UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Daiane Bortolote Ferreira

Balanço material de uma planta industrial produtora de esporos de *Metarhizium anisopliae* por cultivo em estado sólido em biorreator de leito empacotado

São José do Rio Preto

2021

Daiane Bortolote Ferreira

Balanço material de uma planta industrial produtora de esporos de *Metarhizium anisopliae* por cultivo em estado sólido em biorreator de leito empacotado

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. João Cláudio Thoméo

São José do Rio Preto

2021

F383b

Ferreira, Daiane Bortolote

Balanço material de uma planta industrial produtora de esporos de Metarhizium anisopliae por cultivo em estado sólido em biorreator de leito empacotado / Daiane Bortolote Ferreira. -- São José do Rio Preto, 2021

83 f. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: João Cláudio Thoméo

1. Microbiologia industrial. 2. Esporos. 3. Cultivo em estado sólido. 4. Fluxograma de processo. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Daiane Bortolote Ferreira

Balanço material de uma planta industrial produtora de esporos de *Metarhizium anisopliae* por cultivo em estado sólido em biorreator de leito empacotado

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Felipe Fernando Furlan
UFSCAR – Câmpus São Carlos

Profª. Drª Fernanda Perpétua Casciatori
UFSCAR – Câmpus São Carlos

São José do Rio Preto

01 de junho de 2021

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer (1851, p.172)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Cláudio Thoméo, por suas orientações, paciência e dedicação, que para muito além desse projeto, me mostraram a grande beleza desta profissão. Obrigada por acreditar em mim quando nem eu acreditava.

Ao meu pai Pedro e à minha mãe Leila, por toda dedicação, carinho e esforço para que eu pudesse chegar até aqui. Espero ser capaz de retribuir todo amor de vocês um dia.

Ao meu noivo, Yago, por me acolher e ajudar em todos os momentos possíveis, por toda dedicação e carinho, e por ter permanecido ao meu lado todos os dias.

Aos familiares e amigos que torceram e comemoraram junto cada vitória e conquistas até aqui.

Ao Prof. Fabrício Bruno Mendes pelo auxílio para elaboração da análise econômica.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para com a realização desta Dissertação de Mestrado.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos (PPG- ECA), por proporcionarem oportunidade, apoio, suporte e infraestrutura necessários ao desenvolvimento desta pesquisa.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa de estudos e auxílio financeiro que possibilitaram a dedicação integral ao programa de pós-graduação e a execução do estudo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O aumento expressivo previsto na necessidade produtiva dos esporos de *Metarhizium anisopliae*, apesar da sua produção ser ainda semi-artesanal, desperta o interesse pelo uso de biorreatores de cultivo em estado sólido como uma alternativa promissora para o aprimoramento tecnológico do processo. Pressupondo que questões técnicas e operacionais para ampliação de escala estejam resolvidas, este trabalho teve por objetivo estruturar e dimensionar, em termos de balanço material, o processo de produção industrial dos esporos do fungo *M. anisopliae* otimizados pelo emprego de equipamentos com destaque ao biorreator de leito empacotado para o cultivo em estado sólido. O processo de produção proposto é constante e comporta algumas etapas contínuas e em bateladas, de modo que o fluxograma de processo e a cronologia das etapas buscaram solucionar esta dificuldade. Os cálculos deste projeto baseiam-se na produção de esporos de duas biofábricas localizadas no interior de São Paulo, fundamentando-se na área, em hectares, de cana de açúcar beneficiada, no Brasil, pela aplicação dos esporos de *M. anisopliae* para combate da cigarrinha da cana-de-açúcar. Desta forma, adotou-se uma empresa de pequeno porte com capacidade produtiva de 6.10^{17} esporos/ano e outra de grande porte com capacidade produtiva 10 vezes superior. Os principais gargalos operacionais foram identificados e soluções apontadas e, a partir dos cálculos de fluxo de massa, a quantidade e capacidade nominal dos equipamentos propostos foram estabelecidas, detalhando-se estes equipamentos sempre que possível. Definiu-se a forma de esterilização dos substratos, através da operação contínua com a injeção de vapor saturado, e posterior resfriamento, ocorrendo em um tambor rotativo. Estabeleceu-se o cultivo submerso para a produção de inóculo em biorreatores agitados. A mistura e inoculação da biomassa foram configuradas para ocorrer continuamente em tambor rotativo. O cultivo em estado sólido para a produção dos esporos foi proposto em biorreatores de leito empacotado, instalando-se helicoide perfurado em seu interior para auxiliar no carregamento, descarregamento e estruturação da biomassa durante o cultivo, além de prover ar ao sistema. A extração dos esporos foi proposta em tambor rotativo acoplado a dois ciclones para captação dos esporos e a secagem, em outro conjunto de ciclones. Por fim, a formulação oleosa desenvolvida foi obtida em misturador. Para a empresa de pequeno porte são necessários 12 biorreatores de leito empacotado de 4 m^3, enquanto para a empresa de grande porte utilizam-se 36 biorreatores de 13,33 m^3. O impacto do reuso do arroz foi avaliado observando-se com um único reuso uma redução de 44,3% de arroz a ser adquirido anualmente. A viabilidade econômica para emprego das modificações foi avaliada, tomando como parâmetro o *Capital expenditure*, onde as etapas de downstream correspondem a 58% dos custos diretos.

Palavras-chave: *Metarhizium anisopliae*. Biorreator. Fluxograma de processo. Produção industrial. Balanço material. Viabilidade econômica.

ABSTRACT

The significant increase foreseen in the productive need of *Metarhizium anisopliae* spores, despite its semi-artisanal production, arouses interest in the use of solid state culture bioreactors as a promising alternative for the technological improvement of the process. Assuming that technical and operational issues for scaling up are resolved, this work aimed to structure and dimension, in terms of material balance, the industrial production process of spores of the fungus *M. anisopliae*. Optimized by the use of equipment, especially the packed-bed bioreactor for solid state cultivation. The proposed production process is constant and includes some continuous steps and batch. So the process flowchart and the chronology of the steps sought to solve this difficulty. The calculations for this project are based on the production of spores from two biofactories located in the interior of São Paulo, based on the area, in hectares, of sugarcane processed in Brazil by the application of *M. anisopliae* spores to combat the Sugarcane leafhopper. Thus, a small company with a production capacity of 6.10^{17} spores/year and a large company with a production capacity 10 times higher was adopted. The main operational bottlenecks were solutions identified and, from the mass flow calculations, the quantity and nominal capacity of the proposed equipment were established, detailing this equipment whenever possible. The form of sterilization of the substrates was defined, through continuous operation with the injection of saturated steam, and subsequent cooling, taking place in a rotating drum. Submerged cultivation for inoculum production in stirred bioreactors was established. The mixing and inoculation of the biomass was configured to take place continuously in a rotating drum. Solid state cultivation for the production of spores was proposed in packed-bed bioreactors, installing a perforated helicoid inside to assist in loading, unloading and structuring of biomass during cultivation, in addition to providing air to the system. The extraction of spores was proposed in a rotating drum coupled to two cyclones for capturing the spores and drying, in another set of cyclones. Finally, the oily formulation developed was obtained in a mixer. For the small company, 12 packed bed bioreactors of 4 m^3 are needed, while for the large company 36 bioreactors of 13.33 m^3 are used. The impact of rice reuse was evaluated by observing a 44.3% reduction of rice to be purchased annually with a single reuse. The economic feasibility of using the modifications was evaluated, taking as a parameter the Capital Expenditure, where the downstream steps correspond to 58% of direct costs.

Keywords: *Metarhizium anisopliae*. Bioreactor. Process flowchart. Industrial production. Material balance. Economic viability.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Biorreator, condições de cultivo e produção máxima de conídios de *M. anisopliae* em CES. 21

Tabela 4.1 – Balanço material global da BPP. 24

Tabela 4.2 – Tempo operacional da BPP. 27

Tabela 5.1 – Balanço material global da nova proposição para BPPA. 38

Tabela 5.2 – Parâmetros de umidade adotados no balanço material. 41

Tabela 5.3 – Equipamentos na etapa de estoque. 45

Tabela 5.4 – Equipamentos da etapa de preparação do substrato. 48

Tabela 5.5 – Equipamentos da etapa de produção de inóculo. 51

Tabela 5.6 – Equipamentos principais da etapa de incubação. 53

Tabela 5.7 – Equipamentos principais da etapa de extração e secagem 54

Tabela 5.8 – Equipamentos principais da etapa de extração e secagem 55

Tabela 6.1 – Balanço material global da nova proposição para BGP. 65

Tabela 6.2 – Equipamentos principais da BGP. 68

Tabela 7.1 – CAPEX da BPPA. 69

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 - Processo de colonização do fundo *M. anisopliae.* 17

Figura 3.2 - Incubação das embalagens de cultivo. 19

Figura 4.1 – Layout industrial da Oligos Biotec. 23

Figura 4.2 – Diagrama simplificado das etapas de produção da BPP. 26

Figura 5.1 – Diagrama simplificado das etapas de produção da BPPA. 33

Figura 5.2 – Diagrama simplificado da etapa de produção de inóculo da BPPA..... 34

Figura 5.3 – Layout industrial da BPPA. 43

Figura 5.4 – Fluxograma geral de processo da BPPA. 43

Figura 5.5 – Fluxograma de processo da etapa de estocagem dos substratos da BPPA. 45

Figura 5.6 – Fluxograma de processo da etapa de preparo dos substratos da BPPA. 47

Figura 5.7 – Interior do esterilizador, inoculador e misturador. 48

Figura 5.8 – Fluxograma de processo da etapa de produção de inóculo da BPPA. 50

Figura 5.9 – Fluxograma de processo da etapa de incubação e pré-secagem da BPPA..... 52

Figura 5.10 – Fluxograma de processo da etapa de extração e secagem da BPPA. 54

Figura 5.11 – Fluxograma de processo da etapa de formulação da BPPA. 55

Figura 7.1 – Breakdown CAPEX por etapas do processo da BPPA. 73

LISTA DE ABREVIATURAS

CES	Cultivo em estado sólido
CSm	Cultivo submerso
BPP	Biofábrica de pequeno porte
BPPA	Biofábrica de pequeno porte preposição atual
BGP	Biofábrica de grande porte
BDA	Meio Agar Batata Dextrose
CAPEX	Capital Expenditure
OPEX	Operational Expenditure
kgss	kg de substrato seco
gss	g de substrato seco
t	toneladas
kgas	kg de arroz seco
tas	tonelada de arroz seco
tbs	tonelada de bagaço de cana seco
trs	tonelada de resíduo seco
tss	tonelada de substrato seco
tes	tonelada de esporos seco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 12

2 OBJETIVOS 14

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA 15

3.1 Mercado dos agentes de controle biológico 15

3.2 Bioinseticidas 15

3.3 *Metarhizium anisopliae*: descrição e aplicações do fungo entomopatogênico 16

3.4 Produção industrial 18

3.5 Produção de esporos em biorreatores 19

3.7 Avaliação econômica 22

4 PROCESSO TRADICIONAL DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ESPOROS DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE* 23

4.1 Fluxograma de processo e descrição das etapas 25

4.2 Discussão sobre a produção tradicional de esporos na BPP 28

5 PROCESSO DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ESPOROS DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*: PROPOSIÇÃO ATUAL 31

5.1 Balanço material global 31

5.2 Fluxograma de processo e descrição das etapas 42

5.2.1 ESTOQUE 44

5.2.2 PREPARO DOS SUBSTRATOS 45

5.2.3 PRODUÇÃO DE INÓCULO 48

5.2.4 INCUBAÇÃO E PRÉ-SECAGEM 51

5.2.5 EXTRAÇÃO E SECAGEM 53

5.2.6 FORMULAÇÃO 54

5.3 Discussão sobre a proposição atual 56

5.4 Reuso do substrato 60

6 PROCESSO DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ESPOROS DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*: PROPOSIÇÃO ATUAL EXPANDIDA 63

7 AVALIAÇÃO ECONÔMICA 69

8 CONCLUSÃO 75

9 TRABALHOS FUTUROS 77

REFERÊNCIAS 78

1 INTRODUÇÃO

A utilização e o desenvolvimento de metodologias para produção de agentes de controle biológico têm aumentado expressivamente. Visando a produção de alimentos com alta segurança alimentar e de maior qualidade, bem como a diminuição de danos aos ecossistemas e uma maior segurança aos seres humanos. Além das diversas vantagens quando comparado ao controle químico (BLOUCH et al., 2020; FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020; LIMEIRA; RAFIKOV, 2010).

Fungos entomopatogênicos (FE) abrangem 10% do mercado global de biodefensivos microbiológicos. Na America Latina, os FE correspondem a 60% do mercado microbiano onde *Metarhizium anisopliae* é o mais utilizado, seguido por *Beauveria bassiana*, que juntos detêm 65% desta fatia de mercado (NISHI; SATO, 2017). Eficaz contra mais de 200 espécies de pragas o fungo *M. anisopliae*, no Brasil, vem sendo utilizado no controle de alguns insetos presentes em lavouras e pastagens de diversas regiões (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020; KRUGER et al., 2014; NISHI; SATO, 2017).

Ainda que este agente seja de grande importância, a produção industrial é desprovida de tecnologia sofisticada e de controles efetivos, o que torna o processo vulnerável a contaminações e pouco produtivo (MENDEZ-GONZALEZ; LOERA; FAVELA-TORRES, 2018). O fungo ainda é cultivado em arroz no ambiente industrial, por cultivo em estado sólido (CES), embora haja estudos promissores sobre a elaboração de mistura com resíduos sólidos agrícolas (DORTA; ARCAS, 1998; KRUGER et al., 2014; PANDEY, 2003; SENE et al., 2010). O processo de cultivo do fungo é trabalhoso, necessitando de esterilização do substrato, inoculação, incubação e extração dos esporos, etapas realizadas separadamente e de forma manual, requerendo alto tempo de preparo dos insumos e mão de obra extensiva (MENDEZ-GONZALEZ; LOERA; FAVELA-TORRES, 2018; SANTA et al., 2005).

Ainda que tecnologias aprimoradas não sejam de extrema necessidade, tendo em vista a simplicidade operacional, há uma grande dificuldade no monitoramento e controle de variáveis importantes do processo, tornando limitante a aplicação de forma mais ampla e direta, principalmente pelos custos elevados e as contaminações inerentes ao processo semi-artesanal, demandando o desenvolvimento de modificações que permitam a solução dos gargalos industriais e sua automação (FARINAS et al., 2014).

Como alternativa para melhoria do processo, estudos visam a utilização de biorreatores para CES para a produção em larga escala (CUNHA et al., 2019, 2020). No entanto, a aplicação

definitiva destes aparatos industrialmente carece de soluções dos problemas de transferência de calor e massa, que limitam a ampliação de escala dos biorreatores (CASCIATORI et al., 2016).

Na literatura existem poucos estudos que estimam os custos da produção industrial dos esporos de *M. anisopliae*, principalmente quanto a aplicação de biorreatores. Avaliar a integração das etapas do processo e a viabilidade econômica mesmo ao se proceder às modificações tecnológicas e compará-las com as do processo semi-artesanal das biofábricas atuais torna-se um estudo interessante para indicar a pertinência de tais modificações.

Nesse contexto, esta dissertação propõe elaborar um processo industrial de produção dos esporos com duas capacidades distintas. Apresentar soluções para os gargalos industriais, assumindo que as barreiras técnicas à produção dos esporos em biorreator de leito empacotado foram resolvidas. Dimensionar os principais equipamentos, em termos de balanço material do processo, e avaliar a viabilidade econômica para aplicação.

Para esse fim, os capítulos desta dissertação foram organizados da seguinte maneira: o Capítulo 2 identifica os objetivos do trabalho; o Capítulo 3 apresenta a revisão bibliográfica englobando o mercado de bioinseticidas, características do *M. anisopliae*, bem como sua produção semi-artesanal e a aplicação de biorreatores; o Capítulo 4 é responsável por apresentar, de forma mais detalhada, o processo produtivo semi-artesanal adotado atualmente pelas biofábricas brasileiras; o Capítulo 5, por sua vez, apresenta o balanço material global elaborado para a produção industrial modificada, assim como a descrição do fluxograma de processo resultante; o Capítulo 6 traz a expansão do processo produtivo desta produção modificada, observando-se as necessidades desta ampliação; o Capítulo 7 traz a avaliação econômica para viabilidade de implementação das modificações; por fim, os Capítulo 8 e 9 expõem as conclusões e sugestões para trabalhos futuros, respectivamente.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral a estruturação e o detalhamento de um processo de produção de esporos do fungo *M. anisopliae* por cultivo em estado sólido em biorreator de leito empacotado, bem como a elaboração do balanço material das principais correntes envolvidas.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- ✓ Discutir e propor soluções para os gargalos industriais, inerentes a modificação desse processo em relação ao tradicional, encontrados nas operações upstream e downstream;
- ✓ Elaborar um fluxograma de processo para produção industrial modificada;
- ✓ Dimensionar, a partir de um balanço material, os principais equipamentos envolvidos;
- ✓ Avaliar a viabilidade econômica para implementação da nova proposta industrial.

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 Mercado dos agentes de controle biológico

A produção agrícola deve crescer significativamente nos próximos anos para atender às necessidades do aumento populacional (OMKAR; KUMAR, 2016). Para aumentar enfaticamente a disponibilidade de alimentos deve-se reduzir o dano causado pelas pragas de insetos e melhorar o manejo das pragas, uma vez que, apesar de medidas de proteção de culturas, aproximadamente 10% da produção agrícola são afetadas globalmente por pragas antes da colheita (OERKE, 2006).

Visto as novas tendências globais, como a preferência por produtos naturais, sem químicos e mais seguros, cuja a produção agrida menos o ambiente e tenha menor pegada ecológica, o incentivo pelo desenvolvimento de produtos de base biológica para a agricultura tem movimentado iniciativas de pequenas, médias e grandes empresas (BRASIL FOOD TRENDS, 2021; FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020). Além de reduzir os custos, quando comparado aos químicos, estimado entre 20 e 70%, os biológicos contribuem para a manutenção da diversidade, com alta seletividade e baixa toxicidade para o ser humano (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020).

A Associação Brasileira das Empresas de Controle Biológico (2020) estima um crescimento anual previsto entre 15 e 20% no mercado de bioinseticidas para os próximos anos, justificado pelo crescimento de 400%, de 2008 a 2018, dos produtos biológicos registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) para uso na agricultura brasileira (MITTMANN, 2017). No entanto, este crescimento pode ser ainda mais significativo, tendo a produção de produtos biológicos aumentado mais de 70% em 2018 no Brasil, resultado mais expressivo da história do setor e supera o percentual apresentado pelo mercado internacional que totaliza crescimento de 17% no mesmo período.

3.2 Bioinseticidas

Bioinseticidas, também chamados de entomopatógenos, constituem-se de microrganismos causadores de doenças em pragas e insetos. Doença causada, quase sempre, pela presença de toxinas específicas com ação interna no inseto alvo (ARAÚJO et al., 2019).

A alta eficácia inseticida em menor quantidade, o baixo teor de resíduos, a baixa toxicidade aos seres humanos e a boa compatibilidade com o meio ambiente vem estimulando o uso de bioinseticidas como alternativa aos pesticidas químicos e sintéticos, principalmente do ponto de vista econômico e ambiental (ARAÚJO et al., 2019; DAMALAS; KOUTROUBAS, 2018; SAEED et al., 2020). Omkar; Kumar, (2016) compararam o desempenho dos inseticidas e bioinseticidas, no qual os inseticidas químicos apresentaram relação custo/benefício 10 vezes inferior, altos riscos de as pragas desenvolverem resistência, baixa especificidade, numerosos efeitos secundários nocivos, além do custo para desenvolvimento de nova formulação 75 vezes maior.

No Brasil, especificamente, os biodefensivos estão divididos entre macrobiológicos (insetos parasitoides e ácaros predadores) e microbiológicos (fungos, bactérias, vírus e nematoides), tendo estes participação no mercado, em área e valor, de 80 a 89% (ARAÚJO et al, 2019; ABCBIO, 2018). Dentre as mais de 700 espécies de fungos que são entomopatogênicos, *Beauveria bassiana, Metarhizium spp., Metarhizium anisopliae, Isaria fumosorosea, Lecanicillium spp e Trichoderma harzianum* apresentam grande destaque como biopesticidas na agricultura, sendo *M. anisopliae* o mais utilizado para o controle biológico e eficaz contra uma grande variedade de espécies de insetos (ASHRAF et al., 2017; SAEED et al., 2020).

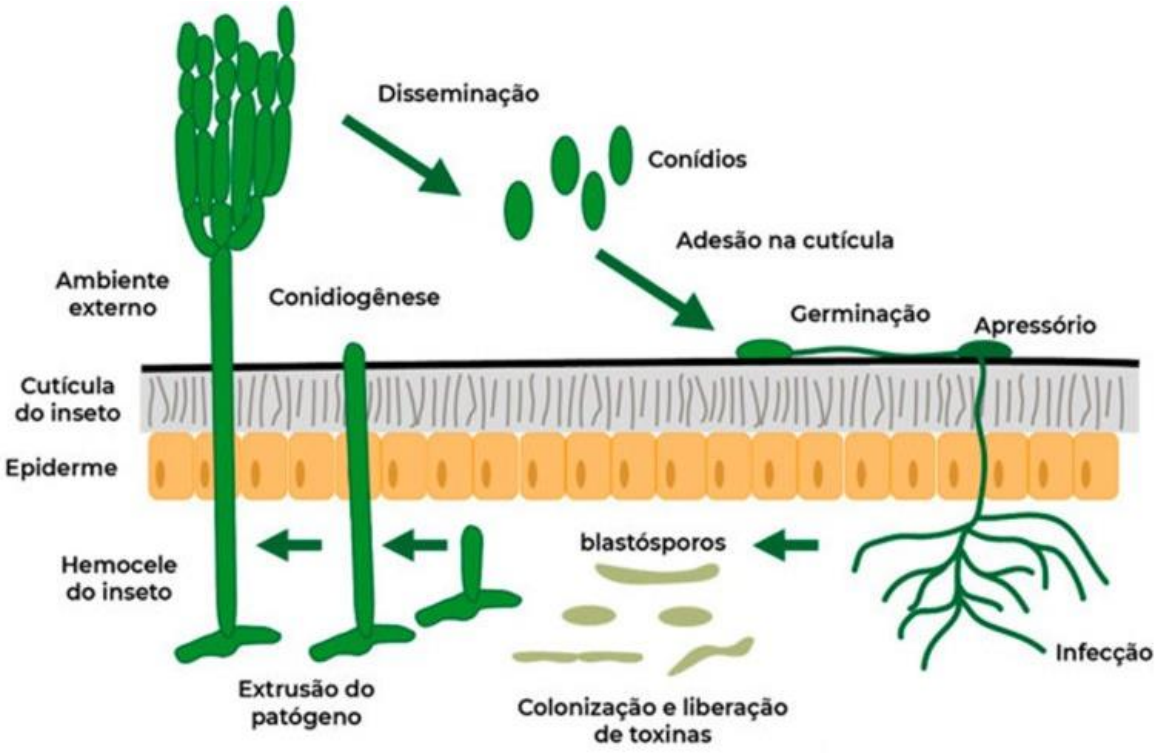
3.3 *Metarhizium anisopliae*: descrição e aplicações do fungo entomopatogênico

Conhecido por causar a “doença da muscardina verde”, o gênero *Metarhizium* foi descrito pela primeira vez por Metchnikoff (1879), ocorrendo em um besouro-do-trigo, *Anisoplia austríaca*, na Rússia (MONGKOLSAMRIT et al., 2020). O gênero possui três espécies sendo: *M. flavoviride*, *M. álbum* e *M. anisopliae*, o último subdividido em duas variedades, minor e majus, baseando-se no tamanho dos esporos (ARRUDA, 2005). Classificado como acaricida e entomopatogênico, o fungo *M. anisopliae* é formado por micélio transparente (hialino) e dividido em células (septado), estruturadas por hifas simples ou ramificadas de onde são originados os conídios, normalmente uninucleados, cilíndricos e de dimensões variadas (HU; ST. LEGER, 2002; WANG; ST. LEGER; WANG, 2016).

Considerados como bioinseticidas de contato, pois invadem o hospedeiro penetrando através da cutícula do inseto, faz-se necessária a correlação de diversos fatores mecânicos e

bioquímicos para que a colonização ocorra, como mostrado na Figura 3.1, a adesão das estruturas fúngicas na superfície do hospedeiro, germinação, penetração, colonização, reprodução e a esporulação (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020; PEDRINI, 2018). Para a ruptura da cutícula do hospedeiro, o fungo *M. anisopliae* secreta enzimas: proteases, lipases e quitinases, as quais degradam os principais compostos presentes na superfície do inseto, possibilitando a penetração das hifas (SCHRANK; VAINSTEIN, 2010).

Figura 3.1 -Processo de colonização do fundo *M. anisopliae*.



Fonte: (SILVA, 2012).

A eficiência de *M. anisopliae* para controle de pragas já foi comprovada por diversas pesquisas, as quais incluem mais de 200 hospedeiros como: o carrapato de gado *Rhipicephalus microplu* e o carrapato *Boophilus microplus*, contra as mosca-dos-estábulos (*Stomoxys calcitrans*), para o controle do inseto *Alphitobius diaperinus*, principal praga da avicultura, contra piolhos de aves (*Mallophaga*), contra lavas do mosquito tigre asiático (*Aedes albopictus*) (BENELLI et al., 2018; ARRUDA, 2005; WASSERMANN et al., 2016; WEBSTER et al., 2017).

Um dos programas de controle biológico mais eficiente do Brasil, que está entre os melhores do mundo, é conduzido para controlar as principais pragas da cana-de-açúcar, sendo a *Mahanarva fimbriolata* controlada com os esporos de *M. anisopliae*, cobrindo uma área de 3 milhões de hectares (SANTOS et al., 2017). Tal aplicação tende a aumentar em virtude da proibição da queima da palha da cana-de-açúcar, estabelecido pelo decreto de lei 42.056 (06/08/1997), com previsão de proibição total em 2021, favorecendo o emprego e desenvolvimento do controle biológico (LOUREIRO et al., 2012).

Para o cultivo de *M. anisopliae* se faz necessário o alcance da temperatura ótima que está entre 25 e 28 ºC, uma vez que temperaturas tanto superiores quanto inferiores afetam diretamente a esporulação e o crescimento fúngico, assim como a umidade relativa que deve estar na faixa de 70 a 100% para garantia de alta virulência (DORTA; ARCAS, 1998; KEYSER et al., 2014; LI; FENG, 2009). Para ser eficiente quando aplicado no campo, a introdução do fungo deve ser inundativa, necessitando alta concentração de esporos, exigindo uma produção intensiva (CUNHA et al., 2019).

3.4 Produção industrial

A produção industrial do fungo *M. anisopliae* ocorre por cultivo em estado sólido (CES), que consiste no crescimento do microrganismo sobre e entre uma matriz porosa, em um meio não solúvel adequadamente umedecido. A quantidade de água deve satisfazer as necessidades do crescimento microbiano, sem exceder a capacidade de retenção de água do meio poroso (OZMIHCI, 2017; PEDRINI, 2018).

Utilizando arroz como substrato, estes são dispostos em embalagens plásticas com capacidade entre 300 e 600 gramas (peso seco), umidificados e homogeneizados manualmente. As embalagens são fechadas e seguem para autoclave onde realiza-se a esterilização a 121 ºC por 30 min. Após resfriamento, seguem para câmara de fluxo onde realiza-se a inoculação das embalagens, uma a uma, com a suspensão de esporos, finalizando com a homogeneização do meio de cultivo. A incubação ocorre em salas climatizadas a 28 ºC e as embalagens ficam dispostas em prateleiras por cerca de 7 a 15 dias, como apresentado na Figura 3.2. Após a colonização, os grãos são removidos da embalagem e secos em ambiente refrigerado a 18 ºC, seguindo para a extração dos esporos através de peneiras vibratórias ou para o empacotamento

em embalagens de maior capacidade utilizando grandes liquidificadores, o qual tritura o substrato junto aos esporos (MASCARIN; QUINTELA, 2013).

Figura 3.2 - Incubação das embalagens de cultivo.

Fonte: (MASCARIN; QUINTELA, 2013).

Desprovido de tecnologia sofisticada e controles efetivos, tornando o processo propício a contaminações exógenas e sujeito a um baixo rendimento, se faz necessário desenvolver técnicas sofisticadas para maior produtividade e redução de mão de obra para a produção de conídios, possível através do uso de biorreatores (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013).

3.5 Produção de esporos em biorreatores

Equipamento onde realiza-se a transformação da matéria-prima no produto desejado, utilizando agentes biológicos como células, enzimas ou microrganismos. Os biorreatores para

CES podem ser classificados em quatro grupos, com base no fornecimento de oxigênio e a forma de agitação. Os biorreatores pertencentes ao primeiro grupo possuem o leito estático ou agitado com pouca frequência durante o cultivo e não recebem ventilação vigorosa. No segundo grupo fazem parte os biorreatores que recebem ventilação vigorosa, porém seu leito permanece estático ou com pouca movimentação. Os biorreatores do terceiro grupo apresentam ventilação não vigorosa com agitação contínua ou frequente durante todo o processo de cultivo. E por fim o quarto grupo abrange os biorreatores que recebem forte ventilação e agitação frequente durante o cultivo (MITCHELL et al., 2011).

Para a produção de conídios de *M. anisopliae* o biorreator de leito empacotado, pertencente ao segundo grupo de classificação, é o mais comum, porém a difícil remoção do calor metabólico, a dificuldade no controle de variáveis e a compactação do leito são problemas a serem superados, tendo como alternativa o uso de biorreatores de bandeja, igualmente de design simples, baixo custo e fácil operação (ARORA et al., 2017; CUNHA et al., 2019). Os biorreatores de tambor rotativo são mais versáteis, onde destaca-se a possibilidade de que todas as etapas sejam desencadeadas no interior do biorreator. No entanto, poucos estudos estão disponíveis na literatura para produção de esporos, uma vez que, requer o estudo particular do efeito das rotações pois o cisalhamento excessivo pode promover o rompimento de estruturas de crescimento do microrganismo. (TADA; CUNHA; THOMÉO, 2018).

Estudos relatam a produção de conídios dos fungos *M. anisopliae* em diferentes biorreatores para CES, como apresentado na Tabela 3.1. Van Breukelen et al. (2011) e Arzumanov et al. (2005) empregaram o leito empacotado, com diferentes tipos de substratos e tempos de cultivo, no entanto obtiveram resultados semelhantes na produção de esporos, demonstrando a possibilidade do uso desta configuração de biorreator para esta finalidade. Van Breukelen et al. (2011) demonstra problemas com a ampliação de escala nesta configuração, pois obteve queda na produção de esporos do fungo em virtude das elevações das temperaturas axial e radial, tendo como possível causa para tal fenômeno a compactação e encolhimento do leito.

A baixa disponibilidade de equipamentos para CES no mercado afeta diretamente o emprego dessa técnica de cultivo nas indústrias, pois mesmo com pesquisas e novas tecnologias, ainda falta desenvolver modelos de operação unitária para implementação dos equipamentos que operam de maneira automatizada sem o uso de mão de obra extensiva.

Tabela 3.1 – Biorreator, condições de cultivo e produção máxima de conídios de *M. anisopliae* em CES.

Biorreator	Condições de Cultivo			Produção máxima de Conídios (conídios/kg de substrato seco)	Referências
	Substrato	Tempo de cultivo (dias)	Temperatura (ºC)		
Bandeja	Arroz tipo1	13	28	$9{,}84.10^{12}$[a]	DALLASTRA; RAMALHO; GRAJALES. (2018)
	Arroz tipo1	10	28	$3{,}57.10^{12}$[a]	CUNHA et al. (2019)
Leito empacotado	Farelo de arroz	14	28	$8{,}68.10^{12}$[b]	DORTA; ERTOLA; ARCAS (1996)
	Farelo de arroz	14	27	$9{,}25.10^{12}$[a]	DORTA; ARCAS (1998)
	Arroz e bagaço de cana	7	25	$6{,}20.10^{12}$	ARZUMANOV et al. (2005)
	Grão de trigo, farelo de trigo e de arroz	14	25	$5{,}60.10^{12}$	VAN BREUKELEN et al. (2011)
	Arroz	7, 9 e 10	27	$1{,}50.10^{12}$	MENDEZ-GONZALEZ; LOERA; FAVELA-TORRES (2018)
	Arroz e bagaço de cana	10	28	$3{,}47.10^{12}$	CUNHA et al. (2020)
Tambor rotativo	Cânhamo impregnado	14	25	$8{,}00.10^{12}$	VAN BREUKELEN et al. (2011)

[a] Calculado considerando adição de 5 mL/g de substrato seco (gss) de solução Tween 80 conforme Cunha et al. (2019).
[b] Calculado considerando peso médio de $1{,}26.10^{-11}$ g/esporo conforme Dorta, Ertola e Arcas (2016).

Fonte: (Autora, 2021)

3.7 Avaliação econômica

O interesse comercial no desenvolvimento de produtos para controle microbiano de insetos teve início em torno de 1950, quando se constatou a possibilidade de manipular microrganismos para causar doenças em insetos-praga sem provocar danos às espécies benéficas (LOPES, 2016). O alto número de novos produtos registrados no MAPA nos últimos anos evidencia o crescente interesse das indústrias no controlo biológico. Porém, poucos estudos na literatura realizam a avaliação econômica de bioprocessos, tornando-se mais raro a mensuração dos custos de produção do fungo *M. anisopliae*, bem como a viabilidade econômica dos processos empregados.

Quintela; Yokoyama; Roberts (1994) realizaram a comparação dos custos de produção em arroz e quirera do fungo *M. anisopliae* em embalagens plásticas levando em consideração custos fixos (construção do laboratório e aquisição de equipamentos) e custos variáveis (salário de funcionários e material de consumo). Observou-se redução em quatro vezes no custo de produção substituindo arroz por quirera, além da produção de conídios 34% superior.

Utilizando o software *Superpro Designer 10*, pesquisadores realizaram a análise de custos da produção em escala piloto de *M. anisopliae* em biorreator de bandeja (DALLASTRA; RAMALHO; GRAJALES, 2018) utilizando uma mistura constituída por quirera de arroz, farelo de trigo e farelo de soja (1:1:1). Levando em consideração todas as etapas de processo e tendo os custos fixos (equipamentos, funcionários e aluguel do imóvel) e custos variáveis (despesas com matéria-prima, insumos, água e energia) pode-se determinar um custo mensal de R$ 11.985,68 e o valor a ser cobrado por uma embalagem de 500g do produto que seria de R$ 500,00.

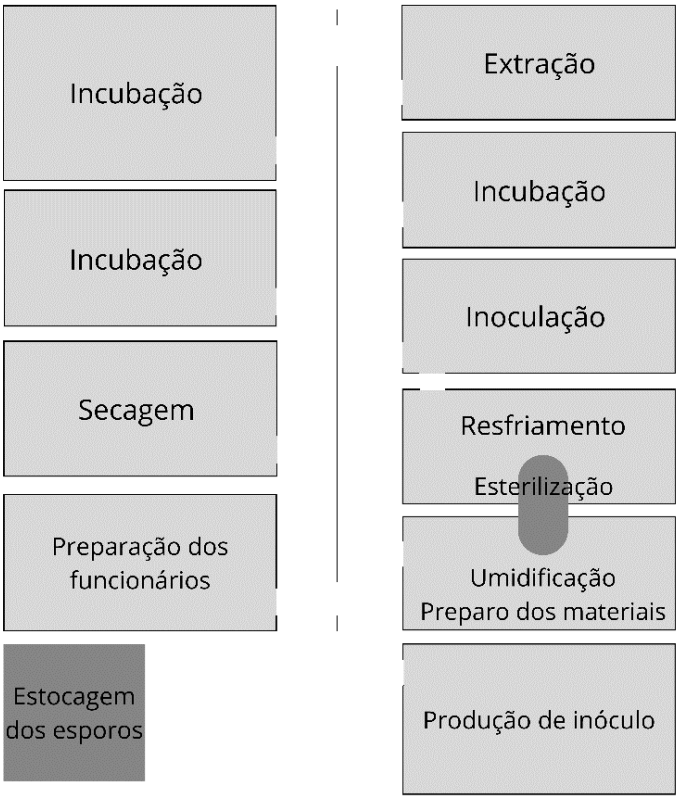
Indicadores econômicos como o *Capital Expenditure* (CAPEX), que representa as despesas de capitais ou investimentos em bens de capitais, e o *Operational expenditure* (OPEX), que engloba foco as despesas e dispêndios operacionais e o investimento em manutenção de equipamentos, permitem uma análise com maior sensibilidade para constatação de que os novos serviços e soluções adotados são realmente vantajosos.

4 PROCESSO TRADICIONAL DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ESPOROS DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*

Apesar da grande importância de *M. anisopliae*, pouco se evoluiu quanto a sua produção quando comparado ao processo utilizado desde o início do programa de controle biológico, destinado ao combate da cigarrinha da cana-de-açúcar, na década de 60 (JACKSON; JARONSKI, 2009). No Brasil e no mundo, a produção de *M.anisopliae* adotada nas biofábricas se dá pelo cultivo sólido em arroz de forma semi-artesanal, possibilitado pela simplicidade e baixa necessidade de tecnologias sofisticadas para o desenvolvimento fúngico (ALVES; FARIA, 2010; SANTOS et al., 2017).

Para melhor compreender como se dá a produção deste agente em biofábricas brasileiras, acompanhou-se a rotina de trabalho da indústria de pequeno porte Oligos Biotec de São José do Rio Preto, que produz esporos de *M. anisopliae* e de *B. bassiana*, visando identificar os principais gargalos industriais. A empresa em questão, que será identificada como BPP (biofábrica de pequeno porte), adota um esquema de produção 5 em 7, ou seja, produz em cinco dias de uma semana, com uma rotina de trabalho de 8 horas e tem seu layout como apresentado na Figura 4.1.

Figura 4.1 – Layout industrial da Oligos Biotec.



Fonte: (Autora, 2021)

Diariamente são utilizados 480 kg de arroz parboilizado, alcançando-se uma produção média de $4{,}6.10^{16}$ conídios/mês. Sendo esta concentração de esporos produzida, capaz de contemplar 2% da área de aplicação anual, estimada em 3 milhões de hectares, beneficiadas atualmente pela pulverização dos esporos de *M. anisopliae*, visando o controle da cigarrinha da cana-de-açúcar (FONTES; VALADARES-INGLIS, 2020; SANTOS et al., 2017).

A Tabela 4.1 resume as principais informações do balanço material global do processo produtivo da BPP. Vale salientar que o arroz parboilizado *in natura* é recebido com umidade de 13%.

Tabela 4.1 – Balanço material global da BPP.

Tempo de operação (continua)

Descrição	Valor	Unidade
Tempo efetivo de produção	261	dias
Tempo efetivo de produção em horas	2088	horas

Arroz parboilizado

Descrição	Valor	Unidade
Arroz parboilizado inicial seco	125,28	tonelada substrato seco (tss) /ano
Arroz parboilizado inicial seco dia	0,48	tss/dia
Arroz parboilizado inicial	144,00	tonelada (t)/ano
Arroz parboilizado inicial dia	0,55	t/dia

Esporos

Descrição	Valor	Unidade
Esporos gerados na incubação	6,96	t/ano
Esporos gerados na incubação dia	0,027	t/dia

Formulação

Descrição	Valor	Unidade
Caulim	31,05	t/ano
Caulim por embalagem	0,9	kg/unidade

Tabela 4.1 – Balanço material global da BPP.

(continuação)

Embalagens	34500	unidade/ano

Fonte: (Autora, 2021)

4.1 Fluxograma de processo e descrição das etapas

O processo de produção dos esporos do fungo *M. anisopliae* na BPP é dividido conforme as etapas apresentadas na Figura 4.2. No diagrama estão retratadas as principais etapas, materiais e produtos envolvidos na cadeia de produção. Vale salientar, que o fluxograma se adequa ao processo produtivo de todas as biofábricas brasileiras, sendo elas de pequeno ou grande porte, podendo apresentar ligeiras diferenças em alguns detalhes da operação.

A primeira etapa consiste na umidificação do substrato. Para isso, o arroz parboilizado adquirido em embalagens convencionais de 5 kg é descarregado em 6 caixas plásticas com capacidade de 15 kg, adicionando-se água até cobrir o material, visando alcançar umidade próxima de 48%. O substrato permanece imerso por uma hora e posteriormente a água excedente é drenada. Se faz necessário a repetição desta operação, de amostras semelhantes a descrita, 5 vezes para umidificação do volume total de substrato utilizado diariamente.

A etapa seguinte, de acondicionamento, contempla a acomodação do arroz parboilizado úmido em embalagens plásticas de polipropileno com capacidade de 600 gss. Estas são vedadas realizando duas dobras na parte superior e grampeando as extremidades e o centro das embalagens.

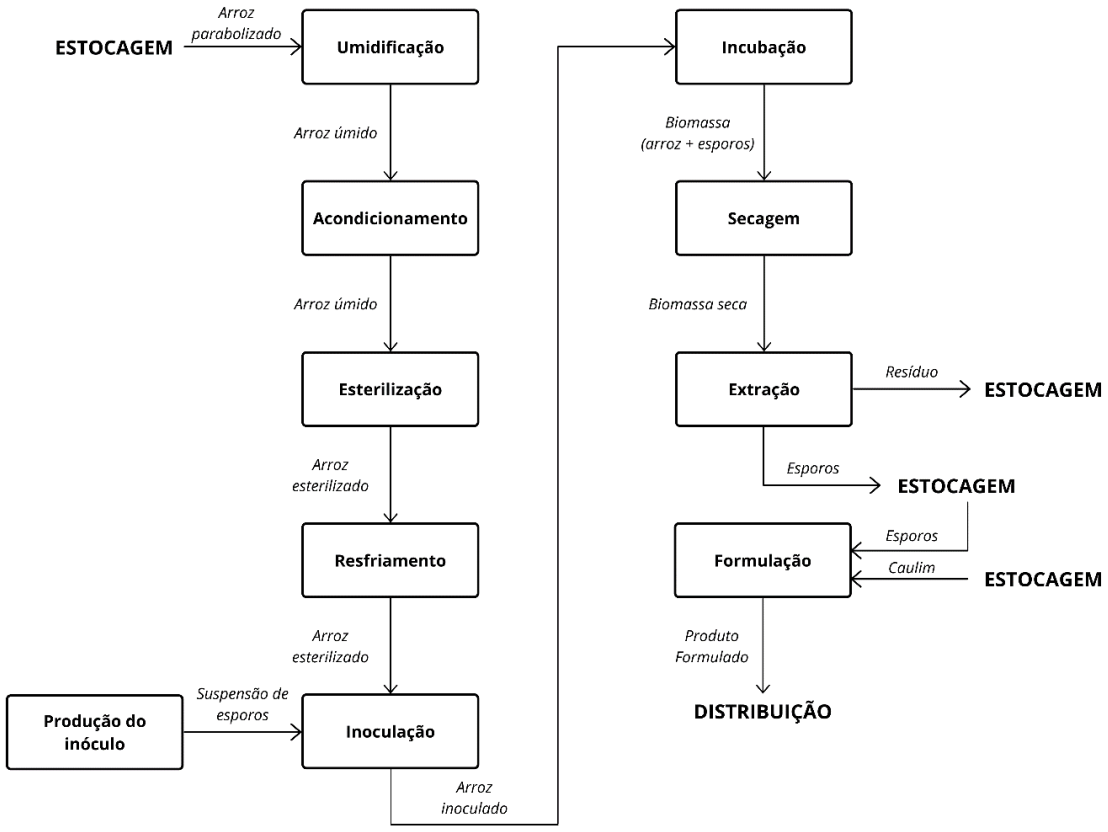
As embalagens são dispostas em um carro bandeja que adentra a autoclave para esterilização do material a 121 ºC por 30 minutos. Remove-se a pressão do equipamento e retira-se o carro bandeja, encaminhando o material para a sala de resfriamento climatizada, onde permanecem por 24 horas, até alcançar a temperatura ambiente.

Resfriado o arroz esterilizado acondicionado em embalagens plásticas segue para inoculação, sendo transportado pelos colaboradores por meio de caixas plásticas. As embalagens são individualmente abertas, no interior de uma câmara de fluxo laminar. A suspensão de esporos previamente preparada é adicionada à embalagem até alcançar 10^7

conídios/gss. Realiza-se a homogeneização da suspensão de esporos e do substrato por agitação manual. Novamente as embalagens plásticas são vedadas pela dobradura e grampeamento.

Para obtenção da suspensão de esporos matrizes são preparadas diariamente. Placas de Petri contendo a cepa fornecida pelo Instituto Biológico de São Paulo são repicadas em novas placas contendo meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA), obtendo-se o pré-inóculo. Os esporos desenvolvidos nas placas são repicados em embalagens plásticas contendo 100g de arroz parboilizado que permanecem incubados na câmara BOD por 15 dias a 28 ºC. Para obtenção da suspensão, uma solução aquosa de Tween 80 a 0,1% (p/p) é adicionada às embalagens, que são agitadas até desprendimento dos esporos. Uma alíquota desta suspensão é retirada e feita a contagem em microscópio ótico, para possível correção da concentração de esporos que será inoculada no arroz do processo principal de cultivo.

Figura 4.2 – Diagrama simplificado das etapas de produção da BPP.



Fonte: (Autora, 2021)

Inoculadas, as embalagens são encaminhadas, por meio de caixas plásticas, para as salas de cultivo climatizadas. As embalagens são dispostas em prateleiras e permanecem incubadas por 15 dias a 28 ºC. Ao final da incubação, as embalagens seguem para a etapa de secagem, onde estas são abertas em sala climatizada a 18 ºC, podendo permanecer ali de 3 a 7 dias, variando de acordo com a umidade da estação, buscando o alcance de uma umidade em torno de 6 a 8%, apesar de não haver controle desta variável.

Após a secagem, as embalagens são deslocadas pelos colaboradores com auxílio de caixas plásticas para a sala de extração. O substrato cultivado é disposto em um extrator, desenvolvido pela própria biofábrica, onde a separação do arroz cultivado e dos esporos ocorre por meio da vibração mecânica das partículas em um conjunto de peneiras, localizado no interior de um tambor.

Após a extração os esporos são coletados manualmente e acondicionados em embalagens plásticas semelhantes às de cultivo, seguindo para câmara fria, onde permanecem até que a empresa receba um pedido. O arroz residual do cultivo é recolhido por uma empresa terceirizada que dá adequado destino ao mesmo.

Por fim, tem-se a formulação do produto. Para tanto, os esporos são removidos da câmara fria e acondicionados nas embalagens de comercialização, sendo na própria embalagem realizada a mistura dos esporos com o caulim, que corresponde a 68% da formulação, que posteriormente são seladas em máquina seladora a vácuo.

Tendo em vista a descrição do processo e o tempo exigido para realização de cada operação, foi possível estabelecer a necessidade de aproximadamente 22 dias, para realização de um ciclo completo de produção, que contempla desde a umidificação do substrato até a formulação do produto comercializado, como descrito na Tabela. 4.2.

Tabela 4.2 – Tempo operacional da BPP.

(continua)

Etapa de produção	**Tempo**	**Unidade**
Umidificação	1,11	h
Acondicionamento	0,67	h
Esterilização	1,92	h
Resfriamento	24,17	h

Tabela 4.2 – Tempo operacional da BPP.

(continuação)

Inoculação	1,17	h
Incubação	360,00	h
Secagem	120,50	h
Extração	2,25	h
Formulação	0,75	h
	517,69	**h**
	21,57	**dias**

Fonte: (Autora, 2021).

4.2 Discussão sobre a produção tradicional de esporos na BPP

Em primeiro lugar, tomando como base os problemas da Oligos Biotec, observam-se os desafios enfrentados pelos colaboradores tendo como ambiente de produção uma indústria com um layout não linear. Uma vez que, além do layout não seguir a ordem do processo operacional, o prédio conta com uma parede central que divide a indústria em dois polos, tendo o colaborador a necessidade de percorrer longas distâncias, muitas vezes com o material de produção em caixas, até uma das duas portas que se encontram nas extremidades do corredor para atravessar a linha produtiva, ocasionando aumento no tempo operacional. Ademais, tem-se o cruzamento constante de material "sujo" com o material esterilizado ou cultivado, aumentando-se a possibilidade de que contaminações exógenas ocorram. Além disso, inserido nos problemas acarretados pelo layout inadequado da empresa, tem-se a necessidade de um maior tempo de resfriamento das embalagens para alcance de temperatura ambiente, uma vez que a autoclave está muito próxima da sala, tornando-a mais quente do que deveria.

Sabe-se que, para potencialização do crescimento de *M. anisopliae* por CES, faz-se necessário o controle de algumas variáveis como: temperatura, aeração e umidade. No entanto, a BPP negligencia um destes parâmetros já na primeira etapa do processo, onde não há controle da umidade alcançada pelo substrato após a umidificação. A quantidade de água em um bioprocesso está diretamente relacionada à diluição de nutrientes, enzimas, gases e à absorção destes pelos agentes microbianos. Quantidades limitadas de água podem comprometer o metabolismo microbiano, de modo que se faz necessário o controle desta variável (FARINAS

et al., 2014). Portanto, algumas medidas simples poderiam aumentar o controle sobre esta variável de processo, como a determinação da umidade inicial do arroz, de modo a se estimar o volume de água requerido e a umidificação de porções menores de arroz, para uma melhor absorção de água pelo sólido.

Outro fator deletério, dá-se após inoculação, pois as embalagens são dobradas na borda livre, não sendo observado um *headspace* suficiente, dificultando a aeração adequada. Atentando-se que no processo de CES, a aeração tem função de manter as condições aeróbicas, remover o CO_2, regular a temperatura do substrato, bem como o nível de umidade do meio., a limitação do controle desta variável pode causar impactos negativos na síntese de esporos (FARINAS et al., 2014).

A sobrecarga das autoclaves pela inserção de muitas embalagens por ciclo, frequentemente ocasiona a esterilização inadequada das embalagens que se localizam principalmente no centro do equipamento e possibilitam a contaminação do substrato quando incubado. A implementação de uma autoclave com desenho especial para a necessidade produtiva da BPP, bem como a operação de mais autoclaves por dia ou a modelagem para obtenção dos perfis espaciais de temperatura no equipamento, visando identificar se em algum ponto não se atinge a temperatura necessária para eliminação dos microrganismos termoresistentes, podem solucionar este problema.

A etapa de secagem também necessita atenção, tendo em vista que não ocorre controle e repetibilidade, além de acarretar grandes acréscimos no tempo operacional. A secagem adequada dos conídios permite a redução da sua atividade metabólica, o que minimiza a perda das reservas de armazenamento e a produção de metabólitos tóxicos. Aumentam a sua tolerância ao estresse térmico e consequentemente a viabilidade quando aplicado, portanto, não deve ser negligenciada (GUIJARRO et al., 2006; HONG; JENKINS; ELLIS, 2000). Desta forma, o emprego de estufas de convecção forçada para secagem deste substrato permitiria a otimização do processo produtivo, além de ser um equipamento simples e barato.

Já na extração, o equipamento empregado pela BPP, que muito se aproxima a peneira vibratória apenas isolada por um tambor, visando evitar a perda de esporos para o ambiente. Esta etapa ocasiona uma perda média mensal de 10% da massa de conídios produzida, constatada pela Oligos, uma vez que a coleta é realizada de forma manual pelos colaboradores e os esporos suspendem facilmente no ar e se perdem. A solução deste problema requer alterações no equipamento, como arraste dos esporos por ar e coleta em ciclones.

Vale salientar, que alguns destes problemas são específicos da Oligos Biotec e não de todas as biofábricas, sendo estes pontos de atenção neste estudo de caso. Tomando uma ótica mais expandida e contemplando todas as biofábricas brasileiras, nota-se que se deve atentar a umidificação dos substratos, adotando-se um maior número de bandejas e alocando uma massa menor em cada recipiente, possibilitando a umidificação de maneira mais uniforme, no entanto, isto requer uma maior área industrial.

Além disso, grande parte das biofábricas relatam problemas recorrentes com contaminações ocasionadas principalmente pelo carregamento excessivo das autoclaves, não esterilizando os substratos de maneira adequada, visando a redução do tempo operacional e os custos com a operação sucessiva deste equipamento. A insalubridade recorrente a grande perda de esporos para o ar é recorrente, ocasionado pela operação desta etapa utilizando equipamentos que não se adequam as características do produto.

E como consequência tem-se o elevado tempo exigido para realização de operações simples, ocasionadas principalmente: pelo preparo manual das embalagens, demandando um tempo elevado para que os colaboradores encham e fechem as embalagens, assim como pela inoculação manual, além de depender diretamente das habilidades do operador para distribuição homogênea dos esporos; pelo controle deficiente da temperatura nas salas de cultivo climatizadas, assim como o controle deficiente da umidade das salas de secagem, ocasionando a obtenção de esporos úmidos; e pelo resfriamento realizado por meio da convecção natural sem nenhuma intervenção.

5 PROCESSO DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ESPOROS DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*: PROPOSIÇÃO ATUAL

5.1 Balanço material global

No diagrama, representado na Figura 5.1, estão retratadas as principais etapas, materiais e produtos desenvolvidos na cadeia de produção de uma biofábrica de pequeno porte com os aprimoramentos tecnológicos propostos para a produção de esporos de *M. anisopliae*, que será chamada daqui por diante de BPPA.

A atual proposição visa tornar o processo de produção de esporos de *M. anisopliae* dotada de melhor controle das variáveis de processo e menos sujeita a contaminação exógena. Em relação ao processo tradicional, propõe-se modificar o método de obtenção do inóculo, que passará a ser por cultivo submerso (CSm), representado na Figura 5.2, a forma de esterilização e secagem dos materiais, o cultivo em estado sólido, que passará a ser realizado em biorreatores de leito empacotado, e a extração dos esporos, que será realizada em tambor rotativo, com coleta em ciclones, bem como a formulação do produto final que será a base de óleo vegetal.

A composição do meio de cultivo é outra modificação proposta, a mistura de arroz tipo 1 e do suporte, bagaço de cana de açúcar, visa proporcionar melhor estrutura física e consequentemente uma maior eficiência de produção. A composição do arroz tipo 1, apresentada por Walter; Marchezan; Avila, (2008) é rica em amido e proteína, favorecendo o crescimento do fungo, enquanto o bagaço de cana dá estruturação ao leito, reduzindo assim a compactação, auxiliando na melhor aeração e evitando elevação da temperatura (BRANDÃO, 2006).

O balanço material tem início com o cálculo do tempo efetivo de produção. Levando-se em consideração que um ano tem 365 dias, sendo destes aproximadamente 15% correspondente aos domingos e que a BPPA operará de segunda-feira a sábado, 8 horas/dia, obtém-se um tempo de produção efetivo de 310 dias (Equação 5.1) ou 2.480 horas (Equação 5.2).

$$t_{efetivoD} = t_{ano} \cdot \left(\frac{dmg}{100}\right) \tag{5.1}$$

$$t_{efetivoH} = t_{efetivoD} \cdot 8 \tag{5.2}$$

Sendo:

$t_{efetivoD}$ - tempo efetivo de produção, em dias

t_{ano} - tempo no ano, em dias

dmg – domingos no ano, em %

$t_{efetivoH}$ - tempo efetivo de produção, em horas

O balanço de material desta proposição é baseado no cenário da BPP que abrange com sua produção anual de *M. anisopliae*, capacidade de aplicação dos esporos em 2% da área atualmente beneficiada pelo controle biológico da cigarrinha da cana-de-açúcar, estimada em 3 milhões de hectares por ano (SANTOS et al., 2017) totalizando 6000 hectares/ano (Equação 5.3).

$$A_{produção} = A_{total} \cdot \left(\frac{P_{BPP}}{100}\right) \quad (5.3)$$

Sendo:

$A_{produção}$ – área beneficiada pela produção da BPPA, em hectares/ano

$Atotal$ – área total beneficiada pelo controle biológico, em hectares/ano

P_{BPP} – volume de aplicação da BPP, em %

Tendo em vista, a necessidade de aplicação de 10^{13} esporos/hectare para letalidade de 85-90% das pragas (DALZOTO; UHRY, 2009), foi possível estabelecer a necessidade produtiva da BPPA, que é de 6.10^{17} esporos/ano (Equação 5.4), correspondente a 7,56 t/ano (Equação 5.5), uma vez que um esporo tem peso médio de $1{,}26.\ 10^{-11}$ g (DORTA; ERTOLA; ARCAS, 1996).

$$ES_{UFC} = A_{produção} \cdot ES_{letalidade} \quad (5.4)$$

$$ES_{Kg} = ES_{UFC} \cdot PES_{médio} \quad (5.5)$$

Sendo:

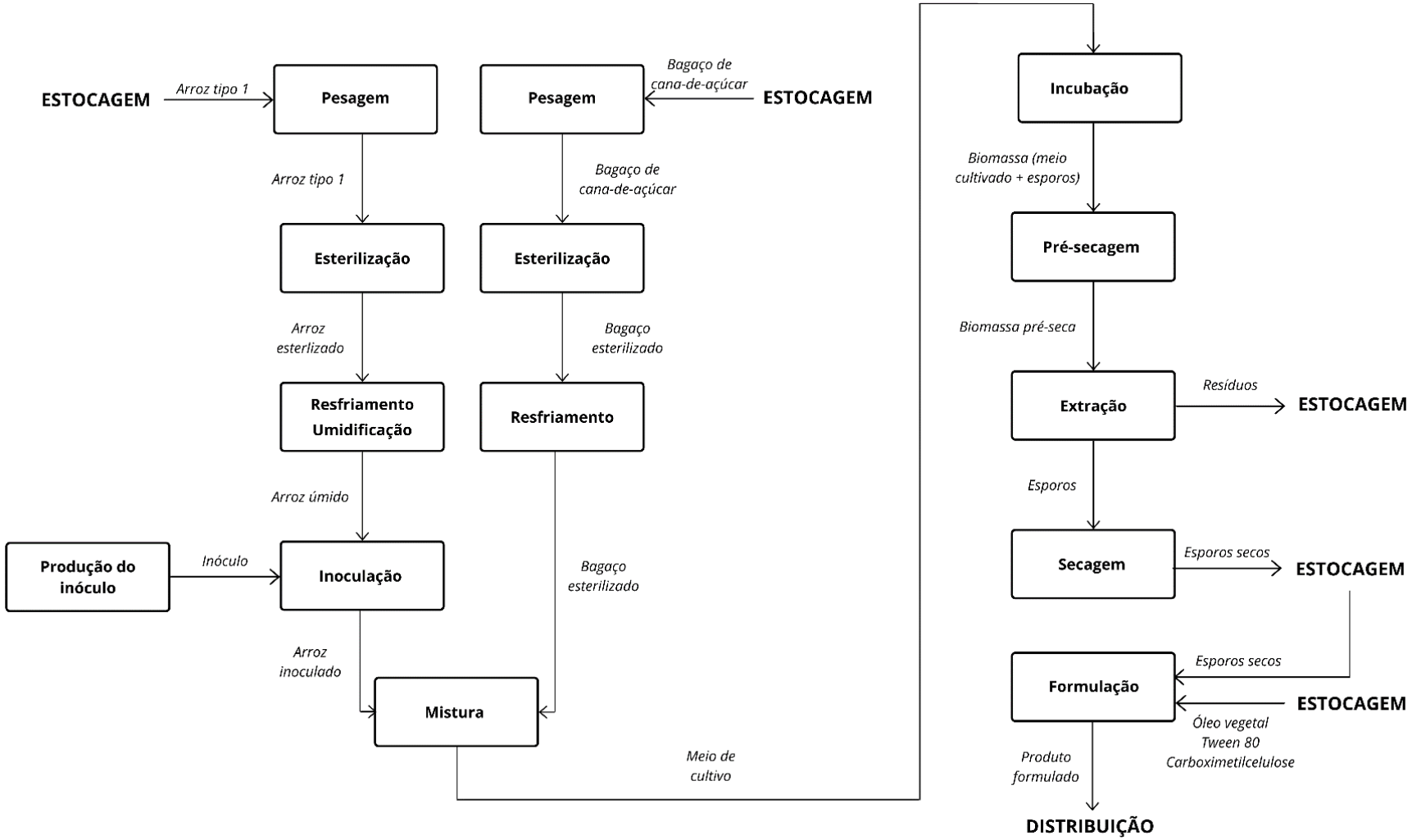
ES_{UFC} – produção de esporos necessária da BPPA, em esporos/ano

$ES_{letalidade}$ – aplicação de esporos necessários para letalidade das pragas, em esporos/hectares

ES_{kg} – produção de esporos necessária da BPPA, em t/ano

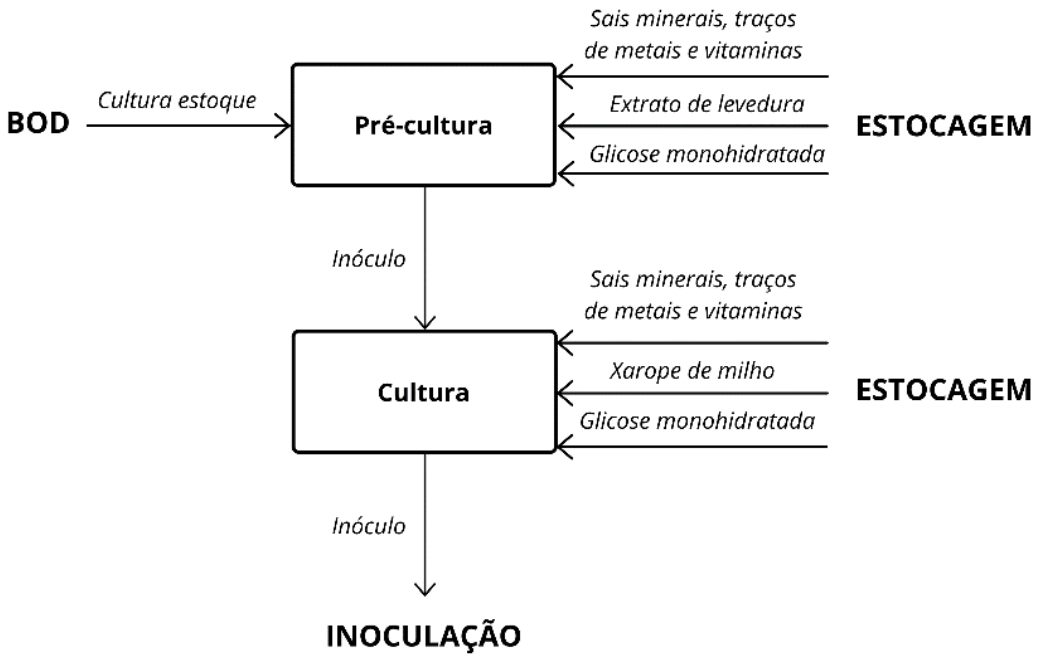
$PES_{médio}$ – peso médio de um esporo, em t/esporo

Figura 5.1 – Diagrama simplificado das etapas de produção da BPPA.



Fonte: (Autora, 2021).

Figura 5.2 – Diagrama simplificado da etapa de produção de inóculo da BPPA.



Fonte: (Autora, 2021)

Tendo em vista que o arroz tipo 1 fornece todos os nutrientes necessários e as vantagens da utilização do bagaço de cana-de açúcar para alcance de maior eficiência de produção, uma vez que, este material inerte agrega estruturação ao meio e auxilia na melhor aeração adotou-se uma mistura de arroz tipo 1 e bagaço de cana-de-açúcar em uma proporção de 9:1 (p/p) e uma produção de $3{,}5.10^{12}$ esporos/kg de arroz seco (kgas) em biorreatores de leito empacotado, semelhantes aos trabalhos do Grupo de Engenharia de Processos e Biorreatores do IBILCE/UNESP (CUNHA et al., 2020). Desta forma, através da definição da produção de esporos necessárias para compor a fatia de mercado adotada pela BPPA foi possível estabelecer a massa de arroz necessária para alcance desta produção, bem como de bagaço de cana, estimados em 171,43 t (Equação 5.6) e 19,05 t (Equação 5.7), respectivamente, considerando-se o aproveitamento total dos esporos produzidos.

$$AR_{inicialseco} = \frac{ES_{UFC}}{ESB_{UFC}} \tag{5.6}$$

$$BGC_{incialseco} = \frac{AR_{inicialseco} \cdot 10}{90} \tag{5.7}$$

Sendo:

$AR_{inicialseco}$ – arroz tipo 1 seco consumido anualmente, em tonelada de arroz seco (tas)/ano

ESB_{UFC} – esporos produzidos em biorreator de leito empacotado, em esporos/tas

$BGC_{inicialseco}$ – bagaço de cana-de-açúcar seco consumido anualmente, em tonelada de bagaço seco (tbs)/ano

Para a produção de inóculo e definição do balanço material desta etapa adotaram-se os resultados obtidos pela produção bifásica realizada por Iwanick et al. (2020). A solução da pré-cultura foi elaborada pela mistura de 40 g/L de glicose monohidratada, 40 g/L de extrato de levedura, sais minerais, traços de metais e vitaminas adaptadas do meio de Jackson et al. (1997) nas seguintes concentrações por litro: KH_2PO_4, 2,5 g; $CaCl_2 2H_2O$, 1,0 g; $MgSO_4 7H_2O$, 0,83 g; $FeSO_4 7H_2O$, 0,3 g; $CoCl_2 6H_2O$, 29,6 mg; $MnSO_4 H_2O$, 12,8 mg; $ZnSO_4 7H_2O$, 11,2 mg; 0,2 mg de cada uma das vitaminas: tiamina, riboflavina, pantotenato, niacina, piridoxina, ácido tioctico; e 0,02 mg cada de ácido fólico, biotina e vitamina B12 alcançando-se uma proporção de carbono para nitrogênio (C: N) de 12: 1. Já o meio de cultura foi composto por 80 g/L de xarope de milho e 140 g/L de glicose monohidratada junto com sais minerais, traços de metais e vitaminas nas mesmas concentrações indicadas para o meio da pré-cultura, alcançando uma proporção de carbono para nitrogênio (C: N) de 30: 1.

Desta forma, admitindo-se adição de $1{,}5.10^8$ blastosporos/kgas e uma produção de 5.10^6 blastosporos/mL do meio da cultura determinou-se a necessidade volumétrica de 5142,86 L/ano (Equação 5.8) do caldo de cultura. O mesmo foi feito para determinação da necessidade volumétrica do caldo da pré-cultura estimada em 571,43 L/ano (Equação 5.9), uma vez que, se tem produção de 5.10^7 blastosporos/mL de meio da pré-cultura e necessidade de adição de 5 mL da solução de pré-cultura para 45 mL de solução da cultura. Por fim, pode-se definir o consumo de BDA pela empresa para geração da suspensão de conídios, estimado em 1,49 kg (Equação 5.10), tendo em vista a obtenção de 2 mL de suspensão de esporos com concentração de 5.10^6 conídios por um mL de BDA preparado (52g BDA/1L de água), adicionando-se 5.10^6 conídios/mL de solução da pré-cultura.

$$CT_{volume} = \frac{AR_{inicialseco} \cdot CIC_{UFC}}{CCT_{UFC}} \tag{5.8}$$

$$PC_{volume} = PPC \cdot CT_{volume} \tag{5.9}$$

$$BDA_{massa} = PSB \cdot DBDA \cdot PC_{volume} \tag{5.10}$$

Sendo:

CT_{volume} – cultura necessária para inoculação do substrato, em L/ano

CIC_{UFC} – concentração do inóculo adicionado para inoculação do substrato, em blastosporos/kgas

CCT_{UFC} – concentração da inóculo gerado na cultura, em blastosporos/L

PC_{volume} – pré-cultura necessária para inoculação da cultura em L/ano

PPC – proporção de pré-cultura por cultura a ser adicionado, em mL de pré-cultura/mL cultura

PSB – proporção de suspensão de esporos por BDA diluído, em mL de suspensão de esporos/mL BDA

$DBDA$ – fator de diluição do BDA, em kg/L

Para determinação do resíduo agroindustrial gerado pela BPPA, considerou-se a redução de 20% na massa do arroz tipo 1, após incubação por 10 dias, conforme constatado por Cunha et al., (2020), tendo-se a geração de 156 t de resíduo seco por ano (Equação 5.11).

$$RS_{finalseco} = AR_{inicialseco} \cdot \left(\frac{R_{arroz}}{100}\right) + BGC_{inicialseco} \quad (5.11)$$

Sendo:

$RS_{finalseco}$ – resíduo agroindustrial gerado pela BPPA, em tonelada de resíduo seco (trs)/ano

R_{arroz} – redução da massa de arroz após incubação, em %

A formulação do produto comercializado pela BPPA foi descrita por Lopes e Faria (2019). Adotou-se uma formulação oleosa elaborada pela mistura dos esporos obtidos após a secagem (10% p/p) com um preparado composto 89% por óleo de soja, 10% por solução Tween 80 (0,1%) e 1% por estabilizador de suspensão carboximetilcelulose. Admitindo-se a comercialização contendo 1 kg da formulação oleosa, foi possível estabelecer a massa de esporos utilizada na composição que é de 100 g (Equação 5.12), bem como o número de embalagens produzidas pela BPPA, estimado em 60.000 unidades/ano (Equação 5.13). Além disso foi possível estabelecer a necessidade dos insumos utilizados para composição do formulado, sendo 0,88 L/unidade (Equação 5.14) de óleo de soja, 9 g/unidade (Equação 5.15) de carboximetilcelulose e 90 mL/unidade (Equação 5.16) de solução Tween 80 (0,1%), ou seja, necessidade de 0,09 mL/unidade (Equação 5.17) de Tween 80. Para realização dos cálculos considerou-se a densidade do óleo de soja e da solução de Tween 80, como sendo 0,93 kg/L (TOFANINI, 2004) e 1 kg/L (ALMEIDA, 2007), respectivamente.

$$ES_{formulado} = \frac{1000 \cdot P_{ESformulado}}{100} \quad (5.12)$$

$$EMB = \frac{ES_{seco}}{ES_{formulado}} \quad (5.13)$$

$$OLS_{formulado} = \frac{\left(\frac{900 \cdot P_{OLSformulado}}{100}\right)}{\rho_{OLS}} \quad (5.14)$$

$$CBX_{formulado} = \left(\frac{900 \cdot P_{CBXformulado}}{100}\right) \quad (5.15)$$

$$SE_{formulado} = \frac{\left(\frac{900 \cdot P_{SEformulado}}{100}\right)}{\rho_{SE}} \quad (5.16)$$

$$TW80_{formulado} = \frac{SE_{formulado} \cdot P_{TW80solução}}{100} \quad (5.17)$$

Sendo:

$ES_{formulado}$ – massa de esporos para composição do formulado, em kg/unidade

$P_{ESformulado}$ – porcentagem de esporos na composição, em %

EMB – unidade de formulado produzidos, em unidade/ano

ES_{seco} – massa de esporos produzida após secagem, em kg/ano

$OLS_{formulado}$ – volume de óleo de soja para composição do formulado, em L/unidade

$P_{ESformulado}$ – porcentagem de óleo de soja na composição, em %

ρ_{OLS} – densidade do óleo de soja, em kg/L

$CBX_{formulado}$ – massa de carboximetilcelulose para composição do formulado, em kg/unidade

$P_{CBXformulado}$ – porcentagem de carboximetilcelulose na composição, em %

$SE_{formulado}$ – volume de solução Tween 80 para composição do formulado, em L/unidade

$P_{SEformulado}$ – porcentagem de solução Tween 80 na composição, em %

ρ_{OLS} – densidade da solução Tween 80, em kg/L

$TW80_{formulado}$ – volume de Tween 80 para composição do formulado, em L/unidade

$P_{TW80solução}$ – porcentagem Tween 80 na solução, em %

A Tabela 5.1. resume os valores estimados mencionados anteriormente e apresenta os mesmos em referência a dias e a base úmida. Para determinação dos resultados em base úmida as umidades apresentadas na Tabela 5.2 foram utilizadas. A seguir, é apresentado o fluxograma

de processo dessa proposição, estruturado com base nos resultados do balanço material aqui apresentado.

Tabela 5.1 – Balanço material global da nova proposição para BPPA.

Tempo de operação (continua)

Descrição	Valor	Unidade
Dias por ano	365	dias
Aproveitamento	85	%
Tempo efetivo de produção em dias	310	dias
Tempo efetivo de produção em horas	2480	horas

Estoque

Descrição	Valor	Unidade
Arroz inicial seco utilizado anualmente	171,43	tas/ano
Arroz inicial seco utilizado diariamente	0,55	tas/dia
Arroz inicial *in natura* utilizado anualmente	198,4	t/ano
Arroz inicial *in natura* utilizado diariamente	0,64	t/dia
Bagaço inicial seco utilizado anualmente	19,05	tbs/ano
Bagaço inicial seco utilizado diariamente	0,06	tbs/dia
Bagaço inicial *in natura* utilizado anualmente	34,63	t/ano
Bagaço inicial *in natura* utilizado diariamente	0,11	t/dia

Preparo dos materiais

Descrição	Valor	Unidade
Água utilizada para umidificação do arroz anualmente	171,94	m^3
Água utilizada para umidificação do arroz diariamente	554,65	L/dia
Arroz úmido	323,45	t/ano
Arroz úmido diariamente	1,04	t/dia

Tabela 5.1 – Balanço material global da nova proposição para BPPA.

(continuação)

Água utilizada para umidificação do bagaço anualmente	19,10	m^3
Água utilizada para umidificação do bagaço diariamente	61,63	L/dia
Bagaço úmido	35,94	t/ano
Bagaço úmido diariamente	0,12	t/dia
Inóculo utilizado anualmente	5142,86	L/ano
Inóculo utilizado diariamente	16,61	L/dia
Arroz inoculado anualmente	328,60	t/ano
Arroz inoculado diariamente	1,06	t/dia

Produção de Inóculo

Descrição	**Valor**	**Unidade**
Cultura estoque		
BDA utilizado anualmente	1,49	kg/ano
BDA utilizado diariamente	4,80	g/dia
Solução Tween 80 (0,1%) utilizada anualmente	57,14	L/ano
Solução Tween 80 (0,1) utilizada diariamente	0,18	L/dia
Suspensão de esporos gerada anualmente	57,14	L/ano
Suspensão de esporos gerada diariamente	0,18	L/dia
Pré-cultura		
Extrato de levedura utilizado anualmente para composição	22,86	kg/ano
Glicose monohidratada utilizada anualmente para composição	22,86	kg/ano
Sais minerais, traços de metais e vitaminas utilizados anualmente para composição	2,68	kg/ano
Inóculo gerado na pré-cultura anualmente	571,43	L/ano
Inóculo gerado na pré-cultura diariamente	1,85	L/dia

Tabela 5.1 – Balanço material global da nova proposição para BPPA.

(continuação)

Cultura		
Xarope de milho utilizado anualmente para composição	411,43	kg/ano
Glicose monohidratada utilizada anualmente para composição	720,00	kg/ano
Sais minerais, traços de metais e vitaminas utilizados anualmente para composição	24,15	kg/ano
Inóculo gerado na cultura anualmente	5142,86	L/ano
Inóculo gerado na cultura diariamente	16,61	L/ano
Incubação/Pré-secagem		
Descrição	**Valor**	**Unidade**
Mistura de cultivo seca incubada anualmente	190,48	tss/ano
Mistura de cultivo seca incubada diariamente	0,61	tss/dia
Mistura de cultivo incubada anualmente	365,54	t/ano
Mistura de cultivo incubada diariamente	1,18	t/dia
Esporos secos gerados na incubação anualmente	5,57	t de esporos secos (tes)/ano
Esporos secos gerados na incubação diariamente	0,018	tes/dia
Esporos gerados na incubação anualmente	7,56	t/ano
Esporos gerados na incubação diariamente	0,03	t/dia
Resíduo seco gerado anualmente	156,00	trs/ano
Resíduo seco gerado diariamente	0,50	trs/dia
Resíduo gerado anualmente	258,96	t/ano
Resíduo gerado diariamente	0,83	t/dia

Tabela 5.1 – Balanço material global da nova proposição para BPPA.

(continuação)

Esporos obtidos após pré-secagem anualmente	6,24	t/ano
Esporos obtidos após pré-secagem diariamente	0,02	t/dia

Extração/Secagem

Descrição	Valor	Unidade
Esporos obtidos após secagem anualmente	5,93	t/ano
Esporos obtidos após secagem diariamente	0,019	t/dia

Formulação

Descrição	Valor	Unidade
Esporos utilizados para a formulação anualmente	5,93	t/ano
Esporos utilizados por formulado	0,019	t/unidade
Óleo de soja utilizado para a formulação anualmente	52,80	L/ano
Óleo de soja utilizado por formulado	0,88	mL/unidade
Carboximetilcelulose utilizada para a formulação anualmente	540,00	kg/ano
Carboximetilcelulose utilizada por formulado	9,00	g/unidade
Solução Tween 80/ (0,1%) utilizada para a formulação anualmente	5,41	L/ano
Solução Tween 80/ (0,1%) utilizada por formulado	0,09	mL/unidade

Fonte: (Autora, 2021)

Tabela 5.2 – Parâmetros de umidade adotados no balanço material.

(continua)

Parâmetro	Valor	Unidade	Referência

Tabela 5.2 – Parâmetros de umidade adotados no balanço material.

(continuação)

Umidade do arroz *in natura*	14	%, b.u.	WALTER; MARCHEZAN; DE AVILA 2008
Umidade de bagaço de cana *in natura*	45	%, b.u.	DOS SANTOS et al., 2011
Umidade do arroz após esterilização e inoculação	47	%, b.u.	Este trabalho[1]
Umidade do bagaço de cana após esterilização	47	%, b.u.	Este trabalho[1]
Umidade da mistura no início da incubação	47	%, b.u.	Este trabalho[1]
Umidade da mistura no final da incubação	40	%, b.u.	Este trabalho[1]
Umidade dos esporos no final da incubação	26	%, b.u	Este trabalho[1]
Umidade dos esporos no início da secagem	12	%, b.u.	Este trabalho[1]
Umidade dos esporos no final da secagem	6	%, b.u.	MASCARIN; QUINTELA, 2013

[1] Hipóteses consideradas por este trabalho.

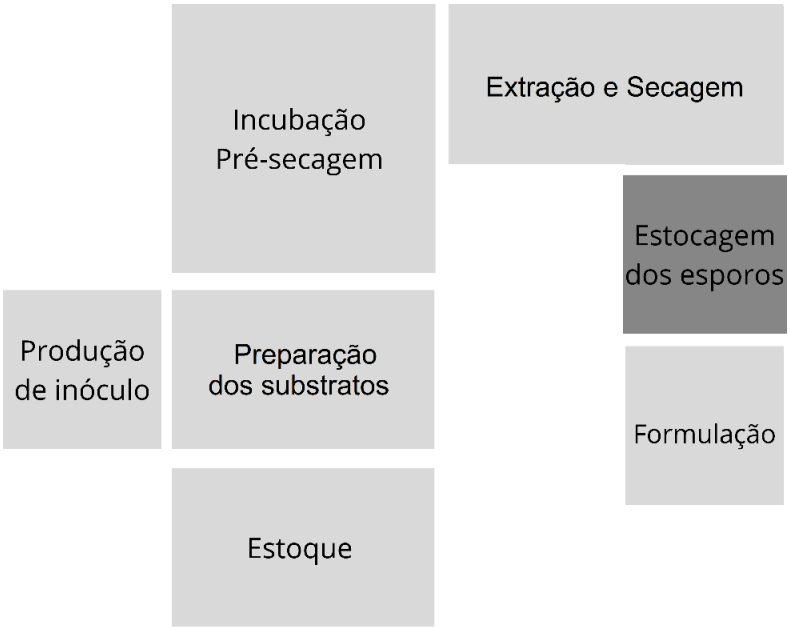
Fonte: (Autora, 2021)

5.2 Fluxograma de processo e descrição das etapas

As soluções apontadas para os desafios de operação da planta industrial resultaram em uma estrutura de produção aprimorada em relação à BPP. Para melhor compreensão da planta produtora, dividiu-se o processo em seis estágios, sendo eles: estoque, preparo dos substratos, e produção do inóculo que representam as etapas upstream; incubação, extração, secagem e formulação que representam as etapas downstream, conforme apresentado nas Figura 5.3 e Figura 5.4.

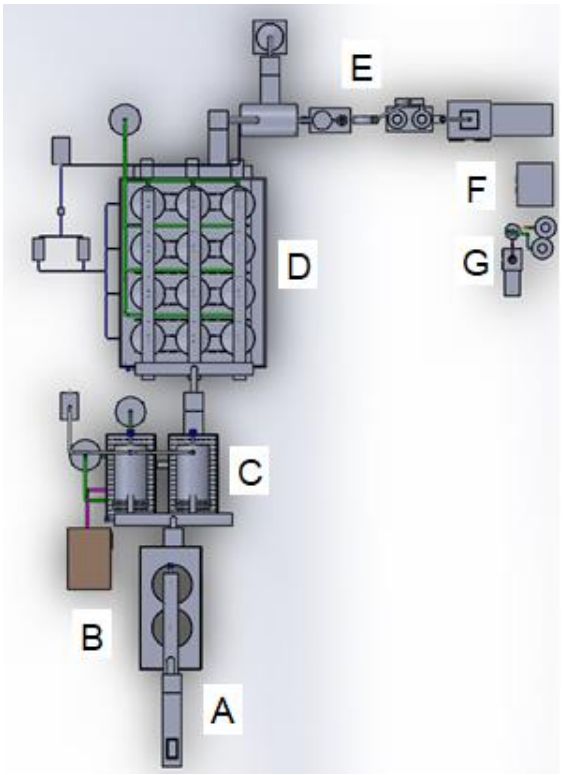
De um modo geral, o processo esquematizado no fluxograma da Figura 5.5 apresenta uma produção constante com algumas etapas em bateladas e outras contínuas. As etapas de mistura, parte das etapas de preparo do substrato, extração e secagem são contínuas, enquanto as de esterilização, preparo do inóculo, de cultivo em estado sólido e formulação são em batelada

Figura 5.3 – Layout industrial da BPPA.



Fonte: (Autora, 2021)

Figura 5.4 – Fluxograma geral de processo da BPPA.



(A) Estoque (B) Preparo do substrato (C) Preparo do inóculo (D) Incubação e Pré-secagem (E) Extração e Secagem (F) Estoque dos esporos (G) Formulação

Fonte: (Autora, 2021)

Para que a produção de esporos, como um todo, seja constante, a quantidade de equipamentos e os tempos de operação foram estabelecidos. A seguir são descritas as operações e os equipamentos identificados nos fluxogramas de processos apresentados. Estima-se que para realização de um ciclo completo de produção, que contempla desde a pesagem dos substratos de cultivo até a formulação, são necessários aproximadamente 12 dias, com base no tempo operacional exigido em cada etapa do processo e considerando-se a realização de operações simultâneas.

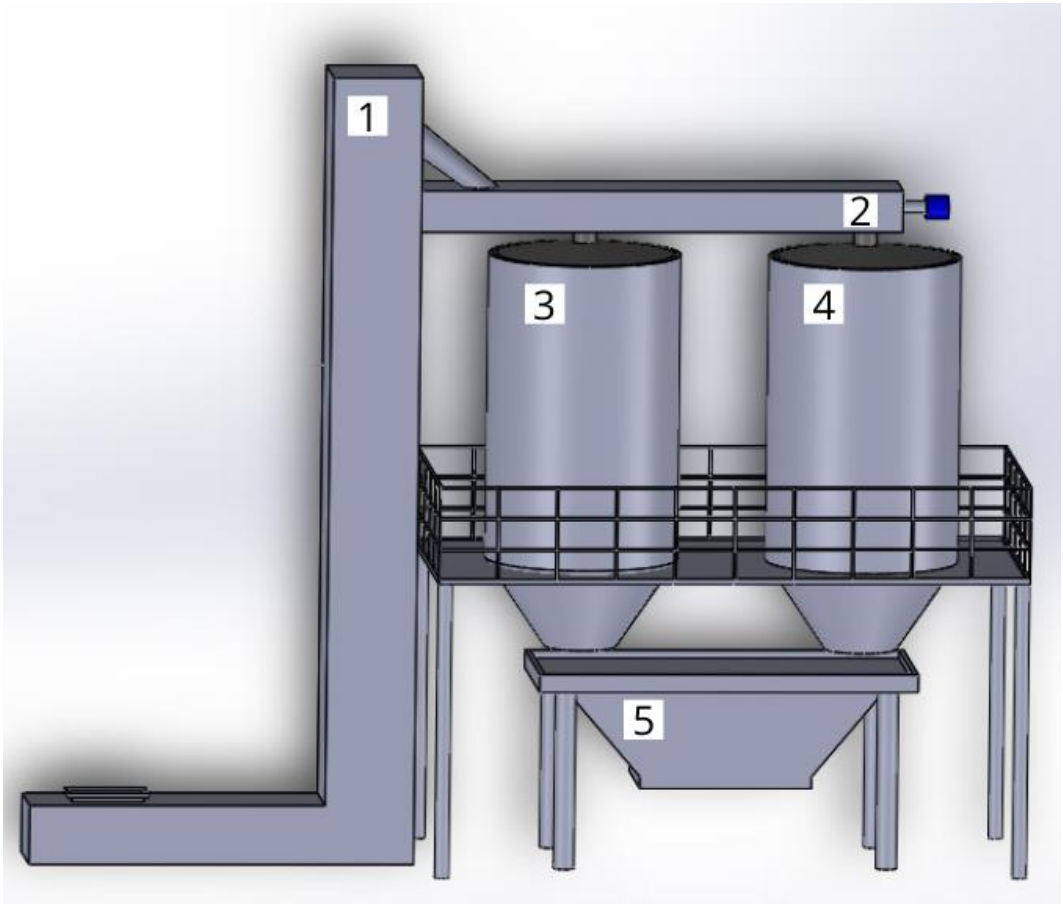
Para a definição da capacidade nominal dos equipamentos considerou-se a densidade do arroz tipo 1 de 0,58 t/m^3 (JULIANO, 1993) e do bagaço de cana de 0,1 t/m^3 (MORGAN et al., 1974). Além disso, para determinação da densidade da mistura adotou-se os cálculos realizados por Cunha et al. (2020) levando-se em consideração a porosidade do leito, alcançando-se a densidade de mistura de 0,37 t/ m^3.

5.2.1 ESTOQUE

O processo tem início com a recepção dos substratos a serem utilizados como meio de cultivo na etapa de incubação. O arroz tipo 1, substrato que fornecerá os nutrientes necessários para o crescimento fúngico, e o bagaço de cana-de-açúcar, material responsável pela estruturação do leito, são encaminhados com o auxílio de um elevador de canecas e um transportador helicoidal com duas roscas para seus respectivos silos de abastecimento. O bagaço de cana de açúcar deve ser adquirido já peneirado ou passar por peneiramento antes que sejam armazenados. O silo de abastecimento do bagaço de cana tem capacidade de estocagem da massa necessária para 7 dias de produção, uma vez que, este é recebido a uma umidade de 45%, e se armazenado por um maior período de tempo pode acarretar uma ação microbiana, provocando sua deterioração e afetando diretamente suas características. Já o silo de estocagem do arroz abrange 21 dias de produção. Para início do processo produtivo os substratos, separadamente, são direcionados para a balança onde são pesados até atingir a massa necessária para suprir a produção diária estabelecida, seguindo para o próximo estágio do processo, como a Figura 5.5 representa.

Na Tabela 5.3 encontram-se relacionados os equipamentos presentes nessa etapa de processamento, suas capacidades nominais e a quantidade de equipamentos necessários para atender a esta etapa.

Figura 5.5 – Fluxograma de processo da etapa de estocagem dos substratos da BPPA.



(1) elevador de canecas (2) transportador helicoidal (3) silo de alimentação do arroz (4) silo de alimentação do bagaço (5) balança

Fonte: (Autora, 2021)

Tabela 5.3 – Equipamentos na etapa de estoque.

Equipamento	**Capacidade nominal**	**Quantidade**
Elevador de canecas	25 m^3/h	1
Transportador helicoidal	40 t/h	1
Silos de abastecimento	11 m^3	2
Balança	1 t	1

Fonte: (Autora, 2021)

5.2.2 PREPARO DOS SUBSTRATOS

A etapa de preparo dos substratos contempla as operações de esterilização, resfriamento, umidificação, inoculação e mistura das correntes de arroz e bagaço de cana, como apresentado

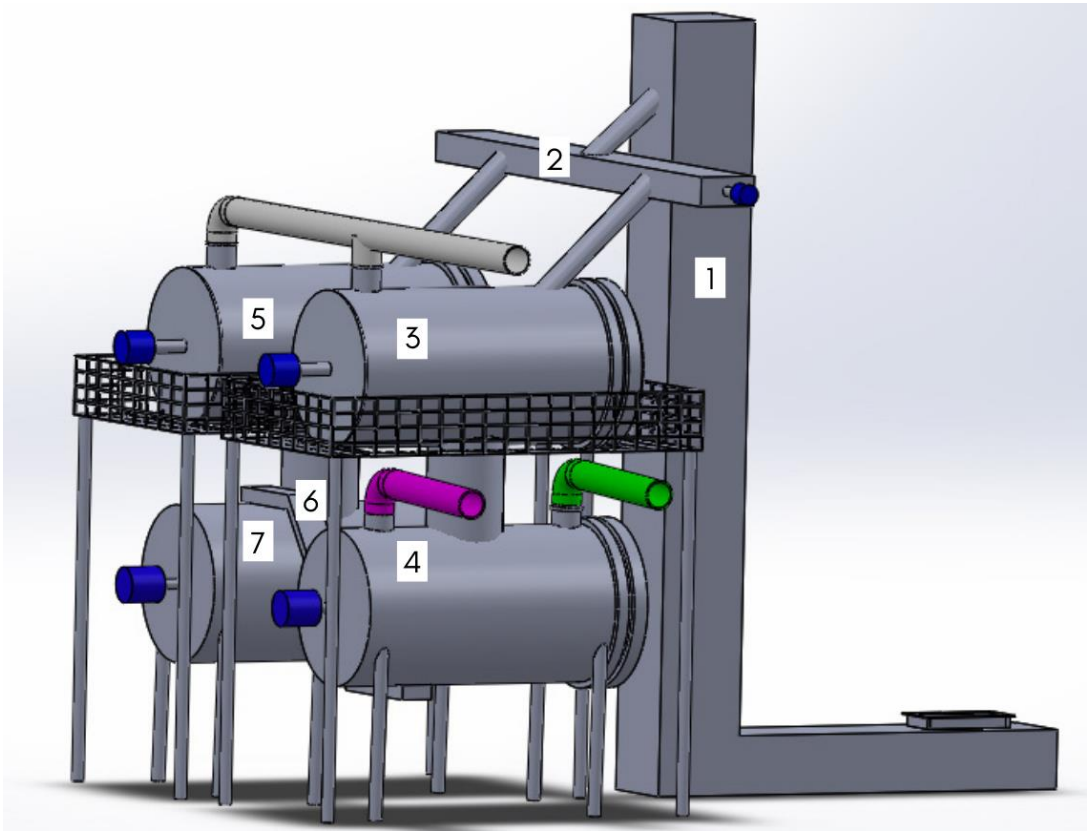
na Figura 5.6. O transporte destes materiais da balança até os esterilizadores é feito com o auxílio de um elevador de canecas e de um transportador com duas roscas helicoidais que direciona cada um dos materiais para seu respectivo equipamento de tratamento térmico. Já nesta etapa, a planta de produção deve ser isolada do restante do processo e o ar ambiente deve ser continuamente renovado e filtrado para remoção de microrganismos contaminantes.

Para esterilização dos materiais dois equipamentos idênticos são utilizados, que consistem em tambores rotativos inclinados, permitindo o direcionamento do substrato e do suporte para a saída. Além disso, os tambores contam com um helicoide, como representado na Figura 5.7, que permite a agitação dos sólidos. Em seu eixo central, que sustenta a pá helicoidal, conta com um tubo todo perfurado por onde o vapor saturado é injetado diretamente, procedendo a esterilização, de forma contínua. O tempo de residência é dado pela temperatura do vapor saturado, respeitando os binômios tempo/temperatura de esterilização. Como consequência desse processo, estima-se que parte do vapor condensado é absorvido pelo material durante a esterilização.

A seguir o arroz é conduzido para o inoculador, que muito se assemelha a estrutura do esterilizador, apresentando uma única modificação, que são as perfurações presentes na pá helicoidal que permitem a passagem de ar, auxiliando no resfriamento, assim como as perfurações no eixo central. Desta forma, antes que se realize a inoculação do substrato faz-se o resfriamento, por meio da aspersão da água, necessária para umidificação até alcance de 47% de umidade (b.u.), sobre o material, bem como por meio da passagem de ar seco e a agitação do material pelas pás, possibilitando a troca de calor por convecção e pela evaporação da água. A água necessária para esta operação é previamente esterilizada e resfriada, garantindo que não ocorra contaminação.

Enquanto isso, o bagaço de cana é encaminhado para o misturador com estrutura idêntica ao inoculador, e neste equipamento realiza-se o resfriamento do suporte utilizando os mesmos artifícios adotados para o resfriamento do arroz. Vale salientar, que a água utilizada para aspersão no bagaço é pequena quando comparado ao adicionado para resfriamento do arroz, uma vez que, este é recebido com uma umidade superior, no entanto, este não afeta na eficiência de resfriamento do suporte. O ar necessário para estas operações com vazão controlada deverá ser seco, filtrado para reduzir a carga microbiana e evitar a contaminação exógena dos substratos.

Figura 5.6 – Fluxograma de processo da etapa de preparo dos substratos da BPPA.



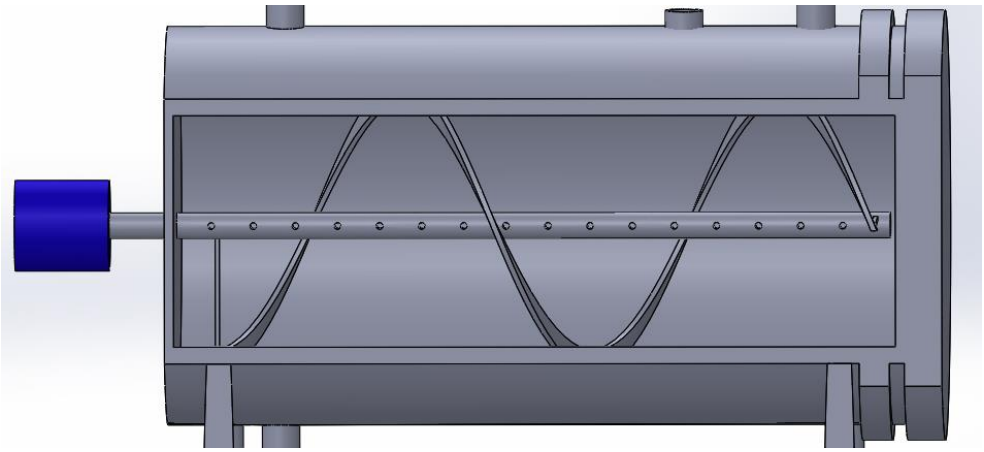
(1) elevador de canecas (2) transportador com roscas helicoidais (3) esterilizador de arroz (4) resfriador/inoculador de arroz (5) esterilizador de bagaço (6) transportador de caneca (7) resfriador de bagaço e misturador. A tubulação cinza clara para injeção de vapor. A tubulação verde para a aspersão de água. A tubulação roxa para a adição do inóculo.

Fonte: (Autora, 2021)

Alcançando uma temperatura próxima ao ambiente, inicia-se a inoculação do arroz, pela aspersão do caldo da cultura preparado como descrito na seção 5.2.3, que é homogeneizado com auxílio da hélice central. O substrato inoculado segue para o transportador helicoidal no interior de uma tubulação, para minimizar os riscos de contaminação, que destinará ao misturador, onde arroz e bagaço são misturados e assim estão prontos para iniciar o processo de cultivo dos esporos. O transporte dos materiais do esterilizador até os biorreatores de leito empacotado é feito por rosca sem fim no interior de tubulações para minimizar riscos de contaminação.

Na Tabela 5.4 encontram-se relacionados os equipamentos presentes nessa etapa de processamento, suas capacidades nominais e a quantidade de equipamentos necessários para atender o processo.

Figura 5.7 – Interior do esterilizador, inoculador e misturador.



Fonte: (Autora, 2021)

Tabela 5.4 – Equipamentos da etapa de preparação do substrato.

Equipamento	Capacidade nominal	Quantidade
Elevador de canecas	20 m^3/h	1
Transportador helicoidal	40 t/h	1
Esterilizador	2 m^3	2
Resfriador/Inoculador	2 m^3	1
Transportador de canecas	10 m^3/h	1
Resfriador/Misturador	2,5 m^3	1

Fonte: (Autora, 2021)

5.2.3 PRODUÇÃO DE INÓCULO

O inóculo a ser empregado na corrente principal de produção de esporos da BPPA será produzido, majoritariamente, por CSm em tanques agitados e contempla três etapas. Basicamente, faz-se a repicagem da matriz fúngica em frascos de erlenmeyer contendo o meio BDA solidificado, os esporos se desenvolvem sobre a superfície do meio através do CES e permitem a obtenção de uma suspensão de esporos, que tem como função inocular a solução nutriente desenvolvida para a pré-cultura. A solução nutriente da pré-cultura através da incubação dá origem ao material que inoculará o caldo da cultura que após o CSm dá origem ao inóculo necessário ao processo principal.

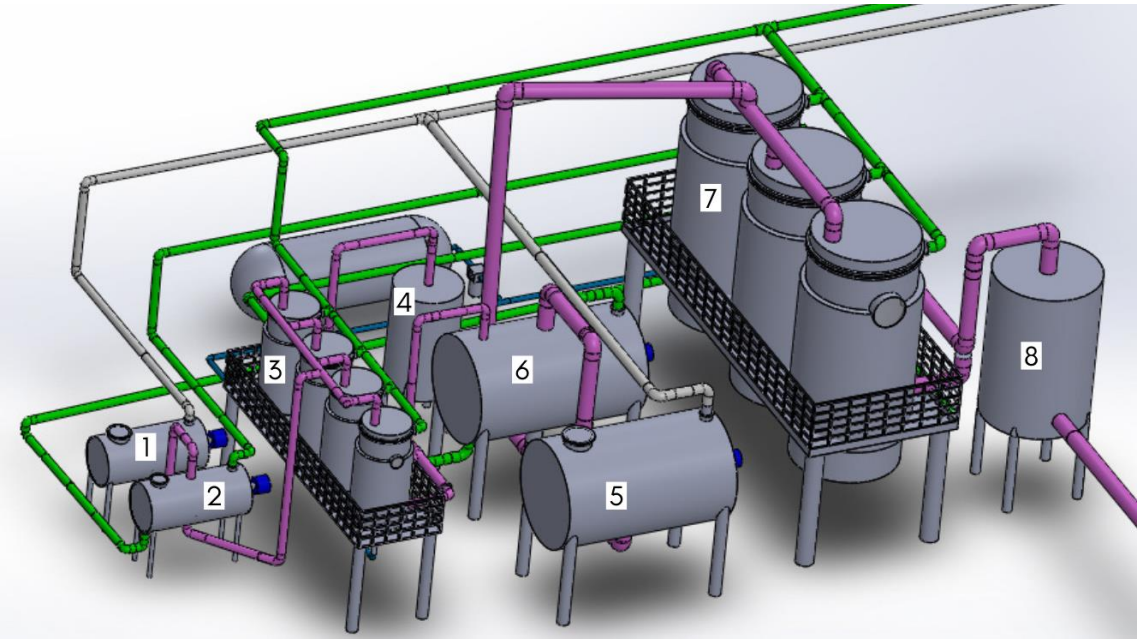
A etapa de produção do inóculo contempla as operações de mistura, esterilização, inoculação, CSm em biorreatores de tanque agitado, armazenamento, e transporte das soluções nutrientes e do inóculo produzido e estão representadas no fluxograma da Figura 5.8. Previamente a todas essas operações, ocorre também uma etapa laboratorial responsável pela conservação e manutenção da cepa original do fungo e para produção das matrizes de trabalho, requeridas para inoculação da solução da pré-cultura. Nos laboratórios, a cepa original do fungo é mantida a -80 °C, cujo acesso é restrito à pesquisa ou para a produção de novas matrizes de trabalho em casos de perda da vitalidade do fungo. As matrizes de trabalho são elaboradas em meio de 100 mL de cultura BDA e são usadas para fornecimento de esporos do fungo ao processo. A partir de uma matriz de trabalho, uma suspensão de esporos é obtida e terá sua concentração ajustada para 10^7 esporos/mL. A suspensão é adicionada a solução nutriente da pré-cultura no tanque agitado onde realiza-se a inoculação.

Buscando aproveitar todas as vantagens da produção de inóculo por CSm bem como não utilizar um meio de cultivo com elevado custo adotou-se a estratégia de cultivo empregada por Iwanick et al. (2019). Desta forma, a solução nutriente da pré-cultura composta por glicose monohidratada, extrato de levedura, sais minerais, traços de metais e vitaminas é preparada no tanque agitado por colaboradores. A esterilização ocorre neste mesmo tanque pela injeção de vapor direto por 30 minutos. Após este período a solução é encaminhada para outro tanque agitado onde realiza-se a inoculação, sendo previamente resfriado pela passagem de água fria na camisa do equipamento, bem como através da agitação da solução nutriente. Alcançado a temperatura ambiente realiza-se a inoculação por meio da adição manual da suspensão de esporos previamente preparada em câmara de fluxo laminar pelo colaborador utilizando os frascos de Erlenmeyer contendo meio BDA.

Em seguida, a solução nutriente inoculada é direcionada a um dos CSTR (*continuous stirred-tank reactor*) para a pré-cultura e permanece incubados por 2 dias. Ao final, o inóculo gerado no CSm da solução nutriente da pré-cultura é encaminhado para outro tanque pulmão, nele permanecendo até que seja necessário para inoculação do caldo da cultura que dará origem ao inóculo da corrente principal. O caldo da cultura composto por xarope de milho, glicose monohidratada, sais minerais, traços de metais e vitaminas é esterilizado em um novo tanque agitado pela injeção de vapor direto, seguindo para outro tanque agitado onde é resfriado pela passagem de água fria na camisa e agitação. Por fim o inóculo gerado na pré-cultura e acondicionado no tanque pulmão é encaminhado para o para o tanque de inoculação e homogeneizado no caldo nutriente. O caldo inoculado segue para o tanque pulmão e dele é

direcionado para um dos CSTR destinados a cultura, onde permanece por 3 dias. Ao final da incubação, o inóculo gerado na cultura é encaminhado para o tanque pulmão de inóculo e deste direcionado à corrente principal do processo por meio da tubulação.

Figura 5.8 – Fluxograma de processo da etapa de produção de inóculo da BPPA.



(1) tanque agitado para esterilização da solução nutriente da pré-cultura (2) tanque agitado para inoculação da solução nutriente da pré-cultura (3) CSTR da pré-cultura (4) tanque pulmão da solução nutriente da pré-cultura (5) tanque agitado para esterilização do caldo da cultura (6) tanque agitado para inoculação do caldo da cultura (7) CSTR da cultura (8) tanque pulmão de inóculo. Tubulação cinza claro para injeção de vapor. Tubulação verde para passagem de água na camisa. Tubulações roxas para passagem de todo material com células do fungo.

Fonte: (Autora, 2021)

Para manter a produção de inóculo de forma constante são necessários três biorreatores da pré-cultura e quatro biorreatores da cultura. Os biorreatores contam com um sistema de aeração onde o ar comprimido é filtrado, visando reduzir a carga microbiana e evitar a contaminação exógena dos substratos, antes que adentre no equipamento.

Na Tabela 5.5 encontram-se relacionados os equipamentos presentes nessa etapa de processamento, suas capacidades nominais e a quantidade de equipamentos necessários para atender o processo.

Tabela 5.5 – Equipamentos da etapa de produção de inóculo.

Equipamento	Capacidade nominal	Quantidade
Esterilizador da solução nutriente da pré-cultura	0,003 m^3	1
Inoculador da solução nutriente da pré-cultura	0,003 m^3	1
Biorreator agitado pré-cultura	0,0025 m^3	3
Tanque pulmão da solução nutriente da pré-cultura	0,0025 m^3	1
Esterilizador do caldo da cultura	0,028 m^3	1
Inoculador do caldo da cultura	0,028 m^3	1
Biorreator agitado cultura	0,021 m^3	4
Tanque pulmão de inóculo	0,021 m^3	1

Fonte: (Autora, 2021)

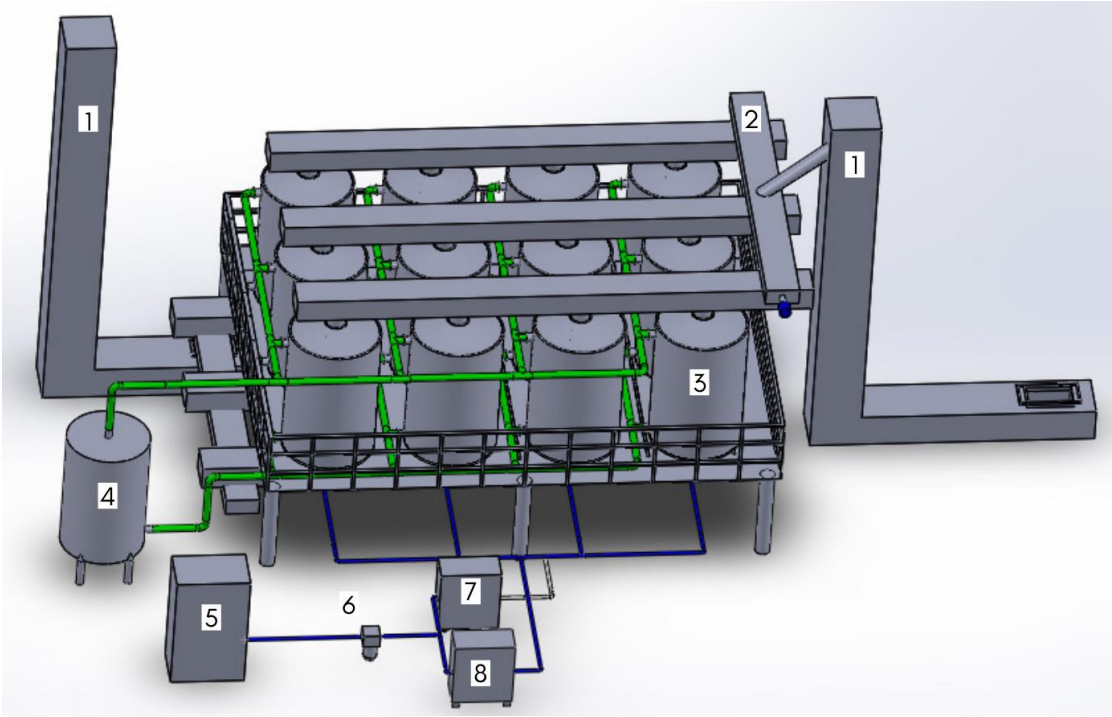
5.2.4 INCUBAÇÃO E PRÉ-SECAGEM

A quarta etapa, contempla o CES para produção dos esporos e a pré-secagem da biomassa, cujo esquema é apresentado na Figura 5.9. O elevador de caneca e os transportadores helicoidais com abertura pneumática, direcionam o meio de cultivo inoculado até a entrada dos biorreatores. Para uma melhor acomodação da biomassa, os biorreatores contam com uma pá helicoidal central, ligeiramente menor que o diâmetro do equipamento, que terá a dupla função de proporcionar aeração ao meio e dar-lhe sustentação. Esta pá é perfurada tanto nas extremidades, quanto no eixo central para conferir aeração ao leito, no entanto, este acessório, necessário à movimentação, areação e sustentação do meio de cultivo, limitou a capacidade volumétrica do biorreator em 70%.

Em operação, o biorreator é mantido a uma temperatura a 28 ºC pela circulação de água pela camisa de refrigeração que circunda a parede do biorreator, proveniente do tanque de resfriamento da água e pela injeção de ar saturado no meio de cultivo através da rosca interna perfurada. A retirada dos gases de respiração é feita pela injeção de ar comprimido. O ar passa pelo filtro e pelo sistema de umidificação para saturação do mesmo, antes de adentrar a coluna. Terminando o tempo de incubação, que é de 10 dias, inicia-se a pré-secagem do meio de cultivo, realizada pela inserção do ar seco previamente no desumidificador. Alcançando a umidade de 26% (b.u.), o resíduo juntamente com os esporos é descarregado com auxílio da hélice para os transportadores helicoidais e ao elevador de canecas sendo encaminhado para a próxima etapa.

O transporte helicoidal e o elevador de canecas deverão ser acondicionados dentro de tubulações, nas quais será soprado ar seco para arraste dos esporos que se desprenderão do arroz, sendo esta corrente de ar introduzida adiante no extrator de esporos.

Figura 5.9 – Fluxograma de processo da etapa de incubação e pré-secagem da BPPA.



(1) elevador de canecas (2) transportador helicoidal (3) biorreator de leito empacotado (4) tanque de água com sistema de resfriamento (5) compressor de ar (6) filtro de ar (7) umidificador de ar (8) desumidificador de ar. Tubulação azul destinada a passagem de ar úmido. Tubulação cinza destinada a passagem de ar seco. Tubulação verde para passagem de água na camisa.

Fonte: (Autora, 2021)

Para a remoção dos resíduos e a sanitização da coluna para início de um novo cultivo será realizada a limpeza de forma automatizada pela inserção de bicos no interior do equipamento para aplicação de água pressurizada e, posteriormente, para aplicação de vapor por 30 minutos para a esterilização do biorreator.

Na Tabela 5.6 encontram-se relacionados os equipamentos presentes nessa etapa de processamento, suas capacidades nominais e a quantidade de equipamentos necessários para atender o processo.

Tabela 5.6 – Equipamentos principais da etapa de incubação.

Equipamento	Capacidade nominal	Quantidade
Elevador de canecas	20 m^3/h	2
Transportador helicoidal	40 t/h	8
Biorreator de leito empacotado	4 m^3	12

Fonte: (Autora, 2021)

5.2.5 EXTRAÇÃO E SECAGEM

Vinda dos biorreatores de leito empacotado, a biomassa entra no extrator de tambor rotativo com grau de enchimento de 40%, onde a movimentação do tambor, por aproximadamente 16 horas a 60 rpm, permite o desprendimento dos esporos do meio de cultura, que com a inserção de um alto fluxo de ar são carregados para os ciclones de coleta, conforme pode ser visto na Figura 5.10. O primeiro ciclone é responsável pela captação das partículas com diâmetro máximo de 2,17 µm, as partículas mais finas acompanham a trajetória do gás e saem pelo topo do ciclone sendo direcionadas por um exaustor para o segundo ciclone capaz de coletar partículas com diâmetro máximo de 1,70 µm. Os esporos depositados no coletor são transportados pneumaticamente para o tanque pulmão que encaminha para o segundo conjunto de ciclones onde ficam em recirculação pela passagem de ar seco, que possibilita o alcance de umidade de 6% (b.u.). Por fim são coletados e encaminhados por transportador pneumático para ensacadeira, responsável por acondicionar os conídios em embalagens, para posterior congelamento quando necessário. Os ciclones contam com um filtro na saída dos gases para impedir que esporos se dispersem no ar.

O resíduo remanescente no extrator é encaminhado por meio de um elevador de canecas para o silo de resíduos onde permanecem armazenados até sua venda, como representado na Figura 5.10.

Na Tabela 5.7 encontram-se relacionados os equipamentos presentes nessa etapa de processamento, suas capacidades nominais e a quantidade de equipamentos necessários para atender o processo. Para dimensionamento dos ciclones baseou-se nas razões fixas da família geométrica Starimand e utilizou-se o algoritmo de Maurício et al. (2006).

Figura 5.10 – Fluxograma de processo da etapa de extração e secagem da BPPA.

(1) extrator (2) elevador de canecas (3) silo de resíduos (4) ciclone partículas maiores (5) ciclone partículas menores (6) coletor (7) transportador pneumático (8) tanque pulmão (9) ciclone secagem (10) ensacadeira. Tubulação azul para inserção do ar comprimido.

Fonte: (Autora, 2021)

Tabela 5.7 – Equipamentos principais da etapa de extração e secagem

Equipamento	**Capacidade nominal**	**Quantidade**
Extrator	3,7 m^3	1
Elevador de canecas	20 m^3/h	1
Silo	1,7 m^3	1
Ciclone partículas maiores	4,14 m	1
Ciclone partículas menores	2,17 m	1
Tanque pulmão	1,2 m^3	1
Ciclone secagem	3,59 m	2
Transportador pneumático	2 t/h	2
Ensacadeira	9 unidades/min	1

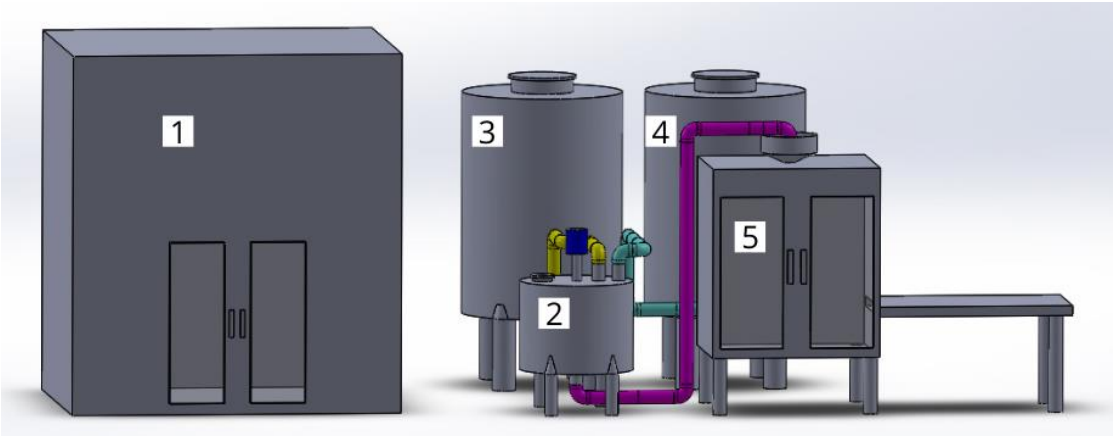
Fonte: (Autora, 2021)

5.2.6 FORMULAÇÃO

Por fim, tem-se a etapa de formulação do produto a ser comercializado, representada na Figura 5.11. No entanto, antes da formulação as embalagens de esporos obtidas são mantidas

em câmara fria (-16ºC), até que se tenha ordem de pedidos para que assim o produto seja formulado. Desta forma, os esporos descongelados, correspondentes a 10% (p/p) da formulação, são colocados no misturador juntamente a solução composta 89% (p/p) por óleo de soja, 10% (p/p) de solução Tween 80 (0,1%) e 1% (p/p) de carboximetilcelulase, sendo misturados até homogeneização. Depois por bombeamento são envasados em embalagens com capacidade de 1L de produto.

Figura 5.11 – Fluxograma de processo da etapa de formulação da BPPA.



(1) câmara fria (2) misturador (3) tanque armazenamento óleo de soja (4) tanque de armazenamento Tween 80 (5) envasadora. Tubulação amarela para adição do óleo de soja, Tubulação azul clara para adição da solução Tween. Tubulação roxa para passagem de material com células do fungo.

Fonte: (Autora, 2021)

Na Tabela 5.8 encontram-se relacionados os equipamentos presentes nessa etapa de processamento, suas capacidades nominais e a quantidade de equipamentos necessários para atender o processo.

Tabela 5.8 – Equipamentos principais da etapa de extração e secagem.

Equipamento	**Capacidade nominal**	**Quantidade**
Câmara fria	20 m^3	1
Tanque de armazenamento	120 L	1
Misturador	180 L	1
Envasadora	10 unidades/min	1

Fonte: (Autora, 2021)

5.3 Discussão sobre a proposição atual

Os fluxogramas de processo apresentados na seção anterior, resumem as escolhas feitas a fim de superar os principais desafios envolvidos na produção de esporos em escala industrial e alcançar uma redução no tempo operacional, bem como uma redução na mão de obra exigida e perdas do processo e ocorrência de contaminações exógenas. Nesta seção, comentam-se essas escolhas e os equipamentos propostos para aplicação no processo, assim como outras possibilidades existentes para resolução desses mesmos gargalos industriais.

Em primeiro lugar, deu-se a implementação de uma produção de fluxo linear tipo “U”. Neste layout as etapas apresentam-se na ordem em que as operações de produção são realizadas, permitindo a utilização de um menor número de estações, uma vez que, tem-se o agrupamento de tarefas (MILTENBURG, 1998). Além disso, este tipo de layout possibilita a redução do número de operadores alocados nos postos de trabalho e promove melhor comunicação entre eles, facilitando a resolução dos problemas.

A primeira mudança observada quando comparado ao processo de produção tradicional está no meio de cultivo utilizado. A adição de um resíduo agroindustrial, o bagaço de cana-de-açúcar, vem com o objetivo de atuar como suporte para o crescimento do microrganismo, possibilitando a estruturação do leito, reduzindo assim a compactação, auxiliando na melhor aeração e redução na elevação da temperatura. (CUNHA et al., 2020).

Dentro da etapa de preparo do substrato, o modelo do esterilizador apresentado foi idealizado a partir de um equipamento desenvolvido com o apoio da FAPESP por meio do programa Pipe (Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas) para esterilização dinâmica do substrato de cultivo dos cogumelos (EIRA, 2007). O equipamento consiste em um tambor horizontal rotativo, com capacidade de carregamento de 1,5 toneladas, dotado de uma rosca central em formato helicoidal que permite a agitação do substrato, empregado para o desenvolvimento de cogumelos, a base de serragem e farelo de cereais, reduzindo-se assim o binômio tempo/temperatura de esterilização e tornando esta operação mais homogênea. Quando comparado ao processo convencional de esterilização estática em autoclaves, os proponentes do projeto observaram grande redução, aproximada em 70%, no tempo operacional, além de praticamente eliminarem as contaminações exógenas, acarretando assim, uma redução inicial de custos na ordem de 40% (EIRA, 2007). Mais comumente aplicada, apesar das suas desvantagens, uma alternativa seria executar a esterilização dos materiais em autoclaves, num

processo em batelada. Todavia, o volume de material a ser processado exigiria desenhos especiais destas autoclaves para que a temperatura fosse uniforme dentro da câmara e a esterilização fosse eficiente. Previu-se ainda a necessidade de se operar quatro autoclaves simultaneamente, mantendo-se a escolha de equipamento da BPP que consistem em autoclaves com capacidade de 300 kg, para que o processo como um todo permanecesse contínuo, de modo que os tempos de carga, descarga e reinício da operação afetariam a produtividade. Desta forma a escolha do equipamento idealizado é justificável, apesar dos desafios de engenharia impostos à sua operação. Ressalte-se para os biorreatores de CES tambor rotativo recomenda-se um grau de enchimento volumétrico máximo de 60% (TADA; AGUDELO; THOMÉO, 2019).

Ainda na etapa de preparo do substrato, empregou-se água para resfriar o arroz em tambor rotativo visando o agrupamento de duas etapas, de resfriamento e de umidificação, objetivando a redução do tempo operacional, uma vez que, o grande conteúdo de arroz exigiria um longo período de resfriamento se realizado somente pela passagem contracorrente de ar seco resfriado. Em função desta escolha, fez-se necessária a realização da esterilização e resfriamento e umidificação do arroz e bagaço de cana em equipamentos separados, visto que, se umidificados juntos ocorreria a segregação das partículas, o que é indesejável para estruturação do leito.

Com o objetivo de diminuir o tempo operacional e levando-se em conta as diversas vantagens da produção bifásica dos esporos do *M. anisopliae,* (IWANICK et al., 2019) o preparo do inóculo foi estruturado visando sua produção por CSm, através de um escalonamento progressivo até a quantidade suficiente para inoculação da biomassa que adentra o biorreator de leito empacotado no cultivo principal. Tendo em vista que, em contraste com os conídios aéreos, os blastosporos gerados por cultura líquida necessitam menor tempo de incubação e germinam mais rápido, cerca de 3 dias, e seu processo de obtenção requer menor trabalho e é mais adaptável à automação, ocasionando um aumento na produção de conídios no substrato sólido, o uso desta técnica para produção de inóculo é justificável. No entanto, deve-se atentar ao custo do meio de cultivo líquido, uma vez que, grande parte dos meios utilizados para produção de blastosporos do *M. anisopliae* utilizam a composição tradicional de Adamek que apresenta grande concentração de extrato de levedura, considerado um componente caro. Porém, como solução tem-se a aplicação do xarope de milho como meio de cultivo eficiente para obtenção dos blastosporos, com um valor estimado em US$ 0,30/L, considerado acessível, quando comparado com o meio de ADAMEK que tem valor médio de US$ 2,10/L (IWANICKI et al., 2020). Como alternativa tem-se a produção de inóculo por CES, o qual demanda longo

tempo de preparo, cerca de 15 dias, bem como os danos de embebição causados aos esporos quando do preparo da suspensão de esporos, reduzindo sua viabilidade, de modo que a produção de inóculo por CSm é econômica e tecnicamente interessante.

Para o cultivo do fungo na corrente principal do processo, decidiu-se pelo uso de biorreatores de leito empacotado, pois Dorta & Arcas, (1998) Arzumanov et al., (2005), Van Breukelen et al., (2011), Mendez-Gonzales; Loera; Favela-Torres, (2018) e Cunha et al, (2020), demonstram esta possibilidade, ainda que tenham relatado problemas de compactação do meio e de elevação de temperatura acima do recomendável De um modo geral, em biorreatores de leito empacotado para CES, algumas estratégias foram bem sucedidas para eliminar ou minimizar estes problemas, como a melhora das características estruturais do meio, bem como o acomodamento progressivo do meio de cultura, utilizando redes para sustentação, o uso de tubos perfurados dispostos longitudinalmente no interior da coluna para melhor aeração e mudanças na direção do escoamento do ar ao longo do cultivo, assim como o maior domínio das condições operacionais. Desta forma, para uma melhor acomodação da biomassa, os biorreatores contam com uma rosca helicoidal central, ligeiramente menor que o diâmetro do equipamento, que terá a dupla função de proporcionar areação ao meio e dar-lhe sustentação, similarmente ao realizado por Oostra et al. (2000) e van Breukelen et al. (2011) em biorreatores de tambor de parede raspada para CES. A função de sustentação é necessária para evitar que o meio de cultivo sofra compactação na base do biorreator, como relatado por van Breukelen et al., (2011) e por Cunha et al. (2020). Assim, as modificações mecânicas e estruturais apresentadas para o biorreator de leito empacotado foram inicialmente implantadas com o intuito de resolver estes problemas, além do carregamento e descarregamento do biorreator. A partir dos resultados obtidos por Perez et al. (2020) os quais apontavam a ação benéfica do uso de um tubo central perfurado para dispersão do ar saturado ao longo de toda a extensão do biorreator, adotou-se alternativa similar introduzindo-se uma rosca sem fim helicoidal no eixo central do biorreator. Entretanto, este acessório, necessário à movimentação, areação e sustentação do meio de cultivo, limitou a capacidade volumétrica do biorreator em 70%. Nagel et al. (2001) também relataram as diversas vantagens alcançadas pela distribuição do ar no interior de um biorreator de parede raspada através do eixo central e pelos orifícios do suporte de cada pá e a aplicação das pás para suporte do material, alcançando melhor controle da temperatura e homogeneização do leito.

Os estudos presentes na literatura utilizam, geralmente reatores de poucos centímetros de diâmetro. Nestes biorreatores, o resfriamento condutivo pelas paredes pode contribuir para

a remoção do calor. Entretanto, em maiores escalas, os reatores são largos de maneira que a transferência de calor pelas paredes tem uma contribuição desprezível, logo o resfriamento condutivo é insuficiente. Em alguns estudos, utilizando biorreatores com diâmetro 20 cm, já se observa um perfil radial expressivo, com aumento de temperatura de até 10 ºC no centro do leito. As simulações executadas pelos autores em Casciatori et al. (2016) demonstram que, para biorreatores de leito empacotado com diâmetros a partir de 50 cm, a remoção de calor por meio da circulação de água pela camisa do biorreator não é eficiente no controle da temperatura interna ao longo do cultivo. Dessa forma, assumindo-se que os problemas de operação são solucionados pelas modificações no layout dos biorreatores estes são aplicáveis.

A extração dos esporos em tambor rotativo é uma alternativa promissora em substituição à extração em peneiras vibratórias. Jenkins et al., (1998) relatam superficialmente a utilização de um equipamento que realiza diversas rotações para que os esporos desprendam do substrato e, através de um alto fluxo de ar, sejam carregados e recolhidos em ciclone. Cunha (2020) expõe a extração dos esporos utilizando um tambor com alto fluxo de ar seco, realizando o desprendimento e o carregamento dos esporos para o ciclone, observando uma coleta de 61% dos esporos. Ressalte-se que este autor não otimizou a arquitetura interna do extrator e as condições de secagem do meio de cultivo e extração dos esporos, e ainda assim concluiu a operação em 12 h. Desta forma, uma vez que os problemas de engenharia do tambor e otimização da extração e captação dos esporos forem resolvidos, o processo teria possibilidade de apresentar aumento significativo na produtividade do processo. Além disso, o uso de dois ciclones em paralelo possibilita aumentar a eficiência de coleta, pois juntamente aos esporos também são arrastados resíduos de arroz e micélio fúngico e principalmente as partículas de esporos diferem bastante quanto ao seu tamanho, apresentando maior eficiência quando se adota ciclones com maior especificidade. Este modelo de extração é simples e permite uma redução expressiva no tempo operacional, quando comparado aos processos convencionais encontrados na indústria, tornando-se viável para aplicação.

O ciclone é considerado um dos equipamentos de separação sólido-fluido mais simples, de fácil construção e operação. O baixo custo de investimento e manutenção dos ciclones tornam este equipamento muito atrativo, além de ser facilmente adaptável a condições operacionais extremas como elevadas concentrações de partículas (ENLIANG; YINGMIN, 1989). Embora o maior uso do ciclone seja como separador de partículas sólidas, também tem sido usado para outros fins, como a secagem. O uso do ciclone comum como secador foi estudado por Silva (1991), onde foram obtidos resultados experimentais satisfatórios para a

utilização do mesmo na secagem. Como alternativa tem-se a utilização de estufas de convecção forçada, sendo necessário a operação de diversas estufas simultaneamente bem como a demanda de maior tempo operacional.

A formulação é etapa de grande importância no desenvolvimento de um produto microbiano, principalmente quando se trata de produtos à base de propágulos infectivos vivos. Tendo em vista a hidrofobicidade dos conídios de *M. anisopliae* a formulação a base de óleos emulsionáveis é uma das mais simples, além de aumentar a eficiência de aplicação, protegem contra danos de embebição e apresenta maior tolerância a radiação ultravioleta, sendo esta a formulação de maior benefício apresentada atualmente para comercialização dos esporos no mercado brasileiro (LOPES; FARIA, 2019)

Por fim, para o direcionamento da biomassa residual, optou-se pela venda deste material para outras empresas de beneficiamento. Leme et al. (2018) avaliaram a viabilidade do uso dos subprodutos do arroz provenientes da produção de fungos entomopatógenicos como constituinte de alimentação animal e constataram que as características nutricionais do resíduo possibilitam que este se apresente como substituto do milho em rações. No entanto, faz-se necessário a avaliação real da possibilidade de utilização deste resíduo na alimentação animal, bem como a adequação com os parâmetros estipulados pela legislação. Outra opção seria a queima deste material para a para geração de bioenergia, o que é potencialmente viável, pois os resíduos apresentam altas concentrações de carboidratos polimerizados. (COSTA, 2009).

5.4 Reuso do substrato

Embora o arroz seja o substrato mais empregado no cultivo de *M. anisopliae*, pois possui nutrientes facilmente assimiláveis pelo microrganismo e em altas concentrações, tem grande área superficial e mantém sua estrutura física ao longo do cultivo, é um dos maiores custos de produção dos esporos (DORTA; ARCAS, 1998; KRUGER et al., 2014; RANGEL et al., 2004; VICENTE, 2021). Desta forma, uma alternativa para redução de custos seria a reutilização do substrato em cultivos sucessivos. Entretanto, poucos estudos foram publicados na literatura reutilizando o arroz, os quais o cultivaram apenas em duas vezes consecutivas, ambos em embalagens plásticas, sendo os resultados similares para ambos os cultivos (BARRA-BUCAREI; VERGARA; CORTES, 2016; KRUGER et al., 2014).

Cunha et al. (2020) realizaram o cultivo dos esporos adotando a mistura de arroz e bagaço de cana, na mesma proporção ao utilizado pela BPPA, 9:1, em três cultivos sucessivos em biorreator de leito empacotado. Após extração dos esporos observou-se que não houve variação significativa na concentração média de esporos ao final dos cultivos, havendo apenas uma redução da massa de meio em 20% do primeiro uso para o segundo e de 23% do segundo cultivo para o terceiro. Desta forma, pode-se dizer que o reuso do substrato é uma prática que pode resultar em expressiva redução de custos operacionais para os fabricantes de esporos. No entanto buscando uma produção de esporos com vigor e virulência, não se deve realizar a extração dos esporos com solução Tween 80, composta basicamente por água, como feito pelos trabalhos citados anteriormente, uma vez que, tem-se os danos de embebição que afetam diretamente na qualidade dos esporos.

O esporo pode se manter viável por extensos períodos de tempo, sem a utilização de nutrientes, porém retornam à atividade assim que encontram condições favoráveis (CAVALCANTE, 2014). Desta forma, devem ser metabolicamente dormentes, ou seja, conter pouco ou nenhum composto de alta energia, o que é negligenciado quando se adiciona água sem nenhum preparo prévio aos esporos, sem levar em consideração a alta hidrofobicidade, lesionando a membrana plasmática e consequentemente desativando os aparatos de germinação, inviabilizando esta célula.

Tendo em vista que o processo de produção da BPPA se dá totalmente de forma automatizada e pela passagem por diversos equipamentos que podem ocasionar a quebra das partículas de arroz com o passar dos cultivos, interferindo na produtividade do processo, para alcance de uma redução no consumo de substrato de forma realista adotou-se apenas a reutilização do substrato por uma única vez. Vale salientar que a extração dos esporos aqui proposta é a seco, de modo que os problemas de embebição em água anteriormente mencionados não estão previstos.

Ao final da etapa de extração, o resíduo sólido é armazenado no tanque de resíduos e deste será encaminhado por meio de um elevador de canecas para um sistema de peneiras para a remoção do bagaço de cana. Posteriormente, o arroz passa pela etapa de preparo do substrato anteriormente descrita e é misturado a um novo bagaço de cana. O cultivo será em biorreatores menores que os empregados para arroz de primeiro cultivo, sendo necessário a adoção de uma nova linha de extração e armazenamento de resíduos para o reuso.

Tendo-se em vista a produção de $3{,}5.10^{12}$ esporos/kgas (CUNHA et al., 2020) o primeiro cultivo, a redução da massa de cultivo em 20% e a produção de $3{,}45.10^{12}$ esporos/kgas (CUNHA et al., 2020) no reuso, bem como a necessidade produtiva da BPPA, estimada em 6.10^{17} esporos/ano, possibilitou-se calcular a massa de arroz utilizada no reuso, considerando-se uma redução em 20% na massa após a incubação estimada em 76,80 t/ano (Equação 5.19), bem como a massa de arroz necessária a ser adquirida pela biofábrica estimado em 96 t/ano (Equação 5.20), possibilitando uma redução de 44,3% do substrato a ser adquirido pela biofábrica (Equação 5.21).

$$AR_{reuso} = \frac{AR_{total} \cdot (100 - R_{arroz})}{100} \tag{5.19}$$

$$AR_{total} = \frac{(ESR_{total} - AR_{reuso} \cdot ESB_{UFC} \cdot PES_{médio})}{ESB_{UFCreuso} \cdot PES_{médio}} \tag{5.20}$$

$$R_{arrozconsumido} = 100 - \left(\frac{AR_{total} \cdot 100}{AR_{inicialseco}}\right) \tag{5.21}$$

Sendo:

AR_{reuso} – arroz tipo 1 consumido nos biorreatores de reuso, em tas/dia

AR_{total} – arroz tipo 1 consumido realizando o reuso, em tas/dia

ESR_{total} – esporos totais a serem produzidos com o reuso, em esporos/dia

ESB_{UFC} – esporos produzidos em biorreator de leito empacotado, em esporos/tas

$ESB_{UFCreuso}$ – esporos produzidos em biorreator de leito empacotado no reuso, em esporos/tas

$R_{arrozconsumido}$ – redução na massa de arroz a ser adquirida pela BPPA, em esporos/tas

De acordo com a análise econômica realizada por Vicente (2021) o arroz utilizado por uma biofábrica de mesmo porte da BPP representa 15,3%, valor significativo do OPEX (*Operational Expenditure*) que representa os custos necessários para manter o funcionamento contínuo do processo. Desta forma, a reutilização do arroz por pelo menos um único processo é de grande impacto do ponto de vista econômico e principalmente do ponto de vista ambiental, uma vez que, se tem a redução em 43% do resíduo agroindustrial gerado. No entanto, deve-se avaliar qual a real redução nos custos operacionais, tendo em vista a necessidade de novos equipamentos.

6 PROCESSO DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL DE ESPOROS DE *METARHIZIUM ANISOPLIAE*: PROPOSIÇÃO ATUAL EXPANDIDA

Com crescimento anual de 15% a 20% no mercado de bioinseticidas microbiológicos previsto para os próximos 5 anos (ABCBio, 2020), muito provavelmente, com a produção semi-artesanal adotada por grande parte das biofábricas brasileiras, não se terá esporos suficientes para suprir a demanda esperada. Desta forma propôs-se uma produção modificada em uma maior escala.

Para maior adequação da proposição expandida adotou-se como modelo a empresa Koppert. A Koppert biological systems está presente no Brasil desde 2011 sendo uma das maiores produtoras de produtos microbiológicos, detendo atualmente capacidade de aplicação, com sua produção anual dos esporos de *M. anisopliae,* em aproximadamente 600.000 hectares de cana de açúcar, abrangendo 20% do mercado atual.

Desta forma, buscando adequar a nova proposição ao um cenário de produção semelhante ao da Koppert, estudou-se a implementação da BGP, biofábrica de grande porte. Para tanto se faz necessário a produção de 6.10^{18} esporos/ano (Equação 6.1).

$$ES_{UFC} = A_{produção} \cdot ES_{letalidade} \quad (6.1)$$

Sendo:

ES_{UFC} – produção de esporos necessária da BGP, em esporos/ano

$ES_{letalidade}$ – aplicação de esporos necessários para letalidade das pragas, em esporos/hectares

$A_{produção}$ – área de aplicação beneficiada pela produção da BGP, em hectares/ano

A princípio levou-se em consideração adequar todos os equipamentos presentes para a demanda de produção diária da BGP, no entanto para isto, mantendo-se a necessidade de 12 biorreatores, estes teriam volume de trabalho estimado em 40 m^3, com diâmetro equivalente a 3 m e altura de 5,70 m.

Tendo em vista os mesmos problemas de operação e as soluções de engenharia adotadas para os biorreatores de 4 m^3, estes seriam aplicáveis para biorreatores de maior capacidade. No entanto, buscando avaliar uma outra alternativa, levando em consideração as etapas que

ocorrem anteriormente ao carregamento dos biorreatores de leito empacotado, contemplando as etapas de estoque e preparo do substrato, pode-se determinar o tempo operacional demandado por estas operações, levando-se em consideração o tempo de cada operação, bem como o tempo necessário para o deslocamento dos materiais e as capacidades nominais dos equipamentos. Alcançando uma demanda de aproximadamente 2 horas para realizar estas etapas do processo na BPPA, ficando estes equipamentos o restante do dia produtivo ociosos. Desta forma, faz-se possível o carregamento de 3 biorreatores/dia com um volume de 13,33 m^3, admitindo que estas etapas mantem a mesma duração, possibilitado pela ampliação da capacidade nominal dos equipamentos.

Com estas considerações e admitindo que as questões técnicas estão resolvidas pode-se adotar qualquer uma das duas configurações propostas para os biorreatores de leito empacotado, sem grandes problemas de aquecimento, tendo em vista as modificações no layout do equipamento de cultivo. No entanto, buscando uma maior segurança operacional, bem como uma maior praticidade no carregamento e descarregamento dos biorreatores, optou-se pela adoção dos biorreatores de menor volume.

Para tanto, tendo em vista a necessidade de consumo de 1714,29 t/ano de arroz (Equação 6.2) e 190,48 t/ano de bagaço de açúcar (Equação 6.3) e a presença de 36 biorreatores para cultivo contínuo na BGP, estes trabalharão com um volume de 2,04 t/biorreator, tendo os biorreatores um volume total de 13,33 m^3 (1,95 m de diâmetro e 4,46 m de altura).

$$AR_{inicialseco} = \frac{ES_{UFC}}{ESB_{UFC}} \tag{6.2}$$

$$BGC_{incialseco} = \frac{AR_{inicialseco} \cdot 10}{90} \tag{6.3}$$

Sendo:

$AR_{inicialseco}$ – arroz tipo 1 seco consumido anualmente, em tas/ano

ESB_{UFC} – esporos produzidos em biorreator de leito empacotado, em esporos/tas

$BGC_{inicialseco}$ – bagaço de cana-de-açúcar seco consumido anualmente, em tbs/ano

Realizando os cálculos de maneira semelhante ao da BPPA, com as mesmas considerações pode-se estabelecer o balanço geral da BGP apresentado na Tabela 6.1, bem como o redimensionamento dos principais equipamentos identificados na Tabela 6.2.

Tabela 6.1 – Balanço material global da nova proposição para BGP.

Tempo de operação (continua)

Descrição	Valor	Unidade
Dias por ano	365	dias
Aproveitamento	85	%
Tempo efetivo de produção em dias	310	dias
Tempo efetivo de produção em horas	2480	horas

Estoque

Descrição	Valor	Unidade
Arroz inicial seco utilizado anualmente	1714,29	tas/ano
Arroz inicial seco utilizado diariamente	5,53	tas/dia
Arroz inicial *in natura* utilizado anualmente	1984,00	t/ano
Arroz inicial *in natura* utilizado diariamente	6,40	t/dia
Bagaço inicial seco utilizado anualmente	190,48	tbs/ano
Bagaço inicial seco utilizado diariamente	0,61	tbs/dia
Bagaço inicial *in natura* utilizado anualmente	346,30	t/ano
Bagaço inicial *in natura* utilizado diariamente	1,12	t/dia

Preparo dos materiais

Descrição	Valor	Unidade
Água utilizada para umidificação do arroz anualmente	1719,40	m^3
Água utilizada para umidificação do arroz diariamente	5546,50	L/dia
Arroz úmido	3234,53	t/ano
Arroz úmido diariamente	10,42	t/dia
Água utilizada para umidificação do bagaço anualmente	191,00	m^3
Água utilizada para umidificação do bagaço diariamente	616,36	L/dia
Bagaço úmido	359,40	t/ano
Bagaço úmido diariamente	1,25	t/dia

Tabela 6.1 – Balanço material global da nova proposição para BGP.

(continuação)

Inóculo utilizado anualmente	51428,66	L/ano
Inóculo utilizado diariamente	165,89	L/dia
Arroz inoculado anualmente	3286,08	t/ano
Arroz inoculado diariamente	10,62	t/dia

Produção de Inóculo

Descrição	**Valor**	**Unidade**
Cultura estoque		
BDA utilizado anualmente	14,95	kg/ano
BDA utilizado diariamente	0,048	kg/dia
Solução Tween 80 (0,1%) utilizada anualmente	571,40	L/ano
Solução Tween 80 (0,1) utilizada diariamente	1,84	L/dia
Suspensão de esporos gerada anualmente	571,40	L/ano
Suspensão de esporos gerada diariamente	1,84	L/dia
Pré-cultura		
Inóculo gerado na pré-cultura anualmente	5714,30	L/ano
Inóculo gerado na pré-cultura diariamente	18,43	L/dia
Cultura		
Inóculo gerado na cultura anualmente	51428,66	L/ano
Inóculo gerado na cultura diariamente	165,89	L/ano

Incubação/Pré-secagem

Descrição	**Valor**	**Unidade**
Mistura de cultivo seca incubada anualmente	1904,82	tss/ano
Mistura de cultivo seca incubada diariamente	6,14	tss/dia
Mistura de cultivo incubada por biorreator	2,04	tss/biorreator

Tabela 6.1 – Balanço material global da nova proposição para BGP.

		(continuação)
Mistura de cultivo incubada anualmente	3655,41	t/ano
Mistura de cultivo incubada diariamente	11,82	t/dia
Mistura de cultivo incubada por biorreator	3,94	t/biorreator
Esporos secos gerados na incubação anualmente	55,70	t de esporos secos (tes)/ano
Esporos secos gerados na incubação diariamente	0,18	tes/dia
Esporos secos gerados na incubação por biorreator	0,06	tes/biorreator
Esporos gerados na incubação anualmente	75,60	t/ano
Esporos gerados na incubação diariamente	0,24	t/dia
Esporos gerados na incubação por biorreator	0,08	t/biorreator
Resíduo seco gerado anualmente	1560,00	trs/ano
Resíduo seco gerado diariamente	5,03	trs/dia
Resíduo gerado anualmente	2589,60	t/ano
Resíduo gerado diariamente	8,35	t/dia
Esporos obtidos após pré-secagem anualmente	62,40	t/ano
Esporos obtidos após pré-secagem diariamente	0,20	t/dia
Esporos obtidos após pré-secagem por biorreator	0,07	t/biorreator

Extração/Secagem

Descrição	Valor	Unidade
Esporos obtidos após secagem anualmente	5,93	t/ano
Esporos obtidos após secagem diariamente	0,019	t/dia

Formulação

Descrição	Valor	Unidade
Esporos utilizados para a formulação anualmente	5,93	t/ano

Tabela 6.1 – Balanço material global da nova proposição para BGP.

		(continuação)
Esporos utilizados por formulado	0,019	t/unidade
Óleo de soja utilizado para a formulação anualmente	52,80	L/ano
Óleo de soja utilizado por formulado	0,88	mL/unidade
Carboximetilcelulose utilizada para a formulação anualmente	540,00	kg/ano
Carboximetilcelulose utilizada por formulado	9,00	g/unidade
Solução Tween 80/ (0,1%) utilizada para a formulação anualmente	5,41	L/ano
Solução Tween 80/ (0,1%) utilizada por formulado	0,09	mL/unidade

Fonte: (Autora, 2021)

Tabela 6.2 – Equipamentos principais da BGP.

Equipamento	**Capacidade nominal**	**Quantidade**
Esterilizador	6,67 m^3	2
Inoculador	6,67 m^3	1
Misturador	8,33 m^3	1
Biorreator agitado pré-cultura	0,008 m^3	3
Biorreator agitado cultura	0,07 m^3	4
Biorreator	13,33 m^3	36
Extrator	12,33 m^3	1
Misturador (formulação)	600 L	1

Fonte: (Autora, 2021)

7 AVALIAÇÃO ECONÔMICA

Para avaliação do impacto das mudanças realizadas da BPP para o sistema de produção da BPPA avaliou-se o CAPEX (*Capital Expenditure)*, que representa a quantidade de recursos destinados a investimentos em bens de capital de uma companhia. Esse tipo de custo pode ser voltado para manter ou até expandir o escopo das operações de uma empresa, como neste caso, a construção de uma nova fábrica.

Desta forma, obteve-se o orçamento em empresas especializadas dos principais equipamentos que compõem o processo produtivo da BPPA em suas respectivas capacidades nominais, possibilitando estimar os custos diretos e indiretos envolvidos no CAPEX, como apresentado na Tabela 7.1.

Tabela 7.1 – CAPEX da BPPA.

(continua)

Custos Diretos				
Etapas	**Descrição**	**Und (R$)**	**Qtde**	**Total (R$)**
Estoque	Elevador de canecas AISI 43025 m3/h	6.300	1	6.300
	Transportador helicoidal SAE 102040 t/h	1.200	1	1.200
	Silo de alimentação SAE 102011 m3	12.600	2	25.200
	Balança SAE 10201 t	18.900	1	18.900
Preparo do substrato	Elevador de Canecas AISI 43020 m3/h	5.999	1	5.999
	Esterilizador AISI 4432 m3	18.900	2	37.800
	Inoculador AISI 4432 m3	13.050	1	13.050
	Transportador de caneca SAE 102010 m3/h	3.981	1	3.981
	Transportador helicoidal SAE 102040 t/h	1.200	3	3.600
	Gerador de vapor industrial	16.899	1	16.899
	Misturador AISI 4302,5 m3	9.080	1	9.080

Tabela 7.1 – CAPEX da BPPA.

(continuação)

Produção de inóculo	Esterilizador AISI 4430,003 m3	5.900	1	5.900
	Inoculador AISI 4300,003 m3	3.600	1	3.600
	Biorreator agitado pneumaticamente AISI 4300,0025 m3	6.000	4	24.000
	Tanque pulmão AISI 4300,0025 m3	2.500	1	2.500
	Esterilizador AISI 4430,028 m3	4.250	1	4.250
	Inoculador AISI 4300,028 m3	3.700	1	3.700
	Biorreator agitado pneumaticamente AISI 4300,021 m3	8.320	3	24.960
	Tanque pulmão AISI 4300,021 m3	1.350	1	1.350
	Compressor de ar	8.091	1	8.091
	Câmara de fluxo laminar Classe 100 AISI 304	11.435	1	11.435
	BOD-342 litros	7.535	1	7.535
	Balança analítica	5.903	1	5.903
	Fluxômetro de ar	232	7	1.624
	Filtro de ar	327	1	327
Incubação	Elevador de canecas AISI 44320 m3/h	5.999	2	11.988
	Transportador helicoidal SAE 102040 t/h	890	8	7.120
	Biorreator de leito empacotado AISI 443 3,2 m3	20.750	12	249.000
	Reservatório de água	6.000	1	6.000
	Filtro de ar	480	1	480
	Umidificador de ar	4.295	1	4.295
	Secador de ar	4.800	1	4.800
	Compressor de ar	19.000	1	19.000
	Fluxômetro de ar	316	12	3.792
Extração e secagem	Extrator AISI 4433,7 m3	16.830	1	16.830
	Elevador de Canecas AISI 44320 m3/h	4.200	1	4.200

Tabela 7.1 – CAPEX da BPPA.

(continuação)

	Silo de armazenamento SAE 10201,7 m3	11.890	1	11.890
	Ciclone SAE 1020	4.360	1	4.360
	Ciclone SAE 1020	3.790	1	3.790
	Ciclone de secagem SAE 1020	3.790	2	7.580
	Transportador pneumático AISI 4432 t/h	1.350	2	2.700
	Tanque pulmão AISI 4300 1,2 m3	3850	1	3850
	Ensacadeira IMBAL 9 unidades/min	5.600	1	5.600
Formulação	Câmara Fria inox 20m^3	42.000	1	42.000
	Reservatório 120 l	2.800	2	5.600
	Misturador AISI 443	3.900	1	3.900
	Envasadora APF 10002B10 unidades /min	7.800	1	7.800
Outros	Ar condicionado	2.000	2	4.000
	Microscópio biológico	2.405	1	2.405
	Bomba centrífuga	3.057	10	30.570
				R$ 710.743,10

Custos Indiretos		
AUTOMAÇÃO		
Aquisição de instrumentação e painéis de energia	10 % equipamentos	**71.074,31**
MONTAGEM E INTERLIGAÇÕES		
Realização de interligações de processo, válvulas, empreiteira	15% equipamentos	**106.611,47**
OBRA CIVIL		

Tabela 7.1 – CAPEX da BPPA.

(continuação)

Realização de fundação e bases civis		5% equipamentos	**35.537,16**
ENGENHARIA E SUPERVISÃO			
Engenharia e assessoria		15% equipamentos	**106.611,47**
Contingência	0,20*CF[1]	0,20	206.115,50
Contratos	0,05*CF	0,05	51.528,87
			R$ 319.834,40
CAPITAL DE GIRO (working capital)			
Capital de Giro (0,2*CF)		0,20	**248.219,37**

[1] Custo Fixo (CF) – Somatório dos custos diretos e indiretos

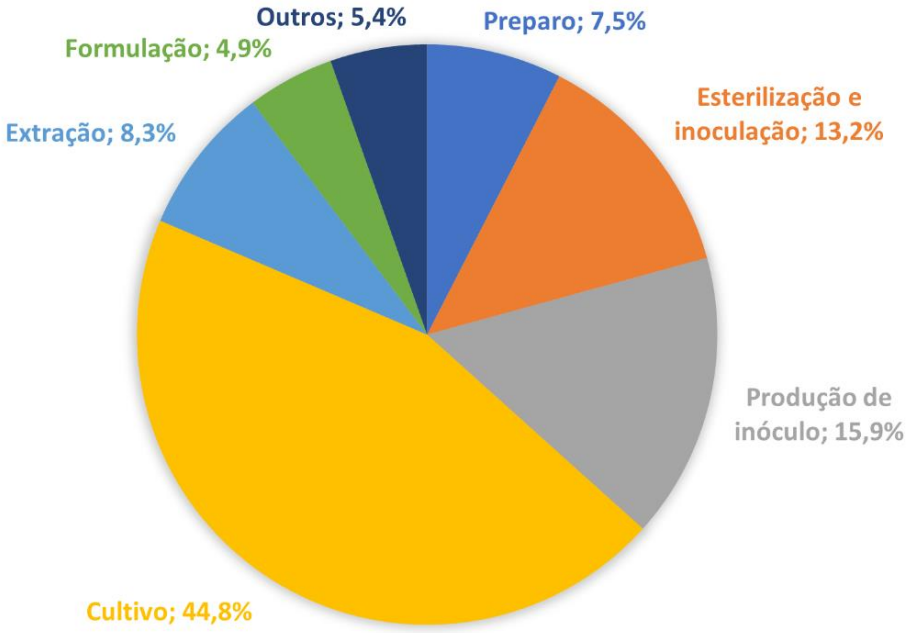
Fonte: (Autora, 2021).

Realizando o breakdown do CAPEX com base nas etapas de processo da BPPA, apresentado na Figura 7.1, nota-se que a etapa de incubação é a que demanda maior investimento, sendo os biorreatores de leito empacotado responsáveis por aproximadamente 45% dos custos diretos. A segunda etapa que exige maior investimento é a de produção de inóculo, justificável pelo uso de muitos equipamentos, no total 27, que representam quase 15% dos equipamentos necessários para funcionamento da BPPA como proposto.

Vicente (2021) realizou a avaliação econômica para uma produção tradicional em uma biofábricas de pequeno porte, adotando os equipamentos descritos na Seção 4, apresentando um custo direto de R$446.098,00 e indireto de R$124.419,60, com a aplicação de apenas 16 equipamentos no processo produtivo, sendo a autoclave e as câmaras frias os equipamentos de maior custo, que correspondem a 88% dos custos diretos. Comparando-se com os custos estimados para a BPPA, observa-se um aumento 59% no investimento em equipamentos, que se deve ao aumento expressivo no número de equipamentos utilizados para a produção, passando de 16 para 109 equipamentos adotados na BPPA. Vale salientar que Vicente (2021) representa a necessidade de duas câmaras frias com capacidade de 29 m^3.

O capital de giro calculado com base nos custos do CAPEX representa o investimento mensal para aquisição dos bens, independente da receita a ser gerada pela BPPA. Para real avaliação do impacto econômico das novas proposições da BPPA, faz-se necessário a determinação do OPEX (*Operational Expenditure*), no entanto as especificações necessárias para este cálculo não foram estabelecidas neste trabalho.

Figura 7.1 – Breakdown CAPEX por etapas do processo da BPPA.



Fonte: (Autora, 2021).

Os indicadores calculados por Vicente (2021) demostram que o investimento em uma empresa com operação semelhante à da BPP apresentam um ótimo retorno, uma vez tem-se a estimativa de um valor presente líquido (VPL) de R$ 14.002.518, representando um alto fluxo de caixa, o que é positivo para o negócio, bem como uma taxa interna de retorno (TIR) em torno de 261,98%, demonstrando a alta rentabilidade anual da biofábricas e um Payback de praticamente 1 ano para que obtenha-se o retorno sobre o capital investido, principalmente para compra de equipamentos e instalação.

Desta forma, tendo em vista as diversas vantagens da BPPA perante a produção da BPP, como a redução do número de funcionários pela adequação do layout e automatização, a redução em 10 dias do tempo necessário para produção de uma mesma concentração de esporos,

assim como a menor área industrial exigida para o cultivo, tendo em vista a utilização 16,01 m^2 para incubação de 12 dias de cultivo nas prateleiras da BPP enquanto os 12 biorreatores ocupam 14,48 m^2, apresentando uma redução de 9,5%, pode-se afirmar que é viável a adoção da nova proposição. Ademais, as contaminações exógenas reduzidas pelo melhor controle das operações e automatização, tornam o processo adotado pela BPPA ainda mais seguro.

8 CONCLUSÃO

Neste trabalho, um processo contínuo e moderno de produção de conídios do fungo *M. anisopliae* foi apresentado e detalhado em termos do balanço material e dos principais equipamentos envolvidos, sendo a incubação do fungo realizada em arroz em cultivo em estado sólido em biorreatores de leito empacotado.

Neste processo, o inóculo será preparado por cultivo submerso e a incubação será feita por cultivo em estado sólido, adotando-se a técnica de cultivo bifásico. No preparo do inóculo serão empregados biorreatores de tanque agitado tendo xarope de milho como substrato principal e na incubação para a produção final de esporos será utilizado o cultivo em estado sólido em biorreatores de leito empacotado e arroz como substrato, tendo bagaço de cana como meio auxiliar para dar estrutura física do leito. A esterilização dos materiais ocorrerá em tambor rotativo inclinado, assim como o resfriamento, a inoculação e mistura. A extração dos esporos ocorrerá em tambor rotativo acoplado a dois ciclones em série, bem como a secagem que será realizada em dois ciclones pela recirculação da corrente de ar. Por fim, a formulação oleosa ocorrerá em um tanque agitado.

A planta da BPPA foi projetada com um total de 12 biorreatores de leito empacotado de 4 m^3 cada, apresentando uma produção anual total de 6.10^{17} esporos. Tendo em vista, a possibilidade de expansão da proposição para uma produção 10 vezes maior, devido o tempo ocioso de grande parte dos equipamentos, fez-se a adequação das capacidades nominais dos equipamentos, tendo a projeção da planta da BGP com um total de 36 biorreatores de leito empacotado de 13,33 m^3, apresentando produção anual total de 6.10^{18} esporos.

Por fim, realizou-se a avaliação do impacto causado pela reutilização por uma única vez do arroz, alcançando-se uma redução de 44,3% do substrato a ser adquirido. Fez-se a avaliação econômica da aplicação de um processo produtivo como o da BPPA, evidenciando que apesar do aumento dos custos com equipamentos, a economia com mão de obra, tempo produtivo e a redução de perdas provenientes das contaminações frequentes, tornam a adoção das novas proposições provavelmente de extrema viabilidade, no entanto necessita uma avaliação mais aprofundada.

De maneira geral, tanto o balanço material quanto o fluxograma de processo apresentados nesse trabalho dão andamento as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de uma produção industrial de esporos por CES de maneira mais sofisticada. Os detalhes

operacionais descritos servem para ampliar as perspectivas tanto do planejamento e estruturação da planta, quanto para dimensionar, de forma mais efetiva, os desafios a serem enfrentados para o estabelecimento de um processo não convencional.

9 TRABALHOS FUTUROS

No sentido de aprimorar a estrutura apresentada para processo de produção industrial de esporos do *M. anisopliae*, como continuação do presente trabalho, um estudo do balanço energético e uma simulação, visando a verificação da integridade dos projetos e de suas funcionalidades práticas deve ser realizado para tornar o processo de obtenção desses esporos uma alternativa mais competitiva do ponto de vista econômico. Para tanto, deve-se dar continuidade a avaliação econômica determinando-se o OPEX e os indicadores de interesse, para assim realmente quantificar a viabilidade, bem como avaliar o real impacto do reuso do substrato.

Do ponto de vista técnico, estudos voltados para o desenvolvimento e aprimoramento dos equipamentos e operações aqui apresentados devem ser executados buscando vencer as limitações tecnológicas ainda existentes principalmente para as operações de esterilização contínua, cultivo em estado sólido em biorreatores de escala industrial e extração.

REFERÊNCIAS

ABCBIO. Biodefensivos: Mercado e percepção do produtor brasileiro. ABCBio, p. 32–37, 2018.

ALMEIDA, K.Y.M. Efeito de surfactantes na estimativa da densidade bacteriana em amostras de petróleo. Dissertação de mestrado em Engenharia Química da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2007.

ALVES, R. T.; FARIA, M. Documentos 286 Pequeno Manual sobre Fungos Entomopatogênicos Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Cerrados Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS EMPRESAS DE CONTROLE BIOLÓGICO. ABCBio projeta expansão de mercado. Disponível em: <http://www.abcbio.org.br/conteudo/publicacoes/associacao-brasileiradas-empresasde-controle-biologico-projeta-expansao-de-mercado/>. Acesso em: 5 de novembro de 2020.

ARAÚJO, I. DA S. et al. Perspectivas atuais da utilização de bioinseticidas em *Spodoptera frugiperda* (*Lepidoptera: Noctuidae*). v. 027, p. 20–27, 2019.

ARORA, S. et al. Effect of mixing events on the production of a thermo-tolerant and acid-stable phytase in a novel solid-state fermentation bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 61, n. December 2016, p. 12–23, 2017.

ARRUDA,W. Caracterização molecular e morfofisiológica de diferentes isolados do fungo entomopatogênico Metarhizium anisopliae e análise morfológica do processo de infecção em *Boophilus microplus*. Tese de doutorado em Biologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

ARZUMANOV, T.; JENKINS, N.; ROUSSOS, S. Effect of aeration and substrate moisture content on sporulation of *Metarhizium anisopliae* var. *acridum*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 3–4, p. 1037–1042, 2005.

ASHRAF, M. et al. Influence of entomopathogenic fungus, *Metarhizium anisopliae*, alone and in combination with diatomaceous earth and thiamethoxam on mortality, progeny production, mycosis, and sporulation of the stored grain insect pests. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 36, p. 28165–28174, 2017.

BARRA-BUCAREI, L.; VERGARA, P.; CORTES, A. Conditions to optimize mass production of *Metarhizium anisopliae (metschn.) sorokin* 1883 in different substrates. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 76, n. 4, p. 448–454, 2016.

BENELLI, G. et al. Control of biting lice, *Mallophaga* − a review. **Acta Tropica**, v. 177, n. June 2017, p. 211–219, 2018.

BLOUCH, A. et al. Comparative Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Commercial Formulations against Leaf Worm, Spodoptera litura Fabricius under Laboratory Conditions. **Pakistan Journal of Zoology**, v. 52, n. 2, p. 609–616, 2020.

BRANDÃO, J. R. Análise de sistemas de valorização de resíduos via compostagem e reciclagem e sua aplicabilidade nos municípios mineiros de pequeno porte. p. 90, 2006.

BRASIL FOOD TRENDS 2020. São Paulo: Federação das Indústrias do Estado de São Paulo: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2020. 176 p. Disponível em: <http://www.brasilfoodtrends.com.br/Brasil_Food_Trends/index.html>.Acesso em: 20 de fevereiro. 2021.

CASCIATORI, F. P. et al. Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 103–116, 2016.

CAVALCANTE, D.A. Ultraestrutura e termorresisntência de esporos e identificação de proteínas e bactérias aeróbicas de solo do Distrito Federal. Dissertação de mestrado em Biologia Microbiana da Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2014.

CUNHA, L. P. et al. Production of conidia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* ICB 425 in a tray bioreactor. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 11, p. 1757–1768, 2019.

CUNHA, L. P. et al. *Metarhizium anisopliae* conidia production in packed-bed bioreactor using rice as substrate in successive cultivations. **Process Biochemistry**, v. 97, n. April, p. 104–111, 2020.

DALLASTRA, E. D. G.; RAMALHO, E. X.; GRAJALES, L. M. Análise do aumento de escala de produção do fungo entomopatogênico *metarhizium anisopliae* por fermentação em estado sólido. p. 2065–2068, 2018.

DALZOTO, P. R.; UHRY, K. F. Controle Biológico De Pragas No Brasil Por Meio De *Beauveria Bassiana* (Bals.) Vuill 37. **Biológico**, v. 71, n. 1, p. 37–41, 2009.

DAMALAS, C. A.; KOUTROUBAS, S. D. Current status and recent developments in biopesticide use. **Agriculture (Switzerland)**, v. 8, n. 1, 2018.

DE JONG, W.; VAN OMMEN, J. R. **Biomass as a sustainable energy source for the future: Fundamentals of conversion processes.** Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2014. v. 9781118304

DORTA, B.; ARCAS, J. Sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-state fermentation with forced aeration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7–8, p. 501–505, 1998.

DORTA, B.; ERTOLA, R. J.; ARCAS, J. Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid-substrate fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, n. 6, p. 434–439, 1996.

DOS SANTOS, M. L. et al. Study of the storage conditions of the sugarcane bagasse through thermal analysis. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 507–511, 2011.

ENLIANG, L.; YINGMIN, W. A new collection theory of cyclone separators. **AIChE Journal**, v. 35, n. 4, p. 666–669, 1989.

FARINAS, C. S. et al. **Desenvolvimentos em fermentação em estado sólido para produção de enzimas de interesse agroindustrialConceitos e aplicações da instrumentação para o avanço da agricultura (2014)**, 2014.

FONTES, E. M. G.; VALADARES-INGLIS, M. C. Controle Biológico de pragas da agricultura. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia Ministério da Agricultura, Pecúaria e Abastecimento. 2020.

GUIJARRO, B. et al. Effect of drying on conidial viability of *Penicillium* frequentans, a biological control agent against peach brown rot disease caused by *Monilinia spp*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 16, n. 3, p. 257–269, 2006.

HONG, T. D.; JENKINS, N. E.; ELLIS, R. H. The effects of duration of development and drying regime on the longevity of conidia of *Metarhizium flavoviride*. **Mycological Research**, v. 104, n. 6, p. 662–665, 2000.

HU, G.; ST. LEGER, R. J. Field studies using a recombinant mycoinsecticide (*Metarhizium anisopliae*) reveal that it is *Rhizosphere competent*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6383–6387, 2002.

IWANICKI, N. S. et al. Growth kinetic and nitrogen source optimization for liquid culture fermentation of *Metarhizium robertsii* blastospores and bioefficacy against the corn leafhopper Dalbulus maidis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 5, 2020.

JACKSON, M. A.; JARONSKI, S. T. Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. **Mycological Research**, v. 113, n. 8, p. 842–850, 2009.

JENKINS, N. E. et al. Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycopesticides. **Biocontrol News and Information**, v. 19, n. 1, p. 21–32, 1998.

JULIANO, B.O. Grain structure, composition and consumers criteria for quality. In: **Rice in human nutrition.** Rome, p.35-59, 1993.

KEYSER, C. A. et al. Heat-induced post-stress growth delay: A biological trait of many *Metarhizium* isolates reducing biocontrol efficacy? **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 120, n. June, p. 67–73, 2014.

KRUGER, R. D. et al. Solid substrate production and formulation of an isolate of *metarhizium anisopliae* for biological control of stem bug tibraca limbativentris. **World Applied Sciences Journal**, v. 32, n. 7, p. 1242–1251, 2014.

LI, J.; FENG, M. G. Intraspecific tolerance of *Metarhizium anisopliae* conidia to the upper thermal limits of summer with a description of a quantitative assay system. **Mycological Research**, v. 113, n. 1, p. 93–99, 2009.

LIMEIRA, E. D. H.; RAFIKOV, M. Dinâmica de interação da praga da cana-de-açúcar com seu parasitóide. **Proceeding of the 9Th Brazilian Conference on Dynamics Control and Their Applications**, p. 238–242, 2010.

LEME, S. F. et al. Utilização de arroz parboilizado provindo de biofábricas de fungos entomopatogênicos para a nutrição animal. **Revista Científica**, v. 1, n. 1, 2018.

LOPES, I. C. "Produção de esporos do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* em diferentes condições de cultivo e em biorreator de bandeja". Dissertação de mestrado em Microbiologia. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, 2016.

LOPES, R. B.; FARIA, M. Influence of two formulation types and moisture levels on the storage stability and insecticidal activity of *Beauveria bassiana*. **Biocontrol Science and Technology**, v. 29, n. 5, p. 437–450, 2019.

LOUREIRO, E. S. et al. Eficiência de isolados de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. no controle da cigarrinha-da-raiz da cana-de-açúcar, *Mahanarva fimbriolata* (Stal, 1854) (Hemiptera: Cercopidae), em condições de campo. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 79, n. 1, p. 47–53, 2012.

MASCARIN, G. M.; QUINTELA, E. D. Documento 289 Técnica de Produção do Fungo Entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* para Uso em Controle Biológico. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Arroz e Feijão Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2013.

MAURÍCIO, P. et al. Um algoritmo para dimensionamento de ciclones. 2006.

MENDEZ-GONZALEZ, F.; LOERA, O.; FAVELA-TORRES, E. Conidia production of *Metarhizium anisopliae* in bags and packed column bioreactors. **Current Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 65–69, 2018.

MILTENBURG, J. Balancing U-lines in a multiple U-line facility. **European Journal of Operational Research**, v. 109, n. 1, p. 1–23, 1998.

MITCHELL, D. A. et al. **Bioreactors for Solid-State Fermentation**. Comprehensive Biotechnology, Second Edition, v. 2, p. 347–360, 2011.

MITTMANN, L. M. Inimigos do bem. **Revista a Granja**, ed. 823, jul. 2017. Matéria de capa

MONGKOLSAMRIT, S. et al. Revisiting *Metarhizium* and the description of new species from Thailand. **Studies in Mycology**, 2020.

MORGAN, R. et al. Wet bulk storage of bagasse. In: **Congress of the international society sugarcane technology**, 15., 1974, Durban Proceedings. Durban: Hayne & Gibson, p.1793-1820, 1974.

NAGEL, F. J. J. I. et al. Temperature control in a continuously mixed bioreactor for solid-state fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 2, p. 219–230, 2001.

NISHI, O.; SATO, H. Species diversity of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride* species complexes isolated from insects in Japan. **Mycoscience**, v. 58, n. 6, p. 472–479, 2017.

OERKE, E. C. Crop losses to pests. **Journal of Agricultural Science**, v. 144, n. 1, p. 31–43, 2006.

OMKAR; KUMAR, B. **Biocontrol of Insect Pests**. In: Ecofriendly Pest Management for Food Security. Elsevier, p. 25–61 [s.l: s.n.], 2016.

Oostra, J.; Tramper, J.; Rinzema, A. Model-based bioreactor selection for large-scale solid-state cultivation of Coniothyrium minitans spores on oats. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 27, p.652–663, 2000.

OZMIHCI, S. Performance of batch solid state fermentation for hydrogen production using ground wheat residue. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 42, n. 37, p. 23494–23499, 2017.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81–84, 2003.

PEDRINI, N. Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. **Fungal Biology**, v. 122, n. 6, p. 538–545, 2018.

PEREZ, C. L.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Improving enzyme production by solid-state cultivation in packed-bed bioreactors by changing bed porosity and airflow distribution. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 3, p. 537–548, 2021.

QUINTELA, E. D. YOLOYAMA, L. P. ROBERTS, D. W. Metodologia e custo de producao de *Metarhizium anisopliae* em quirera de arroz. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Arroz e Feijão Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 1994

RANGEL, D. E. N. et al. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on insects and artificial substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, n. 2–3, p. 77–83, 2004.

SAEED, N. et al. Evaluating the combination of *Metarhizium anisopliae* and an enhanced form of diatomaceous earth (Grain-Guard) for the environmentally friendly control of stored grain pests. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 192, n. 4, 2020.

SANTA, H. S. D. et al. Spore production of *Beauveria bassiana* from agro-industrial residues. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. SPEC. ISS., p. 51–60, 2005.

SANTOS, V. et al. Identification of double-stranded RNA viruses in Brazilian strains of Metarhizium anisopliae and their effects on fungal biology and virulence. **Plant Gene**, v. 11, p. 49–58, 2017.

SCHOPENHAUER, Arthur. Parerga y paralipómena I. Parerga y paralipómena I, p. 172, 1851.

SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. **Toxicon**, v. 56, n. 7, p. 1267–1274, 2010.

SENE, L. et al. Produção De Conídios De *Metarhizium Anisopliae* Em Meio Sólido À Base De Resíduos Agroindustriais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p. 449–456, 2010.

SILVA, M. A. Estudo da secagem em ciclone. Tese de Doutorado em Engenharia Mecânica Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 1991.

SILVA, R. A. Estudo de *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorok: Toxicidade a compostos extraídos de Tibraca limbativentris Stal (Heteroptera: Pentatomidae), efeitos de agroquímicos utilizados na cultura do arroz e aumento da patogenicidade a *T. limbativentris* com doses subletais de inseticidas químicos. Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de Doutor em Química, 2012.

SKOGESTAD, S. Chemical and Energy Process Engineering. [s.l.] CRC Press, 2008.

TADA, É. F. R.; CUNHA, L. P.; THOMÉO, J. C. produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* por cultivo sólido em biorreator de tambor rotativo com rotação intermitente: aplicação de modelos matemáticos para predição de perfis de temperatura. **Avanços Científicos e Tecnológicos em Bioprocessos**, p. 104-120, 2018.

TADA, É. F. R.; AGUDELO, L. M. G.; THOMÉO, J. C. Water holding capacity and heat transfer aspects of a mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in a partially filled rotating drum. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 3, p. 1131–1141, 2019.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. Current developments in solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 81, p. 146–161, 2013.

TOFANINI, J. A. Controle de qualidade de óleos comestíveis. Monografia do Bacharel em Química da Universidade federal de santa de catarina, Campus de Florianópolis, 2004.

VAN BREUKELEN, F. R. et al. Bioreactor and substrate selection for solid-state cultivation of the malaria mosquito control agent *Metarhizium anisopliae*. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 751–757, 2011.

VICENTE, I. V. Produção de esporos de *Metarhizium anisopliae* IBCB 425 em resíduos agroindústriais por cultivo em estado sólido. Dissertação de mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto. 2021.

WALTER, M.; MARCHEZAN, E.; DE AVILA, L. A. Arroz: Composição e características nutricionais. **Ciencia Rural**, v. 38, n. 4, p. 1184–1192, 2008.

WANG, J. B.; ST. LEGER, R. J.; WANG, C. **Advances in Genomics of Entomopathogenic Fungi**. [s.l.] Elsevier Ltd, v. 94, 2016.

WASSERMANN, M. et al. Biological control of Ixodes ricinus larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 768–771, 2016.

WEBSTER, A. et al. Does the effect of a *Metarhizium anisopliae* isolate on *Rhipicephalus microplus* depend on the tick population evaluated? **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 2, p. 270–274, 2017.