

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS TOLEDO**

THAÍS GARRIDO

**AVALIAÇÃO TÉCNICA - ECONÔMICA DA PRODUÇÃO DE
LACTASE PELA FERMENTAÇÃO DO PERMEADO DE SORO
DE LEITE UTILIZANDO A LEVEDURA *Kluyveromyces
marxianus* ATCC 36907**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E
BIOTECNOLÓGICOS
PPGQB**

**TOLEDO
2020**

THAÍS GARRIDO

**AVALIAÇÃO TÉCNICA - ECONÔMICA DA PRODUÇÃO DE
LACTASE PELA FERMENTAÇÃO DO PERMEADO DE SORO
DE LEITE UTILIZANDO A LEVEDURA *Kluyveromyces
marxianus* ATCC 36907**

**Technical and economic evaluation of lactase production by
fermentation of whey permeate using yeasts *kluyveromyces marxianus*
ATCC 36907**

Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do título de Mestre em Processos
Químicos e Biotecnológicos da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador: Gracinda Marina Castelo da Silva.

TOLEDO

2020



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

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



THÁIS GARRIDO

**AVALIAÇÃO TÉCNICA - ECONÔMICA DA PRODUÇÃO DE LACTASE PELA
FERMENTAÇÃO DO PERMEADO DE SORO DE LEITE UTILIZANDO A LEVEDURA
KLUYVEROMYCES MARXIANUS ATCC 36907**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Processos Químicos E Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Processos Químicos E Biotecnológicos.

Data de aprovação: 14 de Setembro de 2020

Prof.a Gracinda Marina Castelo Da Silva, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Marcia Teresinha Veit, Doutorado - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste)

Prof Robson Luciano De Almeida, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 15/11/2020.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar me guiando e me dando força para não desistir em cada obstáculo para conseguir mais essa conquista.

Aos meus pais Fernando e Edineide, por todos os ensinamentos e apoio.

Aos meus avós, meus maiores exemplos de força e dedicação, que me incentivam sempre a buscar os meus sonhos.

À minha orientadora Gracinda Marina Castelo da Silva pela confiança, ensinamentos e dedicação que depositou em mim que foi fundamental para a conclusão desse trabalho.

RESUMO

GARRIDO, Thais. Avaliação técnica - econômica da produção de lactase pela fermentação do permeado de soro de leite utilizando a levedura *kluveromyces marxianus* atcc 36907. Toledo. 2020. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo

Com os avanços da biotecnologia microbiana a utilização do permeado do soro de leite se tornou uma boa alternativa por ser um substrato barato e disponível, na obtenção de β -galactosidase, também conhecida como lactase. Essa enzima é muito utilizada pelas indústrias farmacêuticas para produzir medicamentos para pacientes que possuem intolerância a lactose, já na indústria de alimentos é utilizada para a hidrólise da lactose. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção da β -galactosidase por fermentação submersa a partir do substrato permeado do soro de leite. O estudo da viabilidade é importante, pois existe um aumento da demanda industrial da lactase e em decorrência a necessidade de estudos que viabilizam a produção dessa enzima. As enzimas foram sintetizadas pela levedura *k. marxianus* ATCC 36907 a temperatura de 40 °C em 12 horas. A avaliação técnico-econômica para a produção das enzimas em escala industrial considerou a disponibilidade de permeado do soro de leite de uma indústria de laticínio do oeste do Paraná considerando dois volumes de biorreatores de 10 m³ e 100 m³. Para o biorreator de 10 m³ obteve-se um payback de 20 anos e 3 meses, VPL de R\$ -15.024.651, TIR 6,84%, TIRM -8,00% e IL -0,95%, já o biorreator de 100 m³ um payback de 19 anos e 3 meses, VPL de R\$ -132.239.927, TIR 7,38%, TIRM -9,00% e IL -0,93%. Com base nos levantamentos realizados e construção do fluxo de caixa para implantação e operação de uma planta produtora de lactase a partir do permeado do soro de leite, o estudo não se demonstrou ser atrativo ao se considerar uma TMA de 20%, além disso, o projeto não apresentou viabilidade técnico-econômica em função do tempo de retorno. Porém, ao se considerar uma TMA de 5% para ambos os volumes dos biorreatores o VPL se mostrou positivo, sendo atrativo do ponto de vista econômico.

PALAVRAS-CHAVE: Lactase; Permeado de Soro de Leite; Avaliação Técnico - Econômica.

ABSTRACT

GARRIDO, Thais. Technical and economic evaluation of lactase production by fermentation of whey permeate using yeasts *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Toledo. 2020. Dissertation (Master's Degree) - Graduate Program in Chemical and Biotechnological Processes, Federal Technological University of Paraná, Toledo.

With the advances in microbial biotechnology, the use of whey permeate has become a good alternative because it is a cheap and available substrate for obtaining β -galactosidase, also known as lactase. This enzyme is widely used by the pharmaceutical industry to produce medicines for patients who have lactose intolerance, while in the food industry it is used for the hydrolysis of lactose. Thus, the objective of this work was to evaluate the production of β -galactosidase by submerged fermentation from the whey permeate substrate. The feasibility study is important, as there is an increase in the industrial demand for lactase and, as a result, the need for studies that make the production of this enzyme feasible. The enzymes were synthesized by yeast *K. marxianus* ATCC 36907 at a temperature of 40 °C in 12 hours. The technical-economic evaluation for the production of enzymes on an industrial scale considered the availability of whey permeate from a dairy industry in western Paraná considering two volumes of bioreactors of 10 m³ and 100 m³. For the 10 m³ bioreactor, a payback of 20 years and 3 months was obtained, NPV of R \$ -15,024,651, TIR 6.84%, TIRM -8.00% and IL -0.95%, whereas the bioreactor of 100 m³ a payback of 19 years and 3 months, NPV of R \$ -132,239,927, TIR 7.38%, TIRM -9.00% and IL -0.93%. Based on the surveys carried out and the construction of the cash flow for the implantation and operation of a lactase-producing plant from whey permeate, the study was not shown to be attractive when considering a 20% TMA. The project did not show technical and economic viability due to the return time. However, when considering a TMA of 5% for both volumes of the bioreactors, the NPV was positive, being attractive from the economic point of view.

KEYWORDS: Lactase; Whey Permeate; Technical and Economic Evaluation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição mundial em valores de exportação de enzimas em 2019.....	13
Figura 2 – Distribuição mundial da demanda de enzimas de produção industrial em diferentes áreas.....	14
Figura 3 – Principais países em 2019 que participaram das importações do Brasil em %	16
Figura 4 – Países que tiveram um aumento no valor de exportação para o Brasil entre 2015 a 2019	16
Figura 5 – Mercado brasileiro de importação de enzimas de 2008 a 2018	17
Figura 6 – Preços das enzimas e enzimas preparadas importadas pelo Brasil desde 2008 a 2018.	17
Figura 7 – Principais estados do Brasil importadores de enzimas no ano de 2018 ..	18
Figura 8 – Distribuição das enzimas industriais exportadas no Brasil em 2008.	18
Figura 9 – Aplicações biotecnológicas da enzima lactase	21
Figura 10 – Disponibilidade mundial de biomassa estimada em 2030.....	23
Figura 11 – Etapas de produção e purificação de enzimas de fermentação submersa	26
Figura 12 – Fluxograma da produção de enzimas por meio da fermentação submersa.....	28
Figura 13 – Principais enzimas utilizadas no processamento do algodão	30
Figura 14 – Tipos de biorreatores	33
Figura 15 - Desenho esquemático das simbologias das medidas do biorreator	34
Figura 16- Fluxograma do processo de fabricação do queijo.....	39
Figura 17 – Fluxograma do processo de ultrafiltração do soro de queijo	40
Figura 18 – A fórmula química da lactose	42
Figura 19 – Morfologia da levedura <i>K. marxianus</i> ATCC 36907	45
Figura 20 - Crescimento da levedura <i>K. marxianus</i> com o substrato soro de queijo.	47
Figura 21 – Diagrama dos <i>designs</i> para purificação da lactase	50
Figura 22 – Comparação entre dois fabricantes de lactase com a mesma atividade enzimática	51
Figura 23 – Proporção do custo operacional anual em uma indústria produtora de enzima.....	59
Figura 24– Exemplo de um fluxo de caixa	60
Figura 25- Fluxograma das fases do projeto de instalação de um sistema de fermentação para o subproduto permeado de soro de leite.....	67
Figura 26– Volume de enzimas e enzimas preparadas importadas pelo Brasil em toneladas no período de 2008 a 2018.....	71
Figura 27- Previsão de enzimas e enzimas preparadas importadas pelo Brasil até 2021	71
Figura 28 – Fluxograma macro do processo de obtenção da enzima lactase	73
Figura 29 – Diagrama de Fluxo de Processo (PFD) da produção de lactase (simbologia conforme Tabela 16).....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Fontes de obtenção da enzima lactase	21
Tabela 2 – Classificação geral dos biorreatores de fermentação submersa	33
Tabela 3 – Classificação geral dos biorreatores para a fermentação semissólida	33
Tabela 4 – Medidas do biorreator de 100 L.....	35
Tabela 5 – Atividades específicas máximas de Lactase e parâmetros cinéticos de cultivo em diferentes condições testadas	36
Tabela 6- Valores estimados para a instalação de sistemas de tratamento de efluentes de 80.000 e 120.000 litros/dia em laticínios	38
Tabela 7 – Produção máxima de lactase por diferentes microrganismos	43
Tabela 8 - Relação das variáveis pH, temperatura, agitação e tempo de cultivo para trabalhos que utilizaram resíduo de laticínio como meio de cultivo de diferentes cepas de <i>K. marxianus</i>	46
Tabela 9 – Resultados de análise de bancada para a produção de lactase	46
Tabela 10 – Fator de purificação da lactase	49
Tabela 11 – Resultados dos fatores de purificação e recuperação para cada <i>design</i> de processo.....	50
Tabela 12 – Regulamentação internacional de produção de enzimas	52
Tabela 13 – Estimativa para custos de instalação de empreendimento de processamento sólido-líquido.....	57
Tabela 14 – Caracterização do permeado de soro de leite.....	65
Tabela 15 – Análises de viabilidade do projeto para produção industrial de lactase.....	69
Tabela 16 – Identificação dos equipamentos e das correntes do processo para produção da lactase	73
Tabela 17 – Insumos para o preparo do inóculo	75
Tabela 18 – Insumos para o preparo do meio de cultivo.....	75
Tabela 19 – Insumos das operações de <i>Downstream</i>	75
Tabela 20 - Quantidade de leveduras necessárias para um dia de operação de fermentação em biorreator de 10 m ³ e 100 m ³	76
Tabela 21- Dados para o cálculo da quantidade de enzimas produzidas	77
Tabela 22 – Informações sobre o processo e condições operacionais	78
Tabela 23 - Dados importantes para as despesas do projeto	79
Tabela 24 – Infraestrutura necessária e estimativas dos valores dos equipamentos para um biorreator de 10 m ³	80
Tabela 25– Infraestrutura necessária e estimativas dos valores dos equipamentos para um biorreator de 100 m ³	81
Tabela 26 – Estimativa de investimento necessário para instalar uma indústria produtora de lactase.....	82
Tabela 27 – Tributações sobre enzimas	83
Tabela 28 – Custos variáveis	83
Tabela 29 – Custos fixos de produção de lactase	84
Tabela 30 – Valores das receitas	84
Tabela 31 – Resultados da viabilidade do projeto para um biorreator de 10 m ³	85
Tabela 32 – Resultados da viabilidade do projeto para um biorreator de 100 m ³	85
Tabela 33 – Análise da variação da TMA e VPL.....	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1– Principais fontes comerciais para a produção da lactase	15
Quadro 2– Principais enzimas utilizadas nos processos de produção de alimentos.	29
Quadro 3 – Enzimas terapêuticas e suas aplicações	31

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

TMA	Taxa mínima de atratividade
TIRM	Taxa interna de retorno modificada
TIR	Taxa interna de retorno
VPL	Valor presente líquido
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
FDA	Administração de comidas e remédios
FSS	Fermentação semissólida
FS	Fermentação submersa
FES	Fermentação em estado sólido
TRH	Tempo de retenção hidráulica
SELIC	Sistema especial de liquidação e de custódia
K_{La}	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio
PFD	Diagrama de fluxo de processo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Mercado de enzimas internacional	13
3.2 Mercado de enzimas nacional	15
3.2.1 Empresas brasileiras que exportam enzimas	19
3.3 Lactase	20
3.4 Produção industrial de enzimas	22
3.4.1 Fermentação submersa (FS)	27
3.5 Enzimas na indústria de alimentos	28
3.6 Enzimas na indústria têxtil	30
3.7 Enzimas na indústria farmacêutica	31
3.8 Biorreatores	32
3.8.1 Modelo de biorreator para produção de enzimas - fermentação submersa	34
3.9 Soro de leite	36
3.10 Permeado de soro de leite	39
3.11 Lactose	41
3.12 Microrganismos empregados na produção da lactase	42
3.12.1 Levedura <i>k. Marxianus</i>	44
3.13 Importância da suplementação nutricional do meio de fermentação	47
3.13.1 Preparo do inóculo, meio de cultivo e atividade enzimática para a produção da lactase	48
3.13.2 Métodos para purificação e recuperação da lactase	49
3.14 Especificação do produto final (lactase)	51
3.14.1 Legislação	52
3.15 Avaliação econômica	53
3.16 Conceitos importantes para análise de investimentos	53
3.16.1 Gastos	54
3.16.2 Investimento	54
3.16.3 Despesas e receitas	55
3.16.4 Custo	55
3.16.5 Método para estimar custos variáveis de um empreendimento	56
3.16.6 Métodos de estimativas de custos dos equipamentos	57
3.16.7 Cálculo do custo de produção	58
3.16.8 Depreciação	59
3.16.9 Fluxo de caixa	60
3.16.10 Taxa mínima de atratividade (TMA)	60
3.17 Viabilidade econômica	61
3.18 Valor presente líquido (VPL)	61
3.19 Taxa interna de retorno (TIR) e taxa interna de retorno modificada (TIRM)	62
3.20 Retorno do investimento (PAYBACK)	63
3.21 Índice de lucratividade (IL)	64
4 METODOLOGIA	65
4.1.1 Estudo de caso	65
4.1.2 Fases do projeto	66

4.1.3 Estimativas dos custos dos equipamentos.....	68
4.1.4 Estimativa do custo de instalação de um empreendimento.....	68
4.1.5 Estimativa do custo de produção	68
4.1.6 Indicadores econômicos.....	69
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	70
5.1.1 Levantamentos sobre o mercado	70
5.1.2 Etapas do processo produtivo da lactase.....	72
5.1.3 Diagrama de fluxo do processo.....	74
5.1.4 Levantamentos dos investimentos, gastos e receitas	78
5.1.5 Viabilidade econômica do projeto.....	84
6 CONCLUSÕES	87
7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS.....	87
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
APÊNDICE A: DIMENSIONAMENTO DOS EQUIPAMENTOS.....	100
APÊNDICE B: DETALHAMENTOS DOS CUSTOS E AS RECEITAS PROJETADAS	102

1 INTRODUÇÃO

O mercado da enzima lactase é concentrado em poucos fornecedores mundiais e o fator que dificulta a entrada de novos fabricantes é por ser um processo guardado por sigilo industrial. No ano de 2019, foram exportadas mundialmente 542.057 toneladas de enzimas, sendo que a Dinamarca representou 22% (119.379 toneladas), China 15,33% (83.117 toneladas), Estados Unidos 11,91% (64.592 toneladas), Finlândia 9,90% (53.670 toneladas) e o Brasil 1,13% (6.162 toneladas) (ITC, 2020).

As novas tecnologias permitem o aproveitamento de resíduos de laticínios, abundantemente disponíveis a um custo relativamente baixo é possível produzir produtos com valores agregados como por exemplo, a enzima lactase.

O problema das indústrias de laticínios é que o subproduto permeado do soro de leite (gerado na ultrafiltração do soro de leite) é altamente poluente com uma DQO e DBO elevada, de respectivamente 80.000 e 60.000 mg/L e isso requer tratamentos onerosos para posterior descarte no meio ambiente (ANDRADE, MARTINS, 2002; BALDASSO et al., 2009).

Sendo assim, pode-se adotar medidas estratégicas como investir em projetos de biotecnologia para produzir produtos que possuem preços competitivos no mercado e que gerem lucro para a indústria. Essa viabilidade técnico-econômica para a produção de lactase em escala industrial se mostra atrativa, pois essa enzima possui grande importância para a saúde da população mundial por ser utilizada para tratamento de pessoas com intolerância a lactose. Por isso, essa enzima tem sido mais estudada.

Na literatura não é fácil encontrar muitas informações sobre o processo produtivo da lactase em escala industrial e as indústrias não divulgam detalhes do processo de fermentação e purificação por considerá-los um sigilo industrial.

Ademais, faz-se necessário estimular a competitividade desse mercado que se concentra em poucos fabricantes com o desenvolvimento de tecnologia para a produção desta enzima, sendo a fermentação submersa uma alternativa a ser explorada, devido as suas vantagens como: facilidade de manipulação, maiores volumes de meio, a massa de microrganismo fica totalmente submersa no meio de forma uniforme e melhor absorção dos nutrientes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar o custo de obtenção da enzima lactase por fermentação submersa e avaliar a viabilidade técnico-econômica da instalação de uma planta para produção da enzima com biorreator de 10 m³ e 100 m³.

2.2 Objetivos específicos

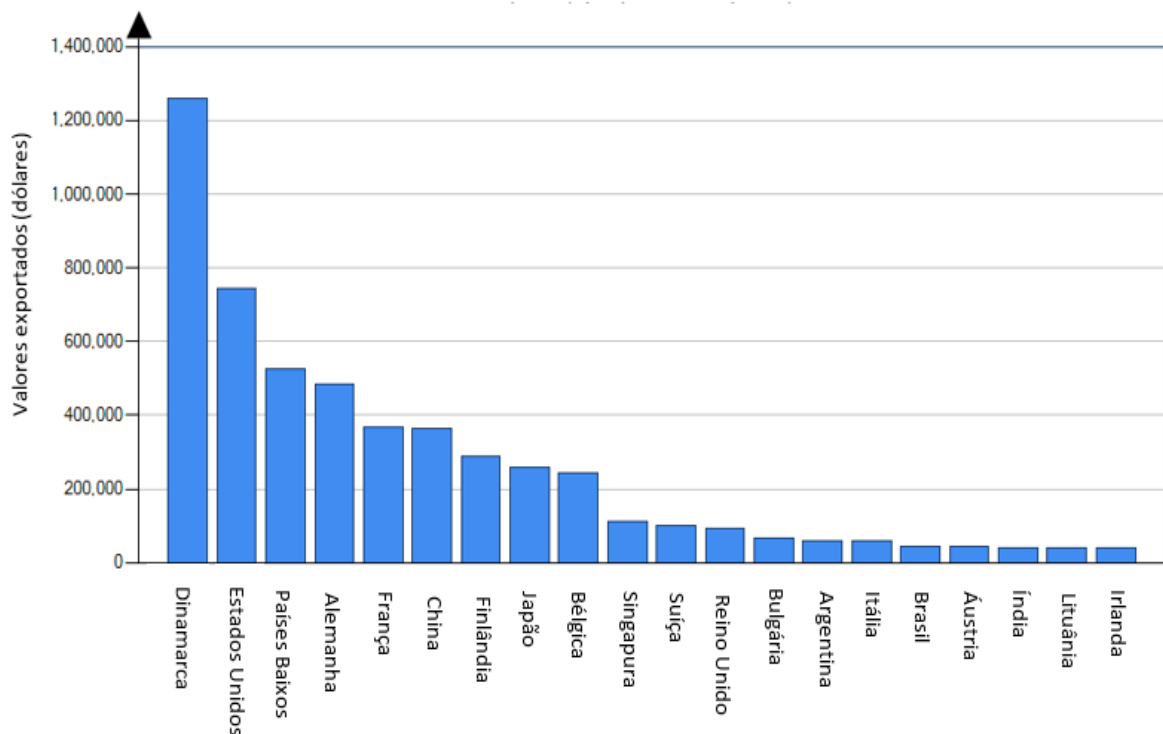
- a) Analisar a demanda do mercado de enzimas e determinar o preço de venda;
- b) Elaborar o escopo do processo (equipamentos, insumos, estimar o custo operacional e mão de obra);
- c) Avaliar a viabilidade do investimento por meio de indicadores técnico-econômicos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Mercado de enzimas internacional

Os principais países exportadores de enzimas e preparações enzimáticas são: Dinamarca, Estados Unidos, Países Baixos e Alemanha. Em 2019, foram exportadas mundialmente 542.057 toneladas de enzimas, sendo que a Dinamarca representou 22% (119.379 toneladas) dessas exportações e o Brasil exportou (6.162 toneladas) equivalente a 1,13% do mercado mundial. (ITC, 2020). A Figura 1 demonstra os valores de enzimas exportadas por país no ano de 2019.

Figura 1 – Distribuição mundial em valores de exportação de enzimas em 2019

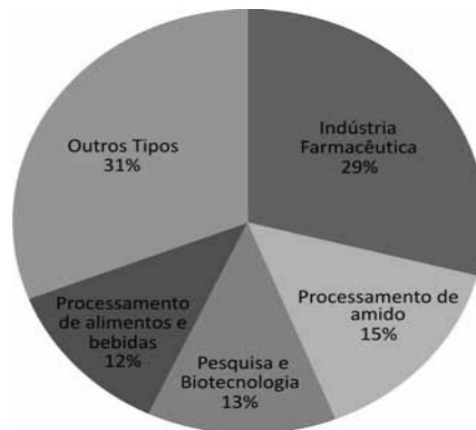


Fonte: Adaptado de ITC, 2020.

A Dinamarca se destaca como país que mais exportou enzimas e preparações enzimáticas em 2019 nesse mercado. Os principais compradores são: Estados Unidos, Países Baixos, Alemanha e França (ITC, 2020). O mercado mundial de enzimas pode ser dividido nos seguintes segmentos que são: as

enzimas técnicas (compõem a indústria têxtil e produtos de limpeza), enzimas destinadas aos alimentos e bebidas, e enzimas para a produção de rações animais (SOUZA, 2012). A Figura 2 representa a distribuição mundial das demandas de enzimas industriais em 2009, na qual a maior parcela cabe as indústrias farmacêuticas.

Figura 2 – Distribuição mundial da demanda de enzimas de produção industrial em diferentes áreas



Fonte: Monteiro e Silva, 2009.

As principais produtoras de enzimas são empresas europeias: a holandesa Gist-Brocades, a finlandesa Genencor International e a dinamarquesa Novo Nordisk. A Nordisk possui cerca de metade do mercado mundial de enzimas, detentora da marca comercial Novozymes S/A, com uma planta industrial no Brasil em Araucária, Curitiba (SOUZA, 2012).

Os produtores de enzimas podem utilizar diferentes fontes para a produção do mesmo produto. No Quadro 1 é apresentada as fontes comerciais para a produção da enzima lactase mundialmente, sendo que a maior parte das indústrias utilizam leveduras para a sua produção.

Quadro 1– Principais fontes comerciais para a produção da lactase

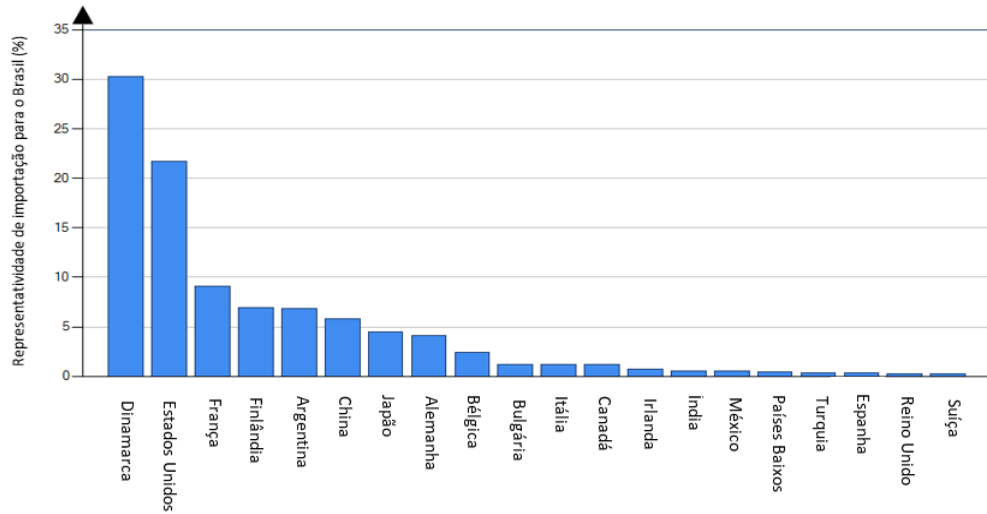
Fonte da Enzima	Nome da Marca	Fornecedor
Bacteria		
<i>Bacillus</i> sp.	Novozym 231	Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark
<i>Escherichia coli</i>	β -Galactosidase	Sigma-Aldrich, UK
Yeasts		
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Maxilact Lactase β -Galactosidase	DSM Food Specialties, Delft, The Netherlands SNAM Progetti, Italy Sigma-Aldrich, UK
<i>Saccharomyces fragilis</i>	β -Galactosidase	Sigma-Aldrich, UK
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Lactozyme	Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark
<i>Kluyveromyces</i> sp.	Lactase NL	Enzyme Development Corporation, New York, USA
<i>Candida pseudotropicalis</i>	Neutral lactase	Pfizer, Milwaukee, USA
Fungi		
<i>Aspergillus niger</i>	Sumylact Lactase	Sumitomo Chemical, Japan Valio Laboratory, Finland
<i>Aspergillus oryzae</i>	Fungal lactase Biolactase Lactase 2214C β -Galactosidase	Enzyme Development Corporation, New York, USA Biocon (US) Inc., Lexington, USA Rohm, Darmstadt, Germany Sigma-Aldrich, UK

Fonte: Adaptado de Carrara, Rubiolo, 1994; Jurado et al., 2004 e Roy, Gupta, 2003.

3.2 Mercado de enzimas nacional

Quanto a exportação do Brasil no ano de 2019, de um total de 6.162 toneladas de enzimas e preparações enzimáticas produzidas, os principais compradores das mesmas foram a Argentina (1.472 toneladas), Paraguai (1.291 toneladas) e China (1.015 toneladas) (ITC, 2020). As importações do Brasil em 2019 representaram 2,8% das importações mundiais de enzimas, correspondendo a 18.478 toneladas de enzimas principalmente dos seguintes países: Dinamarca, Estados Unidos, e França (ITC, 2020). Na Figura 3 observa-se os principais países que forneceram em 2019 enzimas para o Brasil.

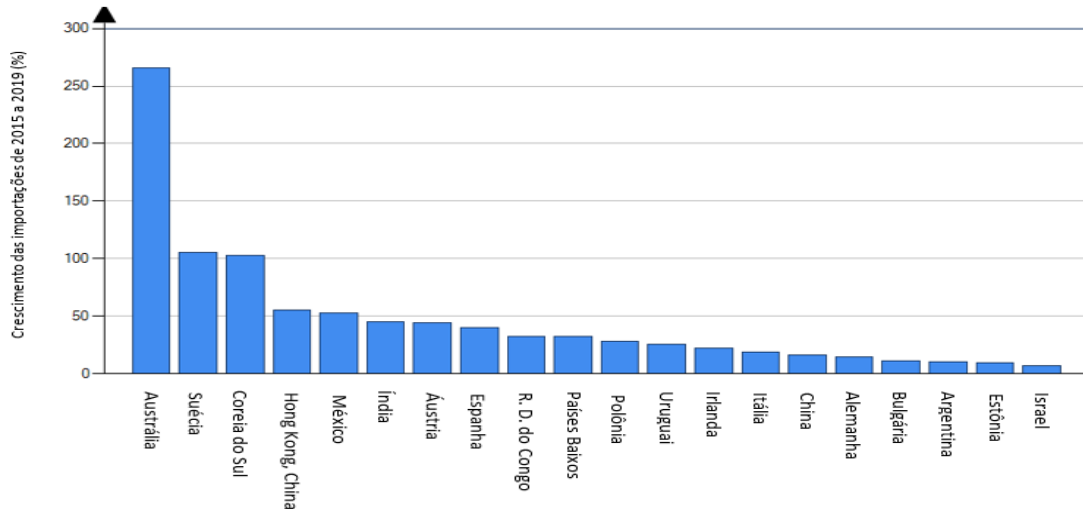
Figura 3 – Principais países em 2019 que participaram das importações do Brasil em %



Fonte: Adaptado de ITC, 2020.

A Austrália, Suécia e Coreia foram os países que no período de 2015 a 2019 tiveram uma considerável taxa de crescimento em valores nas exportações para o Brasil sendo essas taxas 266%, 105% e 103%, respectivamente (ITC, 2020). Na Figura 4 pode-se observar quais foram os principais países fornecedores de enzimas que no período de 2015 a 2019 conquistaram o mercado brasileiro.

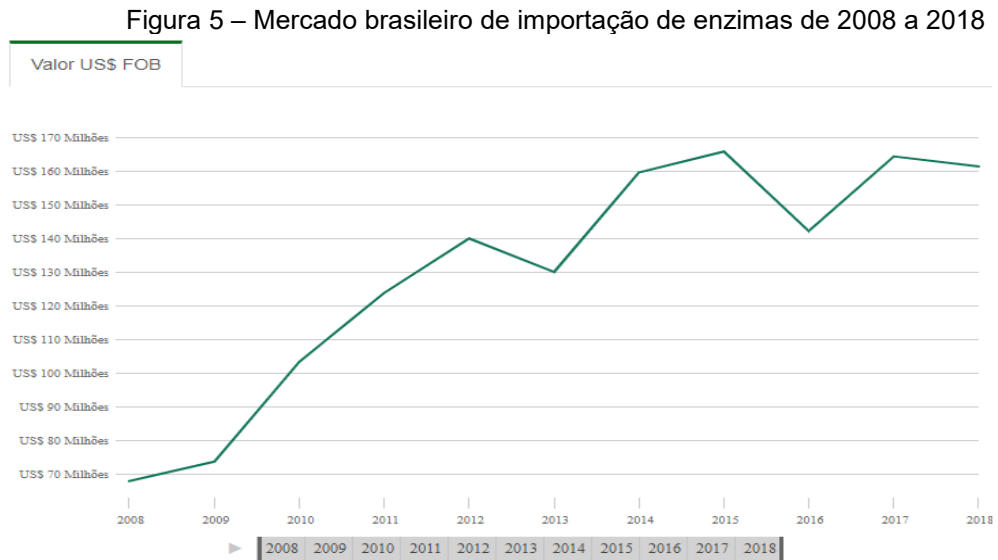
Figura 4 – Países que tiveram um aumento no valor de exportação para o Brasil entre 2015 a 2019



Fonte: Adaptado de ITC, 2020

Dados históricos sobre as importações de enzimas no período de 2008 a 2018, do Ministério da Economia, Indústria, Comércio Exterior e Serviços o

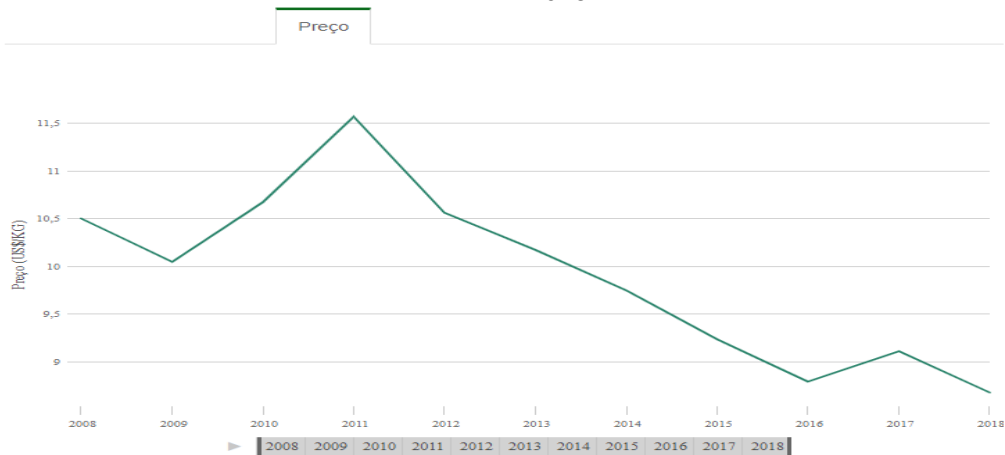
Brasil teve um crescente aumento no seu mercado de importação de enzimas e enzimas preparadas, exceto no ano de 2013 e 2016. O valor gasto com importação no ano de 2018 chegou a US\$ 160 Milhões conforme se pode observar na Figura 5.



Fonte: MDIC, 2019.

Ao analisar os dados sobre os valores de aquisições nesse mesmo período houve um decréscimo nesses valores tendo o valor máximo de US\$ 11,572 / kg no ano de 2011 e o menor valor de US\$ 8,681 / kg em 2018 conforme mostrado na Figura 6.

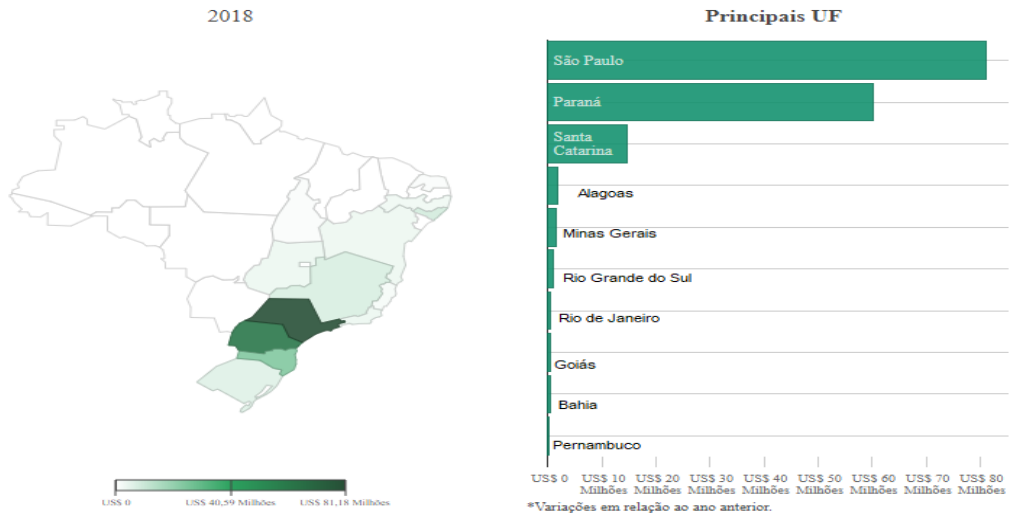
Figura 6 – Preços das enzimas e enzimas preparadas importadas pelo Brasil desde 2008 a 2018.



Fonte: MDIC, 2019.

Os três principais estados que importaram em 2018 enzimas e enzimas preparadas são: São Paulo, Paraná e Santa Catarina com os respectivos valores totais de importações US\$ 81,18 Milhões, US\$ 60,29 Milhões e US\$ 14,48 Milhões (Figura 7), segundo os dados do Ministério da Economia, Indústria, Comércio Exterior e Serviços.

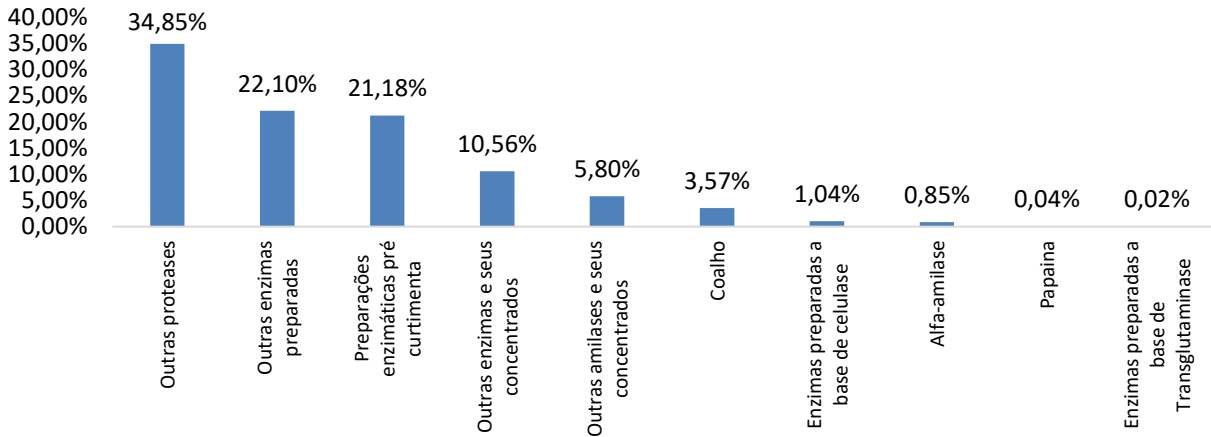
Figura 7 – Principais estados do Brasil importadores de enzimas no ano de 2018



Fonte: MDIC, 2019.

Nas Figuras 8 é possível observar qual foi a distribuição das enzimas industriais exportadas no ano de 2008 pelo Brasil. Os valores de outras enzimas industriais (21,10%) e outras enzimas e seus concentrados (34,85%).

Figura 8 – Distribuição das enzimas industriais exportadas no Brasil em 2008.



Fonte: Adaptado de MDIC, 2012.

Mesmo sendo um país importador de enzimas industriais, o Brasil tem um grande potencial para a produção das mesmas por dois fatores que são a abundância em matéria orgânica a ser utilizada como substrato de custo reduzido para fermentações como, por exemplo: palha de arroz, soro de leite, bagaço de cana, e o grande potencial biológico, com a descoberta de novos microrganismos produtores de enzimas de interesse industrial (SOUZA, 2012).

3.2.1 Empresas brasileiras que exportam enzimas

No período de 2003 a 2005 foram identificadas 114 empresas que exportaram enzimas ou produtos contendo enzimas. Destas empresas 70 (cerca de 60%) estão localizadas no estado de São Paulo e os outros estados que apresentaram número significativo de empresas são: estado do Paraná com 12 empresas, Rio de Janeiro com 10, Rio Grande do Sul com 10 e o estado de Minas Gerais com 6 empresas (POLITZER, BON, 2006).

As áreas de atuação dessas empresas são: a indústria farmacêutica que apresentou o maior número de empresas (27), seguida de alimentos e bebidas (23), têxtil, couro, papel, celulose (22), importação / exportação (13), saneantes (11), diagnósticos (6), produtos médico hospitalares e para laboratório (7), ração animal (7), veterinária (6), cosméticos (5), produção de enzimas (4), meio ambiente (3), instituições de pesquisa (2), indústria química (1) e outros (3) (POLITZER, BON, 2006).

As empresas que possuíam valores de exportação na faixa entre US\$ 1 e 10 milhões no período de 2003 a 2005 são: NOVOZYMES LATIN AMERICA LTDA., (proteases e seus concentrados e enzimas preparadas); TOYOBO DO BRASIL LTDA. (amilases e seus concentrados); SANOFI AVENTIS PHARMA LTDA (medicamento contendo Lasparaginase em doses) (POLITZER, BON, 2006).

3.3 Lactase

As enzimas são proteínas que atuam como catalisadores de reações bioquímicas, pois apresentam uma atividade específica. Além disso, elas são importantes por controlar processos de conversão de nutrientes em energia e tornar os processos bioquímicos mais assertivos e rápidos (NELSON, COX, 2014).

As enzimas precisam de condições específicas para realizarem as suas funções de forma mais eficiente. As condições que influenciam nesse desempenho da ação enzimática são a concentração de substrato, o pH e a temperatura. Conforme suas peculiaridades as enzimas são ativas em uma determinada faixa de pH e são impactadas com às mudanças de acidez ou alcalinidade do meio. Se comparadas as reações químicas, atuam sob condições consideradas brandas de temperatura e acidez (JUNIOR, SASSON, 1984).

Nos processos as enzimas conseguem substituir substâncias químicas sintéticas e ajudam nos processos de produção ou geram benefícios para o meio ambiente por causa da biodegradabilidade e por ter um menor consumo de energia. As enzimas são mais específicas em sua ação comparadas com as substâncias químicas sintéticas (WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011).

Os processos que utilizam enzimas produzem menores quantidades de subprodutos residuais e com isso geram produtos de melhor qualidade e diminuindo a probabilidade de poluição (WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011).

A enzima β -galactosidase é conhecida como lactase, β -D-lactosidase além de nomes comerciais, como Maxilact, Hydrolact, Lactozym e Oryzatym (MARTINS, 2005).

A lactase pode ser encontrada em vegetais, amêndoas, pêssegos, damascos e maçãs, nos animais em órgãos como intestinos, cérebros, testículos, placentas e produzida por fungos filamentosos, bactérias e leveduras (RICHMOND, GRAY, STINE, 1981).

Durante o período neonatal a lactase possui atividade alta e lactância em todas as espécies de mamíferos e em todas as populações humanas, porém diminui na época do desmame. Depois desse período, a atividade da lactase é baixa, geralmente menos de 10% da atividade do neonato (VOGEL, 2000).

A Tabela 1 apresenta as fontes para se obter a enzima lactase.

Tabela 1 – Fontes de obtenção da enzima lactase
Possíveis fontes de obtenção da lactase

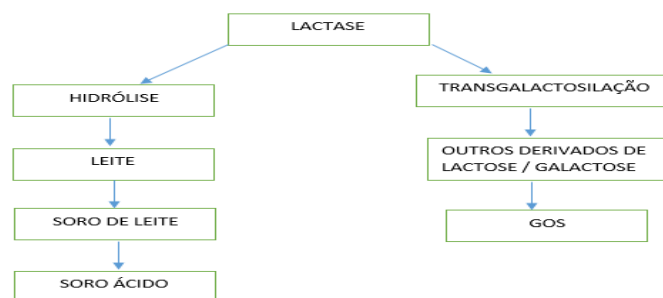
Plantas	Pêssego, algumas espécies de rosas e amêndoas
Bactérias	Streptococcus lactis, Bacillus sp, Lactobacillus bulgaricus e Escherichia coli
Leveduras	Candida pseudotropicalis, k. fragilis e K. lactis
Organismos de animais	Intestino, cérebro e tecidos da pele de mamíferos
Fungos	Aspergillus phoenecis, Aspergillus oryzae, Aspergillus niger e Aspergillus foetidus

Fonte: Adaptado de Shukla, 1975.

A produção enzimática microbiana ao ser comparada com extração de animais e plantas, tem a vantagem de fornecer um resultado mais eficiente e maior rendimento para a indústria. O processo depende do custo de sua recuperação e purificação da enzima. Há um crescente interesse em encontrar microrganismos adequados para uso industrial, com alta capacidade de produção e melhores métodos de purificação. Uma variedade de bactérias, leveduras e fungos tem sido fontes para a produção da enzima lactase (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

A Figura 9 pode-se observar quais são as aplicações da enzima lactase que podem ser a hidrólise (água age como aceptor) e a transgalactosilação (lactose age como aceptor). No processo de hidrólise se obtém como produto o leite, soro de leite e soro de leite ácido, já na transgalactosilação se obtém outros derivados de lactose e galactose e galactooligossacarídeos (GOS).

Figura 9 – Aplicações biotecnológicas da enzima lactase



Fonte: Adaptado de Oliveira et al., 2011.

3.4 Produção industrial de enzimas

A descoberta de novas enzimas que apresentam maior tolerância aos processos industriais deve ser uma prioridade nos próximos anos. A utilização da engenharia enzimática em conjunto com a tecnologia do DNA é essencial no desenvolvimento de novos produtos industriais produzidos através de enzimas. Na tecnologia enzimática uma área importante se refere ao controle ambiental. A preocupação do mundo em diminuir a poluição acarretará na substituição gradual dos processos químicos por processos enzimáticos, conhecida como tecnologia branca (MONTEIRO, SILVA, 2009).

Uma das principais fontes produtoras de enzimas são os microrganismos. Eles são considerados fontes atrativas e com baixo custo na produção de metabólitos, podem ser cultivados em larga escala e em tempo relativamente curto. Outra vantagem está associada a produção não estar condicionada às questões sazonais e geográficas (ZIMMER et al., 2009).

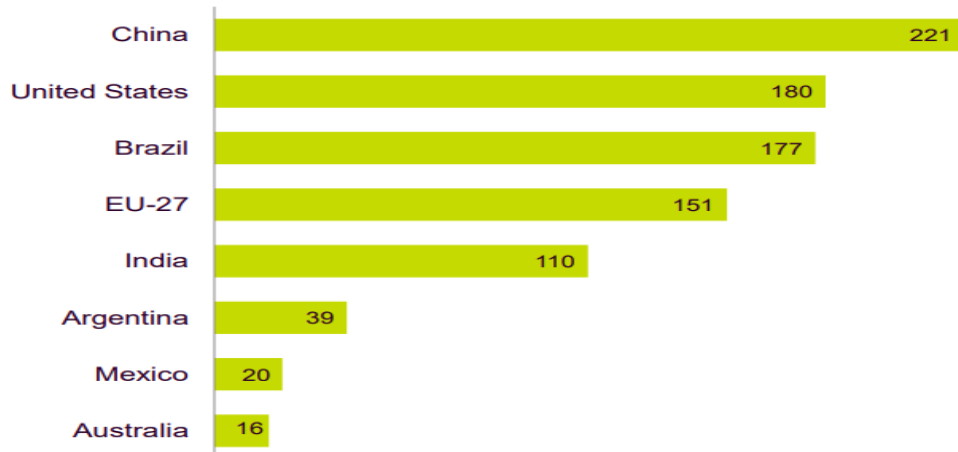
Para se obter enzimas existem diversas fontes, como as células vegetais, células animais e algas. As de origem microbiana oferecem algumas vantagens sobre as demais fontes, pois apresentam alta especificidade e facilidade de purificação (extracelular), produção concomitante, independência da sazonalidade (WANDERLEY; NEVES; ANDRADE, 2011).

Existem ações que auxiliam para o desenvolvimento do mercado de produção de enzimas, como o aprimoramento do Marco Regulatório de Acessos a Recursos Genéticos e Repartição de Benefícios, por meio de alterações na MP 2.186-16/01; aperfeiçoamento da Lei de Biossegurança (Lei nº 11.105/2005); revisão das resoluções normativas 2, de 2006 e 5, de 2008, da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança – CNTBI; atualização da Lei de Propriedade Industrial (Lei nº 9.279/1996) e revisão da Lei de Inovação (Lei nº 10.973/2004) (FERNANDES, 2015).

A Figura 10 mostra o potencial estimado para o ano de 2030 da produção de enzimas mundialmente de acordo com a disponibilidade de biomassa (FERNANDES, 2015).

Figura 10 – Disponibilidade mundial de biomassa estimada em 2030

Resíduos agrícolas estimados disponíveis para biorrefinarias em 2030, milhões de toneladas secas



Fonte: Fernandes, 2015.

As enzimas microbianas podem ser produzidas por cultivo superficial em substratos sólidos que é conhecida por fermentação semissólida (FSS), sólida (FS) ou em estado sólido (FES) que utiliza diversos substratos como o farelo de trigo, milho, cascas de frutas, preparados de soja, farinha de trigo, cacau em pó, grãos de cereais, legumes, madeira e palha, ou são geradas por meio da fermentação submersa (FS), na qual o meio de cultura possui grande quantidade de água. As diferenças entre a FSS e FS é que na primeira a fermentação ocorre com uma quantidade de água mínima para o crescimento microbiano e fungos filamentosos são os microrganismos utilizados, e na FS os nutrientes são dissolvidos em água e são utilizados principalmente leveduras, bactérias e algas (FERNANDES, 2010).

O processo produtivo de enzimas em escala industrial ocorre na sua maioria das vezes, por fermentação submersa, no entanto, nos países orientais utilizam a fermentação semissólida. Na fermentação submersa o microrganismo produtor se desenvolve no interior do meio de fermentação que geralmente está em agitação. Nas fermentações aeróbias o oxigênio necessário à população em desenvolvimento é suprido por meio de um compressor (PEREIRA, 2010).

O processo de fermentação submersa (FS) ocorre com a introdução do microrganismo em meio líquido na forma de um inóculo. Nesse tipo de fermentação o meio fica contido em fermentadores providos e controlados de

agitação e aeração, medidores de pH, temperatura e concentração de oxigênio dissolvido, entre outros. Os nutrientes encontram-se dissolvidos no meio líquido, que favorece a utilização desses nutrientes pelos microrganismos (ROVEDA, 2007).

Ao comparar os processos em superfície com os processos submersos pode-se observar que os submersos oferecem vantagens como a facilidade na manipulação, maiores volumes de meio, a massa de microrganismo fica totalmente submersa no meio de maneira uniforme, absorção de nutrientes e excreção de metabólitos são executados com mais eficiência, e isso gera um menor tempo de fermentação e aumento da produtividade (BON, 1999).

É necessária a escolha do microrganismo e este é cultivado em fermentadores para a produção de quantidades industriais do biocatalisador. É muito importante a otimização do meio de cultivo. Os fatores que devem ser otimizados são: pH e temperatura, condições de aeração e agitação adequada (MONTEIRO, SILVA, 2009).

O preparo do inóculo e a escolha da linhagem são parâmetros importantes para os processos de fermentação. A elaboração de inóculo de maneira adequada irá representar uma igualdade metabólica entre as células e também proporciona controle dos números de células adicionados em um volume de meio de cultura. A determinação da linhagem implicará em produção de compostos específicos. Ademais, a presença de compostos específicos no meio de cultura influencia nos rendimentos da enzima-alvo (BAUMER, DIEGO, 2008).

Depois desse período o biorreator passa por um processo de resfriamento próximo a 5 °C, pois isso garante uma estabilidade do produto e retarda o desenvolvimento microbiano. Logo depois, o pH é ajustado para o valor desejado da enzima-alvo e o meio de cultura segue para o primeiro processo de purificação (*downstream*), a clarificação que pode ser feita por filtração ou centrifugação. O sobrenadante segue para a etapa seguinte de purificação, na qual a enzima é concentrada. Esse processo é realizado por meio da ultrafiltração ou evaporação a vácuo. O produto remanescente passa pelo processo de estabilização com aditivos. A secagem por meio da liofilização, ou *spray-dry* é uma alternativa considerada viável, em casos que não ocorrem a desnaturação enzimática (BAUMER, DIEGO, 2008).

O processo de fermentação industrial apresenta várias etapas que são divididas em: operações de *upstream* (que é responsável pelo pré-tratamento

da matéria-prima), que são as etapas pré fermentação, ou seja, as que antecedem a operação do reator e que tem a função de colocar o sistema nas condições previamente escolhidas, para que as transformações, no reator ocorram em condições ótimas; e operações de *downstream* (responsável pela obtenção do produto), que são as fases que acontecem após a fermentação e que incluem a separação e purificação dos produtos e subprodutos obtidos, e também o tratamento dos possíveis resíduos formados durante o processo (AQUARONE, 2001).

A etapa de recuperação do produto (*downstream processing*) compreende na separação e purificação do produto e deve-se dar a devida atenção para os aspectos citológicos e fisiológicos do microrganismo, onde a fisiologia microbiana indica tanto a geração como a localização do produto. No caso de o produto ser excretado, as fases de recuperação são diferentes daquela em que o produto não é excretado, ou seja, intracelular. Para o produto que não é excretado precisa-se romper a estrutura celular e é importante a escolha da técnica mais adequada para a liberação do produto (BON, 1999).

Para se obter enzimas com alto grau de pureza submete-se esse processo produtivo a uma série de técnicas de fracionamento e purificação (LIMA, et al., 2001).

A eletroforese é uma técnica que mede o teor de pureza de enzimas, a qual é embasada na separação de moléculas em função da existência de uma diferença de potencial. O grau de pureza está totalmente vinculado com a aplicação do produto. No caso de enzimas que vão ser utilizadas em indústrias de alimentos o grau de pureza deve ser alto para que não ocorra contaminação ou compostos não desejados no produto final (BAUMER, DIEGO, 2008).

O grau de pureza vai depender da opção do produto que pode ser extrato bruto ou enzima purificada. O produto final pode ser na forma cristalizada, liofilizada ou líquida concentrada. As operações para que a substância seja separada para a obtenção de um produto de alta pureza são quatro fases: remoção do material insolúvel, isolamento primário, purificação e isolamento do produto final. A remoção do material insolúvel se dá por filtração, centrifugação, decantação ou sedimentação. O isolamento primário se dá pela extração por solventes, precipitação e ultracentrifugação (BON, 1999).

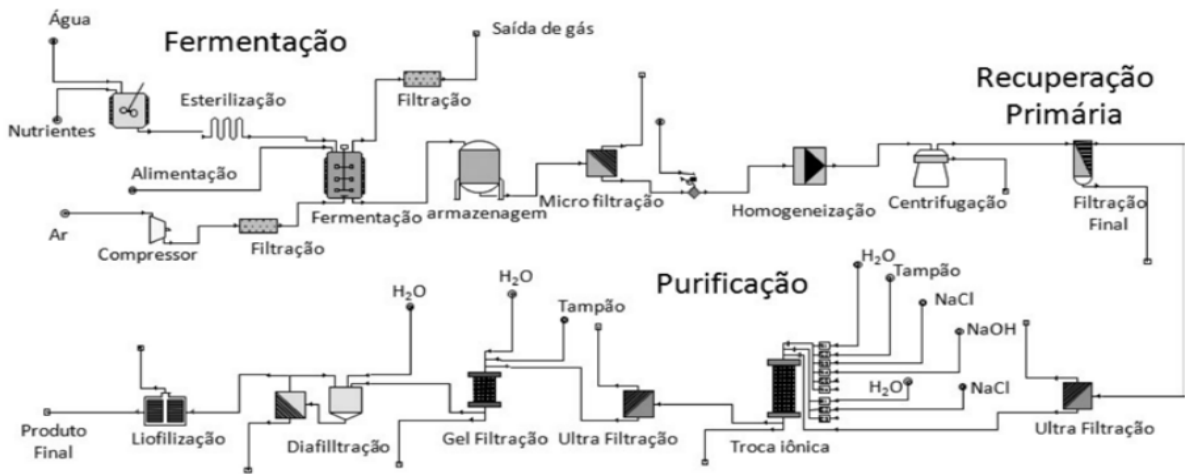
Na Figura 11 pode-se observar as principais etapas do processo

produtivo de enzimas, e também as etapas de purificação do produto final. A fermentação submersa é executada em fermentadores fechados, com agitadores, dispositivos de aeração para introdução de ar estéril e camisas e serpentinas para controle de temperatura ((MONTEIRO, SILVA, 2009).

A recuperação do produto (*downstream processing*) é uma etapa onde ocorre a separação e purificação do produto e deve-se atentar a dois aspectos do microrganismo que são: citológicos e fisiológicos. No processo de purificação ocorre a remoção de impurezas bem como a concentração do produto e também pode-se optar pela cromatografia de adsorção ou precipitação fracionada (MONTEIRO, SILVA, 2009).

A última etapa, isolamento do produto final, na qual ocorre a formulação final que compreende as operações: centrifugação, secagem de um produto cristalizado, liofilizado ou seco por spray drying (MONTEIRO, SILVA, 2009).

Figura 11 – Etapas de produção e purificação de enzimas de fermentação submersa



Fonte: Monteiro e Silva, 2009.

Para a produção em larga escala de enzimas é necessário cultivar os organismos que produzem a enzima desejada. A produção de enzimas pode ser regulada e as condições do processo fermentativo devem ser otimizados para a superprodução da enzima. As proteases são produzidas utilizando cepas superprodutoras de *Bacillus*, *Aspergillus*, *Rhizopus* e *Mucor*; pectinases são produzidas por *Aspergillus niger*; as lactases são produzidas por leveduras e *Aspergillus*; as lipases são produzidas por certas linhagens de leveduras e fungos; A isomerase de glicose é produzida por *Flavobacterium arborescens* ou *Bacillus*

coagulans. Depois da etapa de cultivo as células são separadas dos meios geralmente através da filtração ou centrifugação. A natureza da enzima pode ser intracelular ou extracelular, as células ou o caldo de fermentação são posteriormente processados para separar e purificar a enzima. O processo de recuperação das enzimas intracelulares é mais complexo, pois envolve a ruptura de células e a remoção de detritos celulares e ácidos nucléicos (SHULER, 2017)

Há casos em que a enzima pode ser tanto intracelular quanto extracelular e isso requer processamento de caldo e células. As enzimas intracelulares podem ser separadas ao se aumentar a permeabilidade da membrana celular. Os sais como CaCl_2 , e produtos químicos como dimetilsulfóxido (DMSO), e mudança de pH pode ser usado para extrair a enzima do interior da célula. No processo em que a liberação enzimática não estiver completa, a ruptura celular pode ser essencial (SHULER, 2017).

Dentre os tipos básicos de fermentação utilizados para a produção de enzimas em escala industrial, a mais empregada é a fermentação submersa (FS) (FERNANDES, 2007).

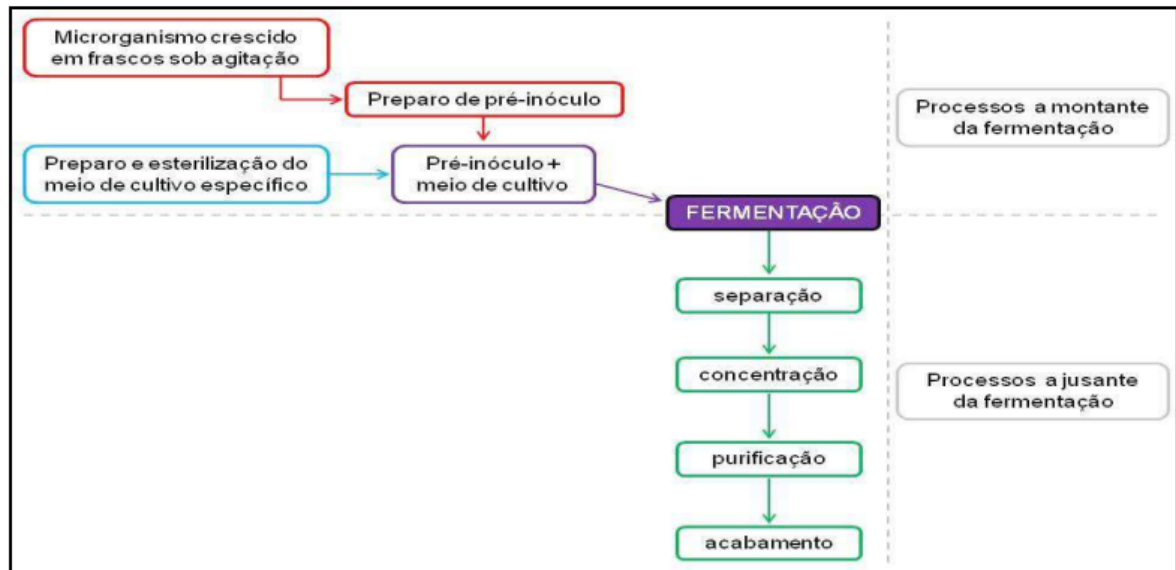
3.4.1 Fermentação submersa (FS)

A fermentação submersa é considerada uma técnica muito utilizada nos países ocidentais com o objetivo de produzir enzimas e tem a facilidade de crescimento dos microrganismos em condições controladas de pH e temperatura, ademais de ser um processo considerado mais fácil para a recuperação das enzimas extracelulares (FEITOSA, 2009).

Esse tipo de processo ocorre em um meio fermentativo líquido, no qual as fontes de nutrientes usadas são solúveis e o desenvolvimento do microrganismo ocorre na presença de água livre. A quantidade de água nesse tipo de fermentação é superior a 95% (RODRIGUES, 2001).

A Figura 12 demonstra um fluxograma da produção em escala industrial de enzimas utilizando uma fermentação submersa.

Figura 12 – Fluxograma da produção de enzimas por meio da fermentação submersa



Fonte: Aquarone et al., 2001.

Esse tipo de fermentação tem seu início com a etapa chamada *upstream* ou a montante da fermentação. A cultura estoque do microrganismo que vai ser utilizada é cultivada em frascos que ficam em agitação até que se inicie a fase de crescimento exponencial média ou tardia. Este cultivo (pré-inóculo) é transferido para fermentadores com 100 a 500 litros de capacidade e os mesmos possuem um meio de cultivo parecido com o utilizado para a produção da enzima (AQUARONE et al., 2001).

Depois de passar o tempo necessário para o crescimento, este pré-inóculo é transferido para o fermentador principal no qual a enzima será produzida, contendo o meio de cultura necessário para esse processo. É necessária a verificação se há durante o processo algum tipo de contaminação, infecção por bacteriófagos e proliferação de microrganismos mutantes de menor eficiência para esse processo (AQUARONE et al., 2001).

3.5 Enzimas na indústria de alimentos

A produção de enzimas industriais para serem utilizadas no processamento de alimentos teve início em 1874 quando Christian Hansen extraiu a

renina de estômagos secos de bezerros para fabricação de queijo. A quimosina é produzida por microrganismos que são modificados pela tecnologia do DNA recombinante na qual o gene proquimosina bovina foi inserido na *Escherichia coli* K-12 e a enzima aprovada para uso em alimentos pelo *Food and Drug Administration*. (OLEMPSKA et al., 2006).

A maioria das enzimas utilizadas em alimentos são derivadas de microrganismos recombinantes como α -amilases e proteases obtidas de microrganismos recombinantes como *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. subtilis* (OLEMPSKA et al., 2006).

As proteases são utilizadas na indústria de laticínios como, por exemplo, a quimosina que auxilia na coagulação do leite (útil no processo de produção de queijos) e a lactase que tem a função de decompor a lactose em açúcares mais simples, impedindo a tendência que a lactose tem para adsorção de odores, além de ser higroscópica, causando o endurecimento de laticínios em pó (WHITAKER, LAW, 2001).

As lipases são utilizadas no processo produtivo de alguns queijos como o roquefort. No processo de amaciamento da carne são utilizadas as proteases como papaína, bromelina e ficina (WHITAKER, LAW, 2001).

No Quadro 2, apresentam as enzimas que podem ser utilizadas nas indústrias de alimentos e suas aplicações (MONTEIRO, SILVA, 2009).

Quadro 2– Principais enzimas utilizadas nos processos de produção de alimentos

Enzimas	Origem	Aplicação
Amilase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>A. oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> ,	Melhorador de massas e produção de xaropes
Celulase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Trichoderma reesei</i>	Preparação de concentrados líquidos de café, clarificação sucos
Glicose oxidase	<i>Aspergillus niger</i>	Eliminação da glicose dos sólidos do ovo
Invertase	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	Mel artificial
Lactase	<i>Sacharomyces fragilis</i>	Hidrólise da lactose
Lipase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> , <i>Mucor spp</i>	Sabor ao queijo
Pectinase	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> , <i>Penicillium</i>	Clarificação de vinho e de sucos de frutas
Protease	<i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i>	Clarificação de cerveja e amaciamento de carne

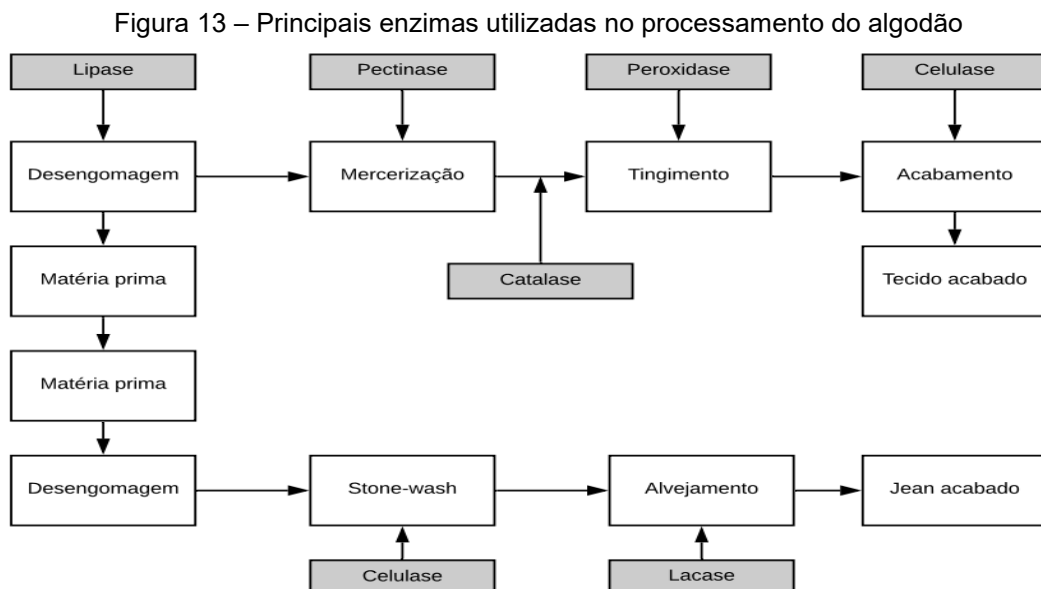
Fonte: Monteiro e Silva, 2009

No Quadro 2 é possível saber para cada enzima qual é a sua origem e aplicação, por exemplo, a lactase tem como origem a levedura *Sacharomyces Fragilis* e é utilizada para a hidrólise da lactose.

3.6 Enzimas na indústria têxtil

A utilização de enzimas no processo têxtil está vinculada à remoção das impurezas não celulósicas conhecida como biopreparação, biopurga, ou purga enzimática. Tem como vantagem contribuir para o melhoramento ecológico do processo, pois não utiliza produtos químicos, reduzindo bastante o impacto ambiental. A primeira utilização de enzimas na indústria têxtil foi em 1857, quando se utilizou o extrato de malte para retirar a goma de amido de um tecido a ser estampado (CUNHA et al., 2007).

A Figura 13 mostra as enzimas utilizadas em cada etapa do processamento de algodão.



Fonte: Monteiro e Silva, 2009.

As enzimas conhecidas como proteases ajudam na resistência ao encolhimento às fibras da lã. Nos processos têxteis as substâncias químicas

sintéticas podem ser substituídas por enzimas, as quais têm ação mais específica e geram grandes benefícios ambientais, porque são biodegradáveis e dependem de menor consumo de energia (MUSSATTO, FERNANDES, MILAGRES, 2007)

3.7 Enzimas na indústria farmacêutica

Há várias aplicações das enzimas na indústria farmacêutica como auxiliar na digestão e cicatrização de feridas. A terapia enzimática apresenta certas limitações que devem ser resolvidas por meio de pesquisas científicas, dentre elas, a baixa potência e seletividade, regulação inadequada da atividade, instabilidade e elevados custos de manufatura quanto a recuperação e purificação final do produto. As formulações que contêm enzimas podem ser administradas por via tópica, oral ou parenteral devem apresentar elevado grau de pureza e isso pode aumentar o custo (MONTEIRO, SILVA, 2009).

No Quadro 3 são apresentadas as principais enzimas terapêuticas, suas fontes, nomes comerciais e seus usos terapêuticos.

Quadro 3 – Enzimas terapêuticas e suas aplicações

Enzima	Número E.C.	Fonte	Nome comercial	Uso terapêutico
Urato oxidase	1.7.3.3	<i>Aspergillus flavus</i>	Uricozyme	Gota
Superóxido dismutase	1.15.1.1	Fígado bovino e eritrócitos	Peroxinorm Oxinorm	Inflamação
Lipase	3.1.1.3	<i>Rhizopus arrhizus</i>		Auxiliar digestivo
Desoxirribonuclease	3.1.21.1	Células CHO recombinante	Pulmozyme	Fibrose cística
Desoxirribonuclease (streptodornase)	3.1.21.1	<i>Streptococcus haemolyticus</i>	Varidase	Úlceras gástricas
Ribonuclease	3.1.26.4	<i>Rana pipiens</i>	Onconase	Antiviral e alguns cânceres
B-amilase	3.2.1.1	<i>Aspergillus oryzae</i>		Auxiliar digestivo
Celulase	3.2.1.4	<i>Trichoderma viride</i>		Auxiliar digestivo
Lisozima	3.2.1.17	Clara de ovos	Murazyme Colpistar	Antibiótico
Galactosidade	3.2.1.22	Células humanas ou CHO recombinantes	Fabrazyme Replagal	Doença de Fabry
Lactase	3.2.1.23	<i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. niger</i>	Surelac Lactaid	Intolerância a lactose
Glicocerebrosidase	3.2.1.45	Células CHO recombinantes	Cerezyme	Doença de Gaucher
Estreptoquinase	3.4.21.73	<i>Streptococcus</i> β hemolítico	Streptase Kabikinase	Coágulo sanguíneo
Esféricase	3.4.21	<i>Bacillus sphaericus</i>		Bronquite crônica Pneumonia aguda
Papaína	3.4.22.2	<i>Carica papaya</i>	Panafil	Digestão Verminose
Colagenase	3.4.24.3	<i>Clostridium histolyticum</i>	Santyl Kollagenase	Úlceras de pele
Serrapeptase	3.4.24.40	<i>Serratia</i> E15	Danzen	Inflamação
L-asparaginase	3.5.1.1	<i>Escherichia coli</i> , <i>Erwinia carotovora</i>	Elspar Erwinase	Leucemia linfocítica aguda

Fonte: Aehle, 2007.

A enzima lactase conforme o Quadro acima tem como fonte a *Kluyveromyces fragilis*, *Aspergillus oryzae* e *A. Niger*, nome comercial *Surelac Lactaid* e seu uso terapêutico é a intolerância a lactose.

3.8 Biorreatores

Em relação a capacidade dos biorreatores pode-se citar três grandes grupos para a produção em escala industrial. Processo de capacidade entre 1 a 2 m³ são utilizados para o cultivo de microrganismos patogênicos ou para crescimento de células animais ou vegetais, ou seja, são direcionados para a área da saúde. Em escala intermediária (operação entre 100 a 200 m³) é utilizado para a produção de enzimas, vitaminas e antibióticos. Para processos que não necessitam de cuidados com assepsia como por exemplo fermentação alcoólica a capacidade pode ser de milhares de metros cúbicos (AQUARONE et al., 2001).

O material que vai ser utilizado na construção de reatores tem que possuir uma resistência mecânica, resistência à corrosão, tanto ácida quanto oxidante, e durabilidade. A vida útil desse equipamento depende principalmente dos materiais empregados e dos processos de fabricação utilizados. Isso torna a pesquisa um fator importante para a busca pelo material ideal a ser empregado, pois que é bastante difícil a substituição de um biorreator em uma planta de operação (SOUZA, 2010).

Os biorreatores podem ser classificados quanto ao tipo de biocatalisador (enzimas ou células), quanto a configuração do biocatalisador (enzimas livres ou imobilizadas / células) e quanto à forma agitação do líquido (AQUARONE et al., 2001). Nas Tabelas 2 e 3 pode-se observar as classificações dos biorreatores ao tipo de fermentação

Tabela 2 – Classificação geral dos biorreatores de fermentação submersa

Reatores de fermentação submersa		
Célula / enzimas livres	Células / enzimas imobilizadas em suporte	Células / enzimas confinadas entre membranas
Agitados mecanicamente	Leito fixo	Membranas planas
Agitados pneumaticamente (coluna de bolhas e <i>air lift</i>)	Leito fluidizado	Fibra oca (<i>hollow-fiber</i>)
Fluxo pistonado (<i>plug-flow</i>)	Outras concepções	

Fonte: Adaptado de Aquarone et al., 2001.

Tabela 3 – Classificação geral dos biorreatores para a fermentação semissólida

Reatores de fermentação semissólida

Estáticos (com bandejas)

Agitação (tambor rotativo)

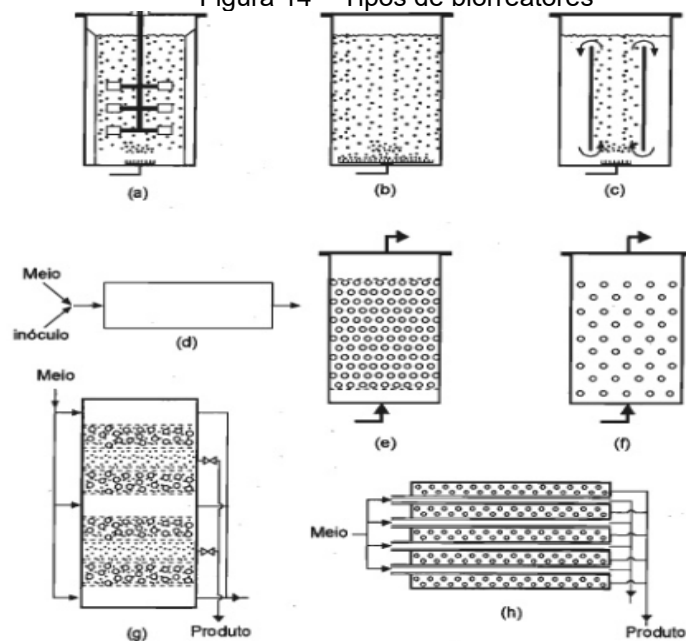
Leito fixo

Leito fluidizado gás – sólido

Fonte: Adaptado de Aquarone et al., 2001.

Na Figura 14 são mostrados os diferentes tipos de biorreatores: sendo (a) STR; (b) coluna de bolhas; (c) *air lift*; (d) *plug flow*; (e) com células imobilizadas (leito fixo); (f) com células imobilizadas (leito fluidizado); (g) reator com membranas planas e (h) *hollow fiber*.

Figura 14 – Tipos de biorreatores



Fonte: Aquarone et al., 2001.

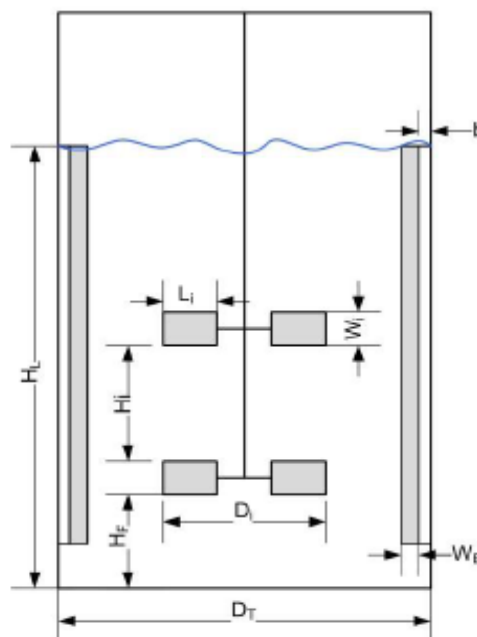
Grande parte dos biorreatores são construídos em aço devido a durabilidade desse tipo de material. Os principais tipos destes materiais ferrosos que podem ser divididos em relação a sua microestrutura em cinco grupos: aços inoxidáveis ferríticos, austeníticos, martensíticos, duplex e endurecíveis por precipitação (SOUZA, 2015).

As produções industriais de enzimas geralmente acontecem em biorreatores operados em modo descontínuo (batelada) e as fermentações em batelada para a produção de enzimas ocorrem de 30 a 150 horas de processo. É necessário que o mesmo tenha um sistema de medidas dos parâmetros que afetam o processo e também munidos de serpentinas internas para as necessidades de aquecimento ou resfriamento (AQUARONE et al., 2001).

3.8.1 Modelo de biorreator para produção de enzimas - fermentação submersa

As dimensões para um biorreator de fermentação submersa para produção de enzimas (capacidade 100 L) podem ser observadas na Figura 15.

Figura 15 - Desenho esquemático das simbologias das medidas do biorreator



Fonte: Kolling, 2017.

A Tabela 4 apresenta as dimensões que foram obtidas para esse biorreator de 100 L.

Tabela 4 – Medidas do biorreator de 100 L

Descrição	Parâmetro	Medida
Volume de reação	V, L	100
Diâmetro do impelidor	Di, cm	16,50
Diâmetro do biorreator	DT, cm	38
Diâmetro do impelidor / Diâmetro do biorreator	Di / DT	0,43
Altura do líquido do biorreator	HL, cm	88
Altura do líquido do biorreator / Diâmetro do biorreator	HL / DT	2,32
Altura entre o impelidor inferior e o fundo do biorreator	HF, cm	17
Altura entre dois impelidores	Hi, cm	23
Altura entre dois impelidores / Diâmetro do impelidor	Hi / Di	1,39
Espessura do impelidor	Wi, cm	2,80
Largura da pá do impelidor	Li, cm	4
Espessura da chicana	WB, cm	3
Distância entre a chicana e a parede do biorreator	b, cm	1,2
-	Nº de impelidores	3

Fonte: Adaptado de Koling, 2017.

Condições operacionais do biorreator de 100 L são: pás retas do tipo Rushton para o tipo de impelidor que impõe um movimento giratório ao líquido; velocidade de agitação de 63 a 158 rpm; aeração de 0,20 a 0,60 vvm (Volume de ar por volume de líquido por minuto); k_{LA} mínimo (agitação de 63 rpm e aeração de 0,20 vvm): $8,5 \text{ h}^{-1}$; k_{LA} máximo (agitação de 158 rpm e aeração de 0,60 vvm): 84 h^{-1} e oxigênio dissolvido fixado em 25% da saturação de ar, mantido por controle em cascata de agitação e aeração e pressão da dorna (KOLING, 2017).

Quanto aos parâmetros cinéticos para a produção de lactase os mesmos podem ser observados na Tabela 5. Foi utilizado um meio LB (Luria Bertani), que é um meio desidratado utilizado para a manutenção e cultivo de cepas recombinantes de *E. Coli*.

Esse cultivo LB é formado por 10 g/L cloreto de sódio, 10 g/L de triptona, 5 g/L extrato de levedura e 16 g/L de ágar. A cepa de *E. Coli* recombinante transformada com o gene de *Kluyveromyces sp* foi utilizada para a determinação da atividade específica máxima, produtividade enzimática, rendimento celular e rendimento enzimático (OKANO et al., 2001).

Tabela 5 – Atividades específicas máximas de Lactase e parâmetros cinéticos de cultivo em diferentes condições testadas

Condição estudada	Atividade específica máx. (U/mg _{proteína})	P _x (g/L.H)	P _p (U/L.H)	Y _{x/s}	Y _{p/s}
Descontínua alimentada em DO-stat com 12 h de indução	39,42	0,510	1359,4	0,68	1036,6
Descontínua alimentada em DO-stat com 18 h de indução	13,04	0,712	351,5	0,63	193,0
Descontínua alimentada em DO-stat com 24 h de indução	11,11	0,545	491,8	0,68	355,4
Descontínua alimentada linear ascendente com 12 h de indução	10,47	0,653	480,5	0,76	312,8
Descontínua alimentada linear ascendente com 18 h de indução	19,80	0,562	507,0	0,64	238,6
Descontínua alimentada linear ascendente com 24 h de indução	3,70	0,735	89,9	0,91	27,1

P_x= produtividade de células; P_p = produtividade enzimática; Y_{x/s} = rendimento celular (conversão de substrato em células); Y_{p/s}= rendimento enzimático (conversão de substrato em enzima).

Fonte: Adaptado de Okano et al., 2016.

Na alimentação DO-Stat o oxigênio dissolvido no meio aumenta rapidamente com a escassez do substrato. O objetivo do estudo da tabela acima foi analisar a superexpressão da lactase recombinante em biorreatores, por meios de cultivos em batelada alimentada com controle DO-stat e linear. É possível observar entre as diferentes condições estudadas quais delas obteve-se a maior atividade enzimática e maior produtividade enzimática.

3.9 Soro de leite

Oriundo das indústrias de laticínios o soro de leite é obtido na fabricação do queijo após a precipitação da proteína do leite pela caseína com consequente separação da gordura. O soro constitui-se de um líquido opaco amarelo-esverdeado, rico em aminoácidos essenciais e vitaminas, como tiamina, riboflavina, vitaminas B6 e B12 e ácido pantotênico (TEIXEIRA, 2002; BALDASSO et al., 2011; ALVES, 2018).

Conhecido como um subproduto da indústria de laticínio o soro do

leite é composto de 86% de água, 5% de lactose, 3,5% de proteínas, 0,7% de sais, 0,1% de cálcio, 0,03% de fosfolípidios e 4% de gordura, com pH em torno de 5,5 a 6. Quando obtido o extrato seco, o soro apresenta cerca de 70 a 80% de lactose (BOBBIO; ORSATTI, 1992).

A produção do soro de leite, em nível mundial, é de 2,6 milhões de toneladas por ano, com um aumento estimado de 3% ao ano (FAOSTAT, 2017).

Na região oeste do Paraná são produzidos por dia cerca de 1 milhão de litros de soro, cerca de 10% são destinados à alimentação animal e 90% vendidos às empresas, para serem incorporados em alimentos (ALBIERO, 2013).

Considerado um agente poluidor dos laticínios o soro de leite representa 90% do volume do leite, porque para produzir 1 kg de queijo são necessários 10 litros de leite e isso gera cerca de 9 litros de soro (LEITE; BARROZO; RIBEIRO, 2012).

Com uma considerável carga poluidora o soro de leite tem uma alta demanda química (DQO) e bioquímica (DBO) de oxigênio, de respectivamente 50.000 a 102.000 mg/L e 30.000 a 50.000 mg/L, sendo esta DBO dez vezes maior que a do esgoto doméstico (ANDRADE et al., 2015).

O soro pode ser reutilizado pela indústria para diminuir os gastos com tratamentos de efluentes e também para evitar possíveis contaminações ambientais. O papel da engenharia e biotecnologia é auxiliar nesse processo com a ajuda de ferramentas para agregar valor aos resíduos. Um exemplo são os processos fermentativos nos quais um microrganismo consome o substrato gerando produtos de valor agregado (ANDRADE et al., 2015).

O soro que não é utilizado se torna um resíduo que precisa de tratamento para ser liberado ao meio ambiente. Esse processo necessita de altos investimentos em equipamentos, mão-de-obra qualificada e também espaço físico, o que torna esse processo bem caro (BURLANI, 2014).

Tabela 6- Valores estimados para a instalação de sistemas de tratamento de efluentes de 80.000 e 120.000 litros/dia em laticínios

Tipos de tratamentos	Valores
Filtro Anaeróbico com filtro biológico e percolador	R\$ 1.494.798,90
Filtro Anaeróbico com biofiltro aeróbico Submerso	R\$ 957.623,52
Filtro Anaeróbico com disposição final dos resíduos do solo	R\$ 861.959,90
Lodo ativado	R\$ 830.495,95

*Valores atualizados conforme inflação INCC (Índice Nacional de Custo de Construção) acumulado de 12 meses mês de referência setembro/2020 de 4,88%
Fonte: Adaptado de Burlani, 2014.

A utilização de resíduos da agroindústria colabora para a preservação do meio ambiente e reduz os custos dos processos ao se buscar a sustentabilidade (BORTOLETO, 1997).

O soro de leite pode ser utilizado para a alimentação de animais e pode passar pelo processo de secagem para uma utilização posterior. Essas são algumas das propostas de utilização desse resíduo como uma forma de reduzir o impacto ambiental do seu descarte direto no meio ambiente (DINIZ, 2009).

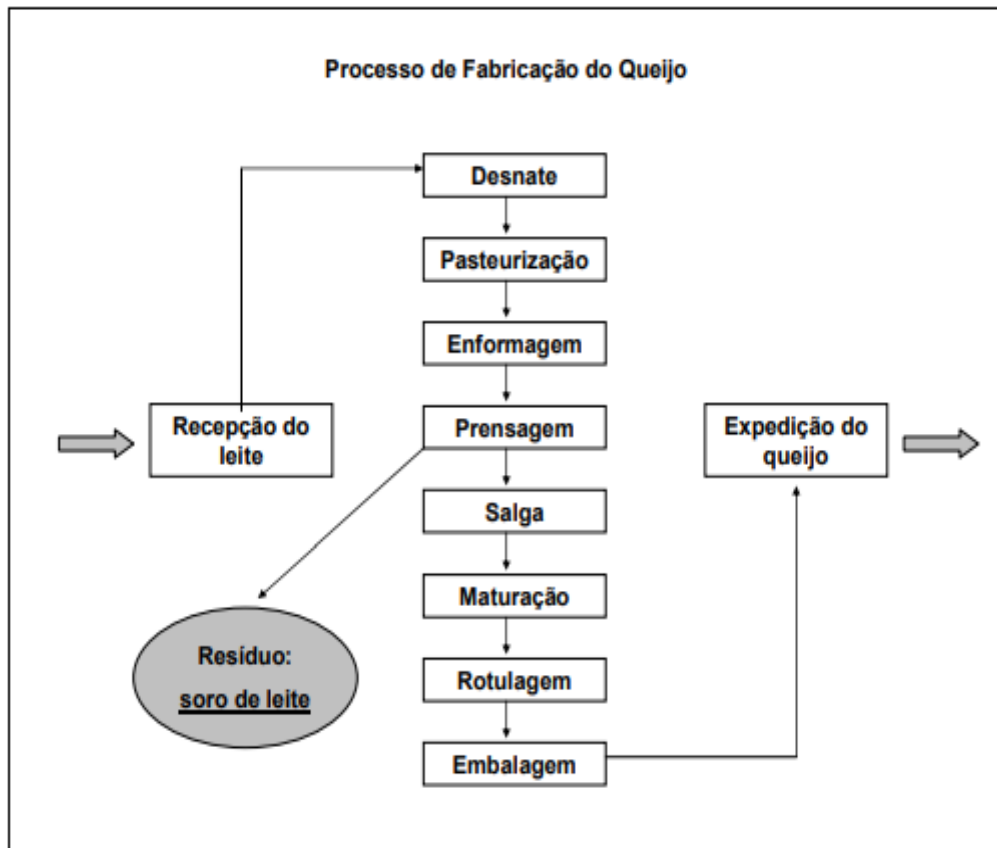
No setor lácteo o Brasil importa em torno de 50% do soro que consome. As transformações em pó são insuficientes para atender a demanda interna, pois a maior parte das queijarias atua apenas com serviço de inspeção estadual, o que impossibilita dessa forma as indústrias de comprarem os soros. A importação do soro de leite em pó tem aumentando também nos países como Argentina e Uruguai (APIL, 2017).

A quantidade de soro gerado durante a produção de queijo depende diretamente do tipo do laticínio. Pode-se considerar que em média, cada quilo de queijo gera 8 litros de soro, o que significa uma produção anual de mais de 4 bilhões de litros deste subproduto no Brasil. É estimado que cerca de metade desse total é descartado no meio ambiente, o que representa mais de 2 bilhões de litros. Isso é preocupante, pois não só pelas perdas comerciais e de renda ao setor produtivo, mas pela forma que é realizado o descarte desse efluente não tratado, gerando assim uma alta taxa de contaminação orgânica na água e resultando em um problema ambiental (EMBRAPA, 2015).

Após a captação da matéria prima o destino do leite “in natura” é a agroindústria, ou seja, unidades de beneficiamento, processamento ou produção de produtos oriundos do elo produtivo. Nas indústrias de lácteos existe a produção dos derivados do leite, obtendo-se produtos diversos a partir dessa matéria-prima, como o leite UHT (*ultra high temperature*), leite em pó, leite pasteurizado, queijos finos e tradicionais, requeijão, manteiga, iogurte, creme de leite, doce de leite e bebida láctea (BIEGER, RINALDI, 2009).

O processo de fabricação do queijo e as atividades envolvidas nesse processo, desde o recebimento da matéria-prima até a venda do produto acabado pode ser observado na Figura 16.

Figura 16- Fluxograma do processo de fabricação do queijo



Fonte: Bieger e Rinaldi, 2009.

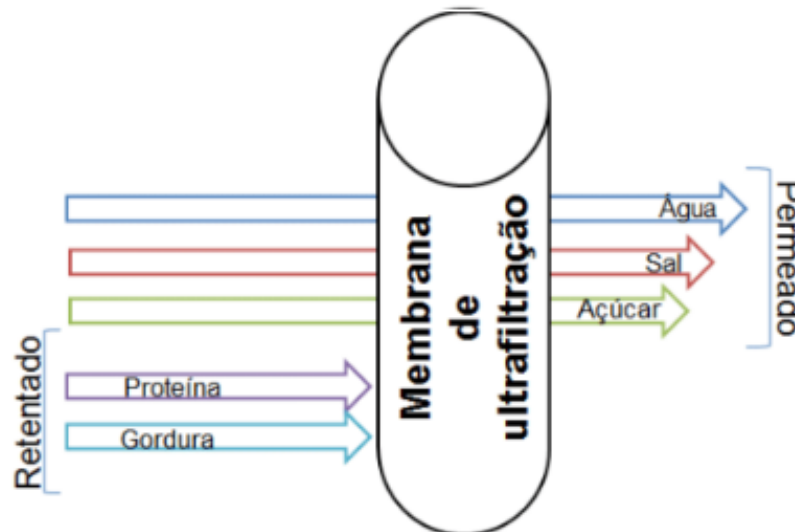
3.10 Permeado de soro de leite

Toda a lactose oriunda do soro de leite está no permeado de soro de

leite e a fermentação da lactose é considerada uma alternativa para reaproveitar e minimizar o impacto ambiental que esse subproduto poderia causar no meio ambiente se descartado de maneira imprópria (BARBOSA et al.; 2010).

O retentado é composto por produtos de interesse alimentar (proteínas e gordura) e ficam retidos pela membrana de ultrafiltração. O permeado é obtido por esse processo de ultrafiltração no qual as partículas de diâmetro menor que 0,1 μm passam pela membrana gerando esse subproduto que é composto por água, sais e açúcar (FELLOWS, 2006). Conforme é demonstrado na Figura 17.

Figura 17 – Fluxograma do processo de ultrafiltração do soro de queijo



Fonte: Burlani, 2014.

O permeado tem na sua composição aproximadamente 5% de lactose, 93% de água, 0,53% de minerais, 0,36% de gordura e 0,85% de proteínas. Na forma seca, essas concentrações são de 65 a 85% de lactose, 8 a 20% de sais minerais, 1,5% de gordura e 3 a 8% e proteína (BEUCLER, DRAKE, FOEGEDIND, 2005).

Na etapa de ultrafiltração são recuperadas as proteínas com valor nutricional, por isso é uma etapa considerada importante. No entanto, essa etapa não reduz a DBO e DQO do efluente, que fica em torno de 80.000 mg/L a 60.000 mg/L, respectivamente. Os subprodutos para serem lançados nos corpos hídricos precisam passar por tratamentos específicos que acarretam em custos adicionais para as indústrias (ANDRADE, MARTINS, 2002).

A partir de resíduos a base de lactose a produção de β -galactosidase

pode ser feita pela levedura *K. marxianus* que é capaz de metabolizar diversos tipos de açúcares como D-xilose, rafinose, celobiose, L-arabinose, sacarose e a lactose (KREGGER- VAN RIJ, 1984; MARTINS, 2005).

O permeado não apresenta todos os nutrientes necessários para o desenvolvimento da levedura *K. marxianus*. Na sua maioria as leveduras sintetizam as bases nitrogenadas necessárias ao seu crescimento através do íon amônio de maneira que o meio deve ser suplementado com este nutriente (HEIN, 2015).

A lactose é considerada responsável pela alta demanda biológica de oxigênio do soro. Vários processos fermentativos têm sido desenvolvidos para tentar reduzir o problema de desperdício e disposição do soro lácteo. O soro e o permeado de soro (produto resultante da produção de proteínas do soro) ou a lactose podem ser utilizados como substrato para o crescimento microbiano com o objetivo de obter produtos de alto valor agregado como proteínas unicelulares, álcoois (etanol, butanol), ácidos orgânicos (lático, acético, propiônico e cítrico), vitaminas e biopolímeros (goma xantana) (YANG & SILVA, 1995).

3.11 Lactose

A lactose na indústria alimentícia é responsável pela solubilidade e cristalização da lactose em sorvetes e leite condensado. Além disso, os resíduos a base desse dissacarídeo apresentam alta demanda química e bioquímica de oxigênio (AL-JAZAIRI et al., 2015).

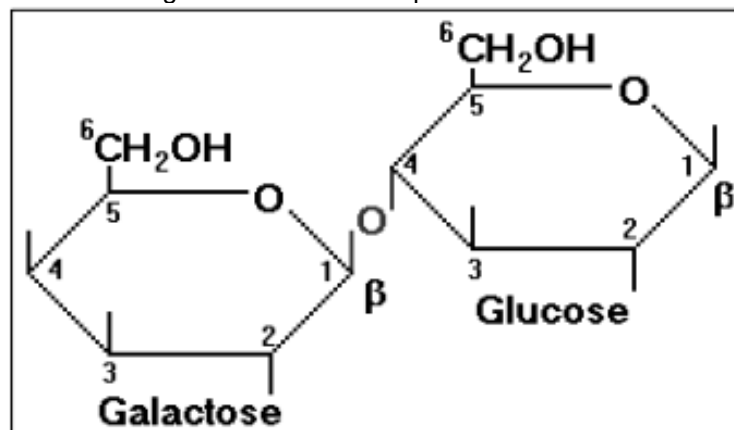
A lactose pode ser encontrada no leite dos mamíferos em diferentes teores. Outras fontes de origem são raras e ela é uma substância energética e seus monossacarídeos fazem parte da construção de cerebrosídeos que são encontrados na massa cerebral e mielina nervosa. A lactose é responsável no organismo na absorção e retenção de cálcio no intestino e absorção de magnésio e também manganês (BACH, 2011).

A β -galactosidase pode ser obtida em processos fermentativos utilizando microrganismos como *Neurospora crassa*, *Sclerotinia sclerotium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Thermus aquaticus* que vem sendo estudados quanto ao potencial industrial (GEKA, LOPEZ-LEIVA, 1985; SHAIKH, KHINE, KHAN, 1997).

A sacarose tem o peso molecular igual ao da lactose. Porém, no requisito da configuração molecular, no poder edulcorante, na solubilidade e no poder redutor são bem distintas. Pode-se dizer que a lactose é cerca de dez vezes menos solúvel que a sacarose (VALSECHI, 2001).

A lactose tem uma capacidade de adoçar menor do que a sacarose. Além disso, a lactose pode ser usada na formulação de alimentos sem interferir no sabor natural dos componentes. Para a utilização em produtos assados, a lactose gera a reação de *Maillard*, na qual ajuda na coloração da crosta. A lactose submetida a altas temperaturas contribui para a caramelização, sabor e cor. Ademais, pode-se dizer que a lactose auxiliar na absorção do cálcio e fósforo e isso é muito útil para as formulações infantis (KIRKPATRICK, FENWICK, 1987). A fórmula da lactose pode ser observada na Figura 18.

Figura 18 – A fórmula química da lactose



Fonte: Macedo, 2003.

As moléculas de lactose possuem um número de sítios ativos que são as ligações glicosídicas, grupo hidroxila livre, grupo redutores e ligações carbono – carbono. Isso faz com que a lactose seja estudada para ser utilizada em indústrias de alimento (CARMINATI, 2001).

3.12 Microrganismos empregados na produção da lactase

As leveduras podem reproduzir-se de duas maneiras, que é

assexuada ou sexuadamente. Na assexuada a célula-mãe forma um broto que se separa e dá origem a célula filha (separação formando pseudo-hifas), processo chamado de brotamento ou a levedura se divide e dá origem a duas novas células iguais, pela fissão (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Pode-se dizer que as leveduras são consideradas importantes, pois utilizam oxigênio ou algum composto orgânico como acceptor final de elétrons, de forma que se houver oxigênio no meio em que elas respiram aerobicamente e metabolizam açúcares formando dióxido de carbono e água, e na ausência de oxigênio elas fermentam os açúcares produzindo etanol e dióxido de carbono (TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

Para a produção da β -galactosidase pode-se empregar bactérias como (*Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Xanthomonas*), leveduras (*Bullera*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*) e fungos filamentosos (*Aspergillus*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizobium*, *Streptomyces*) (GODOY, 2016).

Na Tabela 7 é demonstrado que, dependendo do microrganismo e utilizando principalmente a lactose presente no soro de leite como fonte básica de carbono e energia, podem-se ter diferentes produções máximas de lactase.

Tabela 7 – Produção máxima de lactase por diferentes microrganismos

Microrganismo	Produto	Produção máxima	Referências
<i>Aspergillus niger</i>	β -galactosidase	0,95 U.mL ⁻¹	Barros (2011)
<i>Aspergillus niger</i>	β -galactosidase	2,5 U.mL ⁻¹	Silva <i>et al.</i> (2009)
<i>Aspergillus niger</i>	β -galactosidase	16,02 UGI.mL ⁻¹	Barbosa e Araújo (2007)
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	β -galactosidase	28,0 UGI.mL ⁻¹	Santiago <i>et al.</i> (2004)

Fonte: Adaptado de Chaves, 2015.

As *Kluyveromyces sp.* produzem lactase que é considerada ideal para aplicações no tratamento de leite. As enzimas produzidas estão adaptadas a uma faixa de pH próximo ao neutro, ideal para hidrólise da lactose, além de atuarem em ampla faixa de temperaturas, entre 40 a 52 °C (MANERA *et al.*, 2008; AL-JAZAIRI *et al.*, 2015; DINIZ *et al.*, 2014).

As leveduras do gênero *Kluyveromyces* são do tipo homotáticas, diploides, com alto polimorfismo intraespecífico e com número de cromossomos

variando de 6 a 12. As mesmas podem ser encontradas em habitats como: grãos de Kefir, leite cru, queijos, néctar, insetos e solo (BELLOCH, et al., 1998).

Nos processos industriais a levedura *K. marxianus* possui características de grande valor, pois o seu crescimento ocorre em elevadas temperaturas (40 °C) o que diminui os gastos com resfriamento e riscos de contaminações, além disso possui altas velocidades de crescimento ($\mu_{\text{máx}} = 0,89 \text{ h}^{-1}$). Esse tipo de levedura é considerado como microrganismos GRAS (*generally recognized as safe*) pelo FDA (food and drug administration) dos Estados Unidos (FURLAN et al., 1995).

Com a necessidade de remediar a carga de poluentes presentes no soro de leite a espécie do gênero *Kluyveromyces* tem se destacado nos estudos, pois apresenta grande potencial de uso na produção de produtos de interesse econômico e também na produção de etanol (LATANZE, SANTOS, 2015).

A legislação brasileira especifica pela Resolução RDC nº 205/2006 que a β -galactosidase, ou lactase deve ter como origem os seguintes microrganismos, aprovados pelo FDA (*Food and Drugs Administration*), consideradas como seguros para aplicação em alimentos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pseudotropicalis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Kluyveromyces fragilis* e *Saccharomyces sp* (BRASIL, 2006).

3.12.1 Levedura *k. Marxianus*

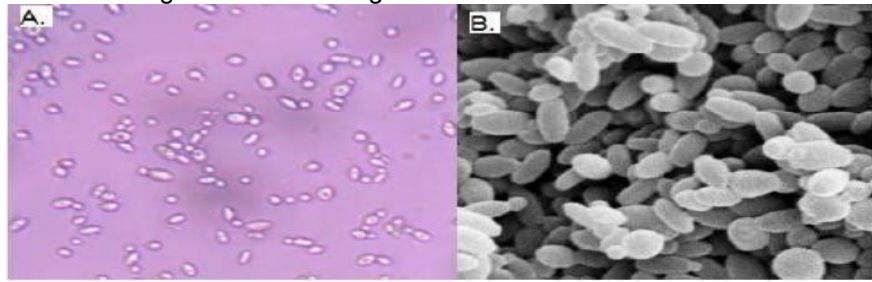
Por causa de sua capacidade de assimilar a lactose, as leveduras *Kluyveromyces* há muito são utilizadas em processos industriais envolvidos na eliminação desse açúcar, portanto utilizam a lactase como fonte de carbono (TEIXEIRA, 2005).

A *K. marxianus* é um fungo unicelular que pertence ao filo Ascomycota, à ordem Saccharomycetales e à família Saccharomycetaceae, e também é conhecida como *Candida kefir*. Apresenta reprodução assexuada por brotamento multilateral e que produz ascóporos que se originam de um zigoto ou partenogenicamente (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Na Figura 19 é possível observar a morfologia da levedura *K.*

Marxianus.

Figura 19 – Morfologia da levedura *K. marxianus* ATCC 36907



Fonte: Tavares, 2017.

O emprego da levedura da classe *Kluyveromyces* no processo produtivo de lactase apresenta vantagens como o alto rendimento de crescimento que tem um impacto econômico importante na indústria de alimentos; considerado um microrganismo seguro e podem crescer a uma extensa faixa de temperatura. Esses aspectos técnicos são importantes, pois permitem sua aplicação nas indústrias farmacêuticas e nas alimentícias (RUBIO, 2006).

Essa levedura apresenta potencial para aplicação nas indústrias alimentícia e farmacêutica, pois é capaz de produzir enzimas de interesse no setor, como a β -galactosidase (HUSAIN, 2010).

Todas essas características são aspectos técnicos importantes quando se considera que os produtos fermentados tem aplicações alimentares ou farmacêuticas; maior atividade de β -galactosidase do que outras leveduras e crescimento em ampla faixa de temperatura (de 30 a 45 °C, com termotolerância de 40 a 45 °C, podendo se desenvolver até 52 °C) (MANERA et al., 2008; AL-JAZAIRI et al., 2015).

A lactase de *Kluyveromyces fragilis*, atualmente chamada *Kluyveromyces marxianus*, é uma enzima dependente de metais. Os metais e as enzimas estão envolvidos em uma reação reversível que promove a formação de um complexo enzimático.

Esse complexo enzima-íon metálico é 50 % mais ativo do que a enzima sozinha. Além disso, as enzimas de leveduras do gênero *Kluyveromyces* são ativas a pH neutro e, portanto, eficientes na hidrólise do leite e do soro doce (LADERO et al, 2000).

A Tabela 8 fornece um levantamento bibliográfico com os melhores

resultados obtidos de atividade enzimática da lactase e as respectivas condições acerca da produção da lactase a partir de meios contendo lactose, em função de diferentes variáveis de processo fermentativo, como pH, temperatura, agitação e tempo de cultivo.

Tabela 8 - Relação das variáveis pH, temperatura, agitação e tempo de cultivo para trabalhos que utilizaram resíduo de laticínio como meio de cultivo de diferentes cepas de *K. marxianus*

Cepa	pH	T (°C)	Agitação (RPM)	Tempo (h)	Ativ. Enzimática	Referências
DIYS11	5	30	150	40	5075 UONPG mLcél ⁻¹ min ⁻¹	Al-Jazairi et al., 2015
	3	20	250	64	4997 UONPG mLcél ⁻¹ min ⁻¹	
	6	25	200	52	4892 UONPG mLcél ⁻¹ min ⁻¹	
	5	30	150	40	4756 UONPG mLcél ⁻¹ min ⁻¹	
CCT 7082	6	30	180	120	10,7 U mLcél ⁻¹	Manera, 2008
	6	30	180	96	10,6 U mLcél ⁻¹	
CCT 7082	6	30	500	16	17 U mL ⁻¹	Alves, 2008
CCT 7082	7	30	180	48	1733,7 UONPG gcél ⁻¹	Manera, 2011
	5	30	180	48	1718,5 UONPG gcél ⁻¹	
CBS 6556	5,5	31	200	24	9,8 U mLcél ⁻¹	Perini, 2013
CBS 6556	5,5	37	200	12	458,5 UONPG gcél ⁻¹	Rech, 1998
					441,8 UONPG gcél ⁻¹	

Fonte: Rachow, 2019.

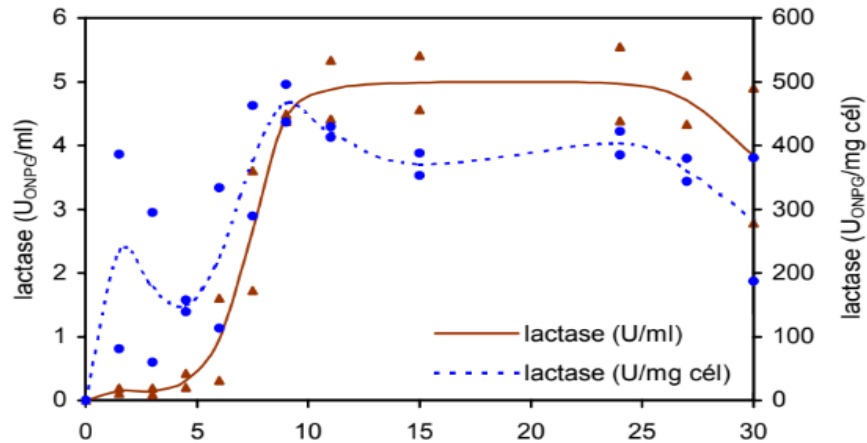
Estudos realizados em escala de bancada utilizando a levedura *k. marxianus* e como substrato o soro de leite são mostrados na Tabela 9 e Figura 20.

Tabela 9 – Resultados de análise de bancada para a produção de lactase

Levedura	Substrato	Qtde de levedura	Qtde de lactose	Atividade enz.	Tempo de fermentação
<i>k. marxianus</i>	soro de leite	12 g/L	50 g/L	28 UG/ml	12 h

Fonte: Adaptado de Santiago et al., 2004

Figura 20 - Crescimento da levedura *K. marxianus* com o substrato soro de queijo



Fonte: Rech, 1998.

Os resultados obtidos por Santiago et al (2004) foi de uma produção máxima em pH de 5,5, temperatura de 37°C e duração de 12 horas de fermentação.

3.13 Importância da suplementação nutricional do meio de fermentação

Os processos fermentativos precisam de um substrato como sacarose, glicose ou lactose que atuará como fonte de carbono, fonte de nitrogênio, fósforo e nutrientes em menor quantidade, como as vitaminas e minerais. Enzimas podem ser produzidas por fermentação submersa, como é o caso da lactase. Neste tipo de fermentação o microrganismo é inserido no meio inóculo, onde ele se desenvolve sob condições controladas de pH, temperatura, agitação e aeração (WAINWRIGHT, 1995).

Existe a necessidade de suplementação para a fermentação do permeado de soro de leite a mesma requer que as necessidades nutricionais da levedura sejam atendidas. Estudos relatam que o uso de extrato de levedura maximiza o rendimento em biomassa de *K. marxianus*, enquanto o uso de ureia não é significativo (MARTINS, 2005).

Diferentes cepas apresentam diferentes desempenhos na

fermentação do substrato permeado de soro de leite. A linhagem CBS 6556 foi descrita como capaz de consumir todo o açúcar do soro in natura (70 g L^{-1}), enquanto a linhagem CBS712 não apresentou o mesmo rendimento. Para tanto, as condições que propiciaram o melhor rendimento foram pH 5,5 e temperatura entre 30 e 37°C (RECH, 1998).

3.13.1 Preparo do inóculo, meio de cultivo e atividade enzimática para a produção da lactase

Há poucos relatos na literatura quanto à produção de lactase utilizando como substrato o permeado de soro de leite.

Para a levedura *k. marxianus* é necessário o seguinte meio de manutenção “Malt Extract Ágar Base” inclinado (extrato de malte 30 g L^{-1} , peptona 5 g L^{-1} e ágar 15 g L^{-1}), a 4°C , em geladeira *Bosh, Style Single Door 34* com repiques a cada 2 meses (CAMARGO, 2016).

Para a produção de lactase utilizando resíduo de laticínio como meio de cultivo; Alves (2008) constatou que 17 g L^{-1} de extrato de levedura conferiram maior valor de atividade enzimática, Rech (1998) trabalhou com uma concentração fixa de 10 g L^{-1} ; e Santiago (2004) verificou que 12 g L^{-1} contribuíram para os melhores resultados.

Para a produção de lactase utilizando como substrato o permeado de soro de leite pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 foram testadas várias condições de temperatura, pH e concentrações dos sais. Após a determinação da condição que proporcionou a maior atividade enzimática foi realizado o ensaio em biorreator com 3,5 L de meio. Os resultados obtidos nos experimentos propostos pelo planejamento apresentaram uma constância em relação a atividade enzimática durante o acompanhamento por 8 horas. As melhores respostas foram obtidas para os pontos centrais a 40°C , 150 RPM e 10 g L^{-1} de extrato de levedura, 10 g L^{-1} de sulfato de amônio, 5 g L^{-1} de fosfato de potássio dibásico e $0,6 \text{ g L}^{-1}$ de sulfato de magnésio heptahidratado, com atividades de 20,726, 20,890 e 20,879 UONPG gcél⁻¹ (RACHOW, 2019).

A cepa *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537 para fermentação

submersa do permeado de soro de leite foi utilizada em um meio composto por extrato de levedura 6,0 g L⁻¹, sulfato de amônio 6,0 g L⁻¹, fosfato de potássio 5,0 g L⁻¹, sulfato de magnésio heptahidratado 0,6 g L⁻¹ e 50 g L⁻¹ permeado de soro de leite em pó. A fermentação foi realizada em incubadora rotatória a 180 RPM, 30 °C por 48 horas, iniciando com uma concentração de células de 1 g L⁻¹ (FALLEIROS, 2016).

3.13.2 Métodos para purificação e recuperação da lactase

Ao utilizar como substrato o permeado de soro de leite e a levedura *K. Marxianus* foram analisados os métodos de purificação da enzima lactase. O método de choque térmico nesse estudo de Ferreira (2019) foi o melhor método de extração, seguido pelos métodos químicos. O método menos eficiente foi a utilização de perolas de vidro (FERREIRA, 2019). Os resultados dos fatores de purificação da lactase são mostrados na Tabela 10.

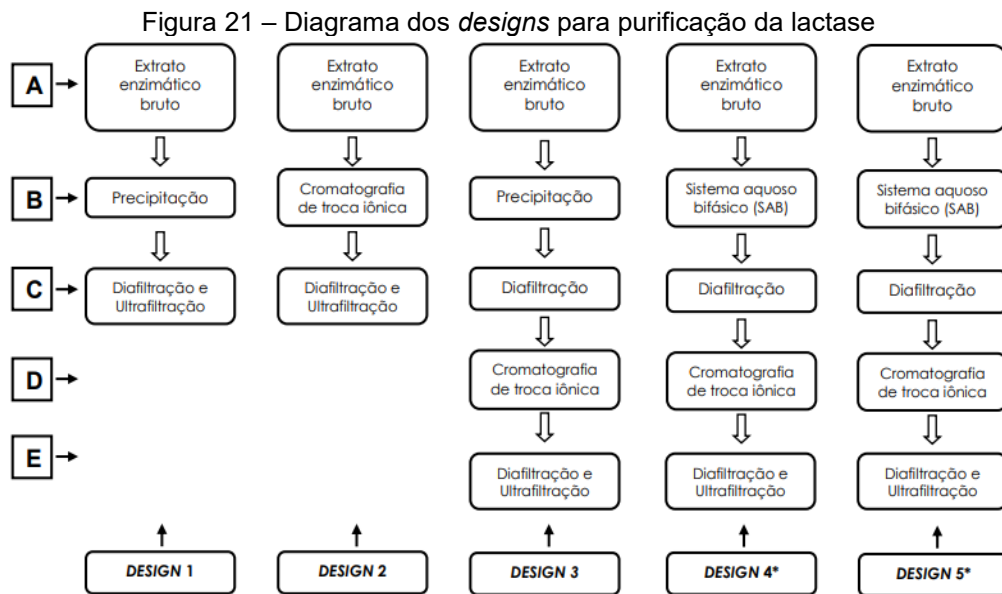
Tabela 10 – Fator de purificação da lactase

Avaliação da extração	
Fator de purificação	% Extração
Sem extração	1
Perolas de vidro (1 min)	0,73
Perolas de vidro (5 min)	1,11
Perolas de vidro (10 min)	1,33
Sonicador (1 min)	1,35
Sonicador (5 min)	1,34
Sonicador (10 min)	1,50
Choque térmico	2,03
SDS (dodecil-sulfato de sódio)	1,83
Triton-X	1,83

Fonte: Ferreira, 2019.

Foi avaliada a purificação da lactase produzida a partir da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 através do estudo dos parâmetros de operação do sistema aquoso bifásico (SAB) e ultrafiltração para estabelecer o melhor *design* para a purificação da enzima utilizando as técnicas de precipitação

com sulfato de amônio, diafiltração, cromatografia de troca iônica, SAB e ultrafiltração (LEMES, 2011). Na Figura 21 é possível observar quais foram os designs testados nesse estudo.



* Os *designs* 4 e 5 apresentam a mesma sequência de técnicas, porém uma menor variação de pH entre as técnicas foi utilizada no último.

Fonte: Lemes, 2011.

A Tabela 11 apresenta os valores de purificação e recuperação da enzima para os diferentes tipos de *designs*, obtidos por Lemes (2011).

Tabela 11 – Resultados dos fatores de purificação e recuperação para cada *design* de processo

<i>Designs</i>	Fator de purificação (FP)							% Recuperação (RP)						
	A	B	C	B+C	D	E	Global	A	B	C	B+C	D	E	Global
1	1	1,4	1,2	1,6	-	-	1,6	100	94,8	85,3	80,8	-	-	80,8
2	1	4,8	1,0	4,7	-	-	4,7	100	64,0	93,4	59,7	-	-	44,8
3	1	1,6	1,0	1,6	4,4	1,1	7,2	100	91,5	92,4	84,5	49,2	90,1	28,5
4	1	2,3	1,1	2,0	3,8	1,1	4,9	100	134,7	89,2	120,1	50,1	91,8	30,8
5	1	1,8	1,1	2,0	4,6	1,1	10,8	100	115,3	98,3	113,3	54,2	94,7	41,3

Fonte: Lemes, 2011.

O *design* que apresentou o melhor fator de purificação global foi a sequência de número 5, formada pelo sistema aquoso bifásico, diafiltração, cromatografia de troca iônica e diafiltração/ultrafiltração, fornecendo um fator de purificação global de 10,8 vezes e uma recuperação global de 41,30% (LEMES,

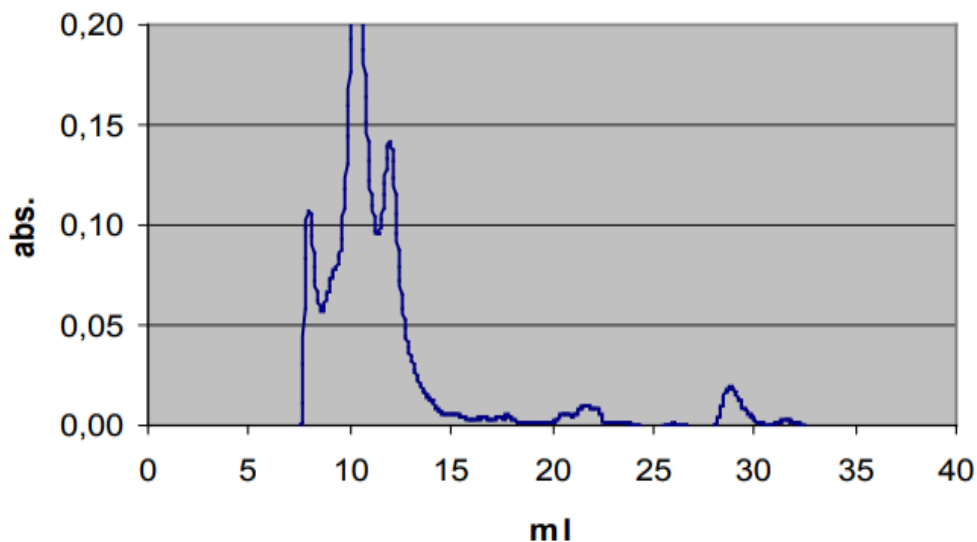
2011).

3.14 Especificação do produto final (lactase)

Dependendo do fabricante, a enzima lactase pode ser apresentada em diferentes concentrações, definidas por LAU (unidade de atividade da lactase), UOPNG (unidades de ortonitrofenilgalactase por grama) e N.L.U (unidade de lactase neutra). A atividade máxima de cada uma depende da origem microbiológica de fermentação (MARTINS, 2020).

O grau de pureza da enzima lactase possui comportamento diferente quando se compara 2 fabricantes diferentes com a mesma atividade em NLU/g. Os picos apresentados na Figura 22 mostram que além da hidrólise, ocorrem também níveis de proteólises que certamente irão ocasionar reações adversas no produto final, tais como geração de sabores estranhos. Impactos de uma enzima com menor grau de pureza no produto final são: maior proteólise, escurecimento do produto, no caso leite UHT (Reação de *Maillard*), menor *shelf life*, necessidade de uso de dosagens elevadas, variabilidade e ou intensidade de cor diferente entre lotes fabricados (MARTINS, 2020).

Figura 22 – Comparação entre dois fabricantes de lactase com a mesma atividade enzimática



Fonte: Martins, 2020

3.14.1 Legislação

Para cada país existe um órgão que regulamenta a produção de enzimas conforme pode ser observado na Tabela 12.

Tabela 12 – Regulamentação internacional de produção de enzimas

Jurisdições	Corpos de avaliação
Estados Unidos	FDA
Canadá	Health Canada
México	COFEPRIS
Brasil	ANVISA
União Europeia	EFSA
China	NHFPC (formerly MOH)
Austrália	FSANZ

Fonte: ABIAM, 2015

No Brasil de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N°53, de 07 de outubro de 2014 dispõe sobre a lista de enzimas, aditivos alimentares e veículos autorizados em preparações enzimáticas para uso na produção de alimentos em geral. A lactase de origem microbiana da levedura *Kluyveromyces marxianus* é aprovada no Brasil conforme o Anexo I dessa RDC.

De acordo com a Anvisa para as enzimas a quantidade por unidade de dosagem deve incluir a atividade da enzima. A atividade é medida de acordo com a reação catalisada por enzimas individuais (especificidade do substrato). Métodos e unidades (por exemplo, Unidades de Lactase FCC) especificadas no Food Chemicals Codex (FCC) devem ser usadas. Os testes quantitativos para um componente específico em um extrato podem ser feitos no estágio de produto acabado ou no estágio do ingrediente de extrato usando métodos analíticos apropriados. Se a quantidade de uma enzima for declarada em peso, a atividade deve ser declarada como uma potência. É responsabilidade dos fabricantes, dos distribuidores e importadores garantir que todos os produtos atinjam um mínimo de 80% do rótulo de potência atividade no final do prazo de validade, com base nos estudos de estabilidade conduzidos para o produto (ANVISA, 2020).

A RDC N°243 de 26 de julho de 2018 dispõe sobre os requisitos para composição, qualidade, segurança e rotulagem dos suplementos alimentares e para atualização das listas de nutrientes, substâncias bioativas, enzimas e probióticos, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar destes produtos.

3.15 Avaliação econômica

Por meio da análise econômica de um determinado projeto é possível realizar estimativas dos gastos com o investimento inicial, manutenção, operação e receitas de um período. Dessa forma, pode-se elaborar um fluxo de caixa relativo aos investimentos, receitas e custos para conseguir determinar indicadores econômicos do projeto (LINDEMEYER, 2008).

Para medir a rentabilidade de um determinado projeto pode-se utilizar o tempo de retorno do capital, a taxa interna de retorno e o valor presente líquido. A viabilidade econômica pode ser determinada pela taxa interna de retorno e valor presente líquido (BUARQUE, 2004).

Os gestores financeiros durante o seu cotidiano podem se deparar com a necessidade de realizar estudos sobre a viabilidade econômica de um determinado projeto de investimento. Para isso podem efetuar o estudo ou apenas repassar a atividade para empresas especializadas nisso. A importância de ser executada a análise de viabilidade está no processo de auxiliar o tomador de decisões no desenho de cenários que irão facilitar a determinação das atitudes que podem ser de sucesso ou de fracasso em um empreendimento (PINTO et al., 2006).

3.16 Conceitos importantes para análise de investimentos

A decisão da implantação de um determinado projeto deve considerar os critérios econômicos de rentabilidade do investimento, critérios financeiros, disponibilidade de recursos e também os fatores não conversíveis em dinheiro (FILHO, KOPITTKKE, 2000).

Em um investimento não se pode deixar de considerar os riscos. Eles aparecem nas seguintes situações: as das possibilidades de rendimentos ou de retornos e as possibilidades de perdas. Desse modo, a viabilidade econômica de projetos consegue analisar o quanto será o retorno do investidor associando aos

riscos que o investimento pode apresentar (PINTO et al., 2006).

3.16.1 Gastos

Ao saber quais são os gastos de uma organização o investidor consegue desenvolver um planejamento para tomar as decisões a fim de garantir um melhor desenvolvimento da organização. Os investimentos feitos em novas tecnologias a serem aplicadas e melhorias geram um crescimento econômico para a organização e também auxiliam o investidor em relação aos programas de ação que devem ser seguidos para conseguir os objetivos e resultados da organização (HERMES, STEINBRENNER, 2016).

Antes de iniciar um determinado negócio é preciso conhecer os gastos pré-operacionais que são os investimentos necessários. Caso isso não ocorra provavelmente o início das atividades operacionais do investimento serão prejudicadas. As máquinas, equipamentos, estoques, móveis, utensílios são considerados gastos para uma organização e define investimentos como gasto ativado em função de sua vida útil ou de benefícios atribuíveis a futuro período (MARTINS, 2003).

3.16.2 Investimento

Ao realizar um investimento é necessário tomar decisões que requerem um processo para determinar onde, quando e quanto investir. Isso está compreendido no orçamento de capital, no qual o escopo é demonstrado pelo conjunto de investimentos que são mais vantajosos em relação ao retorno e diminuição de riscos (BRAGA, 1995).

A avaliação de investimentos quando é realizada tem uma etapa na qual há uma comparação entre os fluxos de caixa e o investimento inicial das propostas de uma determinada organização. Vale ressaltar que essa tomada de decisão ocorre por meio de previsões de venda e custos dos produtos a serem

gerados pelos ativos (LEITE, 1994).

3.16.3 Despesas e receitas

As despesas ou custos fixos são componentes em um investimento que não sofrem alteração de valor em caso de aumento ou diminuição da produção. Os gastos considerados variáveis são aqueles que se alteram proporcionalmente de acordo com o nível de produção ou atividades (ZANLUCA, 2017).

São componentes principais nos estudos de viabilidade como, por exemplo, os custos diretos, os custos específicos da incorporação (projetos, documentação e marketing), projeção de receitas e dos juros de vendas, despesas tributárias, taxas de remuneração, lucro do investidor e por fim quanto à avaliação do estudo, o cronograma de desembolso, o fluxo de caixa, o cálculo do investimento, retorno e indicadores de viabilidade (SILVA, 2004).

3.16.4 Custo

Os custos de um determinado investimento são considerados sacrifícios para a produção ou comercialização de um bem, sendo possível considerar um valor monetário aos mesmos. O chamado custo fixo está relacionado aos gastos independentes do volume das vendas que não depende do faturamento da empresa, já os custos variáveis são aqueles que se alteram diretamente com as vendas da empresa (BOTOMÉ, 2005)

Os preços são baseados nos custos e se referem a qualquer método no qual o custo é utilizado como um fator para se determinar o preço de um produto ou serviço. As estratégias que se baseiam nos custos e por meio disso conseguem ter um custo mensurado para produzir um produto ou serviço, e após isso se determina um preço para o cliente (CREPALDI, 2009).

3.16.5 Método para estimar custos variáveis de um empreendimento

As estimativas de custos são feitas como parte da análise econômica de ideias antes que o projeto tenha sido feito. Nessa fase é preciso um método de estimativa que não necessite de uma relação detalhada de materiais, dimensionamento e balanço de massa e energia, mas que seja suficientemente preciso (WARD, 1984).

A precisão pode ser maior ou menor conforme a quantidade e qualidade de informações disponíveis para um determinado processo industrial. Conforme Turton et al. (2003) as estimativas podem ser classificadas em: ordem de magnitude, estudos preliminares, definitivas e detalhadas. Além disso, quanto maior a precisão desejada maior será o custo para realizá-la.

O método para estimar os custos variáveis para empreendimentos foi proposto por Peter e Timmerhaus (1991) que define a avaliação do custo em estimativas que são divididas em cinco níveis.

Estimativa em ordem de grandeza que é determinada em um custo anterior semelhante, precisão de 30%; estimativa de estudo baseia-se nos principais equipamentos necessários, tem uma precisão de aproximadamente 30%; estimativa preliminar que leva em consideração informações suficientes para solicitar orçamentos com um erro de 20%; estimativa definitiva é definida por dados que completam todas as informações com erro de 10% e estimativa detalhada que é realizada com base em um modelo de engenharia que contempla todas as especificações necessárias com margem de 5% de erro.

A estimativa por ordem de grandeza que foi proposto por Peter e Timmerhaus (1991) determina que 100% é o máximo valor estimado com equipamentos e o restante dos valores são calculados pela porcentagem que representa o investimento em instalações, instrumentos de controle, tubulação instalada, instalação elétrica, edificações, instalação para utilidades, custo com engenharia e supervisão, despesas com construções, contingências e despesas com empreiteiros.

Consoante a Peter e Timmerhaus (1991) é possível observar na Tabela 13 as percentagens para estimar os custos de instalação de uma planta industrial de processamento sólido-líquido.

Tabela 13 – Estimativa para custos de instalação de empreendimento de processamento sólido-líquido

Componentes	Porcentagem
Compra de equipamentos	100
Instalações dos equipamentos	39
Instrumentação e controles	13
Tubulação instalada	31
Instalação elétrica	10
Edificações	29
Instalações para utilidades	55
Custo com engenharia e supervisão	32
Despesas de construção	34
Contingência	10
Despesas com empreiteiros	5

Fonte: Adaptado de Peter e Timmerhaus (1991)

3.16.6 Métodos de estimativas de custos dos equipamentos

Existem quatro métodos para realizar as estimativas de custos de investimento para plantas de processos químicos que são: avaliação superficiais, estimativas baseadas em curvas de custo dos equipamentos, estimativa pela cotação e pormenorizada (SAAD, 2010).

A avaliação superficial é baseada em instalações anteriores, sendo somente um dado de custo fixo por unidade de produto produzido. A estimativa via curva (regra dos seis décimos) baseia-se na utilização de um expoente igual a 0,60 para corrigir as diferenças entre o dimensionamento de futuros equipamentos e aquele com o custo já conhecido (SAAD, 2010).

Conhecida como regra dos seis décimos, se há o conhecimento do custo de um equipamento, mas em uma configuração diferente do requerido, esse valor pode ser ajustado para a configuração desejada por meio dessa regra. Essa

regra heurística foi criada por Williams (1947). Segundo Erwin (2001) esse método pode estimar custos com um erro de até 15%.

O custo (C1) de um determinado equipamento que já é conhecido a uma determinada capacidade, é possível calcular o custo (C2) para qualquer outra configuração pela Equação 1. A razão adimensional P2/P1 é definida como um “fator de tamanho” e pode ser expresso em termos de área, potência, vazão, volume e entre outras configurações (WILLIAMS, 1947).

$$C_2 = C_1 \left(\frac{P_2}{P_1} \right)^{0,6} \quad (1)$$

A estimativa por cotação é baseada na aplicação de fatores as cotações recebidas dos fabricantes dos equipamentos e esses fatores dependem do tipo e do tamanho dos equipamentos. A estimativa de custo pormenorizada consome um maior tempo para as análises, pois requer a preparação de fluxogramas detalhados e também estimar custos indiretos como custo de aluguel e custo de ferramentas (SAAD, 2010).

3.16.7 Cálculo do custo de produção

De acordo com Braga (1991), o valor do custo da Produção por Período (CPP) é determinado pela soma das Matérias Primas aplicadas no período (MAP), Mão de Obra Direta (MOD) e Custo Indiretos Fabricação (CIF) como é demonstrado na seguinte equação.

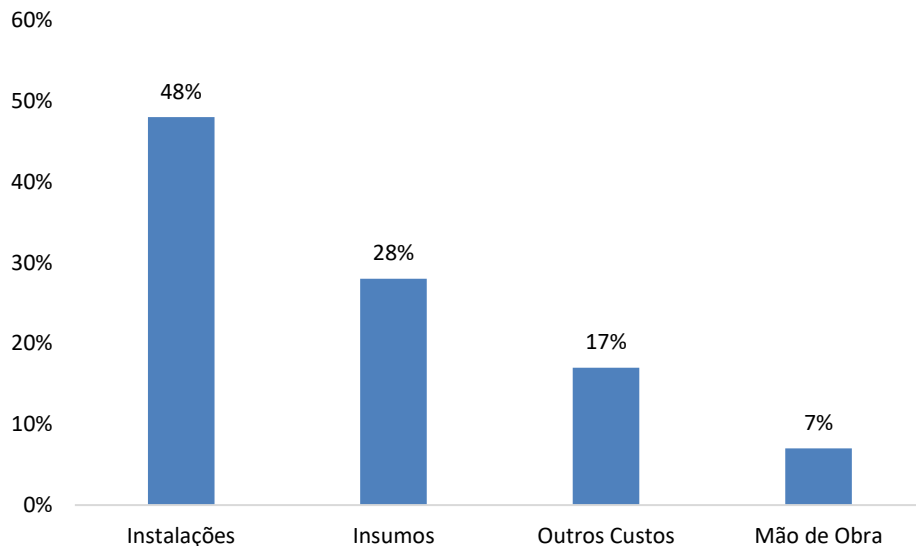
$$CPP = MAP + MOD + CIF \quad (2)$$

O custo de produção é definido pela soma dos custos dos materiais diretos, com o rateio dos custos fixos e dos custos da mão de obra. Para saber o Custo de Produção (CP), quanto custa produzir cada produto, pode-se somar os Materiais Diretos (MD), Mão de Obra (MO) e Custo Fixo (CF), e dividir o resultado pelo Volume de Produção de acordo com a Equação 3 (RIZZON, 2013)

$$CP = \left(\frac{MD+MO+CF}{VP} \right) \quad (3)$$

O comportamento do custo de produção em uma indústria de enzima pode ser observado na Figura 23, sendo a maior porcentagem de gastos operacionais para a produção de enzimas é com a instalação (48%), matérias primas (28%), transporte, tratamento de resíduos, entre outros (17%) e mão de obra (7%).

Figura 23 – Proporção do custo operacional anual em uma indústria produtora de enzima



Fonte: KLEIN et al., 2012.

3.16.8 Depreciação

A depreciação está relacionada aos bens tangíveis como exemplo, máquinas e equipamentos. Os cálculos da depreciação podem ser divididos em três que são o linear, exponencial e soma dos dígitos. Os valores finais e valor contábil são iguais para esses métodos, porém o que se difere é a taxa anual de depreciação para cada método e ano (CREPALDI, 2012).

Conforme determinação da Receita Federal a Instrução Normativa SRF Nº 162, de 31 de dezembro de 1998 que fixa prazo de vida útil e taxa de depreciação dos bens, as máquinas, equipamentos e instalações industriais

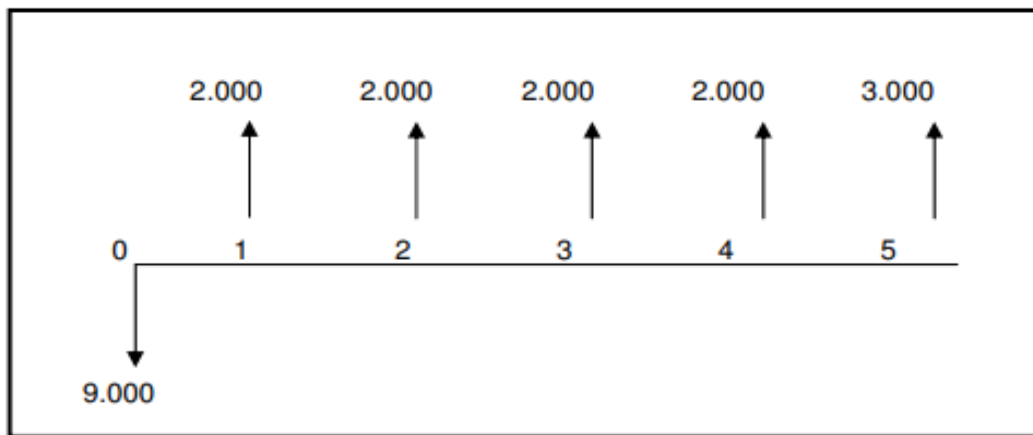
constantes que serão utilizadas na indústria química serão depreciados em 5 anos à taxa de 20%, de acordo com a nota 2 do Anexo I.

3.16.9 Fluxo de caixa

A análise de fluxo de caixa é essencial para o processo de decisões financeiras. O fluxo de caixa demonstra a quantidade de recursos destinados em um determinado investimento ou que podem ser retirados de um investimento ao longo dos anos. Ao analisar as entradas e saídas dos recursos é possível construir uma estimativa de fluxos de caixa (BRUNI, FAMÁ, 2003).

Os fluxos de receitas são valores positivos e de saídas são valores negativos que serão gerados nas etapas de um projeto (COHEN, FRANCO, 2000). Um exemplo de fluxo de caixa pode ser observado na Figura 24.

Figura 24– Exemplo de um fluxo de caixa



Fonte: Casarotto Filho e Kopitter, 2007.

3.16.10 Taxa mínima de atratividade (TMA)

O custo de oportunidade do capital para um investidor corresponde ao que ele não consegue ganhar em um investimento. O custo de capital é o lucro que o investidor perde ao utilizar o capital no projeto.

A taxa de rentabilidade que o capital ganha é o custo de oportunidade. Para conseguir atualizar os fluxos do projeto a pessoa que está avaliando deve usar como taxa de descontos a taxa de rentabilidade de investimento disponível (BUARQUE, 2004).

Quando um investimento proporcionar uma rentabilidade igual ou maior que o rendimento da poupança pode ser considerado viável. Esse conceito de utilizar a rentabilidade da caderneta de poupança é comum no Brasil (PEREIRA, 2009).

3.17 Viabilidade econômica

Como objetivo de conseguir avaliar a capacidade de comercialização os patrocinadores desenvolvem um estudo das condições projetadas de oferta e demanda ao longo da vida esperada de um determinado projeto.

O chamado estudo de marketing é projetado para um conjunto de suposições econômicas razoáveis se a demanda será suficiente para que a produção planejada do projeto atenda ao serviço de sua dívida e irá oferecer uma taxa de retorno que seja assertiva para os investidores (FINNERTY, 1999).

No processo de investimento são analisados vários fatores importantes que podem influenciar diretamente no desempenho de um determinado projeto como a quantidade demandada, preço de venda, canais de distribuição, estoque destes canais, descontos.

Além disso, a análise de mercado é uma importante análise que deve ser feita antes de se iniciar um projeto (WOILER, MATHIAS, 2007).

3.18 Valor presente líquido (VPL)

Considerado um dos instrumentos mais utilizados para avaliar as propostas de capital o valor presente líquido reflete a atratividade do investimento medida pela diferença entre o valor presente das entradas de caixa e o de saídas. É

considerado atraente quando esse valor for maior ou igual a zero (KASSAI et al., 2000).

Maior é a atratividade do projeto quando as entradas são maiores que as saídas de caixa e o valor do VPL é maior. A melhor opção em um projeto é analisar o maior valor presente líquido quando as alternativas consideram a mesma base de TMA (LINDEMEYER, 2008).

O valor presente líquido foi desenvolvido com o intuito de facilitar a comparação entre duas ou mais opções de investimento. Um investimento com possibilidade de mais de uma alternativa, no qual se pode fazer o investimento ou não o fazer, mantendo o capital atualizado por outro tipo de remuneração, a dúvida sempre está em decidir qual situação é mais viável para o investidor. (BREALEY, MYERS, 2003).

O valor presente líquido é calculado de acordo com a Equação 4 (PIRES, 2011).

$$VPL = I + \sum_{t=1}^n \frac{FC_t}{(1+i)^t} \quad (4)$$

Na equação a variável “I” é o investimento de capital na data zero, “FC_t” é o valor final na data t do fluxo de caixa; “n” o prazo de análise do projeto; e o “i” é a taxa mínima de atratividade (TMA) para realizar o investimento, ou também conhecido como o custo de capital do projeto de investimento (PONCIANO et al., 2004).

3.19 Taxa interna de retorno (TIR) e taxa interna de retorno modificada (TIRM)

A taxa interna de retorno representa a rentabilidade média do dinheiro utilizado em um determinado projeto durante toda a sua duração e é uma das formas mais adequadas de avaliar as propostas de investimentos (COHEN, FRANCO, 2000).

Uma das formas mais completas de se demonstrar e analisar as propostas de investimentos de capital é quando um determinado investimento

apresentar uma taxa de TIR maior que uma taxa de TMA (PEREIRA, 2009).

Quando existe a necessidade de comparar mais de um projeto o TIR é aceito como o melhor instrumento de determinação dessa análise comparativa nas quais os projetos não possuem muitas diferenças de investimentos (BUARQUE, 2004).

Em um investimento o TIR é considerado uma taxa exigida de retorno que, garante a reposição de um investimento realizado e quando é utilizada como taxa de desconto pode resultar em um VPL igual a zero (BALIAN, BROM, 2007).

A taxa interna de retorno (TIR) é determinada pela taxa de juros que anula o fluxo de caixa no horizonte de tempo do projeto (PEREIRA, 2009). Para se determinar a taxa interna de retorno (TIR) pode-se utilizar a Equação 5 (PIRES, 2011).

$$0 = -I + \sum_{t=1}^n \frac{FC_t}{(1+TIR)^t} \quad (5)$$

Semelhante à TIR a TIRM (taxa interna de retorno modificada), é uma taxa que estabelece o retorno de um investimento que contemple a aplicação dos fluxos excedentes por uma taxa de aplicação e os déficits de fluxos por uma taxa de captação. Trata-se da TIR tradicional ajustada por taxas diferenciadas de reinvestimentos e de financiamentos (ASSAF NETO, 2006).

3.20 Retorno do investimento (*PAYBACK*)

O prazo que é necessário para recuperar o investimento realizado é conhecido como *payback*. É preciso para se obter o *payback* de maneira simples verificar o tempo que é necessário para que o saldo de um determinado investimento seja igual a zero (BRUNI, FMÁ, 2003).

O mesmo é utilizado em conjunto com os métodos de VPL e TIR em uma situação de tomada de decisão para diminuir os riscos de se utilizar um método que não leva em consideração o fator de tempo (LINDEMEYER, 2008).

No *payback* original, o valor do dinheiro ao longo do tempo não é considerado. Por isso surgiram algumas críticas, porque é recomendável que seja determinado por meio de um fluxo de caixa descontado. Para isso, basta descontar

os valores pela taxa mínima de atratividade e também verificar o prazo que se pode recuperar esse capital investido. As condições para o *payback* descontado são parecidas com as utilizadas no *payback* normal. Os valores do fluxo de caixa são tratados considerando uma taxa de desconto que geralmente é a taxa mínima de atratividade (KASSAI et al., 2000).

O *payback* é uma ferramenta para medir o tempo que é necessário para que a empresa tenha o retorno do investimento inicial aplicado em um projeto. Considerado uma técnica simples que pode ser analisada em qualquer periodicidade e que tem a viabilidade de um projeto definida como positiva, quando o período do *payback* está dentro do previsto pelo investidor e que o retorno do investimento seja o mais breve possível em um prazo total analisado (DEGEN, 1989).

O período de recuperação de capital é o método do *payback* que apresenta a determinação do número de períodos que são necessários para recuperar o capital investido (BRUNI, FAMÁ, 2003). O *payback* pode ser calculado conforme a Equação 6, na qual se divide o valor do investimento inicial pela média do fluxo de caixa anual (PIRES, 2011).

$$PB = \frac{INVESTIMENTO\ INICIAL}{\Sigma FC_{ano}} \quad (6)$$

3.21 Índice de lucratividade (IL)

O índice de lucratividade é representado pela divisão do VPL mais valor em módulo do valor presente dos desembolsos do projeto pelo valor em módulo do valor presente dos desembolsos do projeto. Se o IL for maior que zero aceita-se o projeto, já se for menor que zero rejeita-se o projeto (URTADO et al., 2009).

$$IL = \frac{VPL}{|VP\ desembolsos|} \quad (7)$$

4 METODOLOGIA

Este trabalho não envolve etapas experimentais. As informações necessárias sobre as melhores condições para a produção da lactase foram estabelecidas conforme o trabalho de Conclusão de Curso intitulado “Produção de β -Galactosidase a partir do permeado de soro de leite utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907” desenvolvido por Luciana Maria Rachow no curso de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

4.1.1 Estudo de caso

Nesse estudo de caso foi utilizada a condição ideal proposta pelo planejamento DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) pela análise estatística dos ensaios fermentativos realizados em escala de bancada. A fermentação do permeado de soro de leite em biorreator utilizou 3,5 L de meio de cultivo.

Os resultados obtidos para a caracterização do permeado de soro de leite cedido pela indústria Sooro de Marechal Candido Rondon são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Caracterização do permeado de soro de leite

Parâmetro	RACHOW, 2019
Umidade (%)	85,24
Lactose (%)	8,46
Lípidios (%)	0,03
Sais inorgânicos (%)	2,96
Proteína (%)	<0,1
°Brix	15
pH	6,62

Fonte: Rachow, 2019.

Os resultados obtidos nos experimentos que foram propostos pelo planejamento apresentaram uma constância em relação a atividade enzimática durante o acompanhamento por 8 horas sendo que as melhores respostas foram

obtidas para os pontos centrais a 40°C, 150 RPM e 10 gL⁻¹ de extrato de levedura, 10 gL⁻¹ de sulfato de amônio, 5 gL⁻¹ de fosfato de potássio dibásico e 0,6 gL⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado, com atividades de 20,726, 20,890 e 20,879 UONPG gcél⁻¹ e a 40°C, 180 RPM e 10 gL⁻¹ de extrato de levedura, 10 gL⁻¹ de sulfato de amônio, 5 gL⁻¹ de fosfato de potássio dibásico e 0,6 gL⁻¹ de sulfato de magnésio heptahidratado, que apresentou 20,771 UONPG gcél⁻¹ (RACHOW, 2019).

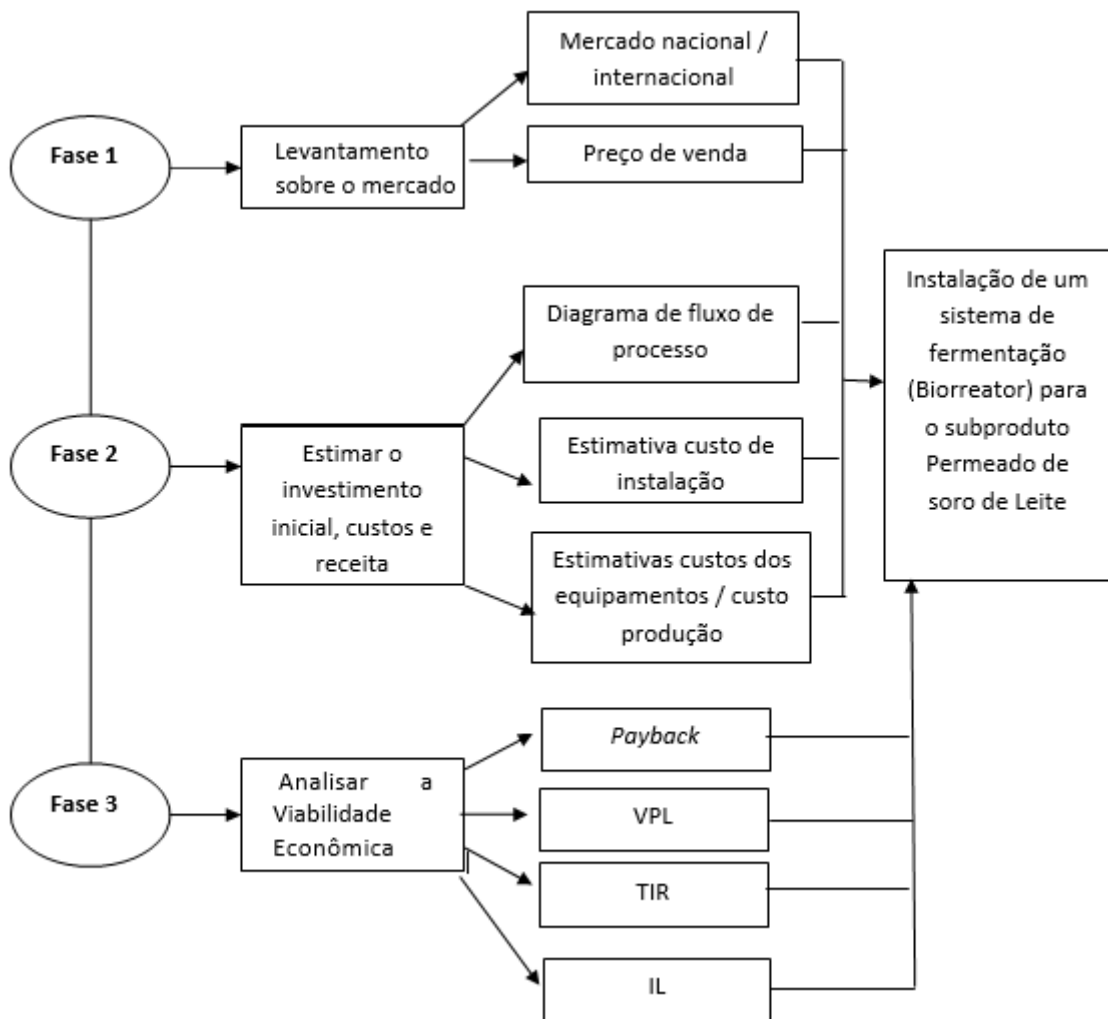
4.1.2 Fases do projeto

No que se trata de procedimentos práticos, o trabalho caracteriza-se como um estudo de caso, pois envolve o estudo de um objeto de maneira que se permita o seu amplo conhecimento referente à avaliação técnico-econômica da produção de lactase utilizando como substrato o permeado de soro de leite. De acordo com Yin (2001), o estudo de caso é uma estratégia de pesquisa abrangente, na qual o pesquisador tem pouco controle sobre os eventos e o foco se encontra em fenômenos contemporâneos inseridos em algum contexto da vida real.

Para o desenvolvimento do trabalho foi realizado um estudo em três fases, as fases foram subdivididas para um melhor detalhamento dos procedimentos adotados.

A Figura 25 apresenta o fluxograma da estrutura metodológica para o desenvolvimento da pesquisa.

Figura 25- Fluxograma das fases do projeto de instalação de um sistema de fermentação para o subproduto permeado de soro de leite



Fonte: Autoria Própria.

Na Fase 1 foi realizada a pesquisa de mercado internacional e nacional para a determinação do preço de venda da lactase.

Para o levantamento das despesas e investimentos foi considerado uma quantidade de recebimento de resíduo líquido de permeado de soro de leite igual a 9.000 litros e 90.000 litros por dia, que seriam cedidos pela indústria Sooro.

Na Fase 2 foram determinadas todas as despesas para o processo produtivo utilizando métodos de estimativas. Para calcular o imposto envolvido na comercialização da enzima foi necessário buscar informações na literatura especializada.

Durante a Fase 3 foi realizada a viabilidade econômica para a qual foi

elaborado o fluxo de caixa dos investimentos, custos e despesas para a instalação do biorreator. Nessa fase somaram-se os custos referentes aos equipamentos necessários e as receitas geradas com a venda da enzima produzida.

As variáveis econômicas (VPL, TIR, IL e *Payback*) foram determinadas utilizando os valores referente a fase 2.

4.1.3 Estimativas dos custos dos equipamentos

Dentre os métodos para realizar as estimativas de custos de equipamentos para plantas de processos químicos foram utilizados nesse trabalho dois métodos: estimativas baseadas em curvas de custos ou também conhecida como regra dos seis décimos, conforme Williams (1947) Equação 1 (item 3.16.6), quando não foram encontrados no mercado os valores das cotações dos equipamentos e estimativa pela cotação de fabricantes.

4.1.4 Estimativa do custo de instalação de um empreendimento

A estimativa para a instalação de uma indústria produtora da enzima lactase foi realizada a partir do método proposto por Peter e Thimmeraus (1991), no qual 100% é o máximo valor estimado com os equipamentos e os demais custos são calculados por porcentagens do valor total dos equipamentos.

4.1.5 Estimativa do custo de produção

Com o objetivo de estimar o custo de produção foi utilizada a Equação 3 (item 3.16.7) que é a soma dos materiais diretos (MD), mão de obra direta (MO) e custo fixo (CF), dividindo o resultado pelo volume de produção (VP).

4.1.6 Indicadores econômicos

A análise de viabilidade econômica levou em consideração requisitos como o investimento inicial: valores dos equipamentos e custos com a instalação da planta produtiva. Sendo que a receita foi determinada pelo preço de venda conforme consulta realizada com a empresa DSM.

Para realizar a análise da viabilidade econômica podem-se comparar os valores obtidos do TIR e TMA (taxa de atratividade mínima), sendo um tomador de decisão para os investimentos.

O projeto que tem a taxa interna de retorno superior a TMA é considerado rentável. Entre as diversas variantes comparáveis e rentáveis de um mesmo projeto de investimento que utiliza este critério pode-se escolher o projeto que tem a taxa interna de retorno maior (GALESNE et al., 1999).

A Tabela 15 apresenta um resumo das análises que foram realizadas no estudo de viabilidade de implantação da indústria produtora de lactase.

Tabela 15 – Análises de viabilidade do projeto para produção industrial de lactase	
Condições	Análises
VPL Positivo	Significa que a essa TMA os fluxos de caixa pagam o investimento inicial.
VPL Negativo	Significa que a essa TMA os fluxos de caixa não pagam o investimento inicial, e o projeto deve ser rejeitado.
IL	Precisa ser maior que 1 para o projeto ser lucrativo
TIR e TIRM > TMA	Projeto economicamente viável para os seus padrões de TMA
TIR e TIRM < TMA	Projeto economicamente inviável para os seus padrões de TMA
TIR e TIRM	Quanto maior o TIR, mais interessante o projeto

Fonte: Adaptado de Pires, 2011.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Uma alternativa para agregar valor ao subproduto permeado de soro de leite é a produção da enzima lactase por meio da fermentação submersa com o auxílio da levedura *K. marxianus*, o que demanda de uma avaliação técnico-econômica do processo.

5.1.1 Levantamentos sobre o mercado

O mercado internacional de enzimas industriais é liderado pela Dinamarca, Estados Unidos, Países Baixos e Alemanha. O Brasil em 2019 representou apenas 1,11% das exportações mundiais e isso demonstra o quanto o país tem potencial para crescer nesse mercado (ITC, 2020).

As importações de enzimas industriais no Brasil superam as exportações. A produção da enzima lactase utilizando como fonte de carbono o permeado de soro de leite é uma oportunidade para utilizar a biotecnologia para agregar valor resíduos, e ganhar espaço no mercado de enzimas industriais.

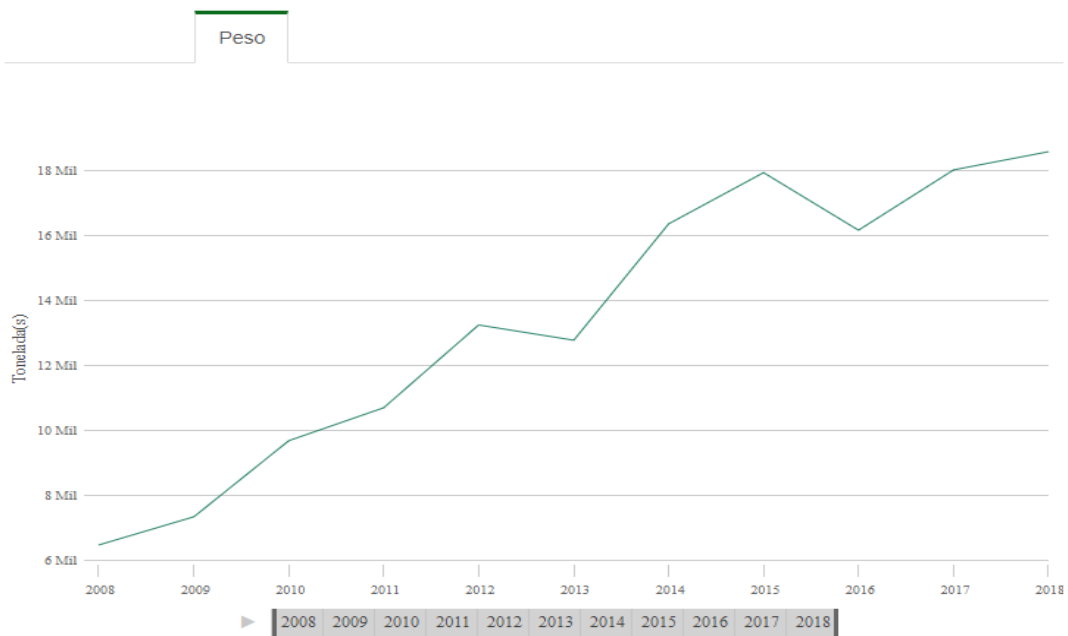
Para a determinação do preço de venda da enzima lactase entrou-se em contato com a empresa DSM (empresa que se destaca no mercado internacional de enzimas industriais), de modo a se obter o preço de venda dessa enzima referente ao ano de 2020.

A mesma forneceu a informação que a enzima lactase é vendida para as indústrias farmacêuticas por R\$ 1.471,81 por kg de enzima.

Esse valor de venda foi utilizado no presente trabalho na análise técnico econômica para produzir enzimas lactases, que terão como mercado as indústrias farmacêuticas.

Com o objetivo de ter um *forecast* das importações de enzimas até 2021 da demanda anual no Brasil, usou-se os dados da Figura 26 que apresenta quantidade de enzimas e enzimas preparadas importadas pelo Brasil no ano de 2008 a 2018, na qual alcançou mais de 18 mil toneladas no ano de 2018.

Figura 26– Volume de enzimas e enzimas preparadas importadas pelo Brasil em toneladas no período de 2008 a 2018

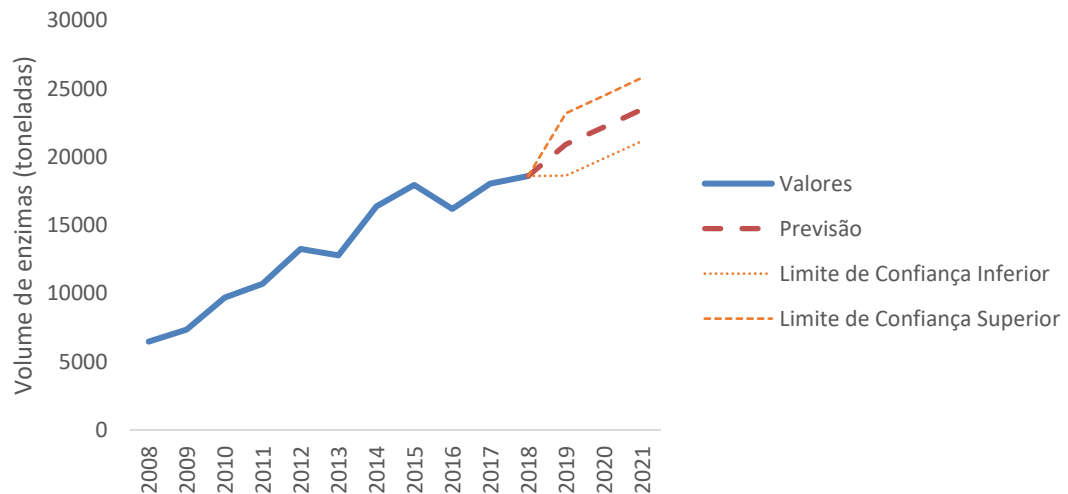


Fonte: MDIC, 2019.

Uma projeção dos dados foi realizada por meio da ferramenta no *software* Excel, permitindo prever os valores futuros a partir dos dados existentes baseados em tempo e técnica de suavização exponencial.

Os dados podem ser observados na Figura 27, podendo-se prevêr que no ano de 2021 o Brasil importará cerca de 23.480 toneladas de enzimas.

Figura 27- Previsão de enzimas e enzimas preparadas importadas pelo Brasil até 2021



Fonte: Autoria própria.

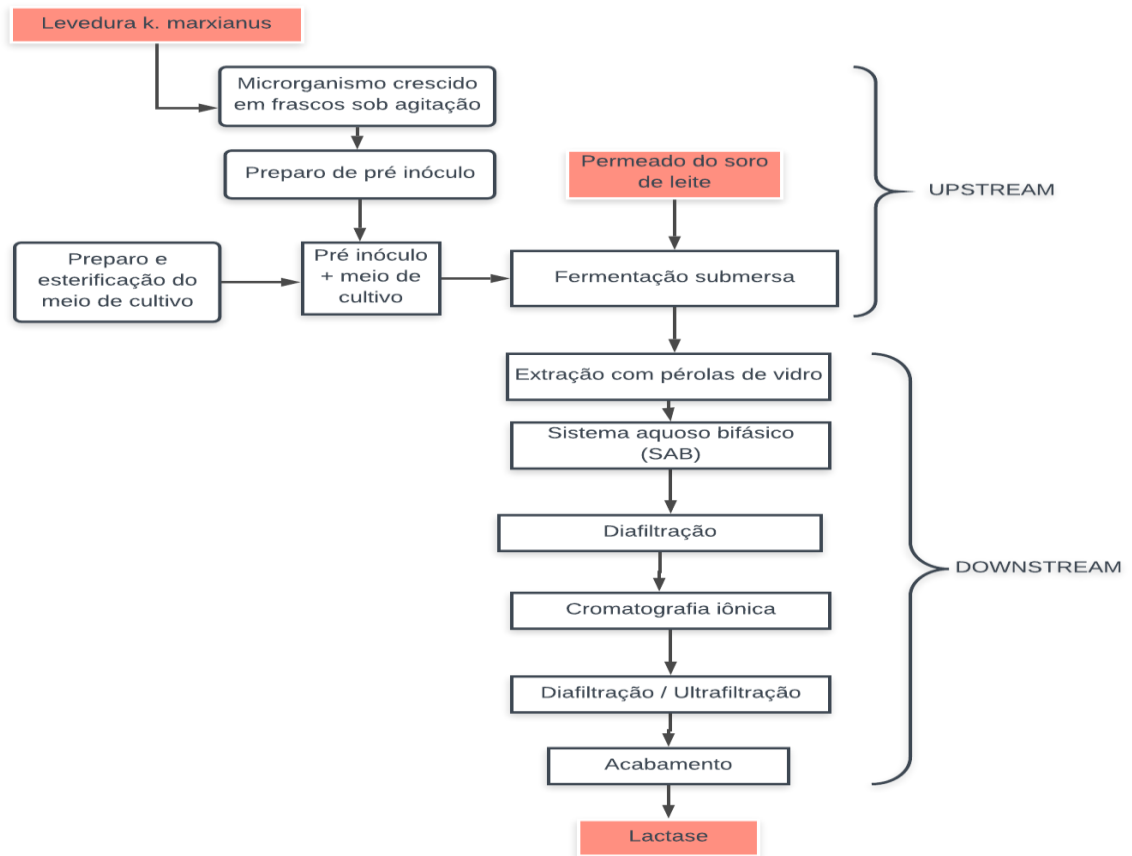
Diante do resultado da projeção, temos para o Brasil uma tendência crescente até 2021 para o volume de importações da enzima lactase, evidenciando a necessidade de abastecimento interno, o que demonstra uma oportunidade para se produzir enzimas nacionais, e investir em processos biotecnológicos.

5.1.2 Etapas do processo produtivo da lactase

Na Figura 28 pode-se observar quais são as etapas do processo produtivo da lactase que foram definidas utilizando como substrato o permeado do soro de leite e a levedura a *k. marxianus* em fermentação submersa, em que a enzima é produzida dentro da célula (intracelular).

Esse fluxograma macro foi elaborado com base em informações disponíveis na literatura, pois as indústrias do setor consideram essa uma informação estratégica e sigilosa. As etapas de purificação da enzima foram definidas conforme o melhor design de Lemes (2011).

Figura 28 – Fluxograma macro do processo de obtenção da enzima lactase



Fonte: Autoria própria.

O preparo do inóculo, preparo do meio de cultivo, esterificação do meio do cultivo e fermentação contemplam o *upstream*. O meio de cultivo e o inóculo com a biomassa é transferida primeiramente para um misturador e posteriormente para o biorreator.

Nessa etapa de transferência é importante observar alguns aspectos como presença de contaminação, infecção por bacteriófagos e proliferação de mutantes de menor eficiência.

A esterilização é conduzida no fermentador principal ou misturador. O final do processo fermentativo ocorre quando se obtém a maior atividade enzimática. Os processos a jusante da fermentação também conhecido como *downstream* dependem da localização da enzima que pode ser intracelular ou extracelular. No presente estudo, a lactase é intracelular. Esse processo é mais complexo, pois apresentam etapas de ruptura celular e posteriormente separação dos constituintes que estavam dentro da célula.

A etapa de extração da enzima por pérolas de vidro ocorre utilizando pérolas de vidro com diâmetro entre 0,6 e 0,8 mm para cada mililitro de suspensão celular. A suspensão deve ser agitada e posteriormente se obtém o extrato bruto com células.

A etapa de sistema aquoso bifásico (SAB) contempla uma técnica de purificação constituída de duas fases aquosas imiscíveis. As proteínas são purificadas pelo resultado da partição diferenciada da molécula-alvo e das impurezas presentes em cada uma das fases líquidas. Na etapa de diafiltração ocorre um processo de separação por membranas para purificar um soluto de uma determinada solução em que os contaminantes possuem dimensões menores que as do soluto de interesse.

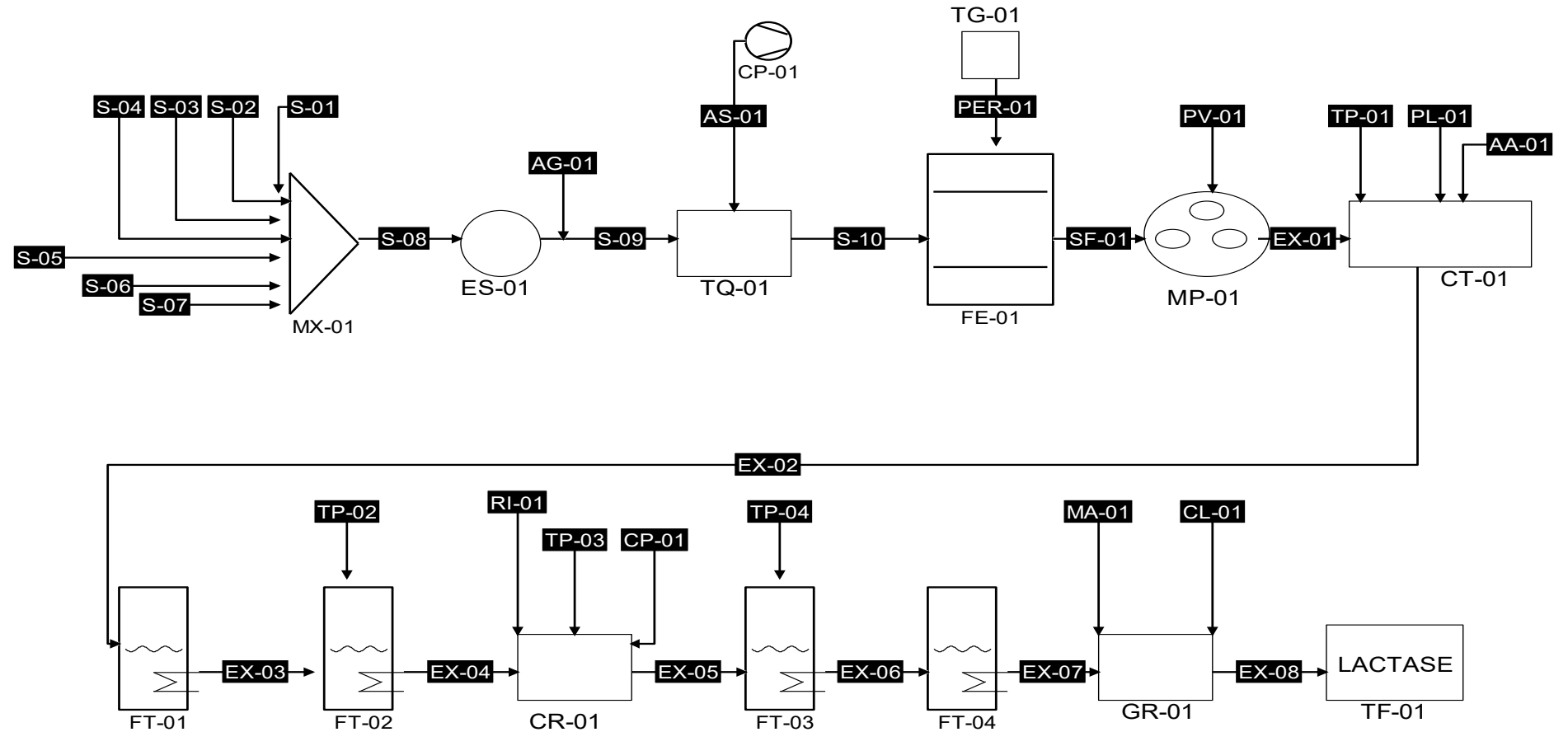
A etapa de cromatografia iônica é necessária por se tratar de uma enzima que tem uso farmacêutico. A purificação nos últimos anos tem sido realizada por técnicas como a cromatografia de troca iônica, a qual vem ganhando importância (KANWAR, GODOI, GOSWAMI, 2002). A cromatografia de troca iônica baseia-se na distribuição dos componentes para serem separados em uma fase estacionária e uma fase móvel que conduz esse componente pela fase estacionária (GHOSH, 2003).

Posteriormente ocorre a etapa de diafiltração e ultrafiltração. Na ultrafiltração ocorre a separação com membranas que é uma técnica de fracionamento baseada na diferença de tamanho das macromoléculas. Depois de todas essas etapas ocorre a etapa de acabamento. Após a granulação com maltodextrina e cloreto de sódio a enzima deve ser misturada para tornar-se homogênea.

5.1.3 Diagrama de fluxo do processo

Para auxiliar na determinação do dimensionamento dos equipamentos da planta industrial foi elaborado o diagrama de fluxo de processo (PFD) conforme a Figura 29.

Figura 29 – Diagrama de Fluxo de Processo (PFD) da produção de lactase (simbologia conforme Tabela 16)



Fonte: Autoria própria.

Esse diagrama de processo foi elaborado utilizando o *software* livre COCO COFE, versão 3.4, a partir da disposição das matérias-primas até a etapa final do processo, em que se obtém o produto final, as lactases.

A identificação das correntes de processo e dos equipamentos por meio dos respectivos TAGs, nome da corrente e o tipo de material estão identificadas na Tabela 16.

Tabela 16 – Identificação dos equipamentos e das correntes do processo para produção da lactase

TAG/Corrente	Equipamento/Etapa	Material
MX-01	Misturador	n/a
ES-01	Esterilizador	n/a
CP-01	Compressor	n/a
TQ-01	Tanque pré inóculo	n/a
FE-01	Biorreator	n/a
TG-01	Tanque pulmão	n/a
MP-01	Moinho de pérolas	n/a
CT-01	Centrífuga	n/a
FT-01	Filtro de membranas	n/a
FT-02	Filtro de membranas	n/a
FT-03	Filtro de membranas	n/a
FT-04	Filtro de membranas	n/a
CR-01	Coluna industrial de troca iônica	n/a
GR-01	Granulador	n/a
TF-01	Tanque produto final	Lactase
S-01	Misturador	Extrato de levedura
S-02	Misturador	Sulfato de amônio
S-03	Misturador	Fosfato de potássio dibásico
S-04	Misturador	Sulfato de magnésio heptahidratado
S-05	Misturador	Extrato de malte
S-06	Misturador	Peptona
S-07	Misturador	Ágar
AG-01	Pré inoculação	Água de extração
AS-01	Aeração esterilizada	Ar saturado
PV-01	Moinho de pérolas	Pérolas de vidro
PER-01	Biorreator	Permeado de soro de leite
SF-01	Biorreator	Substrato Fermentado
EX-01	Moinho de perolas	Extrato enzimático
PL-01	Centrífuga	Polietilenoglicol 4000 (PEG)

TP-01	Centrifuga	Tampão fosfato de potássio
AA-01	Centrifuga	Água
TP-02, TP-04	Diafiltração	Tampão fosfato de potássio
TP-03	Cromatografia iônica	Tampão fosfato de potássio
RI-01	Cromatografia iônica	Resina iônica Q <i>sepharose fast flow</i>
CP-01	Cromatografia iônica	Cloreto de potássio
MA-01	Granulador	Maltodextrina
CL-01	Granulador	Cloreto de sódio

Fonte: Autoria Própria.

Vale ressaltar que embora a enzima lactase tenha uma grande importância industrial, a literatura apresenta poucos dados sobre a purificação e recuperação em escala industrial desta enzima de *k. marxianus*.

Foram definidos os equipamentos necessários para a fermentação do substrato e purificação do extrato enzimático em escala industrial, baseado nas características dos materiais processados e em trabalhos análogos.

As operações *upstream* foram determinadas conforme Mendes (2015). O mesmo realizou uma avaliação técnico econômica para produção de enzimas em escala industrial, no entanto neste trabalho a enzima produzida era a celulase por fermentação submersa. Vale ressaltar que como existem poucos trabalhos sobre a produção de enzimas em escala industrial, Mendes (2015) foi escolhido como base por ser o mais análogo.

As operações do *downstream* foram determinadas conforme Lemes (2011) que realizou um estudo específico para avaliar qual o melhor modelo para a purificação da enzima lactase.

Sendo assim, as etapas que foram usadas no diagrama (Figura 29) são baseadas nesse estudo que apresentou os maiores rendimentos para a produção da enzima lactase a partir da levedura *Kluyveromyces Marxianus* CCT 7082.

As determinações dos insumos dos processos *upstream* quanto ao preparo do inóculo da levedura *k marxianus* seguiu descrição proposta por Carmargo (2016) e Rachow (2019), e são mostradas na Tabela 17.

Tabela 17 – Insumos para o preparo do inóculo

Preparo do inóculo	
extrato de malte	30 g L ⁻¹
peptona	5 g L ⁻¹
Ágar	15 g L ⁻¹

Fonte: Adaptado Carmago, 2016 e Rachow, 2019.

Os insumos do meio de cultivo foram estabelecidos de acordo com o estudo realizado em escala de laboratório por Rachow (2019), no qual verificou em quais concentrações havia uma maior atividade enzimática da lactase. Para uma concentração de substrato contendo lactose de 10 g L⁻¹, as melhores concentrações para o preparo do meio de cultivo são apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18 – Insumos para o preparo do meio de cultivo

Meio de cultivo	
sulfato de amônio	10 gL ⁻¹
fosfato de potássio dibásico	5 gL ⁻¹
sulfato de magnésio heptahidratado	0,60 gL ⁻¹

Fonte: Rachow, 2019

Nas operações *downstream* os insumos foram determinados conforme a Tabela 19.

Tabela 19 – Insumos das operações de *Downstream*

Etapa	Insumo	Concentração	Referências
Extração pérolas de vidro	Pérolas de vidro	1,10 g/mL	Medeiros, 2008
SAB	Polietilenoglicol (massa molar 4000)	14% (m/m)	Lemes, 2011
SAB	Tampão fosfato de potássio	15% (m/m)	Lemes, 2011
SAB	Água	80% (m/m)	Lemes, 2011
Diafiltração	Tampão fosfato de potássio	0,05M	Kuhn et al., 2006
Cromatografia iônica	Resina aniônica	-	Medeiros, 2008
Cromatografia iônica	Tampão fosfato de potássio	25 mM	Medeiros, 2008
Cromatografia iônica	Cloreto de potássio	-	Medeiros, 2008
Acabamento	Maltodextrina	-	DSM, 2020
Acabamento	Cloreto de sódio	-	DSM, 2020

Fonte: Autoria Própria.

Nesse processo foi determinada a produção por fermentação submersa, sendo que o substrato, permeado de soro de leite, foi utilizado em estado líquido. Cerca de 610.000 L por dia de permeado de soro de leite são gerados em uma indústria de laticínios, segundo a empresa Sooro de Marechal

Cândido Rondon.

A fermentação será em regime batelada descontínuo (SOUZA; OSTRUFKA; LUCHETI, 2019). Os cálculos da quantidade de substrato necessário e a determinação da quantidade de enzima produzida por dia e por ano estão descritas a seguir.

A produção industrial de enzimas ocorre em fermentadores com capacidades de 10.000 a 100.000 litros (AQUARONE et al., 2001). Foi analisado dois volumes de biorreatores com $V_{r1} = 10.000$ litros (10 m^3) e $V_{r2} = 100.000$ litros (100 m^3).

Para esse trabalho o tempo do ciclo de fermentação considerado foi 10 horas para a produção de lactase utilizando com levedura a *k. marxianus* (tempo de fermentação de 8 horas, tempo de 2 horas para encher e esvaziar o biorreator com uma vazão de entrada e saída de $6 \text{ L}\cdot\text{s}^{-1}$, totalizando assim 10 horas para o ciclo). Conforme Souza; Ostrufka; Lucheti (2019), foi definido 335 dias de operação em um ano, sendo esses 30 dias restantes para fins de manutenções e paradas realizadas na empresa, não necessariamente 30 dias consecutivos.

A planta produtora de lactase era ter um funcionamento de 2 ciclos por dia totalizando em 20 horas de produção diária.

A quantidade de extrato de levedura necessária para o processo de fermentação com volumes de operação por ciclo com biorreatores com volumes úteis de 9 m^3 e 90 m^3 foram determinadas conforme Rachow (2019), que utilizou 10 g L^{-1} de extrato de levedura de *K. marxianus*. Assim, a quantidade necessária de levedura para o processo de produção da enzima para cada volume de biorreator é mostrada na Tabela 20.

Tabela 20 - Quantidade de leveduras necessárias para um dia de operação de fermentação em biorreator de 10 m^3 e 100 m^3

Volume útil biorreator	Substrato	Levedura
9.000 L	9.000 L	9.000 kg
90.000 L	90.000 L	90.000 kg

Fonte: Autoria própria.

Para realizar os cálculos da quantidade de enzimas produzidas utilizou-se os dados da Tabela 21 que foi um estudo análogo ao processo proposto para produção da lactase por usar a mesma classe de levedura, pois utilizou a cepa

de *Escherichia coli* recombinante BL21(DE3), contendo o gene da β -galactosidase de *Kluyveromyces sp.*

Tabela 21- Dados para o cálculo da quantidade de enzimas produzidas

Condição estudada	Atividade específica máx. (U/mg _{proteína})	P _x (g/l.h)	P _p (U/l.h)	Y _{X/S}	Y _{P/S}
Descontínua alimentada em DO-stat com 12 h de indução	39,42	0,510	1359,4	0,68	1036,6

P_x= produtividade de células; P_p = produtividade enzimática; Y_{X/S} = rendimento celular (conversão de substrato em células); Y_{P/S}= rendimento enzimático (conversão de substrato em enzima).

Fonte: Adaptado de Okano et al., 2016.

A determinação das unidades (U) de enzimas em biorreatores com volumes úteis de 9 m³ e 90 m³ em 8 horas de fermentação foi feita por meio da produtividade enzimática (P_p). Conforme o seguinte cálculo:

$$1359,4 \frac{\text{unidades}}{\text{l.h}} \times 9.000 \text{ l} \times 8 \text{ h} = 97.876.800 \text{ unidades de enzimas produzidas}$$

$$1359,4 \frac{\text{unidades}}{\text{l.h}} \times 90.000 \text{ l} \times 8 \text{ h} = 978.768.000 \text{ unidades de enzimas produzidas}$$

Dividindo o valor encontrado de enzimas em unidades pelo valor da atividade específica máxima obteve-se os cálculos:

$$\frac{97.876.800 \text{ U}}{39,42 \frac{\text{U}}{\text{mg proteína}}} = 2,48 \text{ kg de enzimas /ciclo}$$

$$\frac{978.768.000 \text{ U}}{39,42 \frac{\text{U}}{\text{mg proteína}}} = 24,83 \text{ kg de enzimas /ciclo}$$

Considerando que durante o processo de purificação existem perdas devido ao número de operações unitária e o processo de purificação da enzima foi considerado um rendimento de recuperação de RP = 41,3%, conforme dados de Lemes (2011) para o melhor *design* de purificação. Portanto, a quantidade de

enzima produzidas por ciclo é 1,02 kg para o biorreator de 10.000 L e 10,25 kg para o de 100.000 L.

Na Tabela 22 é possível observar o resumo das informações importantes e condições operacionais para esse processo de produção da enzima lactase.

Tabela 22 – Informações sobre o processo e condições operacionais

Informações	Dados Biorreator 10 m ³	Dados Biorreator 100 m ³	Referências
Temperatura	40 °C	40 °C	Rachow, 2019
Agitação	150 rpm	150 rpm	Rachow, 2019
Tempo de fermentação	8 h	8 h	Rachow, 2019
Ph	7	7	Rachow, 2019
Concentrado de extrato de levedura	10 gL ⁻¹	10 gL ⁻¹	Rachow, 2019
Volume de operação por ciclo (m ³ /ciclo)	9 m ³ (10% do Volume biorreator)	90 m ³ (10% do Volume biorreator)	Autor
Volume do biorreator de inóculo	1 m ³ (10 % do volume do biorreator)	10 m ³ (10 % do volume do biorreator)	Souza; Ostrufka; Lucheti 2019
Tempo de operação por ciclo	10 h (considerando vazão de entrada e saída 6 L.s ⁻¹)	10 h (considerando vazão de entrada e saída 6 L.s ⁻¹)	Autor
Quantidade de ciclos por dia	2	2	Autor
Massa de lactase produzida por dia	2,04 kg	20,50 kg	Autor
Massa de lactase produzida por ano (335 dias úteis)	683,40 kg	6.867,50 kg	Autor

Fonte: Autoria própria.

5.1.4 Levantamentos dos investimentos, gastos e receitas

A determinação dos investimentos e gastos para a implantação do biorreator foi realizada por meio do dimensionamento da capacidade requerida do sistema.

A Tabela 23 apresenta o resumo das principais variáveis envolvidas no processo de obtenção da enzima, para a realização do cálculo dos custos e despesas.

Tabela 23 - Dados importantes para as despesas do projeto

Dados	Biorreator 10 m³	Biorreator 100 m³
Quantidade diária de levedura (kg)	90	900
Horas de operação por dia	20	20
Dias de operação (ano)	335	335

Fonte: Autoria própria.

A partir do fluxo do processo e do dimensionamento foram obtidas as capacidades e quantidades totais dos equipamentos, os quais estão descritos na Tabela 24 e 25 para o volume de biorreator de 10 m³ e 100 m³.

Foi utilizada a estimativa baseada em curvas de custo dos equipamentos ou também conhecida como regra dos seis décimos (WILLIAMS, 1947). É um dos métodos para a estimativa de custos de investimento para plantas de processos químicos.

Para a determinação dos valores dos equipamentos foram utilizados dois métodos: i) regra dos seis décimos considerando como base os valores do projeto em escala industrial de vitaminas dos autores Souza; Ostrufka; Lucheti (2019) e do projeto também em escala industrial para a produção de enzimas celulolíticas de Mendes (2015); ii) método de cotações de preços com fornecedores para os equipamentos encontrados no mercado.

Os dimensionamentos dos equipamentos necessários para a produção da enzima lactase estão descritos no Apêndice A.

Tabela 24 – Infraestrutura necessária e estimativas dos valores dos equipamentos para um biorreator de 10 m³

Equipamentos	Qtde	Capacidade/ Potência	Valor un. Estimado\ fornecedor (R\$)	Valor Total (R\$)	Referências
Biorreator (m ³)	1	10	317.445,80	317.445,80	Equação 1 (Souza; Ostrufka; Lucheti 2019)
Tanque pré inoculação (m ³)	1	1	79.741,29	79.741,29	Equação 1 (Souza; Ostrufka; Lucheti 2019)
Misturador (m ³)	1	1	6.463,68	6.463,68	Equação 1 (Souza; Ostrufka; Lucheti 2019)
Esterilizador (m ³)	1	10	556.992,76	556.992,76	Equação 1 (Mendes, 2015)
Compressor	1	75 kW	43.474,68	473.474,68	Equação 1 (Mendes, 2015)
Tanque pulmão (m ³)	1	6	4.836,35	4.836,35	Equação 1 (Souza; Ostrufka; Lucheti 2019)
Moinho de pérolas (m ³)	1	7	739.982,91	739.982,91	Equação 1 (Souza; Ostrufka; Lucheti 2019)
Centrífuga	1	10ft x 20 ft	32.000,00	32.000,00	Alibaba
Ultrafiltro (m ²)	1	58	1.031.763,46	1.031.763,46	Equação 1 (Mendes, 2015)
Filtro	3	10ft x 20 ft	192.000,00	576.000,00	Alibaba
Coluna industrial de troca iônica	1	7	532.000,00	532.000,00	Alibaba
Granulador	1	1	15.960,00	15.960,00	Alibaba
Tanque produto final (m ³)	1	1	33.708,52	33.708,52	Equação 1 (Mendes, 2015)
				Subtotal: R\$4.400.369,45	

Fonte: Autoria própria

Tabela 25– Infraestrutura necessária e estimativas dos valores dos equipamentos para um biorreator de 100 m³

Equipamentos	Qtde	Capacidade/ Potência	Valor un. Estimado\ fornecedor (R\$)	Valor Total (R\$)	Referências
Biorreator (m ³)	10	100	317.445,80	3.174.458,00	Equação 1 (Souza; Ostrufka; Lucheti 2019)
Tanque pré inoculação (m ³)	10	10	79.741,29	797.412,90	Equação 1 (Souza; Ostrufka; Lucheti 2019)
Misturador (m ³)	10	10	6.463,68	64.636,80	Equação 1 (Souza; Ostrufka; Lucheti 2019)
Esterilizador (m ³)	10	100	556.992,76	5.569.927,60	Equação 1 (Mendes, 2015)
Compressor	10	750 kW	43.474,68	434.746,80	Equação 1 (Mendes, 2015)
Tanque pulmão (m ³)	10	60	4.836,35	48.363,50	Equação 1 (Souza; Ostrufka; Lucheti 2019)
Moinho de pérolas (m ³)	10	70	739.982,91	7.399.829,10	Equação 1 (Souza; Ostrufka; Lucheti 2019)
Centrífuga	10	10ft x 20 ft	32.000,00	320.000,00	Alibaba
Ultrafiltro (m ²)	10	580	1.031.763,46	10.317.634,60	Equação 1 (Mendes, 2015)
Filtro	30	10ft x 20 ft	192.000,00	5.760.000,00	Alibaba
Coluna industrial de troca iônica	10	70	532.000,00	5.320.000,00	Alibaba
Granulador	10	10	15.960,00	159.600,00	Alibaba
Tanque produto final (m ³)	10	10	33.708,52	337.085,20	Equação 1 (Mendes, 2015)
				Subtotal: R\$39.703.694,50	

Fonte: Autoria própria

Na Tabela 26 é apresentada a estimativa de para instalação de uma indústria produtora da enzima lactase para biorreatores de 10 m³ e 100 m³, a qual foi realizada a partir do método proposto por Peter e Thimmeraus (1991) e considerando o valor total das compras dos equipamentos listados na tabela anterior.

Tabela 26 – Estimativa de investimento necessário para instalar uma indústria produtora de lactase

Componentes	Porcentagem	Custo (R\$) para biorreator de 10 m ³	Custo (R\$) para biorreator de 100 m ³
Compra de equipamentos	100	4.400.369,45	39.703.694,50
Instalações dos equipamentos	39	1.716.144,08	15.484.440,86
Instrumentação e controles	13	572.048,03	5.161.480,29
Tubulação instalada	31	1.364.114,53	12.308.145,30
Instalação elétrica	10	440.036,94	3.970.369,45
Edificações	29	1.276.107,14	11.514.071,41
Instalações para utilidades	55	2.420.203,19	21.837.031,98
Custo com engenharia e supervisão	32	1.408.118,22	12.705.182,24
Despesas de construção	34	1.496.125,61	13.499.256,13
Contingência	10	440.036,94	3.970.369,45
Despesas com empreiteiros	5	220.018,4	1.985.184,73
		Subtotal 1: R\$ 15.753.322,61	Subtotal 2: R\$ 142.139.226,31

Fonte: Adaptado ao método de Peter e Thimmeraus (1991).

Para saber qual é o custo de produção foi necessário determinar qual é a porcentagem de impostos sobre o produto vendido. O IPI (Impostos Sobre Produtos Industrializados aprovado pelo decreto nº 4.542/2002) na Seção VI (Produtos das indústrias químicas ou das indústrias conexas) para as matérias albuminoides; produtos à base de amidos ou de féculas modificados; colas; enzimas (0%, exceto amidos e féculas eterificados ou esterificados 12%).

Os percentuais de tributação foram obtidos junto ao SEBRAE

(Serviço de Apoio as Micro e Pequenas Empresas) considerando o estado do Paraná e segmento de indústria, conforme apresentado na Tabela 27.

Tabela 27 – Tributações sobre enzimas

Imposto	Taxa
ICMS	10,64%
PIS/COFINS	8,65%
IPI	0%
Total	19,29%

Fonte: Autoria própria.

O custo dos insumos foi determinado utilizando a Equação 3, na qual usou-se CP = R\$ 746,35 (no valor estabelecido para venda de R\$ 1.471,81 foi considerado que 30% desse valor é o lucro e 19,29% impostos sobre o produto final, sendo assim a diferença de 50,71% é o custo de produção), MO = 131.517,53 e para o biorreator de 10 m³ CF = 190.072,08 e 100 m³ CF = 1.314.027,80.

Tabela 28 – Custos variáveis

Biorreator	Itens	Custo ao Ano (R\$)
9 m ³	Insumos	298.477,97
90 m ³	Insumos	4.762.631,30

Fonte: Autoria própria.

Os custos fixos de operação envolveram os salários dos colaboradores, sendo 3 funcionários: 1 operador de máquinas, 1 analista técnico e 1 analista administrativo (considerou-se 8% de FGTS, INSS 9%, décimo terceiro salário, 1/3 de férias, vale alimentação de R\$ 8,00 e vale transporte de R\$ 15,00 diário e um salário de R\$1.050,00). O pró-labore foi considerado um salário de R\$ 4.000,00.

Para os cálculos dos custos variáveis do processo produtivo considerou-se a potência do motor do biorreator de 37 kW e 370 kW segundo o fornecedor e dessa forma foi estimado o custo com energia elétrica (considerando 335 dias trabalhados no ano e 20 horas de operação por dia no período das 4:00 às 24:00).

Classificou-se a indústria na classe A3a para a potência necessária para o motor do biorreator de 37 kW e A1 para 370 kW. Possui dois preços um para

a energia e um para a demanda, com diferenciação horária apenas na tarifa de consumo, havendo uma tarifa de demanda única para todo o dia de acordo com Firjan (2016).

No estado do Paraná de acordo com dados da COPEL (Companhia Paranaense de Energia) vigentes no ano de 2020, o custo do kWh considerando os impostos (ICMS de 29%, PIS / PASEP de 1,11% e COFIS de 5,09%). Para a classe A3a a demanda contratada é de R\$ 21,22/kW, consumo ponta (das 18:00 as 21:00) R\$ 1,98613 / kWh e fora de ponta R\$ 0,52360 / kWh, já para a classe A1 a demanda contratada é de R\$ 6,39/kW, consumo ponta (das 18:00 as 21:00) R\$ 0,75431 / kWh e fora de ponta R\$ 0,48741 / kWh. Os dados estão demonstrados na Tabela 29.

Tabela 29 – Custos fixos de produção de lactase

Itens	Custo ao Ano (R\$)
Pró-labore	67.576,13
Operador de máquinas	21.313,80
Analista técnico	21.313,80
Analista administrativo	21.313,80
Energia Elétrica (biorreator 37 kW)	190.072,08
Energia Elétrica (biorreator 370 kW)	1.314.027,88

Fonte: Autoria própria.

No cálculo da receita anual, já descontando os impostos de 19,29%, quantidade de 2,48 kg e 24,83 kg de lactases produzidas por dia e ao preço de venda de R\$ 1.471,81. Segue o valor encontrado na Tabela 30.

Tabela 30 – Valores das receitas

Biorreator	Quantidade anual (kg)	Valor (R\$/kg)	Valor anual (R\$)
10 m ³	830,80	1.471,81	986.905,54
100 m ³	8.318,05	1.471,81	9.880.993,72

Fonte: Autoria própria

5.1.5 Viabilidade econômica do projeto

O fluxo financeiro foi determinado através da receita no período de

40 anos, com a subtração dos custos fixos e variáveis. Desse modo, consegue-se calcular os indicadores econômicos do projeto. Sendo que no custo com mão de obra, insumos e energia elétrica foi estimado um aumento de 3% anual e na receita 6% anual com base em dados históricos de crescimento do mercado de enzimas e enzimas preparadas anual de 2015 a 2019 (ITC, 2020).

Os indicadores utilizados na análise econômica foram: *payback*, valor presente líquido (VPL), índice de lucratividade (IL), e a taxa interna de retorno (TIR). Sendo que a taxa mínima de atratividade (TMA) igual a 20%.

Para calcular o valor presente líquido e taxa interna de retorno foi utilizado as funções do Excel VPL e TIR. Índice de lucratividade foi calculado pela divisão do VPL + investimento inicial dividido pelo investimento inicial. *Payback* foi determinado no ano em que o saldo do projeto tornou-se positivo. O detalhamento dos valores de investimento, receita, despesas e saldo do projeto podem ser observados no Apêndice B.

As Tabela 31 e 32 apresentam os resultados do *Payback*, VPL, TIR, TIRM e IL para biorreatores de 10 m³ e 100 m³.

Tabela 31 – Resultados da viabilidade do projeto para um biorreator de 10 m³

Indicadores	Valores	Análise	Resultado da análise
<i>Payback</i>	20 anos e 3 meses	-	-
VPL	R\$ -15.024.651	VPL < 0 = Não viável VPL > 0 = Viável	Projeto não é atrativo
TIR	6,84%	TIR > TMA = Viável TIR < TMA = Não viável	Projeto não é atrativo
TIRM	-8,00%	TIRM > TMA = Viável TIRM < TMA = Não viável	Projeto não é atrativo
IL	-0,95%	IL > 1 Lucrativo IL < 1 Não Lucrativo	Projeto não é atrativo

Fonte: Autoria própria.

Tabela 32 – Resultados da viabilidade do projeto para um biorreator de 100 m³

Indicadores	Valores	Análise	Resultado da análise
<i>Payback</i>	19 anos e 3 meses	-	-
VPL	R\$ -132.239.927	VPL < 0 = Não viável VPL > 0 = Viável	Projeto não é atrativo

TIR	7,38%	TIR > TMA = Viável TIR < TMA = Não viável	Projeto não é atrativo
TIRM	-9,00%	TIRM > TMA = Viável TIRM < TMA = Não viável	Projeto não é atrativo
IL	-0,93%	IL > 1 Lucrativo IL < 1 Não Lucrativo	Projeto não é atrativo

Fonte: Autoria própria.

Outra análise que pode ser feita é a comparação entre a taxa TIR e TMA. Nesse projeto para os dois volumes de biorreator a TIR foi menor que a TMA (20%), sendo assim o projeto não se apresenta ser atrativo.

Na Tabela 33 é possível observar em qual taxa de TMA o VPL ficaria positivo.

Tabela 33 – Análise da variação da TMA e VPL

Taxa TMA	Biorreator 10 m ³ VPL	Biorreator 100 m ³ VPL
0%	85.827.873	879.254.746
5%	9.299.188	112.458.366
10%	-8.243.679	-63.651.519
15%	-13.263.223	-114.289.567
20%	-15.024.651	-132.239.927
25%	-15.750.217	-139.766.718
30%	-16.082.208	-143.311.537
35%	-16.241.817	-145.097.278
40%	-16.317.647	-146.017.390
45%	-16.349.757	-146.477.865
50%	-16.358.009	-146.681.416
55%	-16.352.948	-146.736.683
60%	-16.340.464	-146.705.047
65%	-16.323.960	-146.622.576
70%	-16.305.458	-146.511.074
75%	-16.286.168	-146.383.991
80%	-16.266.822	-146.249.722
85%	-16.247.857	-146.113.527
90%	-16.229.524	-145.978.689
95%	-16.211.963	-145.847.218
100%	-16.195.240	-145.720.304

Fonte: Autoria própria.

Para as duas condições a TMA de 5% é a que resulta em um VPL positivo para o projeto.

6 CONCLUSÕES

Com base nas informações de importações e exportações de enzimas e enzimas preparadas no Brasil é notório que esse mercado está em expansão, pois a cada ano aumenta-se a demanda por enzimas. Por isso, a produção de enzimas tanto nacionalmente como mundialmente é tão promissora para as indústrias.

Ao considerar a utilização de um subproduto, permeado de soro de leite, da indústria de laticínios localizada no Oeste do Paraná e duas capacidades produtivas de biorreatores produtores de enzimas (lactases) de 10 m³ e 100 m³, a integração da planta de lactase com a indústria de laticínios não se mostrou uma alternativa competitiva do ponto de vista técnico e econômico considerando uma TMA de 20%. Porém, com uma TMA de 5% para os dois volumes dos biorreatores o VPL tornou-se positivo, apresentando nessas condições um projeto atrativo.

Vale ressaltar, que o fluxo de processo, determinação dos insumos necessários, dimensionamento dos equipamentos, custos diretos e indiretos e receitas, foram realizados por meio de pesquisas análogas realizadas em cenários nos quais foram utilizados os mesmos tipos de substratos e/ou mesmos tipos de leveduras, além disso foram aplicadas metodologias para estimar os custos do projeto.

Ademais, é preciso enfatizar a dificuldade de encontrar parâmetros mais específicos para todo o estudo do processo produtivo em escala industrial contendo como componentes o permeado do soro de leite e a fermentação por meio da levedura *k. marxianus* para se obter produto lactase.

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Como continuação do presente trabalho, realizar avaliação técnico econômica com diferentes microrganismos para viabilizar o projeto e determinar em qual desses cenários se obtém enzimas com maior atividade enzimática.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIAM. **Enzimas na fabricação de alimentos**. Disponível em:<
http://abiam.com.br/wp-content/uploads/2019/05/Enzimas_na_fabricacao_de_alimentos-07-07-2015.pdf>.
 Acesso em: 17 maio 2020.
- AEHLE, W. **Enzymes in Industry**. 3 ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. 489p., 2007.
- ALBIERO, A. **Desenvolvimento e avaliação de diferentes rotas de produção de etanol biocombustível a partir de resíduos de indústrias lácteas**. 47 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Biocombustíveis, Universidade Federal do Paraná, Palotina - Paraná, 2013.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4th Ed., John Wiley & Sons, Inc, Canada, 1996.
- ALIBABA. **Biorreator Aço Inoxidável**. 2020. Disponível em: <
https://portuguese.alibaba.com/product-detail/20t-industrial-fermentation-equipment-278285084.html?spm=a2700.md_pt_PT.deiletai6.8.41ce7e15ZH3dYY>. Acesso em: 9 julho 2020.
- ALIBABA. **Granulador GHL- 50**. 2020. Disponível em:<
https://www.alibaba.com/product-detail/Granulator-Mixer-Granulator-Quality-Rapid-Mixer_2001125585.html?spm=a2700.galleryofferlist.0.0.31317f02YjXYXa&s=p>.
 Acesso em: 9 julho 2020.
- ALIBABA. **Tubular Centrífuga para a Separação de alta-Velocidade de Processo A Jusante**. 2020. Disponível em: <<https://portuguese.alibaba.com/product-detail/High-Speed-Tubular-Centrifuge-for-Separation-62327839858.html?spm=a2700.galleryofferlist.normalList.32.d70a7e77k3gAyP>>.
 Acesso em: 9 julho 2020.
- ALIBABA. **Trocador de íons**. 2020. Disponível em:<
https://www.alibaba.com/product-detail/Mineral-pure-drinking-water-ion-exchanger_60560597880.html?spm=a2700.gallery_search_cps.normalList.137.18ed6072OCFosD>.
 Acesso em: 9 julho 2020.
- AL-JAZAIRI, M. et al. Optimization of β -galactosidase production by response surface methodology using locally isolated *Kluyveromyces marxianus*. **International Food Research Journal**. Damascus - Siria, v. 22, n. 4, p.1361-1367, jan. 2015.
- ALVES, C. C. **Gráficos de Controle CUSUM: um enfoque dinâmico para a análise estatística de processos**. Dissertação (Especialização). Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
- ALVES, F. G. **Produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 em fermentador e caracterização parcial da enzima livre e imobilizada**. 112 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande – Rio Grande do Sul, 2008.

ANDRADE, R. L. P.; MARTINS, J. F. P. Influência da adição da fécula de batata-doce (*Ipomoea batatas* L.) sobre a viscosidade do permeado de soro de queijo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas - São Paulo, v. 22, n. 3, p. 249-253, set. – dez. 2002.

ANDRADE, R. S. et al. Valorização biotecnológica de soro de leite por fermentação utilizando *Saccharomyces cerevisiae*. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, Ilhéus - Bahia, v. 11, n. 2, p. 82-91, fev. 2015.

ANVISA. **Documento de orientações para discussão a respeito das especificações de ingredientes alimentares**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/4340788/Documento+Orientador.pdf/85dd1d7d-5687-43c3-b960-e6f8ff6c925f>>. Acesso em: 17 maio 2020.

APIL RS, **Soro, a riqueza desperdiçada: de descarte na fabricação de queijos à produto de alto valor industrial**. Revista Leite & Queijos, Porto Alegre, v. 6, n. 33, p.8-12, abr. 2017.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. (Coords.). **Biotecnologia industrial - processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 351-362.

ASSAF NETO, A. **Estrutura e análise de balanços: um enfoque econômico e financeiro**. 8. ed. São Paulo: Atlas, 2006.

BAASEL, W.D. **Preliminary Chemical Engineering Plant Design**. 2nd edition. Van Nostrand Reinhold. New York. 1990. 572p.

BACH, F. **Obtenção de Fermento Acético a partir de Soro de Leite**. Trabalho de Conclusão de Curso. Pinhalzinho. Santa Catarina, 2011.

BALDASSO, C.; TESSARO, I. C.; RUVEN, G. S. **Desmineralização do soro de leite através da eletrodialise**. In: Seminário do programa de pós-graduação em Engenharia Química, 2009, Porto Alegre – RS. Anais VIII Oktoberforum – PPGEQ, 2009.

BARBOSA, A.S., Florentino, E. R., Florencio, I. M; Araujo, A. S. **Utilização do soro como substrato para a produção de aguardente**: Estudo Cinético de Produção de Etanol. Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável Grupo Verde de Agricultura Alternativa. ISSN 1981-8203. Mossoró – Rio Grande do Norte, n 1, p 07-25, 2010.

BAUMER, J. D. e DIEGO, S. M. M. **Apostila enzimas**. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2008.

BELLOCH, C., et. al. Inter-and intraspecific chromosome pattern variation in the yeast genus *Kluyveromyces*. **Yeast**, Valencia – Espanha, v. 14, n. 15, p. 1341-1354, nov. 1998.

BEUCLER, J.; DRAKE, M.; FOEGEDING, A. E. Design of a beverage from whey permeate. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 4, p. 277-285, abr. 2005.

BIEGER, A.; RINALDI, R. N. **Reflexos do reaproveitamento de soro de leite na cadeia produtiva de leite do oeste do Paraná.** In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 47., 2009, Porto Alegre. Anais eletrônicos, Porto Alegre, 2009.

BOBBIO, P. A.; ORSATTI, **Química do processamento de alimentos.** São Paulo: Livraria Varela, 2ª Ed., 1992.

BON, E. P.S.; Pereira Jr, N.; **Tecnologia Enzimática,** Rio de Janeiro, 1999.

BON, E.P.S.; COSTA, R.B.; DA SILVA, M.V.A.; FERREIRA-LEITÃO, V.S.; FREITAS, S.P.; FERRARA, M.A. **Mercado e Perspectivas de Uso de Enzimas Industriais e Especiais no Brasil.** In: BON, E.P.S.; FERRARA, M. A.; CARMO, M.L. Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2008, p. 433-488.

BORTOLETO, M.L.A. Leite: realidade e Perspectivas. Governo do estado de São Paulo, Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **Coleção Cadeias de Produção da Agricultura.** N.3. São Paulo, 1997. 450 p.

BOTOMÉ, M. H. **Projeto de viabilidade econômico financeira para implantação de uma loja de jóias de prata no shopping Santa Mônica em Florianópolis / SC.** Florianópolis, 2005.

BRAGA, R. **Fundamentos e técnicos de administração financeira.** 4. Ed. São Paulo. Atlas, 1995.

BRAGA, Roberto. **Análise Avançada do Capital de Giro.** Caderno de Estudos, São Paulo, FIECAFI, v. 3, nº 3, p. 1-20, set. 1991.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC 2005 nº 205. **Enzimas e preparações enzimáticas para o uso na produção de alimentos destinados ao consumo humano.** Diário Oficial da União, Brasília, 14 nov, 2006.

BREALEY, Richard A.; MYERS, Stewart C. **Capital investment and valuation.** New York: Mc Graw Hill, 2003.

BROM, L. G.; BALIAN, J. E. A. **Análise de investimentos e capital de giro: conceitos e aplicações.** São Paulo: Saraiva, 2007.

BRUNI, A. L. FAMÁ, R. **As decisões de investimentos.** São Paulo: Atlas, 2003.

BUARQUE, C. **Avaliação econômica de projetos.** Ed. Elsevier, São Paulo, 28ª reimpressão, 2004.

BURLANI, E. L. **Avaliação do potencial da levedura *Kluyveromyces spp.* para biotransformação da lactose do soro de ricota e permeado de soro de queijo em etanol.** 102 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de pós-graduação em Biotecnologia, Centro Universitário Univates, Lajeado - Rio Grande do Sul, 2014.

CAMARGO, D. **Produção biotecnológica de etanol a partir das frações celulósica e hemicelulósica do bagaço de sorgo sacarino.** 133 f. Tese

(Doutorado) – Curso de pós- graduação em Engenharia Agrícola, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel – Paraná, 2016.

CARMINATTI, C. A. **Ensaio de hidrólise enzimática da lactose em reator a membrana utilizando Beta-Galactosidase *Kluyveromyces lactis***. Florianópolis, 2001.

CARMINTI, D.; PERRONE, A.; NEVIANI, E. **Inhibition of Clostridium Sporogenes growth in mascarpone cheese by co-inoculation with Streptococcus Thermophilus under conditions of temperature abuse**. Food Microbiology, v. 18, p. 571-579, 2001.

CARRARA, C. R, RUBIOLO, A.C. **Immobilization of β -galactosidase on chitosan**. *Biotechnol Prog* 10:220–224, 1994.

CASAROTTO FILHO, Nelson; KOPITTKKE, Bruno Hartmut. **Análise de investimentos**. 9^a.ed. São Paulo: Atlas, 2000.

CASAROTTO FILHO, Nelson; KOPITTKKE, Bruno Hartmut. **Análise de Investimentos**. São Paulo: Atlas, 2007.

CHAVES, J. R., **Bioensaios em soro de leite doce com células livres e imobilizadas de *aspergillus niger* an 400 para produção de bioprodutos e redução de potencial poluidor**. Dissertação (Mestrado) – Curso Tecnologia e Gestão Ambiental, Instituto Federal do Ceará, Fortaleza – CE, 2015.

COHEN, E.; FRANCO, R. **Avaliação de projetos sociais**. Petrópolis, RJ: Vozes, 4^o ed, 2000.

CREPALDI, S. P. **Contabilidade Rural: Uma Abordagem Decisória**. 7. ed. São Paulo: Atlas S/A, 2012.

CREPALDI, S. P. **Contabilidade Rural: uma abordagem decisória**. Silvio Aparecido Crepaldi. 3. Ed. São Paulo: Atlas, 2005. 338 p.

CUNHA, R. T.; PEREIRA Jr, N.; ANDRADE, C. M.M.C.; **Revista Química Têxtil**, 2007.

DEGEN, R. J. MELLO, A. A. A. **O empreendedor: fundamentos da iniciativa empresarial**. São Paulo: McGraw-Hill, 1989.

DINIZ, R. H. S, et al. Optimizing and validating the production of ethanol from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Viçosa – Minas Gerais, v. 3, n. 2, p. 111-117, set. 2014.

DINIZ, R.H.S. **Metabolismo da lactose em *Kluyveromyces marxianus* UFV - 3 e *Kluyveromyces lactis* JA6**. 2009. 62f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola), Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil, 2009

DOMINGUES, L; GUIMARÃES, P.M.R; OLIVEIRA, C. **Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation**. Bioengineered Bugs, v. 1, p. 164-171, 2010.

DOMINGUES, L; GUIMARÃES, P.M.R; OLIVEIRA, C. **Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for lactose/whey fermentation**. Bioengineered Bugs, v. 1, p. 164-171, 2010.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Pesquisadores identificam composto benéfico para a saúde em soro de leite**. Segurança alimentar, nutrição e saúde. Brasília, DF – Brasil, 2015. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/4989705/pesquisadores-identificam-composto-benefico-para-a-saude-em-soro-de-leite>>. Acesso em: 12 agos. 2019.

ERWIN, D., **Industrial Chemical Process Design**, New York: Mc Graw – Hill, Inc 2001.

FALLEIROS, L. N. S. S. **Produção e caracterização de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 46537**. Tese, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG, 2016.

FAOSTAT, **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Indicator of Livestock Processed – Dry Whey, 2017.

FEITOSA, I. C. **Produção de enzimas lipolíticas utilizando bactéria isolada de solo com histórico de contato com petróleo em fermentação submersa**. 2009. 104 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Tiradentes, Aracaju, 2009.

FELLOWS, P. J. **Tecnologia do processamento de alimentos: Princípios e Práticas** -2 ed.–Tradução: Oliveira, F. C. et al; Porto Alegre: Artmed, pp. 153–181, 2006.

FERMENTECH. **Lactase para produtos lácteos com lactose reduzida GODO-YNL 2**. Disponível em: <https://fermentech.com.br/ingredientes-insumos-laticinios/enzima-godo-ynl-2-lactase-beta-galactosidase/>. Acesso em: 3 set. 2019.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de lipases por fermentação no estado sólido e sua utilização em biocatálise**. 2007. 120 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

FERNANDES, M. L. M. **Produção de Lipases por Fermentação no estado sólido e sua utilização em Biocatálise**. Universidade Federal do Paraná (2007). Disponível em: Acessado em: 07 jun. 2010.

FERNANDES, P. L. **Oportunidades no mercado brasileiro de enzimas** (2015) Disponível em:<<https://www.embrapa.br/documents/1355063/8134956/Palestra+Pedro+Fernandes/3525fcb7-42b5-420f-85cc-f47049e97213>>. Acesso em: 12 agosto 2019.

FERREIRA, G. N., **Extração de produzida por *kluveromyces marxianus* a partir do permeado do soro de leite**. Trabalho de conclusão de curso. Engenharia de Biotecnologia, UTFPR. Toledo – PR, 2019.

FINNERTY, J. D; TRIESCHMANN, C. H., Project Finance: **Engenharia Financeira Baseada em Ativos**. Rio de Janeiro: Qualitymark, 1999.

FIRJAN. Ambiente de Negócios. Disponível em: <file:///C:/Users/Usuario/Downloads/sistema-firjan-quanto-custa-energia-nota-metodologica-2016%20(2).pdf>. Acesso em: 9 julho 2020.

FURLAN, S.A.; CARVALHO JONAS, M. F.; MERKLE, R.; BÉRTOLI, G.B.; JONAS, R. Aplicação do sistema Microtiter Reader na seleção de microrganismos produtores de β –galactosidase. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba,v. 38, p. 1261-1268, 1995.

GALESNE, A.; FENSTERSEIFER, J. E.; LAMB, R. **Decisões de investimentos da empresa**. São Paulo: Atlas, 1999.

GEKAS, V.; LOPEZ-LEIVA, M. Hydrolysis of lactose: a literature review. **Process Biochemistry**, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 1-12, 1985.

GHOSH, R. **Protein bioseparation using ultrafiltration: theory, applications and new developments**. Ed. Imperial College Press, 2003.

GODOY, G. G. de. **Estudo da produção de lactase por fungos filamentosos**. 37 TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Bioquímica, Universidade de São Paulo, Lorena – São Paulo, 2016.

GOMES, A. L. **Análise técnica e econômica de filtro anaeróbico utilizado para tratamento de efluentes líquidos de uma indústria de laticínios – Estudo de caso**. Dissertação (Mestrado) – Curso de pós-graduação em saneamento, meio ambiente e recursos hídricos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – Minas Gerais, 2006.

GUIMARÃES, P. M.R; TEIXEIRA, J.A; DOMINGUES, L. **Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey**. *Biotechnology Advances*, New York, v.28, n. 3, p. 375-384, 2010.

HEIN, K. D. **Suplementação de permeado de soro de leite para produção de etanol**. 52 f. TCC (Graduação) - Curso de Tecnologia em Processos Químicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo - Paraná, 2015.

HERMES, T. R., STEINBRENNER, A. F. **Análise da viabilidade econômica financeira para implantação do produto totem digital**. Santa Rosa. UNIJUÍ, 2016.

HUSAIN, Q. **Beta galactosidases and their potential applications: a review**. *Critical Reviews in Biotechnoly*. v.30, p. 41–62, 2010.

ITC. International Trade Centre. Disponível em:<https://www.trademap.org/Country_SelProductCountry_Graph.aspx?nvpm=3%7>

c076%7c%7c%7c%7c3507%7c%7c%7c4%7c1%7c1%7c1%7c1%7c1%7c2%7c1%7c1>, pg.10. Acesso em: 14 maio. 2020.

JUNIOR, S; SASSON S. **As Enzimas: Proteínas Catalisadoras**. Biologia São Paulo: Atual, 1984.

JURADO E, CAMACHO, F, LUZ'ON, G; VICARIA, J. M, **Kinetic models of activity for β -galactosidases: influence of pH, ionic concentration and temperature**. *Enzyme Microb Technol* .34:33–40, 2004.

KASSAI, J. R., et al. **Retorno de investimento**. 2^a. ed. São Paulo: Atlas, 2000.

KIRKPATRICK, K. J.; FENWICK, R. M. **Manufacture and general properties of dairy ingredients**. Food Technology, v. 41, n. 10, p. 58-65, Oct. 1987.

KLEIN, M; OLESKOWICZ, P.; SIMMONS, B.A.; BLANCH, H.W. **The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels**. Biotechnol. Bioeng. 2012, 109, 1083–1087.

KOLLING, D. **Ampliação de escala do processo de produção de enzimas lignocelulolíticas por fungo filamento em fermentação submersa**. Dissertação (Mestrado) – Curso Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2017, Campinas – SP.

KREGER VAN RIJ, N. J. W. **The yeasts: a taxonomic study**. Ed. 3, 1082 p., Elsevier Science Publishers, B. V. Amsterdam, 1984.

KUHN, K. R.; VEIGA, I. G.; GRUNENVALDT, F. L.; **Purificação de β galactosidase de *Kluyveromyces marxianus*, utilizando a técnica de precipitação**. Projeto de Graduação do curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, RS, 2006.

LADERO, M.; SANTOS, A.; GARCIA-OCHOA, F. **Kinetic modeling of lactose hydrolysis with an immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis***. Enzyme and Microbial Technology, v. 27, n. 8, p. 583-592, 2000.

LATANZE, R.; SANTOS, A. **Produção de etanol pela levedura *Kluyveromyces Marxianus* a partir de permeado de soro de leite**. Congresso Nacional de Iniciação Científica SEMESP, 2015.

LEITE, H. P. **Introdução à administração financeira**. 2 ed. São Paulo. Atlas, 1994.

LEITE, M.T.; BARROZO, M.A.D.S.; RIBEIRO, E.J. (2012) **Canonical analysis technique as an approach to determine optimal conditions for lactic acid production by *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009**. International Journal of Chemical Engineering, v. 2012, p. 1-9.

LEMES, A. C., **Purificação de β -Galactosidase: design do processo**. Tese (Mestrado) – Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande Escola de Química e Alimentos, Rio Grande – Rio Grande do Sul, 2011.

LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SHIMIDELL, W. **Produção de Enzimas Microbianas. Biotecnologia Industrial:** volume 2 e 4; 1ª edição. São Paulo, 2001.

LINDEMEYER, R. M. **Análise da viabilidade econômico-financeira do uso do biogás como fonte de energia elétrica.** Trabalho de Conclusão de curso. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2008.

MANERA, A. P et al. Optimization of the Culture Medium for the Production of β -Galactosidase from *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Food Technology And Biotechnology**, Rio Grande - Rio Grande do Sul, v. 1, n. 46, 13 jul. 2008.

MANERA, A. P. et al. Utilização de resíduos agroindustriais em processo biotecnológico para produção de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082. **Acta Scientiarum. Technology**, Maringá – Paraná, v. 33, n. 2, p. 155-162, abr. 2011.

MARTINS, D. B. G. **produção de β -galactosidase e biomassa por *Kluyveromyces marxianus* sob diferentes condições de cultivo.** 169 f. Tese (Doutorado) - Curso de pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pernambuco, Recife - Pernambuco, 2005.

MARTINS, E. **Contabilidade de custos.** São Paulo: Atlas, 2003.

MARTINS, E. **Ha- Lactasetm referência para produtos lácteos sem lactose.** Disponível em:

<https://aditivosingredientes.com.br/upload_arquivos/201605/2016050254186001463686442.pdf>. Acesso em: 16 maio 2020.

MATHIAS, Washington Franco; WOILER, Samsão. **Projetos.** São Paulo: Atlas, 1996.

MDIC - MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. **Diagnóstico de referência sobre serviços de escalonamento de biotecnologias no Brasil.** Rio de Janeiro: Fundação Bio-Rio, 2012. 50p.

MDIC - MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. **Comex Vix: Principais produtos importados.** Disponível em: <http://www.mdic.gov.br/comercio-exterior/estatisticas-de-comercio-exterior/comex-vis/frame-ppi?ppi=3161>. Acesso em: 09 agosto 2019.

MEDEIROS, F.O. **Adsorção e purificação da enzima β galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7082 através de cromatografia de troca iônica.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, 2008).

MENDES, F. B. **Avaliação Técnico-Econômica da Produção de Enzimas Celulolíticas por Fermentação.** Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, São José do Rio Preto, 2015).

MONTEIRO, V. N, SILVA N. **Aplicações industriais da biotecnologia enzimática.** Anápolis, 2009.

MONTEIRO, V. N., SILVA, R. N. **Aplicações industriais da biotecnologia enzimática**. Goiânia, 2009.

MUSSATTO, S. I, FERNANDES, M, MILAGRES, A. M. F. **Enzimas: poderosa ferramenta na indústria**. São Paulo, 2007.

NELSON, D. L; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre - Rio Grande do Sul: Artmed, 2014.

OKANO, F. Y; ANDRADE, B; MIGLIAVACCA, V; GRAFULIN, V., LUNARDI, J; ROTH, G; SANTOS, D; CHIES, C., RENARD, G; VOLPATO, G. **Produção da enzima β -galactosidase recombinante em biorreatores através de cultivos em batelada alimentada com controle DO-stat e Linear**. Porto Alegre, 2016.

OLEMPSKA, B., Z. S.; MERKER, R. I.; DITTO, M. D.; DINOVI, M. J.; **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 2006.

OLIVEIRA. C; GUIMARÃES, P.M.R; DOMINGUES, L. **Recombinant microbial systems for improved β -galactosidase production and biotechnological applications**. *Biotechnology Advances*, v. 29, p. 600-609, 2011.

PADOVEZE, C. L. **Curso básico gerencial de custos**. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2003. 377 p.

PANESAR, P.S; KUMARI, S; PANESAR, R. **Potential Applications of Immobilized β - galactosidase in Food Processing Industries**, *Enzyme Research*, p. 1-16, 2010.

PEREIRA, C. D. **Produção de metabólitos voláteis frutais por *kluveromyces marxianus* em fermentação submersa em meio a base de soja**. 2007. 80 f. Dissertação (Mestrado em Processos Biotecnológicos), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

PEREIRA, S. M. **Estudo dos custos operacionais e da viabilidade de implantação de um sistema de coleta de dejetos de suínos para a geração de bioenergia no município de Toledo-SC**. Dissertação. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Toledo, 2009.

PEREIRA, S. M. **Estudo dos custos operacionais e da viabilidade de implantação de um sistema de coleta de dejetos de suínos para a geração de bioenergia no município de Toledo-SC**. Dissertação. Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Toledo, 2009.

PETER, M. S.; TIMMERHAUS, K. D. **Plant Design and Economics For Chemical Engineers**. Fourth Edition, 1991, Singapore.

PINTO, M. M., OLINQUEVITCH, J. L., THEODORO, A. J., MOROZINI, J. F., GUTH, S. G., FASSINA, P. H. **Análise de viabilidade econômica de projetos de investimento: métodos utilizados em empresas fabricante de balas do estado do Rio Grande do Sul**. Belo Horizonte, 2006.

PIRES, A. B. **Análise de viabilidade econômica de um sistema de compostagem acelerada para resíduos sólidos urbanos**. Passo Fundo, 2011.

POLITZER, K, BON, E. P. S. **Enzimas industriais e especiais**. Rio de Janeiro, 2006.

PONCIANO, N. J. et al. **Análise de Viabilidade Econômica e de Risco da Fruticultura na Região Norte Fluminense**. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/resr/v42n4/24974.pdf>>. Acesso em: 02 set 2019.

PRODUÇÃO em larga escala de enzimas. In: SHULER, Michael L. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 3. ed. [S. l.]: Prentice Hall, 2017. v. 3, cap. 3.

RACHOW, L. **Produção de β -galactosidase a partir do permeado de soro de leite utilizando a levedura *Kluyveromyces marxianus* atcc 36097**. Trabalho de conclusão de curso. Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, UTFPR. Toledo – PR, 2019.

RECH, R. **Aproveitamento do soro do queijo para a produção de lactase por *Kluyveromyces Marxianus***. Porto Alegre, 1998.

RICHMOND, M.I.; GRAY, J.i.; STINE, C. M. β -Galactosidase: Review of Recent Research Related to Technological Application, Nutritional Concerns, and Immobilization. **Journal Of Dairy Science**, v. 64, n. 9, p. 1759-1771, set. 1981.

RIZZON, L. O. **Sistema de Produção de Vinagre**. Disponível em: <<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Vinho/SistemaProducaoVinhoMoscatelEspumante/custos.htm>>. Acesso em: 9 julho 2020.

RODICIO, R; HEINISCH, J.J. **Yeast on the milk way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis***. *Yeast*, v. 30, p. 165-177, 2013.

RODRIGUES, A. M.; SANTANA, E. S. **Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 21, n.1, p. 57-62, jan. /abr. 2001.

ROVEDA, M.; Dissertação de Mestrado. Universidade de Passo Fundo. Brasil, 2007.

ROY, GUPTA, M, N. **Lactose hydrolysis by Lactozym immobilized on cellulose beads in batch and fluidized bedmodes**. *Process Biochem.* 39:325–332, 2003.

RUBIO, T. M. A. **Comparative analysis on the Gal genetic switch between not so distant cousins – *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis***. *Yeasts*, v.5, p.1115-1128, 2006.

RUIAN GLOBAL MACHINERY CO LTD. **Industrial Biological Aerobic Fermentation Tank for Wine Beer**. Disponível em: <<https://ruianglobal.en.made-in-china.com/product/BvznISXwfURh/China-Industrial-Biological-Aerobic-Fermentation-Tank-for-Wine-Beer.html>>. Acesso em: 24 set. 2019.

SAAD, M.; B.; W. **Avaliação Técnico Econômica Preliminar da Produção de Etanol via Hidrólise Enzimática de Bagaço de Cana-de-açúcar**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial na área de Conversão de Biomassa) - Universidade de São Paulo, [S. l.], 2010.

SANTIAGO, P. A. et al. **Estudo da produção de β -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus***. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 24, n. 4, p. 567-572, 2004.

SHAIKH, S. A.; KHINE, J. M.; KHAN, M. I. Production of β -galactosidase from thermophilic fungus *Rhizomucor sp.* **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 239-245, 1997

SHUKLA, T. P.; WIERZBICKI, L. E. **Beta-galactosidase technology: a solution to the lactose problem**. *Food Science and Nutrition*. V. 25, p. 325-356, 1975.

SILVA, A.P.R. **Purificação de β -galactosidase de *Kluyveromyces marxianus* utilizando sistema aquoso bifásico e separação por membranas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, RS, 2009.

SILVA, D.; TOKUIOSHI, K.; MARTINS, E. S.; SILVA, R.; GOMES, E. **Production of pectinase by solid-state fermentation with *Penicillium viridicatum* RFC3**. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 8, p. 2885-2889, jul. 2005.

SILVA, M. B. **Vocação de Empreendimento. Construção Mercado**, São Paulo, n. 31, p. 22-25, fev. 2004 – Entrevista.

SOUZA, E. B. S.; OSTRUFKA, G. E. H.; LUCHETI, P. R. **Projeto de uma planta de produção de vitamina B12**. Trabalho de Conclusão de Curso – Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo – Paraná, 2019.

SOUZA, E. F. **Aplicação de proteases e amilases produzidas por *Bacillus sp. Smia-2* na remoção de manchas de tecidos**. Campos dos Goytacazes: UENF, 2012.

SOUZA, J. **Contribuição para um método de dimensionamento de plantas de biogás**. 2015. Dissertação (Mestrado em Engenharia – tecnólogo em automação industrial) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

SOUZA, José de, et. al, **Materiais metálicos para a construção de reatores anaeróbios**, UFRGS, 2010.

TAVARES, B. **Estudo do desempenho fermentativo da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 com auxílio de modelagem fenomenológica**. 97 f. Tese (Doutorado) - Curso de pós-graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel - Paraná, 2017.

TEIXEIRA, MARTA. Versatilidade infinita nas aplicações biotecnológicas dos genes *Kluyveromyces LAC*. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 212-225, 2006.

TEIXEIRA, S. M. B. **Elaboração de bebida láctea fermentada utilizando soro de ricota**. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, Lavras – Minas Gerais, 2002.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre - Rio Grande do Sul: 967 p., Artmed, 2012.

URTADO, EDSON *et al.* **Aplicação do método do valor presente líquido (vpl) na análise da viabilidade econômica de projetos na indústria metal mecânica: um estudo de caso.** XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba, Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

VALSECHI, O. **Tecnologia de produtos agrícolas de origem animal: o leite e seus derivados.** Araras – SP: UFSCar, Centro de Ciências Agrárias, 2001. 36p. Apostila digitada.

VIGNAGA, I. R. L. **Obtenção de etanol a partir da fermentação do permeado de soro de queijo utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.** Dissertação, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo – PR, 2017.

VOGEL, F. **Genética Humana: Problemas e abordagens.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 508- 511 p.

WAINWRIGHT M. **Introducción a la biotecnología de los hongos.** Zaragoza: 240 p., Editorial Acribia, 1995.

WANDERLEY, M. D.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. **Aspectos da produção industrial de enzimas.** Rio de Janeiro, 2011.

WARD. T.J. **Predesign estimating of plant capital costs.** Chem. Eng., New York, v. 91, p. 121-124, 1984.

WHITAKER, J.R.; LAW, B.A.; **Sheffied Food Technology**, 2001.

WILLIAMS,R. **Six- tenths factor aids in approximating costs.** Chemical Engineering magazine, 1947.

YANG, S. T.; S, E. M. **Novel products and new technologies for use of a familiar carbohydrate milk lactose.** Journal of Dairy Science, v. 78, p. 2541-2562, 1995.

YIN, R. K. **Estudo de Caso: planejamento e métodos.** Trad. Daniel Grassi, 2. Ed, Porto Alegre: Bookman, 2001.

ZANLUCA, J. S. **Custos fixos e variáveis (portal de contabilidade).** Disponível em:< <http://www.portaldecontabilidade.com.br/tematicas/custo-fixo-variavel.htm>>. Acesso em: 17 agosto 2019.

ZIMMER, K. R, BORRÊ, G. L, TRENTIN, D. S, JÚNIOR, C. W, FRASSON, A. P, GRAEFTA. A, GOMES, P, MACEDO, A. J. **Enzimas microbianas de uso terapêutico e diagnóstico clínico.** Rio Grande do Sul, 2009.

APÊNDICE A: DIMENSIONAMENTO DOS EQUIPAMENTOS

Para o biorreator de 100 m³ foi considerada somente a proporção de 10 vezes maior para as capacidades / potências de todos os equipamentos.

- **Biorreator (10 m³)**

Dimensão definida pelo autor.

- **Tanque pré-inóculo (1 m³)**

Dimensão definida por analogia sendo 10% do volume do biorreator conforme Souza; Ostrufka; Lucheti (2019).

- **Misturador (1 m³)**

Volume de substrato = 5,68 m³

Levedura (57,14 kg em 8 horas de fermentação)

Extrato de Malte (30 gL⁻¹ x 5,68 m³ = 170,4 kg)

Peptona (5 gL⁻¹ x 5,68 m³ = 28,40 kg)

Ágar (15 gL⁻¹ x 5,68 m³ = 85,20 kg)

Sulfato de amônio (10 gL⁻¹ x 5,68 m³ = 56,80 kg)

Fosfato de potássio dibásico (5 gL⁻¹ x 5,68 m³ = 28,40 kg)

Sulfato de magnésio heptahidratado (0,60 gL⁻¹ x 5,68 m³ = 3,41 kg)

Total = 429,75 kg, utilizando a proporção conforme levantamento do mercado de misturadores de 50 L tem capacidade para 30 kg.

Volume misturador = 0,72 m³

- **Esterilizador (10 m³)**

Volume do biorreator pode ser considerado igual ao do esterilizador conforme Mendes (2015).

- **Compressor (75 kW)**

Dimensão definida por analogia conforme Mendes (2015).

- **Tanque pulmão (6 m³)**

Volume de substrato = 0,71 m³h⁻¹ em 8 horas

Volume de substrato = 5,68 m³

- **Moinho de pérolas (7 m³)**

Estimado pela soma do volume do tanque pulmão e tanque pré inóculo.

- **Centrifuga (10 ft x 20 ft), Ultrafiltro (58 m²) e Filtro (10 ft x 20 ft)**

Dimensões definidas por analogia conforme Mendes (2015).

- **Coluna industrial de troca iônica (7 m³)**

Estimado pela soma do volume do tanque pulmão e tanque pré inóculo.

- **Granulador (1 m³) e Tanque produto final (1 m³)**

10% do volume do biorreator.

APÊNDICE B: DETALHAMENTOS DOS CUSTOS E AS RECEITAS PROJETADAS

- **Biorreator de 10 m³:**

Período (Anual)	Total	Investimento Inicial	Receita / Retorno	Insumos	Mão de obra	Energia elétrica	Depreciação equipamentos
0	(15.753.322,61)	15.753.322,61					
1	(513.235,93)		986.905,54	298.477,97	131.517,53	190.072,08	880.073,89
2	(472.623,62)		1.046.119,87	307.432,31	135.463,06	195.774,24	880.073,89
3	(429.016,52)		1.108.887,06	316.655,28	139.526,95	201.647,47	880.073,89
4	(382.218,19)		1.175.420,29	326.154,94	143.712,76	207.696,89	880.073,89
5	(332.019,91)		1.245.945,51	335.939,58	148.024,14	213.927,80	880.073,89
6	601.873,97		1.320.702,24	346.017,77	152.464,86	220.345,63	
7	659.551,25		1.399.944,37	356.398,31	157.038,81	226.956,00	
8	721.336,12		1.483.941,03	367.090,25	161.749,97	233.764,68	
9	787.494,44		1.572.977,49	378.102,96	166.602,47	240.777,62	
10	858.308,59		1.667.356,14	389.446,05	171.600,55	248.000,95	
11	934.078,54		1.767.397,51	401.129,43	176.748,56	255.440,98	
12	1.015.122,82		1.873.441,36	413.163,32	182.051,02	263.104,21	
13	1.101.779,74		1.985.847,85	425.558,22	187.512,55	270.997,34	
14	1.194.408,57		2.104.998,72	438.324,96	193.137,93	279.127,26	
15	1.293.390,79		2.231.298,64	451.474,71	198.932,06	287.501,08	
16	1.399.131,47		2.365.176,56	465.018,95	204.900,03	296.126,11	
17	1.512.060,71		2.507.087,15	478.969,52	211.047,03	305.009,89	
18	1.632.635,15		2.657.512,38	493.338,61	217.378,44	314.160,19	
19	1.761.339,57		2.816.963,12	508.138,76	223.899,79	323.584,99	
20	1.898.688,66		2.985.980,91	523.382,93	230.616,78	333.292,54	
21	2.045.228,74		3.165.139,77	539.084,41	237.535,29	343.291,32	
22	2.201.539,80		3.355.048,15	555.256,95	244.661,35	353.590,06	
23	2.368.237,44		3.556.351,04	571.914,66	252.001,19	364.197,76	
24	2.545.975,09		3.769.732,10	589.072,10	259.561,22	375.123,69	
25	2.735.446,31		3.995.916,03	606.744,26	267.348,06	386.377,40	
26	2.937.387,18		4.235.670,99	624.946,59	275.368,50	397.968,73	
27	3.152.578,92		4.489.811,25	643.694,98	283.629,56	409.907,79	
28	3.381.850,63		4.759.199,92	663.005,83	292.138,44	422.205,02	
29	3.626.082,14		5.044.751,92	682.896,01	300.902,60	434.871,17	
30	3.886.207,16		5.347.437,04	703.382,89	309.929,67	447.917,31	
31	4.163.216,49		5.668.283,26	724.484,38	319.227,56	461.354,83	
32	4.458.161,48		6.008.380,25	746.218,91	328.804,39	475.195,47	
33	4.772.157,74		6.368.883,07	768.605,47	338.668,52	489.451,34	
34	5.106.388,96		6.751.016,05	791.663,64	348.828,58	504.134,88	

35	5.462.111,11		7.156.077,02	815.413,55	359.293,44	519.258,92	
36	5.840.656,75		7.585.441,64	839.875,95	370.072,24	534.836,69	
37	6.243.439,71		8.040.568,13	865.072,23	381.174,41	550.881,79	
38	6.671.959,94		8.523.002,22	891.024,40	392.609,64	567.408,24	
39	7.127.808,81		9.034.382,36	917.755,13	404.387,93	584.430,49	
40	7.612.675,49		9.576.445,30	945.287,78	416.519,57	601.963,41	

Fluxo de caixa e saldo do projeto:

Ano	Fluxo de caixa	Saldo projeto	PAYBACK
0	-15.753.322,61	-15.753.322,61	
1	-513.235,93	-16.266.558,54	
2	-472.623,62	-16.739.182,16	
3	-429.016,52	-17.168.198,68	
4	-382.218,19	-17.550.416,87	
5	-332.019,91	-17.882.436,78	
6	601.873,97	-17.280.562,81	
7	659.551,25	-16.621.011,56	
8	721.336,12	-15.899.675,44	
9	787.494,44	-15.112.181,00	
10	858.308,59	-14.253.872,41	
11	934.078,54	-13.319.793,87	
12	1.015.122,82	-12.304.671,05	
13	1.101.779,74	-11.202.891,31	
14	1.194.408,57	-10.008.482,74	
15	1.293.390,79	-8.715.091,95	
16	1.399.131,47	-7.315.960,48	
17	1.512.060,71	-5.803.899,77	
18	1.632.635,15	-4.171.264,62	
19	1.761.339,57	-2.409.925,04	
20	1.898.688,66	-511.236,39	
21	2.045.228,74	1.533.992,36	20,25
22	2.201.539,80	3.735.532,15	
23	2.368.237,44	6.103.769,59	
24	2.545.975,09	8.649.744,68	
25	2.735.446,31	11.385.190,99	
26	2.937.387,18	14.322.578,16	
27	3.152.578,92	17.475.157,08	
28	3.381.850,63	20.857.007,71	
29	3.626.082,14	24.483.089,85	
30	3.886.207,16	28.369.297,02	
31	4.163.216,49	32.532.513,51	
32	4.458.161,48	36.990.674,99	
33	4.772.157,74	41.762.832,73	
34	5.106.388,96	46.869.221,69	

35	5.462.111,11	52.331.332,80	
36	5.840.656,75	58.171.989,55	
37	6.243.439,71	64.415.429,26	
38	6.671.959,94	71.087.389,20	
39	7.127.808,81	78.215.198,00	
40	7.612.675,49	85.827.873,50	

- **Biorreator de 100 m³:**

Período (Anual)	Total	Investimento Inicial	Receita / Retorno	Insumos	Mão de obra	Energia elétrica	Depreciação equipamentos
0	(142.139.226,31)	142.139.226,31					
1	(4.267.921,89)		9.880.993,72	4.762.631,30	131.517,53	1.314.027,88	7.940.738,90
2	(3.861.307,57)		10.473.853,34	4.905.510,24	135.463,06	1.353.448,72	7.940.738,90
3	(3.424.709,03)		11.102.284,54	5.052.675,55	139.526,95	1.394.052,18	7.940.738,90
4	(2.956.159,60)		11.768.421,62	5.204.255,81	143.712,76	1.435.873,74	7.940.738,90
5	(2.453.569,57)		12.474.526,91	5.360.383,49	148.024,14	1.478.949,96	7.940.738,90
6	6.026.020,22		13.222.998,53	5.521.194,99	152.464,86	1.523.318,45	
7	6.603.490,78		14.016.378,44	5.686.830,84	157.038,81	1.569.018,01	
8	7.222.086,86		14.857.361,15	5.857.435,77	161.749,97	1.616.088,55	
9	7.884.470,30		15.748.802,82	6.033.158,84	166.602,47	1.664.571,20	
10	8.593.468,49		16.693.730,98	6.214.153,60	171.600,55	1.714.508,34	
11	9.352.084,48		17.695.354,84	6.400.578,21	176.748,56	1.765.943,59	
12	10.163.507,66		18.757.076,13	6.592.595,56	182.051,02	1.818.921,90	
13	11.031.125,17		19.882.500,70	6.790.373,43	187.512,55	1.873.489,56	
14	11.958.533,95		21.075.450,74	6.994.084,63	193.137,93	1.929.694,24	
15	12.949.553,49		22.339.977,79	7.203.907,17	198.932,06	1.987.585,07	
16	14.008.239,42		23.680.376,46	7.420.024,38	204.900,03	2.047.212,62	
17	15.138.897,90		25.101.199,04	7.642.625,11	211.047,03	2.108.629,00	
18	16.346.100,81		26.607.270,99	7.871.903,87	217.378,44	2.171.887,87	
19	17.634.701,96		28.203.707,24	8.108.060,98	223.899,79	2.237.044,51	
20	19.009.854,24		29.895.929,68	8.351.302,81	230.616,78	2.304.155,84	
21	20.477.027,76		31.689.685,46	8.601.841,90	237.535,29	2.373.280,52	
22	22.042.029,15		33.591.066,59	8.859.897,15	244.661,35	2.444.478,93	
23	23.711.022,03		35.606.530,58	9.125.694,07	252.001,19	2.517.813,30	
24	25.490.548,60		37.742.922,42	9.399.464,89	259.561,22	2.593.347,70	
25	27.387.552,74		40.007.497,76	9.681.448,84	267.348,06	2.671.148,13	
26	29.409.404,25		42.407.947,63	9.971.892,30	275.368,50	2.751.282,57	
27	31.563.924,81		44.952.424,49	10.271.049,07	283.629,56	2.833.821,05	
28	33.859.415,29		47.649.569,96	10.579.180,54	292.138,44	2.918.835,68	
29	36.304.684,84		50.508.544,15	10.896.555,96	300.902,60	3.006.400,75	
30	38.909.081,71		53.539.056,80	11.223.452,64	309.929,67	3.096.592,78	

31	41.682.525,87		56.751.400,21	11.560.156,22	319.227,56	3.189.490,56
32	44.635.543,65		60.156.484,22	11.906.960,91	328.804,39	3.285.175,28
33	47.779.304,49		63.765.873,28	12.264.169,73	338.668,52	3.383.730,53
34	51.125.659,82		67.591.825,67	12.632.094,82	348.828,58	3.485.242,45
35	54.687.184,38		71.647.335,21	13.011.057,67	359.293,44	3.589.799,72
36	58.477.219,97		75.946.175,33	13.401.389,40	370.072,24	3.697.493,72
37	62.509.921,83		80.502.945,85	13.803.431,08	381.174,41	3.808.418,53
38	66.800.307,86		85.333.122,60	14.217.534,01	392.609,64	3.922.671,08
39	71.364.310,77		90.453.109,95	14.644.060,03	404.387,93	4.040.351,22
40	76.218.834,33		95.880.296,55	15.083.381,83	416.519,57	4.161.561,75

Fluxo de caixa e saldo do projeto:

Ano	Fluxo de caixa	Saldo projeto	PAYBACK
0	-142.139.226,31	-142.139.226,31	
1	-4.267.921,89	-146.407.148,20	
2	-3.861.307,57	-150.268.455,77	
3	-3.424.709,03	-153.693.164,80	
4	-2.956.159,60	-156.649.324,39	
5	-2.453.569,57	-159.102.893,96	
6	6.026.020,22	-153.076.873,74	
7	6.603.490,78	-146.473.382,96	
8	7.222.086,86	-139.251.296,10	
9	7.884.470,30	-131.366.825,80	
10	8.593.468,49	-122.773.357,31	
11	9.352.084,48	-113.421.272,83	
12	10.163.507,66	-103.257.765,17	
13	11.031.125,17	-92.226.640,00	
14	11.958.533,95	-80.268.106,06	
15	12.949.553,49	-67.318.552,57	
16	14.008.239,42	-53.310.313,15	
17	15.138.897,90	-38.171.415,25	
18	16.346.100,81	-21.825.314,44	
19	17.634.701,96	-4.190.612,47	
20	19.009.854,24	14.819.241,77	19,22
21	20.477.027,76	35.296.269,52	
22	22.042.029,15	57.338.298,68	
23	23.711.022,03	81.049.320,70	
24	25.490.548,60	106.539.869,31	
25	27.387.552,74	133.927.422,04	
26	29.409.404,25	163.336.826,29	
27	31.563.924,81	194.900.751,10	
28	33.859.415,29	228.760.166,39	
29	36.304.684,84	265.064.851,23	
30	38.909.081,71	303.973.932,94	
31	41.682.525,87	345.656.458,81	
32	44.635.543,65	390.292.002,46	
33	47.779.304,49	438.071.306,94	
34	51.125.659,82	489.196.966,76	

35	54.687.184,38	543.884.151,15	
36	58.477.219,97	602.361.371,12	
37	62.509.921,83	664.871.292,95	
38	66.800.307,86	731.671.600,81	
39	71.364.310,77	803.035.911,59	
40	76.218.834,33	879.254.745,91	