de soja	103
Figura 3.10 – Proposta de arranjo para a produção de hidrolisados de proteína de soja	109
Figura 3.11 – Balanço de massa para o reator	110
Figura 4.1 – Sugestão de arranjo para trabalhos futuros	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Composição média da semente de soja	40
Tabela 2.2 – Composição nutricional para alguns produtos a base de soja.....	40
Tabela 2.3 – Composição de aminoácidos de alguns farelos desengordurados de oleaginosas	41
Tabela 2.4 – Relações enzima/substrato (m/m) testadas e respectivas massas de enzima para se chegar a essa relação	49
Tabela 2.5 – Valores do grau de hidrólise considerando-se apenas no efeito da hidrólise enzimática após três horas de reação	59
Tabela 2.6 – Tempo que se leva para se chegar a um determinado valor de grau de hidrólise para um dado valor de pH – devido a falha experimental, não foi possível anotar o tempo correspondente a pH = 10 e GH = 7	63
Tabela 2.7 – Divisão dos cromatogramas das amostras para análise da distribuição de peptídeos ao longo da hidrólise	64
Tabela 2.8 – Estimativas iniciais, limites inferior e superior para a busca pelos parâmetros ótimos pelo método do Recozimento Simulado utilizando $[NH_0] = 110$ mmol/L	71
Tabela 3.1 – Preços das matérias-prima	102
Tabela 3.2 – Custos das utilizadas.....	107
Tabela 3.3 – Custo dos equipamentos	110
Tabela 3.4 – Sumário executivo	111
Tabela A.1 – valores de bias das camadas da rede neural.....	124
Tabela A.2 – valores dos pesos da camada oculta.....	124
Tabela A.3 – valores dos pesos da camada de saída	124

RESUMO

A soja e seus derivados possuem propriedades desejadas à alimentação tanto de humanos quanto de vários animais devido a seu alto teor protéico, o que está associado a um bom equilíbrio de aminoácidos. Porém, quando a proteína é hidrolisada em peptídeos menores, seu valor nutricional pode aumentar ainda mais. Um produto com grande valor nutricional agregado, mas que não é viável economicamente, não é interessante para a indústria. Para analisar tal viabilidade, existem softwares que simulam e analisam economicamente a planta de um processo. Assim, este trabalho teve como objetivo, primeiramente, desenvolver dois modelos: um que relacionasse o tempo com o grau de hidrólise obtido na reação de hidrólise enzimática das proteínas do farelo de soja concentrado pela enzima Novo-Pro D e outro que relacionasse esse grau de hidrólise com seu perfil peptídico gerado. Posteriormente, escolhido um grau de hidrólise e seu perfil peptídico, modelar e simular, nessas condições, uma possível planta industrial, na fase de projeto preliminar, para a hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado. Por fim, a viabilidade econômica dessa planta foi analisada, utilizando-se para isto o software SuperPro Designer. Para o ajuste dos modelos matemáticos, foram feitos testes em escala laboratorial, utilizando um pHstato, equipamento que faz medidas do grau de hidrólise e um cromatógrafo líquido, para a análise do perfil peptídico formado após a hidrólise. Os dados obtidos pelos experimentos foram analisados e as condições de hidrólise que apresentaram melhores benefícios foram utilizadas para se fazer o ajuste dos modelos. Os resultados obtidos, em relação às melhores condições, foram 90% umidade, temperatura de 55 °C, pH 9 e relação enzima/substrato de 0,5% (m/m). O ajuste cinético foi muito bem descrito pelo modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva, assim como a rede neural descreveu de maneira satisfatória a relação entre a concentração dos pseudocomponentes em um dado grau de hidrólise. Em relação à análise do projeto preliminar de uma planta para a produção de hidrolisados protéicos de farelo de soja concentrado, a planta se mostrou viável economicamente, mas o resultado guarda muitas incertezas, devido ao projeto se encontrar em uma fase muito preliminar e devido à falta de muitos dados de processo, que foram estimados.

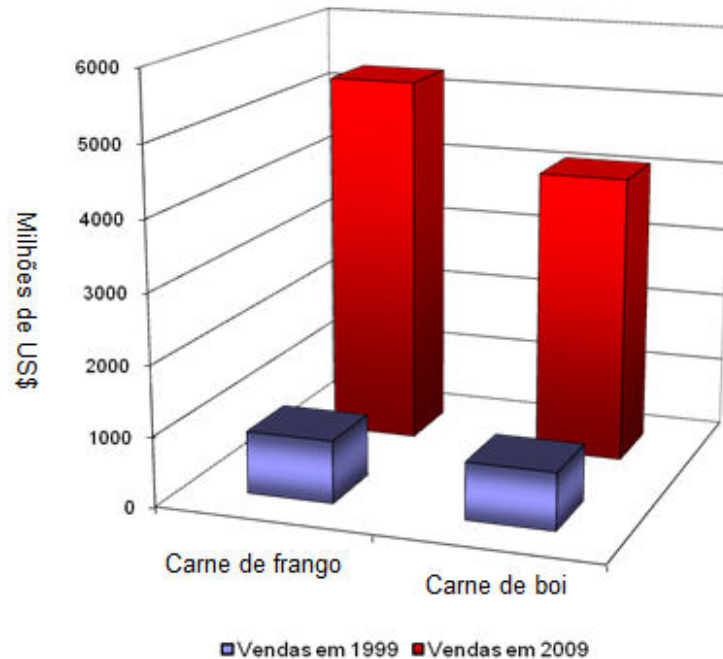
ABSTRACT

Soybean and its derivatives have the desired properties for food either for humans or various animals because of its high protein content, which is associated to a good balance of amino acids. However, when the protein is hydrolyzed into smaller peptides, the nutritional value can increase further. A product with high nutritional value added but which does not present economic viability is not interesting for the industry. To analyze such viability, there are softwares that simulate and analyze a process plant. Thus, this study is two-fold: the mathematical modeling of the hydrolysis process and a preliminary analysis of economic viability. Concerning the modeling, two models were fitted: one that relates time with the degree of enzymatic hydrolysis of proteins of concentrated soybean meal and another that relates the degree of hydrolysis with the molecular weight distribution of the pseudocomponents. The analysis of economic viability was conducted using software SuperPro Designer. For this purpose, a degree of hydrolysis and its molecular weight distribution was chosen, and then, an industrial plant was modeled and simulated in a preliminary project level. For the kinetic model, hydrolysis was conducted in laboratorial scale, using a pHstat and an enzyme called Novo-Pro D. The product was analyzed by liquid chromatography. The data were analyzed and the ones obtained in the best conditions were used to fit the model. The best conditions were 55°C, pH 9, 90% humidity, 0,5% m(enz/sub). The kinetic fitting was well described by the Michaelis-Menten with competitive inhibition and neural network described with high fidelity the relation between the concentration of the pseudocomponents and the degree of hydrolysis. Regarding the analysis of the preliminary project of an industrial plant for the production of hydrolyzed protein of concentrated soybean meal, the plant was economic viable, but the project is in a very preliminary stage, due to a lot of unknown data so they were estimated increasing the uncertainty of results.

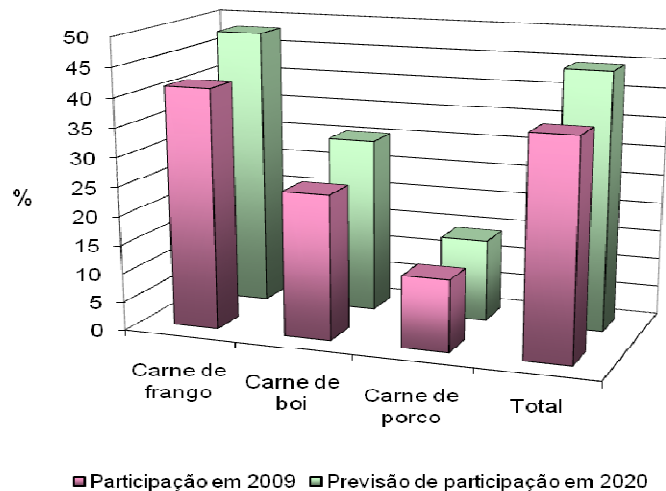
1 INTRODUÇÃO

Em 2009, o comércio mundial de carne bovina movimentou US\$ 21,20 bilhões e o de carne de frango US\$ 9,93 bilhões. Desses números, o Brasil teve 25% de participação no mercado bovino e 41,4% no de frango. Projeções para 2020 estimam que a participação do Brasil nesses mercados e no comércio de carne suína deve aumentar ainda mais, como mostra a Figura 1.1.

Figura 1.1 – Participação do Brasil no mercado mundial de carnes
(a) Volume de vendas do Brasil no mercado internacional



(b) Participação do Brasil no mercado mundial



Fonte: figura elaborada pela autora com base nos dados do CENTRO INTERNACIONAL DE NEGÓCIOS DO PARANÁ, 2010.

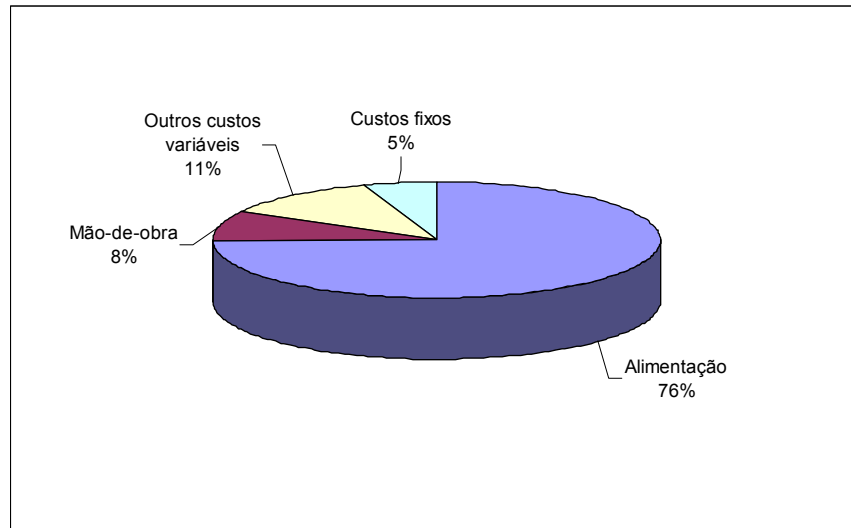
A aqüicultura, por sua vez, movimenta US\$ 11,75 bilhões no mundo inteiro. Estima-se que até 2022 o consumo mundial de pescado aumente dos atuais 16 kg/habitante/ano para 22,5 kg/habitante/ano, o que representa um aumento de consumo de mais de 100 milhões de toneladas/ano. No Brasil, a demanda nos supermercados cresceu 15% nos últimos três anos (PORTAL BRASIL, 2010).

Estes dados e tendências tornam o mercado de carne para consumo humano não só interessante para os próprios produtores destas carnes quanto para fabricantes que produzem ou pretendem produzir insumos para este mercado.

Este setor da economia é considerado uma *commodity*. Assim, as empresas desse setor dificilmente conseguem aumentar seus lucros pela diferenciação de seus produtos, de tal forma que reduzir os custos é uma alternativa muito mais viável quando se deseja aumentar a lucratividade de um empreendimento desta área.

O custo da ração para a alimentação desses animais representa uma parcela significativa no custo total de produção. A Figura 1.2 mostra a distribuição dos custos na produção de suínos para abate.

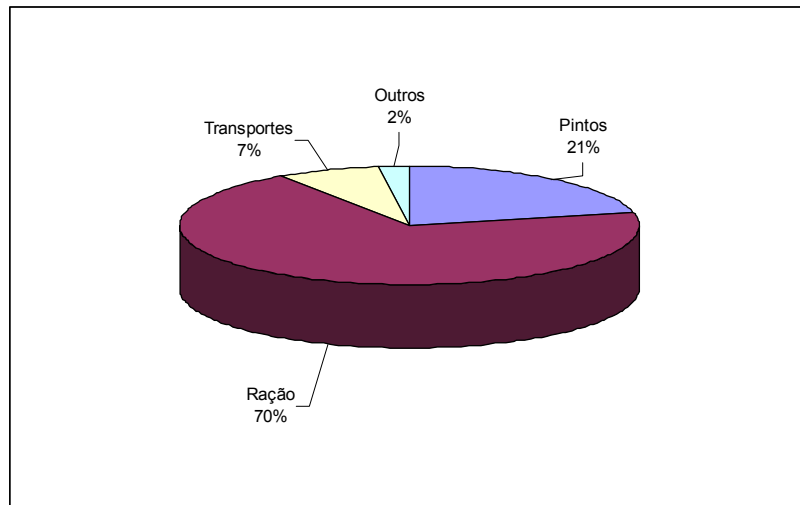
Figura 1.2 – Custos de produção de suínos para abate



Fonte: figura elaborada pela autora com base nos dados da EMBRAPA, 2010 – dados do estado de Pernambuco.

O mesmo se observa com os custos de produção do frango na agroindústria, com mostra a Figura 1.3.

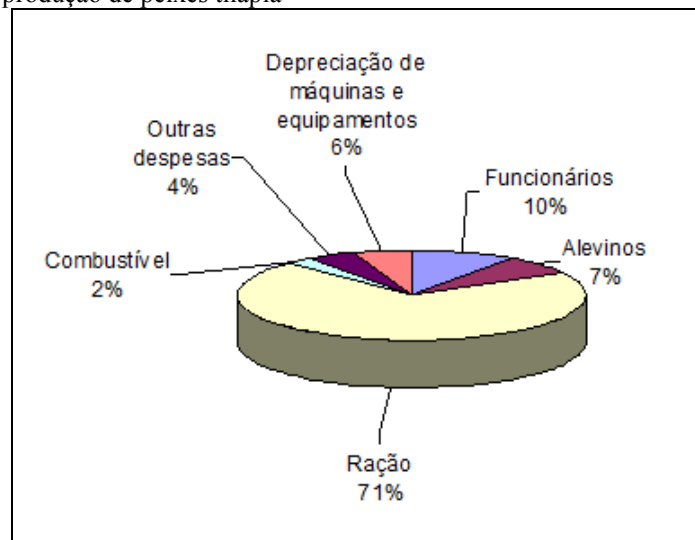
Figura 1.3 – Custos de produção de frango na agroindústria



Fonte: figura elaborada pela autora com base nos dados da EMBRAPA, 2010 – dados do Estado de São Paulo.

Praticamente o mesmo se observa no custo de criação de peixes, como mostrado na Figura 1.4.

Figura 1.4 – Custos de produção de peixes tilápia



Fonte: figura elaborada pela autora com base nos dados de MILITÃO *et al.*, 2007.

Apesar da ração representar mais de 70% dos custos de produção, não se pode reduzir os custos de ração diminuindo a quantidade fornecida por animal nem optar por rações mais baratas, mas que não tenham a quantidade nutricional mínima recomendada. Torna-se interessante então, a obtenção de rações com maior valor nutricional agregado, de forma que, mesmo que o produtor pague mais caro pela mesma quantidade de ração, seja necessária uma quantidade menor por cabeça e que por fim, essa mudança resulte na redução de custos.

Dentre os nutrientes necessários à alimentação de aves, peixes, suínos e bovinos, está a proteína. A proteína representa, em média, 18,5% da composição da ração

para suínos, 19,5% para frangos, de 35 a 50% para peixes e 6% para bovinos (BÜNGE ALIMENTOS, 2008; EMBRAPA, 2007; TAKAHASHI, 2011).

A soja se destaca como o alimento de origem vegetal com maior porcentagem de proteína em sua constituição, tornando-se interessante seu uso na composição das rações como a fonte de suprimento protéico (FISCHER, 2006).

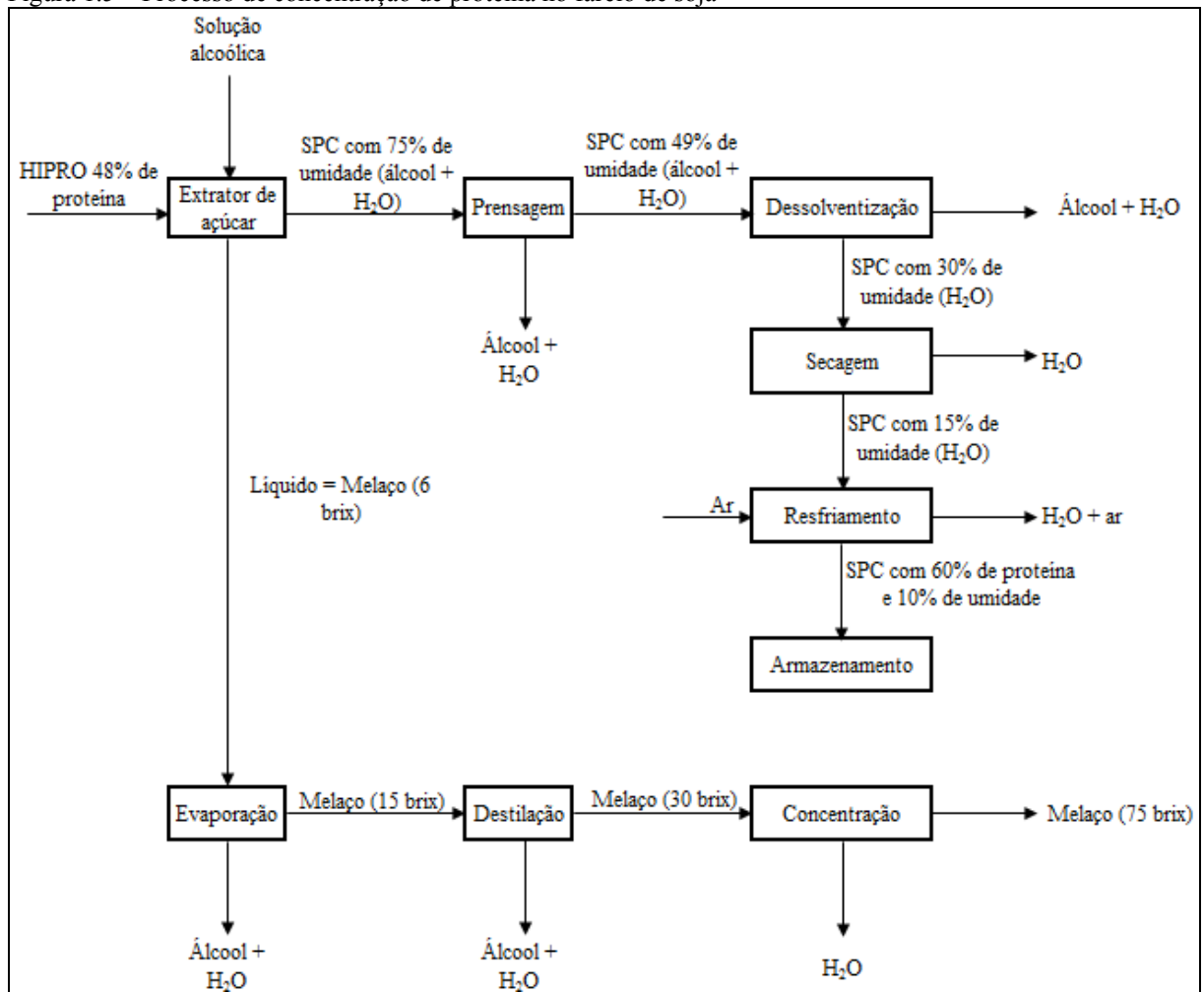
Do ponto de vista de quem fabrica a ração, desenvolver novas rações com melhores condições nutricionais é também interessante para não perder mercado e até para aumentar sua fatia do mercado já conquistada, além de também poder aumentar o lucro. Mas, uma análise minuciosa deve ser feita antes de qualquer implantação, para evitar perdas significativas de capital. Para isso, um projeto deve ser elaborado, as possíveis alternativas podem ser simuladas para se determinar as respostas obtidas de cada uma e a análise de viabilidade econômica pode ser utilizada para se determinar qual é melhor e se a melhor proporcionará ganhos para a empresa.

A empresa IMCOPA, localizada na cidade de Araucária – PR, tem como um de seus produtos o farelo de soja e ciente da necessidade de se produzir uma ração com maior valor nutricional agregado fez uma parceria com a Universidade Federal de São Carlos para desenvolver em conjunto este e outros estudos.

A IMCOPA já produz o farelo de soja concentrado. Após ser separado do óleo de soja, o farelo de soja denominado HIPRO, com 48% de proteína, passa por uma extração com solução alcoólica para retirada de açúcares solúveis. Assim, o farelo resultante, denominado Concentrado Protéico de Soja (SPC), passa a ter uma concentração protéica em base seca que varia entre 60 a 72%.

A Figura 1.5 mostra o processo de concentração da proteína no farelo.

Figura 1.5 – Processo de concentração de proteína no farelo de soja



Fonte: IMCOPA, 2010.

1.1 OBJETIVOS

É nesse contexto que este trabalho teve como objetivo observar como o perfil peptídico gerado pela reação de hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado por uma enzima se comporta em função de seu grau de hidrólise a fim de se entender que tipo de peptídeos são gerados na reação em determinados intervalos de tempo e como esse grau de hidrólise se comporta ao longo do tempo. Ainda verificou-se, em uma análise preliminar, se é viável economicamente produzir um farelo de soja hidrolisado, com um determinado grau de hidrólise e perfil peptídico, para uma ração com maior valor nutricional agregado, que seja tanto interessante para os produtores de animais quanto para o próprio produtor da ração.

2 MODELAGEM MATEMÁTICA DA REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DAS PROTEÍNAS DO FARELO DE SOJA CONCENTRADO

2.1 REVISÃO DA LITERATURA

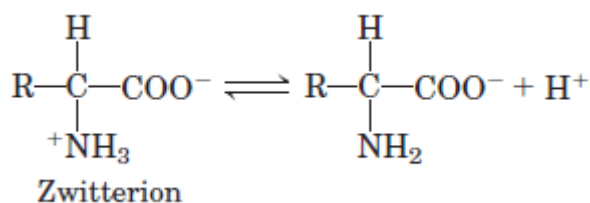
2.1.1 As proteínas

As proteínas são macromoléculas biológicas formadas por pelo menos 100 das unidades que as constituem, denominadas resíduos de aminoácidos. Os aminoácidos são moléculas formadas por um carbono que se liga a pelo menos um grupo amino e a um grupo carboxila. A quarta ligação desse carbono é a responsável por definir esse aminoácido. Quando dois aminoácidos se ligam covalentemente e há a liberação de uma molécula de água, um dipeptídeo é formado, a ligação entre eles é chamada de ligação peptídica e os aminoácidos que perderam ou um hidrogênio ou uma hidroxila para a formação da molécula de água, são denominados resíduos de aminoácidos. Quando um pequeno conjunto de aminoácidos se ligam, tem-se um oligopeptídeo. Quando muitos, um polipeptídeo. Apesar dos termos polipeptídeo e proteína serem usados, muitas vezes, indistintamente, costuma-se referir a polipeptídeos moléculas com massa molecular inferior a 10.000 e a proteínas com massas moleculares superiores (NELSON; COX, 2002).

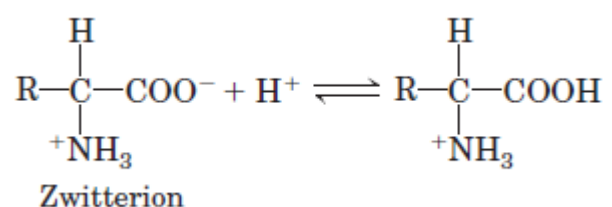
Quando um aminoácido é dissolvido em água, ele existe em solução como um íon dipolar (também chamado de *zwitterion*), ou seja, esse aminoácido pode existir na solução como um ácido (um doador de prótons) ou como uma base (receptor de prótons). A Figura 2.1 mostra este comportamento para um aminoácido genérico.

Figura 2.1 – Comportamento ácido ou básico de um aminoácido em uma solução

a) Aminoácido agindo como um ácido



b) Aminoácido agindo como uma base

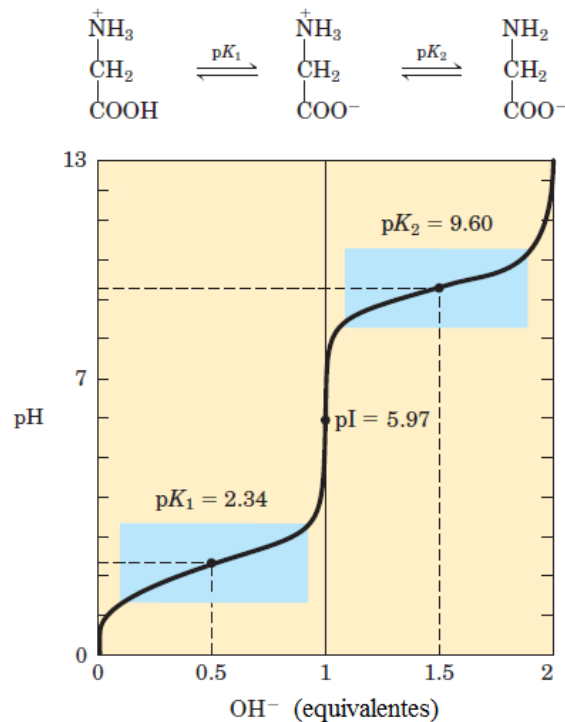


Fonte: NELSON; COX, 2002.

Dessa forma, quando se realiza a titulação ácido-base de um aminoácido, pela adição ou retirada de prótons de forma gradual, obtém-se uma curva com dois estágios distintos, que correspondem a desprotonação de dois grupos diferentes do aminoácido. Como

exemplo, a Figura 2.2 apresenta a curva de titulação do aminoácido glicina, cujo radical R é formado por um hidrogênio.

Figura 2.2 – Curva de titulação para a glicina



Fonte: NELSON; COX, 2002.

O primeiro estágio é caracterizado pela perda de um próton do grupo carboxila e o segundo, pela perda de próton do grupo amina. Ambos os estágios são caracterizados por um ponto de inflexão. Este ponto ocorre quando a forma protonada e desprotonada do grupo em questão permanecem em equilíbrio em iguais concentrações na solução. O aminoácido pode também ser encontrado eletricamente neutro na solução e o pH em que isto acontece é denominado pH isoelétrico (pI). A forma iônica em que um aminoácido é encontrado, seja livre ou em um peptídeo ou proteína, pode ter grande importância em métodos de análise, como por exemplo na eletroforese (NELSON; COX, 2002).

Os aminoácidos e as proteínas estão intimamente relacionados com os processos vitais das células e, por conseqüência, de todo o organismo. Eles atuam ativamente no suprimento das necessidades de crescimento, recuperação dos tecidos, gestação e reprodução de um ser vivo. Mas, para que esse ser sintetize suas próprias proteínas e supra suas necessidades, ele precisa consumir proteínas de outras fontes, pois embora os organismos consigam até sintetizar alguns aminoácidos mais simples, muitos não são sintetizados em velocidade suficiente para atender a essas necessidades orgânicas. A falta dessas proteínas e

aminoácidos pode causar aumento da síntese de gordura, aumento da sensibilidade aos contaminantes de alimentos, crescimento reduzido, redução da eficiência alimentar, reprodução ineficiente e problemas com a aparência de pêlos, pele e penas (SIMAS, 2005).

Grande parte desses processos em que as proteínas estão intimamente ligadas se deve principalmente à forma da proteína. Assim, as proteínas podem ser classificadas de acordo com sua estrutura:

- Estrutura primária: corresponde à seqüência em que os aminoácidos estão ligados na proteína.
- Estrutura secundária: é dada pelo arranjo espacial dos resíduos de aminoácidos próximos entre si na seqüência linear. Existem duas formas gerais de estrutura secundária, a folhear e a helicoidal. Para alguns tipos de proteína, este é o último nível de organização.
- Estrutura terciária: é dada pelo arranjo espacial, desta vez, devido às interações dos grupos R amplamente separados ao longo da cadeia. Normalmente estas interações são fracas, do tipo ponte de hidrogênio, efeito iônico e interações hidrofóbicas e assim, podem ser facilmente rompidas causando a desnaturação da proteína.
- Estrutura quaternária: ocorre apenas com proteínas que possuem mais de uma cadeia principal e se dá pela forma como essas cadeias se ajustam umas às outras por meio de interações semelhantes às da estrutura terciária (NELSON; COX, 2002).

As enzimas são catalisadores biológicos, ou seja, elas aceleram reações químicas. Praticamente todas as enzimas são proteínas, apesar de existirem também enzimas que são formadas por RNAs, as ribozimas. São as enzimas que tornam possíveis os processos metabólicos que ocorrem nas células (KOOLMAN; ROEHN, 2005). Elas possuem grande especificidade pelo seu substrato e possuem um pH e temperatura em que sua atividade catalítica é máxima, isto porque, quando no pH adequado, seus grupos doadores ou receptores de prótons do sítio catalítico se encontram em um estado de ionização adequado para promover a reação e quando na temperatura adequada, as colisões são favorecidas, aumentando a velocidade da reação. Por outro lado, certos valores de pH e temperatura podem alterar sua configuração de forma a desnaturar esta enzima, fazendo com que não seja mais possível a realização da reação de catálise (SILVA, 2000).

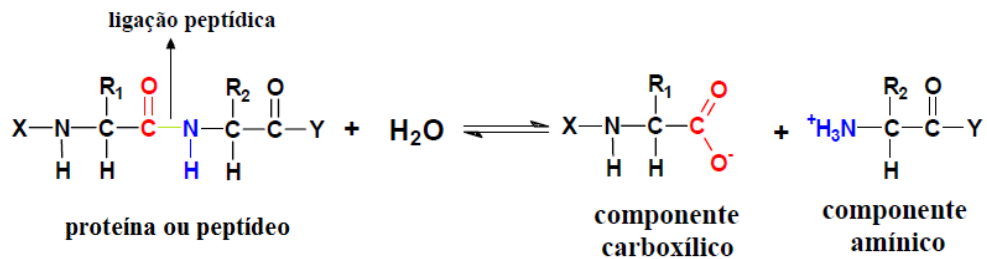
Existem enzimas cuja reação catalítica é a quebra das ligações peptídicas dos resíduos de aminoácidos das proteínas. Essas enzimas são conhecidas como proteases. Dependendo da posição da ligação peptídica clivada, estas enzimas podem ser classificadas como endoproteases e exoproteases. As endoproteases quebram preferencialmente as ligações internas da cadeia peptídica e as exoproteases atuam apenas nas ligações peptídicas próximas

das extremidades da cadeia peptídica das proteínas ou peptídeos (NILL, 2002; ROSSI, 2007). As enzimas também podem ser divididas de acordo com seu mecanismo catalítico de ação em 6 grupos: proteases de serina, proteases de cisteína, proteases de ácido aspártico, proteases de treonina, proteases de ácido glutâmico e metaloproteases. O nome dos grupos é baseado em um dos importantes grupos catalíticos do sítio ativo (POLAINA; MACCABE, 2007). Dentro do grupo das proteases de serina ou serina-proteases, existe uma família chamada de subtilisina. As enzimas do tipo subtilisina tem grande importância industrial, principalmente as produzidas por bactérias. Desta forma, além de importantes nos processos biológicos dos seres vivos, as enzimas também encontram aplicações industriais em vários setores. A Novo-Pro D é uma enzima comercial produzida pela empresa Novozymes. É uma serina-endoprotease produzida pela bactéria *Bacillus licheniformis* e apresentada na forma líquida estabilizada em água, glicerol e ácido fórmico (NOVOZYMES, 2011; POLAINA; MACCABE, 2007).

2.1.2 A hidrólise de proteínas

A reação de hidrólise é caracterizada pela clivagem de uma ligação química que liga um átomo ou um grupo de átomos ao resto da molécula, seguida da adição dos elementos da água a esta ligação. As reações de hidrólise são as responsáveis pela despolimerização enzimática de proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. As enzimas que, de forma geral, catalisam as reações de hidrólise são chamadas de hidrolases e aquelas que, mais especificamente, catalisam a hidrólise de proteínas, são denominadas proteases. A Figura 2.3 representa a reação de hidrólise de uma proteína ou peptídeo. A existência de catalisadores biológicos para este tipo de reação reside no fato de que apesar das reações de hidrólise serem quase que invariavelmente exergônicas, a hidrólise de uma ligação peptídica ocorre lentamente por causa de sua alta energia de ativação e como resultado, as ligações peptídicas nas proteínas são bem estáveis, com tempo de meia vida médio de aproximadamente sete anos na maioria das condições intracelulares (NELSON; COX, 2002; NILL, 2002).

Figura 2.3 – Esquema da reação de hidrólise de uma proteína ou de um peptídeo



Nota: X e Y representam o restante da cadeia da proteína ou do peptídeo.

Fonte: figura adapta de TADIOLI, 2003.

Industrialmente, a hidrólise de proteínas pode ser realizada por ácidos, bases ou enzimas. A hidrólise enzimática para fins nutricionais é mais recomendada, pois a especificidade da enzima em relação ao substrato diminui a probabilidade de ocorrerem reações indesejáveis, que resultem na formação de produtos tóxicos, as condições da reação são mais brandas, existe menor formação de sal no produto e como normalmente a concentração de enzima é baixa, sua remoção após a reação normalmente é desnecessária. Além disso, as hidrólises ácidas ou básicas são inespecíficas, aminoácidos como o triptofano, lisina e treonina podem ser destruídos e boa parte dos aminoácidos podem sofrer racemização, ficando o valor nutricional comprometido (ROMAN; SGARBIERI, 2005; BIASUTTI, 2006).

Uma forma quantitativa de se medir a extensão da hidrólise de proteínas é por meio da porcentagem de ligações peptídicas clivadas durante a hidrólise, denominado grau de hidrólise (GH). Dado que o número de ligações peptídicas clivadas durante o processo de hidrólise é chamado de equivalentes em hidrólise e é expresso como equivalentes por kg de proteína (ou meq/g proteína) e se o número total de ligações peptídicas em uma dada proteína for designado como h_{tot} (meq/g_{prot}), é possível calcular o grau de hidrólise por meio da Equação 2.1.

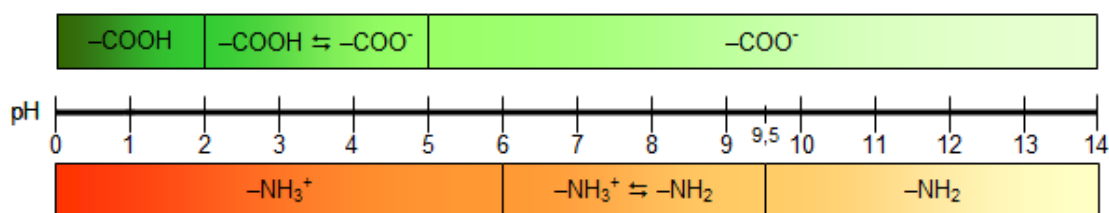
$$GH = \frac{h}{h_{\text{tot}}} * 100 \quad (2.1)$$

O número total de ligações peptídicas em uma proteína, h_{tot} pode ser determinado pela composição de aminoácidos da proteína, como sendo a soma dos mmols dos aminoácidos individuais por grama de proteína. Para a proteína da soja, o valor de h_{tot} é 7,8 meq/g de proteína (ADLER-NISSEN, 1986).

Os grupos aminas e carboxilas livres formados após a hidrólise podem se encontrar mais ou menos ionizados dependendo do valor do pH em que a reação ocorre. Para polipeptídeos, a 25°C, o valor estimado dos pKs para os grupos carboxila e amina se

encontram, respectivamente, nas faixas de 3,1 a 3,6 e 7,5 a 7,8. Assim, como mostrado na Figura 2.4, o grupos carboxilas se encontram não dissociados em pHs abaixo de 2, parcialmente dissociados em valores de pH entre 2 e 5 e totalmente dissociados em pHs acima de 5. Da mesma forma, o grupos aminas se encontram totalmente protonados em pHs abaixo de 6, parcialmente protonados em pHs entre 6 e 9,5 e totalmente desprotonados em pHs acima de 9,5.

Figura 2.4 – Estados de ionização dos grupos carboxila e amina em função do pH



Fonte: figura elaborada pela autora com base nos dados de ADLER-NISSEN, 1986.

Assim, pode-se observar que a hidrólise de proteínas é acompanhada pela liberação ou consumo de H^+ , o que significa que, exceto na faixa de pH entre 5 e 6, em que o consumo e liberação de prótons se cancelam, o pH muda durante a hidrólise. Por outro lado, se o pH for mantido constante ao longo da hidrólise, exceto para a faixa de pH entre 5 e 6, é possível se relacionar o grau de hidrólise com o volume de ácido ou base consumido, como mostra a Equação 2.2, para o caso em que a reação se dá em meio básico. As Equações 2.3 e 2.4 mostram, respectivamente, como se calcula o grau de dissociação e o valor do cologaritmo da constante de ionização, ambos necessários ao cálculo do grau de hidrólise quando relacionado ao volume de base consumida. Acompanhar a adição de base ou ácido ao longo da reação de hidrólise mantendo-se o mesmo pH é a técnica utilizada pelo método do pHstato para, assim, posteriormente se calcular o grau de hidrólise (ADLER-NISSEN, 1986). Desta forma, os tituladores automáticos, equipamento utilizado no método do pHstato, fornecem o volume de base ou ácido consumido ao longo do tempo e conseqüentemente, pode-se ter a evolução da hidrólise, por meio do grau de hidrólise, no tempo.

$$GH = V_b * N_b * \frac{1}{\alpha} * \frac{1}{m_p} * \frac{1}{h_{tot}} * 100 \quad (2.2)$$

$$\alpha = \frac{10^{pH-pK}}{1+10^{pH-pK}} \quad (2.3)$$

$$pK = 7,8 + \frac{298 - T}{298 * T} * 2400 \quad (2.4)$$

Em que,

- GH = grau de hidrólise (%), ou seja, o percentual de ligações peptídicas clivadas ao longo da reação.
- V_b = volume de base adicionada para se manter o pH ao longo da reação (mL).
- N_b = normalidade da base (meq/mL).
- α = grau médio de dissociação dos grupos α -NH₂ (função de T e pH) (adimensional). O valor de α em função de T e pH pode também ser encontrado em Adler-Nissen (1986, p. 123).
- m_p = massa de proteína na amostra (g).
- h_{tot} = número de ligações peptídicas totais em uma proteína. Esse número é expresso em equivalentes por quilograma de proteína ou mili-equivalentes por grama de proteína (meq/g). Para a soja, $h_{tot} = 7,8$. Este valor pode ser determinado pela composição de aminoácidos da proteína, sendo a soma dos mmols dos aminoácidos individuais por grama de proteína.
- pK = média dos valores de pK dos grupos α -amino liberados durante a hidrólise (adimensional). O valor de pK varia de forma significativa com a temperatura, mas não varia com o substrato.
- pH = cologaritmo da concentração de H⁺ (adimensional).
- T = temperatura (K).

Quando uma proteína é hidrolisada, suas propriedades funcionais, como solubilidade, poder emulsificante e textura podem mudar de forma a contribuir para a maior qualidade e atributos sensoriais do alimento. Além disso, seu aproveitamento nutricional também é otimizado, pois o comprimento da cadeia peptídica influencia na taxa de absorção desta cadeia por quem o consome (BIASUTTI, 2006). Proteínas clivadas em oligopeptídeos, especialmente di e tripeptídeos são utilizadas com maior eficácia pelo organismo do que a proteína intacta ou mesmo uma mistura equivalente de aminoácidos livres (SILVA *et al.*, 2009).

2.1.3 Cinética enzimática

A cinética enzimática é o ramo da enzimologia que lida com os fatores que afetam a velocidade das reações catalisadas por enzimas (SEGEL, 1979).

Os fatores mais importantes são (SEGEL, 1979):

- A concentração da enzima;

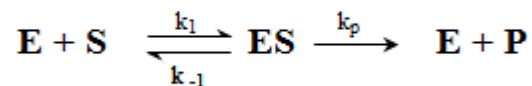
- A concentração dos ligantes (substratos, inibidores e ativadores);
- pH;
- Força iônica;
- Temperatura.

Para Mariotto (2006), a cinética enzimática tem como objetivos:

- Medir a velocidade das transformações que se processam;
- Estudar a influência de condições de trabalho na velocidade (concentração dos reagentes e das enzimas, temperatura, pH, concentrações de ativadores e de inibidores);
- Correlacionar, por meio de equações empíricas ou modelos matemáticos, as velocidades das transformações com alguns dos fatores que as afetam;
- Colaborar na otimização do processo;
- Estabelecer critérios para o controle do processo;
- Projetar o reator mais adequado.

Um modelo matemático para a cinética enzimática envolvendo a reação de apenas substrato e uma enzima foi pela primeira vez desenvolvido por Leonor Michaelis e Maud Menten. Assim, a cinética de uma reação de um substrato e uma enzima é comumente chamada de Michaelis-Menten (SHULER; KARGI, 2006). A Figura 2.5 ilustra uma reação do tipo Michaelis-Menten.

Figura 2.5 – Representação da seqüência de uma reação do tipo Michaelis-Menten



Legenda: E = enzima, S = substrato, ES = complexo enzima-substrato, P = produto.
Fonte: SHULER; KARGI, 2006.

A equação de Michaelis-Menten, descreve a velocidade para uma reação catalisada enzimaticamente e com um único substrato, partindo da hipótese básica de que a etapa limitante da velocidade é a quebra do complexo enzima-substrato (ES) para formar o produto e a enzima livre. A velocidade da reação pode ser calculada como na Equação 2.5.

$$v = V_{\text{máx}} * \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (2.5)$$

Em que,

- v = velocidade instantânea da reação (concentração/tempo).

- $V_{\text{máx}}$ = velocidade máxima (concentração/tempo).
- K_M = constante de Michaelis (concentração). A constante de Michaelis é equivalente à concentração de substrato que fornece metade da velocidade máxima.
- $[S]$ = concentração do substrato (concentração).

A equação de Michaelis-Menten fornece a velocidade instantânea ou inicial relativa a velocidade máxima para uma dada concentração de substrato. Porém, esta equação só é válida em um tempo suficientemente pequeno para que a concentração do substrato permaneça praticamente constante (SEGEL, 1979).

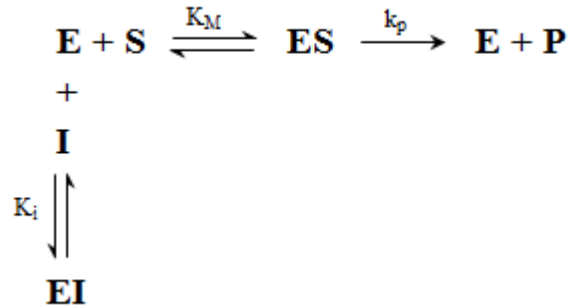
Qualquer substância que reduza a velocidade de uma reação enzimática pode ser considerada como um inibidor. A inibição da atividade enzimática é um dos maiores instrumentos de regulação nas células vivas e um dos mais importantes procedimentos de diagnóstico para os enzimologistas. Alguns tipos de inibição são brevemente descritos a seguir (SEGEL, 1979):

- Inibição competitiva: um inibidor competitivo é uma substância que se combina com uma enzima livre de uma forma tal que impede a ligação do substrato. Isto é, o inibidor e o substrato se excluem mutuamente, em geral porque há uma verdadeira competição pelo mesmo sítio. Um inibidor competitivo poder ser um análogo não metabolizável ou um derivado de um substrato verdadeiro, um substrato substituto da enzima ou ainda um produto da reação.
- Inibição não competitiva: um inibidor não competitivo clássico não tem efeito na ligação do substrato e vice-versa. O substrato S e o inibidor I se ligam reversível, aleatória e independentemente em sítios diferentes. Isto é, I se liga a enzima E e ao complexo ES; S se liga a E e ao complexo EI. Entretanto o complexo ESI resultante é cataliticamente inativo. I pode impedir o posicionamento adequando do centro catalítico.
- Inibição irreversível: é quando um substrato se combina irreversivelmente com uma enzima. Este tipo de inibição pode assemelhar-se à inibição não competitiva, pois $V_{\text{máx}}$ diminui ao passo que K_M permanece a mesma.
- Inibição incompetitiva: um inibidor incompetitivo clássico é um composto que se liga reversivelmente ao complexo enzima-substrato, fornecendo um complexo ESI inativo, porém, o inibidor não se liga a enzima livre. A inibição incompetitiva é comum em sistemas multirreacionais.

• Retroinibição: é quando o produto final ou quase final controla o fluxo metabólico, inibindo uma ou mais reações anteriores do caminho seqüencial biossintético que ocorre em um organismo.

A Figura 2.6 apresenta o esquema de uma reação do tipo Michaelis-Menten com inibição competitiva.

Figura 2.6 – Representação da reação do tipo Michaelis-Menten com inibição competitiva



Legenda: E = enzima, S = substrato, P = produto, I = inibidor, k_p = constante de velocidade, K_M = constante de Michaelis, K_i = constante de inibição.

Fonte: SEGEL, 1979.

A Equação 2.6 descreve a cinética enzimática para a reação do tipo Michaelis-Menten com inibição competitiva.

$$v = V_{m\acute{a}x} * \frac{[S]}{K_M * \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (2.6)$$

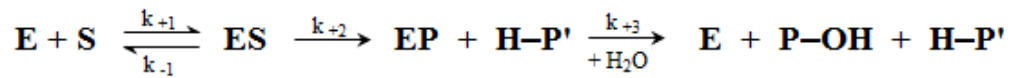
Em que,

- v = velocidade instantânea da reação (mmol/(L.s)).
- $V_{m\acute{a}x}$ = velocidade máxima (mmol/(L.s)).
- K_M = constante de Michaelis (mmol/L).
- K_i = constante de Michaelis (mmol/L).
- $[S]$ = concentração do substrato (mmol/L).
- $[I]$ = concentração do inibidor (mmol/L).

De acordo com Svendsen (1976) citado por Adler-Nissen (1986), a hidrólise realizada por uma enzima do tipo serina-protease ocorre na forma de três reações consecutivas: (1) A formação do complexo entre a cadeia peptídica original (o substrato) e a enzima. (2) A clivagem da ligação peptídica e a liberação de um dos dois peptídeos resultantes. (3) O ataque nucleofílico na parte resultante do complexo para que o outro

peptídeo seja liberado e para a reconstituição da enzima livre. A Figura 2.7 mostra o esquema de uma reação de hidrólise realizada por uma serina-protease.

Figura 2.7 – Esquema de uma reação de hidrólise catalisada por uma serina-protease



Fonte: ADLER-NISSEN, 1986.

Quando uma serina-protease age em uma ligação peptídica, a etapa de acilação, ou seja, a segunda das três reações é a etapa determinante da velocidade de reação. Isto significa que a velocidade da reação é determinada por k_{+2} e que K_M é aproximadamente igual a constante de dissociação k_{-1}/k_{+1} . Em outras palavras, a reação de hidrólise comandada por uma serina-protease pode ser descrita cineticamente pelo modelo de Michaelis-Menten.

A cinética segundo Michaelis-Menten para a reação de hidrólise por uma serina-protease pode ser escrita em função do número de ligações peptídicas hidrolisadas, da mesma forma em que foi feito em Sousa Jr. *et al.* (2004). A Equação 2.7 apresenta a velocidade em função das ligações peptídicas hidrolisadas segundo o modelo de Michaelis-Menten e a Equação 2.8 mostra a velocidade em função das ligações peptídicas hidrolisadas segundo o modelo de Michaelis-Menten com inibição competitiva. Muitas vezes, ligações peptídicas já hidrolisadas podem atuar como inibidores.

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} * (NH_0 - I)}{K_M + (NH_0 - I)} \quad (2.7)$$

$$v = \frac{V_{m\acute{a}x} * (NH_0 - I)}{K_M * \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + (NH_0 - I)} \quad (2.8)$$

Em que,

- v = velocidade instantânea da reação (mmol/(L.s)).
- $V_{m\acute{a}x}$ = velocidade máxima (mmol/(L.s)).
- K_M = constante de Michaelis (mmol/L).
- K_i = constante de Michaelis (mmol/L).
- NH_0 = concentração de ligações peptídicas hidrolisáveis totais (mmol/L).
- I = concentração de ligações peptídicas hidrolisadas (mmol/L).

Nas Equações 2.7 e 2.8, $(NH_0 - I)$ dá a concentração das ligações peptídicas ainda hidrolisáveis, sendo equivalente à concentração de substrato da equação original de Michaelis-Menten. A concentração total de ligações peptídicas hidrolisáveis pode ser calculada pela multiplicação da concentração de proteína na amostra pelo número total de ligações peptídicas hidrolisáveis por grama na proteína, como mostra a Equação 2.9.

$$NH_0 = h_{tot} * C_{prot} \quad (2.9)$$

Em que,

- NH_0 é dada em mmol/L.
- h_{tot} é dado em mili-equivalentes/g, que aqui equivale a mmol/g.
- C_{prot} é dado em g/L.

A concentração de ligações peptídicas hidrolisadas pode ser calculada utilizando-se o valor do grau de hidrólise atingido na reação, no dado momento, como mostrado na Equação 2.10.

$$I = \frac{GH}{100} * NH_0 \quad (2.10)$$

2.1.4 Perfil peptídico

O grau de hidrólise indica a porcentagem de ligações peptídicas clivadas e a cinética enzimática para reações de hidrólise conta a taxa com que essas ligações são quebradas ao longo do tempo, mas apenas por elas não é possível se ter informações sobre a composição do produto formado, ou seja, o peso molecular ou a distribuição dos pesos moleculares do produto formado. Para isto, existem técnicas como a eletroforese em gel com dodecilsulfato de sódio (SDS), ultracentrifugação, filtração em gel, entre outros.

Na eletroforese em gel com SDS, que é um detergente aniônico que destrói efetivamente a estrutura quaternária da maioria das proteínas multiméricas, se liga fortemente às subunidades da proteína, encobrindo a carga original dessa proteína. Ao se aplicar um campo elétrico, os complexos SDS-proteína migram em direção ao pólo positivo com mais ou menos a mesma proporção de carga/massa. Se a eletroforese for realizada em gel de poliacrilamida, a mobilidade do complexo SDS-proteína depende quase que exclusivamente do seu tamanho que pode ser obtido comparando-se com uma curva padrão construída usando-se proteínas cujos pesos moleculares de seus monômeros sejam conhecidos.

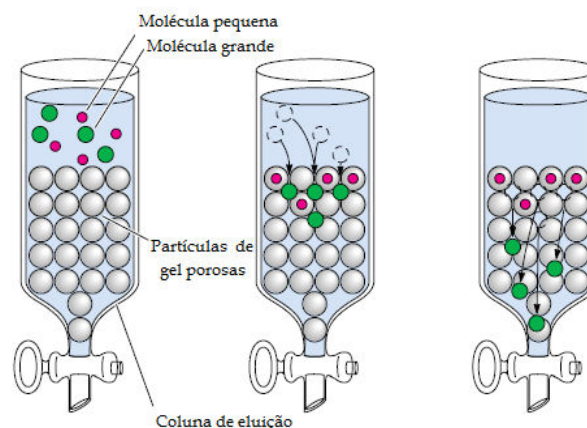
Já a ultracentrifugação baseia-se no princípio de que as moléculas de maiores pesos moleculares sedimentam mais rápido e se difundem mais devagar do que as moléculas de baixo peso molecular.

A filtração em gel é um processo de peneiração molecular que pode ser usado para separar proteínas de acordo com seu tamanho. O meio físico com propriedades de peneiração é um gel tal como Sephadex (copolímero de dextrana de ligação cruzada), Biogel (poliacrilamida) ou pérolas de vidro de poro controlado. Considera-se que o gel possui poros com um diâmetro fixo dentro de uma determinada faixa.

O processo baseia-se no fato de que moléculas de diâmetros menores do que os dos poros penetram facilmente nas partículas do gel, enquanto que moléculas cujos diâmetros são maiores do que os dos poros são completamente excluídas do gel. Moléculas de tamanho intermediário podem penetrar em algumas partículas do gel, porém, comparando-se com o número de moléculas de tamanho menor, uma maior proporção de moléculas de tamanho intermediário permanecerá fora do gel. Todavia, estas moléculas são excluídas a uma velocidade menor do que aquela em que são as moléculas de tamanho maior.

Uma pequena quantidade de solução contendo moléculas de diferentes tamanhos é aplicada em uma coluna contendo gel. A solução aplicada é então eluída através da coluna por meio de um tampão apropriado. O volume de líquido total da coluna é a soma do volume de líquido fora das partículas do gel mais o volume de líquido dentro das partículas de gel: $V_{\text{tot liq}} = V_f + V_i$. As moléculas muito grandes são eluídas assim no V_f e saem da coluna em primeiro lugar. As moléculas de tamanho intermediário são eluídas a seguir. As moléculas muito pequenas, que devem ser eluídas através do $V_f + V_i$, são eluídas por último (SEGEL, 1979), como mostra a Figura 2.8.

Figura 2.8 – Coluna de filtração em gel



Fonte: GARRETT; GRISHAM, 2005.

A filtração em gel é o método mais conveniente para se estimar o peso molecular de uma proteína. Este método não requer uma proteína pura, homogênea. Tudo que é necessário é um método para detectar a proteína quando esta eflui da coluna (SEGEL, 1979).

A coluna de filtração em gel pode ser utilizada em um equipamento de cromatografia líquida de alto desempenho. Nele, após as proteínas saírem da coluna, passam por um detector. Com o sinal do detector, traça-se um cromatograma (ou perfil peptídico, para análise de proteínas e peptídeos) e por ele é possível se obter a massa molecular e concentração dos componentes da amostra por meio da comparação com uma curva de calibração feita com padrões de peptídeos de massa molecular e concentração conhecidas.

Muitas vezes, quando se hidrolisam proteínas, o produto obtido é constituído por uma ampla faixa de peptídeos, tornando-se assim difícil a quantificação individual de cada tipo de molécula formada por meio de padrões destas moléculas injetadas no cromatógrafo líquido. Desta forma, se torna necessário lançar mão de outros métodos que quantifiquem pelo menos faixas de tamanho das moléculas formadas. Foram encontrados, na literatura, 4 diferentes métodos de se caracterizar estas faixas de peptídeos formados, chamados de pseudocomponentes: método das áreas cromatográficas (GUPTA, 1983), o método Sousa Jr *et al.* (2003), o método Silvestre *et al.* (1994) e o método de Kjeldahl descrito por LABCONCO (2010).

O método das áreas cromatográficas (GUPTA, 1983) considera que a área do cromatograma é diretamente proporcional à concentração de proteínas e peptídeos presentes na amostra. Assim, a caracterização do produto é obtida pela divisão do cromatograma em várias regiões, regiões estas, limitadas pelo tempo de retenção de marcadores de massa molecular, e pelo cálculo percentual de cada fração de área cromatográfica em relação à área total do cromatograma. Conhecendo-se a concentração total de proteínas na amostra, supõe-se que o percentual em área é igual ao percentual em massa de peptídeos.

O método proposto por Sousa Jr. *et al.* (2003) baseia-se em se levantar curvas de calibração a partir de padrões, com concentração e massa molecular conhecidas, e correlacionar a área cromatográfica e tempo de retenção com a concentração do analito. Para se obter a equação que determina as concentrações do analito em diferentes amostras, primeiro procede-se à determinação da relação do tempo de retenção dos marcadores de massa molecular com a função logaritmo da massa molecular desses marcadores e depois se determina a relação entre a área cromatográfica e a concentração do analito. O fato de

considerar o tempo de retenção no cálculo da concentração é uma maneira de corrigir o efeito do tamanho molecular na absorvidade dos peptídeos e proteínas.

No método proposto por Silvestre *et al.* (1994a, b), a quantificação é feita de maneira similar ao método das áreas cromatográficas, porém, a interferência dos aminoácidos aromáticos é eliminada das áreas cromatográficas, por meio da correção desta área. Esta correção é possível subtraindo-se o valor de área cromatográfica, obtida a 230 nm, resultante da absorção de aromáticos. Este método considera que, para uma mesma massa de peptídeos em duas amostras diferentes, podem-se obter diferentes áreas cromatográficas em função da quantidade de aromáticos em cada uma delas. Assim, a concentração de peptídeos pode ser superestimada em amostras contendo elevado número de aromáticos.

O último método proposto para a caracterização de hidrolisados protéicos é o de Kjeldahl, proposto por Johan Kjeldahl em 1883. Este método faz a quantificação de proteínas e peptídeos pela quantificação do nitrogênio liberado após a hidrólise ácida. Este método é amplamente conhecido e utilizado na análise de proteínas (LABCONCO, 2010). No caso da caracterização dos pseudocomponentes, a amostra deve ser fracionada em cada pseudocomponente para depois se quantificar o nitrogênio liberado em cada um. O fracionamento pode ser realizado por um cromatógrafo líquido que tenha o módulo de fracionamento. Para se quantificar o nitrogênio liberado, primeiro se procede à digestão da amostra com ácido sulfúrico, posteriormente adiciona-se hidróxido de sódio à amostra digerida e realiza-se a destilação desta amostra, em que a amônia liberada é absorvida por uma solução de ácido bórico. Por fim, a amostra é titulada com ácido clorídrico. A quantificação de peptídeos presentes é feita considerando-se que para cada 10 mL de HCl (0,01 M) consumido há 0,0014 g de nitrogênio, com isso, pode-se determinar a quantidade total de nitrogênio (em g) em uma determinada quantidade de amostra, multiplicando-se o volume total de HCl consumido por 0,0014. Em seguida, considerando que cada 100 g de proteína contêm aproximadamente 16 g de nitrogênio, pode-se estimar a massa de proteína na amostra. Ou seja, multiplicando-se a massa de nitrogênio por um fator de 6,25 obtém-se a massa de proteína na amostra. O inconveniente deste método, para o caso da análise dos pseudocomponentes, é de ser extremamente trabalhoso e demorado.

2.1.5 Redes neurais

É possível relacionar o grau de hidrólise obtido em um determinado momento da reação com a perfil peptídico gerado, ou seja, com a concentração de cada

pseudocomponente por meio do ajuste de uma rede neural artificial. As redes neurais artificiais são técnicas que apresentam um modelo inspirado na estrutura neural de organismos inteligentes e que adquirem conhecimento através da experiência (TATIBANA; KAETSU, 2011).

As redes neurais começaram a se desenvolver na década de 1940, pelo neurofisiologista Warren McCulloch, do MIT, e pelo matemático Walter Pitts, da Universidade de Illinois. Nesta época, publicaram um trabalho que fazia uma analogia entre células nervosas vivas e o processo eletrônico. Este trabalho consistia em um modelo de resistores variáveis e amplificadores representando conexões sinápticas de um neurônio biológico. Desde então, principalmente a partir da década 1980, diversos modelos de redes neurais artificiais surgiram e ainda surgem com o propósito de aperfeiçoar e aplicar esta tecnologia. Algumas destas propostas desejam aperfeiçoar mecanismos internos da rede neural para aplicação na indústria e negócios, outras procuram aproximá-las ainda mais dos modelos biológicos originais (TAFNER, 1998).

Segundo Palma Neto e Nicoletti (2005), uma rede neural é uma rede com muitos processadores simples (cada um deles tendo possivelmente, uma pequena quantidade de memória local), conectados por meio de canais de comunicação (conexões), aos quais, usualmente, estão associados pesos numéricos.

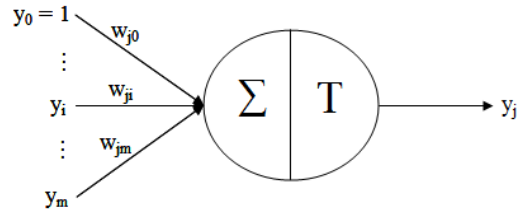
Uma rede neural pode ser caracterizada por:

- Seus processadores básicos, chamados neurônios;
- Pela função de ativação, que representa o estado de um neurônio;
- Pelo padrão de conexão existente entre os neurônios, ou seja, sua estrutura;
- Por seu algoritmo de treinamento (também chamado de algoritmo de aprendizado).

A Figura 2.9 apresenta a anatomia de um neurônio. O neurônio artificial é uma estrutura lógico-matemática que procura simular a forma, o comportamento e as funções de um neurônio biológico. Assim sendo, os dendritos foram substituídos por entradas, representadas por y_i ($y = i, \dots, m$), cujas ligações com o corpo celular artificial são realizadas por meio de elementos chamados de peso (simulando as sinapses). Os estímulos captados pelas entradas são processados pela função soma ou ativação (que é a soma das entradas ponderada pelos pesos). Os pesos de uma rede podem produzir um efeito de excitação ou inibição no valor da entrada, dependendo da magnitude do peso e de seu sinal. O limiar de disparo do neurônio biológico foi substituído pela função de transferência, que calcula o valor da saída y_j , a qual pode compor parte de um vetor de entrada para outros neurônios. Outro

fator importante na composição de um neurônio é o denominado *bias* ou *threshold*, w_{j0} . Este fator é responsável por regular a ativação total do neurônio j (PINTO, 2008; TAFNER, 1998).

Figura 2.9 – Estrutura de um neurônio

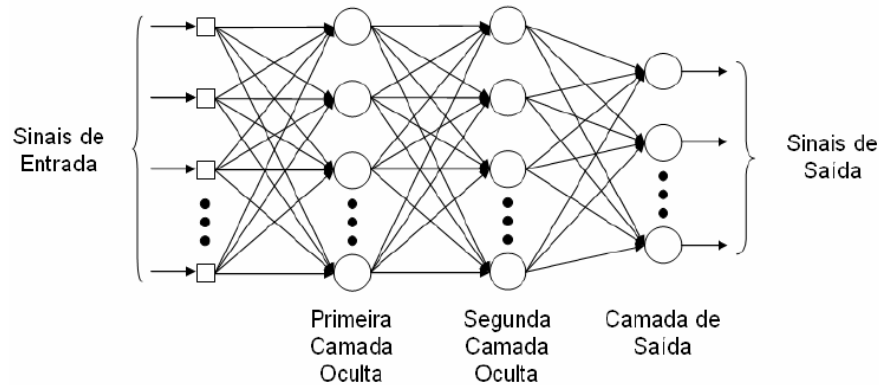


Fonte: figura adaptada de PINTO, 2008.

Uma das arquiteturas possíveis de se utilizar em uma rede neural artificial é a chamada *Perceptrons multicamadas* (MLP, do inglês *Multilayer perceptrons*) ilustrada na Figura 2.10. Como principais características, uma rede MLP apresenta:

- Uma função de ativação suave (ou seja, contínua e diferenciável) para cada neurônio.
- Além das camadas de entrada e de saída, pode possuir uma ou mais camadas ocultas.
- A rede exibe um alto grau de conectividade, determinada por seus pesos.
- É do tipo *feedforward*: a informação segue em apenas uma direção.

Figura 2.10 – Arquitetura de uma rede do tipo MLP com duas camadas ocultas



Fonte: PINTO, 2008.

O conjunto de padrões ou exemplos a serem ajustados pela rede MLP, após um pré-tratamento (por exemplo, normalização dos dados), assim como para qualquer modelo empírico, é geralmente dividido em dois conjuntos: o conjunto de treinamento e o conjunto de teste.

O conjunto de teste é utilizado para testar o desempenho do modelo pós-treinamento.

O conjunto de treinamento é ainda subdividido em dois subgrupos: subconjunto de estimação e subconjunto de validação. O subconjunto de estimação serve para selecionar o modelo (função de transferência a empregar, número de neurônios na camada oculta, números de camadas ocultas, etc.) e definir número de iterações do treinamento de forma a evitar sobreajuste (*overfitting*). E o subconjunto de validação do modelo serve justamente para se inferir se o modelo é válido.

Na etapa de treinamento, ou seja, na etapa de ajuste dos pesos sinápticos, estes ajustes podem ser realizados de forma seqüencial ou intermitente. Na forma seqüencial, a atualização dos pesos da rede é feita após a apresentação de cada exemplo. Este modo é mais utilizado em aplicações que exijam treinamento em tempo real. No modo intermitente, a atualização é realizada após a apresentação de todo o conjunto de exemplos, constituindo, assim, o que se chama de uma época.

Com o intuito de se evitar o *overfitting* durante o treinamento da rede, pode-se utilizar a técnica de parada antecipada, em que, após um período de estimação (treinamento), com os pesos ajustados, é calculado o erro associado aos dados do subconjunto de validação. Reinicia-se a seção de treinamento enquanto o erro calculado permanecer decrescendo (PINTO *et al.*, 2007).

Normalmente, junto à estrutura MLP se usa o algoritmo conhecido como *error backpropagation* ou alguma de suas variações.

O algoritmo de treinamento *backpropagation* é um algoritmo utilizado para se resolver um problema de otimização. O algoritmo utiliza-se do gradiente descendente para estimar o erro das camadas intermediárias por meio de uma estimativa do efeito que estas causam no erro da camada de saída. Assim, o erro de saída da rede é calculado e este é retroalimentado para as camadas intermediárias, possibilitando o ajuste dos pesos proporcionalmente aos valores das conexões entre camadas. Uma variação deste algoritmo é o *backpropagation* com Levenberg-Marquardt, em que ao invés de se basear no método do gradiente descendente, este algoritmo é uma aproximação do método de Newton. Ele melhora o método de Gauss-Newton por meio da utilização de uma taxa de aprendizado variável (BRAGA; CARVALHO; LUDERMIR, 2007).

Para Pinto *et al.* (2007), a identificação de um sistema é uma das aplicações mais comum de redes neurais na engenharia de bioprocessos. Elas podem ser bem eficientes em prever como atuam processos que são bem complexos e/ou não tem modelos bem definidos.

2.1.6 A Soja e as proteínas da soja

2.1.6.1 A história da soja

A soja e seus subprodutos estão entre os produtos mais utilizados na nutrição animal devido a seu elevado teor protéico (SIMAS, 2005). As primeiras referências ao grão aparecem há quase 5000 anos, quando a soja era considerada um grão sagrado, ao lado do arroz, do trigo, da cevada e do milho. Um dos primeiros registros aparece no livro "Pen Ts'ao Kong Mu", feito para descrever as plantas da China ao imperador Sheng-Nung. Mas, para alguns autores, as referências à soja são ainda mais antigas, remetendo ao "Livro de Odes", publicado em chinês arcaico. A soja cultivada hoje é muito diferente de suas ancestrais, que eram plantas rasteiras que se desenvolviam na costa leste da Ásia, principalmente ao longo do rio Yangtze, na China, até que cientistas da antiga China domesticaram e melhoraram a planta resultante do cruzamento natural entre duas espécies de soja selvagem, dando origem à sua evolução.

Apesar de ser conhecida e consumida pela civilização oriental por milhares de anos, a soja foi introduzida na Europa, apenas como curiosidade nos jardins botânicos da Inglaterra, França e Alemanha, no final do século XV. E apenas a partir da segunda década do século XX é que o grão passou a despertar interesse comercial, porém, provavelmente devido às condições climáticas, a tentativa de se cultivar a soja na Rússia, Inglaterra e Alemanha fracassou.

No Brasil, o primeiro registro de que se tem notícia da soja data de 1882, mas somente na década de 1960 foi que seu desenvolvimento passou a ser significativo, principalmente por dois fatores internos: o primeiro é que a soja poderia surgir como uma opção de verão sucedendo ao plantio do trigo, principal cultura do sul do Brasil, na época. O segundo é que o Brasil iniciava um esforço de produção de aves e suínos, gerando uma alta demanda por farelo de soja. Em 1966 já eram produzidas 500 mil toneladas de soja no Brasil. Em 1970, a explosão do preço da soja no mercado mundial aumentou ainda mais o interesse do governo brasileiro e dos agricultores por esta cultura e somou-se a este acontecimento, o fato de que o escoamento da safra brasileira ocorre justamente na entressafra americana, quando os preços atingem as maiores cotações. Assim, o país passou a investir em tecnologia para adaptação da cultura às condições brasileiras, processo liderado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Como consequência dos investimentos, o plantio de soja em regiões de baixas latitudes, entre o trópico de capricórnio e a linha do equador, tornou-se possível, e o impacto desse aumento de áreas passíveis de plantio foi sentido pelo mercado no

final da década de 1980, início de 1990, com a queda dos preços do grão (EMBRAPA, 2012; SIMAS, 2005).

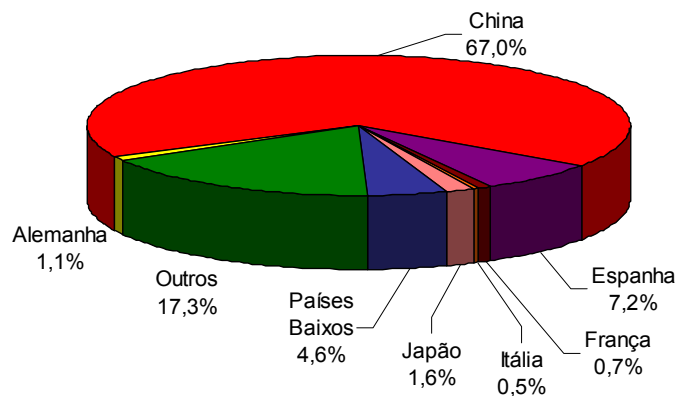
2.1.6.2 A soja em números

Estima-se que foram produzidos mundialmente, na safra 2010/2011, aproximadamente 264 milhões de toneladas de soja em grãos, 165 milhões de toneladas de farelo de soja e 41 milhões de toneladas de óleo de soja. O maior produtor mundial do grão é os Estados Unidos, tendo produzido aproximadamente 91 milhões de toneladas, ocupando uma área de plantio de 31 milhões de hectares e com uma produtividade de 2.922 kg/ha. O segundo maior produtor mundial é o Brasil, tendo produzido, no mesmo período, 75 milhões de toneladas de grãos, com uma área plantada de 24,2 milhões de hectares e produtividade de 3.106 kg/ha. O maior estado produtor de soja é o Mato Grosso e o segundo maior, o Paraná, com produções de 20,4 e 15,4 milhões de toneladas, respectivamente, neste mesmo período. Em relação ao óleo e ao farelo de soja, o Brasil produziu 7,5 e 29 milhões de toneladas, aproximadamente. O terceiro produtor mundial de soja é a Argentina, seguida da China, Índia e Paraguai (USDA, 2012; CONAB, 2012; EMBRAPA 2012).

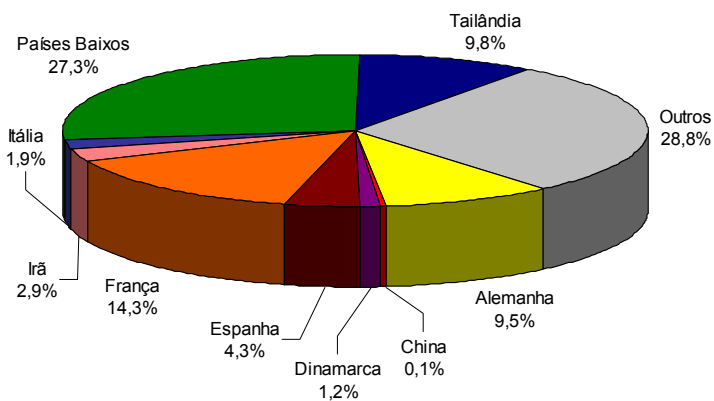
Do total produzido, o Brasil exportou por volta de 33 milhões de toneladas do grão, 14 milhões do farelo e 1,7 milhões de óleo, representando uma movimentação financeira de 16, 6 e 2 bilhões de dólares, respectivamente (valor FOB). As exportações do complexo da soja atingiram quase 53% de participação do total de exportações de produtos do agronegócio e pouco mais de 19% das exportações brasileiras. Os principais importadores do complexo produtivo de soja brasileiro são apresentados na Figura 2.11. Além disso, o Brasil ainda importou, no mesmo período, por volta de 41.000 toneladas de grãos de soja, 25.000 toneladas de farelo e 126 toneladas de óleo, todos eles, majoritariamente do Paraguai (CONAB, 2012).

Figura 2.11 – Países para o qual o Brasil exporta produtos do complexo produtivo da soja

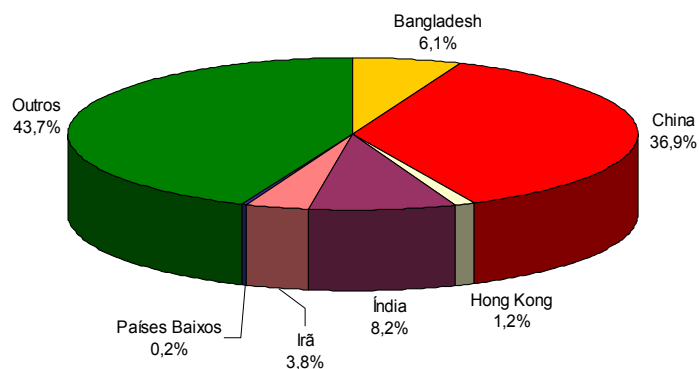
(a) Exportação de grãos



(b) Exportação de farelo de soja



(c) Exportação de óleo



Fonte: figura elaborada pela autora com base nos dados da CONAB, 2012.

2.1.6.3 Composição da soja

A composição da semente da soja pode variar devido a vários fatores, como ambientais, geográficos, modificação genética, etc. Normalmente, grãos que apresentam maior produtividade têm menor teor de proteína. A relação entre o teor de óleo e de proteína

também é inversamente proporcional. Com o advento da manipulação genética, já é possível se obter grãos com mais de 50% de proteína. Atualmente, várias variedades produzem grãos com teores de proteína próximos a 45%. Também já é possível aumentar o nível de alguns aminoácidos essenciais, como variedades que apresentam teor de metionina até 75% maior que o convencional ou grãos de soja com altos teores em lisina, triptofano e isoleucina (VIEIRA, 2007). Mas, de forma geral, a composição média de uma semente de soja, sem alteração genética, é como a apresentada na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Composição média da semente de soja

Componente	% em massa
Umidade	11
Proteínas	38
Lipídios	19
Carboidratos	27
Cinzas	5

Fonte: EMBRAPA, 2012.

A Tabela 2.2 apresenta a composição nutricional média para o farelo de soja não desengordurado torrado, para o farelo de soja desengordurado, para produto a base de proteína concentrada de soja e proteína isolada de soja enquanto a Tabela 2.3 apresenta a composição média de aminoácidos presentes em um grama da proteína bruta do farelo de soja e de alguns farelos de outras sementes, além dos valores diários necessários à crianças e adultos de aminoácidos essenciais.

Tabela 2.2 – Composição nutricional para alguns produtos a base de soja

Nutriente	Farelo de soja			
	não desengordurado torrado	Farelo de soja desengordurado	Proteína de soja concentrada	Proteína de soja isolada
Proteínas (g)	38,1	51,5	63,6	88,3
Lipídeos (g)	21,9	< 1,0	0,5	3,4
Carboidratos totais (g)	30,4	33,9	25,4	0,0
Fibra bruta (g)	2,2	4,3	3,8	0,3
Água (g)	3,8	7,3	5,8	5,0
Cinzas (g)	5,9	6,2	4,7	3,6

Fonte: ERDMAN; FORDYCE, 1989.

Tabela 2.3 – Composição de aminoácidos de alguns farelos desengordurados de oleaginosas

Aminoácido ^a	Soja	Algodão	Amendoim	Girassol	Necessidades ^b		
					Criança, idade		Adulto
					2-5	10-12	
Lisina	64	44	30	38	58	44	16
Histidina	26	27	23	25	19	19	16
Arginina	73	116	113	89	-	-	-
Aspartato	118	92	141	87	-	-	-
Treonina	39	30	25	32	34	28	9
Serina	55	42	49	39	-	-	-
Glutamato	186	217	199	210	-	-	-
Prolina	55	36	44	50	-	-	-
Glicina	43	41	56	51	-	-	-
Alanina	43	39	42	41	-	-	-
Valina	46	45	45	48	35	25	13
Cisteína	14	26	13	18	} 25	} 22	} 17
Metionina	11	15	9	19			
Isoleucina	46	31	41	40	28	28	13
Leucina	78	58	67	61	66	44	19
Tirosina	38	31	41	27	} 63	} 22	} 19
Fenilalanina	50	54	52	47			
Triptofano	14	12	10	11	11	9	5

^a Valores em mg/g de proteína bruta.

^b Valores em mg/kg.dia (miligramas de aminoácido por quilograma de massa corpórea por dia).

Fonte: WOLF, 2007.

2.1.6.4 Proteínas da soja

Entre os cereais e outras espécies leguminosas, a soja é a que contém o mais alto teor de proteína. Enquanto esta contém cerca de 40% de sua constituição em proteínas, a canola contém entre 20 e 30% e outros cereais ficam na faixa de 8 a 15% (FISCHER, 2006).

As proteínas são o principal componente da semente de soja. Baseada na função biológica na planta, as proteínas das sementes podem ser classificadas em proteínas metabólicas e proteínas de reserva. As proteínas metabólicas são ativas nas atividades celulares normais, incluindo a síntese de proteínas de reserva. As proteínas de reserva fornecem fonte de nitrogênio e carbono para o desenvolvimento da planta durante a germinação. A maioria das proteínas de reserva da semente da soja são do tipo globulinas.

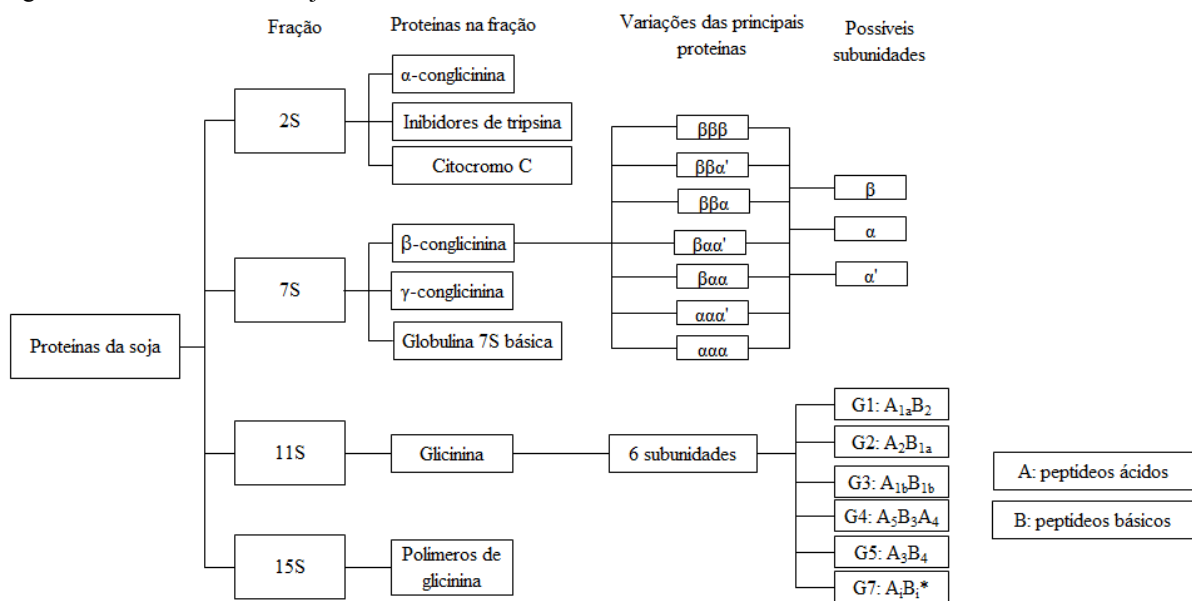
Quando dissolvidas em tampão fosfato de sódio 0,4 M contendo 0,01 M de mercaptoetanol em pH 7,6, baseado no coeficiente de sedimentação, as proteínas de soja podem ser classificadas em 4 frações:

- Fração 2S (13-18% da composição total de proteínas): composta por inibidores de tripsina de Bowman-Birk e Kunitz, citocromo C e α -conglucina.

- Fração 7S (30-46%): mais heterogênea, mas em sua maioria é constituída de β -conglucina.
- Fração 11S (36-53%): composta por proteínas do tipo glicina.
- Fração: 15S (0-4%): composta por polímeros de glicina.

A glicina e a β -conglucina são os maiores grupos de proteínas de reserva da soja. Normalmente a glicina é encontrada em maior proporção. A relação de glicina/ β -conglucina varia entre 1,31 e 2,45. A Figura 2.12 resume a composição das proteínas em cada fração e especifica melhor as duas principais proteínas que compõe a semente de soja (BARAC *et al.*, 2004; KUIPERS, 2007).

Figura 2.12 – Proteínas da soja



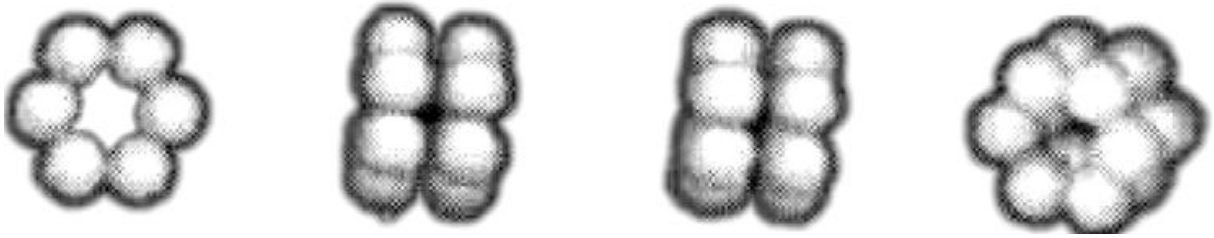
Nota: *Não definido.

Fonte: figura elaborada pela autora com base nos dados de BARAC *et al.*, 2004 e KUIPERS, 2007.

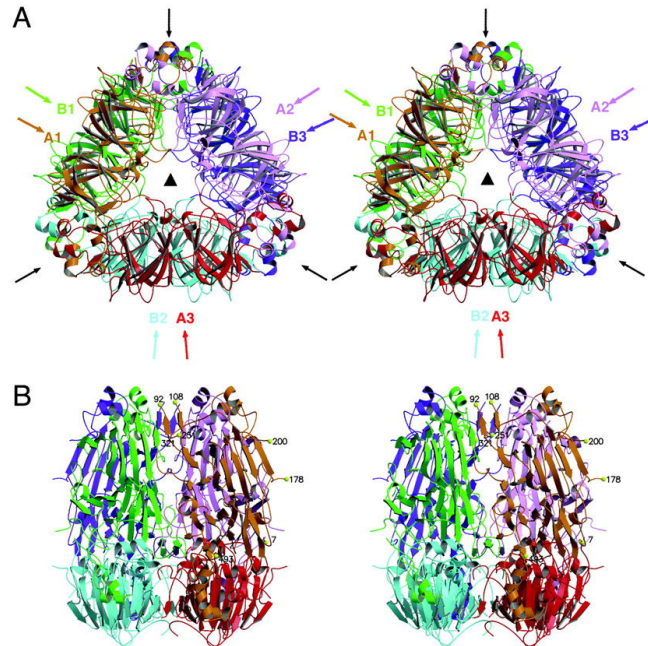
A glicina possui, em média, massa molecular de 360 kDa, com estrutura quaternária compacta, estabilizada por interações de dissulfeto, eletrostáticas e hidrofóbicas. É composta por 6 subunidades, compostas por uma cadeia peptídica ácida e uma cadeia peptídica básica ligadas por uma ponte de dissulfeto, à exceção do peptídeo ácido A₄ que não se liga por ponte de dissulfeto. As subunidades são empacotadas em dois hexágonos, um sobre o outro, formando um cilindro oblato e oco, como mostra a Figura 2.13. Os peptídeos básicos se localizam no interior da molécula (BARAC *et al.*, 2004).

Figura 2.13 – Estrutura da glicinina

a) Glicinina genérica



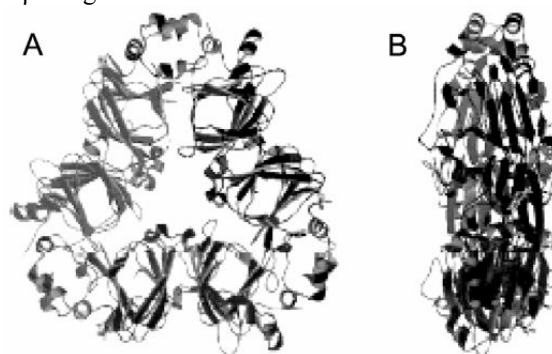
b) Glicinina A₃B₄ homohexâmero



Fontes: a) BARAC *et al.*, 2004. b) ADACHI *et al.*, 2003.

A β -conglycinina possui massa molecular na faixa de 150 a 180 kDa e é composta por três subunidades, podendo elas serem do tipo α , α' ou β . As subunidades α e α' possuem duas cadeias de carboidrato ligadas à N-terminais de resíduos de ácido aspártico enquanto que a subunidade β possui apenas uma cadeia de carboidrato ligada a ela. A Figura 2.14 mostra a estrutura de uma β -conglycinina (KUIPERS, 2007).

Figura 2.14 – Estrutura de uma β -conglycinina

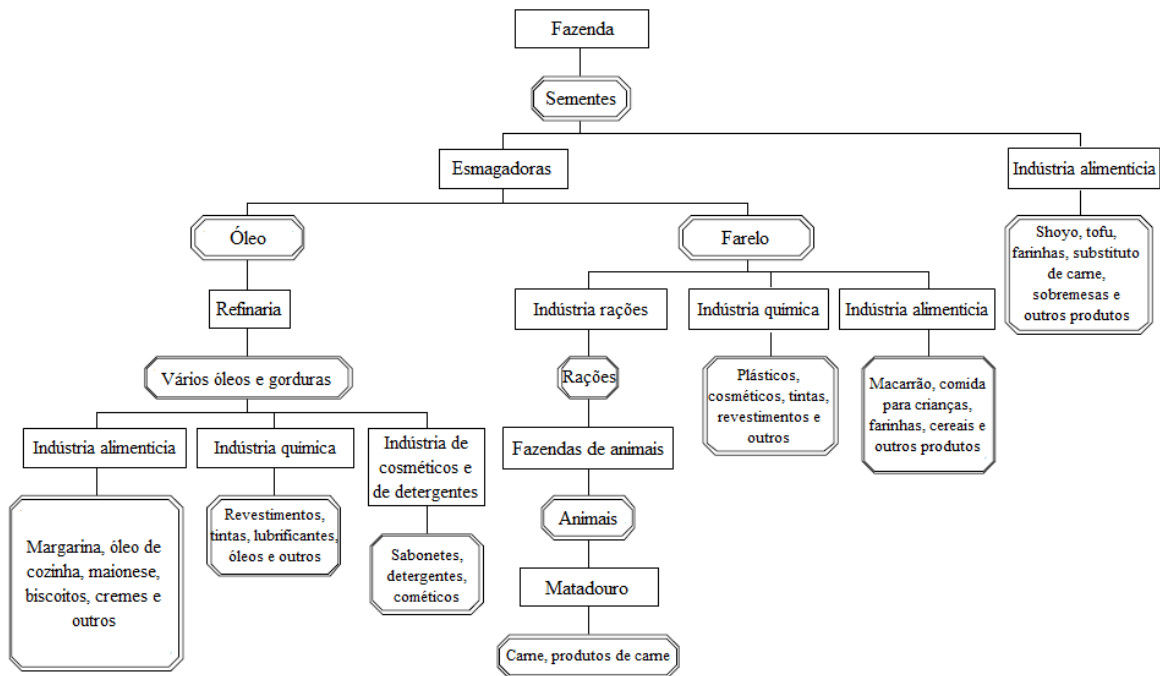


Fontes: BARAC *et al.*, 2004.

2.1.6.5 Produtos da soja

De toda a produção mundial de soja, por volta de 87% vão para esmagadoras. Os outros 13% são destinados para sementes para as próximas safras ou processados de outras formas para a indústria de alimentos (GELDER; DROS, 2002). A produção do óleo de soja representa 15% da produção mundial das sementes e 80% do farelo de soja produzido é destinado à ração animal (APROSOJA, 2012). Outros produtos também podem ser fabricados a partir da semente da soja e de seus derivados. A Figura 2.15 apresenta uma visão geral da cadeia produtiva da soja.

Figura 2.15 – Cadeia produtiva da soja



Fonte: GELDER; DROS, 2002.

Uma nova classe de produtos a base de soja tem tomado a atenção do meio científico e industrial que é a de produtos a base de proteínas hidrolisadas de soja. A hidrólise das proteínas de soja pode melhorar as propriedades funcionais e o valor nutritivo, como por exemplo, aumentar a bioatividade das proteínas da soja por meio da conversão de glicosídeos em agliconas, aumentando suas propriedades antioxidantes e imunomoduladoras. Outro fator interessante é que, com a hidrólise, pode-se aumentar a solubilidade das proteínas da soja em meios mais ácidos, viabilizando seu uso em produtos mais ácidos. Essas proteínas hidrolisadas podem ser usadas como ingrediente em alimentos, temperos, potenciadores nutricionais, substituto de proteínas e em produtos de uso clínico (SUN, 2011).

2.1.6.6 Processo de produção do óleo e farelo de soja

A extração do óleo de soja bruto e do farelo ocorrem basicamente em três etapas: (1) Armazenamento dos grãos. (2) Preparação dos grãos. (3) Extração do óleo bruto.

A etapa de armazenamento não pode ser negligenciada no processo, pois ela incide diretamente no rendimento e qualidade do produto final. Quando as sementes são armazenadas de forma inapropriada podem ocorrer problemas como aumento da acidez e modificações organolépticas influenciando no sabor e aroma dos óleos e farelos produzidos, entre outros.

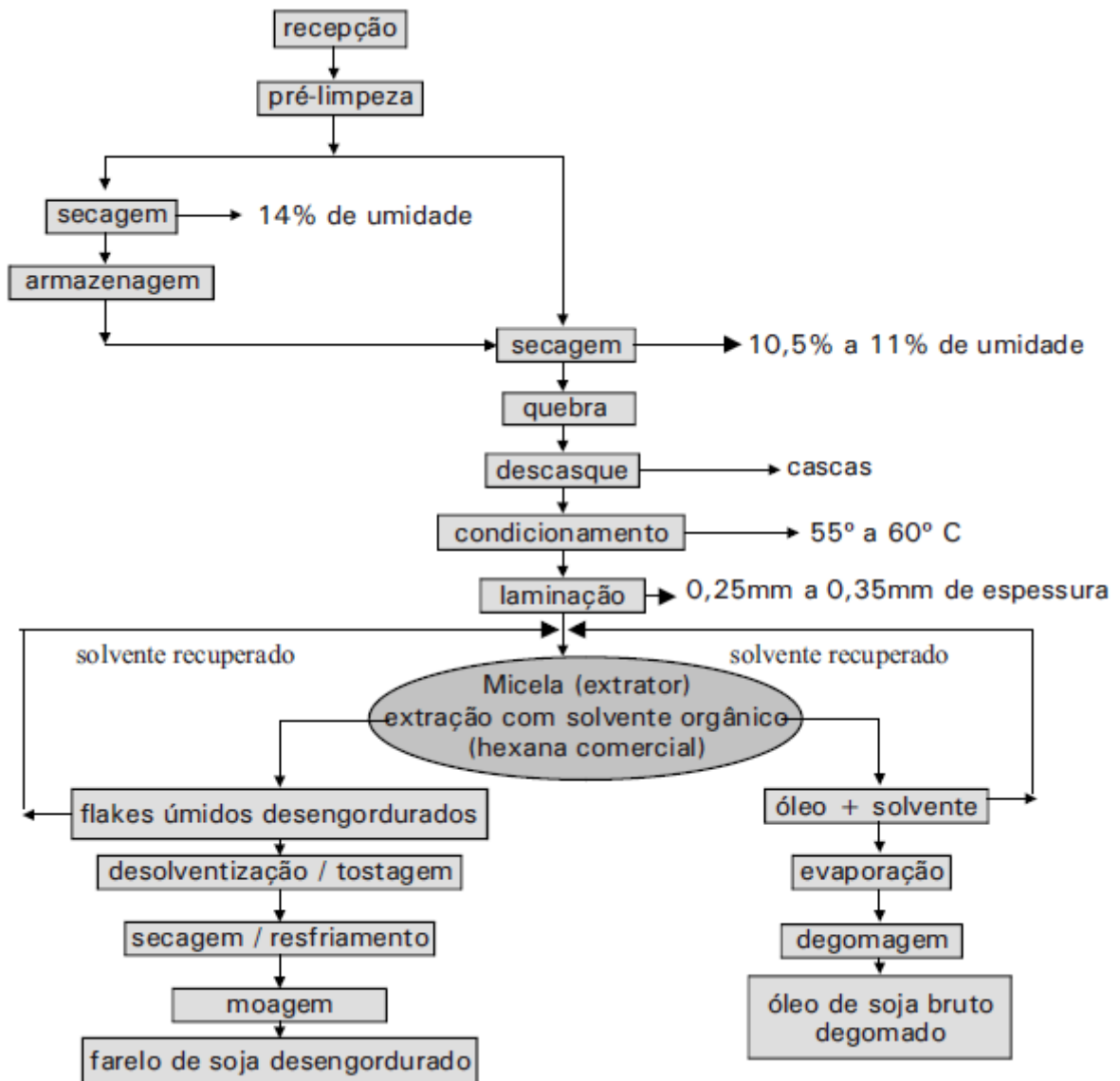
Durante a etapa de preparação, os grãos são pré-limpos, descascados, condicionados, triturados, laminados e cozidos. Na pré-limpeza, os grãos são recebidos, é feita uma amostragem para controle da qualidade e por meio de máquinas especiais, dotadas de peneiras vibratórias ou de outro dispositivo, os grãos são separados dos contaminantes maiores. A pré-limpeza, antes do armazenamento, diminui os riscos de deterioração e reduz o uso indevido de espaço útil do silo. O descascamento é feito por máquinas relativamente simples, onde as cascas são quebradas por batedores ou facas giratórias e são separadas dos cotilédones por peneiras vibratórias e insuflação de ar. No condicionamento, os grãos, após o descascamento, sofrem um aquecimento entre 55 e 60° C. A etapa de trituração e laminação ocorre, pois facilita a etapa de extração de óleo dos grãos, por meio do rompimento dos tecidos e das paredes das células. A trituração e laminação diminui a distância entre o centro do grão e sua superfície e aumentando, assim, a área de saída do óleo. O equipamento usado nesta etapa possui rolos de aço inoxidável horizontais ou oblíquos resultando em flocos ou lâminas com uma espessura de dois a quatro décimos de milímetro, com um a dois centímetros de superfície. O processo de cozimento também visa o rompimento das paredes celulares para facilitar a saída do óleo. É feito em cozedores com aquecimento indireto e direto de vapor.

Nas plantas de indústrias esmagadoras mais antigas, o óleo é parcialmente extraído por meio mecânico de pressão em prensas contínuas ou “expellers”, seguido de uma extração com solvente orgânico. Nos processos mais modernos, os flocos são introduzidos diretamente nos extratores e o óleo é extraído diretamente com o solvente orgânico, geralmente hexano. Deste processo, saem duas correntes: a miscela e o farelo. A miscela que sai do extrator é usualmente filtrada e transferida para um destilador contínuo, no qual o óleo é separado do solvente. Nesse equipamento, o conteúdo de solvente no óleo pode ser reduzido até cerca de 5%. O hexano residual é destilado em um evaporador de filme com insuflação de

vapor direto. Já o farelo de soja passa por um processamento térmico para inativar os fatores antinutricionais como os inibidores de tripsina, as lectinas ou fitohemaglutininas, bem como as substâncias que causam o sabor indesejável. O equipamento usado é o dessolventizador-tostador, um aparelho vertical que combina a evaporação do solvente com uma cocção úmida (EMBRAPA, 2001).

A Figura 2.16 apresenta o processo de produção do óleo bruto e do farelo de soja.

Figura 2.16 – Processo extração do óleo bruto e do farelo de soja



Fonte: EMBRAPA, 2001.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

Os materiais utilizados para a realização das hidrólises das proteínas do farelo de soja concentrado e posterior modelagem foram:

- Farelo de soja concentrado SPC 62, fornecido pela empresa IMCOPA - importação, exportação e indústria de óleos S.A.;
- Enzima Novo-Pro D, fornecida pela empresa Novozymes Latin America Ltda.;
- Água destilada;
- Hidróxido de sódio da marca Mallinckrodt;
- Reator de vidro encamisado;
- Água milli-Q;
- Dodecil sulfato de sódio (SDS) da J. T. Baker;
- Ditioneitol (DTT) da Sigma-Aldrich;
- Amostras do hidrolisado das proteínas do farelo concentrado de soja;
- Fosfato de sódio dibásico anidro da J. T. Baker;
- Cloreto de sódio da J. T. Baker;
- Ácido fosfórico comercial;
- Padrões da Sigma-Aldrich:
 - Albumina do soro bovino, MM = 66.000 Da;
 - Anidrase carbônica, MM = 29.000 Da;
 - α -lactoalbumina, MM = 14.175 Da;
 - Insulina, MM = 5.733 Da;
 - Gly-Tyr, MM = 238,2;
- Coluna de filtração em gel Superdex 200 10/300 GL da GE.
- Papel de filtro de 0,2 μ m.
- Software OriginPro 8 da OriginLab.
- Software Matlab 7 da MathWorks.

2.2.2 Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram:

- pHstato modelo 718 STAT Titrino da marca Metrohm;
- Banho ultratermostato Nova Ética;

- Agitador mecânico IKA RW20 digital;
- Balança da marca Quimis, modelo Q-500L210C.
- Shaker da marca Marconi;
- Medidor de pH;
- HPLC Shimadzu, com os módulos:
 - Injetor automático de amostras modelo SIL-10AD VP;
 - Bomba injetora de eluente modelo LC-10AD VP;
 - Detector UV-visível modelo SPD-10A VP;
 - Forno modelo CTO-10A VP;
 - Coletor de frações modelo FRC-10A;
 - Controlador modelo SCL-10A VP;
 - Software Class VP versão 6.14 SP2.

2.2.3 Procedimento

Uma análise preliminar foi feita para se entender melhor o comportamento da reação de hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado (SPC) pela enzima Novo-Pro D em diferentes condições e posteriormente se escolher um conjunto de condições de trabalho apropriado. O próximo passo foi tentar ajustar um modelo que descrevesse a cinética da reação, relacionando o número de ligações peptídicas hidrolisadas em função do tempo. Posteriormente, a reação nas condições escolhidas foi analisada em diferentes graus de hidrólise em termos de concentração de seus pseudocomponentes. Finalmente, foi feito um ajuste por meio de redes neurais relacionando as concentrações de cada pseudocomponente com seu grau de hidrólise.

2.2.3.1 Análise das condições de hidrólise

a) Relação enzima/substrato

A primeira série de ensaios foi feita com a finalidade de se verificar qual a melhor relação enzima/substrato para a reação de hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado.

Primeiro foi montado um sistema contendo o reator encamisado ligado ao banho termostático por meio de duas mangueiras de silicone. O banho foi ajustado à temperatura de 55°C. No interior do reator foram colocados o sensor de pH e o canal de

passagem do NaOH 1M, ambos do pHstato, além de um impelidor encaixado no agitador mecânico. O pHstato foi ajustado para manter a reação em pH igual a 8.

A seguir foram pesados 10,8570 g do farelo de soja concentrado (10 g em base seca), 89,1470 g de água destilada (obtendo-se 90% de umidade total) e a massa de enzima necessária para se obter a relação, em massa, enzima/substrato desejada. Foram testadas quatro relações diferentes, apresentadas na Tabela 2.4. O farelo de soja concentrado fornecido pela empresa IMCOPA possui aproximadamente 62% de proteína em base úmida e 7% de umidade.

Tabela 2.4 – Relações enzima/substrato (m/m) testadas e respectivas massas de enzima para se chegar a essa relação

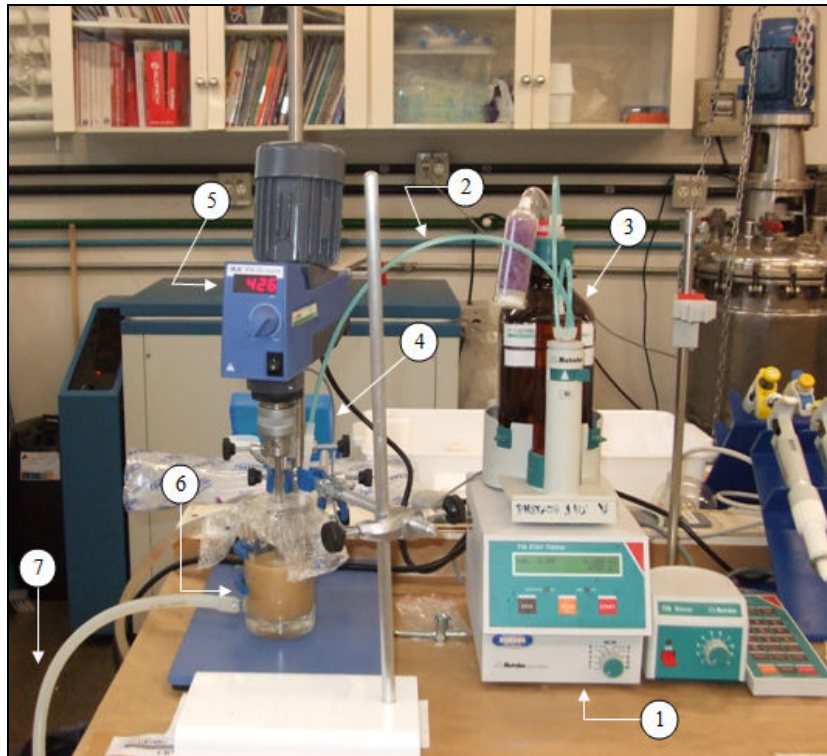
Relação enzima/substrato (%)	Massa da enzima pesada (g)
0,25	0,0166
0,5	0,0332
1,0	0,0664
1,5	0,0996

Fonte: a autora.

A água e o farelo foram colocados no reator e este foi tampado com filme de PVC para se evitar a perda de água por evaporação ao longo da reação. A mistura resultante foi agitada, entre 400-500 rpm, por 5 minutos para a estabilização da temperatura. A Figura 2.17 apresenta o sistema montado já com o farelo e a água.

Para se atingir o valor desejado de pH, hidróxido de sódio 5 M foi adicionado manualmente à mistura, pois o pHstato não possui uma função que faça este ajuste. Uma vez atingido o pH, a enzima foi adicionada e o pHstato, acionado. A partir de então, o sensor do pHstato acompanhou o pH e o manteve no valor desejado adicionando, sempre que necessário, hidróxido de sódio 1M. Os volumes de NaOH adicionados ao longo do tempo foram, então, anotados durante três horas de reação. Utilizando-se dos valores dos volumes de NaOH consumido e das Equações 2.2, 2.3 e 2.4, pôde-se calcular o valor do grau de hidrólise ao longo do tempo.

Figura 2.17 – Sistema utilizado para a realização da hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado pela enzima Novo-Pro D



Legenda: (1) Controlador do pHstato. (2) Tubulação de alimentação do NaOH. (3) Reservatório do NaOH. (4) Fio de ligação do sensor de pH (o sensor não aparece na imagem). (5) Agitador mecânico. (6) Reator já alimentado com farelo, água e enzima. (7) Mangueira que liga o reator ao banho termostato (o banho não aparece na imagem).

Fonte: a autora.

b) Influência da agitação

O segunda série de testes realizada foi para se observar se a agitação influenciava de alguma forma a reação. Foram testadas quatro faixas diferentes de agitação: 360-368 rpm, 416-425 rpm, 556-565 e 626-636 rpm.

O procedimento realizado foi semelhante ao descrito no item *a*, com a relação massa enzima/massa substrato fixada em 0,5% e, desta vez, variando-se apenas a agitação.

c) Influência da temperatura

Para se verificar como a temperatura influenciava a hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado pela enzima Novo-Pro D, procedimento semelhante ao descrito no item *a* foi realizado, com a diferença de que, desta vez, a relação massa enzima/massa substrato ficou fixada em 0,5% para todos os ensaios desta série e o que se variou foi a temperatura. As temperaturas testadas foram 45 °C, 55 °C e 65 °C.

d) Influência do pH

A última série de testes feita para se analisar o comportamento da reação de hidrólise diante da variação de algum parâmetro, foi a avaliação de alterações da resposta com o pH.

Primeiro, foram feitos ensaios com três diferentes valores de pH, 8, 9 e 10, submetidos a praticamente o mesmo procedimento descrito no item *a*, só que desta vez variando-se o pH e mantendo-se a relação enzima/substrato em 0,5% (m/m).

Em segundo, foram realizados ensaios sem a adição da enzima, para se verificar a existência de hidrólise básica ou de maior solubilização do farelo em meio aquoso em um determinado pH. Novamente, o procedimento utilizado foi muito semelhante ao do item *a*, só que desta vez, sem adição alguma de enzima e variando-se o pH a cada ensaio. Assim, a mistura de farelo e água foi ajustada manualmente no pH desejado, da mesma forma que no item *a*, mas sem se adicionar enzima, o pHstato foi acionado. O valor de base consumida ao longo de tempo foi anotado e depois convertido em grau de hidrólise pelas Equações 2.2, 2.3 e 2.4, mesmo a adição desta base podendo ser efeito não da hidrólise, mas da solubilização. Isto para ser possível se mensurar o valor de grau de hidrólise considerado nos experimentos de hidrólise enzimática que não é devido efetivamente à hidrólise enzimática.

Só com a quantidade de NaOH consumido ao longo no tempo, no pHstato, em uma reação sem a adição de enzima, não é possível se extrair a informação do motivo dessa adição a mais, se pela hidrólise básica, se pela solubilização ou mesmo por ambos. Por isso, após as três horas de reação, para cada pH, foram retirados 2 mL da mistura para serem submetidos a solubilização com SDS e DTT e 2 mL apenas do sobrenadante desta mistura. Posteriormente, tanto a solução solubilizada com SDS e DTT quanto os sobrenadantes foram submetidas à análise de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) por exclusão de tamanho molecular.

As amostras de sobrenadantes, os 2 mL retirados da mistura de farelo de soja em água, nos diferentes pHs, foram filtrados em papel de filtro de 0,2 µm. Para as amostras que tiveram as proteínas solubilizadas em meio aquoso com SDS e DTT, foi preparada uma solução com 2% de SDS e 3 g/L de DTT em água milli-Q. Aos 2 mL da mistura do farelo foram adicionados 10 mL dessa solução. Essa mistura final ficou sob agitação em shaker, por duas horas, a 25 °C e 215 rpm. Para finalizar o preparo destas amostras para injeção no HPLC, elas foram filtradas em papel de filtro de 0,2 µm de porosidade nominal.

Foram injetados no HPLC, 25 μ L de cada amostra, utilizando-se como fase móvel tampão fosfato de sódio 50 mM com NaCl 0,15 M, pH 7. O fluxo utilizado foi de 0,25 mL/min e o comprimento de onda foi de 214 nm, por 210 minutos. A coluna utilizada foi a Superdex 200, da GE, com faixa de separação ótima entre 10.000 e 600.000 Da para proteínas globulares.

Para finalizar a série de ensaios relativos ao pH, o último passo foi analisar qualitativamente a distribuição de massa de hidrolisados das proteínas do farelo de soja concentrado obtidos em diferentes pHs, mas com o mesmo grau de hidrólise. Com procedimento similar ao descrito no item *a*, foi feita a reação de hidrólise no pHstato, mas fixando-se 0,5% m_{enz}/m_s e retirando-se 2 mL de amostra quando a reação atingisse o grau de hidrólise desejado e não após três horas. Os graus de hidrólise utilizados foram 4, 7 e 10%. Para se inativar a enzima e parar a reação de hidrólise, a alíquota retirada foi deixada em banho-maria (100°C) por 10 minutos. Posteriormente foi feita a solubilização das proteínas com solução de SDS e DTT e as amostras foram injetadas no cromatógrafo líquido da mesma forma anteriormente descrita para as amostras de farelo sem hidrólise enzimática.

2.2.3.2 Modelagem matemática da reação de hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado

Uma vez decididas as condições de trabalho para a hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado pela enzima Novo-Pro D, o próximo passo foi analisar a cinética da reação nestas condições.

Para isto, foi feita a hidrólise do farelo, nestas condições, seguindo o mesmo procedimento já descrito na seção 2.2.3.1. O grau de hidrólise em função o tempo foi anotado para se tentar ajustar um modelo que descrevesse o número de ligações hidrolisadas em função do tempo. Para se ajustar um outro modelo que descrevesse a concentração de cada pseudocomponente em um dado grau de hidrólise, durante a reação, foram retirados 2 mL de amostra ao se atingir o grau de hidrólise desejado e a enzima foi inativada colocando-se esta alíquota em banho-maria por 10 minutos. Posteriormente, a amostra do hidrolisado teve suas proteínas solubilizadas em solução de SDS e DTT e finalmente as amostras foram injetadas no cromatógrafo. Todo este procedimento, está descrito mais detalhadamente na seção 2.2.3.1. As amostras foram retiradas nos seguintes graus de hidrólise: 2%; 4%; 7%, 11%, 14%, 16%, 17 % e 18%.

Também foram injetados no HPLC padrões de massa molecular conhecida, para ser possível a divisão do hidrolisado de soja em pseudocomponentes e para sua

quantificação, já que não é possível quantificar todos os peptídeos formados de forma individual. Os padrões injetados foram a albumina do soro bovino, com tamanho molecular de 66.000 Da, a anidrase carbônica, MM = 29.000 Da, α -lactoalbumina, MM = 14.175 Da, insulina, MM = 5.733 Da e a gly-tyr, MM = 238,2.

Com base no tempo de retenção de cada um destes padrões, os cromatogramas do farelo hidrolisado foram divididos em 6 partes, cada uma sendo um pseudocomponente do hidrolisado e tendo uma massa que varia no intervalo de tamanho de dois padrões ou massa acima do maior padrão usado ou abaixo do menor.

Para se quantificar a concentração de cada um destes pseudocomponentes, os cromatogramas foram exportados para o OriginPro 8 e nele a área de cada pseudocomponente foi obtida por integração numérica. O método utilizado para a conversão da área em concentração foi o das áreas cromatográficas por ser o mais simples dentre os quatro métodos apresentados no item 2.1.4.

a) Modelagem matemática por Michaelis-Menten com inibição do número de ligações peptídicas hidrolisadas em função do tempo

Para se ajustar a cinética de reação segundo o modelo de Michaelis-Menten com inibição, descrita pela Equação 2.8, primeiro, a partir dos valores obtidos para o grau de hidrólise, calculou-se o valor das ligações peptídicas hidrolisadas ao longo do tempo, utilizando-se a Equação 2.10. Também foi calculado o valor das ligações peptídicas totais hidrolisáveis na amostra pela Equação 2.9. Para se calcular uma estimativa inicial do valor de K_M e $V_{máx}$, utilizou-se o algoritmo de Levenberg-Marquardt implementado em Fortran, cujo código estava disponível no grupo de pesquisa. Para a estimativa desses dois parâmetros não se levou em conta o efeito da inibição, sendo usada, assim, a Equação 2.7 e apenas os oito primeiros valores das ligações peptídicas hidrolisadas em função do tempo. Para se estimar o valor de K_i , utilizou-se o mesmo algoritmo novamente, porém desta vez com a Equação 2.8, levando-se em conta, então, a inibição, e utilizando-se também os valores obtidos de K_M e $V_{máx}$. Para se refinar ainda mais os valores destas estimativas, procedeu-se novamente a uma otimização, com os três parâmetros de uma vez, mas desta vez, utilizando-se o algoritmo de Recozimento Simulado (*Simulated Annealing*) implementado no Matlab. Esta rotina também estava disponível no grupo.

b) Modelagem matemática por redes neurais da concentração dos pseudocomponentes em função do grau de hidrólise

O valor da concentração de cada pseudocomponente em função do valor do grau de hidrólise foi representado graficamente, e para os pontos de cada pseudocomponente, foi ajustada uma curva, no OriginPro 8, com o objetivo de se observar melhor o comportamento das concentrações com o avanço da hidrólise. Por se ter poucos dados experimentais, a rede neural foi implementada com base em pontos retirados deste ajuste, mais precisamente, foram usados 20 pontos de cada curva.

A implementação dessa rede foi feita no software Matlab 7. A rede neural utilizada foi do tipo *multilayer perceptrons* (MLP), com o algoritmo de treinamento do tipo Levenberg-Marquardt *backpropagation*. O conjunto de dados foi dividido em três grupos: um para o treinamento, outro para validação e outro para teste. Este conjunto de teste não é utilizado diretamente no treinamento da rede, é mais usado para comparar diferentes modelos. Esta é a configuração padrão do Matlab quando se usa a função “newff” para a criação de uma rede neural e optou-se por não alterá-la. A proporção de dados utilizados para cada conjunto foi de 0,70, 0,15 e 0,15, respectivamente. Esses valores também são os valores padrão do software e a distribuição dos dados entre os três grupos ocorre de forma aleatória.

Foram testados diferentes números de camadas, de neurônios em cada camada e funções de transferência até que se obtivesse, de maneira heurística, uma arquitetura com melhores predições do modelo durante a validação.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

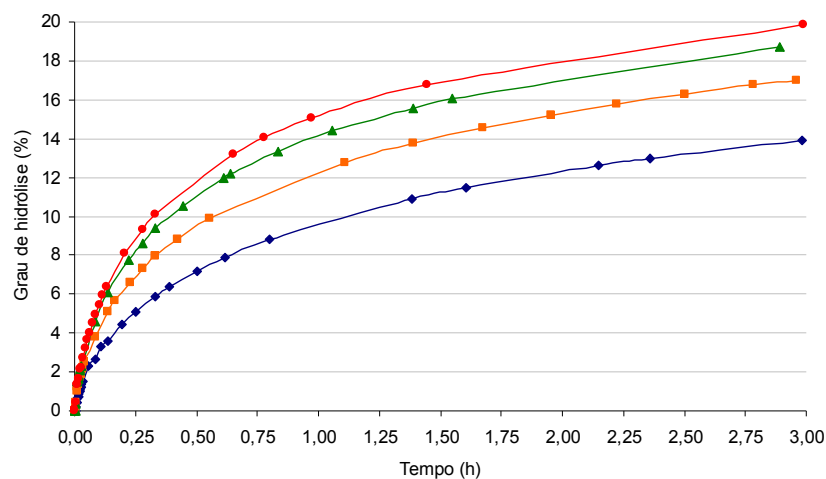
2.3.1 Análise das condições de hidrólise e dos perfis peptídicos

2.3.1.1 Relação enzima/substrato

Os resultados dos ensaios realizados para se verificar qual a melhor relação enzima/substrato são mostrados na Figura 2.18. Como pode-se observar, ao longo de três horas de hidrólise, conforme se aumenta a relação enzima/substrato, aumenta-se o grau de hidrólise, porém esse incremento não ocorre de forma linear, conforme se aumenta a relação enzima/substrato, diminui-se o incremento no grau de hidrólise. Com isso, decidiu-se utilizar para o restante dos experimentos a relação de 0,5% (m_{enz}/m_s), pois a partir de 1/10 de hora, aproximadamente, quando comparado 0,5% (m_{enz}/m_s) em relação a 0,25%, houve um aumento significativo na hidrólise e quando comparando-se 0,5% (m_{enz}/m_s) com 1 e 1,5%, no

mesmo intervalo de tempo, não se observou um incremento no grau de hidrólise bastante significativo. Em termos quantitativos, em três horas de reação, teve-se um aumento de 22% de hidrólise quando dobrou-se a quantidade de enzima de 0,25% (m_{enz}/m_s) para 0,5% (m_{enz}/m_s). Esse aumento foi de apenas 9% quando se dobrou novamente a quantidade de enzima, de 0,5 para 1% (m_{enz}/m_s) e finalmente quando comparado 1,5% (m_{enz}/m_s) em relação a 0,5% (m_{enz}/m_s) (três vezes mais enzima) obteve-se um aumento de 17%. A enzima é uma matéria-prima de alto custo, assim um aumento de 17% na hidrólise não justifica triplicar o valor desse custo. Até 1/10 de hora, os valores de graus de hidrólises obtidos são bem mais baixos do que os desejados no trabalho e, portanto, esse intervalo de tempo não foi utilizado para embasar a conclusão da melhor relação enzima/substrato.

Figura 2.18 – Hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado variando-se a relação enzima/substrato sob as condições de 90% de umidade, 55 °C, pH 8, agitação entre 400 e 500 rpm, durante três horas de hidrólise



Legenda: ◆ 0,25% (m_{enz}/m_s); ■ 0,5% (m_{enz}/m_s); ▲ 1% (m_{enz}/m_s); ● 1,5% (m_{enz}/m_s).

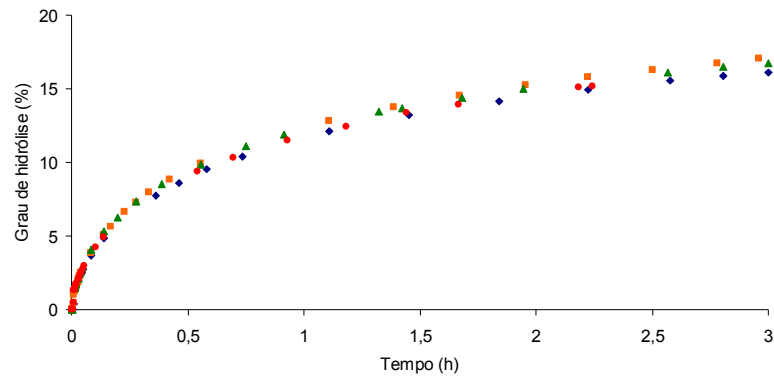
Nota: os pontos experimentais foram conectados por linhas suaves para facilitar a visualização.

Fonte: a autora.

2.3.1.2 Influência da agitação

Para se verificar, em nível laboratorial, com um meio reacional com 90% de umidade, mantendo-se o meio homogêneo, se a agitação influencia na hidrólise, foram analisadas, sob as mesmas condições, variando-se apenas a agitação, a influência desta na reação de hidrólise. Como pode ser observado na Figura 2.19, para as condições definidas, a agitação não apresentou influência no processo de hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado.

Figura 2.19 – Hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado variando-se a agitação. Condições da reação: 90% de umidade, 0,5% (m_{enz}/m_s), 55 °C, pH 8, por três horas

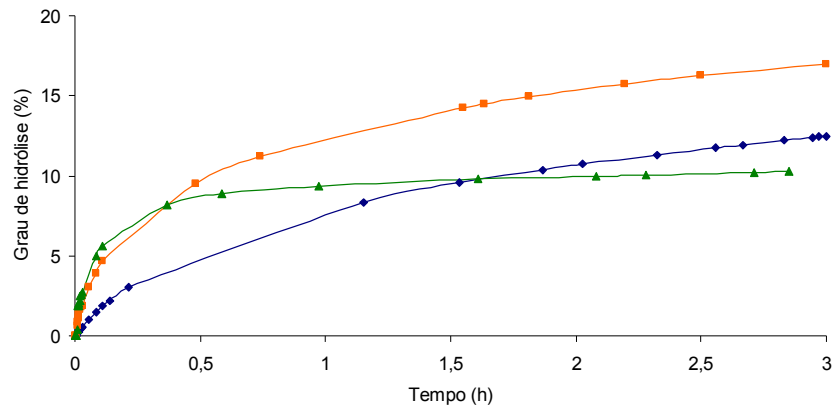


Legenda: ◆ 360-368 rpm; ■ 416-425 rpm; ▲ 556-565; ● 626-636 rpm.
Fonte: a autora.

2.3.1.3 Influência da temperatura

Foram escolhidas três temperaturas diferentes, para se analisar o comportamento da enzima diante da variação desse parâmetro, mantendo-se constantes as outras condições. A Figura 2.20 apresenta os resultados obtidos a partir deste experimento. Nota-se que até aproximadamente 20 minutos (0,33 hora), a temperatura que apresenta maior velocidade de reação, obtendo-se assim maiores valores de grau de hidrólise, é de 65 °C. A partir deste instante, nesta temperatura, observa-se que a enzima passa a sofrer inativação térmica, sendo que, após aproximadamente 1,5 hora de hidrólise, seu desempenho passa a ser, também, pior do que a reação realizada a 45 °C. Assim, como entre 20 minutos e três horas de hidrólise, a melhor reação se dá a 55 °C e estima-se que o tempo final de hidrólise estará nesta faixa, esta foi a temperatura definida. Entre os fatores que definem qual o instante em que se deve parar a hidrólise, está o valor de grau de hidrólise que gere um produto que cuja resposta nutricional nos animais seja mais efetiva do que as rações tradicionais, fator este que depende, então, de testes *in vivo* e de fatores de custos que levem a um arranjo otimizado das variações das condições de hidrólise.

Figura 2.20 – Hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado variando-se a temperatura. Condições da reação: 90% de umidade, 0,5% (m_{enz}/m_s), pH 8, por três horas



Legenda: ◆ 45 °C; ■ 55 °C; ▲ 65 °C.

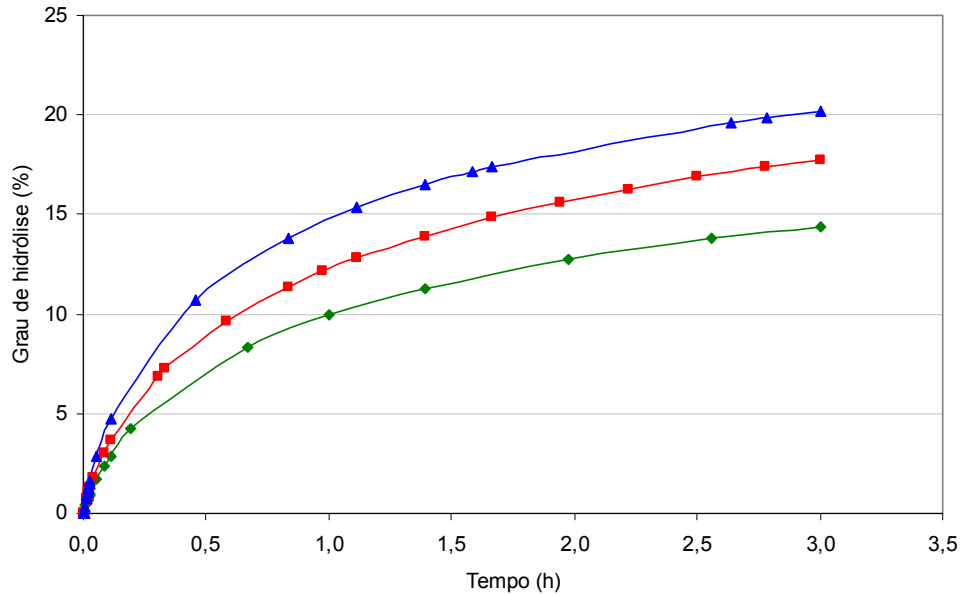
Nota: os pontos experimentais foram conectados por linhas suaves para facilitar a visualização.

Fonte: a autora.

2.3.1.4 Influência do pH

A variação do grau de hidrólise com o pH foi analisada para três diferentes valores de pHs. O resultado é apresentado na Figura 2.21. Aparentemente, o melhor desempenho ocorre no pH 10. Porém em pHs alcalinos as proteínas podem sofrer a chamada hidrólise química, em que as proteínas são quebradas devido ao elevado valor de pH e não devido à ação da enzima. Esse fenômeno não é desejado. Além disso, outro fenômeno observado ao longo da hidrólise enzimática das proteínas do farelo de soja concentrado em pHs alcalinos é a solubilização das proteínas, que são, em sua maioria, insolúveis em seu pH natural em meio aquoso (por volta de 6,4). Com o aumento do pH, essas proteínas se tornam mais solúveis. Tanto a hidrólise básica quanto a solubilização das proteínas causam uma diminuição no pH durante a reação. Desta forma, ao longo da reação, o pHstato adiciona soda não só para suprir a queda do pH devido à hidrólise enzimática, mas também, caso ocorra, para suprir o efeito da solubilização e da hidrólise alcalina. Por isso, para se saber se ocorre algum fenômeno que altere o pH durante a hidrólise no pHstato sem ser o de hidrólise enzimática, também foram feitos testes com o farelo concentrado de soja nos pHs 8, 9 e 10, mantendo-se as mesmas condições, mas sem a adição da enzima. Estes resultados encontram-se na Figura 2.22.

Figura 2.21 – Hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado variando-se o pH. Condições da reação: 90% de umidade, 0,5% (m_{enz}/m_s), 55 °C, três horas de reação

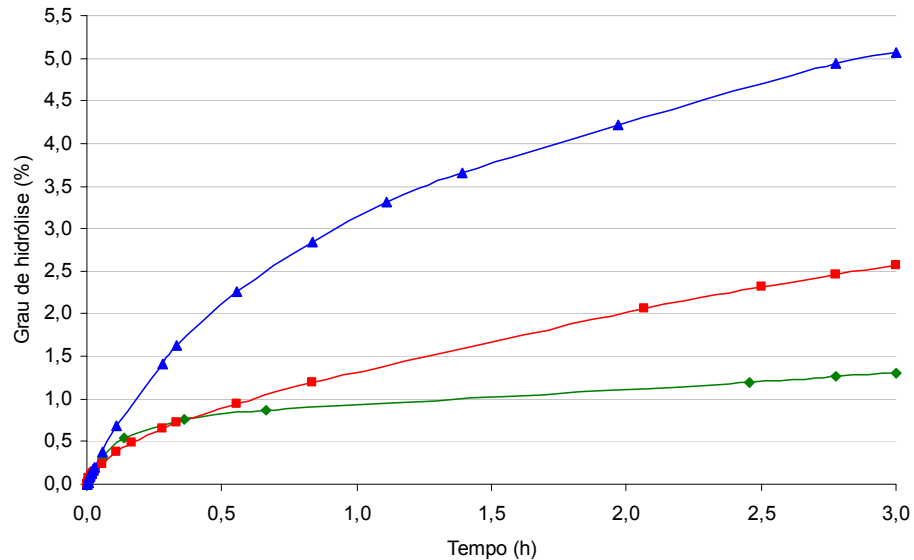


Legenda: ◆ pH 8; ■ pH 9; ▲ pH 10.

Nota: os pontos experimentais foram conectados por linhas suaves para facilitar a visualização.

Fonte: a autora.

Figura 2.22 – Hidrólise ou solubilização das proteínas do farelo de soja concentrado variando-se o pH, sem a adição de enzima. Condições da reação: 90% de umidade, 55 °C, três horas de reação



Legenda: ◆ pH 8; ■ pH 9; ▲ pH 10.

Nota: os pontos experimentais foram conectados por linhas suaves para facilitar a visualização.

Fonte: a autora.

Como pode ser observado na Figura 2.22, ocorre a adição de base mesmo sem a adição de enzima, o que indica que ao se realizar a hidrólise enzimática, outros fenômenos que alteram o pH também ocorrem, prejudicando assim a análise do desempenho da hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado pela enzima em diferentes pHs, quando esta

análise for feita apenas com base nos resultados apresentados na Figura 2.21. Porém, pode-se, por meio da Figura 2.22, observar que o consumo de hidróxido de sódio ocorre de forma muito mais acentuada a pH 10, sendo que em três horas de reação, o desempenho enzimático na reação a pH 10 se torna praticamente igual ao do pH 9, como mostra a Tabela 2.5.

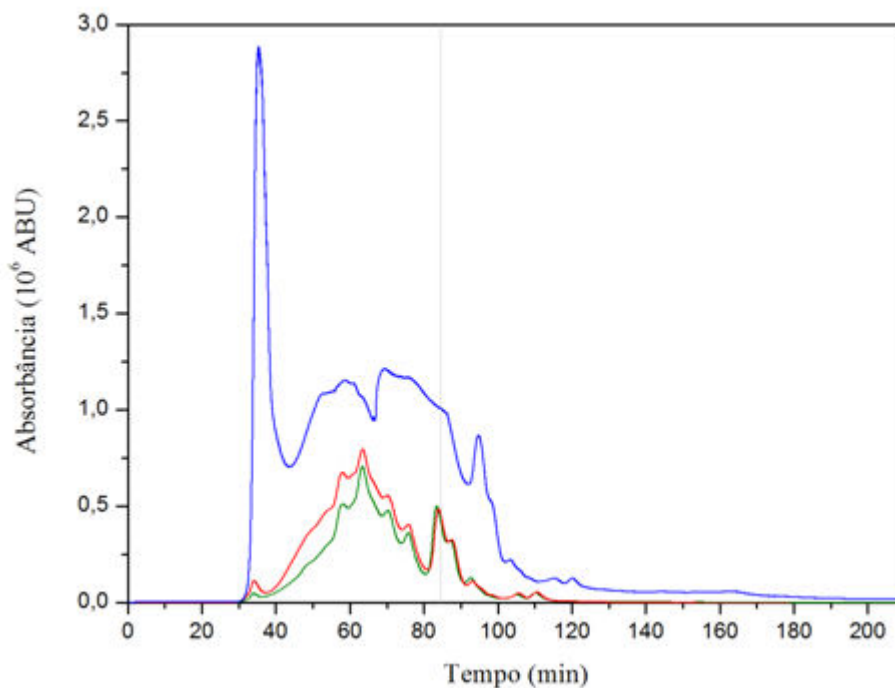
Tabela 2.5 – Valores do grau de hidrólise considerando-se apenas no efeito da hidrólise enzimática após três horas de reação

pH	Valor do grau de hidrólise com enzima (%)	Valor do grau de hidrólise sem enzima (%)	Valor do grau de hidrólise apenas com a influência da enzima (%)
9	17,76	2,58	15,18
10	20,21	5,06	15,15

Fonte: a autora.

Para tentar se entender melhor o que de fato ocorre com o farelo concentrado em diferentes pHs, foram injetadas, no cromatógrafo, amostras do sobrenadante do meio reacional nos três diferentes pHs e amostras da mistura (sobrenadante + sólido) solubilizada em solução aquosa com SDS e DTT. A Figura 2.23 apresenta os cromatogramas dos sobrenadantes do farelo após três horas nos pHs 8, 9 e 10.

Figura 2.23- Cromatograma do sobrenadante do meio reacional submetido a diferentes pHs, por três horas, com 90% de umidade, a 55 °C.



Legenda: — pH 8; — pH 9; — pH 10.

Fonte: a autora.

Pela Figura 2.23, pode-se observar que o perfil do sobrenadante nos pHs 8 e 9 não são muito diferentes entre si, o que provavelmente ocorre é que a pH 9, o farelo se torna um pouco mais solúvel na faixa de peptídeos que saem entre 40 e 80 minutos, por isso a área do farelo no pH 9 é um pouco maior nesta faixa. Porém na faixa em que, provavelmente, saem os di e tri peptídeos e os aminoácidos, ou seja, de 80 minutos em diante, a área é praticamente a mesma. Isso pode ser explicado devido ao fato de peptídeos pequenos e aminoácidos serem normalmente solúveis em qualquer pH e com isso, pode-se também concluir que não ocorre hidrólise básica nestes dois pHs ou, no máximo, que a hidrólise básica ocorre de forma igual em ambos. No pH 10, pode-se notar que a solubilização é muito maior, principalmente de peptídeos grandes, como mostra o primeiro pico. Provavelmente, também, ocorre hidrólise básica, se for observado que o pico que aparece em 65 minutos, nos pHs 8 e 9 vira um vale no pH 10 e em 95 minutos aparece um pico bem mais acentuado no pH 10 do que nos outros dois pHs.

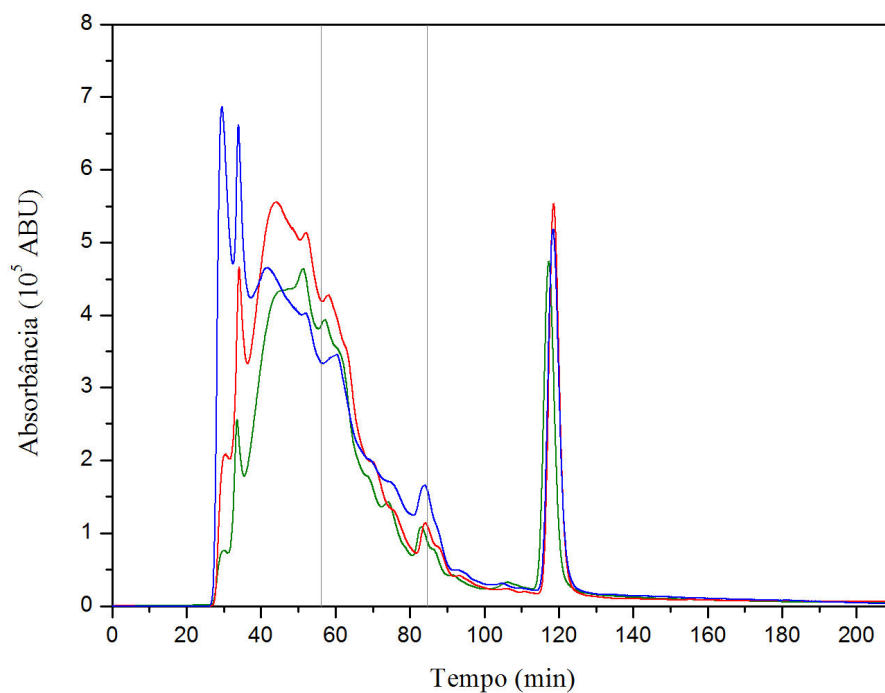
A Figura 2.24 apresenta os cromatogramas para a mistura (sobrenadante + sólido) submetido a diferentes pHs, por três horas, a 55 °C, com 90% de umidade, extraído em solução de SDS e DTT. Pode-se observar que com a solução extratora mais proteínas se solubilizam nos pHs 8 e 9 quando comparados à análise sem extração (Figura 2.23). Na faixa das proteínas que saem em 55 minutos existem menos proteínas, no pH 10 do que no pH 8 e 9. As proteínas insolúveis no pH 8 e 9 se solubilizaram com a solução extratora e ultrapassaram o pH 10, provavelmente, devido à já discutida hidrólise básica que ocorre no pH 10. As proteínas hidrolisadas são as da faixa de 55 minutos. Vem a reforçar esta hipótese, o fato de haver um aumento de área no pH 10 na região de peptídeos pequenos, após 80 minutos.

É importante esclarecer que o pico entre 110 e 120 minutos está situado na faixa em que o DTT é eluído. Desta forma, o grande pico apresentado no cromatograma da Figura 2.24 deve-se, fundamentalmente, à saída desse componente da coluna, uma vez que essas amostras haviam sido extraídas com a solução de SDS e DTT. Admitiu-se que o uso do SDS e do DTT na solubilização das amostras não alteram o tempo de retenção de seus componentes, pois foram testadas anteriormente, pelo grupo de pesquisa, amostras de albumina do soro bovino (BSA) em meio aquoso contendo SDS e DTT e em meio apenas aquoso e os tempos de retenção nessas duas situações foram iguais.

Estes resultados, que indicam que existe a adição de NaOH por fatores que não o da hidrólise enzimática, foram considerados para a escolha do pH de trabalho, porém, por falta de tempo hábil, para os modelos matemáticos propostos para descrever a reação de

hidrólise, este volume adicionado que não devido a hidrólise enzimática não foi subtraído. Mesmo assim, tal fato não invalida os modelos propostos, pois, como os modelos ajustados foram sempre para um mesmo pH, este volume a mais ocorre de forma sistemática para todos os dados utilizados. Assim, o que se tem, na verdade, é que os valores de grau de hidrólise são um pouco superestimados sistematicamente.

Figura 2.24 – Cromatograma da mistura (sobrenadante + sólido) submetida a diferentes pHs, por três horas, com 90% de umidade, a 55 °C, extraído com solução de SDS e DTT



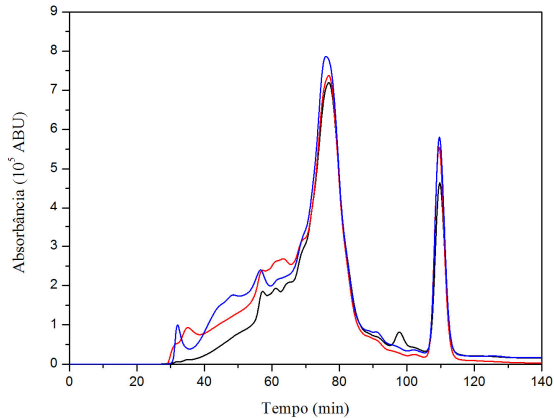
Legenda: — pH 8; — pH 9; — pH 10.

Fonte: a autora.

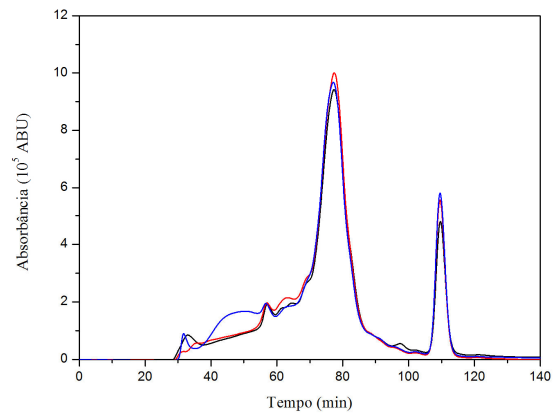
O último teste feito para se observar o comportamento da hidrólise com a variação do pH foi injetar no HPLC amostras de farelo hidrolisado pela enzima nos três diferentes pHs, mas com mesmo valor de grau de hidrólise, depois de extraídas as proteínas com SDS e DTT. Os resultados são apresentados na Figura 2.25.

Figura 2.25- Cromatogramas do farelo de soja hidrolisado (extraídos com SDS e DTT) em diferentes pHs, mas com amostras injetadas com o mesmo grau de hidrólise, a 55 °C, 90% de umidade e 0,5% (m_{enz}/m_s)

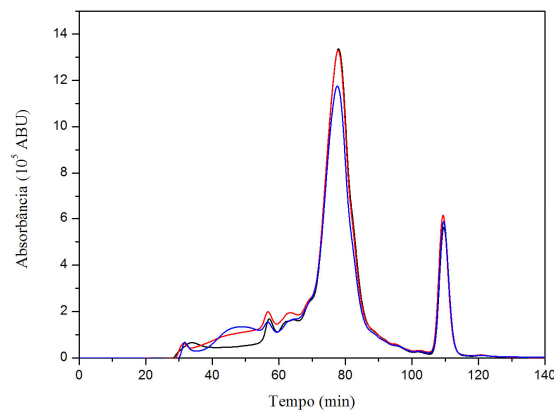
(a) GH = 4%



(b) GH = 7%



(c) GH = 10%



Legenda: — pH 8; — pH 9; — pH 10.

Fonte: a autora.

Estes resultados preliminares indicam que o pH não afeta o produto formado pela hidrólise em um mesmo valor de grau de hidrólise, afetando apenas a velocidade com que se atinge esse mesmo produto, como mostra a Tabela 2.6. Porém, como sugestão para trabalhos futuros, mais replicatas podem ser feitas para comprovar esses resultados, principalmente se a diferença na área no começo dos cromatogramas (até 65 minutos) são apenas frutos de erro experimental ou podem ter algum significado. O provável erro experimental mais acentuado no início da hidrólise pode ser justificado pelo fato de no começo da hidrólise o farelo de soja concentrado estar mais heterogêneo.

Tabela 2.6 – Tempo que se leva para se chegar a um determinado valor de grau de hidrólise para um dado valor de pH – devido a falha experimental, não foi possível anotar o tempo correspondente a pH = 10 e GH = 7

pH	GH (%)	4	7	10
8		6,5 min	33,5 min	60 min
9		6,5 min	16 min	33 min
10		5,6 min	-	25 min

Fonte: a autora.

Desta forma, com algum indício de hidrólise básica no pH 10, se decidiu adotar, como pH de trabalho, o valor de pH 9. Outro motivo que também se acrescenta a esta escolha é o fato de que a enzima é inativada em pHs acima de 10. Como a idéia é, posteriormente, estudar o processo em escala industrial e neste caso o controle de pH é menos preciso, deve-se levar em consideração a possibilidade de ocorrência de variações de pH ao longo da hidrólise suficientes a ponto de inativar a enzima. Assim, o pH 9 deixa uma boa margem de segurança, além de não apresentar um desempenho inferior ao do pH 10 durante quase toda a reação.

2.3.1.5 Conclusões parciais

De posse desses resultados, pôde-se assim escolher as melhores condições para se realizar o restante dos experimentos previstos no trabalho. As condições decididas, então, foram a utilização da relação enzima/substrato de 0,5% (menz/ms), temperatura de 55 °C, pH 9, 90% umidade e agitação entre 400 e 500 rpm.

2.3.2 Modelagem matemática da reação de hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado

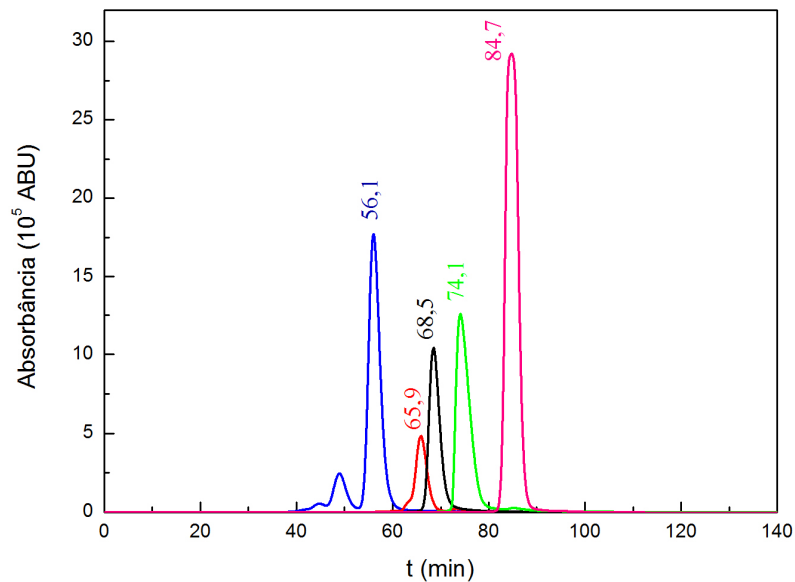
Primeiro foram passados os padrões com massa molecular conhecida no cromatógrafo para que fosse possível a divisão dos cromatogramas das amostras em pseudocomponentes. Depois, a reação de hidrólise foi feita em triplicata e os pontos retirados durante a reação também foram retirados triplicata para se verificar a reprodutibilidade dos experimentos. Alguns pontos aparecem apenas em duplicatas por problemas na hora da análise. Para o cálculo da concentração dos pseudocomponentes e para os ajustes por Michaelis-Menten com inibição e por redes neurais foi utilizado os dados de uma das replicatas.

2.3.2.1 Padrões

Como não é possível quantificar os peptídeos gerados na hidrólise individualmente, o que se fez foi dividi-los em faixas de tamanho moleculares para depois se quantificar o conjunto dos peptídeos presentes em uma determinada faixa. Para se determinar as fronteiras de cada faixa, foram utilizados padrões de proteínas e peptídeos com massa molecular conhecida. De posse dos tempos de retenção de cada padrão, pôde-se, então, mapear o intervalo de tempo em que se saía determinada faixa de tamanho de peptídeos.

A Figura 2.26 e a Tabela 2.7 apresentam, respectivamente, os padrões utilizados e seu tempo de retenção; e a distribuição de tamanho molecular para cada pseudocomponente.

Figura 2.26 – Padrões de massa molecular conhecida e seus tempos de retenção



Legenda: cada valor na figura representa o tempo de retenção, em minutos, dos padrões de seguintes tamanhos, em Daltons: — 66.000; — 29.000; — 14.175; — 5.733; — 238,2.

Fonte: a autora.

Tabela 2.7 – Divisão dos cromatogramas das amostras para análise da distribuição de peptídeos ao longo da hidrólise

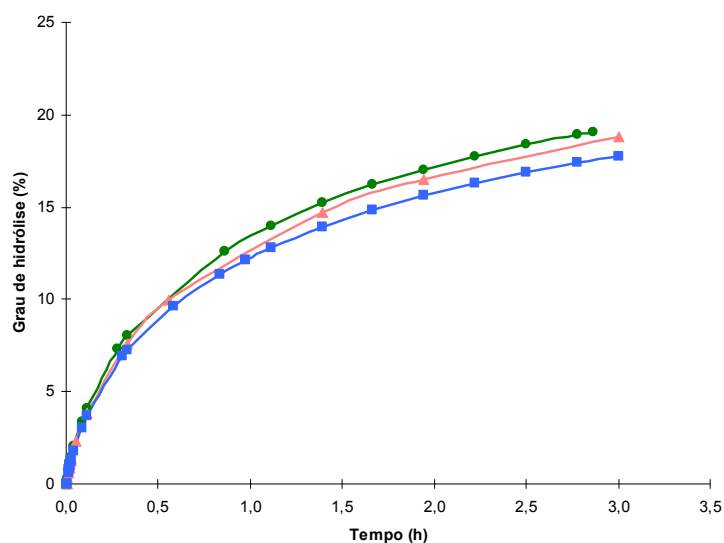
Fração	Faixa de tamanho (Da)
1	≥ 66.000
2	65.999 - 29.000
3	28.999 - 14.175
4	14.174 - 5.733
5	5.732 - 238
6	≤ 237

Fonte: a autora.

2.3.2.2 Reprodutibilidade

O experimento para o ajuste cinético, nas condições de pH 9, temperatura de 55°C, m_{enz}/m_s de 0,5% e 90% de umidade, foi realizado em triplicata. A Figura 2.27 apresenta a evolução do grau de hidrólise em função do tempo. Como pode-se observar, a maior diferença aparece no final da hidrólise, mas mesmo assim, não passando de duas unidades de diferença no valor do grau de hidrólise, o que indica que o experimento foi reprodutível.

Figura 2.27 – Reprodutibilidade do ensaio do grau de hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado em função do tempo (pH = 9, T = 55°C, 0,5% (m_{enz}/m_s), 90% de umidade)



Nota 1: os pontos experimentais foram conectados por linhas suaves para facilitar a visualização.

Nota 2: cada replicata é representada por uma cor.

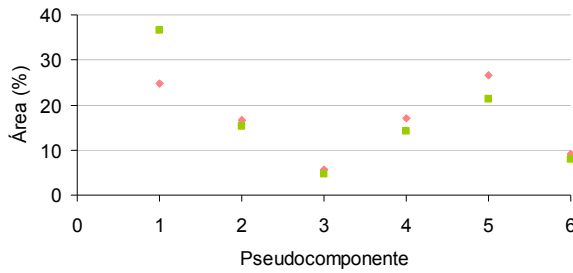
Fonte: a autora.

A Figura 2.28 apresenta os valores em duplicata ou, quando foi possível, em triplicata, para se observar a variação da área do cromatograma para cada pseudocomponente em um determinado grau de hidrólise. Pode-se perceber que para os graus de hidrólise mais baixos, a reprodutibilidade é menor para todos os pseudocomponentes, provavelmente porque o substrato se encontra mais insolúvel e heterogêneo nesta etapa, o que dificulta a amostragem. Observa-se também que o pseudocomponente 1, que compreende as proteínas maiores do que 66.000 Da apresenta maior variação entre os pseudocomponentes na maioria dos diferentes graus de hidrólise, provavelmente porque é o pseudocomponente que possui a maior fração, senão todas as proteínas insolúveis da amostra, porém nos últimos cromatogramas, quando as proteínas já se encontram mais hidrolisadas e solúveis, a variabilidade do pseudocomponente 1 diminui muito. As outras variações provavelmente se devem ao erro experimental.

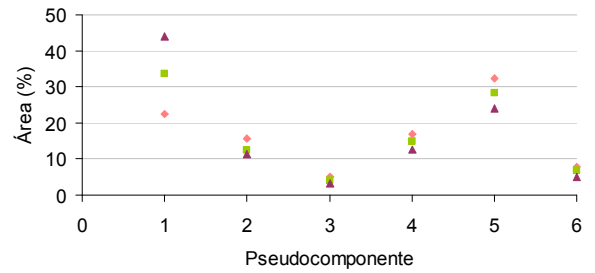
É importante ressaltar que, na construção da Figura 2.28, para o cômputo da área, foi desconsiderado o pico apresentado na faixa de 110-120 min, tempo de eluição do DTT. Assim, a área desse pico não contribui para a área total nem para a fração de área do pseudocomponente 6.

Figura 2.28 – Reprodutibilidade para os diferentes graus de hidrólise

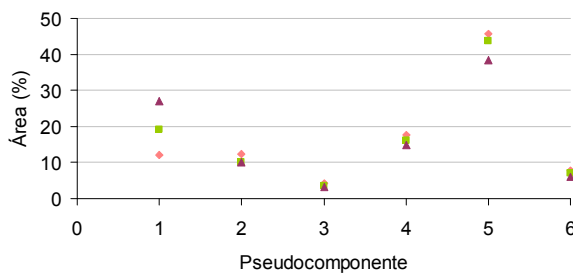
a) GH = 2%



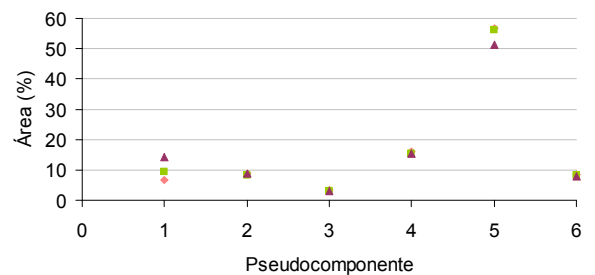
b) GH = 4%



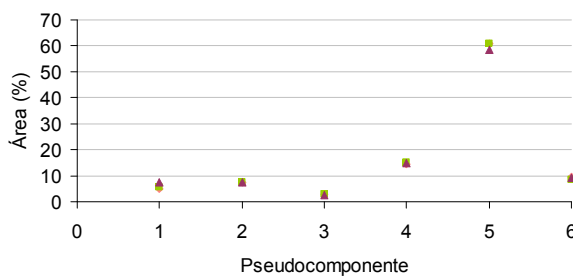
c) GH = 7%



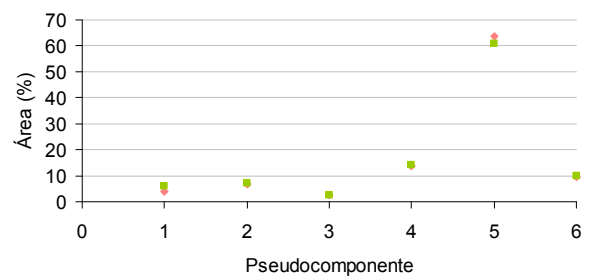
d) GH = 11%



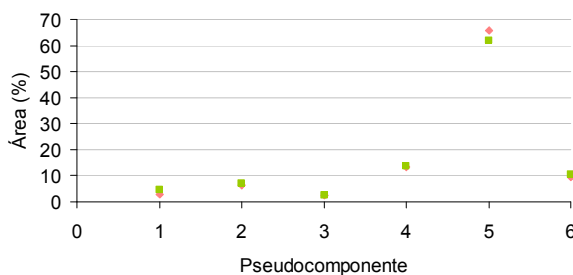
e) GH = 14%



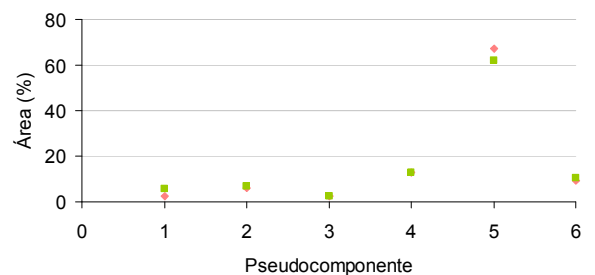
f) GH = 16%



g) GH = 17%



h) GH = 18%



Nota: cada replicata está representada com uma cor e geometria diferente.

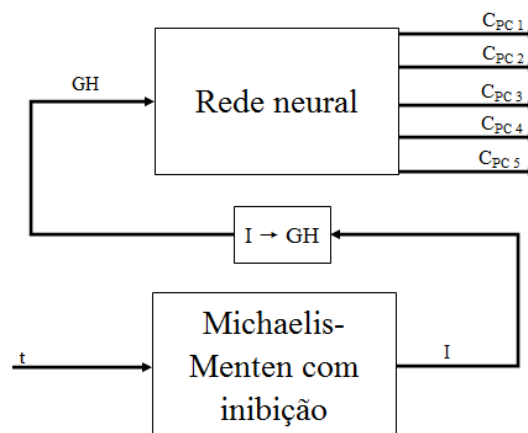
Fonte: a autora.

2.3.2.3 Modelagem matemática das ligações hidrolisadas em função do tempo por Michaelis-Menten com inibição e das concentrações dos pseudocomponentes em função do grau de hidrólise por redes neurais

Conforme resultados do item 2.3.1.4, o perfil peptídico parece ser função apenas do grau de hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado, não dependendo das condições sob as quais a hidrólise foi conduzida. Como foi mostrado, o que varia com as condições de reação parece ser apenas o tempo demandado para se atingir um determinado grau de hidrólise. Essa característica do processo de hidrólise motivou a proposta de uma nova metodologia para a modelagem da hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado. A proposta, ilustrada pela Figura 2.29, é de que se treine uma rede neural para prever as concentrações de cada pseudocomponente, dado um valor de grau de hidrólise das proteínas. O grau de hidrólise, entretanto, é uma resposta, no tempo, da evolução do processo de hidrólise, determinada pelas condições experimentais sob as quais o processo está sendo conduzido. A evolução, no tempo, da concentração de proteínas hidrolisáveis e, conseqüentemente, a evolução, também no tempo, da concentração de proteínas hidrolisadas tem um comportamento bastante característico de um modelo do tipo Michaelis-Menten e, portanto, propõe-se que um modelo desse tipo seja ajustado, para cada condição de reação.

Nesse sentido, a metodologia proposta, que a Figura 2.29 apresenta, é de se fazer dois ajustes para modelos diferentes, de modo a se obter tanto o grau de hidrólise quanto as concentrações de cada pseudocomponente em um dado tempo, dada uma condição experimental.

Figura 2.29 – Esquema da metodologia proposta para a modelagem da hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado



Legenda: t = tempo. I = concentração de ligações hidrolisáveis. GH = grau de hidrólise. C_{pci} = concentração do pseudocomponente i . I pode ser facilmente convertido em GH pela equação 2.10.

Fonte: a autora.

É importante esclarecer de que um modelo do tipo Michaelis-Menten é utilizado, pois supõe-se que a hidrólise das proteínas do farelo de soja seja a etapa controladora no processo de solubilização e hidrólise das proteínas. Nesse sentido, mecanisticamente, está se modelando uma etapa que ocorre em solução, sendo a etapa de solubilização bastante rápida. Esta abordagem é conhecida como pseudo-homogênea. Uma outra abordagem que poderia ser utilizada é a para substratos sólidos, em que se considera que a enzima age diretamente no substrato insolúvel. Esta outra abordagem é descrita por Blanch e Clark (1997) e fica como sugestão para trabalhos futuros, testar a modelagem deste processo por esta segunda abordagem.

Os resultados apresentados dos ajustes da cinética de Michaelis-Menten com inibição para prever a evolução do grau de hidrólise em função do tempo são exemplificados, nesse trabalho, para um dos experimentos da Figura 2.27, conduzido a $\text{pH} = 9$, $T = 55^\circ\text{C}$, $0,5\%$ (m_{enz}/m_s) e 90% de umidade, conforme detalhado no item 2.3.2.3. Entretanto, a metodologia proposta é genérica e pode ser aplicado o ajuste a outras condições experimentais. A utilização de uma rede neural para as respostas das concentrações de pseudocomponentes em função do grau de hidrólise das proteínas está justificada e descrita no item 2.3.2.4.

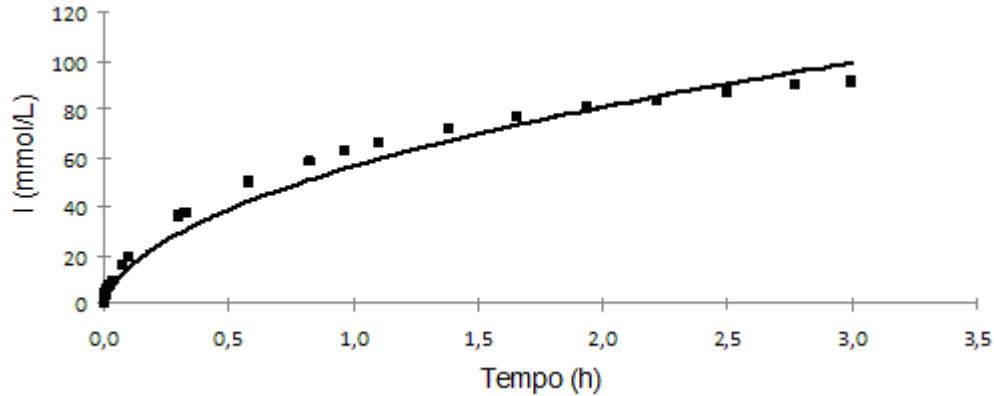
2.3.2.4 Modelagem matemática por Michaelis-Menten com inibição

Para o ajuste do modelo de Michaelis-Menten, dados de experimento conduzido a $\text{pH} = 9$, $T = 55^\circ\text{C}$, $0,5\%$ (m_{enz}/m_s) e 90% de umidade foram utilizados. Nesse experimento, a concentração de proteínas do farelo de soja foi de $6,6 \text{ g}/100\text{g}$ de mistura reacional. Dessa forma, a partir desse valor e, com a utilização da Equação 2.9, chega-se que a concentração volumétrica de proteína era de $[S_0] = 514 \text{ mmol}/\text{L}$. Utilizando, portanto desse valor de concentração inicial de ligações hidrolisáveis ($[\text{NH}_0] = 514 \text{ mmol}/\text{L}$), partiu-se para a estimação dos parâmetros da Equação 2.8.

Conforme descrito no item 2.2.3.2 a, estimou-se primeiro os valores de K_M e $V_{\text{máx}}$, por Levenberg-Marquardt, chegando-se a valores de $159,5 \text{ mmol}/\text{L}$ e $0,11 \text{ mmol}/(\text{L}\cdot\text{s})$, respectivamente. Para K_i , seguindo o procedimento descrito, obteve-se o valor de $1,66 \text{ mmol}/\text{L}$.

A Figura 2.30 mostra o comportamento dos pontos experimentais e o ajuste do modelo. Observa-se que há um desvio sistemático no ajuste.

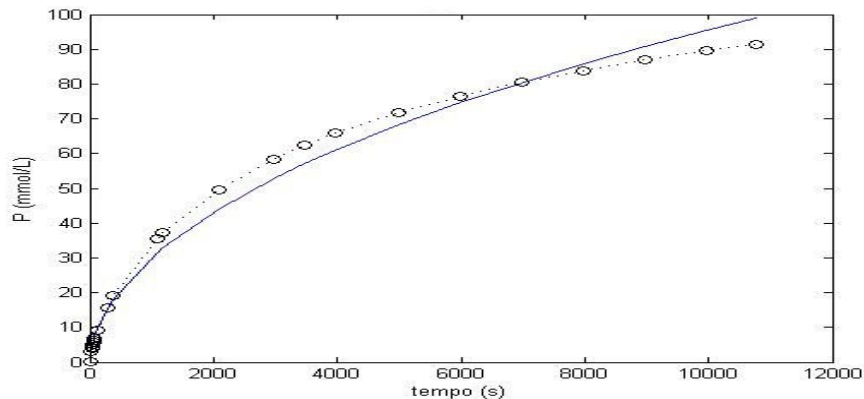
Figura 2.30 – Ajuste inicial dos parâmetros K_M , V_{\max} e K_i por Levenberg-Marquardt. $K_M = 159,5$ mmol/L, $V_{\max} = 0,11$ mmol/(L.s), $K_i = 1,66$ mmol/L, $[\text{NH}_0] = 514$ mmol/L.



Legenda: ■ Dados experimentais; — Ajuste do modelo.
Fonte: a autora.

Ao se tentar refinar os resultados dos valores obtidos para os parâmetros V_{\max} , K_m e K_i com o Algoritmo de Recozimento Simulado pouco se conseguiu melhorar no ajuste. Mesmo alterando muito os valores iniciais (os obtidos por Levenberg-Marquardt) e obtendo resultados de valores bem diferentes, pouco se alterou qualitativamente o ajuste. A Figura 2.31 mostra o ajuste para valores dos parâmetros de $V_{\max} = 0,25$ mmol/(L.s), $K_M = 2,38$ mmol/L e $K_i = 0,0100$ mmol/L. Como pode ser observado, mesmo alterando-se muito os valores desses parâmetros, pouco se alterou na configuração do ajuste.

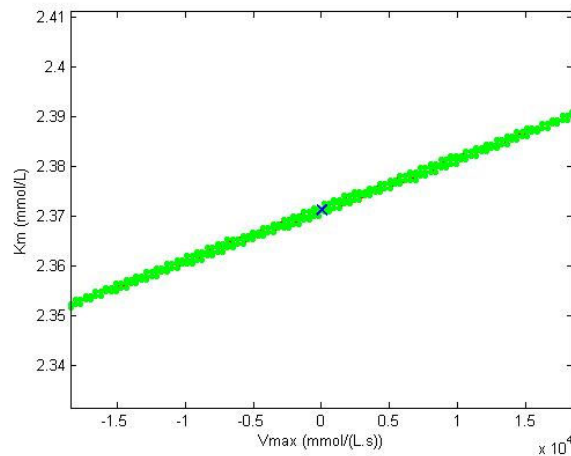
Figura 2.31 – Ajuste dos parâmetros K_M , V_{\max} e K_i por Recozimento simulado. $K_M = 2,38$ mmol/L, $V_{\max} = 0,25$ mmol/(L.s), $K_i = 0,01$ mmol/L, $[\text{NH}_0] = 514$ mmol/L.



Legenda: ○ Dados experimentais; — Ajuste do modelo. $P = I$ = ligações hidrolisadas.
Fonte: a autora.

A título de exemplificação, a região de confiança para o ajuste para os parâmetros K_M e V_{\max} apresentado na Figura 2.31 é mostrado na Figura 2.32. A região de confiança varia na ordem de 10^4 para V_{\max} , o que mostra a deficiência do ajuste.

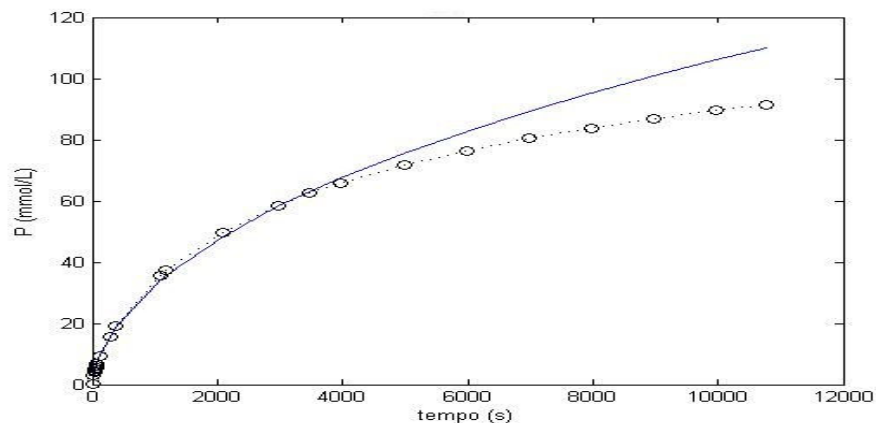
Figura 2.32 – Região de confiança para K_M e V_{\max} feito por Recozimento Simulado. $K_M = 2,38 \text{ mmol/L}$, $V_{\max} = 0,25 \text{ mmol/(L.s)}$, $K_i = 0,01 \text{ mmol/L}$, $[\text{NH}_0] = 514 \text{ mmol/L}$



Fonte: a autora.

Uma outra tentativa foi feita, tentando-se primeiramente ajustar os dados iniciais e depois os finais. O resultado obtido é apresentado na Figura 2.33. Ao se tentar ajustar os pontos finais, o ajuste dos pontos iniciais piora. Para o ajuste mostrado na Figura 2.33, os valores dos parâmetros foram: $V_{\max} = 0,23 \text{ mmol/(L.s)}$, $K_M = 251,0 \text{ mmol/L}$ e $K_i = 1,5 \text{ mmol/L}$. A baixa qualidade do ajuste é nítida.

Figura 2.33 – Ajuste tentando-se primeiro ajustar os dados iniciais e depois os finais. Ajuste por Recozimento Simulado. $K_M = 251,0 \text{ mmol/L}$, $V_{\max} = 0,23 \text{ mmol/(L.s)}$, $K_i = 1,50 \text{ mmol/L}$, $[\text{NH}_0] = 514 \text{ mmol/L}$.



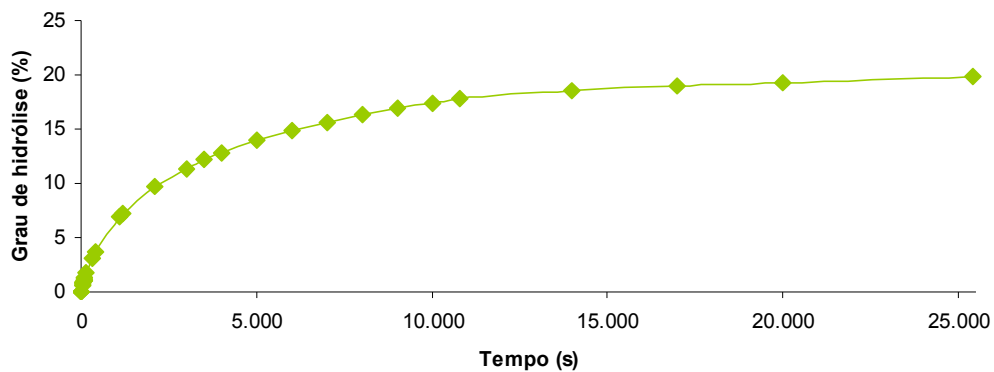
Legenda: ○ Dados experimentais; — Ajuste do modelo. $P = I =$ ligações hidrolisadas.

Fonte: a autora.

As tentativas de ajuste do modelo de Michaelis-Menten apresentadas até aqui mostram claramente (vide Figuras 2.30, 2.31, 2.33) que os dados experimentais, ao final das 3h de hidrólise (10800 s), já apresentavam incrementos muito pequenos de grau de hidrólise com o avanço do tempo. Isso demonstra que a reação estava próxima de atingir um patamar de grau de hidrólise máximo, mesmo estando a concentração de ligações hidrolisadas ainda bastante distante do valor inicial de concentração de ligações hidrolisáveis (514 mmol/L).

Esse é um forte indício de que, provavelmente, nem todos os 514 mmol/L de ligações estavam acessíveis para serem hidrolisadas. Isso é reforçado, como mostra a Figura 2.34, pela evolução do grau de hidrólise ao longo do tempo de uma reação feita sob as condições pH 9, a 55°C, 0,5% (m_{enz}/m_s) durante aproximadamente 7 horas. Nota-se claramente que atinge-se um grau de hidrólise máximo de pouco mais de 20%, o que leva à conclusão de que apenas cerca de 110 mmol/L das proteínas eram hidrolisáveis.

Figura 2.34 – Hidrólise por aproximadamente 7 horas (25.000 s) das proteínas do farelo de soja, a 55°C, pH 9, 0,5% (m_{enz}/m_s).



Fonte: a autora.

Nesse sentido, é necessário alterar a concentração de $[NH_0]$ que foi adotada nas tentativas de ajuste apresentadas no início desse tópico. Assim, um novo ajuste foi feito para os parâmetros da Equação 2.8, mas adotando-se agora $[NH_0] = 110$ mmol/L. Nessa nova tentativa, o ajuste foi feito apenas utilizando Recozimento Simulado. Os valores de estimativas iniciais e de limites inferior e superior de busca para cada parâmetro do modelo estão apresentados na Tabela 2.8.

Tabela 2.8 – Estimativas iniciais, limites inferior e superior para a busca pelos parâmetros ótimos pelo método do Recozimento Simulado utilizando $[NH_0] = 110$ mmol/L

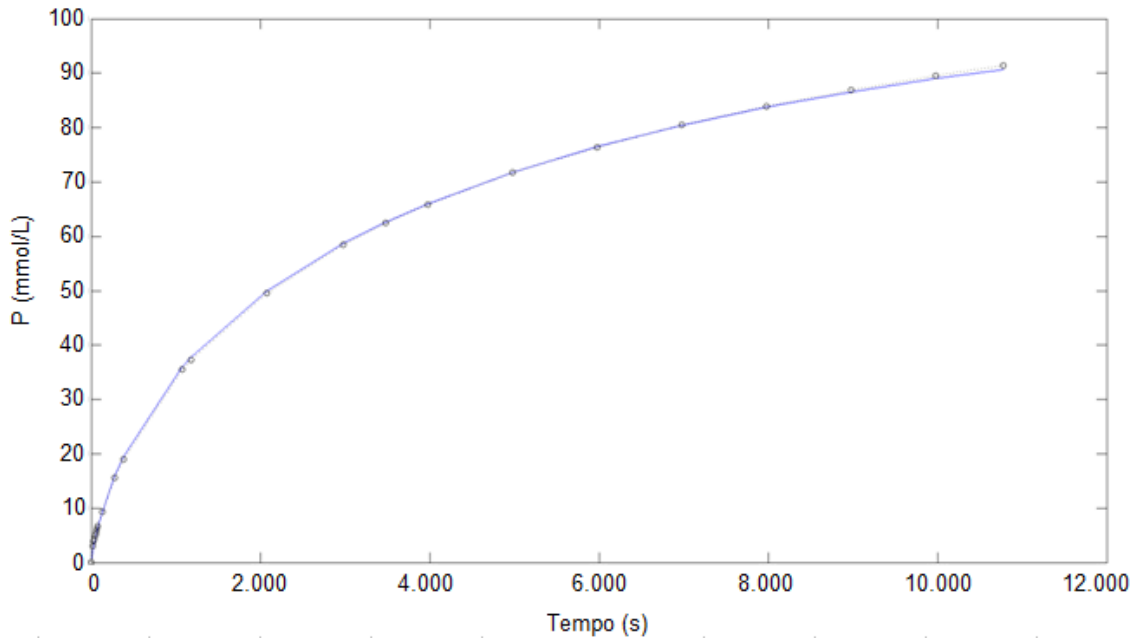
	K_M (mmol/L)	$V_{m\acute{a}x}$ (mmol/(L.s))	K_i (mmol/L)
Estimativa inicial	325,0	0,11	11,2
Limite inferior	25,0	0,01	0,01
Limite superior	450,0	0,70	25,0

Fonte: a autora.

Os novos parâmetros ajustados tiveram os seguintes valores: $V_{m\acute{a}x} = 0,50$ mmol/(L.s), $K_M = 434,2$ mmol/L e $K_i = 10,2$ mmol/L. Esse novo ajuste de parâmetros se mostrou de resultados de alta qualidade, conforme apresentado na Figura 2.35. É importante

observar que os valores dos parâmetros otimizados não se encontram em extremos de intervalo de busca, o que demonstra que o algoritmo não ficou preso a limites de intervalo.

Figura 2.35 – Ajuste por Recozimento Simulado. $K_M = 434,2$ mmol/L, $V_{m\acute{a}x} = 0,50$ mmol/(L.s), $K_i = 10,2$ mmol/L, $[NH_0] = 110$ mmol/L.

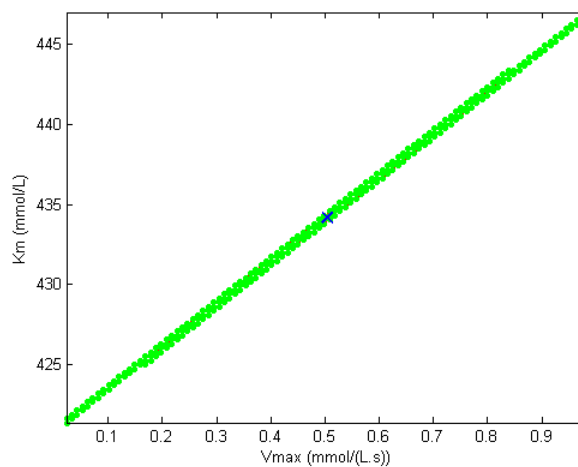


Legenda: ○ Dados experimentais; — Ajuste do modelo. $P = I$ = ligações hidrolisadas.

Fonte: a autora.

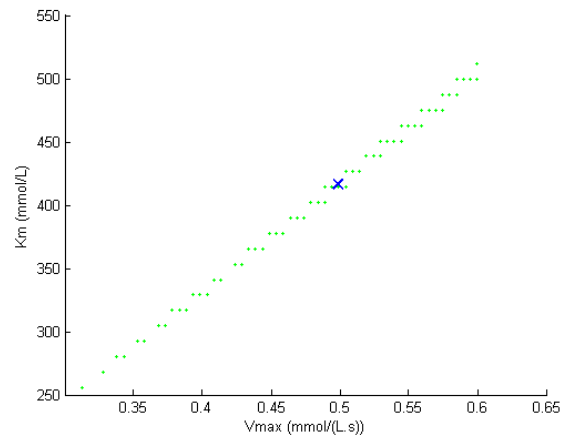
Os intervalos de confiança para cada par de parâmetro do modelo (Equação 2.8) estão ilustrados nas Figuras 2.36 a 2.41. Os intervalos de confiança não são muito amplos, o que valida a confiança nos parâmetros.

Figura 2.36 – Região de confiança linear. Par K_M e $V_{m\acute{a}x}$.



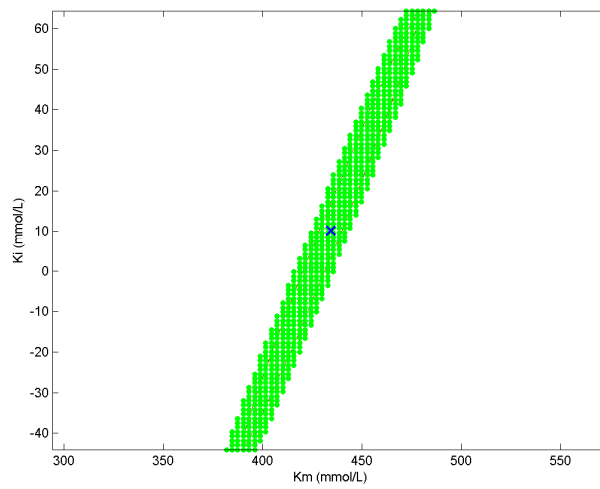
Fonte: a autora.

Figura 2.37 – Região de confiança não-linear. Par K_M e $V_{m\acute{a}x}$.



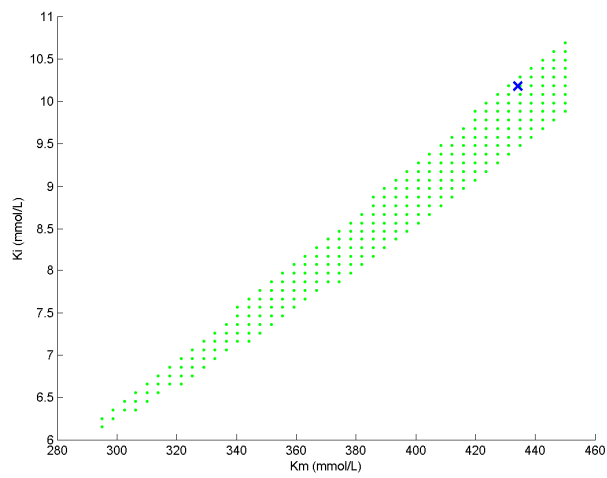
Fonte: a autora.

Figura 2.38 – Região de confiança linear. Par K_i e K_M .



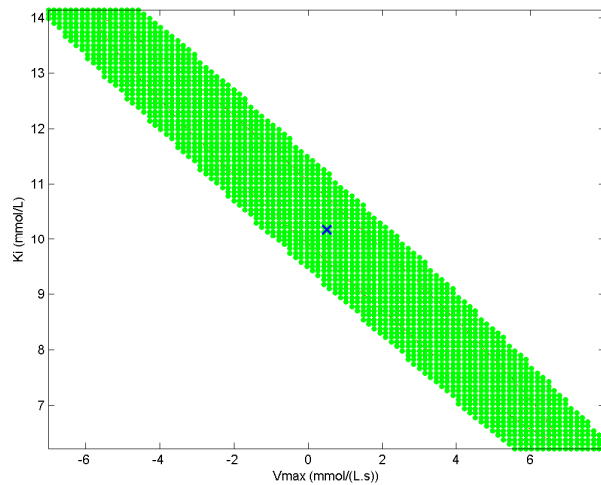
Fonte: a autora.

Figura 2.39 – Região de confiança não-linear. Par K_i e K_M .



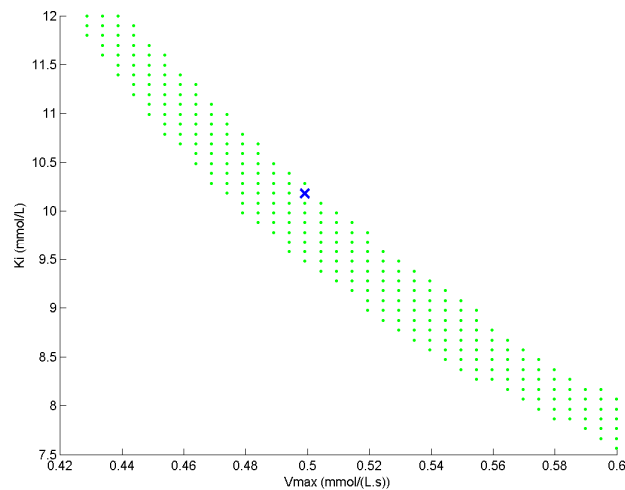
Fonte: a autora.

Figura 2.40 – Região de confiança linear. Par K_i e $V_{m\acute{a}x}$.



Fonte: a autora.

Figura 2.41 – Região de confiança não-linear. Par K_i e $V_{m\acute{a}x}$.



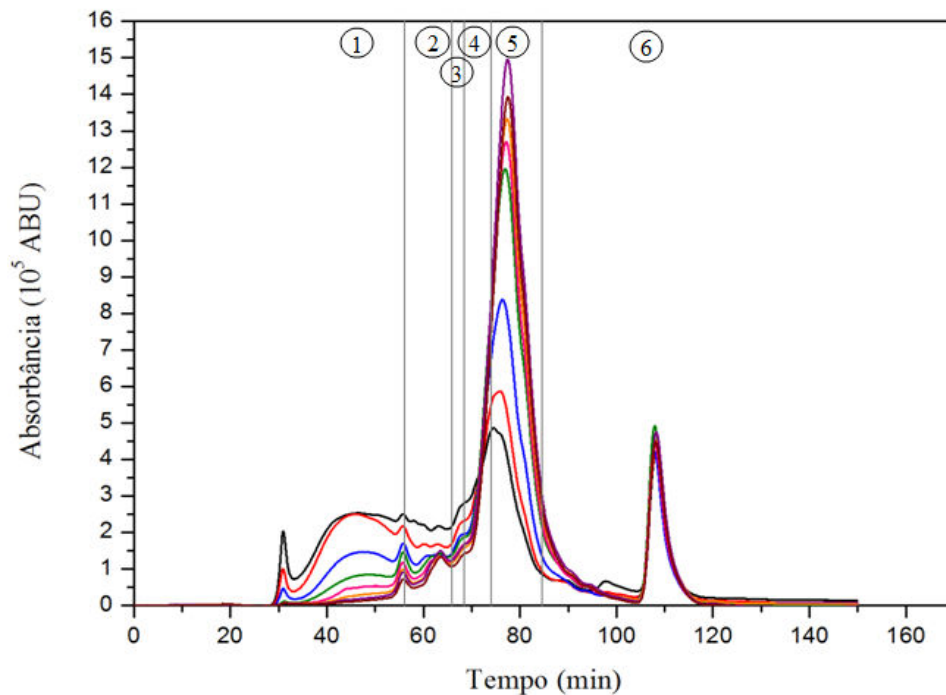
Fonte: a autora.

Portanto, o ajuste alcançado para os parâmetros da cinética de Michaelis-Menten com inibição foi bastante satisfatório. Pode-se pensar, em trabalhos futuros, em se fazer um ajuste de quatro parâmetros, isto é, os mesmos três aqui ajustados ($V_{m\acute{a}x}$, K_M e K_i), adicionados de um parâmetro que seja responsável por quantificar a quantidade de ligações das proteínas que não são hidrolisáveis. Chamando-se esse novo parâmetro de A , a concentração de ligações hidrolisáveis $[NH_0]$, portanto, seria na verdade $([S_0] - A)$. Entretanto, o ajuste final aqui apresentado já ilustra, apropriadamente, a adequação da metodologia proposta no trabalho.

2.3.2.5 Cromatogramas do farelo hidrolisado

A Figura 2.42 apresenta a análise cromatográfica, após a solubilização com a solução de SDS e DTT, de hidrolisados das proteínas do farelo de soja concentrado a 55 °C, 90% de umidade, 0,5% (m_{enz}/m_s), pH 9, para 8 diferentes graus de hidrólise: 2%; 4%; 7%, 11%, 14%, 16%, 17 e 18%.

Figura 2.42 – Hidrolisados das proteínas do farelo de soja concentrado, após extração das proteínas em solução de SDS e DTT, em 8 diferentes graus de hidrólise, a 55 °C, pH 9, 90% umidade e 0,5% (m_{enz}/m_s)



Legenda: — 2%; — 4%; — 7%; — 11%; — 14%; — 16%; — 17 e — 18%.

Fonte: a autora.

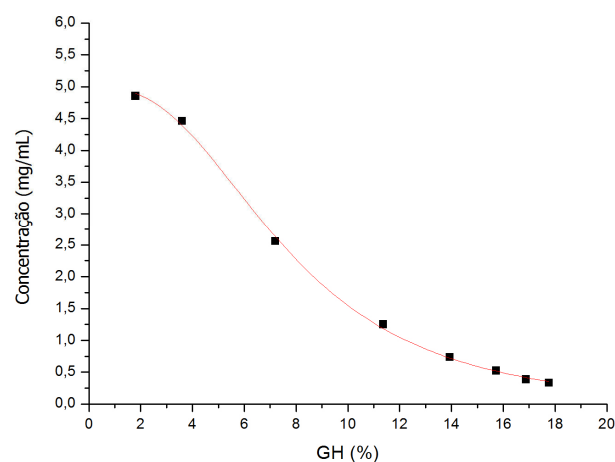
Como pode ser observado na Figura 2.42, conforme aumenta-se o grau de hidrólise, diminui-se a área de peptídeos maiores e aumenta-se a área de peptídeos menores, o que é totalmente esperado por se tratar de uma reação de hidrólise. O pico que sai em aproximadamente 110 minutos é relativo à absorção do DTT. Para os cálculos de concentração, a área deste pico foi desconsiderada.

Cada cromatograma foi dividido em seis faixas de tamanhos diferentes, com base no tempo de retenção dos padrões, como mostrado na Figura 2.42. Posteriormente, a área de cada pseudocomponente foi transformada em concentração pelo método das áreas cromatográficas. Os valores dessas concentrações são apresentados no item 2.3.2.6.

2.3.2.6 Modelagem matemática das concentrações dos pseudocomponentes em função do grau de hidrólise por redes neurais

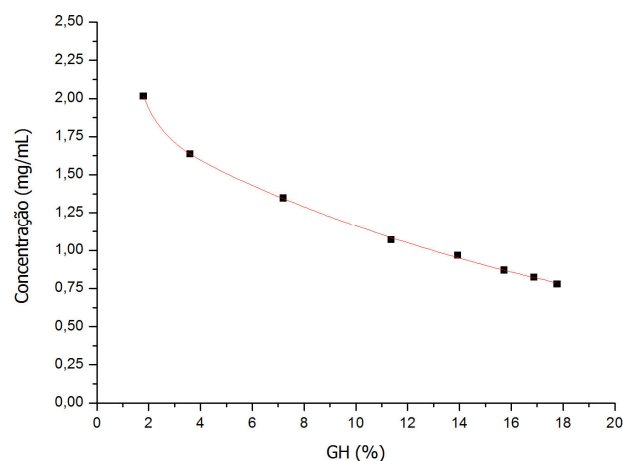
As concentrações foram plotadas em função do grau de hidrólise para cada pseudocomponente e uma curva foi ajustada para cada um. As Figuras de 2.43 a 2.48 apresentam os pontos experimentais e os ajustes, respectivamente, dos pseudocomponentes 1 ao 6.

Figura 2.43 – Concentração do pseudocomponente 1 (peptídeos maiores ou iguais a 66.000 Da) em função do grau de hidrólise



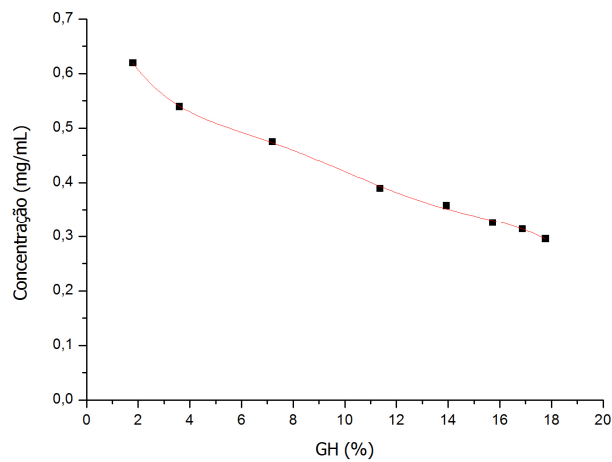
Legenda: ■ Dados experimentais. — Curva de ajuste do tipo logística ($y = (A_1 - A_2) / (1 + (x/x_0)^p) + A_2$).
Fonte: a autora.

Figura 2.44 – Concentração do pseudocomponente 2 (peptídeos com tamanho entre 65.999 e 29.000 Da) em função do grau de hidrólise



Legenda: ■ Dados experimentais. — Curva de ajuste do tipo decaimento exponencial 2 ($y = y_0 + A_1 * e^{-x/t1} + A_2 * e^{-x/t2}$).
Fonte: a autora.

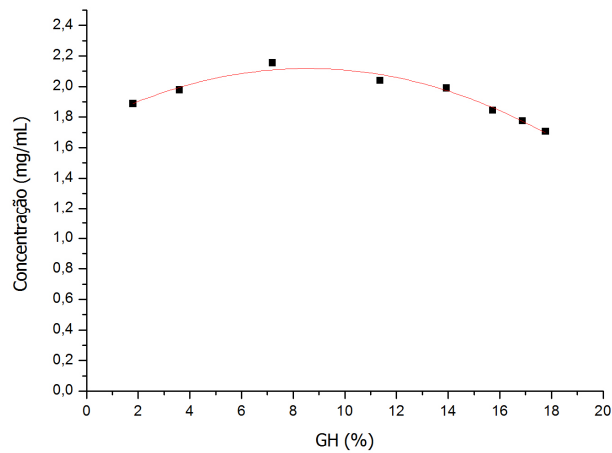
Figura 2.45 – Concentração do pseudocomponente 3 (peptídeos com tamanho entre 28.999 e 14.175 Da) em função do grau de hidrólise



Legenda: ■ Dados experimentais. — Curva de ajuste do tipo decaimento exponencial 2 ($y = y_0 + A_1 * e^{-x/t_1} + A_2 * e^{-x/t_2}$).

Fonte: a autora.

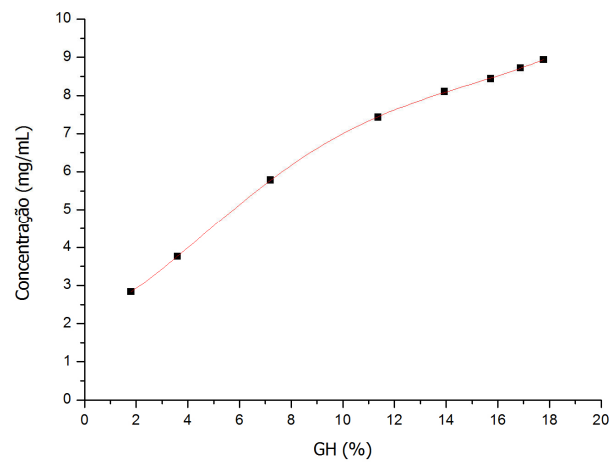
Figura 2.46 – Concentração do pseudocomponente 4 (peptídeos com tamanho entre 14.174 e 5.733 Da) em função do grau de hidrólise



Legenda: ■ Dados experimentais. — Curva de ajuste do tipo polinomial de segundo grau.

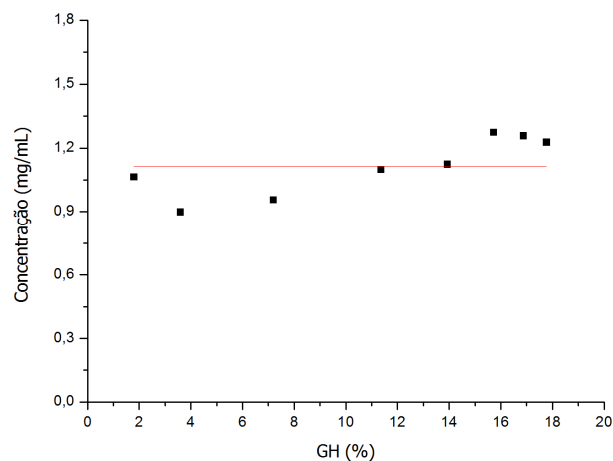
Fonte: a autora.

Figura 2.47 – Concentração do pseudocomponente 5 (peptídeos com tamanho entre 5.732 e 238 Da) em função do grau de hidrólise



Legenda: ■ Dados experimentais. — Curva de ajuste do tipo polinomial de grau cinco.
Fonte: a autora.

Figura 2.48 – Concentração do pseudocomponente 6 (peptídeos com menores do que 238 Da) em função do grau de hidrólise



Legenda: ■ Dados experimentais. — Curva de ajuste do tipo linear.
Fonte: a autora.

Pela Figura 2.43, que compreende peptídeos e proteínas maiores ou iguais a 66.000 Da, pode-se observar que o comportamento dos dados experimentais, apesar de ser parecido com o descrito pela equação de Michaelis-Menten difere principalmente nos dois primeiros pontos, em que nota-se um ponto de inflexão, com a mudança de concavidade da curva, comportamento este, não descrito por Michaelis-Menten. Isto provavelmente se deve ao fato do substrato, o farelo de soja concentrado, ser insolúvel em água, ou seja, este comportamento inicial pode ser devido à solubilização das proteínas do farelo, o qual não é explicado pela cinética convencional. Para se confirmar este comportamento anômalo, como

sugestão para trabalhos futuros, pode-se proceder a novamente a este experimento retirando-se mais pontos nesta faixa inicial de hidrólise. Além disso, o que também pode-se observar é que os peptídeos nesta faixa de tamanho sofrem a hidrólise enzimática.

A Figura 2.44 e a Figura 2.45 apresentam, respectivamente, os pontos experimentais do pseudocomponente 2, que compreende a faixa de tamanho de peptídeos entre 65.999 e 29.000 Da e os pontos experimentais do pseudocomponente 3, que compreende a faixa de tamanho de peptídeos entre 28.999 e 14.175 Da. Pode-se observar que os peptídeos nestas duas faixas sofrem a hidrólise enzimática.

O que se observa na Figura 2.46, que mostra a concentração do pseudocomponente 4 (com peptídeos de tamanho entre 14.174 e 5.733 Da) em função do grau de hidrólise, é que provavelmente a enzima hidrolisa, inicialmente, os pseudocomponentes 1, 2 e 3 no pseudocomponente 4 em uma velocidade maior com que hidrolisa este último, ocorrendo assim uma formação maior do que o consumo deste pseudocomponente. Quando o grau de hidrólise supera o valor de 9%, os peptídeos desta faixa de tamanho passam a ter a taxa de consumo maior que a de formação, indicando que peptídeos desta faixa também são hidrolisados pela enzima.

A Figura 2.47 apresenta os pontos experimentais do pseudocomponente 5, que compreende a faixa de tamanho de peptídeos entre 5.732 e 238 Da. Pode-se observar que há a formação de peptídeos nesta região durante a hidrólise.

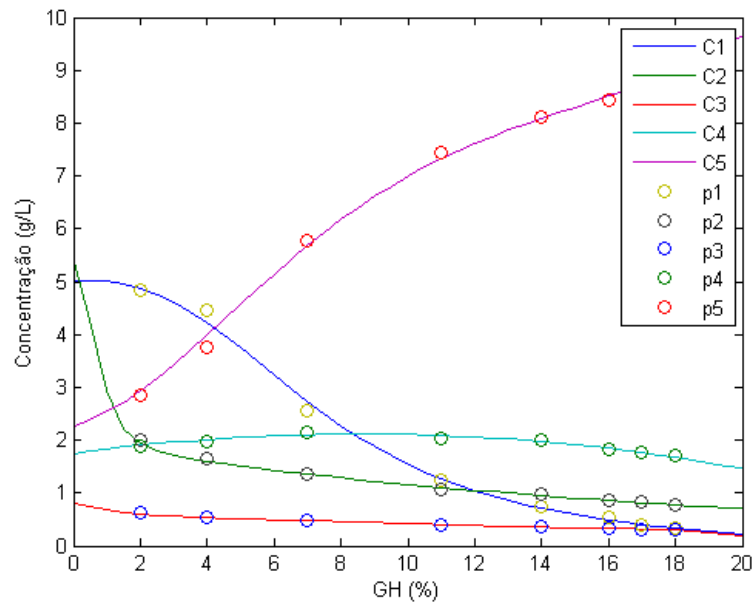
A Figura 2.48 apresenta os valores das concentrações e o ajuste da curva para o pseudocomponente 6, cujos peptídeos (ou aminoácidos) tem tamanhos menores do que 238 Da. Pode-se observar que os valores das concentrações não variaram muito para os diferentes graus de hidrólise. Fisicamente, a concentração desse pseudocomponente não pode diminuir pois ele representa os menores peptídeos e, assim, a sua concentração poderia, no máximo, aumentar ao longo da hidrólise. Espera-se, entretanto, que não ocorram variações nas concentrações desse pseudocomponente, pois a enzima Novo-Pro D é uma endoprotease, não quebrando assim, ligações peptídicas terminais, que gerariam moléculas nesta faixa de tamanho molecular. Atribui-se a pequena flutuação nas concentrações desse pseudocomponente a erros experimentais. Este pseudocomponente foi desconsiderado para o ajuste da rede neural, pois se assume aqui que seu valor é constante, não sendo necessária uma rede para prever seu valor e evitando-se assim saturar a rede.

Uma rede neural foi então treinada segundo a proposta da Figura 2.29, isto é, tendo um neurônio na camada de entrada (grau de hidrólise) e cinco neurônios na camada de saída (as concentrações dos cinco primeiros pseudocomponentes). Das várias arquiteturas

testadas, a que apresentou melhores resultados foi a com uma camada oculta com função log-sigmoide e 10 neurônios nesta camada. Para camada de saída foi utilizada a função linear.

A Figura 2.49 apresenta os valores de concentração de cada pseudocomponente gerados pelo modelo neural.

Figura 2.49 – Concentração dos pseudocomponentes gerados pelo modelo neural

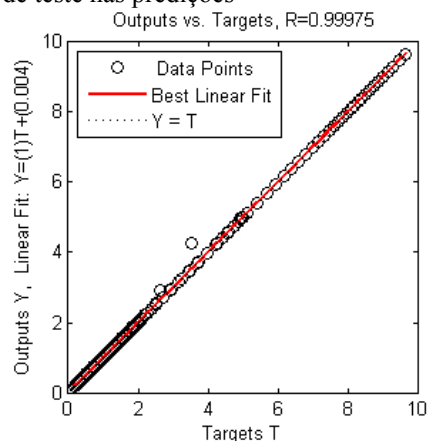


Nota: as linhas contínuas representam o ajuste do modelo e os círculos os dados experimentais para cada pseudocomponente.

Fonte: a autora.

A Figura 2.50 mostra a dispersão dos dados de teste nas previsões. Pode-se observar que o ajuste obtido foi satisfatório indicando que a utilização da rede para prever a concentração dos pseudocomponentes em um dado grau de hidrólise se justifica. Os valores de bias e pesos de todas as camadas são apresentados no Anexo 1 deste trabalho.

Figura 2.50 – Dispersão dos dados de teste nas previsões



Fonte: a autora.

3 ANÁLISE ECONÔMICA DE UM PROJETO PRELIMINAR DA FABRICAÇÃO DE UM PRODUTO A BASE DE HIDROLISADO PROTEICO DE SOJA

3.1 REVISÃO DA LITERATURA

3.1.1 Operações unitárias envolvidas na reação de hidrólise das proteínas

3.1.1.1 Introdução

A mais importante das operações envolvidas na fabricação de hidrolisados de proteínas é a reação de hidrólise. Normalmente, as operações anteriores à reação são chamadas de *upstream* e as posteriores de *downstream*. De forma geral, as operações de *upstream* envolvem, quando necessário, a preparação da matéria-prima para a hidrólise, como purificação ou concentração. Um exemplo se encontra na produção de hidrolisados protéicos de soro de queijo: o soro passa primeiro por filtrações para serem retirados lipídios e a lactose, posteriormente por um processo de evaporação para se concentrar as proteínas e só depois as proteínas do soro são submetidas à hidrólise enzimática (SILVA, 2000). As operações de *downstream* podem envolver a esterilização, a secagem, além de, novamente, a purificação e a concentração, mas desta vez, estas operações podem ser realizadas com a finalidade de se separar proteínas solúveis das insolúveis, de se obter a cor e limpidez desejadas e de se remover odores indesejados (PASUPULETI; DEMAIN, 2010).

Geralmente, o processo de hidrólise começa com a solubilização das proteínas em água até se obter uma porcentagem de sólidos que varia entre 8 e 20%. Se necessário, as proteínas podem ser pré-tratadas com calor, ácidos ou bases até se ajustar à temperatura (normalmente de 38 a 65 °C) e pH (3,5 a 9) desejados. Quando a hidrólise ocorre por meio de enzimas, a enzima ou as enzimas são adicionadas ao sistema. O tempo de hidrólise pode variar de uma até mais de 100 horas e por isso, em alguns casos conservantes bacteriostáticos ou bactericidas também são adicionados, principalmente quando o tempo de hidrólise é grande e, desta forma evita-se a contaminação por microorganismos. Estes conservantes são depois removidos ou evaporados. Atualmente outras formas de se impedir a contaminação também podem ser utilizadas como, por exemplo, tratamento com UV, aplicações de campo elétrico pulsado e ozônio, mas estas ainda são pouco exploradas. Uma forma simples de se impedir a contaminação microbiana sem ser necessária a utilização de aditivos ou outros recursos, é, quando possível, reduzir o tempo de hidrólise para menos de 4 horas ou utilizar enzimas que suportem temperaturas mais altas e pHs mais extremos. Quando a reação atinge a conversão desejada, a hidrólise normalmente é cessada aumentando-se a temperatura ou

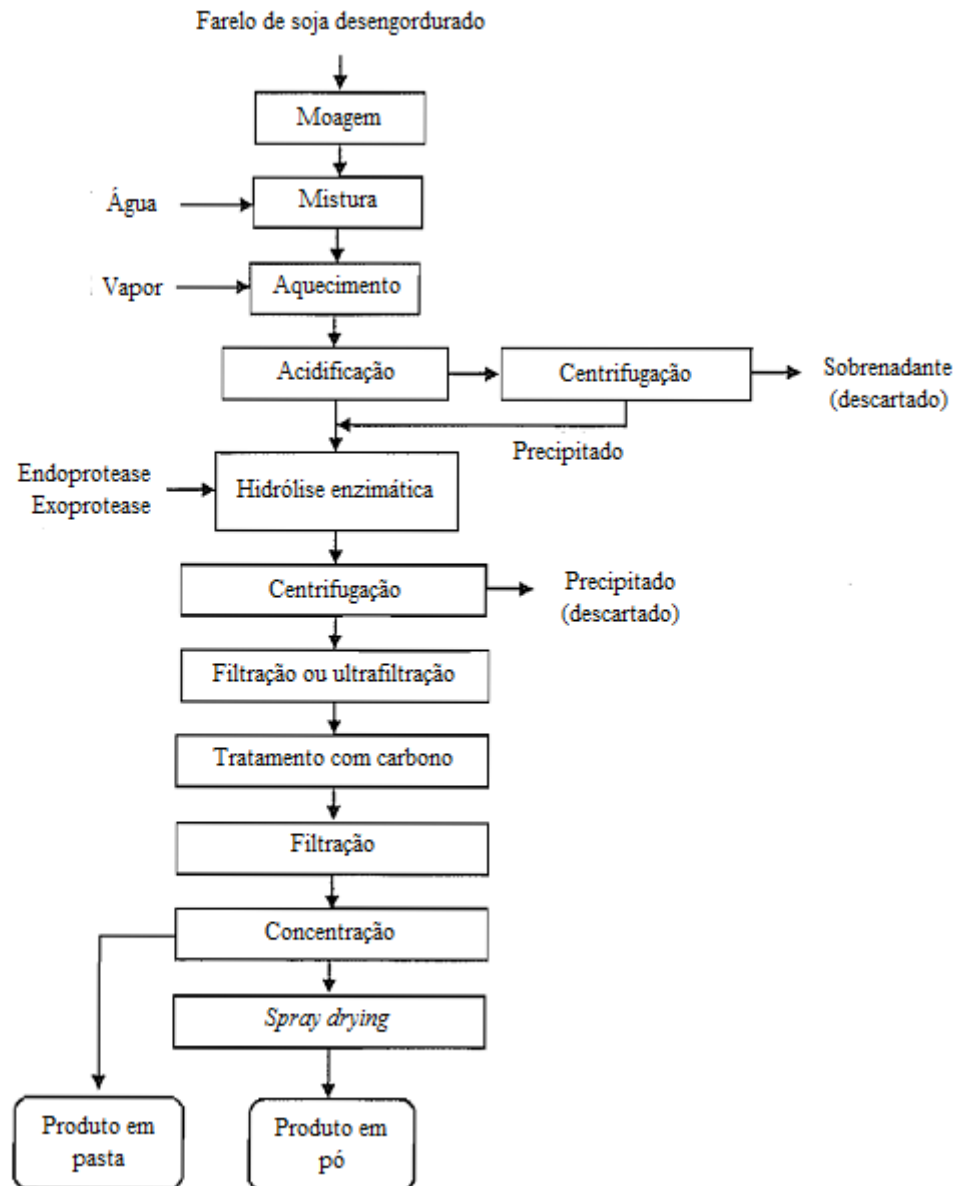
mudando-se o pH do meio para desativar a enzima. Dependendo do uso final, o hidrolisado pode passar por processos de pasteurização, evaporação, purificação, etc.

A maioria dos trabalhos relatados na literatura desejam como produto final apenas as proteínas ou peptídeos solúveis e de forma pura, diferentemente do que se propõe neste trabalho. Normalmente, quando estes produtos se encontram solúveis e com algo grau de pureza, obtém-se maior valor agregado, mas por outro lado, os custos de produção também são maiores.

Chae, In e Kim (1998) testaram alguns parâmetros de processo para a hidrólise enzimática da proteína do farelo de soja desengordurado. O esquema proposto é apresentado na Figura 3.1. De forma geral, no processo proposto, o farelo de soja desengordurado foi moído, suspenso em água com 90% de umidade e então a mistura foi pré-aquecida a 120°C por 10 minutos. Depois o pH foi ajustado para 4,2-4,5 com ácido clorídrico, seguida pela etapa de centrifugação. Finalmente, o pH foi ajustado para 7,5. Na hidrólise foram utilizadas combinações de três enzimas, Alcalase, Neutralse e Flavourzyme. A hidrólise se deu a 55°C por 4 horas. Depois o pH foi reduzido para 5 e a enzima Flavourzyme foi adicionada novamente. Durante a hidrólise o pH não foi ajustado. A hidrólise foi cessada por calor, deixando a mistura a 90°C por 10 minutos. A enzima Flavourzyme é uma exoprotease e é utilizada para reduzir o gosto amargo gerado durante o processo de hidrólise por endoproteases. Posteriormente à hidrólise, a fração solúvel foi separada por centrifugação. Em alguns casos, o centrifugado foi ultrafiltrado. Depois teve-se tratamento com carbono seguido por filtração. Posteriormente, a solução foi concentrada ou com evaporação ou com osmose reversa. E em alguns casos o produto foi seco em *spray dryer*.

Processos que passam por várias etapas de purificação e aumentam o valor do produto normalmente são direcionados à alimentação humana. Para rações animais não é viável se produzir algo com valor agregado tão alto.

Figura 3.1 – Esquema proposto para processo de hidrólise do farelo de soja desengordurado



Fonte: CHAE; IN; KIM, 1998.

3.1.1.2 Reação de hidrólise

A reação de hidrólise é o coração de todo o processo de fabricação de um produto a base de proteínas hidrolisadas do farelo de soja e este processo ocorre em um reator.

De acordo com Pasupuleti e Demain (2010), o tamanho dos reatores utilizados em hidrólises na indústria, dependendo do produtor e do produto, variam de aproximadamente 2.000 a 37.000 litros. A Figura 3.2 exemplifica como é uma seção de reatores para hidrólise enzimática em uma indústria.

Figura 3.2 – Exemplo de reatores para hidrólise enzimática em escala industrial



Fonte: PASUPULETI; DEMAIN, 2010.

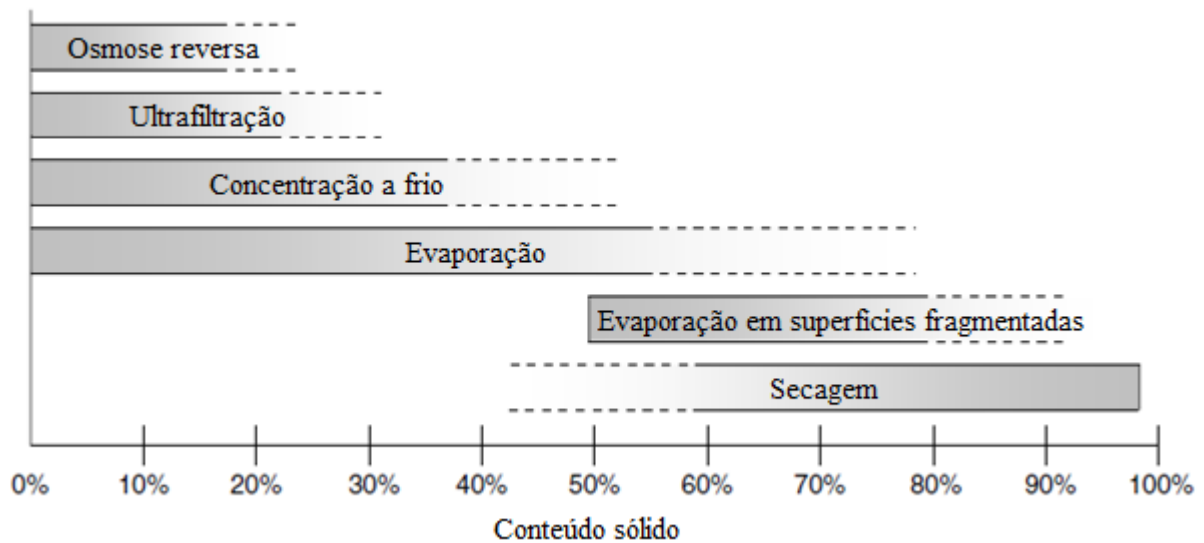
A maioria das reações de hidrólise ocorrem em reatores em batelada (descontínuos), porém técnicas como imobilização de enzimas ou uso de bioreatores com sistema de membranas já são estudados para se diminuir o custo com enzimas e aumentar a produtividade.

3.1.1.3 Concentração e secagem

Em muitos processos industriais, a água ou outro solvente precisa ser retirado de um meio líquido para produzir um produto mais concentrado ou seco. Entre os processos que podem ser usados para remover a água encontram-se a evaporação, concentração por congelamento, osmose reversa (ou qualquer outro tipo de separação por membrana) e secagem. A escolha do processo depende do grau de concentração desejado, do efeito que o processo causa no produto, das fontes de energia disponíveis e do custo relativo do processo. A Figura 3.3 mostra opções de escolha de operações de concentração ou secagem em função da composição de sólidos no início e no fim do processo (HELDMAN; LUND, 2007).

A operação de secagem difere das operações de concentração porque, via de regra, o produto final da secagem é um sólido seco e nas operações de concentração, líquidos mais viscosos.

Figura 3.3 – Processos mais indicados para determinadas porcentagens de sólidos existentes no início e desejadas no fim do processo



Fonte: HELDMAN; LUND, 2007.

3.1.1.4 Concentração de misturas sólido-líquidas

Uma forma de se concentrar pastas é por meio da evaporação, em que um solvente volátil é evaporado por meio da transferência de calor. A principal vantagem da evaporação reside no fato dos evaporadores modernos utilizarem pouca energia enquanto geram altas taxas de evaporação. Técnicas como evaporação em múltiplos efeitos, recompressão térmica do vapor e recompressão mecânica do vapor reduzem de forma significativa a quantidade de energia necessária para um determinado grau de concentração. Outra vantagem da evaporação é que a maioria das soluções/suspensões líquidas alimentadas com diluição de até 50% podem ser concentradas facilmente e quando necessário podem chegar a uma concentração final de sólidos de até 98% (HELDMAN; LUND, 2007).

Além da evaporação, que é um processo térmico, outros processos não térmicos podem ser utilizados na separação sólido-líquido, como por exemplo, floculação ou coagulação, que podem alterar as propriedades das pastas, facilitando assim sua separação. Também pode-se proceder à filtrações, por meio de prensas, membranas, à vácuo, por gravidade, ultrafiltração, além de centrifugação, etc. (MUJUMDAR, 2006).

3.1.1.5 Secagem

O objetivo de se secar produtos do gênero alimentício é de se fornecer ao produto um longo tempo de prateleira com poucas necessidades de embalagem e pouco peso.

A qualidade do produto e seu custo são altamente influenciados pelo processo de secagem (HELDMAN; LUND, 2007).

Uma vez que o uso da secagem se faz necessário no processo, a escolha do secador é um processo fundamental, devendo-se optar por um secador que integre o processo como um todo e levando em consideração as vantagens e desvantagens que cada tipo de secador oferece tanto do ponto de vista técnico quanto econômico. Alonso e Park (2005) escreveram sobre os vários métodos de seleção de secadores encontrados na literatura. Segundo os autores, existem trabalhos indicando que a escolha dos secadores pode ser subjetiva devido à grande amplitude de aplicação de alguns secadores, sendo portanto a escolha subjetiva, baseada no bom-senso e experiência do engenheiro. Porém para auxiliar na escolha, pode-se lançar mão de dois mecanismos diferentes de escolha: o analítico e o numérico. Independente do mecanismo escolhido, fato é que, antes, é necessário serem levantados dados sobre o processo em que se está inserida a etapa de secagem, dados sobre o produto desejado e dados sobre a matéria-prima. Esses dados podem ser obtidos na literatura, junto ao fornecedor, pela experiência do engenheiro ou por estudos em escala laboratorial. Algumas informações necessárias, comuns à maioria dos autores citados por Alonso e Park (2005), são descritas a seguir:

- Quantidade: qual a produtividade em termos de massa seca desejada e qual o processo anterior, se em batelada ou contínuo.
- Propriedades físicas da matéria-prima: fonte de matéria-prima, estágios de dessorção anteriores, capacidade de armazenamento da matéria-prima, dimensão da partícula, método de alimentação do secador, maneabilidade, abrasividade, etc.
- Propriedades químicas da matéria-prima: toxicidade, problemas de odor, possibilidade de explosão, limites de temperatura e tempo de exposição, etc.
- Especificações do produto seco: umidade desejada do produto final, etc.
- Propriedades do produto seco: desvantagens na formação de partículas menores, etc.
- Dados de secagem disponíveis: detalhamento dos testes laboratoriais, detalhamento dos testes em escala piloto, detalhamento do desempenho de materiais semelhantes em escala real, etc.
- Recuperação de solventes.
- Perdas: perda de pó para a atmosfera. Se esta perda é só inoportuna ou pode representar riscos.
- Local de operação: disponibilidade de fontes de calor, detalhes do fornecimento de energia elétrica, necessidade de purificação do ar de secagem e resfriamento, necessidade de remoção

do odor dos gases liberados para a atmosfera, necessidade de reduzir a vibração e o barulho, restrições de espaço, disponibilidade de equipamentos de controle e manutenção.

Assim, de forma resumida, com as informações obtidas, as principais questões a serem respondidas são quanto aos limites de temperatura, limites do comportamento do material e limitações construtivas. Uma vez de posse dessas informações, pode-se proceder ao mecanismo de seleção analítico ou numérico.

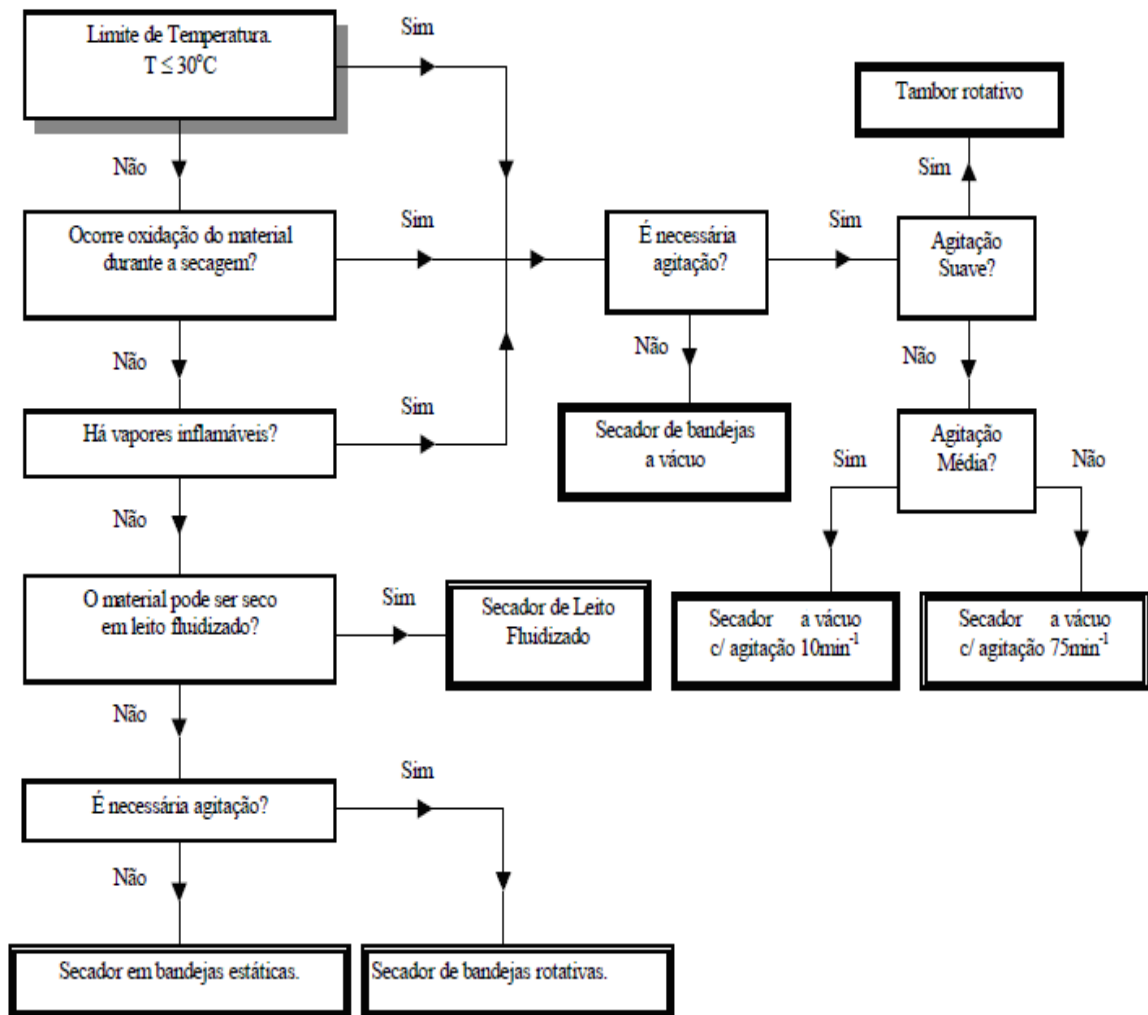
No método numérico, cada equipamento recebe uma pontuação de acordo com a adequação à solução do problema, no final, a melhor solução é a que obtém a maior pontuação. Os algoritmos numéricos normalmente requerem o uso de capacidade computacional e cada secador tem que ser testado para cada parâmetro do produto, o que demanda mais tempo, porém a certeza sobre a decisão correta aumenta.

Já se encontra na literatura, o uso da lógica difusa para a seleção de secadores, abrindo espaço para um terceiro mecanismo em que se combina os algoritmos analíticos e numéricos.

No mecanismo analítico, procede-se a uma seqüência de processos decisórios que elimina os equipamentos inadequados, conduzindo à determinação da escolha da melhor solução. Uma forma analítica de se proceder à escolha do secador é baseando-se na forma de alimentação, dependendo do tipo de alimentação, se é classificada como um líquido, suspensões finas, lamas, pasta, etc., escolhe-se o secador.

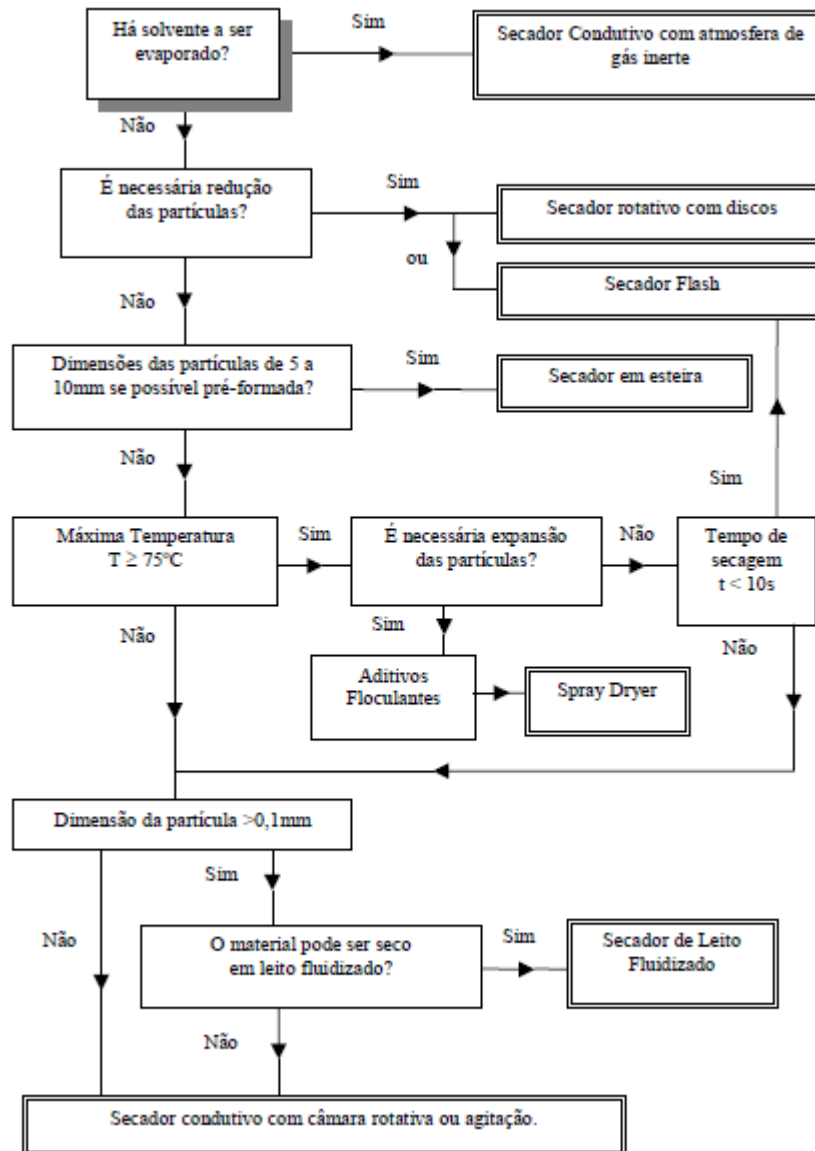
Van't Land (1991), citado por Alonso e Park (2005), desenvolveu, dentro do mecanismo analítico, uma forma de se selecionar secadores. O procedimento se desdobra em dois: um para equipamentos contínuos e outro para equipamentos em batelada. Estes são apresentados nas Figuras 3.4 e 3.5 respectivamente. Normalmente se usa um secador contínuo para capacidades produtivas superiores a 100 kg/h, mas a escolha entre o processo contínuo ou em batelada deve levar em consideração as etapas anteriores e posteriores do processo.

Figura 3.4 Algoritmo de Van't Land para seleção de secadores em batelada



Fonte: ALONSO; PARK, 2005.

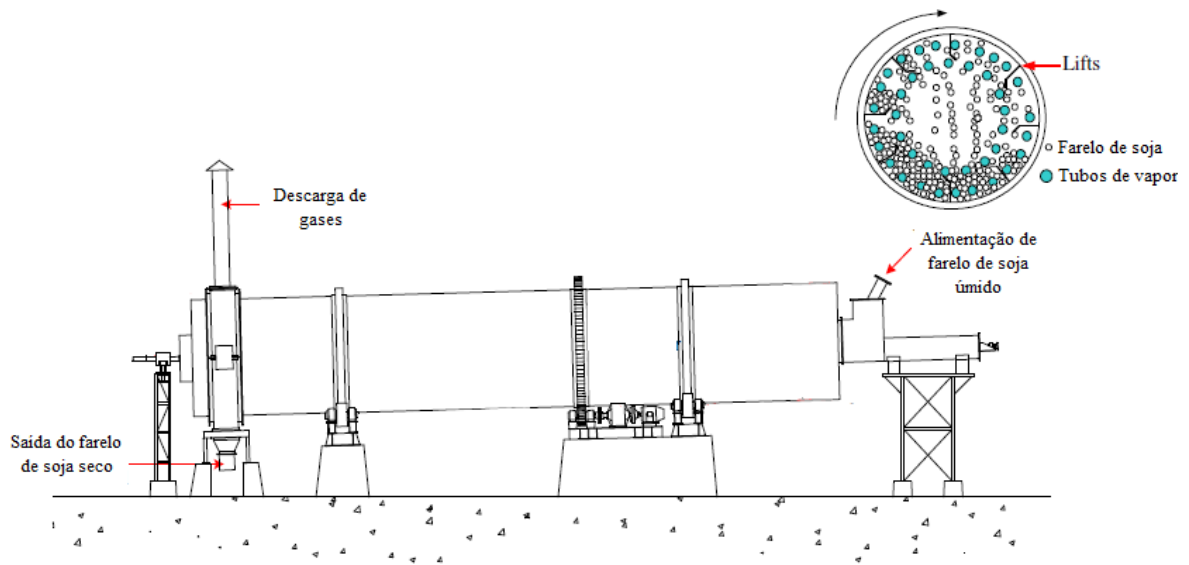
Figura 3.5 – Algoritmo de Van't Land para a seleção de secadores contínuos



Fonte: ALONSO; PARK, 2005.

O processo de secagem do farelo de soja, após a extração do óleo e dessolventização, pode ser feito por um secador rotativo com aquecimento indireto por vapor d'água, como relatam Paraíso, Andrade e Curvelo (2004), sendo este tipo de secador o utilizado pela maioria das indústrias no noroeste do Paraná. A Figura 3.6 mostra o esquema de um secador rotativo com aquecimento indireto.

Figura 3.6 – Esquema de um secador rotativo com aquecimento indireto



Nota: Parece que a entrada de ar é omitida na figura.

Fonte: LUZ *et al.*, 2009.

Os secadores rotativos, tanto diretos como indiretos, consistem em um tubo cilíndrico levemente inclinado em relação à horizontal. O material úmido é alimentado e em virtude da rotação, do efeito do calor e da inclinação, sai como produto seco no final do tubo, na parte menos inclinada. A direção do gás no cilindro relativa aos sólidos é ditada pelas propriedades do material processado. Fluxo concorrente normalmente é utilizado em materiais sensíveis ao calor mesmo para altas temperaturas, pois o gás rapidamente esfria devido a evaporação inicial da água na superfície das partículas. O fluxo contracorrente é desejável quando se quer obter eficiência energética. No primeiro caso, o fluxo do gás aumenta a taxa de fluxo dos sólidos e no segundo, diminui.

Se o material não flui livremente na parte da alimentação, uma operação especial se faz necessária, que pode incluir reciclar uma porção final do produto, incluir uma pré-mistura junto com a alimentação ou a constante adição de um produto inerte na extremidade de alimentação do cilindro (MUJUMDAR, 2006).

Além do farelo de soja, grãos, farinhas, cacau, açúcar e sal estão entre os alimentos que costumam ser secos em secadores rotativos (BRENNAN, 2006). Porém este tipo de secador não se restringe apenas a secagem de alimentos. Também pode ser usado para secar fertilizantes, minerais, argila, carvão, etc.

3.1.1.6 Concentração e secagem usadas em conjunto

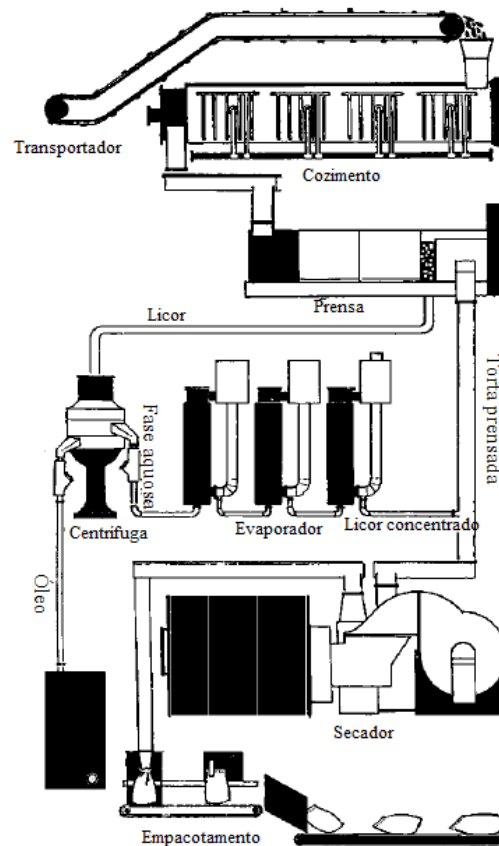
Freqüentemente, uma combinação dos processos de concentração e secagem é utilizada em conjunto, como por exemplo, pode-se realizar uma pré-concentração por meio de membranas ou evaporação para posterior processo de secagem, pois este último se dá às custas de gastos relativamente altos de energia e requer uma alimentação na forma já concentrada. Para soluções que contêm menos de 10% de concentração de sólidos, anterior ao processo de evaporação, pode-se ainda realizar o processo de osmose reversa, caracterizando também o uso duas operações de concentração em conjunto para otimizar o processo (HELDMAN; LUND, 2007).

Um exemplo de processo em que o material passa pela operação de concentração antes da secagem é a produção de farinha de peixe. Este processo é esquematizado na Figura 3.7. A primeira operação do processo é o cozimento do peixe, para que as proteínas presentes se coagulem e que a etapa posterior de retirada do óleo e de água possa ocorrer, pois o peixe no estado bruto não libera muito licor mesmo a altas temperaturas e pressão. O equipamento que se usa é um trocador de calor cilíndrico e a movimentação da matéria é feita por meio de um transportador na forma de parafuso. Vapor também pode ser injetado diretamente no material.

A próxima etapa é a de prensagem em que óleo e água são removidos. O material entra em um tubo perfurado e é submetido à pressão crescente, assim, o óleo e a água são espremidos e saem pelas perfurações e o sólido sai ao fim da prensa. Durante este processo, a água é reduzida de 70% para 50% e o óleo para até 4%. À fração líquida que sai da prensa dá-se o nome de licor e à fração sólida de torta prensada.

Posteriormente o licor é enviado para uma centrífuga para que se remova o óleo. Algumas vezes o óleo é novamente centrifugado, para se tornar mais refinado, e depois armazenado. Esse óleo pode ser usado como óleo e gordura comestível em alimentos. A porção aquosa do licor contém materiais dissolvidos e sólidos finos em suspensão, podendo chegar até a 9% em peso. A maioria do sólido é composto de proteína e essa porção aquosa pode conter até 20% do total de sólidos da matéria-prima, então, estes sólidos são recuperados por evaporação desta fração aquosa até se obter um xarope entre 30 e 50% de sólidos. Esse xarope pode ser vendido separadamente, como condensados de peixe solúveis, mas normalmente o que se faz é adicioná-lo novamente a torta prensada.

Figura 3.7 – Processo de produção de farinha de peixe



Fonte: WINDSOR, 2001.

A operação de secagem pode ser feita em secadores diretos ou indiretos. O secador direto consiste em um cilindro que é alimentado por uma corrente de ar a 500 °C e pelo material rapidamente. Este é o método mais rápido, porém o que exige mais controle também e produz mais cheiro desagradável do que o método indireto. De qualquer forma, o material não atinge a temperatura do ar, pois ocorre uma rápida evaporação da água da superfície das partículas de peixe, o que causa uma redução de temperatura. De forma geral, o material sai a uma temperatura de 100°C. Os secadores indiretos utilizados neste processo podem ser aquecidos por meio uma camisa na parte externa do cilindro ou por tubos com vapor que passam dentro do cilindro.

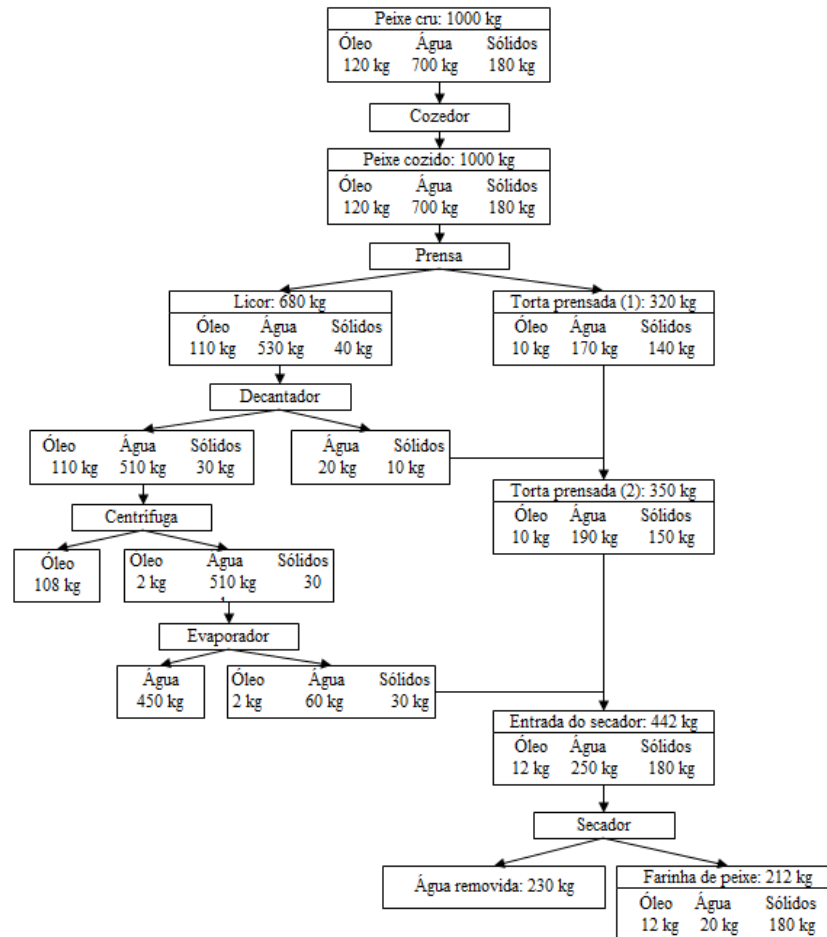
A etapa de secagem é crucial ao processo, pois se o material não for suficientemente seco, pode-se ocorrer contaminação por bactérias e se for seco demais, o material pode queimar e o valor nutricional do farelo pode ser perdido.

Para algumas variedades de peixe, por possuírem pouca gordura, a etapa de prensagem não seria necessária, podendo do aquecimento ir direto para o secador, mas mesmo assim, ainda utiliza-se a prensagem seguida pela evaporação, pois a eficiência energética de

evaporadores em termos de uso de vapor é maior que a dos secadores, resultando em um processo mais barato (WINDSOR, 2001).

A Figura 3.8 ilustra o balanço de massa para este processo.

Figura 3.8 – Balanço de massa para o processo de produção de farinha de peixe



Nota: neste diagrama aparece uma etapa a mais quando comparada com as etapas descritas ao longo do texto e no diagrama de processo do mesmo autor.

Fonte: WINDSOR, 2001.

Os produtos farinha de peixe e farelo de soja são semelhantes no fato de que ambos possuem uma matéria-prima com alto valor de proteínas e têm seu óleo retirado durante o processo produtivo. Além disso, tanto a farinha de peixe como o farelo de soja são fonte de alimentação para peixes, aves, suínos e ruminantes.

A farinha de peixe é considerada como a fonte de alimento ideal para suprir as necessidades protéicas e lipídicas de peixes carnívoros, pois além do excelente perfil de aminoácidos, é rica em ácidos graxos essenciais, minerais, elementos traços e vitaminas. Porém é um ingrediente relativamente caro e de fornecimento limitado. Sua disponibilidade está cada vez menor, não só pelo aumento da demanda pela indústria de rações, mas também pela forte pressão de pesca sobre as espécies forrageiras, ocasionando a queda de alguns

desses estoques. Para se ter uma idéia, em duas décadas, as reservas do peixe cavala caíram de 30 milhões de toneladas para menos de 3 milhões. A maioria da cavala pescada é processada e vira ração para piscicultura e para criação de porcos. São necessários mais de 5 kg de cavala para engordar 1 kg de salmão de cativeiro. Assim, surge também um apelo social desfavorável à pesca para a alimentação de peixes de cativeiro pois, peixes como a cavala, rica em proteína oleosa, que poderia ser um alimento para um planeta com fome, é utilizada em enormes quantidades em rações para animais de alto valor agregado (FABREGAT *et al.*, 2011; TAKAHASHI, 2011; SALAZAR *et al.*, 2012).

Assim, a elaboração de um adequado substituto para a farinha de peixe torna-se necessária, buscando-se um alimento que continue à altura da eficiência nutricional da farinha de peixe, mas que também gere um menor custo. Apesar de existem outras fontes protéicas de origem animal disponíveis no mercado, como a farinha de vísceras de aves e a farinha de carne, a demanda por estes ingredientes também é elevada e a disponibilidade restrita, assim uma alternativa é a utilização de fontes protéicas vegetais.

Neste contexto, o farelo de soja é o ingrediente mais estudado e considerado como a opção com maior potencial para substituir a farinha de peixe, de forma parcial ou total, nas rações, atendendo aos requisitos nutricionais de digestibilidade elevada e praticamente um balanço adequado de aminoácidos essenciais. O farelo de soja contém lisina em maiores quantidades que o de outros vegetais, e ainda que não seja rica em lipídios, possui a quase totalidade dos ácidos graxos necessários para os peixes de água doce.

Porém, a inclusão do farelo de soja nas dietas pode provocar efeitos negativos sobre o desempenho dos peixes. Um dos motivos pode ser a presença de fatores antinutricionais. A maioria dos fatores antinutricionais da soja, como os inibidores de tripsina e as hemaglutininas, são inativados durante a tostagem do farelo de soja. Entre os que resistem ao processamento, pode-se destacar alguns carboidratos complexos, principalmente oligossacarídeos, como os galactooligosacarídeos. Esses carboidratos são pouco digestíveis e sua absorção depende principalmente da fermentação por bactérias, processo que pode afetar de forma negativa o desempenho e o aproveitamento dos nutrientes quando níveis elevados de inclusão são utilizados (FABREGAT *et al.*, 2011; TAKAHASHI, 2005).

No processo de concentração do farelo de soja para produzir o Concentrado Protéico de Soja (SPC), esses carboidratos poucos digeríveis já são retirados do farelo por extração alcoólica como foi mostrado na Figura 1.1. Assim, rações a base de SPC já possuem uma qualidade nutricional maior do que o farelo de soja comum. Para melhorar ainda mais a qualidade, as proteínas podem ser hidrolisadas para que a absorção destas pelos animais seja

ainda mais eficiente e resulte em ganho de peso e maior qualidade da carne. Além de melhorar a absorção, foi determinado por Carr (1982) citado por Oliveira (2003) que baixo peso molecular é uma das características necessárias ao alimento para se tornar mais atrativo aos peixes, aumentando assim o consumo da ração, ao lado de conter nitrogênio, não ser volátil nem solúvel em água e apresentar propriedades ácidas e básicas.

Uma vez vislumbrada a oportunidade de um novo negócio, como por exemplo, a produção de um produto a base de hidrolisado de proteína de soja, é necessário se fazer um estudo para ver se existe tecnologia para se fabricar o produto desejado em escala industrial e se a produção é viável economicamente. Para isso, recorre-se ao projeto do processo. No projeto do processo, tanto o conhecimento das operações unitárias e equipamentos quanto o conhecimento da engenharia de sistemas se faz necessário. Nesta seção, de forma bem superficial, foram tratadas as operações unitárias e equipamentos onde elas podem ocorrer para se realizar a hidrólise de proteínas e sua posterior secagem e na próxima, será tratado, também de forma muito superficial, os principais conceitos para se desenvolver um projeto de processo preliminar.

3.1.2 Projeto de processos

O projeto de processo é o trabalho conceitual que antecede a construção da planta de um processo. O processo pode ser dividido em três estágios consecutivos:

- Projeto preliminar: é o primeiro estágio para se avaliar uma nova idéia. Modelos matemáticos simplificados e métodos aproximados são usados para dimensionar e estimar custos de operações unitárias com erros que podem chegar a mais ou menos 30%.
- Projeto detalhado: é feito para processos que foram considerados economicamente atrativos após a avaliação do projeto preliminar. É baseado em um fluxograma e em projeto de equipamento em fase final. As especificações dos equipamentos não são exatas e erros na estimativa do custo variam entre 10 e 15%.
- Projeto definitivo: é baseado em especificações detalhadas dos equipamentos e estimativas de custo precisas, com erro de aproximadamente 5%. Também inclui informações para se começar a construção da planta.

A engenharia de processos químicos é a parte que engloba, além de todos os níveis da engenharia química, a parte de projeto de processos integrados e ainda ferramentas de outros campos do conhecimento: da engenharia de sistemas e da inteligência artificial. Da engenharia de processos, obtém-se informações desde os fundamentos básicos de matemática,

física e química, passando pela engenharia de equipamentos até se chegar na análise dos processos. A engenharia de sistemas fornece ferramentas para se analisar a estrutura, projetos, fazer a síntese, análise, simulação e otimização. A inteligência artificial pode vir a auxiliar na resolução dos problemas de síntese.

A engenharia de sistemas estuda sistemas, ou seja, os elementos de um determinado conjunto e as conexões existentes entre eles. Na engenharia química, o projeto de um sistema consiste em gerar um conjunto de estruturas viáveis para a fabricação de um determinado produto, etapa esta denominada de síntese e prever e avaliar o desempenho de cada estrutura gerada, etapa de análise.

Na etapa da síntese ocorre a seleção de equipamentos e a definição do fluxograma. Na análise, procede-se à escolha da melhor estrutura gerada pela síntese, ou seja, aquela que apresenta o melhor desempenho.

A análise pode ser subdividida em dois grupos:

- Identificação dos elementos do sistema e da forma como os mesmos interagem.
- Previsão e avaliação do desempenho desse sistema, ou seja, desses elementos e suas conexões.

A previsão é realizada com o auxílio de um modelo matemático. Modelo é uma representação física, matemática, lógica ou computacional qualquer de um sistema real ou imaginário, de um processo, de um fenômeno ou de uma entidade, usando para isso, uma linguagem, um meio, e segundo um ponto de vista. O aspecto mais importante de um modelo é a relação simplicidade versus fidelidade. Se o modelo é uma representação válida de um sistema, informações significativas podem ser retiradas sobre sua dinâmica ou seu desempenho, tornando-se assim a principal ferramenta para o estudo do comportamento de sistemas complexos. Modelagem é, de forma geral, a elaboração de um modelo para a representação de alguma coisa. O modelo matemático que rege um processo químico é formado pelo conjunto dos modelos dos equipamentos e de uma representação da estrutura do fluxograma. O modelo de um equipamento, por sua vez, é constituído pelo sistema de equações que representam os fenômenos que regem o seu comportamento. Assim, partindo-se das especificações de projeto, ao final desta etapa, são obtidas:

- As principais dimensões dos equipamentos.
- As vazões de produto.
- As matérias-primas.
- As principais dimensões de utilidades.
- As principais dimensões dos demais insumos.

Assim, uma vez pronto o modelo, este é utilizado para dimensionar os equipamentos, o consumo de utilidades e dos demais insumos de forma a atender as metas de projeto.

Na avaliação é realizado o cálculo do índice de mérito, normalmente de natureza econômica, função das principais variáveis do sistema. Assim, no caso dos processos, a partir das dimensões dos equipamentos pode-se estimar os custos de investimento e com as vazões das correntes pode-se calcular a receita e os custos de produção. Com isso obtém-se o índice de mérito natural que normalmente é uma função lucro ou custo.

Ou seja, nesta etapa, o modelo pode ser simulado para se reproduzir o comportamento desse processo quando operado em condições outras que não as do dimensionamento. Após a simulação das diversas condições que se deseja variar para o conhecimento dos efeitos por elas causados, procede-se a otimização do processo, para se achar qual das condições que gera a melhor solução. A melhor solução é aquela, que atendendo todas as especificações do projeto, gera o maior lucro ou o menor custo.

A simulação é a execução ou manipulação de um modelo de determinado processo ou sistema com o objetivo de se analisar o comportamento desse processo ou sistema. A simulação pode ser entendida como uma analogia que deve ter relações ou propriedades bastante similares ao sistema real. Desta forma, pode-se prever o comportamento do sistema real com base nas medidas ou observações fornecidas pelo sistema análogo. Assim, a simulação começa com o desenvolvimento de um modelo que represente com a precisão necessária o processo ou sistema em estudo e continua com o processamento ou operação desse modelo de forma a possibilitar a determinação do comportamento do processo ou o sistema em estudo. A simulação tem seu propósito em auxiliar a compreensão do sistema e fornece uma descrição (total ou parcial) do sistema, podendo explicar o comportamento passado, predizer o comportamento futuro.

Cada vez que um modelo é simulado sob diferentes condições, que são alteradas propositalmente para se analisar a reação desencadeada, tem-se um resultado diferente e inicia-se então a busca pelo melhor resultado, denominado solução ótima. Ao processo de busca pela solução ótima, dá-se o nome de otimização (PERLINGIERO, 2005; SILVA, 2000; TRIVELATO, 2003; GOLDSMIDT, 1982).

3.1.3 Custo de equipamentos

Quando não se possui dados disponíveis sobre o custo de um equipamento de um determinado tamanho e capacidade, mas se possui o preço de um equipamento similar, mas de dimensões e capacidade diferentes, uma maneira de se estimar o custo desse equipamento é por meio da regra do fator seis décimos. A Equação 3.1 apresenta a fórmula que relaciona as capacidades e os custos de cada equipamento para no fim se obter o custo estimado do equipamento desejado.

$$Custo A = Custo B * \left(\frac{Capacidade A}{Capacidade B} \right)^{0,6} \quad (3.1)$$

Um método também utilizado para se estimar o custo de um equipamento é por meio de índices de custo. Este método é utilizado quando se possui o custo do equipamento em algum momento no passado. Como os preços dos equipamentos mudam ao longo do tempo devido à fatores econômicos, a atualização pode ser feita relacionando-se o custo do equipamento na data disponível, índices de custo naquela data e o índice de custo da data atual, como mostra a Equação 3.2.

$$Custo atual = Custo original * \left(\frac{valor do índice no presente}{valor do índice no tempo em que o custo foi obtido} \right) \quad (3.2)$$

Muitos tipos diferentes de índices de custo são publicados regularmente. Alguns podem ser utilizados para estimar o custo de equipamentos, outros especificamente para laboratórios, construções, materiais e outros ramos específicos. As publicações mais comuns são “Marshall and Swift all-industry and process-industry equipment indexes”, “Engineering news-record construction index”, “Nelson Farrar refinery construction index” e “Chemical engineering plant cost index”.

Assim, é possível por meio do custo de um equipamento em algum momento do passado, obter o preço no presente e caso não seja da capacidade desejada, por meio da regra do fator seis décimos estimar na capacidade requerida. (PETERS; TIMMERHAUS, 1991).

3.1.4 Análise de investimento

Durante o projeto de uma planta de processos, surgem várias possibilidades de arranjos físicos, de tamanho de equipamentos e até mesmo qual operação utilizar para se obter o produto desejado, quando existe mais de uma possibilidade (PERLINGEIRO, 2005). Assim, selecionar um investimento não é uma tarefa muito fácil. Para auxiliar nessa decisão, existem técnicas de análise de investimentos.

O processo de decisão da melhor alternativa pode ser dividido em sete fases. São elas (MOTA; CALÔBA, 2009):

1. Identificação das alternativas: fase em que se define o nível das análises a serem realizadas e em que são feitas perguntas do tipo: onde, quem, quando, como e por quê.
2. Estudo preliminar de viabilidade das alternativas: fase em que alternativas são eliminadas, pois fica clara a impossibilidade de realização ou que alguma alternativa já é melhor do que outra.
3. Seleção preliminar das alternativas: estimativas preliminares de custos de capital e operacionais e de receitas são realizadas nesta fase.
4. Estudo de viabilidade das alternativas selecionadas: o estudo econômico passa a ser detalhado, envolvendo diversas alternativas, previsões científicas sobre o mercado, cronogramas de desembolso, culminando em fluxos de caixa, possíveis fontes de financiamento, estruturas de capital (próprio/financiado) e custo de capital (taxa de juros de empréstimos) e perfil da dívida (prazos para repagamento de empréstimo).
5. Considerações sobre riscos e incertezas: neste ponto são consideradas as incertezas associadas aos fatores-chaves do projeto e o grau de propensão ao risco do organismo empreendedor, além da sensibilidade dos resultados a possíveis variações de determinados fatores, as quais poderão vir a comprometer a viabilidade econômica do empreendimento.
6. Implementação das alternativas selecionadas.
7. Análises a posteriori, melhoria do sistema decisório.

Para se definir as possíveis alternativas de investimento e prever suas consequências do ponto de vista econômico, todos os parâmetros e variáveis devem ser reduzidos a termos monetários, um ponto de referência temporal deve ser definido e o valor do dinheiro no tempo passa a ser considerado (MOTA; CALÔBA, 2009). Feito isto, procede-se à análise das alternativas para a escolha da melhor. Existem vários métodos para a análise de alternativas econômicas e, desde que sejam tomados os devidos cuidados de uniformidade de considerações, todos os métodos levam ao mesmo resultado (HIRSCHFELD, 1992). Dos

métodos existentes, os mais utilizados são o *pay back*, o Valor Presente Líquido (VPL) e a Taxa Interna de Retorno (TIR). Estes três métodos são brevemente descritos a seguir (NOGUEIRA, 1997):

- Valor presente líquido (VPL): todas as variações (positivas quando entram no caixa e negativas quando saem) de caixa esperadas (X), durante um determinado número de períodos (n) são transferidas para o instante atual, descontadas a uma determinada taxa de juros (i) e depois somadas, como mostra a Equação 3.3.

$$VPL = \sum_{j=0}^n \frac{X_j}{(1+i)^j} \quad (3.3)$$

Se o valor de VPL for maior que zero, o investimento é viável. Entre várias opções de investimento, o que tiver maior valor de VPL é o melhor.

- Taxa interna de retorno (TIR): TIR, por definição, é a taxa de juros que torna uma série de recebimentos e desembolsos equivalentes na data presente. Matematicamente, TIR é a taxa que torna o valor presente líquido igual a zero.

Se o valor da TIR da alternativa for maior que a taxa mínima atrativa de retorno (TMA), que é uma taxa de juros utilizada para a avaliação da atratividade de propostas de investimento e varia de acordo com vários fatores, o investimento é aprovado, caso contrário, é rejeitado. Para a comparação de diferentes investimentos, aquele que tiver seu valor acima da TMA e o maior valor de TIR de todos os investimentos é o mais interessante.

- *Pay back*: este método consiste em determinar o número de períodos necessários para o capital investido ser recuperado. Para se calcular o valor do *pay back* simplesmente se somam as entradas período a período de tempo determinado ao valor investido (que é negativo) até o período em que esse valor se torna nulo. Quando utilizado para a comparação de diferentes investimentos, o que tiver o menor *pay back* no período determinado ou o que se tornar nulo antes é o melhor. Este método não considera o valor do dinheiro no tempo nem os fluxos posteriores ao período de *pay back*.

3.1.5 Taxa básica de juros

A taxa básica de juros da economia brasileira é definida pela taxa SELIC. Esta é a taxa de referência no mercado financeiro, exercendo influências diretas sobre o volume da dívida pública, oferta de crédito, nível de inflação, entre outros indicadores econômicos importantes. Esta taxa, é admitida como a de mais baixo risco no mercado financeiro nacional, sendo referência para as demais taxas do mercado. O Banco Central do Brasil, por meio do COPOM – Comitê de Política Monetária, fixa a taxa Selic regularmente.

A taxa SELIC de um determinado período pode ser decomposta em duas partes: taxa real de juros e taxa de inflação. A taxa real cobre a taxa livre de risco (taxa pura) e o risco da conjuntura (risco da economia). Desta forma, apesar da taxa SELIC ser entendida como uma taxa livre de risco da economia, ela incorpora uma parcela mínima do risco conjuntural. Um investidor, ao aplicar seus recursos à taxa SELIC, recebe cobertura deste risco (ASSAF NETO, 2009).

3.1.6 Custo Brasil

A diferença dos custos de produção entre o Brasil e outros países, o chamado Custo Brasil, torna os produtos nacionais menos competitivos nos mercados externo e interno e é causado por diversos fatores como a infra-estrutura precária, os impostos, as altas taxas de juros e o câmbio apreciado. Segundo Bernardini em entrevista dada a Caldeira (2011), no setor de bens de capital, no período de 2011, o fator Custo Brasil foi de 43%. Ou seja, para se produzir algum bem de capital no Brasil, gasta-se em média 43% a mais do que se este produto fosse fabricado em outro país.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a elaboração do projeto do processo preliminar de produção de um produto a base de hidrolisados de proteínas de soja, utilizou-se software SuperPro Designer 7. Com este software é possível realizar várias simulações com diferentes condições, otimizar o processo e analisá-lo economicamente.

O objetivo aqui não foi se obter números reais em termos econômicos e produtivos, pois muitos dados não puderam ser obtidos e foram estimados. O foco foi em desenvolver uma metodologia, mesmo que preliminar, para quando tais dados se tornarem disponíveis, já se ter uma estrutura pronta ou de auxílio.

3.2.1 Matérias-prima

Parte das informações necessárias foram fornecidas pela empresa IMCOPA, são elas: umidade com que o farelo de soja concentrado sai do dessolventizador, custo da água e custo da enzima. O custo do hidróxido de sódio foi obtido pelo site ICIS pricing (www.icispricing.com, acessado em 10/2011). Todos os valores monetários foram convertidos de reais para dólares, utilizando-se a taxa de câmbio de 1,8034 reais para cada dólar (valor em 17/03/2012). A Tabela 3.1 mostra as matérias-prima utilizadas para a modelagem do processo preliminar, o preço de cada uma e a fonte de onde foram tirados esses preços.

Tabela 3.1 – Preços das matérias-prima

Matéria-prima	Preço (USD)	Fonte
Farelo de soja concentrado	385/ton	IMCOPA
Água	0,55/m ³	IMCOPA
Enzima Novo-Pro D	27,00/kg	IMCOPA
Hidróxido de sódio anidro	545,00/ton	ICIS pricing

Fonte: fontes citadas no corpo da própria tabela.

A umidade com que o farelo entra no reator foi definida como 30%, a mesma com que ele sai do dessolventizador (Figura 1.5). Para a quantidade de farelo de soja concentrado destinada à hidrólise, supõe-se que as etapas posteriores ao dessolventizador não são utilizadas.

Para representar o farelo de soja concentrado no simulador, o componente e as propriedades utilizadas foram a da farinha de soja, pois tal já fazia parte do banco de dados do programa.

3.2.2 Produto

O produto desejado deste processo é o farelo de soja concentrado com proteínas hidrolisadas. Este tipo de produto não é fabricado no Brasil. Aqui, os únicos produtos com maior valor agregado fabricados são o concentrado protéico de soja, proteína isolada de soja ou proteína de soja texturizada. Porém, no mercado internacional este produto já é fabricado. Uma empresa que produz hidrolisado de proteínas de soja é Beijing Salion Food Co., localizada na China. O preço do quilo de seu produto varia entre USD 1,50 e 3,80 (peço de venda em atacado). A Figura 3.9 mostra a aparência do produto final. Porém, provavelmente este produto difere do proposto neste trabalho, pois, segundo o fabricante, a tecnologia de secagem deste hidrolisado é por *spray dryer*, o que indica que provavelmente a

composição do produto é apenas a parte solúvel do hidrolisado, e aqui pretende-se trabalhar com toda a mistura produzida, tanto a parte solúvel quanto a não solúvel.

A escolha definitiva de qual o melhor grau de hidrólise a se atingir depende de testes *in vivo* que ainda não foram feitos. Assim, para este trabalho ficou definido se produzir um hidrolisado de proteínas de soja com grau de hidrólise de aproximadamente 20%. Para se atingir este valor, as condições utilizadas foram 3 horas, 60% de umidade, 0,5% m_{enz}/m_s e 55°C. A umidade aqui suposta difere da dos testes feitos em laboratório, mas espera-se que em escala industrial seja possível realizar uma reação com tal concentração, caso contrário, os custos para secagem se tornarão muito elevados. É interessante esclarecer neste momento que, mesmo que estas condições possam vir a variar no futuro, o que fica proposto aqui é a metodologia de aplicação.

Figura 3.9 – Aparência do produto final de um hidrolisado de soja



Fonte: ALIBABA, 2012.

O preço estipulado para se analisar a viabilidade foi de 1,50 USD/kg para se verificar se, mesmo no pior dos cenários, a planta se mantém economicamente viável.

3.2.3 Arranjo do processo produtivo

Para o arranjo do processo produtivo, os equipamentos selecionados foram: reator para se processar a reação de hidrólise, secador rotativo e um resfriador (trocador de calor). Cada etapa é melhor explicada nas próximas subseções.

a) Reator

No reator, o farelo de soja concentrado com 30% de umidade e temperatura de 90 °C (temperatura com que sai do dessolventizador) é adicionado, seguido da água para se

atingir uma umidade de 60% e depois de hidróxido de sódio para se atingir o pH de 9. Uma vez atingido o pH, a enzima é adicionada e a reação de hidrólise se inicia. Para se manter o pH em 9, hidróxido de sódio é adicionado ao longo da reação. Como para fins econômicos o que importa é a quantidade de hidróxido adicionado, no modelo, todo hidróxido é adicionado de uma só vez, mas na mesma quantidade que se espera adicionar ao longo do processo real e a uma velocidade tal que este tempo de adição não interfira no tempo da batelada. A reação perdura, então, por três horas, a 55 °C e com agitação. Com a quantidade adicionada de solução de hidróxido de sódio, a umidade final do farelo é de 70%, admitindo-se que o reator é fechado e não há perdas de água por evaporação ao longo da reação.

O tamanho máximo estipulado para o reator foi de 40.000 litros. Este valor foi baseado em Pasupuleti e Demain (2010), que informaram que normalmente os reatores para reação de hidrólise vão até 37.000 litros. Assim, o valor foi arredondado para 40.000 litros.

b) Secador rotativo

Depois do processo de hidrólise o farelo é envidado para o secador rotativo onde sai, após o tempo estipulado de 6 horas com temperatura de 70 °C. A essa temperatura, a enzima é inativada. O farelo de soja hidrolisado sai com uma umidade do secador de 15%. Para a secagem é utilizado vapor saturado a 152°C.

O secador rotativo pode ser usado para produção em grande escala e é largamente utilizado na indústria química e na de alimentos e é o secador utilizado para a secagem do farelo de soja nas fábricas. Por este motivo foi o selecionado. Aqui, supõe-se que as propriedades do farelo de soja hidrolisado não se alterem significativamente em termos de parâmetros de secagem das do farelo de soja.

Por falta de dados sobre a cinética de secagem do farelo hidrolisado de soja nestas condições, foram deixados os valores sugeridos pelo software.

c) Resfriador

Em seguida o farelo passa por um resfriador genérico, onde tem sua temperatura abaixada até 25 °C por meio de contato indireto com água gelada que entra a 5°C e sai a 10°C. Nele, o farelo perde até mais 5 pontos de umidade, ficando com uma umidade final por volta dos 10%. Este perda de umidade no resfriador não foi representada no modelo, pois não existe opção de perda de água por resfriamento no software. De qualquer forma, tal fato também não interfere de forma significativa na análise econômica.

Novamente, como não se tinha dados sobre os parâmetros de troca térmica do farelo hidrolisado nestas condições, os valores utilizados foram os sugeridos pelo SuperPro Designer.

Outras alternativas para se abaixar a temperatura do farelo poderiam ser utilizadas, mas optou-se por analisar a viabilidade com esta, mesmo contando com custos, como a água gelada, que não é relativamente barata.

3.2.4 Custos dos equipamentos

O SuperPro Designer conta com um banco de dados atualizado que possui o custo para os equipamentos em uma dada dimensão. Assim, pela regra do fator seis décimos, ele calcula os custos dos equipamentos simulados. Também é possível, quando se tem os valores dos custos dos equipamentos, obtido por algum fornecedor ou por alguma outra fonte, inseri-los no software.

A primeira vez em que se procedeu ao cálculo dos equipamentos, foi utilizada, pelo software, a regra do fator seis décimos. Feito isto, os custos dos equipamentos foram salvos e a eles adicionados fator do Custo Brasil. Na segunda vez em que procedeu à simulação, os valores corrigidos foram diretamente inseridos nos custos dos equipamentos.

3.2.5 Custos fixos

Os custos fixos foram calculados a partir do preço de compra do equipamento. O preço de compra do equipamento é calcula pela Equação 3.4.

$$\text{Preço Compra (PC)} = \text{Custo Equipamento} + \text{Custos de compra do equipamento não listados} \quad (3.4)$$

Em que,

- Custo do equipamento igual ao calculado pela regra do fator seis décimos.
 - ↳ O custo de instalação varia de equipamento para equipamento.
- Custos de compra do equipamento não listados = $0,2 * \text{PC}$.
 - ↳ O custo de instalação destas partes não listadas é calculado como sendo igual a $0,5 * \text{Custos de compra do equipamento não listados}$.

a) Custo fixo total (CFT)

O custo fixo total é calculado como a soma dos custos direto, indireto e outros custos, como mostra a Equação 3.5.

$$\text{Custo fixo total (CFT)} = \text{Custos diretos (CD)} + \text{Custos indiretos (CI)} + \text{Outros custos (OC)} \quad (3.5)$$

b) Custos fixos diretos (CD)

A seguir são listados todos os custos fixos diretos levados em conta e as equações de 3.6 a 3.12 apresentam seus respectivos cálculos. Todos eles são calculados com base no preço de compra do equipamento (PC).

• Encanamentos (A)

$$A = 0,35 * PC \quad (3.6)$$

• Instrumentação (B)

$$B = 0,40 * PC \quad (3.7)$$

• Isolamento (C)

$$C = 0,03 * PC \quad (3.8)$$

• Facilidades elétricas (D)

$$D = 0,10 * PC \quad (3.9)$$

• Edificação (E)

$$E = 0,45 * PC \quad (3.10)$$

• Melhorias necessárias no terreno (F)

$$F = 0,15 * PC \quad (3.11)$$

• Facilidades auxiliares (G)

$$G = 0,40 * PC \quad (3.12)$$

Assim, o custo fixo direto total se dá como mostrado pela Equação 3.13

$$CD = PC + A + B + C + D + E + F + G + \text{Instalação} \quad (3.13)$$

c) Custos fixo indiretos (CI)

Os custo fixos indiretos são formados pela soma da quantia gasta no trabalho de engenharia (H) e construção (I), como mostra a Equação 3.14.

$$CI = H + I \quad (3.14)$$

O custos com engenharia e construção são calculados baseados nos custos fixos diretos como mostra as Equações 3.15 e 3.16.

$$H = 0,25 * CD \quad (3.15)$$

$$I = 0,35 * CD \quad (3.16)$$

d) Outros custos (OC)

Os outros custos levam em consideração serviços terceirizados e contingência, como mostra a Equação 3.17.

$$OC = \text{custos com serviços terceirizados} + \text{custos com contingência} \quad (3.17)$$

O custo de serviços terceirizados e os custos com contingência são calculados como nas Equações 3.18 e 3.19.

$$\text{Custos com serviços terceirizados} = 0,05 * (CD + CI) \quad (3.18)$$

$$\text{Custos com contingência} = 0,10 * (CD + CI) \quad (3.19)$$

3.2.6 Custos operacionais

Para as utilidades foram utilizados os preços listados na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Custos das utilizadas

Utilidade	Preço (USD/ton)
Água gelada	0,40
Vapor	12,00

Fonte: a autora.

Estes custos e outros que não foram aqui citados tiveram seus valores obtidos do próprio software.

3.2.7 Taxa SELIC

A taxa SELIC utilizada para se proceder aos cálculos do VPL e da TIR (é a variável i da Equação 3.3 multiplicada por 100) foi de 9,75%, referente ao mês de março de 2012.

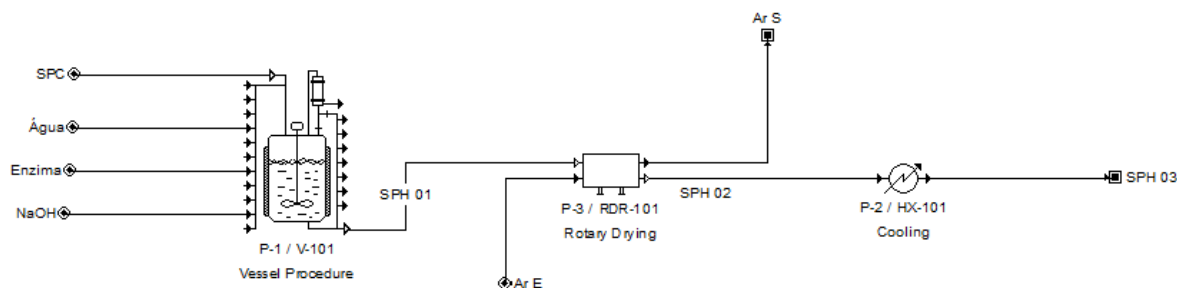
3.2.8 Custo Brasil

Apesar deste processo não pertencer ao setor de bens de capital, como o único valor para o Custo Brasil encontrado até a finalização deste trabalho, foi o para este ramo, então este foi o usado, que é de 43%.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O esquema do arranjo proposto é mostrado na Figura 3.10. Apesar dos processos de produção do farelo de soja e do farelo concentrado de soja serem contínuos, devido ao fato da enzima não ser imobilizada e o substrato não ser solúvel nem de fácil transporte quando muito úmido, como nas condições necessárias para a hidrólise, a reação, então, foi simulada em batelada. Assim, supõe-se que o farelo venha de um tanque de armazenamento e não diretamente da saída do processo produtivo do farelo de soja concentrado. Com este arranjo, obteve-se uma produção anual de pouco mais de 20.500 toneladas de farelo com proteínas de soja hidrolisadas.

Figura 3.10 – Proposta de arranjo para a produção de hidrolisados de proteína de soja

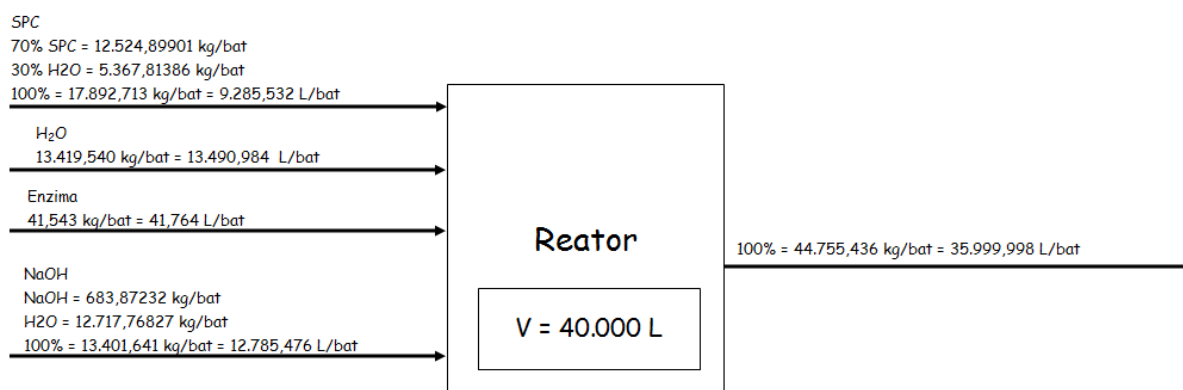


Legenda: SPC = corrente de entrada do farelo concentrado. Água = corrente de entrada da água. Enzima = corrente de entrada da enzima. NaOH = corrente de entrada do hidróxido de sódio. P-1/V-1 = reator de hidrólise. SPH 01 = corrente com hidrolisado de soja que sai do reator e entra no secador. Ar E = Ar que entra no secador. Ar S = ar que sai do secador. P-3/RDR-101 = Secador rotativo. SPH 02 = corrente com farelo hidrolisado que sai do secador e entra no resfriador. P-2/HX-101 = resfriador. SPH 03 = corrente que sair do resfriador, ou seja, o produto final.

Fonte: a autora.

Foi estipulada que a capacidade máxima do reator seria de 40.000 L devido aos dados disponíveis na literatura explicarem que não se costuma utilizar reatores maiores do que este para produção de hidrolisados. Assim, como mostra o balanço de massa para o reator na Figura 3.11, esta seção apresenta os resultados para se hidrolisar no máximo 18 toneladas de farelo concentrado (considera-se que o reator opera com 90% de sua capacidade) por batelada, resultando em pouco mais de 5 horas de ocupação do reator, entre carregar, hidrolisar e descarregar. Este valor de processamento é consideravelmente pequeno perto da quantidade que as grandes esmagadoras processam de farelo/farelo concentrado por dia. A IMCOPA, por exemplo, processa 42 ton/h de farelo concentrado. Porém, novamente, devido ao fato da enzima não ser imobilizada e o substrato não ser solúvel, dificultando a agitação, esta é uma limitação de dimensão existente. Assim, caso seja interessante se produzir mais, deve-se fazer quantas plantas iguais a esta sejam necessárias.

Figura 3.11 – Balanço de massa para o reator



Nota: considera-se que todas as entradas se transformaram em um único produto, denominado farelo de soja hidrolisado (ainda úmido ao sair do reator).

Fonte: a autora.

Assim que o farelo de soja hidrolisado sai do reator, com 70% de umidade, passa pelo secador e a secagem dura seis horas, saindo com 15% de umidade e depois vai para o resfriador por mais 5 horas, saindo com 10% de umidade. Foram necessários apenas um secador e um resfriador. O secador deve ter diâmetro de aproximadamente 2,8 m e aproximadamente 40 m de comprimento. Não se teve tempo viável para pesquisar se esses valores são ou não possíveis na prática.

O preço de cada equipamento, corrigido pelo custo Brasil, é apresentado na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Custo dos equipamentos

Equipamento	Preço (USD)
Reator	1.337.000,00
Secador	2.628.000,00
Resfriador	3.000,00

Fonte: a autora.

Para fazer os cálculos econômicos, o software assume que são necessárias dois anos para a construção da planta, ou seja, nos dois primeiros anos não se teria nada de lucro, porém se teriam custos. A partir de então, demora-se um ano para as vendas estabilizarem e a partir do quarto ano, as vendas entram em regime permanente. O prazo do projeto é de 15 anos, porém o tempo de vida dos equipamentos, para fins de depreciação é de 10 anos. Estas informações podem ser vistas no Anexo 2 referente ao fluxo monetário do processo. O valor da taxa mínima de atratividade sugerida pelo software era de 7%, porém este valor foi mudado para a taxa SELIC numa tentativa de representar melhor a realidade no Brasil. Postas estas condições, o capital necessário para se colocar a planta em operação assumiu um valor de 32.864.000 dólares, com um custo operacional anual de quase 17 milhões de dólares ao

ano. Quase que 50% dos custos operacionais são devidos à obtenção de matérias-primas. Outros custos operacionais juntamente com o resto do relatório econômico são mostrados no Anexo 3. O valor para se produzir um quilograma de farelo com proteínas de soja hidrolisadas ficou em 0,82 dólares.

O valor da taxa interna de retorno foi de 29,61%, maior do que a taxa mínima de atratividade (taxa SELIC) de 9,75%, o que indica que o projeto é viável. Vem a reforçar a viabilidade da planta, o valor positivo do valor presente líquido, sendo de 39.775.000 dólares. A Tabela 3.4 apresenta um resumo dos dados mais importantes econômicos obtidos.

Tabela 3.4 – Sumário executivo

Capital total investido	32.864.000 USD
Custo operacional	16.820.000 USD/ano
Custo unitário	0,82 USD/kg produto
TIR	29,61%
VPL	39.775.000 USD

Fonte: a autora.

Como mencionado na Revisão da literatura, normalmente materiais com muita umidade costumam passar por uma operação de concentração antes de ir para secagem, pois mesmo inserindo mais operações, o custo fica menor do que com o gasto em energia utilizado só pelo secador. Assumindo que os dados de secagem sugeridos pelo SuperPro se aproximem da realidade, mesmo utilizando só a secagem, esse projeto preliminar já se mostrou viável. Porém, quando de fato um material muito úmido vai direto para a secagem, o que se faz é adicionar alguma partícula inerte ou parte do produto já seco para tornar essa secagem factível, fato este que não foi considerado neste modelo. Além disso, o que se observa na literatura é que dificilmente se usaria imediatamente um secador com um material com 70% de umidade na entrada. Assim, o procedimento mais comum seria colocar alguma operação de concentração antes, provavelmente algo parecido com o que ocorre na produção da farinha de peixe, mostrado na Figura 3.7. Assim, poderia ser inserida uma prensa anteriormente ao processo de secagem, em que parte da água é retirada do farelo hidrolisado, porém provavelmente as proteínas menores, foco maior de interesse do produto, provavelmente irão junto com esta água. Assim, esta água poderia passar por um processo de evaporação para a concentração desse material e posteriormente se juntaria novamente à torta prensada do farelo e finalmente todo esse material seguiria para secagem e resfriamento. Um processo deste tipo não foi simulado por falta de tempo e de dados, como a quantidade de material sólido que passaria pela prensa junto com a água e etc.; informações como as apresentadas na Figura 3.8.

Além disso não se tem informações de elevação de temperatura, de ebulição ou capacidade calorífica da água contendo proteínas.

4- CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados obtidos, decidiu-se adotar como condições de trabalho para a hidrólise das proteínas do farelo de soja concentrado pela enzima Novo-Pro D, temperatura de 55 °C, pH 9, relação enzima/substrato 0,5% (m_{enz}/m_s) e 90% de umidade.

Pela análise cromatográfica do farelo de soja hidrolisado em diferentes graus de hidrólise, para hidrólise realizada na temperatura de 55 °C, pH 9, 0,5% (m_{enz}/m_s) e 90% de umidade, observa-se que as proteínas com tamanho molecular acima de 14.000 Da são hidrolisadas ao longo de todo o tempo de reação observado (3 horas, grau de hidrólise de 18%). Os peptídeos de tamanho entre 14.000 e 5.000 Da tem sua taxa de formação maior que a de consumo até a reação atingir grau de hidrólise de aproximadamente 9% e após este valor, os peptídeos desta faixa de tamanho passam a ter a taxa de consumo maior que a de formação, indicando que peptídeos desta faixa são intermediários pelos quais a enzima tem também grande afinidade. Os peptídeos entre 5.000 e 238 Da aumentam conforme se avança a hidrólise e peptídeos e aminoácidos menores do que 238 Da não tem sua formação ou consumo alterados significativamente ao longo da hidrólise, o que faz sentido, já que a enzima Novo-Pro D é uma endoprotease, enzima que tem preferência por quebrar ligações não terminais da cadeia peptídica.

Um modelo cinético do tipo Michaelis-Menten com inibição competitiva foi utilizado para descrever o comportamento da concentração de ligações peptídicas hidrolisadas ao longo do tempo. Experimentalmente, foi observado que nem todas as ligações peptídicas presentes nas proteínas do farelo concentrado de soja estavam acessíveis para serem hidrolisadas, visto que o grau de hidrólise máximo alcançado, em um experimento de cerca de sete horas, foi de 21%. Assim, a concentração inicial de ligações hidrolisáveis presentes foi corrigida, com base na informação do grau de hidrólise máximo. O ajuste dos parâmetros do modelo de Michaelis-Menten com inibição mostrou-se adequado. Ao se ajustar curvas aos pontos experimentais das concentrações dos pseudocomponentes em função do grau de hidrólise, pode-se notar que a cinética convencional não descreve corretamente todo o comportamento apresentado ao longo da reação. Por isso, foi feita uma modelagem por meio de um modelo neural, que se mostrou bastante satisfatória.

A partir da análise econômica de um projeto preliminar para a fabricação de um produto a base de proteínas hidrolisadas do farelo concentrado de soja, pôde-se verificar que tal empreendimento se mostrou viável. Porém mais estudos precisam ser feitos acerca dos

parâmetros presentes no processo, principalmente os relativos à secagem e da escolha de equipamentos, para uma análise mais confiável.

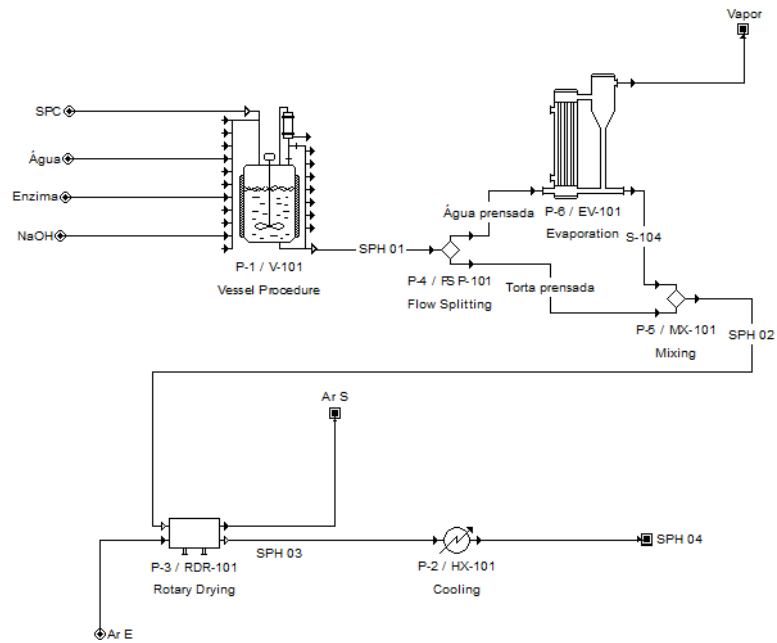
Para trabalhos futuros, sugere-se que, durante a reação de hidrólise nas condições realizadas para a implementação da rede neural, sejam retirados e analisados mais pontos no início da reação, para que se verifique se o comportamento observado, a inflexão no início da curva para a concentração em função do tempo para o pseudocomponente 1, de fato acontece. Também, pode-se retirar mais pontos durante toda a hidrólise, para que o dados de entrada da rede sejam os próprios pontos experimentais e não pontos de curvas previamente ajustadas. Além disso, mais replicatas da reação de hidrólise podem ser feitas nos pHs 8, 9 e 10, analisando-se o perfil peptídico em diferentes momentos para se confirmar, com uma certeza maior se, de fato, o pH não influencia no perfil peptídico em um dado valor de grau de hidrólise.

Como discutido no item de modelagem matemática por Michaelis-Menten, sugere-se uma modelagem a quatro parâmetros, em uma modificação do modelo de Michaelis-Menten com inibição, de modo a contabilizar as ligações peptídicas não hidrolisáveis.

Outra sugestão é a de se levar em consideração o volume adicionado de NaOH que não devido a hidrólise enzimática, subtraindo-se este valor durante cálculo do grau de hidrólise e, como consequência, tem-se esta correção para as modelagens matemáticas que se utilizam desses valores.

Em relação ao projeto preliminar do processo, pode-se em trabalhos futuros, realizar o estudo dos parâmetros de processo envolvidos e também da melhor seleção de equipamentos para a obtenção do produto hidrolisado. Um arranjo mais realista pode ser estudado, como o apresentado na Figura 4.1, em que existe uma etapa de concentração por meio de uma prensa seguida de um evaporador, este último, para concentrar as proteínas solúveis em água que saíram da prensa na fase aquosa. Por fim, este concentrado se juntaria novamente à parte sólida do hidrolisado.

Figura 4.1 – Sugestão de arranjo para trabalhos futuros



Fonte: a autora.

Além disso, testes in vivo são interessantes para se verificar a aceitação do produtos pelos animais e se a maior eficiência nutricional realmente se verifica.

REFERÊNCIAS

ADACHI, M.; KANAMORI, J.; MASUDA, T.; YAGASAKI, K.; KITAMURA, K.; MIKAMI, B.; UTSUMI, S. Crystal structure of soybean 11S globulin: Glycinin A3B4 homohexamer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 100, no. 12, p. 7395-7400, 2003.

ADLER-NISSEN, J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. Londres: Elsevier, 1986.

ALIBABA. **Hydrolyzed soy protein powder 1H**. Disponível em: <http://salionfood.en.alibaba.com/product/435295495-212049057/hydrolyzed_soy_protein_powder_1H.html>. Acesso em 01 mar. 2012.

ALONSO, L. F. T.; PARK, K. J. Método de seleção de secadores. **Ciência e tecnologia dos alimentos**. vol. 25, nº 2, p. 208-216, 2005.

ASSAF NETO, A. **Mercado financeiro**. 9 ed. Atlas, 2009.

APROSOJA. **Soja: cultura de uso diversificado**. Disponível em: <http://www.aprosoja.com.br/novosite/soja_diversificado.php>. Acesso em 20 mar. 2012.

BARAC, M. B.; STANOJEVIC, S. P.; JOVANOVIC, S. T.; PESIC, M. B. Soy protein modification: A review, **Acta periodica technologica**, no. 35, p. 3-16. 2004.

BIASUTTI, E. A. R. **Otimização das condições de hidrólise enzimática das proteínas do soro de leite para obter elevado teor de oligopeptídeos**: utilização da subtilisina e da pancreatina. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

BLANCH, H. W. CLARK, D. S. **Biochemical engineering**. Marcel Dekker, 1997.

BRAGA, A. P.; CARVALHO, P. L. F.; LUDERMIR, T. B. **Redes neurais artificiais**: teoria e aplicações. 2ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

BRENNAN, J. G. **Food processing handbook**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. 2006.

BÜNGE ALIMENTOS. **Conceitos para formulação de ração**: ingredientes e nutrientes. 2008. Disponível em: <<http://www.portaleducacao.com.br/veterinaria/artigos/2510/conceitos-para-formulacao-de-racao-ingredientes-e-nutrientes>> Acesso em 24 fev. 2011.

CALDEIRA, J. P. **Especialistas dissecam o Custo Brasil**. 2011. Disponível em: <<http://www.advivo.com.br/blog/luisnassif/especialistas-dissecam-o-custo-brasil>>. Acesso em: mar. 2012.

CENTRO INTERNACIONAL DE NEGÓCIOS DO PARANÁ. **Brasil diversifica e lidera comércio mundial agropecuário**. Disponível em: <<http://www.cinpr.org.br/News2content106235.shtml>>. Acesso em 03 dez. 2010.

CHAE, H. J.; IN, M-J.; KIM, M-H. Process development for the enzymatic hydrolysis of food protein: effects of pre-treatment and post-treatment on degree of hydrolysis and other product characteristics. **Biotechnol. Bioprocess Eng.** vol. 3, nº 1, p. 35-39, 1998.

CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=547&t=>>>. Acesso em: 03 abr. 2012.

EMBRAPA. **Custos de produção**. 2010. Disponível em <<http://www.cnpsa.embrapa.br/?ids=Sn6p54k7p>>. Acesso em 25 fev. 2011.

EMBRAPA. **Ração de baixo custo é alternativa para alimentação de bovinos no período da seca**. 2007. Disponível em: <<http://hotsites.sct.embrapa.br/prosarural/programacao/2007/racao-de-baixo-custo-para-alimentacao-de-bovinos-no-periodo-da-seca>>. Acesso em: 24 fev. 2011.

EMBRAPA. **EMBRAPA soja**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/>>. Acesso em 20 mar. 2012.

EMBRAPA. **Tecnologia para produção do óleo de soja**: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos. 2001. Disponível em:

<<http://www.aboissa.com.br/informativos/espec/soya/processosdasoja.pdf>>. Acesso em dez. 2011.

ERDMAN JR, J. W.; FORDYCE, E. J. Soy products and the human diet. **Am J Clin Nutr.** v. 49, 725-737, 1989.

FABREGAT, T. E. H. P. et al. Substituição da farinha de peixe pelo farelo de soja em dietas para juvenis de curimba. **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, vol. 37 nº 3, p. 289-294, 2011.

FISCHER, M. **Limiting factors for the enzymatic accessibility of soubean protein.** 2006. Tese (doutorado em Química dos alimentos) – Departamento de Agrotecnologia e Ciência dos alimentos, Universidade de Wageningen, Holanda, 2006.

GARRET, R.; GRISHAM, C. M. **Biochemistry.** Cengage Learning, 2005.

GELDER, J. W.; DROS, J. M. **Corporate actors in the South American soy production chain:** A research paper prepared for World Wide Fund for Nature. Switzerland. 2002.

GOLDSCHIMIDT, P. C. **Elaboração de um modelo dinâmico de simulação para o treinamento de executivos em marketing.** 1982. Tese (Doutorado em Administração de Empresas) – Escola de Administração de Empresas de São Paulo, Fundação Getúlio Vargas, São Paulo, 1982.

GUPTA, B. B. Determination of native and denatured milk proteins by high-performance size exclusion chromatography. **Journal of chromatography.** Amsterdam. vol. 282. p. 463-475. 1983.

HELDMAN, D. R.; LUND, D. B. **Handbook of food engineering.** 2 ed. CRC Press, 2007.

HIRSCHFELD, H. **Engenharia econômica e análise de custos.** 5. ed. São Paulo: Atlas, 1992.

IMCOPA. **Processo industrial de produção do farelo concentrado de soja e melaço de soja.** Fornecido pela IMCOPA. 2010.

KOOLMAN, J.; ROEHM, K-H. **Color Atlas of Biochemistry**. 2 ed. Nova York: Thieme, 2005.

KUIPERS, B. J.H. **Aggregation of peptides in soy protein isolate hydrolysates: The individual contributions of glycinin- and β -conglycinin-derived peptides**. Tese. Wageningen University, Holanda, 2007.

LABCONCO. **A guide to Kjeldahl Nitrogen determination methods and apparatus**. ExpotechUSA, Houston, Texas, USA. Disponível em <http://www.expotechusa.com/catalogs/labconco/pdf/KJELDAHLguide.PDF>. Acesso em: abril de 2010.

LUZ, G. R.; PARAÍSO, P. R., JORGE, L. M. M.; ANDRADE, C. M. G. Modeling and energetic analysis of soybean meal drying in the indirect rotary dryer. **Chemical products and process modeling**. vol 4, nº 1, art. 8, 2009.

MARIOTTO, J. R. **Cinética enzimática**. 2006. Disponível em <http://www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng_bioq/apostilas/Apostila_cinetica_enzimatica_ju.pdf> . Acesso em 22 fev. 2011.

MILITÃO, E. S.; SOUZA, C. S. S.; COSTA, S. M. A. L.; FERNANDES, W. B. Custo de produção de tilápia em Ilha Solteira. CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL. 45, 2007. Londrina. **Anais...**

MOTTA, R. R. CALÔBA, G. M. **Análise de investimentos**: tomada de decisão em projetos industriais. 1. ed. São Paulo: Atlas, 2009.

MUJUMDAR, A. S. **Handbook of Industrial Drying**. 3 ed. CRC Press, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. Lehninger – **Princípios de Bioquímica**. 3ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NILL, K. **Glossary of biotechnology terms**. 3 ed. Florida: CRC, 2002.

NOGUEIRA, E. Análise de investimentos. In: _____. **Gestão agroindustrial**. São Carlos: Atlas, 1997. V.2.

NOVOZYMES. **Ficha de informação do produto**: Novo-Pro D. 2011.

OLIVEIRA, A. M. B. M. S. **Substituição de fontes protéicas de origem animal por fontes protéicas de origem vegetal em rações para o "Black Bass" *Micropterus salmoides***. Tese (Doutorado em Ciência animal e pastagens) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

PALMA NETO, L. G.; NICOLETTI, M. C. **Introdução às redes neurais construtivas**. São Carlos: EdUFSCar, 2005.

PARAÍSO, P. R.; ANDRADE, C. M; CURVELO, A. N. Análise energética preliminar da secagem industrial do farelo de soja. **Acta Scientiarum technology**. Maringá, vol. 26, nº 2, p. 91-95, 2004.

PASUPULETI, V. K.; DEMAIN, A. L. **Protein Hydrolysates in Biotechnology**. Springer, 2010.

PERLINGEIRO, C. A. G. **Engenharia de Processos**: análise, simulação, otimização e síntese de processos químicos. 2005.

PETERS, M. S.; TIMMERHAUS, K. D. **Plant design and economics for chemical engineers**. 4 ed. McGraw-Hill, 1991.

PINTO, G. A. **Biorefinaria de soro de queijo: engenharia de bioprocessos e sistemas aplicada à transformação de um resíduo poluente em produtos com valor agregado**. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.

PINTO, G. A.; GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C. Neural network inference of molar mass distributions of peptides during Tailor-Made enzymatic hydrolysis of cheese whey: effects of pH and temperature. **Applied biochemistry and biotechnology**. v. 143, p. 142-154, 2007.

POLAINA, J.; MACCABE, A. P. **Industrial enzymes**: structure, function and applications. Springer, 2007.

PORTAL BRASIL. **Aqüicultura e pesca**: importância estratégica. 2010. Disponível em: <<http://www.sae.gov.br/brasil2022/?p=272>>. Acesso em 03/12/2010.

ROMAN, J. A.; SGARBIERI, V. C. Efeito da hidrólise enzimática sobre propriedades funcionais de caseína bovina coagulada pela ação da Quimosina. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.25, n.3. p.468-474, jul.-set. 2005.

ROSSI, D. M. **Utilização de carne mecanicamente separada de frango para produção de um hidrolisado protéico a partir de enzimas microbianas**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia agrícola e do ambiente. Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SALAZAR, M. et al. Pesca predatória dizima peixes no sul do Pacífico. **Publica**, 17 fev. 2012. Disponível em: <<http://apublica.org/2012/02/pesca-predatoria-dizima-peixes-sul-pacifico/>>. Acesso em: mar. 2012.

SEGEL, Irwin H. **Bioquímica: teorias e problemas**. Trad. Denise Mattatia Grassiano. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1979.

SHULER, Michael L.; KARGI, Fikret. **Bioprocess engineering: basic concepts**. 2 ed. New Jersey: Prentice Hall, 2006.

SIMAS, R. C. **Determinação de proteína bruta e aminoácidos em farelo de soja por espectroscopia no infravermelho próximo**. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Unicamp, Campinas, 2005.

SILVA, C. R. N. **Processos de recuperação de proteínas no soro de queijo na forma de hidrolisados e concentrados**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Centro de ciências exatas e de tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2000.

SILVA, M. C.; SILVA, V. D. M.; LANA, A. M. Q.; SILVESTRE, M. P. C. Grau de hidrólise e perfil peptídico de hidrolisados enzimáticos obtidos a partir de concentrado protéico de soro de leite. **Alim. Nutr.**, Araraquara. v.20, n.3, p. 395-402, jul./set. 2009.

SILVESTRE, M. P. C.; HAMON, M; YVON, M. Analysis of protein hydrolysates. 1. Use of Poly(2-hydroxyelaspertamide)-Silica column in size exclusion chromatography for the fractionation of casein hydrolysates. **J. Agric. Food Chem.**, v.42, p.2778-2782, 1994a.

SILVESTRE, M. P. C.; HAMON, M; YVON, M. Analysis of protein hydrolysates. 2. Characterization of casein hydrolysates by a rapid peptide quantification method. **J. Agric. Food Chem.**, v.42, p.2783-2789, 1994b.

SOUSA JR., R; RESENDE, M.; GIORDANO, R. L. C.; GIORDANO, R. C. Hybrid model for an enzymatic reactor: hydrolysis of cheese whey proteins by alcalase immobilized in agarose gel particles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 105, p.413-422, 2003.

SOUSA JR, R.; LOPES, G. P.; TARDIOLI, P. W.; GIORDANO, R. L. C.; ALMEIDA, P. I. F.; GIORDANO, R. C. Kinetic model for whey protein hydrolysis by Alcalase multipoint immobilized on agarose gel particles. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. Vol. 21, No. 02, pp. 147 - 153, April - June 2004.

SUN, X. D. Review: Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation. **International Journal of Food Science and Technology**. 2011.

TAFNER, M. A. Redes Neurais Artificiais: Aprendizado e Plasticidade. **Cérebro & Mente**. 1998. Disponível em : <<http://www.cerebromente.org.br/n05/tecnologia/rna.htm>>. Acesso em: abr. 2012.

TAKAHASHI,, N. S. **Nutrição de peixes**. Disponível em <ftp://ftp.sp.gov.br/ftppeasca/nutricao_peixes.pdf>. Acesso em 24 fev. 2011.

TARDIOLI, P. W. **Hidrólise controlada de proteínas do soro de queijo usando carboxipeptidase A e Alcalase imobilizadas multipontualmente em agarose**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de ciências exatas e de tecnologia, Universidade federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

TATIBANA, C. Y.; KAETSU, D. Y. **Redes neurais**. Disponível em <<http://www.din.uem.br/ia/neurais/#artificial>> . Acesso em 25 fev. 2011.

TRIVELATO, G. C. **Técnicas de modelagem e simulação de sistemas dinâmicos**. São José dos Campos, 2003.

USDA. United States Departamento f Agriculture. Economics, Statistics and Market Information System. Disponível em: <<http://usda.mannlib.cornell.edu/MannUsda/viewDocumentInfo.do?documentID=1288>>. Acesso em: 3 abr. 2012.

VIEIRA, T. M. F. S. Estrutura, funcionalidade e aplicações de proteínas de soja. In: XII CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ÓLEOS E GORDURAS. **Anais...** 2007.

WINDSOR, M. L. **Fish meal**. Department of trade and industry Torry research station. 2001. Disponível em: <<http://www.fao.org/wairdocs/tan/x5926e/x5926e00.htm>>. Acesso em 2011.

WOLF, W. J. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**. Wiley-Interscience: 2007.

ANEXO 1

As Tabelas A.1 a A.3, apresentam os valores de Bias e dos pesos das camadas. Na Tabela A.1, a camadas oculta tem 10 valores de *bias*, porque possui 10 neurônios e a camada de saída tem 5 *bias*, pois tem 5 neurônios. A Tabela A.2 apresenta os valores dos pesos camada oculta. As coluna representa a entrada e as linhas, os 10 neurônios da camada, ou seja, indica o peso que o valor de entrada recebeu em cada neurônio Analogamente, saem informações de 10 neurônios da camada oculta para cada um dos 5 neurônios da camada de saída.

Tabela A.1 – valores de bias das camadas da rede neural

Camada oculta	Camada de saída
2.3720405e+001	-9,34E+06
1.1967555e+001	-8,61E+06
7.1695354e+000	-6,96E+06
3.6197076e+000	-9,97E+06
-1.4919221e+000	8,41E+06
5.3463562e-001	
-1.9735715e+000	
-1.0670145e+001	
1.8295491e+001	
-2.6508614e+001	

Fonte: a autora.

Tabela A.2 – valores dos pesos da camada oculta

-2.3865293e+001
-1.3923370e+001
-1.0920119e+001
-8.9370936e+000
9.2745575e+000
7.2537676e+000
-4.0130818e+000
-1.7825485e+001
2.3796881e+001
-2.8175577e+001

Fonte: a autora.

Tabela A.3 – valores dos pesos da camada de saída

1,50E+05	3,44E+05	5,54E+05	9,79E+05	-7,33E+05	-1,18E+06	2,19E+07	-5,50E+05	1,07E+06	-1,78E+06
1,39E+05	2,72E+05	3,79E+05	5,09E+05	-3,29E+05	-4,13E+05	2,90E+06	2,14E+05	-7,68E+05	1,73E+07
3,42E+06	2,66E+06	5,76E+05	8,78E+05	-1,13E+06	-1,80E+06	3,84E+06	7,30E+05	-2,04E+06	6,31E+06
3,70E+06	6,01E+06	6,00E+06	5,29E+06	-1,91E+06	-2,60E+06	-8,92E+06	-1,27E+06	1,88E+06	-3,69E+06
-1,18E+06	-1,62E+06	-1,27E+06	-1,13E+06	7,67E+05	1,26E+06	-1,45E+07	-3,09E+05	3,84E+05	-7,86E+04

Fonte: a autora.

ANEXO 2

Este anexo trata sobre o fluxo de caixa fornecido pelo SuperPro Designer.

Cash Flow Analysis Report
Processo final-01b- sem prensav.01 - valor corrigi

April 17, 2012

1. CASH FLOW ANALYSIS (thousand \$)

Year	Capital Investment	Debt Finance	Sales Revenues	Operating Cost	Gross Profit	Loan Payments	Depreciation	Taxable Income	Taxes	Net Profit	Net Cash Flow
1	- 9,107	0	0	0	0	0	0	0	0	0	- 9,107
2	- 12,143	0	0	0	0	0	0	0	0	0	- 12,143
3	- 10,096	0	15,409	12,051	3,359	0	2,884	3,359	1,343	4,899	- 5,197
4	0	0	30,819	16,820	13,998	0	2,884	13,998	5,599	11,283	11,283
5	0	0	30,819	16,820	13,998	0	2,884	13,998	5,599	11,283	11,283
6	0	0	30,819	16,820	13,998	0	2,884	13,998	5,599	11,283	11,283
7	0	0	30,819	16,820	13,998	0	2,884	13,998	5,599	11,283	11,283
8	0	0	30,819	16,820	13,998	0	2,884	13,998	5,599	11,283	11,283
9	0	0	30,819	16,820	13,998	0	2,884	13,998	5,599	11,283	11,283
10	0	0	30,819	16,820	13,998	0	2,884	13,998	5,599	11,283	11,283
11	0	0	30,819	16,820	13,998	0	2,884	13,998	5,599	11,283	11,283
12	0	0	30,819	16,820	13,998	0	2,884	13,998	5,599	11,283	11,283
13	0	0	30,819	13,936	16,882	0	0	16,882	6,753	10,129	10,129
14	0	0	30,819	13,936	16,882	0	0	16,882	6,753	10,129	10,129
15	2,507	0	30,819	13,936	16,882	0	0	16,882	6,753	10,129	12,636

IRR/NPV SUMMARY

IRR Before Taxes	42.11 %	Interest %	9.75	9.00	11.00
IRR After Taxes	29.61 %	NPV	39,775.00	43,000.00	34,877.00

Depreciation Method: Straight-Line
 DFC Salvage Fraction: 0.050

2. LOAN INFORMATION (thousand \$)

	Direct Fixed Capital	Working Capital	Up Front R&D	Up Front Royalties
Amount	30,357	989	0	0
Equity (%)	100	100	100	100
Debt (%)	0	0	0	0
Interest (%)	9	12	12	12
Loan Time (yrs)	10	6	6	6

3. BREAKDOWN OF CAPITAL OUTLAY (\$)

Year	Direct Fixed Capital	Working Capital	Start-Up Cost	Up Front R&D	Up Front Royalties	Total
1	- 9,107,142	0	0	0	0	- 9,107,142
2	- 12,142,856	0	0	0	0	- 12,142,856
3	- 9,107,142	- 989,024	- 1,517,857	0	0	- 10,096,166
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	1,517,857	989,024	0	0	0	2,506,881

ANEXO 3

Este anexo trata sobre o relatório econômico fornecido pelo SuperPro Designer.

Economic Evaluation Report for Processo final - 01b - sem prensa v.01

April 17, 2012

1. EXECUTIVE SUMMARY (2012 prices)

Total Capital Investment	32,864,000 \$
Capital Investment Charged to This Project	32,864,000 \$
Operating Cost	16,820,000 \$/yr
Production Rate	20,545,781.25 kg MP/yr
Unit Production Cost	0.82 \$/kg MP
Total Revenues	30,819,000 \$/yr
Gross Margin	45.42 %
Return On Investment	34.33 %
Payback Time	2.91 years
IRR (After Taxes)	29.61 %
NPV (at 9.8% Interest)	39,775,000 \$
MP = Total Flow of Stream SPH 03	

2. MAJOR EQUIPMENT SPECIFICATION AND FOB COST (2012 prices)

Quantity/ Standby/ Staggered	Name	Description	Unit Cost (\$)	Cost (\$)
1 / 0 / 0	V-101	Stirred Reactor Vessel Volume = 40000.00 L	1,337,000	1,337,000
1 / 0 / 0	RDR-101	Rotary Dryer Drying Area = 351.30 m ²	2,628,000	2,628,000
1 / 0 / 0	HX-101	Heat Exchanger Heat Exchange Area = 0.51 m ²	3,000	3,000
		Unlisted Equipment		992,000
			TOTAL	4,960,000

3. FIXED CAPITAL ESTIMATE SUMMARY (2012 prices in \$)

3A. Total Plant Direct Cost (TPDC) (physical cost)

1. Equipment Purchase Cost	4,960,000
2. Installation	2,213,000
3. Process Piping	1,736,000
4. Instrumentation	1,984,000
5. Insulation	149,000
6. Electrical	496,000
7. Buildings	2,232,000
8. Yard Improvement	744,000
9. Auxiliary Facilities	1,984,000
TPDC	16,498,000

3B. Total Plant Indirect Cost (TPIC)

10. Engineering	4,125,000
11. Construction	5,774,000
TPIC	9,899,000

3C. Total Plant Cost (TPC = TPDC+TPIC)

TPC	26,398,000
-----	------------

3D. Contractor's Fee & Contingency (CFC)

12. Contractor's Fee	1,320,000
13. Contingency	2,640,000
CFC = 12+13	3,960,000

3E. Direct Fixed Capital Cost (DFC = TPC+CFC)

DFC	30,357,000
-----	------------

4. LABOR COST - PROCESS SUMMARY

Labor Type	Unit Cost (\$/h)	Annual Amount (h)	Annual Cost (\$)	%
Operator	69.00	22,784	1,572,067	100.00
TOTAL		22,784	1,572,067	100.00

5. RAW MATERIALS COST - PROCESS SUMMARY

Bulk Raw Material	Unit Cost (\$/kg)	Annual Amount (kg)	Annual Cost (\$)	%
SPC	0.385	16,507,817	6,355,510	76.13
Water	0.001	41,523,751	22,838	0.27
Enzima	27.000	54,753	1,478,343	17.71
Sodium Hydroxid	0.545	901,344	491,232	5.88
TOTAL		58,987,665	8,347,923	100.00

6. VARIOUS CONSUMABLES COST (2012 prices) - PROCESS SUMMARY

THE CONSUMABLES COST IS ZERO.

7. WASTE TREATMENT/DISPOSAL COST (2012 prices) - PROCESS SUMMARY

THE TOTAL WASTE TREATMENT/DISPOSAL COST IS ZERO.

8. UTILITIES COST (2012 prices) - PROCESS SUMMARY

Utility	Annual Amount	Reference Units	Annual Cost (\$)	%
Electricity	0	kWh	0	0.00
Steam	78,509,193	kg	942,110	98.64
Steam (High P)	0	kg	0	0.00
Cooling Water	0	kg	0	0.00
Chilled Water	32,382,900	kg	12,953	1.36
TOTAL			955,063	100.00

9. ANNUAL OPERATING COST (2012 prices) - PROCESS SUMMARY

Cost Item	\$	%
Raw Materials	8,348,000	49.63
Labor-Dependent	1,572,000	9.35
Facility-Dependent	5,709,000	33.94
Laboratory/GC/QA	236,000	1.40
Consumables	0	0.00
Waste Treatment/Disposal	0	0.00
Utilities	955,000	5.68
Transportation	0	0.00
Miscellaneous	0	0.00
Advertising/Selling	0	0.00
Running Royalties	0	0.00
Failed Product Disposal	0	0.00
TOTAL	16,820,000	100.00

10. PROFITABILITY ANALYSIS (2012 prices)

A.	Direct Fixed Capital	30,357,000 \$
B.	Working Capital	989,000 \$
C.	Startup Cost	1,518,000 \$
D.	Up-Front R&D	0 \$
E.	Up-Front Royalties	0 \$
F.	Total Investment (A+B+C+D+E)	32,864,000 \$
G.	Investment Charged to This Project	32,864,000 \$
H. Revenue Stream Flowrates		
	Total flow in SPH 03	20,545,781 kg/yr
I. Production Unit Cost		
	SPH 03	0.82 \$/kg
J. Selling / Processing Price		
	Total flow in SPH 03	1.50 \$/kg
K. Revenues		
	SPH 03	30,819,000 \$/yr
L. Annual Operating Cost		
	AOC	16,820,000 \$/yr
M.	Gross Profit (K-L)	13,998,000 \$/yr
N.	Taxes (40%)	5,599,000 \$/yr
O.	Net Profit (M-N + Depreciation)	11,283,000 \$/yr
	Gross Margin	45.42 %
	Return On Investment	34.33 %
	Payback Time	2.91 years