

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ**

**MARIA ANGELICA PAGANE DE CAMPOS**

**CUSTOS DE PRODUÇÃO HETERÓLOGA DA ENZIMA CATALASE DE *Serratia marcescens* EM ESCALA DE BANCADA**

**PONTA GROSSA**

**2023**

**MARIA ANGELICA PAGANE DE CAMPOS**

**CUSTOS DE PRODUÇÃO HETERÓLOGA DA ENZIMA CATALASE DE *Serratia marcescens* EM ESCALA DE BANCADA**

**Costs of Heterologous Production of the Catalase Enzyme from *Serratia marcescens* on Bench Scale**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Juliana Vitória Messias Bittencourt.

**PONTA GROSSA**

**2023**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

**MARIA ANGELICA PAGANE DE CAMPOS**

**CUSTOS DE PRODUÇÃO HETERÓLOGA DA ENZIMA CATALASE DE *Serratia marcescens* EM ESCALA DE BANCADA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 08/novembro/2023

---

Juliana Vitória Messias Bittencourt  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Marcio Silva  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

---

Mariana Machado Fidelis do Nascimento  
Doutorado  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

**PONTA GROSSA**

**2023**

Dedico este trabalho ao meu padrasto (*in memoriam*) e a minha mãe, pois sem o carinho e o apoio de vocês nada disso seria possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Concedo minha gratidão, primeiramente à Deus, por Sua orientação e força que me guiaram ao longo desta caminhada. Expresso minha gratidão especial à minha mãe, cujo o apoio incansável e amor incondicional foram o alicerce que sustentou meu caminho. Sem ela, esta jornada teria sido muito mais difícil, e esta conquista não teria sido possível.

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra. Juliana Vitória Messias Bittencourt, por sua orientação sábia, paciência e pelos preciosos conselhos. Levo consigo não apenas conhecimento técnico, mas também lições valiosas que serão guias em minha jornada futura.

Às minhas amigas Josuelen de Paula Martins e Joyce Araújo de Oliveira por todo apoio, auxílio e pela companhia inestimável nas inúmeras horas que passamos juntas nos laboratórios da universidade. A jornada acadêmica tornou-se significativamente mais leve e enriquecedora com a presença delas ao meu lado. Cada desafio enfrentado, cada experimento realizado e cada conquista alcançada foram compartilhados com alegria e determinação graças à nossa amizade.

Ao meu namorado Renan Toledo por seu apoio durante as longas e exaustivas horas de estudo e trabalho. Sua paciência, incentivo e compreensão foram fundamentais para que eu pudesse superar obstáculos e alcançar meus objetivos. Obrigada por tudo e por ser minha fonte de inspiração.

Por fim, agradeço a todos os amigos e membros da família que estiveram ao meu lado, contribuindo de alguma forma nesta trajetória. Cada gesto de apoio foi fundamental e será lembrado.

When everything seems to be going against you,  
remember that the airplane takes off against the  
wind, not with it  
(FORD; CROWTHER, 1922).

## RESUMO

As enzimas desempenham um papel primordial em reações metabólicas e bioquímicas, sendo derivadas de fontes vegetais, animais e microbianas. Especificamente, as enzimas microbianas destacam-se em setores industriais vitais, como têxtil, alimentício e farmacêutico, antevendo um crescimento significativo no mercado global de enzimas, com uma projeção de receita em 10,5 bilhões de dólares até 2028. A catalase é uma enzima antioxidante, cuja aplicabilidade industrial abrange processos de branqueamento e esterilização, com potencial ainda não totalmente explorado na odontologia para mitigar os efeitos adversos do peróxido de hidrogênio. Avaliar os custos de produção, sobretudo os ligados à catalase, torna-se imprescindível para empreendimentos biotecnológicos, fornecendo insights econômicos cruciais para decisões estratégicas. Apesar da relevância desse aspecto, estudos detalhados sobre os custos associados à produção da catalase ainda são escassos. Esse estudo delineou e analisou os custos envolvidos na produção da catalase, proveniente de *Serratia marcescens*, por meio de métodos recombinantes e em escala de bancada. A análise revelou que a maioria dos dispêndios concentra-se em despesas fixas, tais como aquisição da linhagem bacteriana, a construção do plasmídeo e a coluna cromatográfica. Em contraste, os custos variáveis estão intimamente relacionados a reagentes e suprimentos plásticos. No âmbito energético, a tarifa de 0,5782 R\$ por kWh resultou em um custo total estimado de R\$ 513,77, considerando um consumo total de 888,58 kWh. Desse modo, obteve-se um custo total estimado para a expressão e purificação de R\$ 4.760,43 e R\$ 9.530,96, respectivamente. O custo total da produção da catalase em escala de bancada foi de R\$ 14.291,39, podendo ser amortizado a longo prazo, visto que 96,0% são despesas reutilizáveis, enquanto 4,0% são consumíveis, incluindo energia elétrica. O estudo também destacou desafios específicos encontrados durante o procedimento, como o impacto do volume inadequado do meio no frasco Erlenmeyer e a qualidade das células transformadas, que influenciaram significativamente o tempo necessário para atingir a  $DO_{600nm}$ . Este estudo sublinha a complexa interação entre desafios técnicos e custos na produção de enzimas comerciais. Como sugestão para futuras pesquisas, propõe-se uma análise técnico-econômica mais ampla, incluindo uma análise de mercado para produtos odontológicos, a fim de avaliar de forma abrangente a viabilidade da produção da catalase nesse cenário específico. Este enfoque multidisciplinar é vital para desenvolver estratégias eficientes e sustentáveis na produção de enzimas para aplicações comerciais.

Palavras-chave: catalase; produção de enzimas; análise econômica; aplicação odontológica.

## ABSTRACT

Enzymes play a fundamental role in metabolic and biochemical reactions, being derived from plant, animal and microbial sources. Specifically, microbial enzymes stand out in vital industrial sectors such as textiles, food and pharmaceuticals, anticipating significant growth in the global enzyme market, with a revenue projection of \$10.5 billion by 2028. Catalase is an antioxidant enzyme, whose industrial applicability covers bleaching and sterilisation processes, with its potential, not yet fully explored in dentistry, to mitigate the adverse effects of hydrogen peroxide. Evaluating production costs, especially those related to catalase, becomes essential for biotechnological enterprises, providing crucial economic insights for strategic decisions. Despite the relevance of this aspect, detailed studies on the costs associated with catalase production are still scarce. This study outlined and analysed the costs involved in the production of catalase, from *Serratia marcescens*, through recombinant methods and bench scale. The analysis revealed that most of the expenditures are concentrated in fixed expenses, such as acquisition of the bacterial lineage, construction of the plasmid and the chromatographic column. In contrast, variable costs are closely related to reagents and plastic supplies. In the energy field, the tariff of R\$ 0.5782 per kWh resulted in an estimated total cost of R\$ 513.77, considering a total consumption of 888.58 kWh. Thus, we obtained an estimated total cost for expression and purification of R\$ 4,760.43 and R\$ 9,530.96, respectively. The total cost of production of catalase in bench scale was R\$ 14,291.39 and can be amortised in the long term, since 96.0% are reusable expenses, while 4.0% are consumables, including electricity. The study also highlighted specific challenges encountered during the procedure, such as the impact of inadequate media volume on the Erlenmeyer flask and the quality of the transformed cells, which significantly influenced the time required to reach OD<sub>600nm</sub>. This study highlights the complex interaction between technical challenges and costs in the production of commercial enzymes. As a suggestion for future research, a broader technical-economic analysis is proposed, including a market analysis for dental products, in order to comprehensively assess the viability of catalase production in this specific scenario. This multidisciplinary approach is vital to develop efficient and sustainable strategies in the production of enzymes for commercial applications.

Keywords: catalase; enzyme production; economic analysis; dental application.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura de um monômero de uma catalase monofuncional CAT-1 de <i>Neurospora crassa</i> .....	21
Figura 2 - Anatomia dentária e os principais tecidos .....	26
Figura 3 - Ilustração esquemática da construção molecular do pET-28a .....	27
Figura 4 - Fluxograma do processo de obtenção da enzima recombinante em escala laboratorial.....	31
Fotografia 1 - Células induzidas após aplicação de IPTG .....	32
Fotografia 2 - Pellets das células induzidas pós centrifugação e descarte do sobrenadante.....	33
Gráfico 1 - Crescimento do investimento de P&D dos países selecionados de 2000 - 2020 .....	16
Gráfico 2 - Distribuição mundial de exportação de enzimas de 2022.....	19
Gráfico 3 - Distribuição de importação de enzimas industriais no Brasil em 2022 .....	19
Gráfico 4 - Distribuição de exportação de enzimas industriais no Brasil em 2022 .....	20
Gráfico 5 - Crescimento anual do consumo de produtos de clareamento dental de 2022 - 2030 .....	24
Gráfico 6 - Distribuição dos custos de insumos para a etapa de expressão.....	35
Gráfico 7 - Distribuição dos custos de insumos para a etapa de purificação ...	37
Gráfico 8 - Distribuição dos custos de infraestrutura reutilizável e consumíveis .....	38
Quadro 1 - Classe de enzimas de uso industrial e suas funções .....	18
Quadro 2 - Mecanismo de reação dos precursores de peróxido de hidrogênio	25
Quadro 3 - Radicais livres gerados pela reação de decomposição do peróxido de hidrogênio.....	25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Leituras das DO's durante o crescimento celular no inóculo.....	32
Tabela 2 - Estimativa de custos dos insumos por categoria, referentes à etapa de expressão calculada para o montante de 2 L de meio.....	34
Tabela 3 - Estimativa para custos de energia elétrica dos equipamentos utilizados na etapa de expressão .....	35
Tabela 4 - Estimativa de custos dos insumos por categoria, referentes à etapa de purificação .....	36
Tabela 5 - Estimativa dos custos de energia elétrica dos equipamentos utilizados na etapa de purificação .....	37

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
CAT	Catalase
Cdp	Radical Catiônico de Porfirina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa	Quilodalton
L	Litros
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nm	nanômetro
PDB	Protein Data Bank
pH	Potencial Hidrogeniônico
Porf	Porfirina
PVDF	Fluoreto de Polivinilideno
rpm	Rotação por Minuto
RU	Resistência de União
Tris	Hidroximetil aminometano

## LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	Grau Celsius
$C_1$	Concentração inicial
$C_2$	Concentração final
$\text{CaO}_2$	Peróxido de cálcio
$\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_3$	Peróxido de carbamida
$\text{Fe}$	Ferro
$\text{H}_2\text{O}$	Óxido de dihidrogênio
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de hidrogênio
$\text{HCl}$	Ácido clorídrico
$\text{MgO}_2$	Peróxido de magnésio
$\text{Na}_2(\text{CO}_4)$	Percarbonato de sódio
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	Hidrogenofosfato de sódio
$\text{NaBO}_3$	Perborato de sódio
$\text{NaCl}$	Cloreto de sódio
$\text{O}_2$	Oxigênio
$T$	Temperatura
$V_1$	Volume inicial
$V_2$	Volume final

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Desenvolvimento de novos produtos</b> .....	<b>16</b>
3.1.1	Desafios do desenvolvimento de produtos biotecnológicos .....	16
<b>3.2</b>	<b>Mercado industrial de enzimas</b> .....	<b>18</b>
<b>3.3</b>	<b>Catalase</b> .....	<b>20</b>
3.3.1	Mecanismo de reação da catalase .....	21
3.3.2	Catalase recombinante de <i>Serratia marcescens</i> .....	22
<b>3.4</b>	<b>Produtos odontológicos</b> .....	<b>23</b>
3.4.1	Clareamento dental .....	23
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1</b>	<b>Expressão e purificação</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2</b>	<b>Custos de produção da catalase em escala de bancada</b> .....	<b>30</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
<b>5.1</b>	<b>Fluxograma</b> .....	<b>31</b>
<b>5.2</b>	<b>Expressão</b> .....	<b>31</b>
<b>5.3</b>	<b>Purificação</b> .....	<b>34</b>
<b>5.4</b>	<b>Custos de produção da catalase em escala de bancada</b> .....	<b>34</b>
5.4.1	Expressão .....	34
5.4.2	Purificação.....	36
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>40</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>
	<b>APÊNDICE A - Detalhamento dos custos para o processo de expressão da catalase em escala laboratorial</b> .....	<b>46</b>
	<b>APÊNDICE B - Detalhamento dos custos para o processo de purificação da catalase em escala laboratorial</b> .....	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores que desempenham um papel importante nas etapas do metabolismo e nas reações bioquímicas, por apresentarem características de alta especificidade e atividade metabólica de bioconversão (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2008; TATTA, *et al.* 2022). Além disso, são obtidas de organismo vegetal, animal e microbiano. Muitas enzimas microbianas estão sendo exploradas para catalisar inúmeros processos metabólicos de cunho comercial nas indústrias têxtil, alimentícia e farmacêutica, pela alta atividade e estabilidade enzimática, em relação às de origem vegetal e animal (GURUNG, *et al.* 2013; NIGAM, 2013; TATTA, *et al.* 2022).

O uso comercial de enzimas está aumentando devido à crescente conscientização por soluções mais sustentáveis dentro de seus processos e produtos, por ser possível a utilização de resíduos agroindustriais como matéria-prima para o processo fermentativo (ADRIO; DEMAIN, 2014; GURUNG, *et al.* 2013). Estima-se que no mercado global de enzimas haverá um crescimento anual de 6,8% de 2022 a 2030, gerando uma receita de 10,5 bilhões de dólares até o final de 2028 (BlueWeave Consulting and Research, 2022).

O avanço da biotecnologia moderna possibilitou a descoberta de diversas enzimas com aplicações industriais, além de melhorar as propriedades cinéticas da enzima, estabilidade térmica e a especificidade dos substratos, permitindo a produção em larga escala e a aplicação em diversos setores (SINGH, *et al.* 2019; THAPA, *et al.* 2019). A tecnologia do DNA recombinante utiliza uma série de técnicas de manipulação genética e de biologia molecular, as quais permite a combinação de genes de organismos distintos e a expressão de proteínas heterólogas em diversos microrganismos (KAUR; KUMAR; KAUR, 2018; THAPA, *et al.* 2019).

A catalase (E.C. 1.11.1.6.) é uma das enzimas antioxidantes que atenua no estresse oxidativo, realizando a decomposição do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ) (NANDI, *et al.* 2019; VITOLO, 2021). O peróxido de hidrogênio é utilizado em processos de branqueamento e esterilização nas indústrias farmacêutica (médica e odontológica), alimentícia e têxtil (JIA, *et al.* 2016; VITOLO, 2021). Desse modo, devido a essas características, há estudos indicando o uso da catalase no setor odontológico em branqueamento dental, a fim de minimizar

os efeitos causados pelo peróxido de hidrogênio e eliminar os radicais livres residuais nas superfícies dentárias (GIANNINI, *et al.* 2006; PACHECO, 2021).

Determinar os custos de produção de enzimas é fundamental para qualquer empreendimento biotecnológico. Essa análise minuciosa não apenas oferece insights econômicos fundamentais para a gestão financeira, mas também possibilita a identificação de áreas de otimização e eficiência no processo de produção. Além disso, fornece uma base sólida para tomadas de decisão estratégicas, facilitando a projeção de preços competitivos no mercado e garantindo a sustentabilidade econômica do projeto (KLEIN-MARCUSCHAMER, *et al.* 2012).

Apesar de ser uma enzima importante, há poucos estudos que avaliam os custos de produção de catalase de forma detalhada. Isso ocorre, pois a catalase é uma enzima complexa, e os fatores que influenciam seus custos de produção são diversos, como o microrganismo utilizado, a estabilidade da atividade enzimática e a escala de produção. Portanto, o presente trabalho buscou mapear os custos de produção da enzima catalase de *Serratia marcescens* produzida de forma recombinante, para realizar uma análise econômica da produção em escala de bancada para a aplicação em produtos de clareamento dental.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Mapear os custos de produção da enzima catalase de oriunda de *Serratia marcescens* em escala de bancada para aplicação odontológica.

### **2.2 Objetivos específicos**

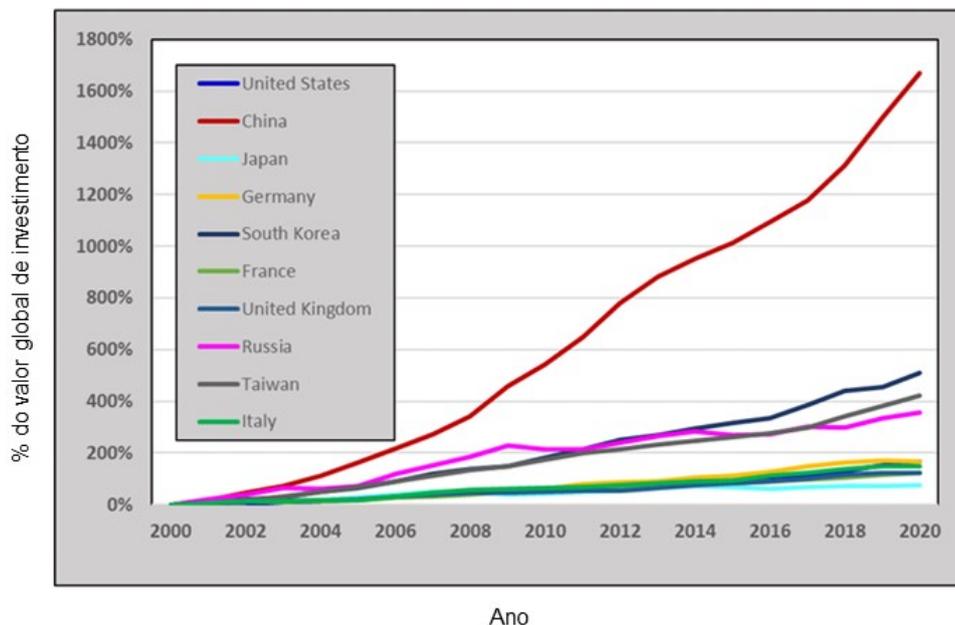
- Realizar o fluxograma do processo de produção da enzima catalase em escala laboratorial;
- Levantar os custos de insumos e energéticos para a produção da enzima catalase em escala laboratorial;
- Realizar análise das despesas para a produção da enzima catalase, a fim de identificar o maior custo.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Desenvolvimento de novos produtos

O desenvolvimento de novos produtos tornou-se crucial no ambiente global altamente competitivo. Haja vista as crescentes tendências do mercado global, é imprescindível que as empresas integrem às novas perspectivas e as necessidades para o desenvolvimento de produtos (YELKUR; HERBIG, 1996). A Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) desempenha um papel importante na economia e competitividade industrial. Tal que, o crescimento econômico de P&D é resultado do amplo investimento em setores públicos e indústrias, os quais reconheceram a importância do P&D para a inovação industrial, tanto na geração quanto no aperfeiçoamento de serviços e produtos. Desse modo, estima-se que houve um investimento global em P&D de aproximadamente US\$ 2,4 trilhões em 2020, em setores público e privado. O Gráfico 1 representa este crescente investimento dos 10 principais países financiadores (Congressional Research Service, 2022).

**Gráfico 1 - Crescimento do investimento de P&D dos países selecionados de 2000 - 2020**



Fonte: Congressional Research Service (2022)

##### 3.1.1 Desafios do desenvolvimento de produtos biotecnológicos

Neste contexto, o alto investimento em P&D teve papel fundamental para o desenvolvimento do mercado biotecnológico (OECD, 2013). A biotecnologia consiste em uma série de tecnologias que utiliza células vivas ou partes de organismos para

aplicação de processos industriais e no aprimoramento de processos e produtos, com impacto em diversos setores, como o alimentício, farmacêutico, enzimático, ambiental, agroindustrial, têxtil e químico (OECD, 2013; HAND, 2001). Devido à ampla gama de aplicações as cores têm sido utilizadas para representar as principais áreas de atuação, como branco (industrial), amarelo (alimentício), verde (agricultura), e azul (água e vida marinha), vermelho (medicina), roxo (patentes e inovações), dourado (bioinformática), preto (bioterrorismo), entre outras (KAFARSKI, 2012).

A biotecnologia branca baseia-se na produção e processamento de produtos químicos, materiais e energia, em que utiliza técnicas de biologia sintética para a síntese de produtos em escala industrial. Estimativas indicam que o uso desta biotecnologia pode resultar em uma diminuição de até 50% nas emissões de dióxido de carbono, 20% no consumo energético e 75% do consumo hídrico, podendo obter uma redução média de 10 a 50% de custos de capital e operacional (BARCELOS, *et al.* 2018). Essa área da biotecnologia tem maior abrangência de aplicação e trata-se da substituição de processos industriais tradicionais por biocatálise, produção de biopolímeros, produção de biocombustíveis e produção de enzimas e biossurfactantes (KAFARSKI, 2012).

A taxa de crescimento mundial do mercado biotecnológico entre 2015 e 2020 foi de 1,3%, com estimativas de aumento constante em investimentos em Inovação & Desenvolvimento (I&D) até 2025 (MARTIN, *et al.* 2021). O processo fermentativo é um dos métodos utilizados na biotecnologia que desempenha um papel fundamental, que envolve material biológico na produção de produtos e aditivos de alto valor agregado. Em 2015, o mercado de produtos derivados da fermentação foi avaliado em US\$ 24,3 bilhões, com previsão de crescimento anual de 7,7%, atingindo US\$ 35,1 bilhões em 2020. Além disso, as técnicas de modificação genética possibilitaram o desenvolvimento de novos produtos, otimização de processos e procedimentos de tratamento de resíduos mais sustentáveis (MOLINA, *et al.* 2019).

O avanço da biologia sintética permitiu o aperfeiçoamento das características intrínsecas das enzimas para o uso industrial, devido à alta estabilidade em diferentes substratos, estabilidade térmica e ao pH, a fim de melhorar e otimizar processos químicos. A bioprospecção de enzimas microbianas, destaca-se como uma tendência atual na indústria, para a identificação e caracterização de novas enzimas com potencial de aplicação comercial (TATTA, *et al.* 2022). Atualmente, mais de 500 produtos industriais foram sintetizados por meio de enzimas com diversas aplicações

biotecnológicas. As principais classes de enzimas utilizadas incluem, oxidorreductase, transferase, hidrolase, liase, isomerase e ligase, cujas descrições estão listadas no Quadro 1 (THAPA, *et al.* 2019).

**Quadro 1 - Classe de enzimas de uso industrial e suas funções**

Classe da enzima	Função	Principais enzimas industriais
Oxidorreductase	Oxidação e redução entre moléculas	Álcool desidrogenases, catalases, oxigenases e peroxidases
Transferase	Transferência de grupos funcionais de uma molécula a outra	Transcelotases, aciltransferases, frutossiltransferases, glicosiltransferases
Hidrolase	Hidrólise de um substrato	Proteases, amilases, celulases, xilanases, pectinases e lipases
Liase	Adição ou eliminação de moléculas de água, amônia ou dióxido de carbono, a partir de ligações duplas	Descarboxilases, aldolases e desidratases
Isomerase	Rearranjo geométrico ou estrutural de átomos dentro de uma molécula	Glicose isomerases, epimerases, topoisomerases, tautomerases e mutases
Ligase	Junção de duas moléculas, a partir da hidrólise de um difosfato em ATP	Sintetases, carboxilases e glutatona

Fonte: Thapa, *et al.* (2019)

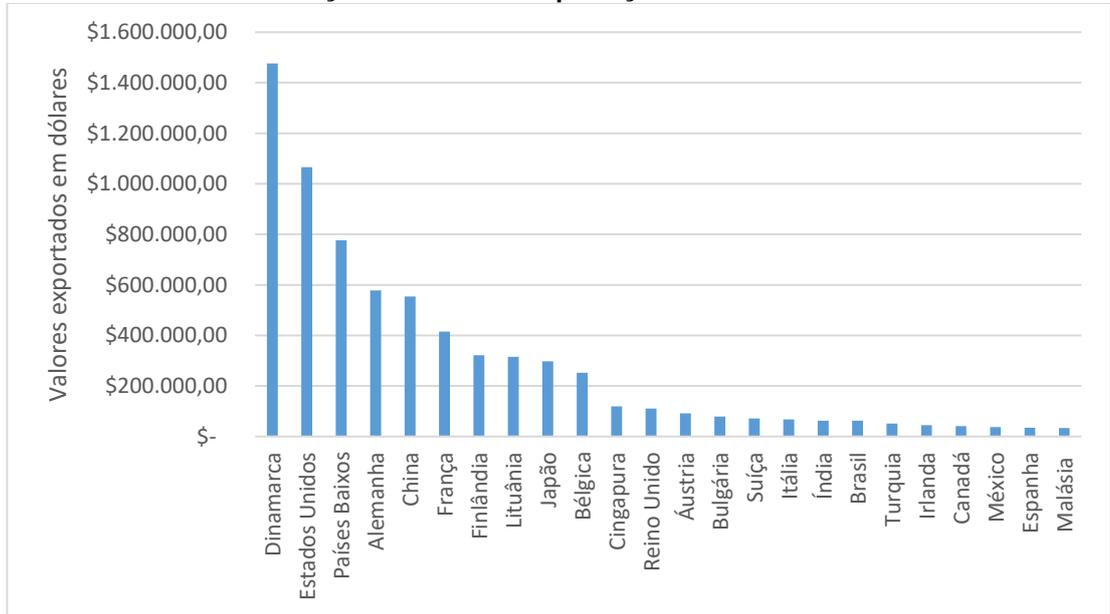
### 3.2 Mercado industrial de enzimas

O mercado de enzimas é impulsionado pela necessidade crescente de soluções sustentáveis, que incluem novas tecnologias para melhorar a relação de custo-benefício e eficiência do processo fermentativo em larga escala (ADRIO; DEMAIN, 2014). Este avanço envolve pela alta demanda de produção de detergentes, ração animal e bioetanol, bem como em produtos dos setores têxtil e farmacêutico (MEGHRABY, *et al.* 2023). O mercado global de enzimas foi relatado em US\$ 11,5 bilhões em 2021, com previsão de taxa de crescimento anual de 6,5% a partir de 2022 até 2030. Entre as principais empresas de produção de enzimas destacam-se a Novozymes, BASF, DuPont e DSM N.V., que podem produzir cerca de 75% do total de enzimas industriais (MOLINA, *et al.* 2019; MEGHRABY, *et al.* 2023).

Os principais países que mais exportaram enzimas e preparações enzimáticas em 2022 foram a Dinamarca, Estados Unidos, Países Baixos e Alemanha. No mesmo ano, a quantidade de total de enzimas exportadas globalmente atingiu aproximadamente 543.713 toneladas. A Dinamarca liderou essas exportações, contribuindo com 23% (124.365 toneladas), enquanto o Brasil exportou 6.532

toneladas, correspondendo a 1,20% do mercado mundial. O Gráfico 2 representa os volumes de enzimas exportadas por nação no ano de 2022.

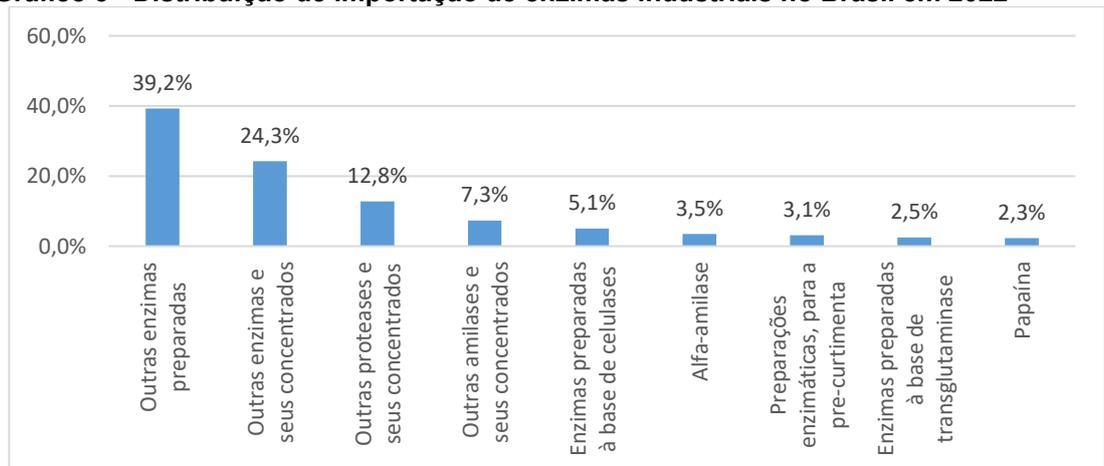
**Gráfico 2 - Distribuição mundial de exportação de enzimas de 2022**



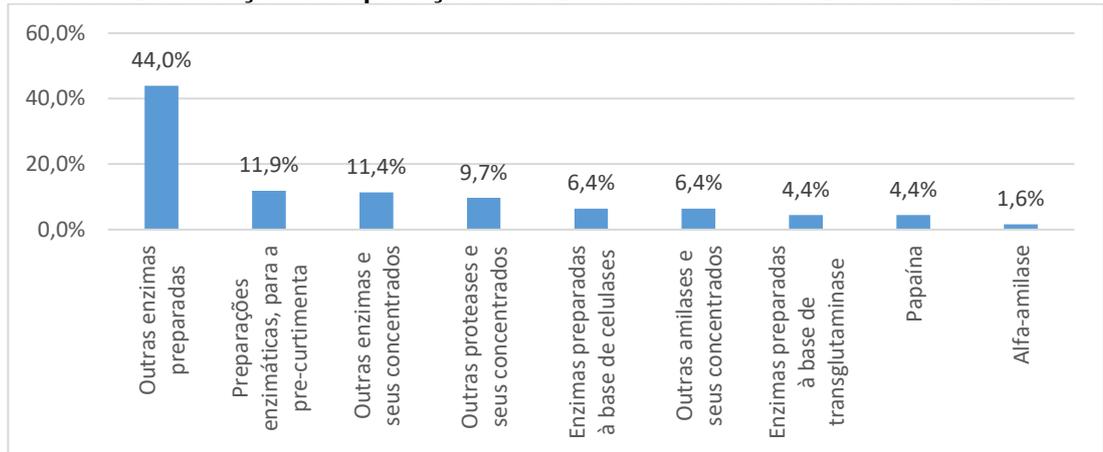
Fonte: Adaptado de ITC (2022)

Os Gráficos 3 e 4 apresentam a distribuição de importação e exportação de enzimas industriais pelo Brasil em 2022, respectivamente. Ao examinar os valores de aquisição durante esse período, revela-se um custo médio de importação de US\$ 10,92 e de exportação de US\$ 8,34 por quilo de enzimas (BRASIL, 2022).

**Gráfico 3 - Distribuição de importação de enzimas industriais no Brasil em 2022**



Fonte: Adaptado de MDIC (2022)

**Gráfico 4 - Distribuição de exportação de enzimas industriais no Brasil em 2022**

Fonte: Adaptado de MDIC (2022)

Com base em dados históricos do Ministério da Economia, Indústria, Comércio Exterior e Serviços, referente ao primeiro semestre dos anos de 2022 e 2023, constatou-se um aumento médio de 7,20% nos custos de importação e 17,0% nos custos de exportação, por quilograma de enzimas.

Diante do exposto, é possível concluir que o mercado de enzimas representa uma área de crescente importância devido à busca por soluções mais sustentáveis e à demanda crescente de setores-chaves, alimentos, bebidas, bioetanol, produtos farmacêuticos e detergentes. No cenário nacional, os custos de importação e exportação de enzimas aumentaram durante os anos de 2022 e 2023, refletindo a dinâmica desse setor no país. Esse aumento sugere a necessidade de análise e estratégias adequadas para o mercado de enzimas no Brasil, visto que o país é um grande produtor de commodities agrícolas, que são matérias-primas para a produção de enzimas.

### 3.3 Catalase

A catalase é da família oxidorreductase, além de ser uma importante enzima antioxidante, que atua na defesa celular contra radicais livres, na decomposição do peróxido de hidrogênio em moléculas de água e oxigênio molecular (NANDI, 2019; SOOCH; KAULDHAR; PURI, 2014).

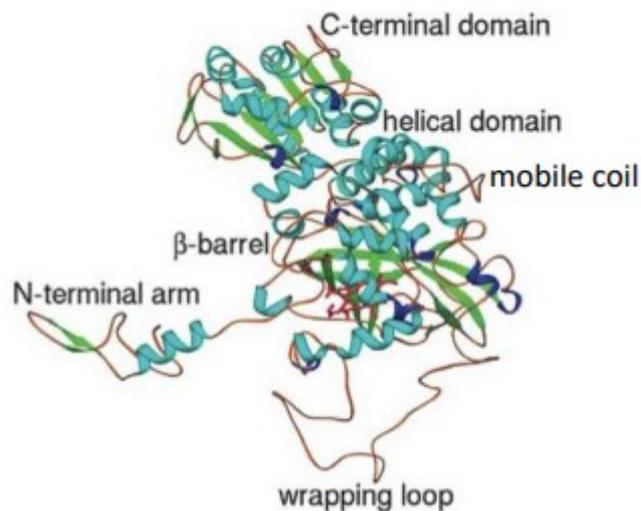
Devido as suas características físicas e bioquímicas, as catalases são divididas em três classes: classe 1 – heme catalase monofuncional; classe 2 – heme catalase-peroxidase bifuncional; classe 3 – sem heme catalase. O grupo heme é responsável pela atividade enzimática da catalase, o qual localiza-se nas

extremidades entre as conformações  $\beta$ -barril e  $\alpha$ -hélice. A primeira classe da catalase é encontrada em animais, plantas e microrganismos, com uma massa molecular entre 200 a 340 kDa (KARAKUS, 2020; SOOCH; KAULDHAR; PURI, 2014).

O grupo prostético heme situa-se no centro catalítico e são enzimas homotetraméricas e termoestáveis (HANSBERG, 2022; SOOCH; KAULDHAR; PURI, 2014). Ademais, a catalase possui condições ótimas de temperatura (T) entre 35 a 37 °C e um pH ótimo entre 6,0 a 7,0 (YAYA, 2019).

Vale ressaltar que neste trabalho será utilizada a catalase de *S. marcescens*, a qual consta-se dentro da classe 1 (monofuncional). Segue a Figura 1 da representação da estrutura dos monômeros de uma catalase monofuncional de *Neurospora crassa*, devido à ausência da estrutura da catalase de *S. marcescens* no Protein Data Bank (PDB).

**Figura 1 - Estrutura de um monômero de uma catalase monofuncional CAT-1 de *Neurospora crassa***



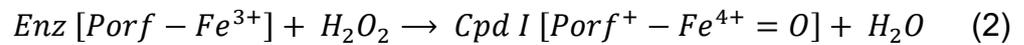
Fonte: Hansberg (2022)

### 3.3.1 Mecanismo de reação da catalase

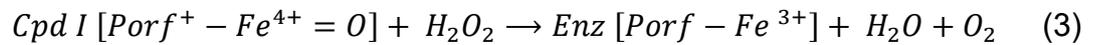
A reação global da catalase pode ser descrita na quebra de duas moléculas de peróxido de hidrogênio em duas moléculas de água e uma de oxigênio (reação 1). A degradação do peróxido de hidrogênio ocorre em duas etapas distintas, que podem diferenciar de acordo com a reação catalítica das catalases e das catalase-peroxidases (GLORIEUX; CALDERON, 2017; KARAKUS, 2020; NANDI, 2019).



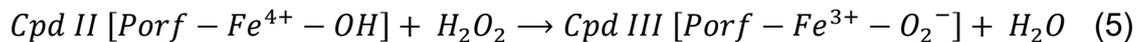
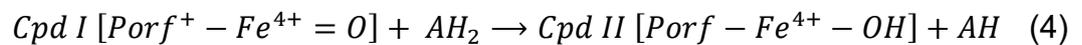
Na primeira etapa ocorre a oxidação do grupo heme que utiliza uma molécula de peróxido de hidrogênio, levando a formação de oxiferril, Cpd I, um radical catiônico porfirina (reação 2) (GLORIEUX; CALDERON, 2017; KARAKUS, 2020).



Na segunda etapa ocorre a redução do composto intermediário formado, Cpd I, por meio de uma molécula de peróxido de hidrogênio, a fim de regenerar a enzima. A partir da reação de redução, gera-se água e oxigênio (reação 3) (GLORIEUX; CALDERON, 2017; KARAKUS, 2020).



Além disso, as catalases podem desempenhar atividade de peroxidase, envolvendo um composto orgânico como doador de elétrons. Com isso, o Cpd I é convertido em Cpd II (reação 4), o qual pode ser oxidado por uma molécula de peróxido de hidrogênio (reação 5) (KARAKUS, 2020; SOOCH; KAULDHAR; PURI, 2014).



### 3.3.2 Catalase recombinante de *Serratia marcescens*

As técnicas de DNA recombinante têm sido utilizadas na expressão e purificação de proteínas e enzimas, as quais podem ser obtidas por meio de microrganismos geneticamente modificados pela inserção do DNA plasmidial com o gene da proteína de interesse (CHEN; TEXADA, 2006; PEREIRA, 2009). A bactéria *Escherichia coli* é uma das mais utilizadas para a expressão heteróloga de proteínas e enzimas, por apresentar vantagens de cultivo, altas taxas de produção de proteínas e um baixo custo, o qual permite a produção das enzimas catalases (PEREIRA, 2009; DE ROBERTIS; HIB, 2006).

De acordo com Pacheco (2021), a *Serratia marcescens* é uma bactéria gram-negativa e anaeróbio facultativo que é conhecida pela sua capacidade de expressar diversas enzimas, incluindo a catalase. Um estudo realizado por Ghanbari *et al.* (2021) investigou a atividade antioxidante de extratos de *S. marcescens* em diferentes

condições de crescimento, e verificou que a expressão da enzima catalase está associada com uma maior atividade antioxidante da bactéria, além de apresentar alta eficiência enzimática.

Por esta razão, a catalase é utilizada em diversos setores como nas indústrias alimentícias, têxteis e farmacêuticas. Em que este último vem sendo explorado no setor odontológico, pois estudos de Thakur, *et al.* (2015), demonstrou que o uso da catalase possibilitou uma melhora significativa na microdureza do esmalte e menor desmineralização da estrutura dentária. Desse modo, a catalase apresenta boas perspectivas no que tange à diminuição dos efeitos adversos dos agentes oxidantes residuais, que ocorre durante o clareamento dental, devido à decomposição dos ingredientes ativos das formulações clareadoras (PACHECO, 2021).

Dentre as inúmeras enzimas, as catalases vem sendo exploradas na biodegradação de poluentes tóxicos, pesticidas, herbicidas, hidrocarbonetos aromáticos, corantes têxteis e na remoção do peróxido de hidrogênio, além de atuarem como marcadores de estresse oxidativo, uma vez que realiza reações de oxido-redução (TAKIO; YADAV; YADAV, 2021). O uso de antioxidantes enzimáticos tem sido empregado na odontologia, pois suprimem a formação de radicais livres (ROS), causados pelo peróxido de hidrogênio (ALAGOZ; KARADAGLIOGLU; ULUSOY, 2019).

Estudos realizados por Bhusari e Sharma (2017), mostraram que a aplicação da catalase em clareadores dentais é apresenta resultados promissores, incluindo a remineralização do esmalte dentário e a neutralização dos radicais livres. Esses resultados, são fundamentais para o desenvolvimento de novos produtos odontológicos para o branqueamento dental com viés biotecnológico, visando à segurança dos pacientes. Vale ressaltar que os radicais livres estão relacionados à destruição das membranas celulares e do DNA, mutações do DNA, peroxidação lipídica, além de outras doenças (ALAGOZ; KARADAGLIOGLU; ULUSOY, 2019; PACHECO, 2021).

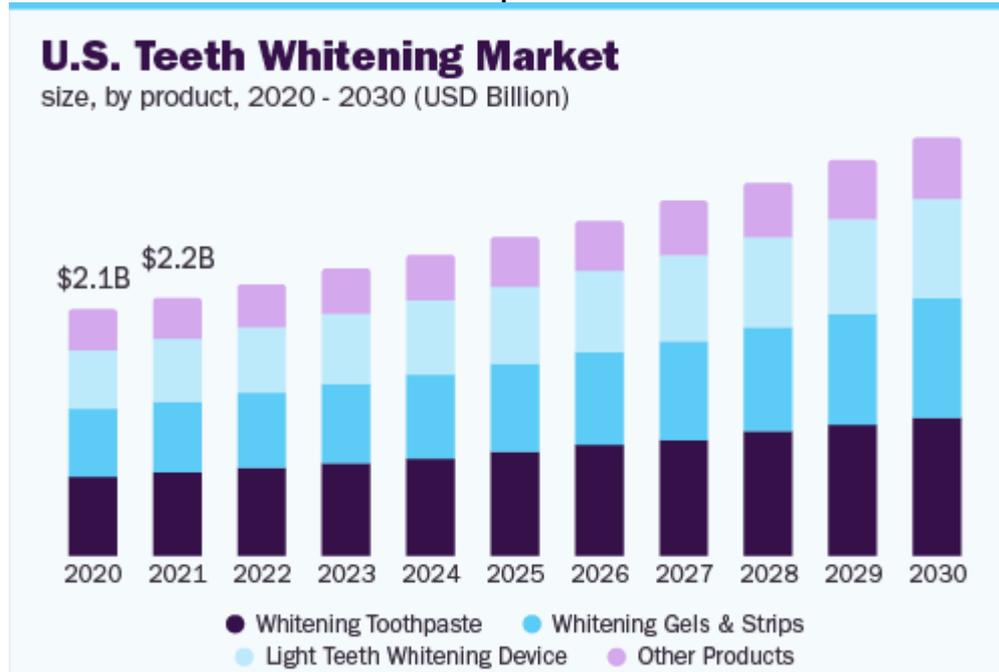
### **3.4 Produtos odontológicos**

#### **3.4.1 Clareamento dental**

O clareamento dental é um dos procedimentos mais procurados nos consultórios odontológicos, com o objetivo de melhorar a coloração dos dentes e,

consequentemente a aparência do sorriso (FRANCCI, *et al.* 2010; KWON; WERTZ, 2015). O mercado global de clareamento dental possui uma previsão para atingir cerca de 11,66 bilhões de dólares até 2030, com crescimento de 5,5% de 2022 a 2030 (Grand View Research, 2022; Straits Research, 2022). O Gráfico 5 representa o crescimento de 2020 a 2030, classificados em diferentes produtos consumidos, a fim de obter o efeito de clareamento.

**Gráfico 5 - Crescimento anual do consumo de produtos de clareamento dental de 2022 - 2030**



Fonte: Grand View Research (2022)

O clareamento dental é um processo de descoloração dos dentes, em que consiste na degradação química dos cromogênios (agentes causadores de cor), por meio da aplicação de um gel clareador com ingredientes ativos. Alguns compostos utilizados no branqueamento são, o peróxido de carbamida ( $\text{CH}_6\text{N}_2\text{O}_3$ ), peróxido de magnésio ( $\text{MgO}_2$ ), peróxido de cálcio ( $\text{CaO}_2$ ), perborato de sódio ( $\text{NaBO}_3$ ) e percarbonato de sódio ( $\text{Na}_2(\text{CO}_4)$ ), os quais são precursores de peróxido de hidrogênio que é o principal ativo para o clareamento dental (CAREY, 2014; EPPLE; MEYER; ENAX, 2019; FONSECA, 2008). Desse modo, segue o Quadro 2 dos compostos de precursores de peróxido de hidrogênio com seus respectivos mecanismos de reação.

**Quadro 2 - Mecanismo de reação dos precursores de peróxido de hidrogênio**

Composto	Mecanismo de reação
Peróxido de carbamida	$CO(NH_2)_2 \cdot H_2O_2 \rightarrow CO(NH_2)_2 + H_2O$
Peróxido de magnésio	$MgO_2 + 2 H_2O \rightarrow Mg(OH)_2 + H_2O_2$
Peróxido de cálcio	$CaO_2 + 2 H_2O \rightarrow Ca(OH)_2 + H_2O_2$
Perborato de sódio	$Na_2[B_2(O_2)_2(OH)_4] + 2 H_2O \rightarrow 2 NaBO_3 + 2 H_2O_2$
Percarbonato de sódio	$Na_2(CO_4) + H_2O \rightarrow Na_2CO_3 + H_2O_2$

Fonte: Epple; Meyer; Enax (2019); Fonseca (2008)

O peróxido de hidrogênio é decorrente de uma reação química de decomposição dos compostos de precursores de peróxido de hidrogênio. Devido ao seu baixo peso molecular é possível reagir com a matriz orgânica presente no esmalte e na dentina, em que envolve a quebra de ligações duplas de compostos orgânicos (RODRÍGUES-MARTÍNEZ; VALINTE; SÁNCHEZ-MARTÍN, 2019; KWON; WERTZ, 2015). Vale ressaltar que a reação de decomposição do peróxido de hidrogênio em radicais livres depende de fatores como o pH, temperatura, concentração do ativo, exposição à luz, tempo de contato e coeficiente de difusão (FONSECA, 2008).

O esmalte e a dentina desempenham papel de membrana semipermeáveis, em função do fluxo de fluidos nos espaços interprismáticos e nos túbulos dentinários, permitindo a interação do peróxido de hidrogênio por meio da difusão, respeitando a segunda lei de Fick (KWON; WERTZ, 2015). Conforme se difunde no dente, o peróxido de hidrogênio se decompõe e produz radicais livres instáveis (Quadro 2). Estes, reagem com as moléculas orgânicas responsáveis pela pigmentação entre os espaços do tecido duro dentário, o qual sucede-se em compostos menores e menos pigmentados (KIHN, 2007; RODRÍGUES-MARTÍNEZ; VALINTE; SÁNCHEZ-MARTÍN, 2019).

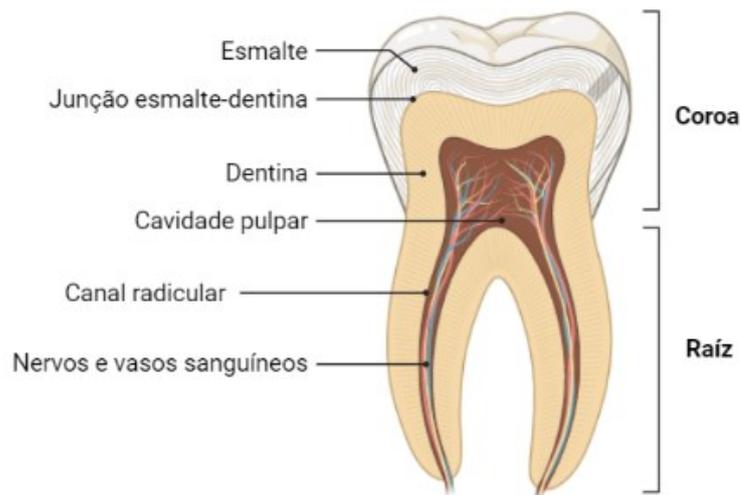
**Quadro 3 - Radicais livres gerados pela reação de decomposição do peróxido de hidrogênio**

Radicalis livres	Reação de decomposição
Hidroxil	$H_2O_2 \rightarrow 2 HO^\bullet$
Per-hidroxil	$HO^\bullet + H_2O_2 \rightarrow H_2O + HO_2^\bullet$
Ânion superóxido	$HO_2^\bullet \leftrightarrow H^+ + O_2^{\bullet -}$
Moléculas de oxigênio reativas, instáveis e que se transformam em oxigênio	$2 H_2O_2 \leftrightarrow 2 H_2O + 2(O) \leftrightarrow 2 H_2O + O_2$
Ânion de peróxido de hidrogênio	$H_2O_2 \leftrightarrow H^+ + HOO^-$

Fonte: Fonseca (2008)

No entanto, tem-se discutido a segurança e aos efeitos colaterais do uso dos produtos de peróxidos no uso odontológico (LAGO; GARONE-NETTO, 2013). O peróxido de hidrogênio que não reage com as substâncias orgânicas (cromóforos), se dissocia formando radicais livres mais reativos (Quadro 3), em que podem penetrar até a cavidade pulpar (Figura 2), gerando um quadro inflamatório no tecido pulpar (BATH-BALOGH; FEHNRENBACH, 2012; DUQUE, 2019).

**Figura 2 - Anatomia dentária e os principais tecidos**



**Fonte: Autoria própria (2022)**

Devido à liberação de radicais livres e instáveis durante o processo de clareamento, os agentes ativos utilizados podem alterar a morfologia do esmalte do dente, além do aumento da sensibilidade dentária, irritação gengival e diminuição da adesão do esmalte (PRICE; SEDAROUS; HILTZ, 2000; OZ; KUTUK, 2018; BERI; BUENDIA, 2003). Visto que decorre pelo acúmulo de peróxido de hidrogênio residual na superfície dentária, o qual interfere na polimerização do sistema adesivo, de modo que diminui a resistência de união (RU) do complexo esmalte e dentina (DUQUE, 2019; YAYA, 2019; BUENDIA, 2003).

De acordo com Soares, *et al.* (2019), a aplicação de enzimas catalases e peroxidases ao gel clareador demonstrou efeitos positivos nas características biológicas dentárias, bem como na redução do estresse oxidativo e difusão residual do peróxido de hidrogênio. Portanto, a utilização de catalizadores enzimáticos em géis clareadores, tem-se mostrado resultados significativos na diminuição dos efeitos adversos dos agentes clareadores sobre a RU do complexo esmalte e dentina, além da adesão do esmalte (DUQUE, 2019; YAYA, 2019; BUENDIA, 2003).

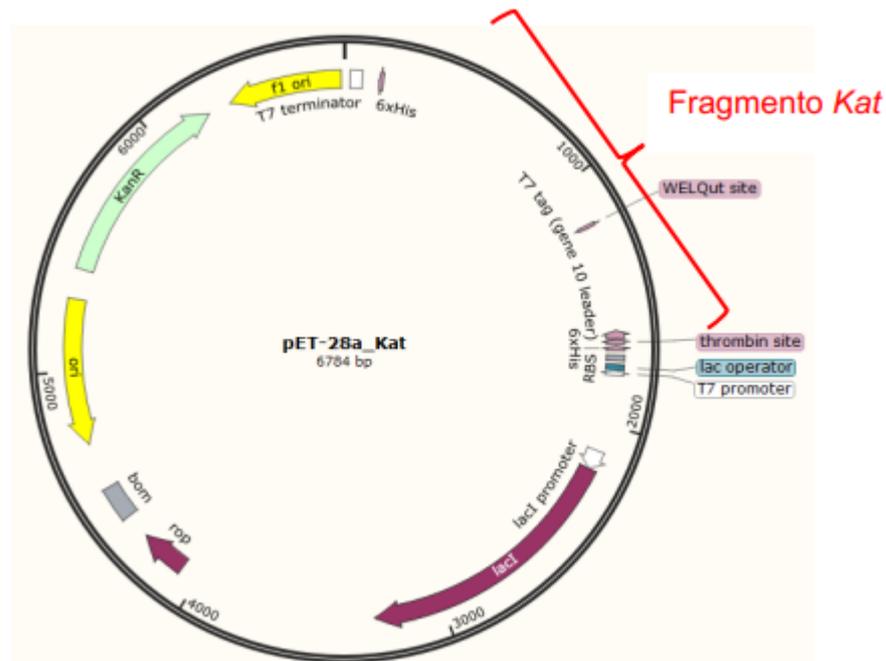
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Para a síntese da enzima catalase realizada neste trabalho, os experimentos foram conduzidos nos laboratórios de Bioengenharia, de Fermentações e da Coleção Microbiológica da Rede Paranaense da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR-PG), além do laboratório de Purificação de Proteínas da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

### 4.1 Expressão e purificação

O procedimento para o ensaio de expressão da enzima catalase foi realizado de acordo com a metodologia estabelecida por Pacheco (2021). A indução ocorreu em células de *E. coli* Rosetta-gami pLysS transformadas com o plasmídeo pET-28a contendo o gene da enzima catalase (Figura 3).

Figura 3 - Ilustração esquemática da construção molecular do pET-28a



Fonte: Pacheco (2021)

No dia anterior à indução, o pré-inóculo foi preparado a partir do estoque das células transformadas de *E. coli* Rosetta-gami pLysS, em tubo de ensaio identificados como “Tubo C1” para o pré-inóculo e “Tubo C” para o controle. Foi inoculado 100 µL de células em 22 mL de meio líquido LB (Luria Bertani), adicionando 11,0 µL de Kanamicina e 15,7 µL de Cloranfenicol, conforme a relação (1) e (2), respectivamente.

Os tubos foram então colocados em um shaker com agitação a 200 rpm e mantidos a 37 °C em *overnight*.

$[Kanamicina]_{inicial} = 50 \text{ mg/mL}$  – Concentração de Kanamicina em estoque;

$[Kanamicina]_{final} = 25 \text{ mg/mL}$  – Concentração recomendada para o plasmídeo pET-28a(+);

$V_{final \text{ de meio}} = 22 \text{ mL}$  – Volume de meio líquido.

Utilizando a equação de diluição  $C_1 * V_1 = C_2 * V_2$ , temos que:

$$5000 \text{ } \mu\text{g/mL} * V_1 = 25 \text{ } \mu\text{g/mL} * 22 \text{ mL} \quad (1)$$

$$V_1 = 11,0 \text{ } \mu\text{L de Kanamicina}$$

$[Cloranfenicol]_{inicial} = 35 \text{ mg/mL}$  – Concentração de Cloranfenicol em estoque;

$[Cloranfenicol]_{final} = 25 \text{ mg/mL}$  – Concentração recomendada para o plasmídeo pET-28a(+);

$V_{final \text{ de meio}} = 22 \text{ mL}$  – Volume de meio líquido.

Utilizando a equação de diluição  $C_1 * V_1 = C_2 * V_2$ , temos que:

$$3500 \text{ } \mu\text{g/mL} * V_1 = 25 \text{ } \mu\text{g/mL} * 22 \text{ mL} \quad (2)$$

$$V_1 = 15,7 \text{ } \mu\text{L de Cloranfenicol}$$

A partir da cultura resultante do pré-inóculo, em condições estéreis, 1500  $\mu\text{L}$  foram inoculadas em 4 Erlenmeyer de 1 L, cada um contendo 500 mL de meio líquido LB. Os frascos Erlenmeyer foram colocados no shaker às 08h45, com agitação a 200 rpm e a 37 °C, até que a Densidade Óptica a 600 nm, ( $DO_{600\text{nm}}$ ) atingisse um valor entre 0,400 e 0,600.

Uma vez alcançada a  $DO_{600\text{nm}}$  desejada, foram retiradas alíquotas de 2 x 2 mL do meio e armazenadas em tubos de Eppendorf autoclavados (amostras antes da indução, denominadas de “T0”). Em seguida, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de IPTG a cada frasco Erlenmeyer, relação (3), e a cultura foi incubada a 37 °C, com agitação a 200 rpm.

$[IPTG]_{inicial} = 1 \text{ M}$  – Concentração de IPTG em estoque;

$[IPTG]_{final} = 0,4 \text{ mM}$  – Concentração recomendada para a indução da catalase;

$V_{final \text{ de meio}} = 500 \text{ mL}$  – Volume de meio líquido.

Utilizando a equação de diluição  $C_1 * V_1 = C_2 * V_2$ , temos que:

$$1 \text{ M} * V_1 = 0,0004 \text{ M} * 500 \text{ mL} \quad (3)$$

$$V_1 = 200 \mu\text{L de IPTG}$$

Após o período de indução, a cultura foi transferida para frascos plásticos e submetida a uma centrifugação a 7000 rpm por 10 minutos, a 25 °C. A partir da precipitação celular, o sobrenadante foi descartado, e os pellets foram congelados a -80 °C na UEPG.

Os pellets foram ressuspensos em tampão de lise<sup>1</sup> com pH ajustado para 8,0. Para a lise celular, a solução foi submetida a sonicação por 6 minutos de pulsos no Sonicador Sonics Vibra-Cell VCX 750 em um ciclo total de 12 minutos, alternando entre pulsos de 30 segundos e com intervalos de 30 segundos. Após a etapa de rompimento celular, a solução foi centrifugada a 7000 rpm por 30 minutos, a uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, enquanto o pellet resultante foi ressuspensado em 20 mL de tampão de lise. Em seguida, o sobrenadante foi filtrado através de um sistema a vácuo contendo uma membrana de PVDF de 0,44 µm, preparando-o para a etapa subsequente de purificação.

A etapa de purificação é imprescindível para a aplicação e quantificação da enzima. No entanto, esta etapa não foi realizada e, como resultado, será apresentada uma descrição teórica do processo, como deveria ter ocorrido.

A purificação da proteína deve ser conduzida utilizando o sobrenadante do lisado celular de *E. coli* previamente filtrado. Isso é realizado por meio da cromatografia de afinidade em uma coluna contendo íons de níquel ligados à resina de agarose, conhecida como Ni-NTA (Qiagen), com um volume de 5 mL. Inicialmente, a coluna de níquel deve ser submetida a três lavagens com 5 mL de solução tampão de lise, para equilibrá-la. Em seguida, o sobrenadante deve ser adicionado à coluna, permitindo que as demais proteínas da *E. coli* sejam removidas, enquanto a catalase se liga à resina de níquel. Para a fase de eluição da proteína recombinante, é

---

<sup>1</sup> Composta por 50 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM de Tris HCl e 100 mM de NaCl.

necessário passar 5 mL de tampão de lise contendo imidazol em concentrações crescentes (10 mM; 25 mM; 50 mM; 75 mM; 100 mM; 250 mM; 500 mM; e 750 mM).

#### **4.2 Custos de produção da catalase em escala de bancada**

As estimativas de custos de linhagem, construção do plasmídeo, reagentes, vidrarias e outros materiais foram determinadas com base nos valores de mercado, considerando os preços unitários e as quantidades utilizadas em todas as etapas do processo, incluindo pré-inóculo, expressão, filtração do sobrenadante e purificação.

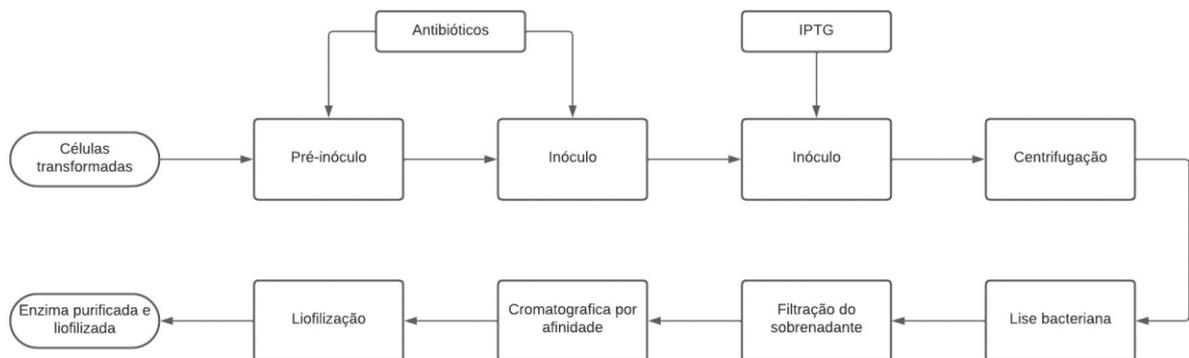
Além disso, realizou-se o cálculo dos custos de energia elétrica dos equipamentos empregados, levando em consideração a potência de cada equipamento, o tempo de uso, o grupo tarifário A4 e a modalidade tarifária verde da empresa concessionária do município de Ponta Grossa/PR. As informações detalhadas sobre os custos dos insumos e de energia elétrica estão disponíveis no Apêndice A e B para as etapas de expressão e purificação, respectivamente.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Fluxograma

As etapas para a obtenção da enzima catalase foram determinadas e realizadas de acordo com os estudos de Pacheco (2021), conforme observada na Figura 4.

**Figura 4 - Fluxograma do processo de obtenção da enzima recombinante em escala laboratorial**



**Fonte: Autoria própria (2023)**

### 5.2 Expressão

Durante a etapa de crescimento celular do inóculo, a solução alcançou uma  $DO_{600nm}$  de 0,608 após 3 horas e 15 minutos de incubação (Tabela 1). As leituras de  $DO_{600nm}$  foram feitas em apenas um dos frascos Erlenmeyer, embora todos os frascos tenham sido retirados do shaker no momento da coleta.

Observa-se na Tabela 1 que o tempo necessário para o crescimento celular atingir a  $DO_{600nm}$  desejada foi prolongado. Isso pode ter sido influenciado pelo uso da metade da capacidade dos frascos Erlenmeyer de meio de cultura, o que dificultou a oxigenação do meio. O ideal seria utilizar apenas 1/3 do volume do frasco. Conforme os estudos sobre a taxa de transferência de oxigênio em diferentes volumes de meios de cultura por Branco, *et al.* (2010), mediante ensaios de crescimento microbiano com meios de cultura de 50, 100 e 150 mL em frascos idênticos de Erlenmeyer, identificou-se que o volume que resultou em maior concentração de biomassa, melhor consumo de substrato e eficiência nos fatores de bioconversão correspondeu ao menor volume, ou seja, 50 mL de meio. Desse modo, a utilização da quantidade apropriada de volume é um fator importante para a obtenção da otimização da produção e o rendimento celular do processo fermentativo.

Além disso, outro fator que pode ter contribuído para esse tempo maior foi o processo de transformação bacteriana do plasmídeo pET-28a contendo o gene da enzima catalase na linhagem de *E. coli* Rosetta-gami pLysS, que ocorreu cerca de 1 ano e meio antes da execução deste experimento e as amostras não foram armazenadas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Portanto, é possível que as células não estivessem em condições ideais de qualidade nesse período, o que poderia ter afetado o desempenho do processo.

**Tabela 1 - Leituras das DO's durante o crescimento celular no inóculo**

Horário da coleta	Erlenmeyer 1	Erlenmeyer 2	Erlenmeyer 3	Erlenmeyer 4
08h45	0	0	0	0
10h15	0,089	-	-	-
12h00	-	-	-	0,608

Fonte: Autoria própria (2023)

Após a adição do IPTG, a cultura foi incubada por 3 horas e 22 minutos para a indução bacteriana, conforme ilustrado na Fotografia 1. O IPTG funciona como um indicador molecular que se liga ao operador LAC do DNA, desativando o repressor LAC. Isso permite que o RNA polimerase se ligue ao promotor e inicie a transcrição do gene de interesse, permitindo a produção da proteína correspondente.

**Fotografia 1 - Células induzidas após aplicação de IPTG**



Fonte: Autoria própria (2023)

A cultura de células induzidas foi transferida em 8 frascos plásticos de 250 mL cada e centrifugadas para obter os pellets, como ilustrado na Fotografia 2. Essa etapa

de centrifugação é essencial para separar as células, preparando-as para a subsequente lise bacteriana e purificação. A lise bacteriana se faz necessária, pois a enzima é sintetizada intracelular e não é enviada para fora das células naturalmente.

Observou-se um rendimento celular relativamente baixo, conforme evidenciado na Fotografia 2, em comparação com os resultados obtidos no estudo de Pacheco (2021). Fatores como o tempo de transformação bacteriana e o uso de mais de 1/3 da capacidade do frasco podem ter influenciado o tempo de crescimento e, conseqüentemente, o rendimento celular. Em que este, varia significativamente entre diferentes microrganismos devido às suas características genéticas, necessidades nutricionais e condições ambientais específicas. Cada espécie bacteriana possui sua eficiência na utilização dos nutrientes, resultando em rendimentos distintos durante o processo de cultivo. Essa variabilidade é fundamental para entender e otimizar o crescimento bacteriano em diferentes contextos, como pesquisas científicas e produção industrial.

No entanto, é importante ressaltar que não foram realizadas análises quantitativas do rendimento celular e da enzima, o que poderia fornecer insights adicionais sobre a eficiência do processo.

**Fotografia 2 - Pellets das células induzidas pós centrifugação e descarte do sobrenadante**



**Fonte: Aatoria própria (2023)**

A produção de enzimas por processo fermentativo é confrontada com uma série de desafios devido à natureza do cultivo do microrganismo e à síntese de enzimas, especialmente em grandes quantidades e alta pureza. A obtenção eficiente

de enzimas torna-se uma tarefa complexa, mas a aplicação da biotecnologia tem desempenhado um papel crucial na superação desses desafios. Ao manipular geneticamente microrganismos para aumentar a produção de enzimas desejadas e implementar técnicas avançadas de fermentação, a biotecnologia oferece soluções inovadoras para a complexidade do processo.

### 5.3 Purificação

A etapa de purificação não foi realizada neste trabalho. No entanto, é importante enfatizar que a etapa de purificação desempenha um papel fundamental no uso da enzima em aplicação comercial.

### 5.4 Custos de produção da catalase em escala de bancada

#### 5.4.1 Expressão

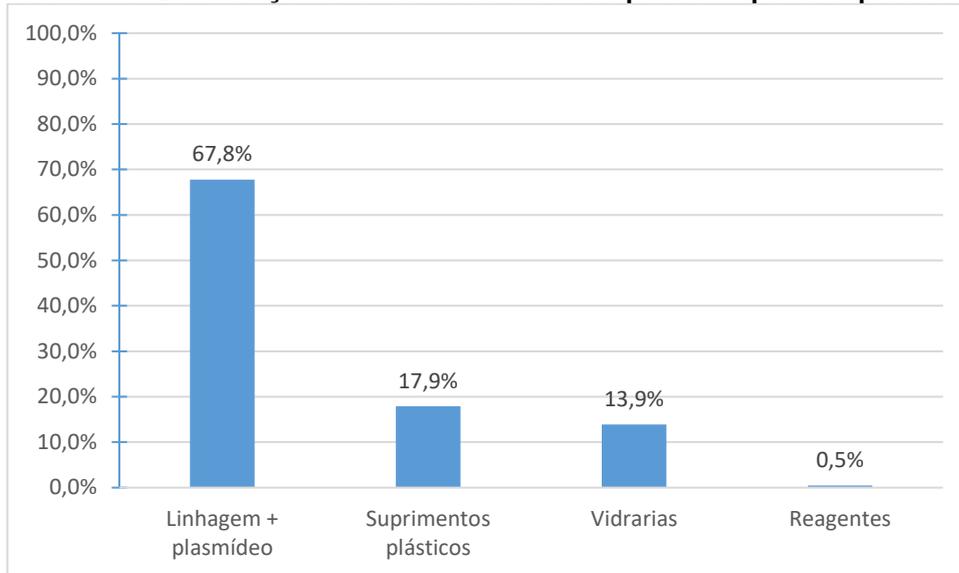
Por meio da coleta de informações comerciais, foram calculados os custos previstos para a produção da enzima de interesse. Esses valores foram categorizados, a fim de identificar o maior custo dentre os insumos utilizados, e, estão representados nas principais categorias na Tabela 2. Assim, foi possível estimar o custo total do processo de indução bacteriana em R\$ 4.501,54.

**Tabela 2 - Estimativa de custos dos insumos por categoria, referentes à etapa de expressão calculada para o montante de 2 L de meio**

<b>Categoria</b>	<b>Custo estimado</b>
Linhagem + plasmídeo	R\$ 3.050,00
Reagentes	R\$ 21,02
Vidrarias	R\$ 625,94
Suprimentos plásticos	R\$ 804,59
<b>Total</b>	<b>R\$ 4.501,54</b>

**Fonte: A autoria própria (2023)**

Desse modo, conforme a distribuição dos custos da etapa de expressão, representada no Gráfico 6, foi possível identificar que 99,2% dos gastos correspondem a despesas fixas, como a linhagem bacteriana, construção do plasmídeo, vidrarias e micropipetas, que são investimentos únicos e não recorrentes. Enquanto que 0,8% estão relacionados a despesas variáveis, incluindo reagentes como meio de cultura, antibióticos e IPTG, além dos suprimentos plásticos descartáveis.

**Gráfico 6 - Distribuição dos custos de insumos para a etapa de expressão**

**Fonte: Autoria própria (2023)**

Para o consumo energético, foi estabelecida uma tarifa de 0,5782 R\$ por kWh, incluindo impostos. Esse valor resultou em um custo estimado de R\$ 258,88, como indicado na Tabela 3, para um consumo total de 447,74 kWh dos equipamentos utilizados.

**Tabela 3 - Estimativa para custos de energia elétrica dos equipamentos utilizados na etapa de expressão**

Equipamentos	Custo estimado
Aparelho de osmose reversa	R\$ 0,01
Autoclave	R\$ 4,05
Câmara de fluxo laminar	R\$ 0,20
Shaker	R\$ 13,88
Espectrofotômetro	R\$ 0,01
Centrífuga	R\$ 0,81
Freezer -80 °C	R\$ 239,93
<b>Total</b>	<b>R\$ 258,88</b>

**Fonte: Autoria própria (2023)**

Portanto, obteve-se um custo total de R\$ 4.760,43 para a fase de expressão. O componente mais dispendioso foi a construção do plasmídeo em *E. coli* Rosetta-gami pLysS. Vale destacar que esse custo pode ser diluído em produções subsequentes, uma vez que a aquisição da linhagem bacteriana e o plasmídeo ocorre apenas uma vez. Em condições apropriadas de transformação bacteriana e

armazenamento à temperatura ideal, esses elementos podem ser mantidos em boas condições por um longo período. Além disso, há a possibilidade de realizar Miniprep para a extração do DNA plasmidial, permitindo, assim, novas transformações para a utilização de procedimentos de indução bacteriana.

#### 5.4.2 Purificação

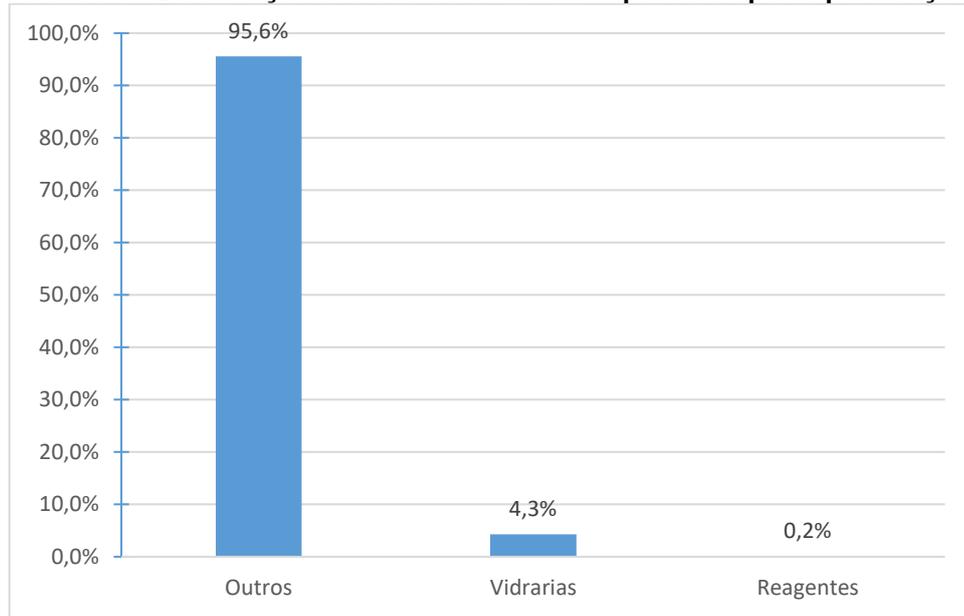
Por meio da coleta de informações comerciais, foram calculados os custos previstos para a produção da enzima de interesse. Da mesma forma para a etapa de expressão, os valores obtidos foram categorizados e estão representados nas principais categorias na Tabela 4, em que os “outros” correspondem a coluna cromatográfica e os filtros utilizados. Assim, foi possível estimar o custo total do processo de purificação em R\$ 9.276,07.

**Tabela 4 - Estimativa de custos dos insumos por categoria, referentes à etapa de purificação**

<b>Categoria</b>	<b>Custo estimado</b>
Reagentes	R\$ 14,39
Vidrarias	R\$ 395,00
Outros	R\$ 8.866,68
<b>Total</b>	<b>R\$ 9.276,07</b>

**Fonte: Autoria própria (2023)**

No Gráfico 7 representa a distribuição dos custos da etapa de purificação. A análise revela que 99,9% dos gastos correspondem a despesas fixas, como a coluna cromatográfica e as vidrarias, que são investimentos únicos e não recorrentes. Neste contexto é importante ressaltar que os custos associados à coluna cromatográfica podem ser diluídos ao longo do tempo, considerando novas produções. Ademais, há a possibilidade de explorar métodos alternativos que visam a redução desses custos fixos, sem comprometer a qualidade do processo, em um processo de produção em escala de bancada. Apenas 0,1% estão relacionados a despesas variáveis, incluindo reagentes como solução tampão de lise, imidazol para a purificação da enzima catalase em concentrações distintas, filtro 0,44 µm e etanol 20% para a restauração da coluna cromatográfica.

**Gráfico 7 - Distribuição dos custos de insumos para a etapa de purificação**

**Fonte: Autoria própria (2023)**

Para o consumo energético, resultou-se em um custo estimado de R\$ 254,89, como indicado na Tabela 5, para um consumo total de 440,84 kWh dos equipamentos utilizados, considerando uma tarifa de 0,5782 R\$ por kWh com impostos.

**Tabela 5 - Estimativa dos custos de energia elétrica dos equipamentos utilizados na etapa de purificação**

Equipamentos	Custo estimado
Aparelho de osmose reversa	R\$ 0,02
Autoclave	R\$ 8,09
Bomba à vácuo	R\$ 0,07
Cromatógrafo	R\$ 6,66
Sonicador	R\$ 0,11
Freezer -80 °C	R\$ 239,93
<b>Total</b>	<b>R\$ 254,89</b>

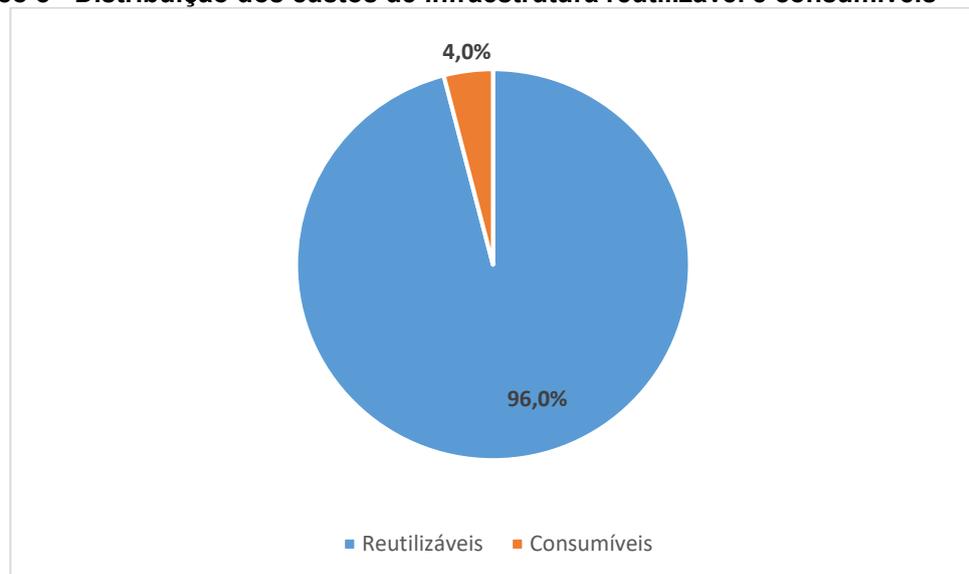
**Fonte: Autoria própria (2023)**

Dessa forma, obteve-se um custo total para a etapa de purificação de R\$ 9.530,96, o qual o maior custo foi a coluna cromatográfica de níquel HisTrap FF crude, representado na categoria 'outros' no Gráfico 7. No entanto, esse custo pode ser reduzido ao substituir por uma coluna de gravidade, como demonstrado na tese de Pacheco (2021).

Vale ressaltar que, apesar do custo total inicial de R\$ 14.291,39 para a primeira realização, esse valor pode ser amortizado ao longo do tempo, pois 96,0% desse valor representa infraestrutura reutilizável, o qual pode ser mitigado pela produção contínua a longo prazo. Por outro lado, os 4,0% restantes referem-se a consumíveis, que são itens necessários em cada experimento e precisam ser adquiridos regularmente, incluindo o custo de energia elétrica, conforme visto no Gráfico 8.

Devido à falta da etapa de purificação, não foi possível obter a enzima catalase na sua forma purificada. Como resultado, não foi possível quantificar a quantidade de enzima em mg e avaliar a eficiência do processo, considerando a sua atividade enzimática. Portanto, são necessários estudos e experimentos adicionais para validar a viabilidade da implementação comercial da catalase em produtos odontológicos, a fim de identificar o custo-benefício da produção em relação ao rendimento de enzima produzida.

**Gráfico 8 - Distribuição dos custos de infraestrutura reutilizável e consumíveis**



**Fonte: Autoria própria (2023)**

De acordo com Ferreira, Azzoni e Freitas (2018), o custo médio de produção de enzimas recombinantes em *E. coli* é de 316 US\$/kg, considerando um cenário base. No entanto, o custo final da enzima poderia ser reduzido em muitas frentes, por exemplo, substituindo a fonte de carbono por alternativas mais baratas, como resíduos agroindustriais, alteração de estratégias de indução bacteriana e do processo de inoculação.

Nesse sentido, a análise dos custos das etapas de produção torna-se fundamental. A dificuldade do processo de obtenção da enzima está diretamente relacionada ao custo de produção. Ao compreender a interação entre os desafios técnicos e os custos associados, será possível desenvolver estratégias mais eficientes e econômicas para a produção em larga escala de enzimas de interesse comercial.

## 6 CONCLUSÃO

No decorrer desse estudo, diversas nuances dos processos de produção de enzimas por meio de cultura bacteriana foram exploradas. Durante a fase inicial crescimento celular, observou-se fatores como a quantidade de volume de meio inadequado para o frasco Erlenmeyer utilizado e a qualidade das células transformadas influenciaram significativamente o tempo necessário para atingir a  $DO_{600nm}$ , evidenciando a importância crucial desses detalhes para o cultivo.

A análise detalhada dos custos revelou que investimentos iniciais significativos foram direcionados a infraestrutura, destacando a necessidade de amortização ao longo do tempo, enquanto os consumíveis, representados por itens regulares e energia elétrica, exigem uma gestão econômica contínua. Dessa forma, a produção de enzimas por meio de expressão heteróloga apresenta-se como uma perspectiva promissora, uma vez que a 96,0% dos custos podem ser diluídos em produções subsequentes.

Além disso, é válido destacar a complexidade de determinar parâmetros específicos para o estudo do processo produtivo em escalas laboratoriais e industriais, envolvendo um processo fermentativo por meio da bactéria *E. coli* para se obter a enzima catalase.

A literatura reforça que o custo médio de produção de enzimas recombinantes em *E. coli* pode ser otimizado, seja por meio de estratégias de indução bacteriana ou da exploração de fontes de carbono mais acessíveis, como resíduos agroindustriais. A análise dos custos, contextualizada com os desafios técnicos, emerge como um elemento fundamental para o desenvolvimento de abordagens mais eficazes e econômicas na produção em larga escala de enzimas com aplicações comerciais. Este estudo, ao elucidar essas complexidades, contribui para a evolução e inovação contínua no campo da biotecnologia enzimática.

Para pesquisas futuras, recomenda-se a realização de uma análise técnico-econômico mais abrangente para avaliar a viabilidade da produção de catalase com aplicação em produtos odontológicos. Isso incluiria uma análise de mercado específica para produtos de clareamento dental.

## REFERÊNCIAS

- ADRIO, J. L.; DEMAIN, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. **Biomolecules**, v. 4, n. 1, p. 117-139, 2014.
- ALAGOZ, L. G.; KARADAGLIOGLU, O. I.; ULUSOY, N. Antioxidants used in restorative dentistry. **Cyprus Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 2, p. 141-145, 2019.
- BARCELOS, M. C. S.; *et al.* The colors of biotechnology: general overview and developments of white, green and blue areas. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 21, 2018.
- BATH-BALOGH, M.; FEHRENBACH, M. J. Anatomia, histologia e embriologia dos dentes e das estruturas orofaciais. **Elsevier Editora Ltda**, 3. ed., 2012.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. Guanabara Koogan LTDA, 6. ed., 2007.
- BHUSARI, C. P.; SHARMA, D. S. Pattern of hydroxyapatite crystal growth on bleached enamel following the application of two antioxidants: an atomic force microscope study. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 41, n. 1, p. 38-47, 2017.
- BRANCO, L. S. C.; *et al.* **Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa por *Rhodotorula* sp. CNPAT02 em processo batelada para obtenção de carotenoides**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria, Comércio e Serviços. **Importação e de enzimas preparadas pelo Brasil**. MDIC, 2022. Disponível em: <http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral/92445>. Acesso em: 12 set. 2023.
- BUENDIA, S. H. **Avaliação *in vitro* do papel da catalase em diversas concentrações da adesividade do material restaurador à dentina clareadora**. Dissertação (Mestrado em Odontológica) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- CAREY, C. M. Tooth whitening: what we now know. **The Journal of Evidence-Based Dental Practice**, v. 14, p. 70-76, 2014.
- CHEN, D.; TEXADA; D. E. Low-usage codons and rare codons of *Escherichia coli*. **Gene Therapy and Molecular Biology**, v. 10, p. 1-12, 2006.
- DE ROBERTIS, E. D. P.; HIB, J. **Bases da biologia celular e molecular**. Guanabara Koogan, 4. ed., 2006.
- DUQUE, C. C. O. **Desenvolvimento de produtos para clareamento dental contendo a enzima horseradish peroxidase como agente catalisador**. Tese (Doutorado em Reabilitação Oral) – Programa Pós-Graduação em Reabilitação Oral,

Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2019.

EPPLE, M.; MEYER, F.; ENAX, J. A Critical review of modern concepts for teeth whitening. **Dentistry Journal**, v. 7, n. 79, 2019.

FERREIRA, R. G.; AZZONI, A. R.; FREITAS, S. Techno-economic analysis of the industrial production of a low-cost enzyme using *E. coli*: the case of recombinant  $\beta$ -glucosidase. **Biotechnology of Biofuels**, v. 11, n. 81, 2018.

FONSECA, A. S. **Odontologia estética: a arte da perfeição**. Editora Artes Médicas LTDA, 1. ed., 2008.

FORD, H.; CROWTHER, S. **My life and work**. Doubleday, Page & Company, 1922.

FRANCCI, C.; *et al.* Clareamento dental - técnicas e conceitos atuais. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 64, n. 1, p. 78-89, 2010.

GHANBARI, N.; *et al.* The influence of culture medium and growth phase on the antioxidant activity and bioactive compounds of *Serratia marcescens*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 131, n. 1, p. 282-293, 2021.

GIANNINI, M.; *et al.* Effect of carbamide peroxide-based bleaching agents containing fluoride or calcium on tensile strength of human enamel. **Journal Applied Oral Science**, v. 14, n. 2, p. 82-87, 2006.

GLOBAL industrial enzymes market to cross USD 10.5 billion by 2028. **BlueWeave Consulting and Research**, 2022. Disponível em: <https://bityli.com/gTIICHmeZ>. Acesso em: 02 nov. 2022.

GLOBAL Research and development expenditures: fact sheet. **Congressional Research Services**, v. 15, 2022. Disponível em: <https://bityli.com/VRIZSmcOR>. Acesso em: 28 nov. 2022.

GLORIEUX, C.; CALDERON, P. B. Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. **Biological Chemistry**, v. 398, n. 10, p. 1025-1108, 2017.

GURUNG, N.; *et al.* A broader view: microbial enzymes and their relevance in industries, medicine, and beyond. **BioMed Research International**, 2013.

HAND, J. R. M. The market valuation of biotechnology firms and biotechnology R&D. **Kenan-Flagler Business School**, 2001.

HANSBERG, W. Monofunctional heme-catalases. **Antioxidants**, v. 11, p. 2173, 2022.

ITC. International Trade Centre. Disponível em: <https://www.trademap.org/>. Acesso em: 07 set. 2023.

JIA, X.; *et al.* Cloning, expression, and characterization of a novel thermophilic monofunctional catalase from *Geobacillus* sp. CHB1. **BioMed Research International**, 2016.

KAFARSKI, P. Rainbow code of biotechnology. **Chemik**, v. 66, n. 8, p. 811-816, 2012.

KARAKUS, Y. Y. Glutathione system and oxidative stress in health and disease. Chapter - Typical catalases: function and Structure. **IntechOpen**, 2020.

KAUR, J; KUMAR, A.; KAUR, J. Strategies for optimization of heterologous protein expression in *E. coli*: roadblocks and reinforcements. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, p. 803-822, 2018.

KIHN, P. W. Vital tooth whitening. **Dental Clinics of North America**, v. 51, n. 2, p. 319-331, 2007.

KLEIN-MARCUSCHAMER, D.; *et al.* The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 4, p. 1083-1087, 2012.

KWON, S. R.; WERTZ, P. W. Review of the mechanism of tooth whitening. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, v. 27, n. 5, p. 240-257, 2015.

LAGO, A. N.; GARONE-NETTO, N. Microtensile bond strength of enamel after bleaching. **Indian Journal of Dental Research**, v. 24, n. 1, p. 104, 2013.

MAGHRABY, Y. R.; *et al.* Enzyme immobilization technologies and industrial applications. **ACS Omega**, v. 8, p. 5184-5196, 2023.

MARTIN, D. K. *et al.* A brief overview of global biotechnology. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 35, n. 1, p. 5-14, 2021.

MOLINA, G. *et al.* **Bioprocessing for biomolecules production**. Wiley, 1. ed., 2019.

NANDI, A.; *et al.* Role of catalase in oxidative stress- and age-associated degenerative diseases. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2019.

NIGAM, P. S. Microbial enzymes with special characteristics for biotechnology applications. **Biomolecules**, v. 3, n. 3, p. 597-611, 2013.

OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development). **Science, technology and industry coreboard 2013: innovation for growth**, 2013. Disponível em: <https://bitly.com/TvYKthltY>. Acesso em: 28 nov. 2022.

OZ, F. D.; KUTUK, Z. B. Effect of various bleaching treatments on shear bond strength of different universal adhesives and application modes. **Restorative Dentistry & Endodontics**, v. 43, n. 2, 2018.

PACHECO, A. E. M. **Expressão, purificação e caracterização de uma catalase de *Serratia marcescens***. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2021.

PEREIRA, L. M. **Clonagem, expressão, purificação e caracterização estrutural da proteína ribossomal L10 humana recombinante**. Dissertação (Mestrado em

Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ J.; VALIENTE, M.; SÁNCHEZ-MARTÍN, M. Tooth whitening: from the established treatments to novel approaches to prevent side effects. **Journal of Esthetic and Restorative Dentistry**, p. 1-10, 2019.

SHAEER, A.; ASLAM, M.; RASHID, N. A highly stable manganese catalase from *Geobacillus thermopakistaniensis*: molecular cloning and characterization. **Extremophiles**, v. 23, p. 707-7018, 2019.

SINGH, R. S.; *et al.* Advances in enzymes technology: biomass, biofuels, biochemicals. **Elsevier**, 2019.

SOARES, D. G.; *et al.* Increased whitening efficacy and reduced cytotoxicity are achieved by the chemical activation of a highly concentrated hydrogen peroxide bleaching gel. **Journal of Applied Oral Science**, v. 27, 2019.

SOOCH, B. S.; KAULDHAR, B. S.; PURI, M. Recent insights into microbial catalases: isolation, production and purification. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 8, p. 1429-1447, 2014.

TAKIO, N.; YADAV, M.; YADAV, H. S. Catalase-mediated remediation of environmental pollutants and potential application – a review. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 39, n. 6, p. 389-407, 2021.

TATTA, R. E.; *et al.* Bioprospecting of microbial enzymes: current trends ins industry and healthcare. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 106, p. 1813-1835, 2022.

TEETH whitening market size is projected to reach USD 11.66 Billion by 2030, growing at a CAGR of 5,45%. **Strait Research**, 2022. Disponível em: <https://bityli.com/vIAUKEZXi>. Acesso em: 18 nov. 2022.

TEETH whitening market size, value, growth report, 2022 - 2030. **Grand View Research**, 2022. Disponível em: <https://bityli.com/IXerTSCVw>. Acesso em: 18 nov. 2022.

THAKUR, R.; *et al.* Catalase and sodium fluoride mediated rehabilitation of enamel bleached with 37% hydrogen peroxide. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v. 33, n. 4, p. 324-330, 2015.

THAKUR, R.; *et al.* Effect of catalase and sodium fluoride on human enamel bleached with 35% carbamide peroxide. **International Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 12-17, 2015.

THAPA, S.; *et al.* Biochemical characteristics of microbial enzymes and their significance from industrial perspectives. **Molecular Biotechnology**, v. 61, n. 8, p. 579-601, 2019.

VITOLLO, M. Decomposition of hydrogen peroxide by catalase. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 8, p. 47-56, 2021.

YAYA, M. D. C. C. **Efeito da enzima catalase e peroxidase na cor e resistência de união do esmalte e dentina após clareamento.** Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2019.

YELKUR, R.; HERBIG, P. Global markets and the new product development process. **Journal of Product & Brand Management**, v. 5, n. 6, p. 38-47, 1996.

**APÊNDICE A - Detalhamento dos custos para o processo de expressão da catalase em escala laboratorial**

Categoria	Material	Quantidade (mL, g ou unidades)	Valor do Material	Valor Unitário	Quantidade (mL, g ou unidades) Gasto	Valor Gasto
Construção do plasmídeo	pET28a(+) + KAT	2,00E-06	R\$ 2.500,00	R\$ 2.500,00	2,00E-06	R\$ 2.500,00
Linhagem bacteriana	<i>Escherichia coli</i> Rosetta-gami pLysS	1	R\$ 550,00	R\$ 550,00	1	R\$ 550,00
Reagentes	Extrato de levedura (g)	500	R\$ 363,96	R\$ 0,73	10	R\$ 7,279
	Cloreto de sódio (g)	500	R\$ 20,13	R\$ 0,04	10	R\$ 0,403
	Triptona (g)	500	R\$ 296,81	R\$ 0,59	20	R\$ 11,87
	Luria Bertani (g)	500	R\$ 299,19	R\$ 0,60	2,2	R\$ 1,316
	Kanamicina (g)	1	R\$ 5.263,00	R\$ 5.263,00	2,61E-05	R\$ 0,137
	Cloranfenicol (g)	5	R\$ 291,00	R\$ 58,20	3,73E-05	R\$ 0,002
	IPTG (g)	1	R\$ 105,00	R\$ 105,00	7,63E-05	R\$ 0,008
	Suprimentos plásticos	Micropipeta (1000 µL)	1	R\$ 263,76	R\$ 263,76	1
Micropipeta (200 µL)		1	R\$ 263,76	R\$ 263,76	1	R\$ 263,76
Micropipeta (10 µL)		1	R\$ 263,76	R\$ 263,76	1	R\$ 263,76
Ponteiras (1000 µL)		96	R\$ 26,86	R\$ 0,28	20	R\$ 5,596
Ponteiras (200 µL)		96	R\$ 18,55	R\$ 0,19	20	R\$ 3,865
Ponteiras (10 µL)		96	R\$ 17,08	R\$ 0,18	20	R\$ 3,558
Tubos Eppendorf (1,5 mL)		500	R\$ 47,72	R\$ 0,10	3	R\$ 0,286
Vidrarias	Tubos de ensaios	1	R\$ 12,85	R\$ 12,85	2	R\$ 25,70
	Béquer (500 mL)	1	R\$ 18,90	R\$ 18,90	2	R\$ 37,80
	Béquer (250 mL)	1	R\$ 12,96	R\$ 12,96	2	R\$ 25,92
	Frasco de reagente c/ tampa (500 mL)	1	R\$ 43,16	R\$ 43,16	2	R\$ 86,32
	Frasco de reagente c/ tampa (1 L)	1	R\$ 71,40	R\$ 71,40	2	R\$ 142,80
	Erlenmeyer (1L)	1	R\$ 76,85	R\$ 76,85	4	R\$ 307,40
<b>TOTAL</b>		-	-	-	-	R\$ 4.501,54

Equipamento	Potência (kW)	Tempo de uso (horas)	Consumo kWh	Tarifa R\$/kWh com imposto	Valor Final de Energia
Aparelho de osmose reversa	0,02	1,00	0,02	0,5782	R\$ 0,01
Autoclave	3,50	2,00	7,00	0,5782	R\$ 4,05
Câmara de fluxo laminar (lâmpada UV)	0,03	1,00	0,03	0,5782	R\$ 0,02
Câmara de fluxo laminar (lâmpada LED)	0,04	2,00	0,08	0,5782	R\$ 0,05
Câmara de fluxo laminar (ventilação)	0,12	2,00	0,24	0,5782	R\$ 0,14
Shaker	1,50	16,00	24,00	0,5782	R\$ 13,88
Espectrofotômetro	0,02	0,33	0,01	0,5782	R\$ 0,01
Centrífuga (refrigeração)	1,50	0,67	1,00	0,5782	R\$ 0,58
Centrífuga (motor)	1,20	0,33	0,40	0,5782	R\$ 0,23
Freezer -80 °C	2,47	168,00	414,96	0,5782	R\$ 239,93
<b>TOTAL</b>	-	-	447,74	-	R\$ 258,88

**APÊNDICE B - Detalhamento dos custos para o processo de purificação da catalase em escala laboratorial**

Categoria	Material	Quantidade (mL, g ou unidades)	Valor do Material	Valor Unitário	Quantidade (mL, g ou unidades) Gasto	Valor Gasto
Reagentes	Fosfato de sódio (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	250	R\$ 34,74	R\$ 0,14	4,9	R\$ 0,68
	Tris-HCl	500	R\$ 180,00	R\$ 0,36	1,0	R\$ 0,36
	Cloreto de Sódio (NaCl)	500	R\$ 19,66	R\$ 0,04	4,8	R\$ 0,19
	Imidazol	250	R\$ 148,91	R\$ 0,60	20,4	R\$ 12,16
	Etanol (20%)	1000	R\$ 50,00	R\$ 0,05	20,0	R\$ 1,00
Vidrarias	Kitassato (500 mL)	1	R\$ 85,22	R\$ 85,22	1	R\$ 85,22
	Funil de porcelana	1	R\$ 246,06	R\$ 246,06	1	R\$ 246,06
	Béquer (500 mL)	1	R\$ 18,90	R\$ 18,90	2	R\$ 37,80
	Béquer (250 mL)	1	R\$ 12,96	R\$ 12,96	2	R\$ 25,92
Outros	Coluna de níquel (5 mL)	1	R\$ 8.853,60	R\$ 8.853,60	1	R\$ 8.853,60
	Filtro (0,44 µm)	100	R\$ 326,98	R\$ 3,27	4	R\$ 13,08
<b>TOTAL</b>		-	-	-	-	R\$ 9.276,07
Equipamento	Potência (kW)	Tempo de uso (horas)	Consumo kWh	Tarifa R\$/kWh com imposto	Valor Final de Energia	
Aparelho de osmose reversa	0,02	2,00	0,04	0,5782	R\$ 0,02	
Autoclave	3,50	4,00	14,00	0,5782	R\$ 8,09	
Bomba à vácuo	0,75	0,17	0,13	0,5782	R\$ 0,07	
Cromatógrafo Akta	1,92	6,00	11,52	0,5782	R\$ 6,66	
Sonicador	0,75	0,25	0,19	0,5782	R\$ 0,11	
Freezer -80 °C	2,47	168,00	414,96	0,5782	R\$ 239,93	
<b>TOTAL</b>	-	-	440,84	-	R\$ 254,89	