

Exemplo 1 de aplicação do programa ‘superPro Designer’

PRODUÇÃO DE β -GALACTOSIDASE

Pretende-se obter β -Galactosidase (**b-gal** – PM=50000 kg/kmol), uma enzima intracelular produzida por *Escherichia coli*, que se pretende vender a 6500 \$/kg.

O diagrama de processo de produção, incluindo fermentação, recuperação e purificação da enzima através da simulação no programa SuperPro Designer, é apresentado em anexo. O processo é desenvolvido tomando como base 7920 h/ano.

Água processual (0.04 \$/kg) com um caudal de 2000 kg/min, 64000 kg/batch, com um tempo de preparação (setup time, ST) de 10 min e nutrientes a 500 kg/min e ST=5 min (**Glucose** (1 \$/kg) com um caudal de 6150 kg/batch e **sais** (PM=100g/gmol, 1.6 \$/kg) com um caudal de 1025 kg/batch) são alimentados a um misturador agitado (Batch blending tank), considerando-se 10 min suficiente como tempo de agitação.

Seguidamente a mistura passa por um esterilizador (Heat Sterilization), que funciona 4h/ciclo (Process Time, PT) e que necessita de 2h/ciclo (Turnaround Time, TT) para limpeza e esterilização, antes de entrar no fermentador (Batch Fermentation) em que PT=16 h/ciclo. Considere que o fluido no esterilizador tem uma viscosidade de 0.4 cp.

Um compressor (Transport near – compressor), para o qual TT=0, seguido de um filtro de ar (Air filtration) providenciam ar (Mixture) (T=25 °C, P=1 atm) ao fermentador.

Usa-se **amónia** (400 kg/batch, 10 kg/min, ST=5 min, 0.5 \$/kg) como fonte de azoto.

Considerar uma reacção a 98%, em que os coeficientes de estequiometria (em massa) da reacção são: amónia = -1.77; **biomassa** = 12.79; **CO₂** (BP=-78.39 °C)= 22.38; glucose = -30; O₂ = -15.57; água processual = 16.37; e sais = -4.2. A entalpia da reacção é igual a -3750 kcal/kg, referente ao oxigénio, considerando-se como temperatura de referência 37 °C.

Considera-se que 100 % de: amónia, CO₂, N₂ e O₂ remanescentes são eliminados para a atmosfera, passando antes por um filtro de ar. No fermentador considera-se que se procede a limpeza – clean-in-place, durante 30 min, utilizando-se **água** (0.01 \$/kg) a 25 °C.

A mistura é transferida a um caudal volumétrico de 1000 L/min (ST=5 min) para um tanque.

A corrente que sai do tanque recircula através de um filtro de microfiltração (PT=8h/ciclo), para concentrar com um factor de concentração = 2, coeficiente de rejeição da biomassa igual a 100%. Considere o uso de membranas MF da Biotech, com 100 ciclos de utilização máxima.

A corrente concentrada entra no homogeneizador (high pressure) que funciona 16h/ciclo. Considera-se que a estequiometria de ruptura das células é: b-gal= 0.5; biomassa= -10; **debris**= 3; **Ácidos nucleicos** (PM=30000 kg/kmol)= 2 e **proteína** =4.5. A homogeneização é efectuada em 2 passos, sendo o produto activo b-gal e o produto desnaturado proteínas. A temperatura de saída, para um tanque, é de 15°C.

Numa centrífuga de discos (PT=8h/ciclo) removem-se 98% de biomassa e 8.2% de debris. A temperatura de saída é de 15 °C, usando-se água sub-arrefecida como agente de arrefecimento, considerando-se que o diâmetro de partículas limitante é de 2 µm. Na centrífuga procede-se a limpeza (clean-in-place), durante 30 min, utilizando-se água (**WFI**, 0.1 \$/kg) a 25 °C com um caudal de 20 L/min.

Entre o homogeneizador e a centrífuga é necessário utilizar um tanque devido à diferença de tempos de processo.

Num filtro (Dead-end filtration), em processamento durante o mesmo tempo que a centrifugação anterior, são removidas as restantes partículas nas seguintes percentagens: b-gal=1%,

biomass=100%, debris=100%, ácidos nucleicos=5% e proteínas=5%, sendo a mistura simultaneamente transferida para um tanque.

A solução é concentrada, recirculando através de um filtro de membranas UF da Biotech, com 100 ciclos de utilização, (Ultrafiltration, PT=8h/ciclo). Considerar como coeficientes de rejeição: b-gal=100%, biomass=100%, proteínas=80%. O produto activo é b-gal, sendo as proteínas o produto desnaturado (3% de desnaturação). O factor de concentração (Alimentação/Produto retido)=2.

A solução é, de seguida, purificada utilizando uma coluna cromatográfica de enchimento (PBA) que funciona em 8 ciclos/batch. Utilizar resina INX da Biotech, que pode funcionar em 200 ciclos. A velocidade linear de carga é 150 cm/h e a capacidade de ligação é de 20 mg/mL. O objectivo é reter o produto, tendo-se considerado como percentagens de ligação os seguintes valores: b-gal=100%, ácidos nucleicos=5% e proteínas=20%. Os rendimentos de recuperação são: b-gal=90%, ácidos nucleicos=5% e proteínas=15%. A eluição, por gradiente, é efectuada com um volume igual a 2 vezes o volume da coluna e o volume da corrente de produto é 0,3 vezes o volume da coluna, e a velocidade linear é igual a 250 (cm/h). O componente chave é o cloreto de sódio com uma concentração de 0.05 mol/L à entrada e 0.3 M à saída, entrando uma corrente WFI3 (WFI) e uma corrente NaCl 2 constituída por **NaCl(0,5M)**, cujo preço de compra é 0.19 \$/kg, a um caudal de ≈ 12000 kg/batch). A lavagem e a regeneração são efectuadas de acordo com a tabela seguinte:

Passo		Corrente	Componentes	Volume (x vol. col)	Vel. Linear (cm/h)
Pré-lavagem	wash	WFI 2	WFI	6	200
Lavagem	wash	Tris	Tris Buffer^a	10	200
Esgotamento	wash	NaCl 1	NaCl(0,1M)^b	4	200
Regeneração	regen.	NaOH	NaOH(0,5M)^c	5	200

^a**Tris Buffer** (0.15 \$/kg) é constituída por **Tris[HM]AM.HCl** (PM=157.6 kg/kmol) – **7,65%** + **WFI** – **92,35%** *

^b**NaCl(0,1M)** (0.13 \$/kg) – **NaCl=0,5845%** + **Água=99,4155% m/m** *

^c **NaOH(0,5M)** (0.12 \$/kg)

* (considerar **a=1020** como constante na densidade)

A solução é transferida para um tanque e de seguida recircula através de um filtro de ultrafiltração (PT=6h/ciclo) onde é de novo concentrada. Utilizar membranas UF Biotech, em que o número máximo de ciclos de utilização é 100. Considerar como coeficientes de rejeição: b-gal=100%, biomass=100%, debris=100%, proteínas=100%. O produto activo é b-gal, sendo as proteínas o produto desnaturado (5% de desnaturação). O factor de concentração (Alimentação/Produto retido)=3.

Nova purificação é efectuada numa coluna cromatográfica de filtração por gel (resina para filtração gel, em 200 ciclos), que funciona em 25 ciclos/batch. A velocidade linear de carga é 100 cm/h e o volume é igual a 5% do volume do leito. Considerar os seguintes rendimentos de recuperação: b-gal=90%, e proteínas=1%. As condições de eluição (isocrática) e de lavagem são as seguintes:

Passo	Corrente	Componentes	Volume (x vol. col)	Vel. Linear (cm/h)
Eluição	Eluente	NaCl(0,1M)	2 (0,15 na corrente de saída)	100
Lavagem	WFI 4	WFI	2	100

A solução é transferida para um filtro de ‘diafiltration’ (tempo de filtração =6h).

Água (WFI) é usada na corrente WFI-5 para facilitar a remoção de espécies permeadas. Pretende-se que o coeficiente de rejeição seja de 100% para a b-gal. O produto activo é a b-gal, para uma desnaturação de 3%. O volume permeado é 5 vezes o volume de alimentação e a concentração admitida máxima de sólidos é 350 g/L. Na pre-diafiltração, o nº de estágios é de 1 e o factor de concentração é de 6. A descarga é efectuada a um caudal de 10 kg/min.

A mistura é finalmente liofilizada num ‘freeze drying’ em que se considera que WFI possui uma percentagem de evaporação de 99.5% e a água de 100%, sendo a temperatura final de 12 °C e o tempo de secagem de 15 h. A descarga do bolo é realizada a um caudal de 10 kg/min, sendo de 20 min o tempo necessário de preparação.

A principal receita é obtida na corrente Produto, sendo o componente principal β -Galactosidase. Considere a seguinte valorização:

Corrente	Classificação	Preço \$/kg ou \$/entidade
Lixo 1	Aqueous Waste	0.01
Lixo 2	Aqueous Waste	0.01
Res liq 1	Aqueous Waste	0.01
Res liq 2	Aqueous Waste	0.01
Res liq 3	Aqueous Waste	0.01
Res liq 4	Aqueous Waste	0.01
Res liq 5	Aqueous Waste	0.01
Produto	Revenue	

(A) - Considere todos os equipamentos em ‘Design Mode’.

- Divida o diagrama em três secções. Efectue os balanços de massa. Verifique os caudais à saída de cada secção. Determine a quantidade de b-gal produzida.
- Verifique qual a unidade com maior duração e o equipamento que condiciona o processo.
- Efectue os cálculos económicos, para o ano de 2006, considerando uma taxa de inflação de 2,8%, uma taxa de imposto de 38 %, uma vida útil do equipamento de 10 anos, uma vida do projecto de 12 anos e uma taxa de câmbio de 1,2 do dólar para o euro. Analise os resultados em termos de taxa de retorno do investimento, ‘pay-back time’, taxa interna de rentabilidade e valor líquido actual.
- Introduza equipamentos em modo ‘staggered’ nos casos que condicionam o processo. Avalie a influência nos balanços mássicos e económicos.
- Analise os gráficos de Gantt.
- Passo o valor do tempo de ciclo para um múltiplo de 8 h. Avalie a influência nos balanços mássicos e económicos.
- Efectue uma análise de sensibilidade ao valor do tempo de inactividade (Batch time slack).

(B) – Passe alguns equipamentos, nomeadamente reservatórios, para ‘Rating Mode’, tendo em atenção os valores encontrados na execução anterior.

- Analise a influência nos balanços mássicos e económicos.
- Analise o relatório de ‘throughput’. Verifique quais os passos limitantes em cada uma das secções.
- Efectue uma análise de sensibilidade à quantidade de nutrientes.
- Efectue uma análise de sensibilidade ao valor do volume do fermentador.
- Efectue uma análise de sensibilidade ao tempo de filtração na ‘Dead-End Filtration’.
- Analise a influência do tempo de filtração na Microfiltração. Analise também a influência do factor de concentração.

- n) Analise a influência do caudal de saída de eluição na coluna de permuta iónica (nº de volumes do leito). Analise igualmente a influência da concentração final do componente chave.
- o) Analise a influência do caudal de saída de eluição na coluna cromatográfica de filtração por gel (nº de volumes do leito). Analise também a influência do nº de unidades.
- p) Efectue uma análise de sensibilidade, em termos mássicos e económicos, ao preço de WFI.

(C)

- q) Analise os efeitos, quer sob o ponto de vista mássico, quer sob o ponto de vista económico, do ajuste por scale-up.

(D)

Volte à versão inicial (sem ajuste de 'scale-up').

Introduza uma secção de FORMULAÇÃO e EMBALAGEM do produto liofilizado.

Utilizar **garrafas** de **plástico** que pesam 20g e custam 0.5 \$/entidade. Encher garrafas de 100 g de capacidade, engarrafando-se 8 garrafas por minuto, na linha de garrafas.

Na linha de rótulos, utilizar **rótulos** de **papel** que pesam 0.1 g, e custam 0.0025 \$/entidade. Considerar que se rotulam 10 garrafas por minuto.

Na linha de caixas, utilizar **caixas** de **cartão** para 6 entidades que pesam 10g e custam 1 \$/entidade, embalando-se 5 entidades por minuto, em 6 h.

Considere que pode vender o produto assim embalado a 3900 \$/entidade.

- r) Efectue os balanços mássicos e económicos.
- s) Analise a influência da capacidade das garrafas (p. ex. 250 g). Analise os resultados (mássicos e económicos). Por quanto deverá vender o produto para que a rentabilidade seja idêntica?

(E) – FORMULAÇÃO e EMBALAGEM do produto liofilizado.

Acrescente o transporte por camião que pode transportar 500 unidades, considerando um custo fixo de 2500 \$, despesas por quantidade de 1\$ e também por distância de 0.05 \$/entidade.km.

Considere a capacidade das garrafas de 100 g.

- t) Considere que pode vender o produto embalado a 3900 \$/entidade. Analise os resultados (mássicos e económicos).
- u) Analise a influência da distância a transportar na rentabilidade do processo.