

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

LEONARDO DO CARMO GARCIA

Avaliação tecnológica e econômica do processo industrial de produção de etanol de permeado de soro de queijo por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735

São Carlos

2018

LEONARDO DO CARMO GARCIA

Avaliação tecnológica e econômica do processo industrial de produção de etanol de permeado de soro de queijo por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735

Monografia apresentada ao Curso de Engenharia Ambiental, da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro Ambiental.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Adriana Maluf Braga Ferreira

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Zaiat

São Carlos

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,  
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS  
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da  
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

Da do Carmo Garcia, Leonardo  
Avaliação tecnológica e econômica do processo industrial de produção de etanol de permeado de soro de queijo por *Kluyveromyces marxianus* / Leonardo do Carmo Garcia; orientadora Adriana Maluf Braga Ferreira; coorientador Marcelo Zaiat. São Carlos, 2018.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2018.

1. Etanol. 2. Soro de leite. 3. *Kluyveromyces marxianus*. 4. Biotecnologia. I. Título.

# FOLHA DE JULGAMENTO

---

Candidato(a): **Leonardo do Carmo Garcia**

Data da Defesa: 30/10/2018

Comissão Julgadora:

Resultado:

**Dra. Adriana Ferreira Maluf Braga (Orientador(a))**

Aprovado

**Prof. Dr. Marcelo Zaiat**

Aprovado

**Prof. Dr. Raphael Hermano Santos Diniz**

Aprovado



**Prof. Dr. Marcelo Zaiat**

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação

## DEDICATÓRIA

Eu dedico este trabalho à minha família, que se manifesta de diversas formas e que é fonte de toda a força e graça que experimento nesta existência. Em primeiro lugar, dedico este trabalho à família que escolhi para me gerar e me criar: este trabalho e toda a possibilidade de crescimento não seria possível sem todo o apoio que recebi de meu pai e de minha mãe. Que este trabalho honre o vosso esforço e dedicação.

Eu dedico este trabalho à família que fui aprendendo a cultivar, que inclui as amizades e os encontros que escolhi experimentar. Graças a eles sou capaz de desenvolver a sabedoria de discernir os frutos da terra que me servem e os que não. Graças a eles posso desfrutar da boa companhia que me permite o espaço para a criação.

Eu dedico este trabalho à família que escolhi e que escolherei para trilhar este Caminho ao meu lado. Que este trabalho seja apenas mais um passo na trilha em busca do aperfeiçoamento das virtudes. Que eu continue a ser inspirado pelo contato com os seres que buscam aquilo que busco. Que todos os seres sejam felizes e libertos.

## AGRADECIMENTOS

Ao *Dhamma* que todos os dias me encanta com a percepção da impermanência e da transformação. Ao Buda que é fonte de infinita inspiração e esperança de que o paraíso está diante de nós. A todos os mestres e gigantes que mantiveram vivos os conhecimentos que me permitem enxergar o mundo através de seus ombros.

À Sagrada Medicina que finalmente me ofereceu a oportunidade de ser honesto comigo mesmo e poder decidir a minha vida. A todos os seres que amparam a minha jornada, incluindo *devas* protetores e os espíritos dos animais, das plantas e dos seres muito pequenos! Ao Instituto Flor de Lótus que ao longo destes 4 anos me proporcionou oportunidades únicas de encontro com os meus desejos, as minhas sombras e a possibilidade da transmutação, que me forjou cada vez mais firme, forte e amoroso.

Ao meu pai por todo o suporte e zelo, que de fato é um anjo da guarda protetor. À minha mãe, por todo o suporte e as oportunidades de aprendizado sobre o perdão que vieram e que virão. Aos amigos que fiz e desfiz, em especial ao Sr. Habib pela parceria inusitada e muito bem-vinda! E também à dona Stefany, pelos anos de companheirismo e aprendizados sobre o amor.

À Universidade de São Paulo e ao povo paulistano, pela oportunidade concedida de poder aprender. Ao Dr Marcelo Zaiat, pela orientação interessada, por acolher as ideias de um aspirante a empresário e principalmente por me encantar, pela primeira vez de fato, com a arte da engenharia, nas aulas de cinética de reatores. À Dr<sup>a</sup> Adriana Maluf, pela orientação atenciosa e solícita.

Aos pesquisadores da Universidade de Viçosa, por todo o trabalho realizado com a levedura *Kluyveromyces marxianus* que forneceram o suporte e a inspiração para a realização deste trabalho. Em especial ao Dr Wendel Silveira, pela disponibilização das cepas de levedura e ao Dr Raphael Hermano Santos Diniz pela grande disponibilidade em me atender por email e compartilhar os dados de sua pesquisa.

A todos, o ofereço a minha gratidão.

*“There is no butterfly”*

*“There was no caterpillar”*

*Said the Moon to the Cocoon.*

(Autor desconhecido)

## RESUMO

GARCIA, L. C. **Avaliação tecnológica e econômica do processo industrial de produção de etanol de permeado de soro de queijo por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735**. 2018. 62f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

No Brasil, são produzidos cerca de 1,7 bilhões de quilos de queijo por ano e para cada quilograma de queijo, são gerados 9 quilos de soro de leite. O soro contém cerca de 5% de lactose, 1% de proteínas e valores de DBO entre 30 e 60 g/L, sendo necessárias opções de tratamento que aproveitem o seu potencial nutricional e energético. A levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735, isolada de laticínios de Minas Gerais, possui a notável habilidade de utilizar a lactose como única fonte de carbono e energia em meio hipóxico, a uma taxa de conversão de mais de 90% de lactose em etanol. Assim, considerando a utilização desta levedura para produzir etanol a partir do permeado de soro de leite, este trabalho procura estimar um valor de rendimento celular a partir de dados da literatura e avaliar a hipótese de que o rendimento celular varia com o pH, a temperatura, a concentração inicial de células e concentração inicial de lactose. Além disso, procura realizar uma análise econômica de ordem de grandeza de investimentos, custos, receitas e tempo de retorno do investimento de uma usina que utiliza esta tecnologia, comparando duas alternativas de pré-tratamento: ultrafiltração e evaporação e incluindo cenários diferentes de financiamento e condições de custo do soro. Verificou-se que a levedura cresce de modo associado, com valor do rendimento celular entre 0,008 e 0,009 g/g. Este resultado foi utilizado para dimensionar reatores para serem utilizados em uma escala industrial de 1000 toneladas de soro por dia. O pré-tratamento com ultrafiltração e osmose reversa se mostrou técnica e economicamente viável e o balanço de massa indicou concentração de etanol na saída dos reatores de 6% v/v e DQO do efluente da destilação de 23 g/L, que representa uma eficiência de remoção de 79% da DQO do permeado. A análise econômica indica viabilidade se considerar o beneficiamento e a venda do concentrado proteico, com tempo de retorno de 7,7 anos ou se considerar o cenário sem juros, com tempo de retorno entre 11 e 12 anos. Para os cenários que incluem apenas a receita do etanol, os resultados para o tempo de retorno ficaram acima de 30 anos, indicando baixa viabilidade econômica.

Palavras-chave: Etanol. Soro de leite. *Kluyveromyces marxianus*. Biotecnologia.

## ABSTRACT

**SOBRENOME, N. P. Technological and economic evaluation of the industrial process of ethanol production of cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735.** 2018. 62f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

In Brazil, about 1.7 billion kilos of cheese are produced per year and for each kilogram of cheese, 9 kilos of whey are generated. Whey contains about 5% lactose, 1% protein and BOD values between 30 and 60 g / L, requiring treatment options that take advantage of their nutritional and energy potential. The yeast *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735, isolated from Minas Gerais dairy products, has the remarkable ability to use lactose as the only source of carbon and energy in anaerobic environment at a conversion rate of more than 90% of lactose in ethanol. Considering the use of this yeast to produce ethanol from whey permeate, this work tries to estimate a cellular yield value from literature data and to evaluate the hypothesis that the cellular yield varies with pH, temperature, initial cell concentration and initial lactose concentration. In addition, it seeks to conduct an economic analysis of the order of magnitude of investments, costs, revenues and time of investment return of a plant using this technology, comparing two pretreatment alternatives: ultrafiltration and evaporation and including different financing scenarios and cost conditions. It has been found that the yeast grows in association with the cell yield value between 0.008 and 0.009 g/g. This result was used to size reactors to be used on an industrial scale of 1000 tons of serum per day. Pretreatment with ultrafiltration and reverse osmosis has proven to be technically and economically feasible and the mass balance indicated ethanol concentration at the exit of the reactors of 6% v/v and COD of the distillation effluent of 23 g/L, representing a removal efficiency of 79% of the COD of the permeate. The economic analysis indicates feasibility considering the beneficiation and the sale of protein concentrate, with a return time of 7.7 years or considering the scenario without interest, with a time of return between 11 and 12 years. For scenarios that include only ethanol revenue, the results for the time of return were over 30 years, indicating low economic viability.

Keywords: Ethanol. Whey. *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnology.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Processos possíveis de recuperação do soro .....	3
Figura 2 - Crescimento da produção de álcool no Brasil, de 1973 até o final de 2017 ..	7
Figura 3 - Uso de combustível nos veículos 0 km no Brasil entre 2003 e 2007 .....	7
Figura 4 - Representação esquemática da hidrólise da lactose em galactose e glucose através da enzima $\beta$ -galactosidase.....	12
Figura 5 - efeito do etanol sobre o crescimento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7735 em fermentações com permeado de soro.....	13
Figura 6 - Estimativa da precisão para diferentes níveis de estimativa de custos .....	23
Figura 7 - Fluxograma de processos, com as principais entradas e saídas.....	24
Figura 8 - Valores observados e previstos de $Y_{X/S}$ , obtido via MQ.....	31
Figura 9 - Informações sobre os resíduos da regressão de $Y_{X/S}$ via MQ. À esquerda está o gráfico dos resíduos em função dos valores previstos, cuja distribuição deve ser aleatória. À direita está o histograma dos resíduos. ....	32
Figura 10 - Consumo de substrato, produção de etanol e produção de biomassa por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7735 em regime de batelada e sob anaerobiose.....	33
Figura 11 - Agendamento ( <i>scheduling</i> ) dos reatores em batelada, por turno de 8h .....	35
Figura 12 – Tarifa média pela energia elétrica no Brasil por setor, dados de junho de 2018.....	43
Figura 13 – Curvas de custos e receitas totais acumuladas para o Cenário 1, calculadas de modo simplificado .....	45
Figura 14 - Curvas de custos e receitas potenciais totais acumuladas para o Cenário 1, incluindo as receitas de WPC, calculadas de modo simplificado.....	45
Figura 15 - Curvas de custos e receitas totais acumuladas para o Cenário 2, calculadas de modo simplificado .....	46
Figura 16 - Curvas de lucro líquido e valor da dívida para diferentes proporções de amortizações aplicadas à receita líquida, para o cenário 1, incluindo inflação anual de 4,5%	48
Figura 17 - Curvas de custos e receitas totais acumuladas para o Cenário 1 sem juros, calculadas de modo simplificado.....	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados de conversão de lactose em etanol e consumo de lactose para ensaios em batelada da fermentação de permeado de soro de leite realizados por Silveira, 2004. ....	11
Tabela 2 - Valores estimados das constantes cinéticas do crescimento de <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7735 em permeado de soro de queijo sob diferentes condições de oxigênio. ....	11
Tabela 3 - Parâmetros fermentativos obtidos por <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7735 em fermentações realizadas em meio YNB com lactose em 24 horas. ....	14
Tabela 4 - Composição padrão do soro de leite bovino.....	15
Tabela 5 - Fatores para estimativas de investimento para cada item de uma planta de processamento químico, baseada no custo do equipamento entregue.....	26
Tabela 6 - Tabela ANOVA sobre o melhor modelo quadrático obtido via DCC.....	30
Tabela 7 - Resultados para o rendimento celular obtido via MQ.....	30
Tabela 8 - Constantes e considerações utilizadas para o dimensionamento dos reatores e no restante do trabalho.....	33
Tabela 9 - Equipamentos com condições operacionais e fonte indicada.....	36
Tabela 10 - Lista de equipamentos com a potência estimada para o balanço de energia .....	38
Tabela 11 - Balanço de massa e energia completo .....	39
Tabela 12 - Balanço global de massa e energia, por dia.....	40
Tabela 13 - Lista de equipamentos com o preço <i>Free on Board</i> indicado em dólar comercial e o preço total incluindo frete, seguro e impostos, em reais, aplicado a taxa de câmbio de outubro de 2018 de 1USD para 3,77BRL.....	40
Tabela 14 - Valor de investimento de capital para uma usina de produção de etanol que processa 1000 ton/dia de soro, utilizando o pré-tratamento 1 .....	41
Tabela 15 - Valor de investimento de capital para uma usina de produção de etanol que processa 1000 ton/dia de soro, utilizando o pré-tratamento 2 .....	41
Tabela 16 – Estimativa de custos totais para cada cenário .....	43
Tabela 17- Estimativa das receitas totais, válida para ambos os cenários.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANTT – Agência Nacional de Transportes Terrestres

BRL – Real brasileiro

CEPEA – Centro de estudos Avançados em Economia Aplicada

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

CONFINS – Contribuição para Fins Sociais

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DCCR – Delimitação composta central rotacionado

DQO – Demanda Química de Oxigênio

ESALQ – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz

ICMS – Imposto sobre a Circulação de Mercadorias e Serviços

II – Imposto sobre Importação

IPI – Imposto sobre Produtos industrializados

MQ – Mínimos Quadrados

PIS – Programa de Integração Social

U - Coeficiente de transferência de calor ( $\text{Wm}^{-2}\text{K}^{-1}$ )

USD – Dólar americano comercial

USP – Universidade de São Paulo

WPC – *Whey Protein Concentrate*

YNB – *Yeast Nitrogen Base*

$Y_{X/S}$  – Rendimento celular

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	5
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1.	O cenário do álcool no Brasil.....	6
3.2.	Fermentação: o processo principal de uma usina de produção de etanol.....	8
3.3.	Sobre a levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> CCT 7735.....	9
3.4.	A importância do pré-tratamento.....	15
3.5.	As opções de pré-tratamento.....	17
3.5.1.	Ultrafiltração para promover a assepsia.....	17
3.5.2.	Concentração do soro e outros parâmetros.....	18
3.6.	Destilação.....	19
4.	METODOLOGIA.....	20
4.1.	Proposição do modelo para o rendimento celular.....	20
4.1.1.	Condições dos ensaios de fermentação.....	20
4.1.2.	Parâmetros e métodos de análise.....	20
4.1.3.	Design experimental e validação do modelo.....	21
4.2.	Avaliação econômica do processo industrial.....	23
4.2.1.	Definição da escala e do fluxograma de processos.....	24
4.2.2.	Metodologia de estimativa do investimento de capital.....	26
4.2.2.1.	Sobre os custos dos equipamentos.....	27
4.2.3.	Sobre as despesas e o faturamento.....	28
4.2.4.	Comparação com trabalhos realizados.....	29
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1.	Proposição do modelo para o rendimento celular.....	29
5.2.	Avaliação do processo industrial.....	32
5.2.1.	Cálculo do tempo de fermentação.....	32

5.2.2.	Definição dos equipamentos. ....	34
5.2.3.	Balço de massa e energia.....	37
5.2.4.	Investimento de capital.....	40
5.2.5.	Custos e receitas .....	42
5.2.6.	Viabilidade econômica.....	44
5.2.7.	Considerações finais e recomendações para estudos futuros.....	49
6.	CONCLUSÃO.....	51
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
8.	APÊNDICE .....	59



## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, cerca de 11 bilhões de litros de leite são transformados em queijo por ano, o que corresponde a 46% de toda a produção fiscalizada de leite do país em 2015, segunda dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo. Sobre a produção informal, que é estimada em 10 bilhões de litros de leite por ano, estima-se que 6 bilhões de litros são destinados para a produção de queijo (ZOCCAL, 2016).

Sabe-se que 10 quilogramas de leite produzem um quilograma de queijo, resultando em 9 litros de soro de leite, o que constitui um verdadeiro desafio para as fábricas de queijo, cujas alternativas de destinação são a produção de soro de leite em pó a um alto custo, incorporação em parte da alimentação animal, incorporação em bebidas lácteas ou, em último caso, adição do soro ao efluente da fábrica. O soro de leite contém cerca de 5% de lactose, 1% proteínas e altos valores de DBO, que podem atingir de 30 g/L até 60 g/L e que faz do soro de leite uma das principais fontes poluidoras do setor (BRANDÃO, 1994).

A alternativa mais econômica ao descarte é a utilização do soro de leite na alimentação animal, como previsto na Instrução Normativa 8/2004 do Ministério da Agricultura, visto que rebanhos bovinos e ovinos podem alcançar bons níveis de crescimento e produção leiteira consumindo soro fresco até 30% do da matéria seca da dieta (DAVID, 2006). No entanto, esta é uma alternativa viável apenas para as fábricas de queijo que estejam próximas de rebanhos, que é a realidade da maior parte dos pequenos produtores, mas não dos grandes laticínios, que em geral compram o leite de uma rede de produtores e, portanto, estão suficientemente distanciadas dos rebanhos de tal modo que o uso do soro para alimentação animal é inviável.

Deste modo, aos grandes laticínios a alternativa de uso do soro é a secagem via atomizadores, ou *spray dryers*, para a produção de soro em pó para a indústria alimentícia (WESTGAARD, 2001), uma vez que cada secador custa em torno de duzentos mil dólares para uma capacidade evaporativa de 60 a 150 litros de água por hora (Dry Master, 2017) e demanda pré-tratamentos para a cristalização da lactose, para evitar que o soro em pó absorva água do ambiente, devido ao fato de que a lactose possui dois isômeros, sendo a beta lactose altamente higroscópica (PEREIRA et al, 2010). A absorção da água pelo soro em pó cria dificuldades no armazenamento, conservação e qualidade do produto.

Avanços na tecnologia de filtração por membranas desde o final dos anos 70 tornou possível separar as proteínas do soro, que mais recentemente se tornaram ingredientes populares em diversos alimentos, em especial os suplementos alimentares. No entanto, produzir as proteínas não resolve o problema do permeado, que concentra a maior parte da

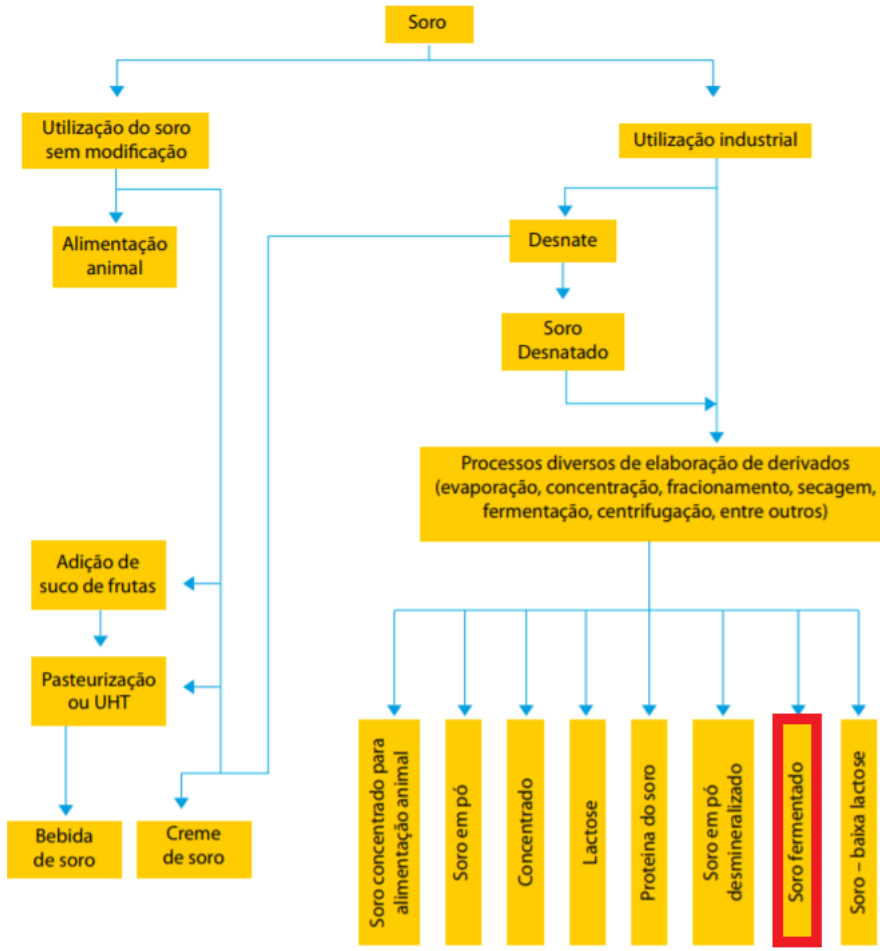
lactose e sais minerais. Secar o permeado é uma opção, mas a lactose tem usos limitados na indústria, devido à palatabilidade e baixa digestibilidade, visto que 70% da população mundial apresenta algum nível de intolerância à lactose (MICINSKI et al., 2013).

Outros destinos possíveis para o soro de leite estão indicados na Figura 1, extraída do Guia Técnico Ambiental de Produtos Láteos da CETESB, com destaque para a fermentação do soro. A primeira indústria a produzir etanol para combustível a partir do soro de leite iniciou as suas operações em 1985 pela empresa *Carbery Milk Products*, na Irlanda e desde então algumas plantas adotaram esta estratégia nos Estados Unidos no final dos anos 80, localizadas em *Corona*, Califórnia e *Melrose*, *Minnesota* em que juntas produzem 8 milhões de galões de etanol por ano, na Alemanha com a empresa *Müllermilch* e Nova Zelândia, em 2007 (DAMASCENO, 2007). O fato de que duas plantas de produção de etanol a partir do soro estejam em operação por mais de 20 anos indica que esta tecnologia é aplicável em grande escala e pode ser economicamente viável dentro do contexto brasileiro (LING, 2008).

Atualmente já há diversos estudos que buscam viabilizar uma tecnologia para utilizar o soro de leite como matéria-prima para a produção de etanol no Brasil, via fermentação, contribuindo com uma matriz energética sustentável. Alguns desses estudos são: o de Florêncio et al (2013), que obtiveram etanol a partir do permeado de soro de queijo “tipo coalho” hidrolisado, utilizando a *Saccharomyces cerevisiae* e cujo melhor resultado obtido foi a taxa de conversão de 76,14% com a adição de 100 g/L de sacarose; Colognesi (2015) produz etanol em escala piloto, novamente a partir da *Saccharomyces cerevisiae*, com adição de nutrientes e acompanhado da hidrólise do soro; Silveira (2006) e Gabardo (2011) utilizam diferentes configurações de reatores contínuos e imobilizados com as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus* para a produção de etanol a partir do soro de queijo.

As leveduras do gênero *Kluyveromyces* possuem a notável habilidade de utilizar a lactose como única fonte de carbono e energia e as *Kluyveromyces marxianus* são reconhecidas como próprias para o consumo humano, assim como a amplamente utilizada *Sacharomise cerevisiae*. Elas possuem um metabolismo respiro-fermentativo e em hipoxia, as leveduras da espécie *Kluyveromyces marxianus* vem sendo estudadas devido a altas taxas de produção de etanol a partir da fermentação da lactose, crescendo tanto em soro *in natura* quanto em permeado de soro, que é o soro removido de suas proteínas, sem a necessidade de adicionar quaisquer nutrientes adicionais.

Figura 1 - Processos possíveis de recuperação do soro



Fonte: MAGANHA (2008).

A espécie *Kluyveromyces marxianus* já é amplamente estudada, mas apesar do consenso da comunidade científica sobre o grande potencial desta levedura em ser aplicada em contextos industriais, há poucos estudos que visam otimizar e validar os processos (DINIZ, 2013). A planta de produção de etanol da empresa irlandesa *Carbery Milk Products Ltd*, por exemplo, trabalha com cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e produz diariamente 214 toneladas de queijo, 9 toneladas de manteiga, 211 toneladas de proteína concentrada de soro e 33,5 toneladas de etanol 95% m/m (GUEDRI, 2016).

As principais etapas para a produção de etanol de soro são o pré-tratamento, a fermentação e a destilação. No pré-tratamento, o soro deve ser esterilizado e concentrado, em geral por meio de ultrafiltração e osmose reversa, cujo retido é basicamente proteína concentrada. A etapa de fermentação acontece em reatores hipóxicos de batelada em um tempo entre 12 e 36 horas e na destilação o etanol é separado do mosto, para posteriormente ser concentrado em suas diversas graduações e vendido. Os reatores fermentativos são

dimensionados em função da cultura selecionada, que dentre os parâmetros estão as constantes cinéticas para as reações de interesse e o rendimento celular  $Y_{X/S}$ , que é uma constante para o caso de crescimento associado, como costuma ser o das leveduras.

No entanto, levedura de *K. marxianus* CCT 7735 cultivada em permeado de soro de leite apresentou grandes variações no seu rendimento celular, variando em diferentes concentrações de lactose, pH e temperatura, visto que nos estudos já realizados o rendimento celular variou de 0,31 até 0,08 g g<sup>-1</sup> em aerobiose e 0,08 até 0,035 g g<sup>-1</sup> em anaerobiose (SILVEIRA, 2004) e de 0,24 até 0,07 g mM<sup>-1</sup> aerobiose e 0,31 até 0,03 g mM<sup>-1</sup> em hipoxia (DINIZ, 2009).

Portanto, uma etapa na direção de viabilizar a produção de etanol a partir de soro de leite via a promissora cepa de *K. Marxianus* CCT 7735 é a determinação de um valor confiável para o rendimento celular, que estabelece a quantidade de levedura que é produzida no reator a cada batelada e dita a proporção do concentrado de leveduras entre o que é descartado e o que volta ao reator na forma de fermento tratado. Além disso, é necessário estabelecer quais são os processos adequados de logística do soro, pré-tratamento, fermentação e destilação para que esta tecnologia possa ser implementada ao contexto brasileiro.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho de graduação possui dois objetivos principais. O primeiro é avaliar a hipótese de que a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 cresce de maneira não associada. Neste caso, o rendimento celular não é uma constante e serão investigados a influência da concentração inicial de lactose e de células, pH e temperatura inicial.

O segundo objetivo é avaliar o processo industrial para a produção de etanol a partir do permeado de soro, estabelecendo um panorama geral sobre a tecnologia, incluindo uma análise de viabilidade econômica e propor operações unitárias que melhor desempenhem a higienização e a concentração do soro que são pontos considerados críticos para a viabilidade econômica do processo. Assim, esta pesquisa buscará:

- Formular um modelo matemático que descreva o rendimento celular  $Y_{x/S}$  em função da concentração inicial de lactose e de células, pH e temperatura inicial.
- Avaliar a melhor forma de pré-tratamento do soro de leite visando a produção de etanol em escala industrial.
- Avaliar a viabilidade econômica da tecnologia no Brasil, incluindo estimativas de ordem de grandeza de investimento, custos operacionais e tempo de retorno do investimento.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. O cenário do álcool no Brasil

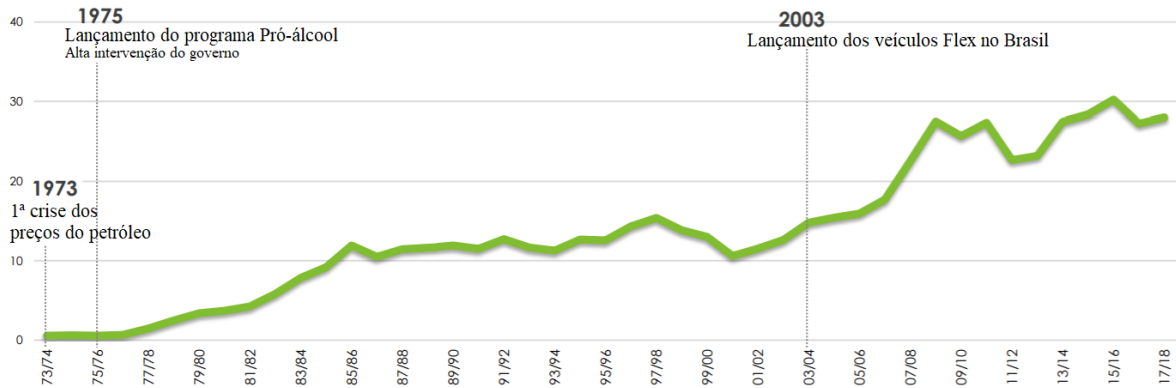
O Brasil conta com a matriz energética mais renovável do mundo industrializado, com um percentual de 45,3% em 2016, bem acima dos 14,1% de matriz energética renovável mundial. Os derivados da cana, bagaço e etanol, correspondem a 17,5% de toda a matriz energética brasileira, seguido, das renováveis, da energia hidráulica (12,6%), lenha e carvão vegetal (8,0%) e outras renováveis (5,4%) (EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA, 2016). Esse cenário evidencia a atual importância do etanol para o Brasil, que é o segundo consumidor e produtor de etanol do mundo, que em 2015 produziu 37 bilhões de litros (BRASIL, 2017).

A produção e consumo do álcool no Brasil cresce desde 1975, como mostra a Figura 2 com o implemento do programa Pró-Álcool, devido à grande intervenção governamental. A partir de março de 2003, o Brasil passa a produzir em série motores *flex-fuel*, que se difundiram pelos consumidores, como mostra a Figura 3, de modo que em 2010 mais de 92% dos veículos novos no Brasil já eram vendidos com este tipo de motor, o que possibilita ao consumidor fazer a escolha do combustível a partir do preço (KOHLHEPP, 2010).

Cabe ressaltar que para o caso do etanol produzido a partir da cana de açúcar, apesar de ser considerado uma fonte de energia renovável, possui vários impactos negativos associados ao plantio da cana e destinação da vinhaça gerada pelas usinas. O tipo de plantio que ocorre nos latifúndios brasileiros em geral não respeita os ciclos bioquímicos do solo, causando a saturação de seus nutrientes, a contaminação por agrotóxicos e demandando grandes quantidades de fertilizantes químicos, que esgotam as reservas de fósforo mineral disponível (ALTIERI, 2012). Diferente é o caso do etanol produzido do soro, pois o soro é um subproduto da produção de queijo que seria produzido independentemente de qualquer intenção de aproveitá-lo, de modo que todos os impactos provenientes da cadeia de produção do soro devem ser atribuídos à produção de queijo, não de etanol, salvo aqueles provenientes diretamente da usina.

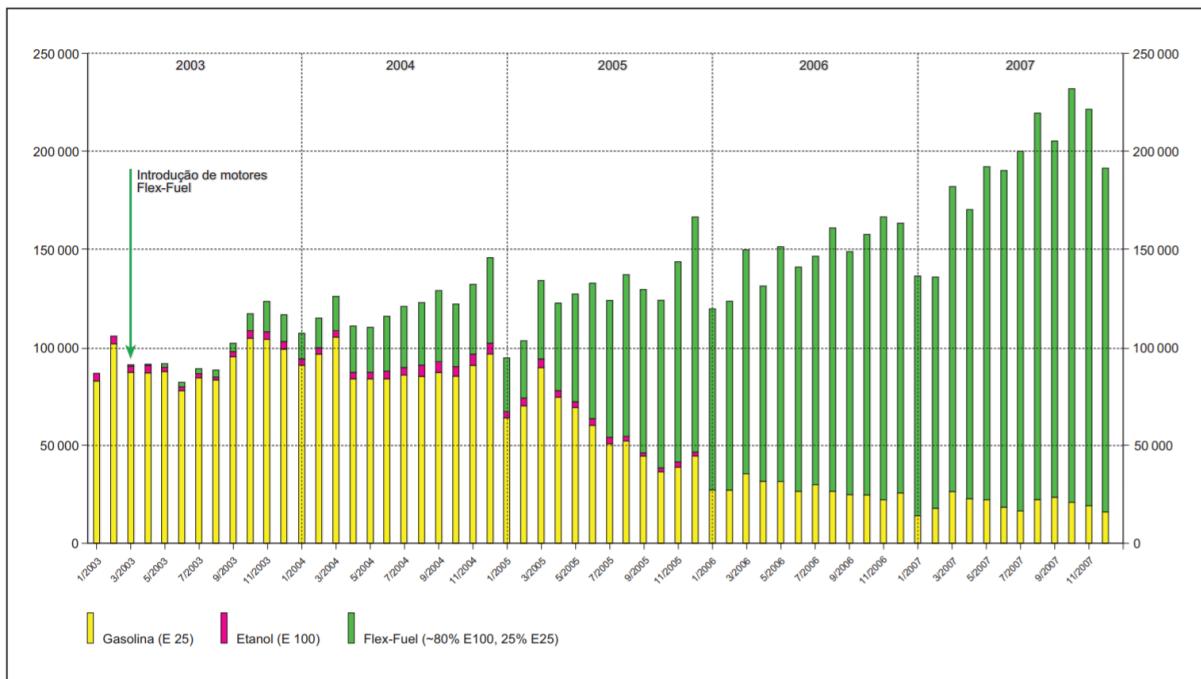
Figura 2 - Crescimento da produção de álcool no Brasil, de 1973 até o final de 2017

**Produção de álcool no Brasil (bilhões de litros)**



Fonte: PHILIPS, 2018

Figura 3 - Uso de combustível nos veículos novos no Brasil entre 2003 e 2007



Fonte: OLIVÉRIO, 2008 apud KOHLHEPP, 2010

### 3.2. Fermentação: o processo principal de uma usina de produção de etanol

A fermentação alcoólica é a biotransformação de um substrato em etanol, por meio de micro-organismo. Nas usinas o substrato é carboidrato – glicose, sacarose ou lactose – e os microrganismos em sua maioria são leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, para as usinas de álcool de cana de açúcar. O processo ocorre sob hipoxia em reatores de batelada na forma de dornas, cujos volumes não ultrapassam 300 m<sup>3</sup>, mas há plantas que trabalham com reatores contínuos. Dos fatores que afetam a fermentação, os principais são: presença de álcool etílico, tempo de fermentação, temperatura, contaminação, pH, concentração de açúcar, concentração e tipo de levedura (LIMA e MARCONDES, 2002).

Pelo fato de a fermentação ocorrer via cultura pura de leveduras, uma das principais perdas no processo está relacionada à contaminação por bactérias e leveduras selvagens, afetando diretamente a produção de álcool (PASCHOALINI; ALCARDE, 2011). Para controlar esse problema, é imprescindível que o pré-tratamento do substrato garanta uma boa sanitização. Um pré-tratamento bem feito não garante a assepsia do substrato, pois toda a operação de manuseio até as dornas de fermentação oferece meios para a contaminação. Assim, nas usinas de etanol de cana de açúcar, a desinfecção é feita com ácido sulfúrico e com diferentes tipos de desinfetantes químicos, além de antibióticos (LIMA; MARCONDES, 2002).

Vários estudos sobre a produção de etanol via soro de leite utilizaram cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, por esta ser a levedura mais empregada comercialmente e, por conseguinte, possuir mais informação e pesquisa a seu respeito. Um desses estudos é o de Bach *et al* (2014) que realizou três ensaios em batelada de fermentações de soro de leite hidrolizado, sendo dois deles com glicose adicionada, para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A conversão de substrato em etanol oscilou entre 39% e 46% e a redução da DQO no final do processo foi de 75%. Florêncio *et al* (2015) apresenta resultados preliminares utilizando *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em soro de leite desproteínizado a partir do método ácido-térmico adicionado de sacarose, apresentando uma conversão de 76,1% de substrato em etanol.

Um estudo feito em escala piloto foi conduzido por Colognesi (2015), em reatores batelada, utilizando *Saccharomyces fragilis* IZ 275 e permeado de soro como substrato da fermentação, em que a autora indica a possibilidade do uso da levedura *S. fragilis* em escala industrial, atingindo uma concentração de etanol de 5,66% v/v. Ela testou a adição de diferentes nutrientes e concluiu que os nutrientes presentes no permeado são suficientes para a

fermentação da lactose via *Saccharomyces fragilis*. No entanto, os melhores resultados ocorreram com a hidrólise prévia do permeado, que é economicamente inviável, visto que o custo para hidrolisar 1 L de soro a partir da enzima  $\beta$ -galactosidase era de R\$1,25 em 2015.

Silveira (2006) compara o crescimento da levedura recombinante *Saccharomyces cerevisiae* BLR 014 com *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 com lactose como fonte de carbono em batelada, em biorreator contínuo de mistura completa (CSTR) e em biorreator tubular de fluxo pistonado (PFR) com células imobilizadas. A levedura recombinante foi construída com a expressão dos genes que codificam a  $\beta$ -galactosidase (LAC4) e lactose-permease (LAC12). Em todas as condições, *Kluyveromyces marxianus* obteve maior consumo de lactose e maior taxa de conversão de lactose para etanol do que *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que em batelada a máxima conversão foi de 58% para *Kluyveromyces marxianus* livres a 30°C e de 30% para *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas a 37°C. Nos reatores PFR foi utilizado o soro de queijo como substrato, as leveduras *Kluyveromyces marxianus* consumiram 95% da lactose em 24h, com conversão de 32% e as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* consumiram apenas 33% da lactose.

Outro estudo que compara espécies de leveduras é o de Gonçalves (2014), que utiliza uma mistura em diferentes proporções de soro de leite com extrato de alfarroba como substrato para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis* combinadas, atingindo conversões de substrato em etanol de até 90%. No entanto, ficou comprovado que a mistura das leveduras causa perda de viabilidade celular da levedura *Kluyveromyces lactis* durante todo o processo fermentativo até a morte celular.

### 3.3. Sobre a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735

De todos os trabalhos consultados sobre tecnologia de fermentação de soro de leite, os que apresentaram os melhores resultados de consumo e conversão da lactose foram os que utilizaram a espécie de levedura *Kluyveromyces marxianus*, como observado pelos seguintes estudos que compararam esta espécie com outras: Silveira (2006) em relação à *Saccharomyces cerevisiae*; Assunção, 2014 em relação a *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*; Diniz (2009) em relação à *Kluyveromyces lactis* em altas concentrações de lactose e Burlani (2014) em relação à *Kluyveromyces lactis*.

Linhagens da espécie *Kluyveromyces marxianus* têm sido isoladas em ambientes diversos, o que evidencia alta diversidade metabólica e substancial grau de polimorfismo intra-específico e em decorrência disso, diferentes aplicações da biotecnologia têm sido estudadas neste microrganismo (DINIZ, 2009). Além da produção de etanol via fermentação

do soro de leite, esta levedura tem sido estudada por sua capacidade de produção de proteínas heterólogas, para produção de enzimas de interesse industrial (FONSECA et al, 2008; DINIZ, 2013); na área de biorremediação a levedura possui a capacidade de assimilar grande quantidade de íons de cobre (AKSU e DÖNMEZ, 2000); sendo reconhecida como segura para o consumo humano, ela pode ser utilizada para produzir compostos aromáticos (ETSCHMANN et al, 2002 apud FONSECA et al, 2008); também já foi proposto o uso *Kluyveromyces marxianus* para a produção de extratos de levedura e na produção de oligonucleotídeos usados como realçador de sabor, oligossacarídeos usados como prebióticos e oligopeptídeos usados como estimulantes do sistema imunológico (BELEM; LEE, 1998).

Silveira (2004) isolou a linhagem de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 com a máxima atividade de  $\beta$ -galactosidase de cinco laticínios da Zona da Mata do Estado de Minas Gerais e realizou ensaios em batelada em aerobiose, microaerobiose e anaerobiose para avaliar o crescimento em lactose e a produção de etanol. Seus resultados estão expostos na Tabela 1, para fermentação em permeado de soro de queijo em determinados tempos de fermentação e aponta excelentes taxas de conversão de lactose em etanol, se aproximando da conversão teórica em vários ensaios, incluindo alguns em que o consumo da lactose foi próximo a 100% para as concentrações iniciais de lactose entre 46 e 130 g/L. A Tabela 2 exhibe os parâmetros cinéticos de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 estimados a partir do modelo de Andrews (1968), expresso na seguinte equação:

$$\mu = \frac{\mu_{max}}{1 + K_s/S + S/K_i}; \text{Equação (1)}$$

Em que:  $\mu$  = taxa específica de crescimento ( $\text{tempo}^{-1}$ );  $\mu_{max}$  = taxa máxima de crescimento na ausência de inibição ( $\text{tempo}^{-1}$ ); S = concentração do substrato limitante (massa/volume);  $K_s$  = constante de saturação (massa/volume);  $K_i$  = constante de inibição (massa/volume).

Tabela 1 - Resultados de conversão de lactose em etanol e consumo de lactose para ensaios em batelada da fermentação de permeado de soro de leite realizados por Silveira, 2004.

Microaerobiose				Anaerobiose			
S <sub>0</sub> (g/L)	L->E* (%)	Tempo (h)	C. L (%)	S <sub>0</sub> (g/L)	L->E* (%)	Tempo (h)	C. L (%)
11,1	65,8	72,0	98,6	9,3	78,8	12,0	48,9
26,1	75,6	12,0	58,3	22,6	84,2	24,0	88,5
46,0	94,8	72,0	100,0	48,2	96,7	48,0	98,6
69,7	96,1	72,0	100,0	65,6	98,5	14,0	37,4
85,8	99,4	72,0	100,0	87,4	94,8	14,0	28,7
127,0	98,5	72,0	100,0	133,0	96,6	72,0	99,5
176,0	98,5	48,0	66,2	171,0	94,8	72,0	91,4
244,0	99,2	72,0	43,1	237,0	98,5	96,0	50,6

S<sub>0</sub>: concentração inicial de lactose (g/L)  
 \* Taxa de conversão de lactose em etanol, com base no máximo teórico  
 C.L: Consumo de lactose (%)

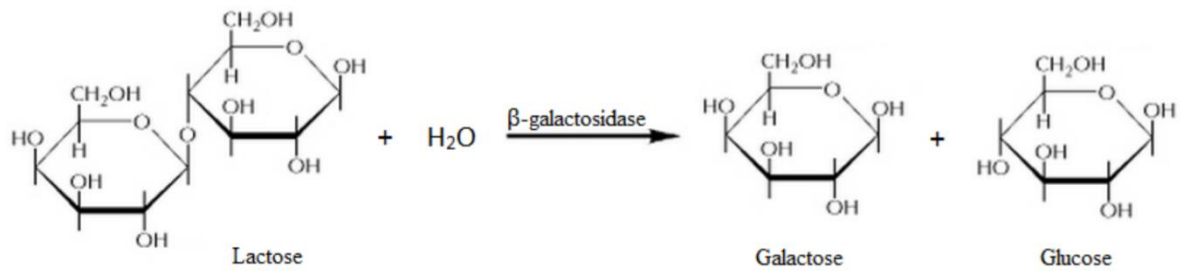
Tabela 2 - Valores estimados das constantes cinéticas do crescimento de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 em permeado de soro de queijo sob diferentes condições de oxigênio.

Nível de Oxigênio	$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	K <sub>s</sub> (g·L <sup>-1</sup> )	K <sub>i</sub> (g·L <sup>-1</sup> )
Aerobiose	0,452	0,682	2629,4
Microaerobiose	0,383	0,841	490,2
Anaerobiose	0,292	1,517	529,4

Fonte: SILVEIRA, 2004

Para metabolizar os dissacarídeos, como a lactose, é necessário a hidrólise a monômeros. A espécie *K. marxianus* transporta a lactose por meio de uma permease codificada pelo gene LAC12 e após o transporte a lactose é hidrolisada pela enzima  $\beta$ -galactosidase, induzida por lactose, resultando em glicose e galactose (Figura 4), de modo que a glicose é metabolizada pela via glicolítica e a galactose é catabolizada pela via de Leloir até glicose 6-fosfato, que é um composto da via glicolítica. (TEXEIRA, 2005 apud DINIZ, 2009).

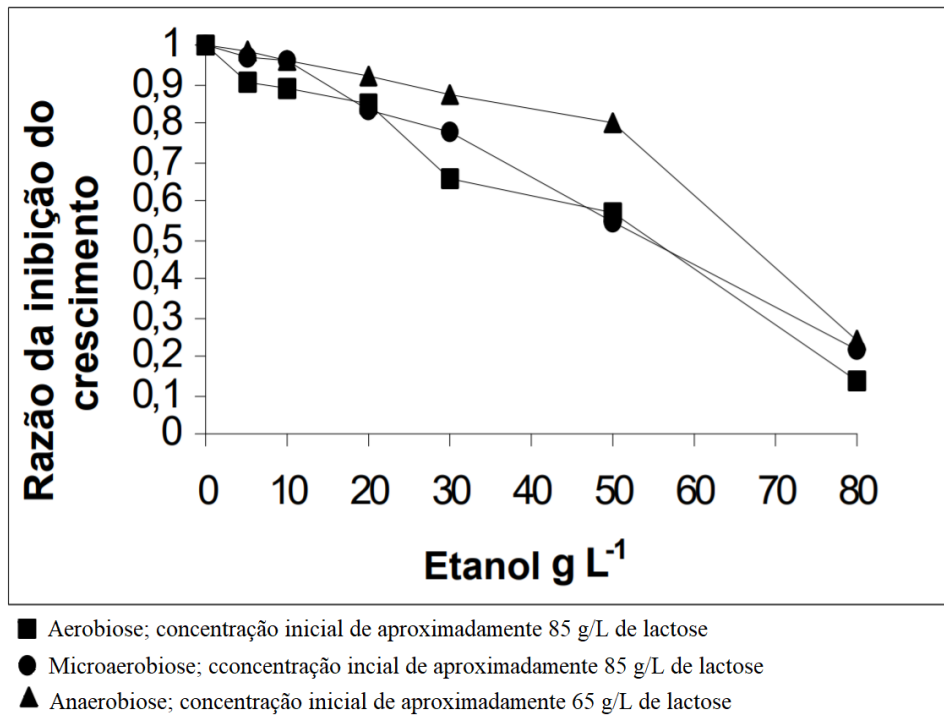
Figura 4 - Representação esquemática da hidrólise da lactose em galactose e glucose através da enzima  $\beta$ -galactosidase.



Fonte: GOLÇALVES, 2014

O gênero *Kluyveromyces spp* também apresenta outras características que são desejáveis para processos industriais, tais como alta taxa de crescimento, capacidade de metabolizar diferentes carboidratos, como pentoses, hexoses e dissacarídeos, é classificada como termotolerante por ter a capacidade de se multiplicar em até 48°C (BURLANI, 2014). Leveduras capazes de fermentar em altas temperaturas podem economizar energia no resfriamento quando o pré-tratamento do substrato envolva aquecimento, tais como o *spray dryer* e a secagem térmica, de tal modo que pode economizar até US\$30.000,00 por ano para uma usina que produz 30.000 m<sup>3</sup> de etanol por ano, além de diminuir as chances de contaminação, devido a seletividade da termotolerância, que também se traduz em redução de custos (ABDEL-BANAT et al, 2010). Além disso, *K. marxianus* CCT 7735 apresenta uma boa resistência à inibição por etanol em anaerobiose, como mostra a Figura 5, em que o efeito de inibição se limita a menos de 20% para uma concentração de etanol de até 50 g/L (SILVEIRA, 2004).

Figura 5 - efeito do etanol sobre o crescimento de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 em fermentações com permeado de soro.



Fonte: SILVEIRA (2004)

Diniz (2009) ressalta que o comportamento fermentativo de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 é sensível à concentração de substrato. A Tabela 3 apresenta os resultados de uma sequência de fermentações realizadas por Diniz em meio *Yeast Nitrogen Base* (YNB) com lactose como fonte de carbono, indicando a ausência de produção de etanol em condições aeróbias e a alta variabilidade na taxa de conversão de lactose em etanol e da produtividade volumétrica em função da concentração inicial de lactose (DINIZ, 2009). Além disso, observa-se alta variância no rendimento celular  $Y_{X/L}$ , que em geral é constante, mas parece ser inversamente proporcional à concentração de lactose, tanto em hipoxia quanto em aerobiose.

Tabela 3 - Parâmetros fermentativos obtidos por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 em fermentações realizadas em meio YNB com lactose em 24 horas.

<i>K. marxianus</i> UFV-3 hipoxia						<i>K. marxianus</i> UFV-3 aerobiose					
So <sup>a</sup>	Y <sub>X/L</sub> <sup>b</sup>	Y <sub>E/L</sub> <sup>c</sup>	Y <sub>E/L</sub> % <sup>d</sup>	Y <sub>E/X</sub> <sup>e</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>f</sup>	So <sup>a</sup>	Y <sub>X/L</sub> <sup>b</sup>	Y <sub>E/L</sub> <sup>c</sup>	Y <sub>E/L</sub> % <sup>d</sup>	Y <sub>E/X</sub> <sup>e</sup>	Q <sub>E</sub> <sup>f</sup>
0,25	0,31	0,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00
0,5	0,21	0,00	0,00	0,00	0,00	0,5	0,19	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,15	1,49	37,23	0,45	9,68	1	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0,10	0,85	21,29	0,38	8,19	2	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0,06	2,17	54,32	1,58	34,39	4	0,17	0,00	0,00	0,00	0,00
64	0,03	3,44	85,92	4,53	98,22	64	0,07	1,23	30,64	17,84	3,00

<sup>a</sup> Concentração inicial de lactose em mM

<sup>b</sup> Rendimento máximo de biomassa por substrato em g mM<sup>-1</sup>

<sup>c</sup> Rendimento máximo de etanol por substrato em mM mM<sup>-1</sup>

<sup>d</sup> Consumo de lactose em%

<sup>e</sup> Rendimento máximo de etanol em relação à massa celular mM g<sup>-1</sup>

<sup>f</sup> Produtividade volumétrica máxima mM h<sup>-1</sup>

Fonte: DINIZ, 2009

O estudo de *K. marxianus* CCT 7735 prossegue com a publicação em 2013 da tese de doutorado de Diniz, a qual tinha como um dos objetivos determinar as condições ótimas para o rendimento de lactose em etanol de temperatura, pH, concentração de lactose e concentração inicial de massa celular seca. Os intervalos para os quais é se atinge uma taxa de conversão superior a 90% são: temperatura entre 33,3 °C e 38,5 °C, com ótimo em 37°C; pH entre 4,7 e 5,7; concentração inicial de lactose entre 50 g/L e 108 g/L; concentração inicial de massa celular seca entre 1,21 g/L e 1,67 g/L. Além disso, foi validado uma equação para prever a taxa de conversão de uma fermentação de permeado de soro por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735, que está expressa a seguir:

$$RF_{L \rightarrow E}(\text{permeado}) = -15,059 + 0,506T + 2,06pH - 0,02L + 1,924C - 0,007T^2 - 0,198pH^2 - 0,655C^2 \quad \text{Equação (2)}$$

Em que: RF = taxa de conversão de lactose em etanol; T = temperatura em °C; L = concentração inicial de lactose em g/L; C = concentração inicial de biomassa, em g/L (DINIZ, 2013).

### 3.4. A importância do pré-tratamento

Considerando as condições ótimas de fermentação expressas por Diniz (2013), cabe a discussão de quais operações unitárias são necessárias para viabilizar a fermentação com as características desejadas. A Tabela 4 apresenta a composição padrão do soro de leite integral, expresso por dois autores, de modo que Antunes (2003) diferencia a composição do soro doce e ácido, que dependem do tipo de coagulação do queijo, se por enzimas ou acidez, sendo que, de acordo com a Portaria nº 52 de 2010 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o soro doce é definido como tendo pH superior a 6 e o soro ácido como tendo pH inferior a 6 (BRASIL, 2010).

Tabela 4 - Composição padrão do soro de leite bovino

Componente	Concentração (massa/volume) (%)				
	Smithers et al 1996	Antunes, 2003		Jelen, 2010	
	Soro integral	Soro doce	Soro ácido	Soro doce	Soro ácido
Lactose	4,90	4,60	4,20	4,6 - 5,2	4,4 - 4,6
proteínas	0,70	0,80	0,75	0,6 - 1	0,6 - 0,8
Gordura	0,05	0,50	0,04	-	-
Cinzas	0,70	0,50	0,80	-	-
Minerais	-	-	-	0,25 - 0,47	0,43 - 0,72

Deste modo, verifica-se que o soro ácido naturalmente apresenta um pH dentro da faixa ótima descoberta por Diniz (2013), entre 4,7 e 5,7, para a fermentação do soro de leite por *K. marxianus* CCT 7735. Em relação ao soro doce, este se encontra naturalmente acima da faixa ótima de pH. No entanto, é inerente ao processo de desinfecção a diminuição do pH do “leite de leveduras” com ácido sulfúrico, que é o centrifugado rico em leveduras que é retornado às dornas de fermentação (LIMA; MARCONDES, 2002).

Conforme observado por Diniz (2009), *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 é sensível à concentração inicial de lactose e, portanto, esta é uma variável importante para a fermentação. A Tabela 4 mostra que a concentração de lactose no soro de leite está entre 42 e 52 g/L, com pouca variabilidade entre os autores, o que evidencia pouca variabilidade na prática. Observa-se, portanto, que o soro de leite possui uma concentração de lactose inferior à faixa ótima para a fermentação estipulada por Diniz (2013) o que expressa a necessidade de algum processo de concentração do soro de leite no pré-tratamento. Além de cumprir essa exigência, a concentração do substrato favorece a cinética de reação, de acordo com a Equação 1 e, portanto, diminui o tempo de fermentação e também aumenta a concentração de etanol no fim da fermentação, o que favorece a velocidade e rendimento da destilação (SCHETTERT, 2012).

O soro também apresenta quantidades consideráveis de diversos nutrientes como o sódio, magnésio, cálcio, potássio e fósforo, além de ser rico em vitaminas hidrossolúveis como o ácido pantotênico, a tiamina, a riboflavina a piridoxina e o ácido ascórbico (PINTO, 2010), o que corrobora a conclusão de Colognesi (2015) de que o permeado de soro contém nutrientes suficientes para o crescimento de *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*.

Outro aspecto fundamental sobre o pré-tratamento é a necessidade de desinfecção do soro de leite para minimizar os riscos de contaminação das dornas de fermentação, visto que trabalham utilizando uma cultura pura de leveduras, que é uma condição instável na natureza. Em análises feitas com soro pasteurizado e armazenado, verificou-se baixa estabilidade microbiológica devido à presença de bactérias aeróbias mesófilas (DESCONSI, 2014). Caso ocorra contaminação em alguma dorna, o procedimento adequado é reiniciar o processo de fermentação, o que pode gerar um prejuízo de até US\$50.000 para uma dorna de 260 m<sup>3</sup> (ABDEL-BANAT, 2009).

São várias operações unitárias que compõem um processo industrial maduro, que envolve logística, armazenamento e as operações de produção. No entanto, este trabalho se limitará a analisar as operações intrínsecas à tecnologia de fermentação do soro de leite para a produção de etanol, que são àquelas que garantem a **sanitização** e a **concentração** do soro, mantendo as condições ideais de pH e temperatura.

### 3.5. As opções de pré-tratamento

#### 3.5.1. Ultrafiltração para promover a assepsia

Os métodos de desinfecção de efluentes líquidos são tratamentos térmicos, químicos, com ultravioleta e filtração. De todos esses, o mais empregado na indústria de laticínios para a produção de concentrados de proteínas do soro de leite (WPC) é a ultrafiltração, tendo em vista as principais vantagens desse método em relação aos outros que são: menor custo, a alta velocidade, a ausência de desnaturação das proteínas, sistema compacto, de rápida instalação e de fácil automatização e a obtenção de um concentrado de proteínas livre de sais que possui um alto valor agregado (KOSIKOWSKI, 1979 apud SILVEIRA, 2004; SANCHO, 2014).

A ultrafiltração é definida como um sistema de filtração sob pressão que separa duas soluções através de uma membrana que atua como barreira seletiva, cuja massa molar de corte está entre 1 e 100 kDa (NATURALTEC, 2018). Deste modo, é um método eficaz para a desinfecção e que produz um permeado com o mínimo de conteúdo bacteriano, visto os resultados de desinfecção para as membranas com diâmetros de corte entre 10 e 100 kDalton foram de 100% de remoção das bactérias, tanto para águas com pouca, média e alta atividade microbiana (SANCHO, 2014).

O processo de isolamento de proteínas do soro de leite via ultrafiltração é considerado novo, mas já é amplamente utilizado pela indústria em contraposição ao método de secagem térmico, que consome grande quantidade de energia, produz grande quantidade de cinzas e desnatura as proteínas do soro, degradando as suas grandes propriedades nutricionais e funcionais (BALDASSO; BARROS; TESSARO, 2011). As indústrias nos EUA que já produzem etanol a partir de soro de leite incluem a ultrafiltração em seu pré-tratamento (ANTUNES, 2003) e estudos recomendam a ultrafiltração no pré-tratamento (SISO, 1996; LING, 2008; FORTUNATO, 2012).

Alguns detalhes de operação de um sistema de ultrafiltração são relatados por Serpa, 2012, como a formação de uma camada gel que alteram significativamente a seletividade da membrana, que para membranas de *cut off* de 10 kDa, por exemplo, pode significar a retenção da lactose. Outros fatores de resistência que podem diminuir o fluxo de permeado são a polarização de concentração, bloqueio dos poros e o efeito *fouling*, resultado de interações físico-químicas entre a membrana e os componentes do soro que reduz a permeabilidade da membrana de maneira irreversível (FORTUNATO, 2012).

### 3.5.2. Concentração do soro e outros parâmetros

Considerando que a ultrafiltração processa todo o volume de soro de leite e que, se bem operada, não retém a lactose, temos que a concentração de lactose no permeado é semelhante à concentração do soro de leite *in natura*. Assim, precisa-se de uma segunda operação unitária para promover a concentração do soro, visto que esta é uma exigência para alcançar rendimentos elevados com a levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 (DINIZ, 2013). Para realizar esta tarefa, serão consideradas duas hipóteses: **evaporação** e **osmose reversa**.

Dentre os métodos térmicos, o mais comum na indústria de laticínio são os atomizadores, ou *spray dryers*. No entanto, como o objetivo é obter uma solução concentrada a partir de uma solução diluída, e não um produto seco, a alternativa mais econômica é o emprego de evaporadores, pois demandam menos investimento e consomem menos energia (JLSSPRAY, 2018). Os evaporadores são constituídos por um trocador de calor capaz de levar a solução à fervura e por um dispositivo para separar o vapor do líquido em ebulição (ROGÉRIO, 2013).

Os evaporadores são projetados para otimizar a transferência de calor direcionado para a ebulição do fluido – no caso, o permeado de soro. Os sistemas de evaporação podem ser compostos de apenas um evaporador se este fornecer a solução na concentração desejada ou serem compostos por evaporadores ligados em série, de modo que a energia do vapor de um evaporador seja aproveitada pelos evaporadores subsequentes (CAMPESE; PASSINI, 2015). Além disso, em tese é possível utilizar a energia dos evaporadores para manter a temperatura de fermentação, que deve estar em torno de 37° C para as condições otimizadas (DINIZ, 2013).

A osmose reversa, por sua vez, é a opção mais prática dado a existência prévia de um processo de ultrafiltração, que é um requerimento para o bom funcionamento de um sistema de osmose reversa. Um sistema de osmose reversa é caracterizado pelo uso de membranas semipermeáveis com diâmetro menor que 0,001 µm e capacidade de operar com pressões compreendidas entre 1500 kPa a 15000 kPa e têm sido investigados para diversas aplicações nas empresas de laticínios (DESCONSI, 2014). A sua utilização se justifica por eliminar parte da água do permeado, que é extraída com alto grau de pureza, podendo ser reutilizada pela indústria para os fins mais nobres, enquanto que o retido pela membrana é o permeado de soro concentrado, cujo conteúdo permanece inalterado.

### 3.6. Destilação

A destilação é a operação unitária mais adequada para extrair o etanol depois de um processo de fermentação. Ela explora a diferença de composição entre uma mistura líquida que, para o caso de uma usina, se dá pela diferença do ponto de ebulição da água (100°C a 1 atm) e do álcool (78,4°C a 1 atm). É necessário elevar a temperatura da mistura até uma temperatura intermediária entre os pontos de ebulição, que está em função da concentração de etanol do meio. Este processo demanda grande quantidade de energia e, portanto, incide diretamente no custo do produto final (FORTUNATO, 2012).

Os sistemas de destilação possuem três etapas, em que a primeira é a destilação do caldo da fermentação, a segunda é realizada em uma coluna de retificação que proporciona uma série de destilações simples e condensações, de modo que a cada condensação, o líquido é cada vez mais rico nas substâncias mais voláteis. A etapa de retificação nas usinas produz o etanol hidratado, que apresenta um teor de água de 5% em volume. A produção do etanol anidro, que é isento de água, é feita na terceira etapa em que ocorre o fracionamento de misturas azeotrópicas (BAPTISTA, 2017). No Brasil, o etanol hidratado é utilizado em veículos equipados com motores movidos exclusivamente a etanol ou *flex fuel* e o etanol anidro pode ser misturado à gasolina, de modo que a gasolina vendida no Brasil contém cerca de 20% de etanol anidro (UNICA, 2010).

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Proposição do modelo para o rendimento celular

Os dados para a proposição do modelo foram extraídos do trabalho de Diniz (2013), com alguns dados fornecidos pelo próprio pesquisador e, portanto, não foram produzidos por este trabalho. Eles foram obtidos através de ensaios de batelada e planejados utilizando um modelo de Delineamento Composto Central Rotacionado (DCCR), cujo propósito foi otimizar o rendimento da produção de etanol da levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 em função do pH, da temperatura, da concentração inicial de lactose e da concentração inicial de células.

#### 4.1.1. Condições dos ensaios de fermentação

As cepas foram isoladas de uma fábrica de laticínios de Minas Gerais e mantidas conservadas a uma temperatura de -80°C em um meio contendo 50% de glicerol e foram ativadas em meio YNB acrescido de lactose a 37°C após 24 horas. (DINIZ, 2013)

O substrato foi preparado a partir de permeado de soro de queijo em pó reconstituído com água destilada e esterilizado por filtração com diâmetro dos poros de 22 µm. As fermentações ocorreram em tubos de 50 mL com 30 mL de *headspace* preenchido com gás nitrogênio (99,9% v/v), selados com silicone para prevenir entrada de oxigênio. Os tubos ficaram em banho-maria por 144 horas e a cada 24 horas foram retiradas amostras para determinar o consumo de substrato, crescimento celular e produção de etanol. (DINIZ, 2013)

#### 4.1.2. Parâmetros e métodos de análise

As variáveis independentes (fatores) monitoradas foram o pH, que variou de 4,5 a 6,5 e medido no início e no fim da fermentação; a temperatura que variou de 30°C a 45°C; a concentração inicial de lactose que variou de 50 a 250 g/L; e a concentração inicial de massa celular seca, que variou de 1 g/L a 2 g/L e foi medida a cada amostra via densidade óptica, sob absorvância de 600 nm, de modo que cada unidade de absorvância a 600 nm é equivalente a 0,507 g/L de massa celular seca de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735. A concentração de lactose foi medida a cada amostra via cromatografia líquida de alta performance (HPLC). (DINIZ, 2013)

A variável dependente analisada foi o rendimento celular, definido pela razão entre a produção celular e o substrato consumido, em um determinado intervalo de tempo, que no caso foi medido a cada dia.

#### 4.1.3. Design experimental e validação do modelo

Os experimentos foram planejados sob planejamento fatorial do tipo Delineamento Composto Central Rotacionado (DCCR)  $2^k + 2k + 5$ , em que  $k$  é o número de fatores, que é igual a quatro, totalizando 29 experimentos, com ponto central realizado em quintuplicata. (DINIZ, 2013). O planejamento fatorial permite observar o efeito de todos os fatores e suas combinações em uma determinada variável de resposta, ao passo que minimiza o número de pontos experimentais e assim, o erro humano associado. (CALADO; MONTGOMERY, 2003)

A escolha do planejamento deve estar em função do objetivo da pesquisa, como ressaltam Neto, Scarminio e Bruns (2010). Assim, como o objetivo é estimar um modelo quadrático para o rendimento celular em um espaço amostral específico que corresponde ao rendimento ótimo de produção de etanol, descoberto por Diniz (2013), o DCCR é um planejamento apropriado, conforme indicam Wang e Wan (2008, p. 240-241), que realizaram uma revisão sobre os métodos de design experimental empregados para estudar a produção de hidrogênio via fermentação. O modelo empírico utilizado para determinar o rendimento celular foi baseado em Montgomery (2017), expresso na equação 3.

$$Y_{X/S} = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii}X_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii}X_i^2 + \sum_{i=3}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta_{ij}X_iX_j \text{ (Equação 3)}$$

Onde  $\beta_0$  é constante;  $X_i$  são os fatores em suas respectivas unidades, que são pH, temperatura (°C), concentração inicial de lactose (g/L) e concentração inicial de massa celular seca (g/L);  $\beta_{ii}$  são os coeficientes obtidos via regressão quadrática, relacionado aos termos lineares e quadráticos;  $\beta_{ij}$  são os coeficientes das interações dos fatores.

A partir da avaliação dos efeitos dos fatores, concluiu-se que o rendimento não era dependente dos mesmos. Assim, foi utilizado outro método para estimar o valor de  $Y_{X/S}$  enquanto constante. Para tanto, foi utilizado a ferramenta *Nonlinear Estimation* do *software* Statistica 10, que estima parâmetros de uma dada expressão minimizando os quadrados dos resíduos pelo método MQ de Levenberg-Marquardt (Levenberg, 1944).

A expressão que foi considerada para a aplicação deste método foi a própria definição de rendimento celular, dado pela razão da produção de massa celular pelo consumo de substrato, de acordo com a equação 4, em que S é a concentração de lactose em g/L, inicial e final, X é a concentração de células em g/L, inicial e final e  $Y_{X/S}$  é o parâmetro a ser estimado pelo método MQ.

$$\frac{dX}{dS} = -Y_{X/S} \Rightarrow X_f = -Y_{X/S}(S_0 - S_f) + X_0 \text{ (Equação 4)}$$

Os seguintes critérios estatísticos foram avaliados:

**Coeficiente de correlação ( $R^2$ ):** Este coeficiente é frequentemente empregado na estatística para mensurar a adequação do modelo. Ele expressa a porcentagem da variância explicada pela regressão, de tal modo que quanto mais próximo de 1, mais adequado é o modelo. (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010)

**Coeficiente de correlação ajustado ( $R^2_{adj}$ ):** O uso deste parâmetro corrige o fato de que o  $R^2$  sempre aumenta com o acréscimo de variáveis, de tal modo que se  $R^2$  e  $R^2_{adj}$  diferem muito entre si, é um indicativo de que o modelo inclui mais variáveis do que o necessário. (MONTGOMERY, 2017)

**Análise dos resíduos via histograma e gráfico:** para se certificar que não há erros sistemáticos, os resíduos devem apresentar distribuição aleatória e simétrica em relação aos sinais. (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010, p. 119-120)

Coeficientes avaliados de acordo com o teste P, admitindo um intervalo de confiança de 95%, de modo que para  $p < 0,05$  admite-se a hipótese de que há relação entre a resposta e o respectivo fator.

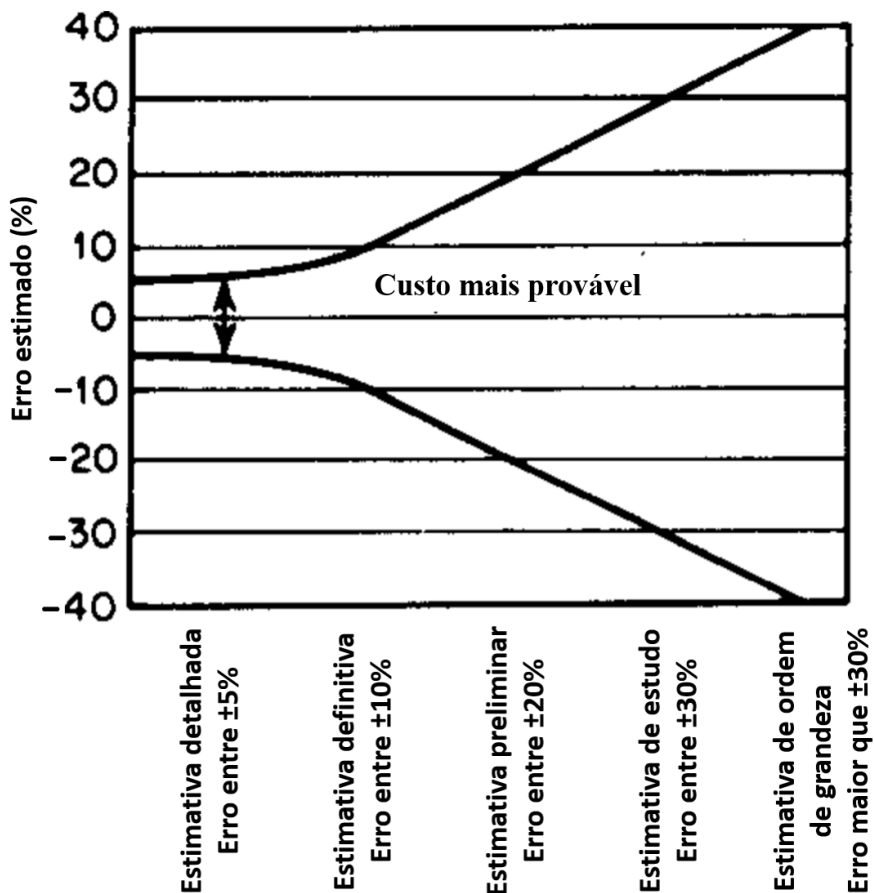
**Lack of fit:** este componente consiste na soma dos quadrados dos fatores que foram excluídos do modelo. Se for significativo ( $p < 0,05$ ), indica que provavelmente há fatores ou interações que precisam ser incluídas no modelo. (MONTGOMERY, 2017)

#### 4.2. Avaliação econômica do processo industrial

Com o objetivo de verificar a viabilidade econômica da tecnologia, este estudo utilizará a metodologia proposta por Peters e Timmerhaus (1991) em seu livro sobre o planejamento de plantas industriais para engenheiros químicos. Serão alvo de estimativa o investimento de capital fixo, que inclui a compra e instalação dos equipamentos e custos de construção; as despesas com matéria-prima, energia, água, salários, taxas e outras despesas; e o faturamento potencial proveniente da produção e comercialização de etanol.

Importante ressaltar que as estimativas de investimento de capital em fase de planejamento variam de acordo com o nível de informação disponível e o estágio de desenvolvimento do projeto. Este estudo se encontra em uma fase de pré-planejamento, partindo apenas de um fluxograma básico e de uma escala de produção definida e, portanto, pretende realizar uma estimativa de estudo, baseada no conhecimento dos custos dos equipamentos iniciais e que possui uma precisão estimada de mais ou menos 30%. A Figura 6 apresenta uma estimativa de precisão para diferentes níveis da informação.

Figura 6 - Precisão para diferentes níveis de estimativa de custos



Fonte: PETERS; TIMMERHAUS, 1991

#### 4.2.1. Definição da escala e do fluxograma de processos

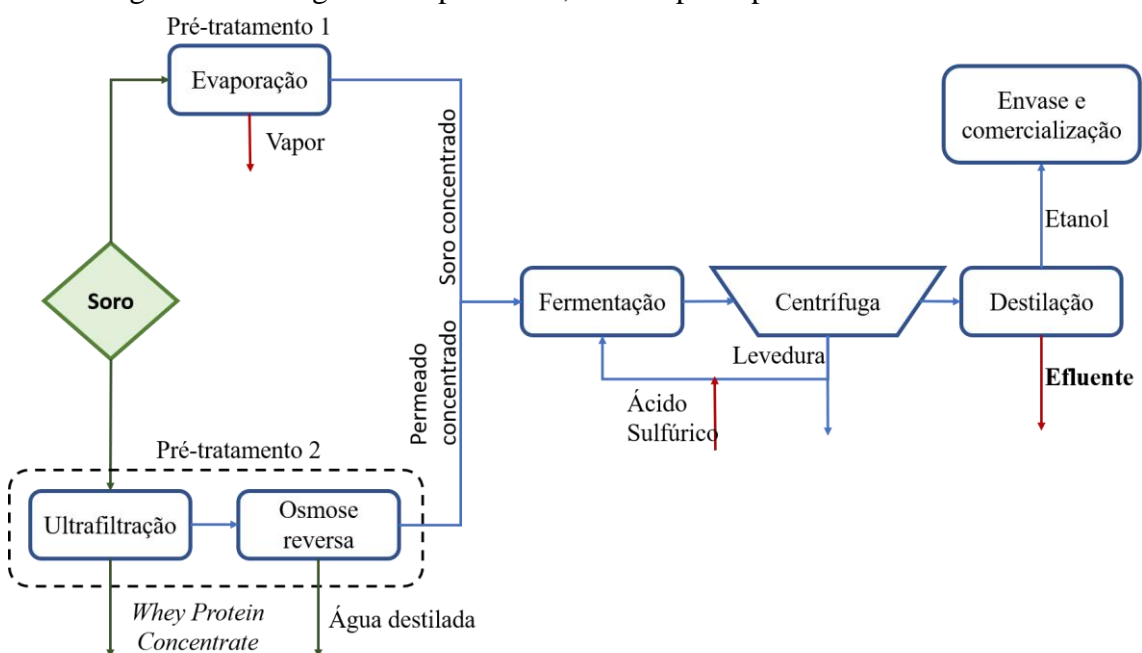
Para definir a escala do estudo, procurou-se exemplos de empresas que produzem ou utilizem grandes quantidades de soro, cuja escala pudesse viabilizar a tecnologia. Assim, tomou-se como referência a empresa *Sooro*, que foi a primeira empresa brasileira a fabricar WPC e que hoje possui uma capacidade instalada de produção de 1500 toneladas por mês de sólidos de soro de leite em pó, o que equivale a um consumo diário de quase 3000 toneladas de soro de leite por dia (SOORO, 2016). No entanto, considerando que a planta não funciona o tempo todo na capacidade máxima e para facilitar a comparação com trabalhos já realizados, será adotado uma escala de 1000 ton/dia de soro de leite ácido, que foi a mesma utilizada por Fortunato, 2012 em seu trabalho que também realiza uma análise econômica desta tecnologia.

O processo industrial de conversão de lactose em etanol é dividido em três etapas principais, que são o pré-tratamento, a fermentação e a destilação. Este estudo comparou dois cenários para o pré-tratamento, que são:

- Cenário 1: Concentração e esterilização do soro via evaporadores.
- Cenário 2: Esterilização do soro via ultrafiltração e concentração via sistema de osmose reversa.

A Figura 7 mostra o fluxograma de processos que serve de base para o estudo. Em cada processo, foram identificados os principais equipamentos e máquinas necessários que serviram de base para a estimativa do investimento e das despesas.

Figura 7 - Fluxograma de processos, com as principais entradas e saídas.



Fonte: Elaboração própria

A metodologia de análise consistirá em estimar o investimento necessário para a planta da usina, as despesas e a receita proveniente da venda do etanol e do WPC no cenário 2, resultando em um determinado tempo de retorno do capital investido. As seguintes considerações foram feitas:

- Uso diário de 1000 toneladas de soro ácido, com custo admitido igual a zero.
- Ano de análise para os dados econômicos: 2018.
- Fermentação em batelada, realizada a partir de levedura *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735, sob anaerobiose e condições otimizadas definidas por Diniz, 2013, que são: pH 5,0; temperatura de 37 graus Celsius; Concentração inicial de lactose de 100 g/L; Concentração inicial de células de 1,68 g/L.
- Como a levedura não é comercializada, seu custo é difícil de estimar. Como há expressiva produção de biomassa na fermentação, considera-se que este não é um custo significativo e será considerado zero.
- Modelo cinético de Andrews, 1968.
- Características iniciais do soro de acordo com a Tabela 4, sendo de 44 g/L de lactose e 0,7 g/L de proteínas no soro bruto.
- Álcool anidro destilado contendo 95% de etanol e 5% de água, em volume.

Além disso, uma grande simplificação foi feita ao considerar a usina funcionando 24h por dia, em três turnos de 8 horas, apesar da fermentação ocorrer em batelada. No entanto, foi proposto um agendamento hipotético que permite essa simplificação, de modo que em cada turno um reator é preenchido e outro é esvaziado com uma vazão constante.

#### 4.2.2. Metodologia de estimativa do investimento de capital

Um design industrial aceitável deve ser capaz de gerar lucro, que essencialmente é igual à toda receita menos todas os custos, que são fixos ou despesas. O investimento de capital necessário para qualquer processo industrial consiste em um capital fixo direto para a aquisição de máquinas e construção de estruturas, um capital fixo indireto com os custos de projeto, engenharia e administração e um “capital de trabalho” que deve estar disponível para pagar salários, manter o estoque de matéria-prima e insumos em dia e estar preparado para lidar com outras despesas que demandem pagamento imediato (PETERS; TIMMERHAUS, 1991).

A metodologia utilizada para estimar os investimentos necessários para a implantação de uma usina de produção de álcool é frequentemente usada para obter estimativas de ordem de magnitude e reconhece que o custo de uma planta de indústria química pode ser obtido multiplicando o custo do equipamento básico por um determinado fator, que varia dependendo do tipo de processo utilizado, vide Tabela 5, que apresenta aproximações grosseiras destes fatores (PETER; TIMEERHAUS, 1991).

Tabela 5 - Fatores para estimativas de investimento para cada item de uma planta de processamento químico, baseada no custo do equipamento entregue.

Porcentagem do custo de maquinário e equipamentos para uma planta que processa:			
	Sólido	Sólido-Fluido	Fluido
Custos diretos			
Maquinário de processo e equipamentos entregue	100	100	100
Instalação de maquinário e equipamentos	45	39	47
Instrumentos de controle	9	13	18
Encanamento (instalado)	16	31	66
Parte elétrica (instalada)	10	10	11
Construções (incluindo os serviços)	25	29	18
Infraestrutura de serviços (instalada)	40	55	70
Infraestrutura de acesso	13	10	10
Terreno (se necessário adquirir)	6	6	6
Custos indiretos			
Engenharia e supervisão	33	32	33
Despesas de construção	39	34	41
Seguro e despesas contratuais	51	54	63
Capital de trabalho (estimado 15% do investimento)	68	74	86
Investimento total	455	487	<b>569</b>

Fonte: PETERS e TIMMERHAUS, 1991

A base deste método, portanto, é elencar todos os equipamentos a serem utilizados nos processos, incluindo as bombas e compressores, fazer um orçamento do preço de cada um deles no mercado e incluir todos os custos de transporte, taxas, impostos e outros serviços

relacionados à entrega dos equipamentos. Este custo será a base para estimar os outros elementos da construção de uma usina.

A infraestrutura de serviço consiste nas instalações de apoio aos processos como resfriadores, sistemas de tratamento de água e efluentes, sistemas de segurança e proteção a incêndios; nas instalações de apoio administrativo, como restaurantes e cafeteria, unidade de primeiros socorros, armários, laboratórios, etc. A infraestrutura de acesso consiste no gradeamento, construção de estradas, vias de acesso estacionamentos e áreas recreativas.

Dos custos indiretos, as despesas de construção incluem as estruturas temporárias como andaimes, escritórios, armazéns e estradas; o aluguel de equipamentos como guindastes; segurança, atendimento médico, análises de terreno, etc. O seguro e despesas contratuais também inclui uma parcela de capital para compensar eventos imprevisíveis, como enchentes, variação de preços, erros de projeto, etc (PETERS; TIMMERHAUS, 1991).

#### 4.2.2.1. Sobre os custos dos equipamentos

Para calcular o preço dos principais equipamentos necessários em sítio, algumas estratégias foram utilizadas. Todos os custos foram encontrados em dólar ou em euro e, portanto, admitiu-se que eles seriam importados, com a exceção dos reatores cuja melhor opção foi de um fornecedor brasileiro, com preço em reais já acrescido de imposto. Assim o preço FOB (*Free on Board*) de cada um deles foi acrescido de um valor para o frete e seguro, que não costuma ultrapassar em 1% do valor da mercadoria e acrescido dos impostos de importação brasileiros, que são o Imposto de Importação (II), os Impostos de Produto Industrializado (IPI), o Programa de Integração Social (PIS) e a Contribuição para Fins Sociais (CONFINS) que são federais e o Imposto sobre Circulação de Mercadorias e Serviços (ICMS), que é estadual.

As alíquotas dos impostos foram majoradas para simplificar a análise. Assim, para pessoas jurídicas, a alíquota do II varia de 0 a 35% do valor FOB mais frete e seguro, do IPI, segundo Giraldelli (2018), costuma variar entre 0 e 20%, do PIS é de 2,1%, do CONFINS é de 9,65% e do ICMS para o Estado de São Paulo é de 18% (SÃO PAULO, 2017). Além disso, a cotação do euro em outubro de 2018 era de 1 euro (€) para 1,15 USD e de 1 USD para 3,77BRL.

Os equipamentos do pré-tratamento foram selecionados de catálogos de fabricantes chineses, cujas capacidades máximas atendiam as demandas da escala definida. As bombas foram escolhidas do catálogo da Grundfos ® de 2018. A centrífuga para separação das leveduras e os equipamentos da destilação foram extraídos do trabalho de Fortunato, 2012,

visto que a escala de trabalho é a mesma. Os dados econômicos e as condições de operação de Fortunato foram extraídos do simulador *SuperPro Designer*® e são de 2012. Assim, para atualizar os preços para o ano base de 2018, foi considerado uma inflação média anual de 4% ao ano.

O custo dos reatores foi estimado via uma técnica de escala empírica denominada a regra do fator de seis décimos, que estabelece uma relação de custo entre equipamentos semelhantes, mas de capacidades diferentes, dada pela equação 5, em que o coeficiente  $n$  costuma ser 0,6, mas varia com diferentes tipos de equipamentos. Para tanques e reatores, o valor deste coeficiente é 0,57 (PETERS; TIMMERHAUS, 1991).

$$CustoA = CustoB * \left( \frac{CapacidadeA}{CapacidadeB} \right)^n \quad \text{Equação 5}$$

#### 4.2.3. Sobre as despesas e o faturamento

O custo total de um produto pode ser dividido em custo de produção e custo administrativo. Os custos de produção incluem os custos diretos como matéria-prima em sítio, salários dos operadores e supervisores, a manutenção dos equipamentos, água, energia e outros insumos; os custos fixos que se mantém praticamente constantes em relação à produção, como a depreciação, juros, impostos e aluguéis; e os custos relacionados às atividades de suporte à produção, como serviços hospitalares, de alimentação, segurança, gastos laboratoriais, pagamento de encargos trabalhistas, férias e pensões e outros (PETERS; TIMMERHAUS, 1991).

O custo da principal matéria-prima desta tecnologia admitido foi zero, considerando o estudo de Lencastre (2012) em que realizou um mapeamento da produção de soro de leite no estado do Rio de Janeiro e verificou que os laticínios do estado doam o soro de queijo. No entanto, como a escala adotada é grande se julgou necessário admitir que pelo menos uma parte do soro processado seria doado de laticínios distantes, de até 100 km de distância. Assim, o custo da matéria-prima se resumiu ao custo de transporte dela até a usina.

Foi realizado um balanço de massa para todo o processo, levando em consideração o equacionamento cinético da reação de fermentação segundo modelo de Andrews (1968). O balanço de massa junto com a lista de equipamentos forneceu as principais informações sobre o custo total do produto e, principalmente, sobre as receitas, que se resumem à venda do etanol para as distribuidoras de combustível e à receita potencial da venda de WPC para a indústria alimentícia e das leveduras secas para a alimentação animal.

Dos custos de produção, foram estimados o custo com energia a partir da potência dos equipamentos listados, com ácido sulfúrico através do balanço de massa e dos juros levando

em consideração uma taxa anual na faixa de 6% de 10% ao ano aplicada a todo o capital inicial, que é uma adoção relativamente superestimada comparando à taxa básica de juros brasileira que se encontra em 6,5% ao ano (MARTELLO, 2018).

Os outros custos, incluindo os custos administrativos, foram estimados de acordo com a média dos custos para a indústria de etanol de cana-de-açúcar, devido às semelhanças de processo.

#### 4.2.4. Comparação com trabalhos realizados

Com os resultados para o investimento de capital, dos custos e das receitas, foi possível estimar o tempo de retorno do investimento e comparar com o trabalho de Fortunato (2012) que elaborou diversos *layouts* de plantas de produção de bioetanol empregando as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces marxianus*, em processo em batelada com recuperação de células e processo contínuo, através do simulador Superpro Designer ® e realizou uma análise preliminar de custo, semelhante à estimativa de ordem de grandeza que este trabalho se propõe a realizar.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Proposição do modelo para o rendimento celular

O apêndice 1 contém os dados que são resultado do DCCR para estimar um modelo quadrático para o rendimento celular, que incluem todos os resultados para 48h de fermentação. De acordo com a equação 3, são muitos parâmetros que devem ser estimados e nem todos eles são significativos, sendo parte da investigação descobrir quais os são, incluindo e excluindo coeficientes da estimativa. Assim, foram produzidos muitos modelos extremamente insatisfatórios.

Dentre todos, foi selecionado o melhor modelo, cuja tabela ANOVA está expressa na Tabela 6. Para a microbiologia, costuma-se considerar modelos representativos aqueles cujo coeficiente de correlação  $R^2$  é próximo a 80%. No entanto, o melhor modelo apresentou  $R^2=56\%$  e ajustado igual a 41,3%, e os únicos parâmetros que se mostraram significativos a 95% foram a temperatura e a constante, embora o modelo que considerava apenas a temperatura se mostrou ainda menos representativo.

O apêndice 1 também mostra outros resultados estatísticos em relação ao modelo, incluindo o gráfico de valores observados e previstos, e todos indicam que o modelo é insatisfatório, tendo em vista que a análise de outros parâmetros citados, como *Lack of fit* e histograma dos resíduos não são suficientes para viabilizar o modelo. Diante deste cenário,

ficou concluído que a hipótese inicial que justificou este estudo é falsa, ou seja: O rendimento celular de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 em soro de leite não é função de temperatura, pH, concentração inicial de substrato ou concentração inicial de células.

Tabela 6 - Tabela ANOVA sobre o melhor modelo quadrático obtido via DCC

ANOVA; Var. $Y_{X/S}$ ; 4 factors; 1 Block; 29 runs					
$R^2 = 55,997\%$		$R^2_{adj} = 41,329\%$ MS pure error = 0,0000167			
Fatores	SS	df	MS	F	p
Temperatura	0,000171	1	0,000171	10,26109	0,032798
[lactose]	0,000009	1	0,000009	0,541506	0,50263
[lactose] <sup>2</sup>	0,000007	1	0,000007	0,390572	0,565881
[X <sub>0</sub> ]	0,000027	1	0,000027	1,592618	0,275523
pH*[X <sub>0</sub> ]	0,000054	1	0,000054	3,227924	0,146811
Temper.*[lac]	0,000037	1	0,000037	2,239009	0,208904
Temper.*[X <sub>0</sub> ]	0,000045	1	0,000045	2,687046	0,17651
Lack of Fit	0,000208	17	0,000012	0,732647	0,712594
Pure Error	0,000067	4	0,000017		
Total SS	0,000624	28			

Fonte: Elaboração própria a partir dos dados de Diniz, 2013.

A partir deste ponto, foi mais sensato admitir que a levedura cresce de modo associado, como é comum às leveduras e que, portanto, o rendimento celular é uma constante. Para tal, utilizou-se a definição de rendimento celular como expressão para aplicar o método MQ para estimar o valor de  $Y_{X/S}$ . Para cada 24h, havia um conjunto de dados sobre as concentrações iniciais e finais de lactose e massa celular. Levando em consideração que os períodos em que ocorrem a maior produtividade volumétrica de etanol está entre 48h e 72h, com maior número de pontos em 48h (DINIZ, 2013), admite-se que este seria um tempo razoável para operações industriais. Sendo assim, os dados até 48 e 72h foram considerados para a regressão deste modelo via MQ, eliminados os *outliers* e os resultados estão expressos na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados para o rendimento celular obtido via MQ

	$Y_{X/S}$	$R^2$	p (95%)	Lim. inferior (95%)	Lim. superior (95%)
Até 48h	0,00931	80,41%	<0,00000	0,00847	0,01014
Até 72h	0,00792	66,10%	<0,00000	0,00731	0,00853

Fonte: Elaboração própria a partir dos dados de Diniz, 2013.

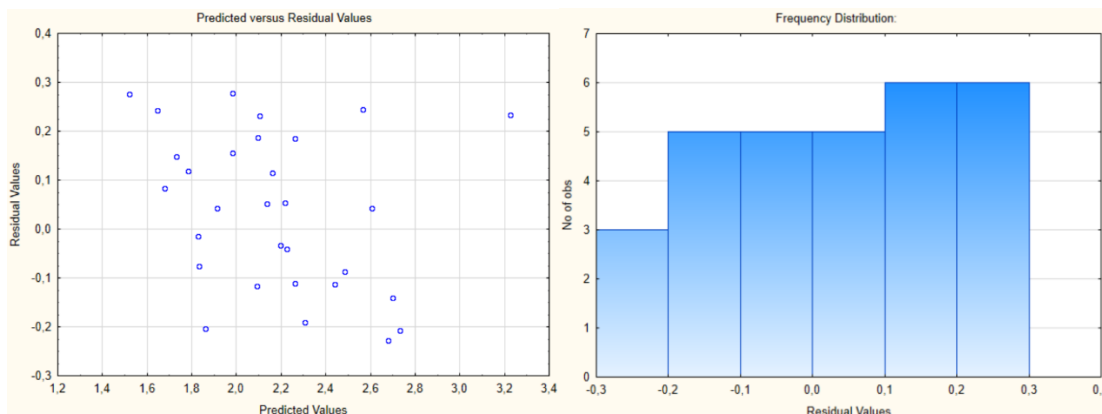
Nota-se que o valor do rendimento celular diminui com o aumento do tempo de fermentação e isso se explica porque o rendimento celular tal como definido, engloba a síntese e a morte celular, de modo que para o crescimento associado de leveduras o rendimento da síntese é constante e a morte celular aumenta com o tempo de fermentação,

diminuindo o número de células ativas. Isso também fez com que o ajuste do coeficiente para o tempo de até 72 h fosse inferior.

Os trabalhos realizados de Silveira, 2004 e Diniz, 2009 relataram o rendimento celular máximo da levedura entre 0,03 e 0,06, mas nenhum apresentou valores recomendados para o dimensionamento. Assim, considerando que o consumo de lactose para rendimento de mais de 90% de conversão em etanol ficou entre 49% e 95% para 48 horas de fermentação e 78% e 98% para 72 horas de fermentação, têm-se que o tempo ideal para os processos industriais está entre esses dois valores e, portanto, o rendimento celular recomendado para o dimensionamento dos reatores está entre 0,008 e 0,009. A Figura 8 e a



Figura 9 - Informações sobre os resíduos da regressão de  $Y_{X/S}$  via MQ. À esquerda está o gráfico dos resíduos em função dos valores previstos, cuja distribuição deve ser aleatória. À direita está o histograma dos resíduos.



Fonte: Elaboração própria a partir dos dados de Diniz, 2013.

## 5.2. Avaliação do processo industrial

### 5.2.1. Cálculo do tempo de fermentação

A fermentação é o processo principal da usina e, por isso, o primeiro passo foi dimensionar os reatores em função da escala de produção estipulada, a partir do modelo cinético proposto por Andrews (1968), com inibição por substrato. A equação diferencial 6 é citada por Andrews (1968) e vale para reatores de batelada em volume, pressão e temperatura constantes e admitindo que não há fase *lag*, morte celular e respiração endógena.

$$\frac{dS}{dT} = -\frac{1}{Y} * \left[ \frac{\mu_m}{1 + \frac{K_S}{S} + \frac{S}{K_1}} \right] * X \quad \text{Equação 6}$$

Esta é uma equação diferencial de primeira ordem, em que as constantes são a concentração de substrato (S), o tempo (T) em horas e o resultado é uma função do tipo T(S), obtida a partir de um problema de valor inicial em que para a concentração inicial, o tempo é zero. O resultado está expresso na equação 7. Todo o memorial de cálculo está no Apêndice 3.

$$T = T_0 + \frac{1}{\mu_m} \left[ \left( -1 - \frac{1}{\left( S_0 - \frac{X_0}{Y} \right)} + \frac{-S_0 + \frac{X_0}{Y}}{K_i} \right) * \ln \left( \frac{\Delta S * Y}{X_0} + 1 \right) + \frac{\ln \left( \frac{S}{S_0} \right)}{\left( S_0 - \frac{X_0}{Y} \right)} - \frac{\Delta S}{K_i} \right]$$

Equação 7

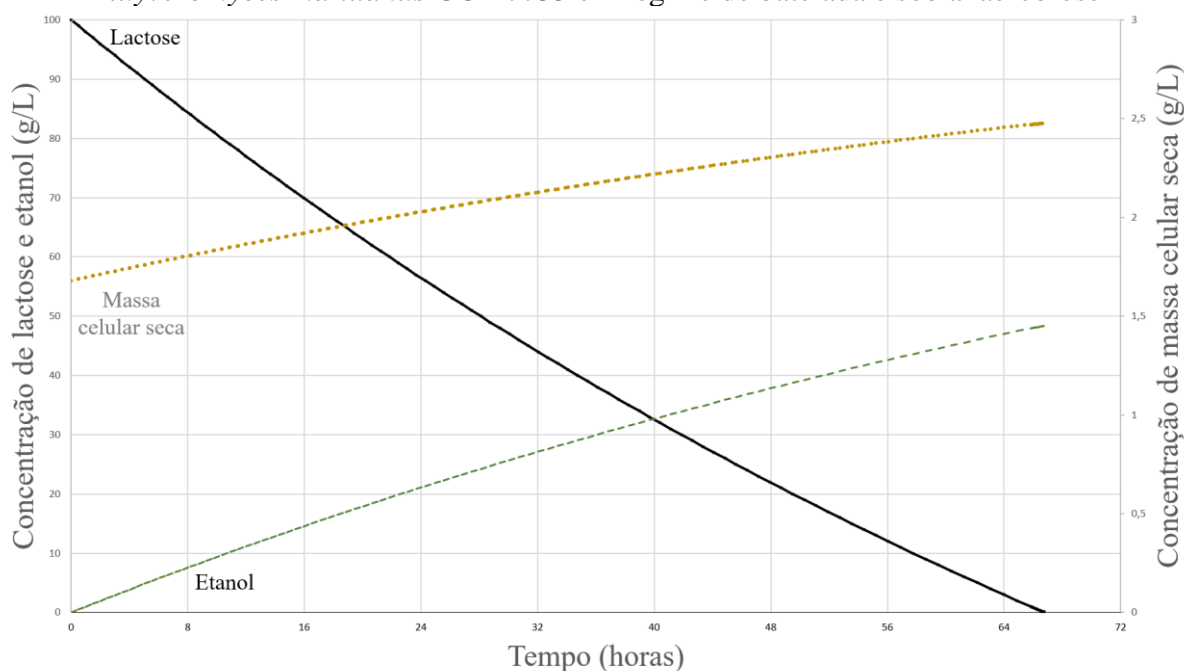
As constantes cinéticas foram calculadas por Silveira (2004), conforme Tabela 2. O rendimento celular para dimensionamento foi calculado na primeira parte deste trabalho e as condições para que se ocorra a eficiência de 90% da conversão de lactose em etanol foram

fornecidas por Diniz, 2013. A Tabela 8 apresenta um resumo de todas as considerações utilizadas para a aplicação da equação 7 e a Figura 10 apresenta o resultado dos cálculos, que relaciona o consumo de lactose, a produção de etanol e a produção de biomassa em função do tempo.

Tabela 8 - Constantes e considerações utilizadas para o dimensionamento dos reatores e no restante do trabalho.

Constantes cinéticas	Condições iniciais	Outras considerações
$\mu_m = 0,292$ 1/h	$S_0 = 100$ g/L	Eficiência produção etanol = 3,6 mole/mols *
$K_s = 1,512$ g/L	$X_0 = 1,68$ g/L	Massa molar lactose = 342,3 g/mol
$K_i = 529,4$ g/L	pH = 5,4	Massa molar etanol = 46,07 g/mol
$Y = 0,008$ gX/gS	Temp = 37 oC	Densidade etanol = 789 kg/m <sup>3</sup>
* Resultado de se admitir RF = 0,9 (Equação 2), dentro das condições ideais definidas por Diniz, 2013		

Figura 10 - Consumo de substrato, produção de etanol e produção de biomassa por *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 em regime de batelada e sob anaerobiose



Fonte: Elaboração própria

Assim, foi possível definir um tempo de fermentação adequado para aproveitar o máximo de lactose, visto que toda a lactose que não foi consumida durante a fermentação resultará em DQO no efluente da usina e deverá ser tratado de outra forma. É importante ressaltar que as informações contidas na Figura 10 estão de acordo com os resultados experimentais nos trabalhos de Silveira (2004), Diniz (2009) e Diniz (2013), embora tenha sido elaborada a partir de dados teóricos, o que corrobora com a qualidade do modelo.

Aqui se verifica a hipótese inicial de que o tempo adequado para a fermentação está entre 48 e 72 horas. Verifica-se que em 48 horas a eficiência de consumo de lactose está em

80% e em 64 horas a eficiência é de 97%. Deste modo, foi definido como tempo de detenção o valor de 64 horas, que é um valor alto dentro da prática industrial de até 12 horas, mas que para este caso fornece a melhor eficiência.

Nota-se que o modelo é sensível para a concentração inicial de células e por isso foi definida como maior valor do intervalo de rendimento ótimo, de 1,26 até 1,68 g/L. Caso a concentração inicial de células fosse de 1,26 g/L, por exemplo, o tempo de fermentação necessário para se atingir o mesmo consumo de lactose seria de 100 horas.

Nas usinas de etanol via cana-de-açúcar, as dornas de fermentação utilizam uma proporção de 28% de fermento tratado nos reatores, cuja concentração típica de levedura é de 35%, o que resulta em uma concentração de leveduras inicial de aproximadamente 1%, ou 9,8 g/L (RIBEIRO, 2011, p.74). Para esta concentração típica, o tempo para se atingir o mesmo consumo de lactose seria de 8,52 horas. O intervalo de condições definidos pela equação 2 está entre 1 e 2 g/L de massa celular seca inicial e, portanto, não é possível garantir que fora deste intervalo a conversão de lactose em etanol será superior a 90%. Assim, por mais que um tempo de fermentação curto represente redução da quantidade de dornas de fermentação e por consequência do investimento e do custo, será considerado o tempo de fermentação de 64 horas, que garante a alta conversão da lactose.

### 5.2.2. Definição dos equipamentos.

Na prática, a definição dos equipamentos foi realizada ao mesmo tempo que o balanço de massa, com um resultado alimentando o outro. Partindo da escala definida de 1000 toneladas de soro por dia e considerando uma usina que funciona 24 horas por dia sem interrupções, têm-se uma vazão constante de 41,7 m<sup>3</sup>/h de soro integral. Além disso, a concentração de lactose do permeado ou do soro concentrado deve ser igual a 100 g/L para atender as condições impostas para a fermentação. Com estes valores foi possível determinar a ordem de grandeza dos equipamentos do pré-tratamento e a vazão de alimentação dos reatores, de aproximadamente 18 m<sup>3</sup>/h.

Com esta vazão e considerando o tempo de enchimento de cada reator igual a 8 horas para facilitar o agendamento, temos que o volume útil de cada reator seria de 144 m<sup>3</sup>. Deste modo, para que a usina se mantenha em funcionamento durante toda as 64h de fermentação, têm-se um total de 8 reatores com um volume estimado de 180 m<sup>3</sup> cada um, considerando uma margem de segurança própria de reatores industriais. A Figura 11 exibe o agendamento dos reatores, em que a cada turno há pelo menos um reator enchendo e consumindo a vazão e outro esvaziando e liberando a vazão.

Figura 11 - Agendamento (*scheduling*) dos reatores em batelada, por turno de 8h

Reator	1	2	3	4	5	6	7	8
0-8h	E	S	M	M	M	M	M	M
8-16h	M	E	S	M	M	M	M	M
16-24h	M	M	E	S	M	M	M	M
24-32h	M	M	M	E	S	M	M	M
32-40h	M	M	M	M	E	S	M	M
40-48h	M	M	M	M	M	E	S	M
48-56h	M	M	M	M	M	M	E	S
56-64h	S	M	M	M	M	M	M	E
64-72h	E	S	M	M	M	M	M	M
72-80h	M	E	S	M	M	M	M	M
80-88h	M	M	E	S	M	M	M	M
88-96	M	M	M	E	S	M	M	M
96-104h	M	M	M	M	E	S	M	M
104-112h	M	M	M	M	M	E	S	M

E	Entrada de permeado
M	Manter a fermentação
S	Saída do vinho

Fonte: elaboração própria

A ultrafiltração do cenário 1 possui diâmetro de corte entre 500 Da e 100kDa e garante a remoção de bactérias e vírus. As operações de limpeza da membrana geram um concentrado de proteínas e gordura denominado WPC, que possui grande valor agregado quando seco. A temperatura dos evaporadores encontrados não ultrapassa 90 °C e o tempo de residência entre 30 segundos e um minuto, não sendo eficaz para garantir a assepsia do soro concentrado.

A etapa de separação das leveduras consiste na centrifugação do vinho após a fermentação e adição de ácido sulfúrico para garantir a assepsia das leveduras que retornam aos reatores. Neste caso a vazão é a mesma que entra e sai dos reatores. O porte da centrífuga, bem como o dos equipamentos de destilação, foram definidos de acordo com os equipamentos elencados no trabalho de Fortunato (2012) que também faz uma avaliação econômica desta tecnologia, comparando a *Kluyveromyces marxianus* com a *Saccharomise cerevisiae* em processos contínuos e em bateladas.

A Tabela 9 consta todos os equipamentos considerados como essenciais para a tecnologia, com suas condições operacionais e as fontes de informação de cada um.

Tabela 9 - Equipamentos com condições operacionais e fonte indicada

Processo	Equipamento	Nº	Cond. operacionais	Fonte/observações
Pré-tratamento 1	Bomba axial	1	até 100 m <sup>3</sup> /h	Modelo 50-200; <i>Grundfos</i>
	Ultrafiltração	1	até 100 m <sup>3</sup> /h	Modelo HJUF-200T; <i>Foshan Hongjun Ltd.</i>
	Bomba axial	1	até 50 m <sup>3</sup> /h	Modelo 40-160; <i>Grundfos</i>
	Osmose reversa	3	12 m <sup>3</sup> /h cada	Modelo RO12000; <i>Zhangjiagang City AK Machinery</i>
Pré-tratamento 2	Evaporador	1	até 50 m <sup>3</sup> /h	Modelo TK-0104; <i>Taikang</i>
Fermentação	Reatores	8	180 m <sup>3</sup>	Baseado no modelo RE0205; 70m <sup>3</sup> ; JEMP Equipamentos industriais
	Filtro de ar	8	3,2 m <sup>3</sup> /s	Fortunato, 2012
	Bomba axial	1	até 30 m <sup>3</sup> /h	Modelo 32-125; <i>Grundfos</i>
Separação das leveduras	Centrífuga	1	até 36,4 m <sup>3</sup> /h	Fortunato, 2012
	Tanque de mistura	1	50m <sup>3</sup>	Baseado no modelo LTD; <i>Shenzhen Litengda</i>
	Bomba axial	1	até 30m <sup>3</sup> /h	Modelo 32-125; <i>Grundfos</i>
Destilação	Refervedor	1	5,33 m <sup>2</sup>	Fortunato, 2012
	Refervedor	1	0,18 m <sup>2</sup>	Fortunato, 2012
	Condensador	1	1,4 m <sup>2</sup>	Fortunato, 2012
	Destilador	1	19 estágios	Fortunato, 2012
	Destilador	1	31 estágios	Fortunato, 2012

Fonte: Elaboração própria utilizando catálogos de fabricantes e o trabalho de Fortunato, 2012

### 5.2.3. Balanço de massa e energia

O balanço de massa foi realizado de acordo com a eficiência dos equipamentos, considerando as condições de fermentação estipuladas. Na entrada dos reatores a vazão de enchimento é de 18 m<sup>3</sup>/h com uma concentração de 100g/ de lactose. Após as 64 horas de fermentação, 97% da lactose é consumida e 90% da lactose consumida é convertida em etanol, gerando um vinho fermentado com 6% v/v de etanol ou 47 g/L de etanol. Além disso, no fim do período de 64 horas são produzidas 892 kg de leveduras em excesso.

Na centrifugação, as leveduras que retornam aos reatores são misturadas com ácido sulfúrico para garantir a assepsia do fermento, visto que a resistência das leveduras ao pH muito ácido é maior que a dos outros microrganismos. Bereche (2011) estima que em média se utiliza 5 kg de ácido sulfúrico para cada metro cúbico de etanol produzido em uma usina de etanol de cana-de-açúcar e, portanto, este foi o valor estimado, resultando em um consumo diário de 130 kg de ácido sulfúrico.

Há duas etapas principais de destilação necessárias para se produzir o etanol anidro. A primeira destilação ocorre em 19 ciclos e produz um etanol de 85% v/v de concentração e a segunda destilação ocorre em 31 ciclos e produz o etanol anidro 95% v/v. O rendimento de cada destilação, definido pelo etanol que sai dividido pelo etanol que entra é de 84,6% e 95,5%, respectivamente (FORTUNATO, 2012). Deste modo, ao todo são produzidos 23 m<sup>3</sup>/dia de etanol.

Este valor é muito próximo da estimativa feita por Fortunato, 2012, cujo cenário mais viável economicamente foi o de processo contínuo com *Kluyveromyces marxianus*, mas o cenário que mais produziu etanol foi o cenário em batelada com *Kluyveromyces marxianus*, com um total de 21 toneladas de etanol produzidas por dia, com a mesma escala de 1000 toneladas de soro por dia, apesar de as concentrações iniciais de lactose no soro estimadas por cada um dos trabalhos ter sido diferente, de 44 g/L neste trabalho e 50g/L por Fortunato, 2012.

O balanço energético foi realizado segundo a potência estimada para cada equipamento principal considerado, funcionando 24 por dia. A maioria dos equipamentos encontrados em catálogos não possuía informações precisas sobre a potência unitária dos equipamentos, então algumas informações foram buscadas na literatura.

Todas as bombas possuíam a informação da potência unitária por vazão no catálogo. A potência do aparelho de ultrafiltração foi estimada segundo estudo de Carvalho (2016) que estimou uma potência média para estes equipamentos de 0,31kW/m<sup>3</sup> de água filtrada. A potência dos equipamentos de osmose reversa foi estimada segundo o fabricante em um valor

unitário de 3,73kW por m<sup>3</sup> de água deionizada produzida. A potência do evaporador foi estimada segundo valores típicos de capacidade térmica, com  $U = 2,5 \text{ kW.m}^{-2}.\text{K}^{-1}$ , admitindo tubos de duas polegadas e velocidade de passagem de 1,2 m/s.

A potência dos reatores foi considerada para manter a temperatura do fermentado em 37 °C ao longo das 64 horas e foi baseado em valores típicos de aquecedores de piscinas, de 22 kW para aquecer um volume de 180 m<sup>3</sup>. A potência dos refervedores e dos condensadores foram estimados segundo valores típicos apontados por Ferreira (2014), com  $U = 0,85 \text{ kW}/(\text{m}^2\text{K})$  e área de contato estimada por Fortunato, 2012. A tabela 10 lista a potência total estimada para cada equipamento.

A Tabela 11 e a Tabela 12 exibem o balanço de massa e energia em diferentes escalas temporárias para comparação. A Tabela 11 apresenta o balanço completo por hora e por um período de 64 horas, que reflete a capacidade máxima dos 8 reatores instalados. A Tabela 12 apresenta o balanço global e diário resumido.

Tabela 10 - Lista de equipamentos com a potência estimada para o balanço de energia

Processo	Equipamento	Nº	Potência estimada (kW)
Pré-tratamento 1	Bomba axial	1	15,0
	Ultrafiltração	1	12,9
	Bomba axial	1	6,0
	Osiose reversa	3	85,3
Pré-tratamento 2	Evaporador	1	168,0
Fermentação	Reatores	8	176,0
	Filtro de ar	8	-
	Bomba axial	1	3,0
Separação das leveduras	Centrífuga	1	11,0
	Tanque de mistura	1	-
	Bomba axial	1	3,0
Destilação	Refervedor	1	250,5
	Refervedor	1	8,5
	Condensador	1	259,0
	Destilador	1	-
	Destilador	1	-

Fonte: Elaboração própria

Tabela 11 - Balanço de massa e energia completo

Equipamento	Indicador	Unidade	Horária (/h)		Em 64h	
			Entrada	Saída	Entrada	Saída
Ultrafiltração - Cenário 1	Energia	kWh	27,9	0,0	1787	0
	Soro <i>in natura</i>	m <sup>3</sup>	41,7	40,8	2667	2613
	Lactose	kg	1833,3	1796,7	117333	114987
	WPC	kg	0,0	29,2	0	1867
Osmose reversa - Cenário 1	Energia	kWh	84,8	0,0	5425	0
	Permeado	m <sup>3</sup>	40,8	18,0	2613	1150
	Lactose	kg	1796,7	1796,7	114987	114987
	Água deionizada	m <sup>3</sup>	0,0	22,9	0	1463
Evaporador - Cenário 2	Energia	kWh	168,0	0,0	10752	0
	Soro <i>in natura</i>	m <sup>3</sup>	41,7	18,0	2667	1150
	Lactose	kg	1833,3	1796,7	117333	114987
Reatores	Energia	kWh	154,0	0,0	9856	0
	Permeado	m <sup>3</sup>	-	-	1150	1150
	Lactose	kg	-	-	114987	3450
	Etanol 100%	kg	-	-	0	54042
	Levedura	kg	-	-	1932	2824
	DQO	kg	-	-	128995	116482
Centrífuga	Energia	kWh	14,0	0,0	896	0
	Levedura	kg	44,1	13,9	2824	892
Tanque de mistura	Ácido Sulfúrico	kg	5,4	5,4	342	342
Refervedores	Energia	kWh	259,0	0,0	16574	0
Condensador	Energia	kWh	259,0	0,0	16574	0
Destilador 19 estágios	Etanol 100%	kg	844,4	714,4	54042	45720
Destilador 31 estágios	Etanol 100%	kg	714,4	682,2	45720	43662
	Efluente	m <sup>3</sup>	18,0	17,0	1150	1089
	DQO efluente	kg	1820,0	398,4	116482	25499
Totais	Etanol 95% v/v	m <sup>3</sup>	-	0,96	-	61,3
	Energia_cenário1	MWh	0,80	-	51,11	-
	Energia_cenário2	MWh	0,85	-	54,65	-
	Concentração DQO (g/L) =					23,42

Fonte: Elaboração própria

Tabela 12 - Balanço global de massa e energia, por dia

Entrada		Saída	
Indicador	Valor	Indicador	Valor
Soro integral	1000 ton/dia	Etanol hidratado 95%	23 m <sup>3</sup> /dia
Ácido Sulfúrico	130 kg/dia	Levedura	334 kg/dia
Energia_cenário1	19,2 MWh/dia	Efluente	408 m <sup>3</sup> /dia
Energia_cenário2	20,4 MWh/dia	WPC_cenário1	701 kg/dia
		Água deionizada_cenário1	550 m <sup>3</sup> /dia

Fonte: Elaboração própria

#### 5.2.4. Investimento de capital

De acordo com a metodologia exposta por Peters e Timmerhaus (1991), o investimento de capital pode ser estimado de acordo com o custo total dos principais equipamentos que compõe o procedimento industrial. Deste modo, a Tabela 13 exhibe os custos totais para cada equipamento listado, sendo que o preço FOB unitário foi adquirido da respectiva fonte de informação de cada equipamento, como descrito na seção anterior. O preço total corresponde ao custo de todos os equipamentos, incluído frete, seguro, impostos e taxa de câmbio entre o real e o dólar comercial em outubro de 2018.

Tabela 13 - Lista de equipamentos com o preço *Free on Board* indicado em dólar comercial e o preço total incluindo frete, seguro e impostos, em reais, aplicado a taxa de câmbio de outubro de 2018 de 1USD para 3,77BRL

Processo	Equipamento	Nº	Preço FOB (US\$/un)	Preço Total (R\$)
Pré-tratamento 1	Bomba axial	1	11.627,65	89.506,64
	Ultrafiltração	1	238.000,00	1.832.062,48
	Bomba axial	1	7.690,05	59.196,02
	Osmose reversa	3	20.000,00	461.864,49
Pré-tratamento 2	Evaporador	1	100.000,00	769.774,15
Fermentação	Reatores	8	440.788,07	13.294.168,11
	Filtro de ar	8	56.860,91	3.501.604,46
	Bomba axial	1	3.415,50	26.291,64
Separação das leveduras	Centrífuga	1	409.948,18	3.155.675,11
	Tanque de mistura	1	39.397,92	303.274,98
	Bomba axial	1	3.415,50	26.291,64
Destilação	Refervedor	1	3.904,77	30.057,94
	Refervedor	1	1.112,22	8.561,55
	Condensador	1	1.488,02	11.454,36
	Destilador	1	44.203,92	340.270,35
	Destilador	1	50.710,19	390.353,94
			<b>Total Cenário 1</b>	<b>23.530.633,70</b>
			<b>Total Cenário 2</b>	<b>21.857.778,22</b>

Fonte: Elaboração própria

Tabela 14 - Valor de investimento de capital para uma usina de produção de etanol que processa 1000 ton/dia de soro, utilizando o pré-tratamento 1

Custos diretos - Cenário 1	Tipo de planta: Fluido		
	%	mil R\$	mil US\$
Maquinário de processo e equipamentos entregue	100	23.530,63	6.241,55
Instalação de maquinário e equipamentos	47	11.059,40	2.933,53
Instrumentos de controle	18	4.235,51	1.123,48
Encanamento (instalado)	66	15.530,22	4.119,42
Parte elétrica (instalada)	11	2.588,37	686,57
Construções (incluindo os serviços)	18	4.235,51	1.123,48
Infraestrutura de serviços (instalada)	70	16.471,44	4.369,08
Infraestrutura de acesso	10	2.353,06	624,15
Terreno (se necessário adquirir)	6	1.411,84	374,49
Custos indiretos - Cenário 1			
Engenharia e supervisão	33	7.765,11	2.059,71
Despesas de construção	41	9.647,56	2.559,03
Seguro e despesas contratuais	63	14.824,30	3.932,17
Capital de trabalho (estimado 15% do investimento)	86	20.236,34	5.367,73
<b>Investimento total - Cenário 1</b>	<b>569</b>	<b>133.889,31</b>	<b>35.514,40</b>

Fonte: Elaboração própria

Tabela 15 - Valor de investimento de capital para uma usina de produção de etanol que processa 1000 ton/dia de soro, utilizando o pré-tratamento 2

Custos diretos - Cenário 2	Tipo de planta: Fluido		
	%	mil R\$	mil US\$
Maquinário de processo e equipamentos entregue	100	21.857,78	5.797,82
Instalação de maquinário e equipamentos	47	10.273,16	2.724,98
Instrumentos de controle	18	3.934,40	1.043,61
Encanamento (instalado)	66	14.426,13	3.826,56
Parte elétrica (instalada)	11	2.404,36	637,76
Construções (incluindo os serviços)	18	3.934,40	1.043,61
Infraestrutura de serviços (instalada)	70	15.300,44	4.058,47
Infraestrutura de acesso	10	2.185,78	579,78
Terreno (se necessário adquirir)	6	1.311,47	347,87
Custos indiretos - Cenário 2			
Engenharia e supervisão	33	7.213,07	1.913,28
Despesas de construção	41	8.961,69	2.377,11
Seguro e despesas contratuais	63	13.770,40	3.652,63
Capital de trabalho (estimado 15% do investimento)	86	18.797,69	4.986,12
<b>Investimento total - Cenário 2</b>	<b>569</b>	<b>124.370,76</b>	<b>32.989,59</b>

Fonte: Elaboração própria

A Tabela 14 e a Tabela 15 apresentam uma estimativa do investimento de capital necessário para se instalar uma usina com as características descritas neste trabalho a partir do zero, categorizado por setor. Ela foi elaborada a partir do valor total dos equipamentos expresso na Tabela 13 para cada cenário, aplicado às proporções propostas na Tabela 5.

#### 5.2.5. Custos e receitas

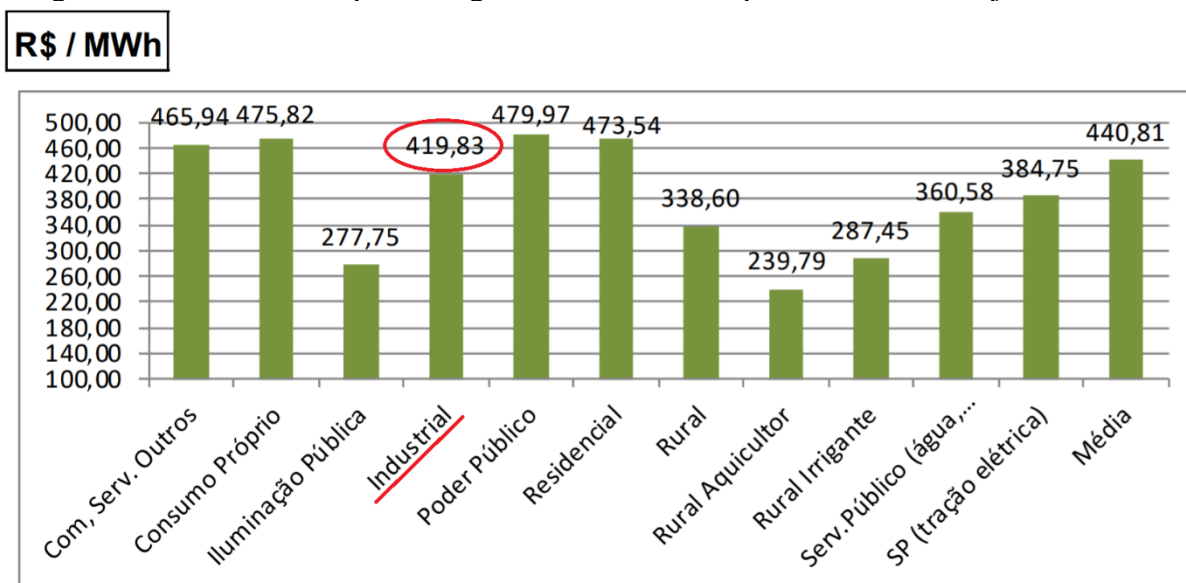
O custo com o transporte foi estimado utilizando preços de frete tabelados pela ANTT, uma capacidade do caminhão baseado no caminhão tanque Volvo ® Edc 360, com carreta Randon ® de capacidade de 30 m<sup>3</sup> e uma faixa de distância dos fornecedores de soro até a usina entre 20 e 100 km. Os preços tabelados pela ANTT estão divididos em tabelas que variam conforme o tipo de carga e a quantidade total de quilômetros percorridos. Quanto ao tipo de carga, que é líquida, se majorou considerando a categoria mais cara, cargas gerais, dentro de uma faixa mínima entre 0 e 100 km rodados, resultando em um valor de R\$2,10 por eixo e por quilômetro rodado (BRASIL, 2018).

Deste modo, ficou estipulado um valor mínimo e máximo de custo de transporte, que dependerá do quão bem localizada a usina está. O mesmo foi feito para os juros, que se mostrou um valor expressivo e cuja taxa depende do poder de negociação do investidor. É importante considerar os juros como um custo sempre que não há garantia de que o capital do investidor será suficiente para cobrir todo o investimento. Nesse caso, é necessário considerar a compensação pelo uso antecipado do capital como um custo fixo. Este trabalho considerou uma taxa anual de juros entre 3% a 6%, que é baixa em relação ao praticado no mercado. A Tabela 16 lista todos os custos considerados por este trabalho, com as faixas para cada cenário.

O custo com energia foi estimado a partir da potência de cada equipamento levantado, funcionando 24h por dia, sob a tarifa média paga pelo setor industrial no estado de São Paulo que foi de 421,25 R\$/MWh, segundo o relatório gerencial da ANEEL de junho de 2018. A Figura 12 exhibe a média do valor das tarifas para este mês em função do setor. O custo com ácido sulfúrico não se mostrou significativo, mas foi estimado a partir de informações de custo fornecidas por Fortunato, 2012.

Os outros custos foram retirados do relatório produzido pela empresa IDEA, disponível na plataforma online Nova Cana, com dados de 2005. Ele fornece informações sobre o custo unitário de cada item por metro cúbico produzido de etanol, incluindo custos com salários e encargos, manutenção, a depreciação, óleos lubrificantes, serviços de terceiros e outros. Todos os custos foram corrigidos com uma inflação de 4% ao ano.

Figura 12 – Tarifa média pela energia elétrica no Brasil por setor, dados de junho de 2018.



Fonte: ANEEL, 2018

Tabela 16 – Estimativa de custos totais para cada cenário

Custos setorizados	Cenário 1	Cenário 2
Indicador	R\$/dia	R\$/dia
Soro de leite (min)	1.428,00	1.428,00
Soro de leite (max)	7.140,00	7.140,00
Custos de produção		
Energia	10.634,71	11.299,38
Salários e encargos	1.219,95	1.219,95
Depreciações	1.590,54	1.590,54
Ácido Sulfúrico	94,58	94,58
Óleos lubrificantes	131,59	131,59
Materiais de manutenção	864,33	864,33
Serviços de terceiros	373,27	373,27
Juros mínimo 3% a.a	11.157,44	10.364,23
Juros máximo 6% a.a	22.314,88	20.728,46
Outros	991,31	991,31
Custos administrativos		
Salários e encargos	675,96	675,96
Serviços de terceiros	276,98	276,98
Assistência social	386,70	386,70
Outros	2.024,05	2.024,05
<b>Total mínimo</b>	<b>31.849,42</b>	<b>31.720,87</b>
<b>Total máximo</b>	<b>48.718,86</b>	<b>47.797,10</b>

Fonte: Elaboração própria

A receita vem, basicamente, da venda do etanol para as distribuidoras de combustível. A USP, através da ESALQ e do CEPEA, acompanha semanalmente o preço do etanol ao produtor e o preço do começo de outubro de 2018 para o etanol hidratado 95% para combustível era de R\$1,79 por litro (CEPEA, 2018). Deste modo, a receita diária proveniente da venda de etanol seria de R\$41.227,78, como mostra a Tabela 17.

Além disso, há outros subprodutos que merecem destaque, como o concentrado proteico WPC que é resultado do retido nas membranas de ultrafiltração e que possui um alto valor agregado. O valor unitário do WPC, no entanto, varia conforme a sua qualidade enquanto produto final, principalmente em função do teor de proteínas e como este trabalho não avaliou cenários para a qualidade deste produto e nem estimou os custos relacionados ao seu beneficiamento, que se resume basicamente à concentração e secagem via *spray dryer*, não foi seguro estabelecer um valor fixo para seu preço, mas sim uma faixa de valores subestimado entre 11,00USD e 20,00 USD por quilograma, que gera uma receita diária entre 21 mil e 38 mil reais. O trabalho de Fortunato (2012) por exemplo, adotou o valor de 75,00USD.

As receitas provenientes da venda de levedura seca também foram estimados e se mostraram não significativas, devido ao baixo valor de rendimento celular. Assim como no caso do WPC, esta estimativa não contempla os dados de custo até o produto final e, portanto, também foi considerada uma receita potencial.

Tabela 17- Estimativa das receitas totais, válida para ambos os cenários

Indicador	Receita (R\$/dia)	
	Mínimo	Máximo
Etanol	41.227,78	
WPC (Cenário 1) *	19.417,70	38.835,40
Levedura *	300,60	

\* Receitas potenciais. Fonte: Elaboração própria

#### 5.2.6. Viabilidade econômica

O tempo de retorno do investimento é definido como o tempo em que um empreendimento é capaz de gerar um lucro igual ao investimento do empreendimento. Para estes cálculos serão consideradas as curvas de custo mínimo e as receitas de cada cenário. Para o cenário, há também a possibilidade de uma receita substancial adicional advinda da venda de WPC. No entanto, como não estão contabilizados todos os custos para a produção do produto final, estas receitas são analisadas de forma separada e definidas como “receitas potenciais”.

Figura 13 – Curvas de custos e receitas acumuladas para o Cenário 1, incluindo apenas a receita do etanol

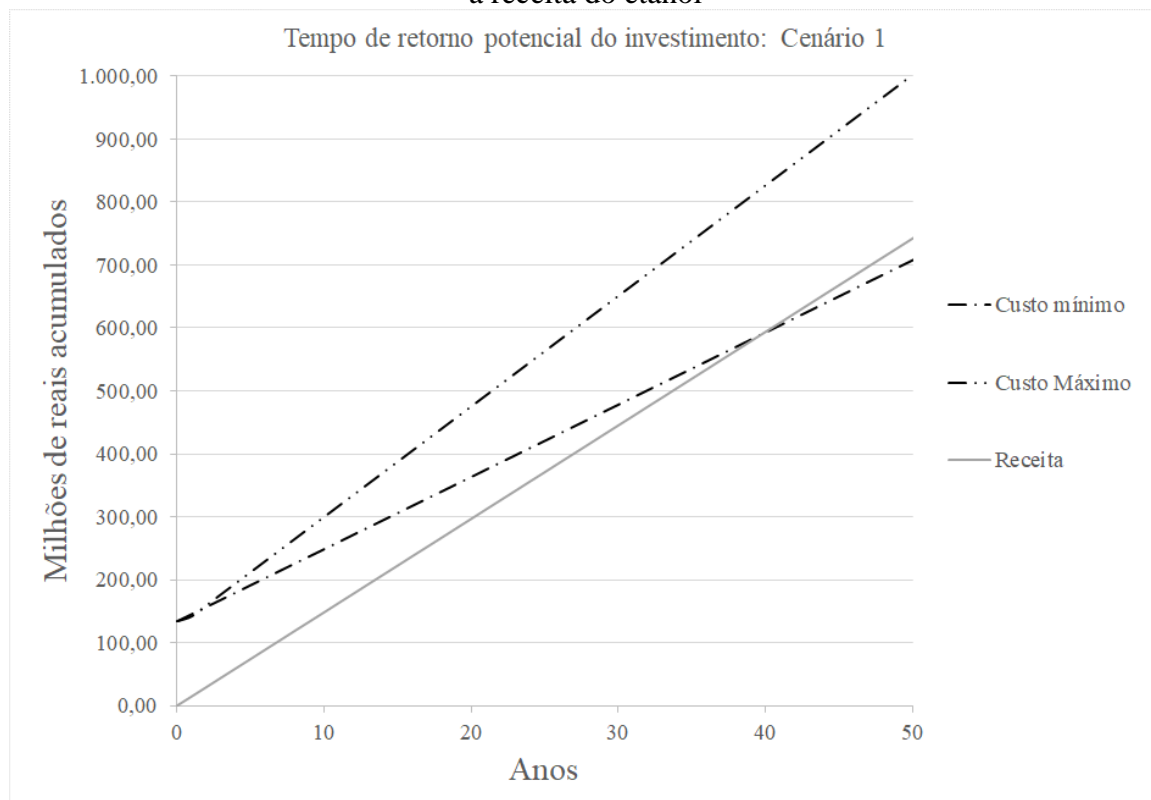
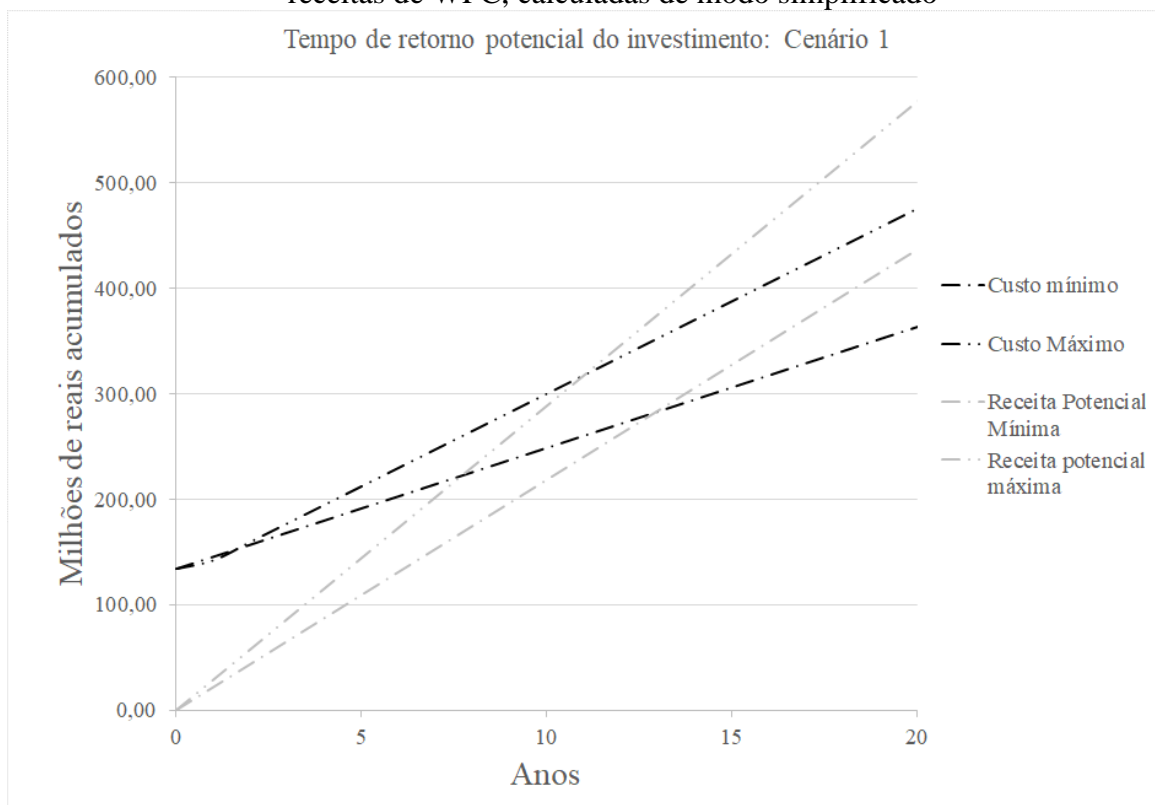


Figura 14 - Curvas de custos e receitas potenciais acumuladas para o Cenário 1, incluindo as receitas de WPC, calculadas de modo simplificado

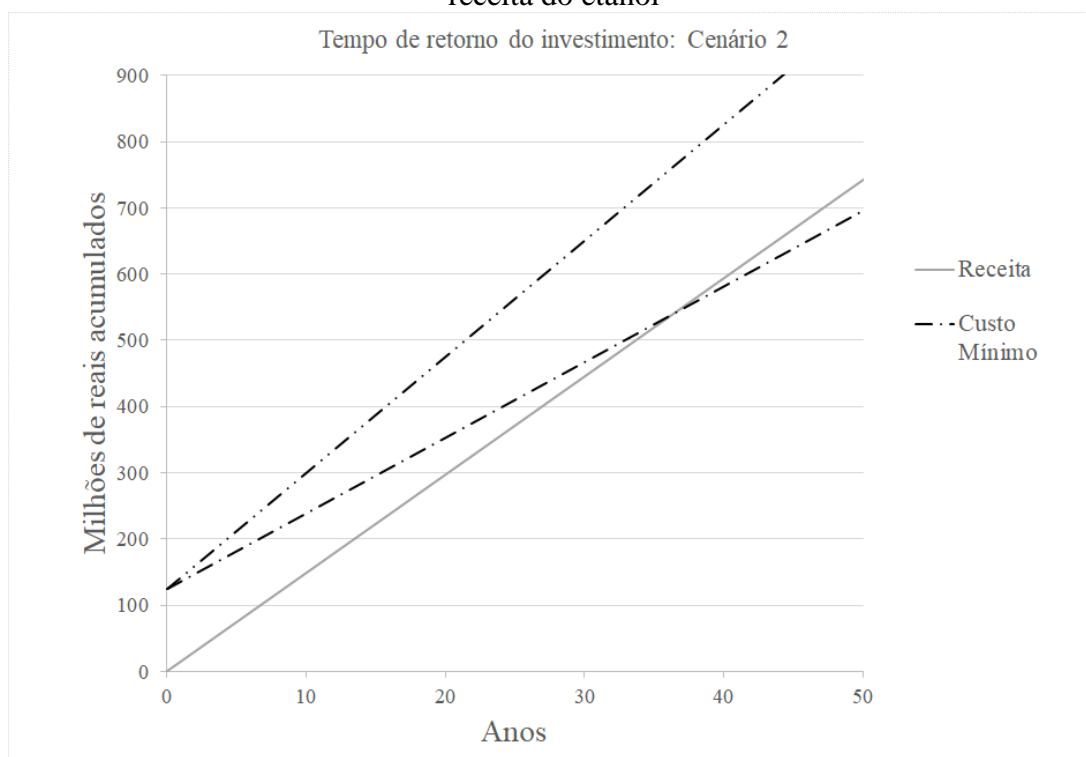


A Figura 13 mostra as curvas para o cenário 1 que em relação aos custos mínimos apresentou um tempo de retorno igual de aproximadamente 40 anos e em relação aos custos máximos o empreendimento está fadado a causar prejuízo, visto que os custos são maiores que as receitas. Considera-se que um tempo de retorno adequado para a indústria química é de 10 anos ou no máximo 15 e, portanto, este resultado aponta para a não viabilidade econômica da tecnologia considerando apenas a produção de etanol.

No entanto, se for considerado a receita potencial proveniente do WPC, o resultado é muito diferente, como mostra a Figura 14. Os tempos de retorno para este cenário variam entre 7,7 e 31,2 anos, o que já indica a importância de avaliar a produção de etanol acoplada a produção de WPC, visto que as duas fontes de receitas podem ser igualmente significantes. No entanto, para que este resultado se confirme é necessária uma avaliação detalhada do processo de beneficiamento e desidratação das proteínas, com os custos associados.

O cenário 2, com o pré-tratamento feito exclusivamente com evaporador, está contemplado pela Figura 15 e mostra um tempo de retorno igual a 36 anos para o cenário de custo mínimo e prejuízo para o cenário de custo máximo. Além disso, já na fase de pesquisa dos equipamentos, ficou claro que a faixa de temperatura e a faixa de tempo de permanência que estes equipamentos trabalham não é suficiente para promover a assepsia do concentrado e, portanto, este não é um cenário viável tecnicamente e tampouco economicamente.

Figura 15 - Curvas de custos e receitas totais acumuladas para o Cenário 2, incluindo apenas a receita do etanol



Neste ponto da análise, como os resultados para as condições simplificadas não se mostraram satisfatórios, decidiu-se levar em consideração a inflação ao longo do tempo e a perspectiva de amortização do empréstimo, visto que os juros são parte expressiva dos custos, ainda considerando o caso em que 100% do capital inicial é financiado. A taxa de juros é calculada no início do empréstimo e não varia ao longo do tempo, enquanto que todos os outros custos estão sujeitos à inflação e, para o caso em que a receita é maior que os custos, a inflação pesa a favor do investidor.

O cenário 2 já foi descartado e as análises incidem sobre o cenário 1. Como envolvem taxas de juros compostos, a análise foi feita mês a mês para aumentar a precisão, considerando taxa mensais equivalentes às taxas anuais. Neste caso, considerando os custos máximos o empreendimento continua a fornecer uma receita líquida negativa, mas para o caso de custos mínimos o tempo de retorno de investimento foi menor, como mostra a Figura 16. O lucro líquido é a receita descontada dos custos, dos juros e das parcelas de amortização e, portanto, é o que sobra ao investidor, de modo que o encontro desta curva com o valor atual da dívida corresponde ao ponto em que o lucro é o mesmo que o valor investido e, portanto, corresponde ao tempo de retorno que é de aproximadamente 22 anos para a proporção de amortização de 50% e de 20 anos para a proporção de 90% de amortização.

A comparação da curva do lucro líquido com a curva do investimento inicial corrigido com a inflação de 4,5% fornece uma noção de custo de oportunidade, comparando o retorno do empreendimento com a hipótese de se deixar o investimento inicial parado em uma poupança, por exemplo.

Além disso, uma última hipótese foi avaliada, que é a mais otimista e corresponde ao cenário em que o investidor é capaz arcar com todos os custos fixos e operacionais. Nesse caso, não há empréstimo e, portanto, os juros não configuram um custo fixo, embora ainda haja prejuízo em custos de oportunidade, difíceis de serem mensurados. A Figura 17 exhibe estes resultados que apontam um tempo de retorno do investimento entre 11,7 e 12,5 anos, sem considerar as receitas potenciais.

Figura 16 - Curvas de lucro líquido e valor da dívida para diferentes proporções de amortizações aplicadas à receita líquida, para o cenário 1, incluindo apenas a receita do etanol

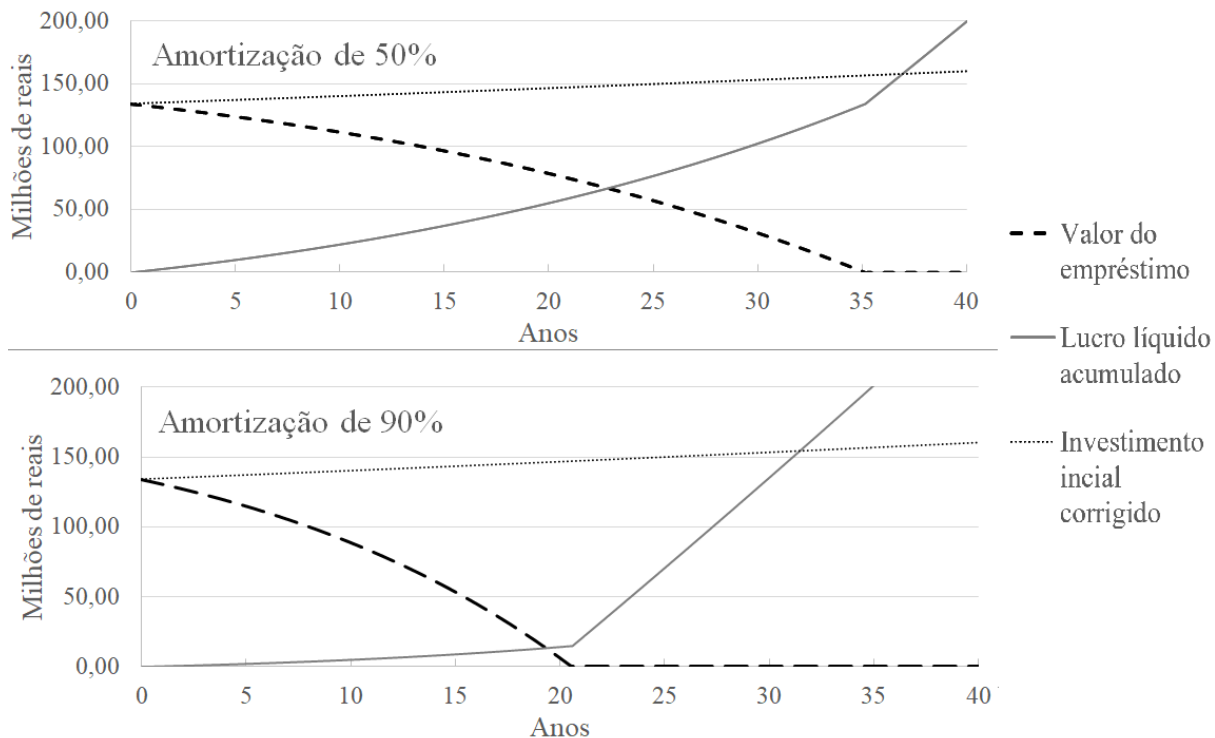
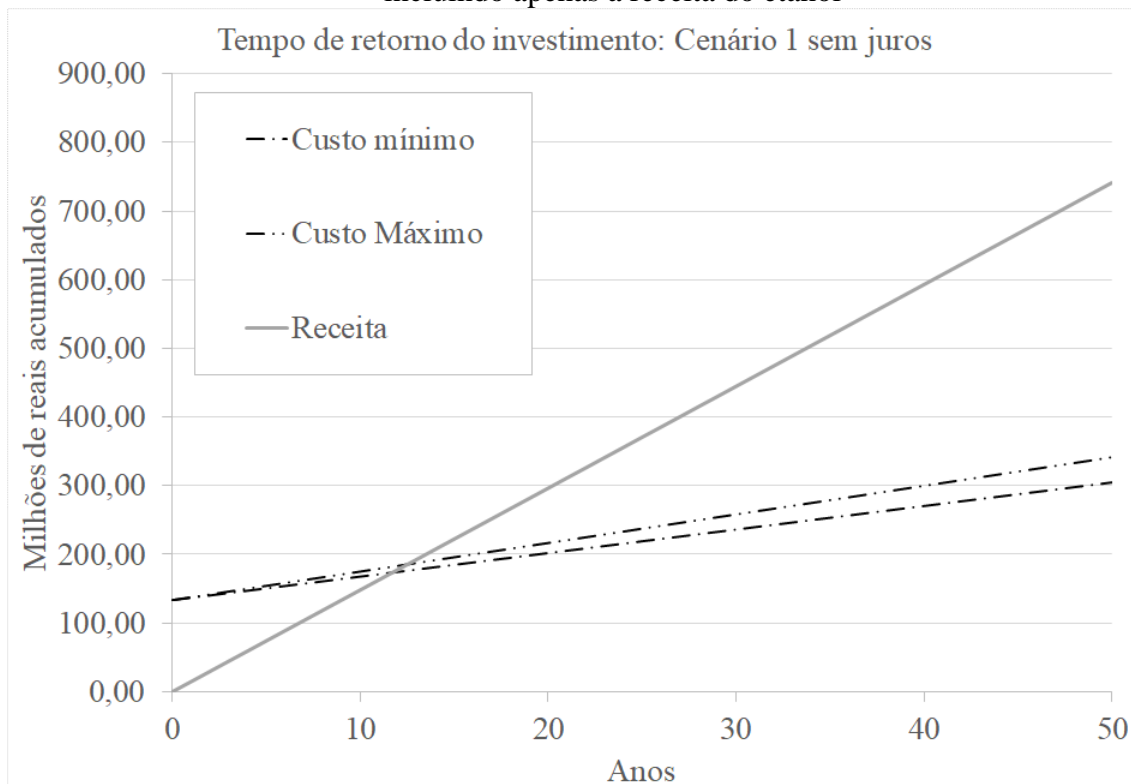


Figura 17 - Curvas de custos e receitas totais acumuladas para o Cenário 1 sem juros, incluindo apenas a receita do etanol



Fonte: Elaboração própria

### 5.2.7. Considerações finais e recomendações para estudos futuros

O modelo cinético se mostrou muito satisfatório, com valores de tempo e eficiência que estão de acordo com os resultados experimentais. No entanto, ele não leva em consideração a inibição do crescimento devido à concentração de etanol, que o estudo de Silveira (2004) mostrou que é significativo, reduzindo a velocidade de crescimento para até 80% em anaerobiose, para concentrações de etanol que aparecem nos momentos finais de fermentação. Assim, uma recomendação para estudos futuros seria o estabelecimento das constantes de inibição por etanol em outro modelo cinético.

O balanço de massa foi capaz de estimar a quantidade de DQO de entrada e saída, considerando a demanda por oxigênio no permeado é devida exclusivamente da lactose e no efluente é devido ao remanescente de lactose e etanol. Assim, a concentração de DQO do permeado concentrado é de 112 g/L e no efluente do destilador é de 23 g/L, o que representa uma eficiência de remoção de 79%. Assim o processo de produção de etanol a partir do soro de leite pode ser considerado um sistema de tratamento de efluente da indústria de laticínios, excede o estipulado pela resolução 430 de março de 2011 da CONAMA de 60% de remoção de DBO.

No entanto, o valor de DQO de 23 g/L a uma vazão de 17 m<sup>3</sup>/h pode ser muito agressivo para grande parte dos corpos hídricos brasileiros e, por isso, deve-se avaliar a necessidade de instalação de algum sistema de tratamento deste efluente em função das características do corpo receptor.

Fortunato (2012) avalia sistemas utilizando *Kluyveromyces marxianus* e obtém tempos de retorno de 135 anos para o processo em batelada e de 4,22 anos para o processo contínuo. Esta diferença se dá principalmente devido ao alto custo estimado para os processos em batelada, principalmente devido aos preços dos reatores. Assim, os principais equipamentos foram estimados de forma independente neste trabalho, a fim de fornecer uma segunda opinião sobre os custos do processo em batelada.

Os resultados econômicos apresentaram previsões de custo, receita e tempo de retorno para diversos cenários de financiamento e de distância da matéria-prima. Para a situação mais otimista o tempo de retorno foi de 12 anos, embora ainda incluindo elementos de majoração, como ignorar a venda dos subprodutos. Algumas situações, no entanto, apresentaram prejuízo certo. Assim, fica claro que a viabilidade econômica desta tecnologia está diretamente atrelada à posição geográfica da usina a fim de minimizar os custos com transporte e da capacidade do investidor, a fim de minimizar os custos financeiros, que são muito

significativos. Assim, como os resultados de tempo de retorno não foram atrativos, é recomendável que futuros estudos considerem um processo de fermentação contínua como principal opção.

O potencial de produção de WPC merece um destaque, pois dependendo das condições de beneficiamento e comercialização, as receitas provenientes deste produto podem ultrapassar as receitas provenientes da produção de etanol. Assim, é imprescindível que as próximas análises econômicas desta tecnologia envolvam o beneficiamento deste produto, estimando investimento, custos e receita, para se ter um panorama mais completo do potencial de aproveitamento de soro.

Uma grande oportunidade para tornar esta tecnologia viável economicamente é a avaliação da eficiência de conversão de lactose em etanol para uma concentração celular inicial de 10 g/L, em que o modelo cinético aponta para um tempo de fermentação de 8 horas, o que poderia reduzir o custo com os reatores em até 8 vezes, caso a eficiência de conversão de lactose em etanol se mantenha. O preço dos reatores corresponde a 56% do investimento total de maquinário e, portanto, tal redução poderia resultar em um investimento aproximadamente 50% menor, conseqüentemente custos com juros menores e tempos de retorno mais atrativos.

## 6. CONCLUSÃO

Durante a avaliação detalhada dos dados experimentais fornecidos por Diniz, 2013, verificou-se que a hipótese inicial que sustentava o primeiro objetivo deste trabalho era falsa, ou seja, o crescimento celular de *Kluyveromyces marxianus* CCT 7735 não depende significativamente de temperatura, pH e concentrações iniciais de célula e substrato. No entanto, como o interesse por esta informação se justifica pela necessidade de maior precisão do equacionamento cinético, os dados foram utilizados para sugerir um valor de dimensionamento para o rendimento celular, obtido através de regressão linear via mínimos quadrados. O resultado se mostrou estatisticamente aceitável, com  $R^2$  acima de 80 e forneceu um valor de Y entre 0,008 e 0,009.

O julgamento dos cenários de pré-tratamento foi concluído durante a fase de pesquisa dos equipamentos, visto que não foi encontrado modelos de evaporadores que trabalhavam a altas temperaturas e um tempo de residência suficientes longos para garantir a desinfecção do soro e, portanto, ele não apresenta viabilidade técnica. No entanto, a análise do cenário 2 se manteve a título de comparação da ultrafiltração e osmose reversa com uma técnica intuitiva de secagem. Os indicadores dos equipamentos de cenário 1, por sua vez, se mostram eficazes para a remoção de bactéria e vírus do permeado de soro.

Os resultados da análise econômica indicam que, para o modelo e premissas propostos por este trabalho, a tecnologia não pode ser considerada viável economicamente. Dentre o intervalo analisado, com juros variando de 0 a 6% e custos de transporte do soro variando entre mil e sete mil reais por dia, em grande parte o empreendimento causaria prejuízo. Nos cenários mais otimistas, o tempo de retorno variou entre 11 e 40 anos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-BANAT, B.M. et al. **High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast.** Applied microbiology and biotechnology, 85(4), p.861-867. 2010

AKSU, Z.; DÖNMEZ, G. **The use of molasses in copper (II) containing wastewaters: effects on growth and copper (II) bioaccumulation properties of *Kluyveromyces marxianus*.** Proc Biochem n°36 p.451–458. 2000.

ALTIERI, M. **Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável.** Expressão Popular, 3ªed, São Paulo, 2012.

PASCHOALINI, G.; ALCARDE, V. E. **Estudo do Processo Fermentativo de Usina Sucroalcooleira e Proposta para sua Otimização.** Revista de Ciência & Tecnologia, v.16, n.32, p. 59-68, jun 2011.

ANDREWS. J. F. **A Mathematical Model for the Continuous Culture of Microorganisms Utilizing Inhibitory Substrates.** Biotechnology and Bioengineering. Vol. X, p 707-723. 1968.

ANEEL. **Informações gerenciais: Relatório de junho de 2018.** Agência Nacional de Energia Elétrica, junho de 2018. Disponível em: < <http://www.aneel.gov.br/>>. Acesso dia 13/10/2018 às 18:58.

ANTUNES, J.A. **Funcionalidade de Proteínas do Soro de Leite Bovino.** Barueri: Manole, 135p. 2003.

ASSUNÇÃO, G.M. **Crop biomass using yeast whey permeate cheese.** 2014. 132 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2014.

BACH, F. et al. **Estudo da influência de variáveis no processo de produção de bioetanol de soro de leite.** Engevista, v. 16, n. 3, p. 392-409, 2013.

BALDASSO, C.; BARROS, T.C.; TESSARO, I.C. **Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration.** Desalination, v. 278, n. 1-3, p. 381-386, 2011.

BERECHE, R. P. **Modelagem e integração energética do processo de produção de etanol a partir da biomassa de cana-de-açúcar.** Tese (doutorado em Engenharia Mecânica). Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2011.

BELEM, M.A.F.; LEE B. H. P. **Production of Bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* Grown on Whey: An Alternative.** Critical reviews in Food Science and Nutrition, 38(7), p. 565-598, 1998.

BRANDÃO, S.C.C. **Soro: um desafio para as fábricas de queijo.** Leite & Derivados, v. 15, p. 13-18, 1994.

BRASIL. **Instrução Normativa nº8 de 25 de março de 2004.** Diário Oficial da União, s.1 p.5, Brasília, DF, mar. 2004. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-8-de-25-de-marco-de-2004.pdf>> Acesso em agosto de 2018.

BRASIL. **Matriz energética.** Portal oficial do Governo do Brasil, dez. 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/meio-ambiente/2010/11/matriz-energetica>> Acesso dia 15 de outubro de 2018.

BRASIL. **Portaria nº 53 de 10 de abril de 2013:** Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Soro de Leite. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2010.

BRASIL. **Resolução Nº 430, de 13 de maio de 2011.** Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Diário Oficial da União nº92 p.89. Brasília, DF, mai. 2011.

BRASIL. **Resolução Nº 5820 de 30 de maio de 2018:** Estabelece a metodologia e publica tabela com preços mínimos vinculantes, referentes ao quilômetro rodado na realização de fretes, por eixo carregado. Diário Oficial da União, Brasília, DF, mai. 2018.

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.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Centro universitário UNIVATES, Lajeado, mar. 2014.

CAMPESE, G.B.; PASSINI R.J. **Estudo De Evaporadores De Múltiplos Efeitos.** Monografia. Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2015.

CARVALHO, C. **Balanco de massa e energia do sistema de ultrafiltração para tratamento de água.** Congresso Técnico Científico de Engenharia e da Agronomia. Foz do Iguaçu, Paraná, 1 de setembro de 2016.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D.C. **Planejamento de experimentos usando o Statistica.** Rio de Janeiro: e-papers, 2003.

CEPEA. **Indicador semanal do etanol hidratado combustível.** São Paulo, outubro de 2018. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/indicador/etanol.aspx>>. Acesso dia 14 de outubro de 2018 às 02:02.

COLOGNESI, G.O.S. **Produção de etanol em escala piloto a partir da fermentação do soro de queijo desproteínizado**. 40f. Dissertação (mestrado em Ciência e Tecnologia de Leite e Derivados) – Unidade Piza. Universidade Norte do Paraná, Londrina, 2015.

DAMASCENO, M. **Fábrica alemã vai fazer etanol com sobras de queijo**. BBC Brasil, jul. 2007. Disponível em: <[https://www.bbc.com/portuguese/reporterbbc/story/2007/07/070717\\_queijoetanol\\_md\\_ac.sh](https://www.bbc.com/portuguese/reporterbbc/story/2007/07/070717_queijoetanol_md_ac.sh)>. Acesso em agosto de 2018.

DAVID, F.M. **Diferentes quantidades de soro de leite na alimentação de vacas secas**. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2006.

DRY MASTER. **Aplicações e vantagens da secagem por Spray**. Disponível em: <<http://www.drymaster.com.br/aplicacoes-e-vantagens>>. Acesso em agosto de 2018.

DINIZ, R.H.S. **Metabolismo de lactose em Kluyveromyces marxianus CCT 7735 e Kluyveromces lactis JA6**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2009.

DINIZ, R.H.S. **Otimização do processo fermentativo e análise do secretoma de Kluyveromyces marxianus CCT 7735 em meios contendo lactose em diferentes condições de cultivo**. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, março de 2013.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Matriz energética e elétrica**. 2016. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br/pt/abcdenergia/matriz-energetica-e-eletrica>>. Acesso em agosto de 2018.

ETSCHMANN, M. et al. **Biotechnological production of 2-phenylethanol**. Applied microbiology and biotechnology, v. 59, n. 1, p. 1-8, 2002.

FERREIRA, P. R. R. **Análise técnica e econômica de sequestro químico de CO<sub>2</sub> via produção de dimetil carbonato por rota direta**. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de processos Químicos, janeiro de 2004.

FLORÊNCIO, M. I. et al. **Produção de etanol a partir de lactossoro industrial**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental v.17, n.10 p.1088-1092. Campina Grande, 2013.

FONSECA, G.G. et al. **The yeast Kluyveromyces marxianus and its biotechnological potential**. Appl Microbiol Biotechnol, 2008. P339-354. 22 de abril de 2008.

FORTUNATO, M.R.C. **Utilização do simulador *Superpro Designer*® para avaliação do aproveitamento de soro de queijo para a produção de etanol.** Dissertação (Mestrado), Escola de Química, UFRJ. Rio de Janeiro, setembro de 2012.

GABARDO, S. **Otimização da bioconversão de lactose do soro de queijo em etanol em sistemas de biorreatores imobilizados.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

GIRALDELLI, R. **Saiba quais são os impostos na importação empresarial.** Disponível em: <<http://chinagate.com.br/impostos-na-importacao-empresarial/>>. Acesso dia 09/10/2018 às 19:49.

GONÇALVES, J.D.M. **Produção de bioetanol por uma cultura mista de leveduras a partir de um substrato misto de alfarroba e soro de queijo.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Biológica). Universidade do Algarve, 2014.

JLSPRAY. **Milk Powder Production Line.** 2018. Disponível em: <<https://www.jqspray.com/Product/Milk-Powder-Production-Line.html>>. Acesso em agosto de 2018.

KOHLHEPP, G. **Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil.** Estudos avançados, v. 24, n. 68, p. 223-253, 2010.

LENCASTRE, K.G.S. **Mapeamento da Produção de Soro de Queijo no Rio de Janeiro: Potencial para a Produção de Etanol.** Dissertação de mestrado do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, UFRJ, 2012.

LEVENBERG, K. **A method for the solution of certain non-linear problems in least squares.** Quarterly of Applied Mathematics, v. 2, n. 2, p. 164-168. Brown University, 1944.

LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. **Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira** Editora UFPR. Curitiba, Paraná, 2002.

LING, K.C. **Whey to ethanol: a biofuel role for dairy cooperatives?.** Rural Business and Cooperative Programs, Research Report 214. February, 2018.

MAGANHA, M.F.B. **Guia Técnico Ambiental da Indústria de Produtos Lácteos: Série P+L.** São Paulo: CETESB, 95p. 2008.

MARTELLO, A. **Copom deve manter pela terceira vez consecutiva taxa básica de juros em 6,55 ao ano.** G1, Economia. Brasília, agosto de 2018. Disponível em: <<https://g1.globo.com/economia/noticia/2018/08/01/copom-deve-manter-pela-terceira-vez->

consecutiva-taxa-basica-de-juros-em-65-ao-ano-aposta-mercado.ghtml> Acesso dia 13 de outubro de 2018 às 22:05.

MICINSKI, J; ZWIERZVHOWSKI, G; KOWALSKI, I. M; SZAREK, J. **Health-promoting properties of selected milk components**. Journal of Elementology, v. 18, n. 1, p. 165-186, mar., 2013.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. 8<sup>th</sup>ed. Arizona: John Wiley & Sons, Inc, 2017.

MORESI, M.; TRUNFIO, A.; PARENTE, E. **Kinetics of continuous whey fermentation by *K. fragilis***. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 49, p. 205-222, 1990

MURARI, C.S. et al. **Avaliação da redução na poluição dos laticínios, a partir da fermentação do soro de leite em etanol pela levedura *Kluyveromyces marxianus* 229**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 68, n. 393, p. 42-50, 2013. Disponível em: < <https://www.revistadoilct.com.br/riict/article/view/35/39>> Acesso em agosto de 2018.

NETO, B.B; SCARMINIO I.S; ROY; E.B. **Como fazer experimentos**. Porto Alegre: Bookman, 2010.

NOVACANA. **Custos de produção de cana e etanol e as novas tecnologias das usinas**. 2005. Disponível em: < <https://www.novacana.com/usina/evolucao-setor-melhorias-proporcionadas-pela-pd/>>. Acesso em outubro de 2018.

OLIVÉRIO, J.B. **Brazilian sugar cane sector: evolution, trends, sustainability**. São Paulo, 2008.

ONWULATA, C.I.; HUTH, P.J. **Whey processing, functionality and health benefits**. Wiley-Blackwell, 1<sup>st</sup> ed, 2008.

PASOTTI, L. et al. **Fermentation of lactose to ethanol in cheese whey permeate and concentrated permeate by engineered *Escherichia coli***. BMC Biotechnology (2017) p.17-48. 2017.

PEREIRA, J.P.F. et al. **Percentual De Cristalização Da Lactose Em Cristalizador De Bancada De Soro De Leite Concentrado**. Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes, v. 65, n. 374, p. 26-32, 2010.

PETERS, M.S; TIMMERHAUS, K.D. **Plant Design and economics for chemical engineers**. 4<sup>th</sup> edition, McGraw-Hill, 1991.

PHILLIPS, L. **Brazilian Sugarcane Sector: Recent Developments and the Path Ahead**. Unica, Arlington, February, 2018. Disponível em:

<[https://www.usda.gov/oce/forum/2018/speeches/Leticia\\_Phillips.pdf](https://www.usda.gov/oce/forum/2018/speeches/Leticia_Phillips.pdf)> Acesso em agosto de 2018

PINTO, F.A. **Metodologia da espectroscopia no infravermelho para análise dos soros provenientes da fabricação de queijos Minas padrão e prato**. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária da Universidade federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2010.

RIBEIRO, E.J. **Tecnologia do Açúcar e do Álcool**. Faculdade de Engenharia Química, Universidade federal de Uberlândia. Maio de 2011.

ROGERIO, H.A.; COSTA, A.O.S; JUNIOR, E.F.C. **Aplicações Industriais De Evaporadores De Múltiplo Efeito**. Enciclopédia Biosfera, centro Científico Conhecer, Goiânia, v.9, N.16, p.2915, 2013. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013a/engenharias/aplicacoes%20industriais.pdf>>. Acesso em agosto de 2018.

TEXEIRA, M.R. **A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins: Saccharomyces cerevisiae versus Kluyveromyces lactis**. FEMS Yeast Research, v.5, p.1115-1128, dez. 2005.

SÃO PAULO. **Lei nº 6.374 de março de 1989**. Dispõe sobre a instituição do Imposto sobre Operações Relativas à Circulação de Mercadorias e sobre Prestação de Serviços de Transporte Interestadual e Intermunicipal e de Comunicação – ICMS. Palácio dos Bandeirantes, São Paulo, 1989.

SERPA, L.; PRIAMO, W.L.; REGINATTO, V. **Destino ambientalmente correto a rejeitos de queijaria e análise de viabilidade econômica**. 2nd International Workshop–Advances in Cleaner Production. v.2, p.1-10. 2009

SERPA, L. **Uso de membranas no tratamento do soro lácteo e seu aproveitamento para produção de poli-hidroxialcanoatos (PHAs)**. Florianópolis, 2012.

SILVEIRA, R. S. **Produção de etanol por leveduras em biorreatores com células livres e imobilizadas utilizando soro de queijo**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia. Porto Alegre, 2006.

SILVEIRA, W. B. **Produção de etanol em permeado de soro de queijo por Kluyveromyces marxianus CCT 7735**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2004.

SMITHERS, G. W.; BALLARD, F. J.; COPELAND, A. D. et al. **New opportunities from the isolation and utilization of whey proteins**. Journal of Dairy Science, v. 79, p. 1454-1459, 1996.

SOORO. **Sooro investe 35 milhões, duplica capacidade produtiva e inicia produção do WPCi 80**. Paraná, 8 de abril de 2016. Disponível em: <<http://www.sooro.com.br/noticias/sooro-investe-35-milhoes-duplica-capacidade-produtiva-e-inicia-producao-do-wpci-80/>>. Acesso dia 08/10/2018 às 2:00.

UNICA. **2º Relatório de Sustentabilidade**. União da Indústria de Cana de Açúcar, São Paulo, 2010.

WANG, J.; WAN, W. **Experimental design methods for fermentative hydrogen production**: a review. International Journal of Hydrogen Energy, 18 de novembro de 2008, p.235-244. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.10.008.

WESTERGAARD, V. **Tecnologia de La Leche en Polvo**: Evaporación y Secado por Atomización. Copenhague: Niro A/S, 2001. 166 p. Disponível em: <<https://pt.scribd.com/document/164961373/Es-Tecnologia-de-La-Leche-en-Polvo-Todo>>. Acesso dia 01 de agosto de 2018.

ZOCCAL, R. **Queijos**: produção e importação. Balde branco, 17 de agosto de 2016. Disponível em: <<http://www.baldebranco.com.br/queijos-producao-e-importacao/>>. Acesso dia 01 de agosto de 2018.

## 8. APÊNDICE

APÊNDICE 1A – Dados de entrada para o Delineamento Composto Central para um tempo de fermentação de 48h.

<b>pH</b>	<b>T (oC)</b>	<b>[lactose]</b>	<b>[X seco] (g/L)</b>	<b>Y_X/S</b>
5,5	37,50	150	1,52	0,0075
5,5	37,50	150	1,01	0,0129
4,5	37,50	150	1,52	0,0104
5,5	37,50	250	1,52	0,0076
5,5	45,00	150	1,52	0,0077
5,5	37,50	150	1,52	0,0088
5,5	37,50	150	1,52	0,0070
5,5	37,50	150	1,52	0,0068
6,5	37,50	150	1,52	0,0162
5,5	37,50	150	2,03	0,0102
5,5	30,00	150	1,52	0,0169
5,5	37,50	50	1,52	0,0143
5,5	37,50	150	1,52	0,0067
6,0	41,25	100	1,27	0,0103
5,0	33,75	100	1,77	0,0146
5,0	41,25	200	1,27	0,0068
6,0	33,75	100	1,27	0,0231
5,0	41,25	200	1,77	0,0056
5,0	33,75	200	1,27	0,0086
5,0	41,25	100	1,77	0,0063
5,0	33,75	100	1,27	0,0148
5,0	33,75	200	1,77	0,0089
6,0	41,25	200	1,77	0,0126
6,0	33,75	200	1,27	0,0178
6,0	33,75	200	1,77	0,0049
6,0	33,75	100	1,77	0,0031
6,0	41,25	200	1,27	0,0047
6,0	41,25	100	1,77	0,0033
5,0	41,25	100	1,27	0,0014

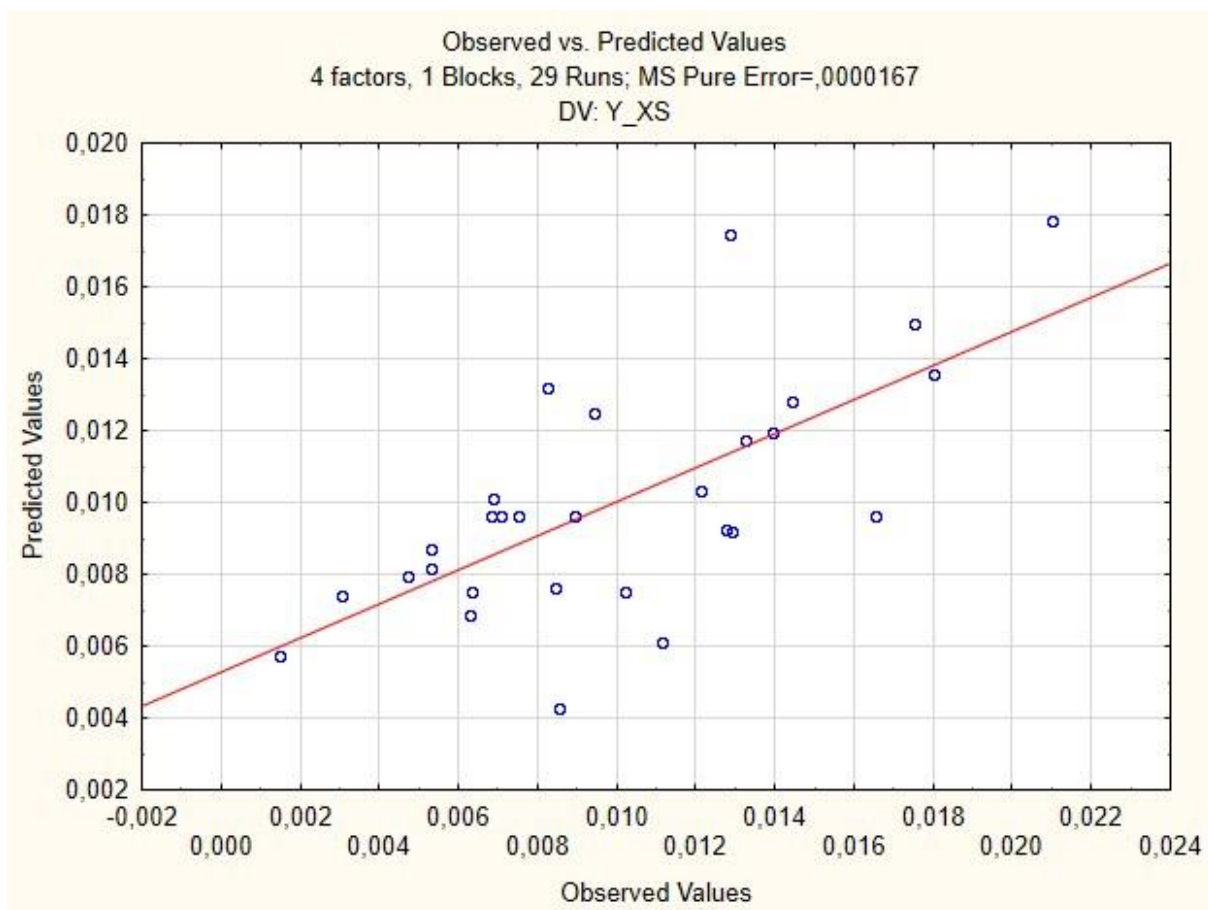
\*A concentração de lactose e de massa celular seca estão em g/L

APÊNDICE 1B – Resumo estatístico do melhor modelo quadrático encontrado em DCC, para um tempo de fermentação de 48h.

Resultados sobre os coeficientes de regressão estimados. Em vermelho estão os coeficientes significativos.

Effect and Coefficient Estimates; Var. $Y_{XS}$ ; 4 factors; 1 Block; 29 runs									
$R^2 = 55,997\%$ $R^2_{adj} = 41,329\%$ MS pure error = 0,0000167									
Fatores	Effect	Std. Error	t(4)	p	-95% Cnf Limit	+95% Cnf Limit	Coefficient	-95% Cnf Limit	+95% Cnf Limit
Constante	0,009637	0,000991	9,72464	0,000626	0,006885	0,012388	0,009637	0,006885	0,012388
Temperatura	-0,005343	0,001668	-3,20329	0,032798	-0,009975	-0,000712	-0,002672	-0,004987	-0,000356
[lactose]	-0,001227	0,001668	-0,73587	0,502630	-0,005859	0,003404	-0,000614	-0,002929	0,001702
[lactose] <sup>2</sup>	0,000963	0,001541	0,62496	0,565881	-0,003314	0,005240	0,000481	-0,001657	0,002620
[X <sub>0</sub> ]	-0,002105	0,001668	-1,26199	0,275523	-0,006736	0,002526	-0,001053	-0,003368	0,001263
pH*[X <sub>0</sub> ]	-0,003670	0,002043	-1,79664	0,146811	-0,009343	0,002002	-0,001835	-0,004671	0,001001
Temper.*[lac]	0,003057	0,002043	1,49633	0,208904	-0,002615	0,008729	0,001528	-0,001308	0,004365
Temper.*[X <sub>0</sub> ]	0,003349	0,002043	1,63922	0,176510	-0,002323	0,009021	0,001674	-0,001162	0,004510

Gráfico dos valores observados em função dos valores previstos. Pontos tendendo a uma reta de inclinação igual a 45 graus indica um modelo adequado.





APÊNDICE 3 – Memorial de cálculo do dimensionamento dos reatores.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y} * \left[ \frac{\mu_m}{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i}} \right] * X \rightarrow \int_{t_0}^t dt = - \int_{S_0}^S \left[ \frac{\left(1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i}\right) Y}{\mu_m X} \right] dS \quad (I)$$

Admitindo (II) e substituindo em (I), têm-se:

$$X = -Y(S_0 - S) + X_0 \quad (II)$$

$$\int_{t_0}^t dt = \int_{S_0}^S \left[ \frac{1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i}}{\mu_m \left(-S + S_0 - \frac{X_0}{Y}\right)} \right] dS \quad (III)$$

A integral em (III) pode ser expressa pela soma das integrais A, B, C que são:

$$A = \int_{S_0}^S \frac{1}{\mu_m \left(-S + S_0 - \frac{X_0}{Y}\right)} = \frac{\ln \left( \mu_m \left(-S + S_0 - \frac{X_0}{Y}\right) \right)}{\mu_m} \Bigg|_{S_0}^S =$$

$$= -\frac{1}{\mu_m} * \ln \left( \frac{\Delta S * Y}{X_0} + 1 \right) + C_A \quad (IV. a)$$

$$B = \int_{S_0}^S \frac{\frac{K_s}{S}}{\mu_m \left(-S + S_0 - \frac{X_0}{Y}\right)} = \frac{\ln S - \ln \left( \mu_m \left(-S + S_0 - \frac{X_0}{Y}\right) \right)}{\mu_m \left(S_0 - \frac{X_0}{Y}\right)} \Bigg|_{S_0}^S =$$

$$= \frac{1}{\mu_m \left(-S + S_0 - \frac{X_0}{Y}\right)} \left[ \ln \left( \frac{S}{S_0} \right) - \ln \left( \frac{\Delta S * Y}{X_0} + 1 \right) \right] + C_B \quad (IV. b)$$

$$C = \int_{S_0}^S \frac{S/K_i}{\mu_m \left(-S + S_0 - \frac{X_0}{Y}\right)} = \frac{1}{K_i \mu_m} \left[ -S - \left(S_0 - \frac{X_0}{Y}\right) \ln \left( \mu_m \left(-S + S_0 - \frac{X_0}{Y}\right) \right) \right] \Bigg|_{S_0}^S =$$

$$= -\frac{\left(-S_0 + \frac{X_0}{Y}\right)}{K_i \mu_m} * \ln \left( \frac{\Delta S * Y}{X_0} + 1 \right) - \frac{\Delta S}{K_i \mu_m} + C_C \quad (IV. c)$$

Em que  $C_A$ ,  $C_B$ ,  $C_C$  são as constantes de integração. Deste modo, desenvolvendo a equação (II) e unindo as constantes de integração em uma única constante C, temos a seguinte família de funções:

$$T = T_0 + \frac{1}{\mu_m} \left[ \left( -1 - \frac{1}{\left(S_0 - \frac{X_0}{Y}\right)} + \frac{-S_0 + \frac{X_0}{Y}}{K_i} \right) * \ln \left( \frac{\Delta S * Y}{X_0} + 1 \right) + \frac{\ln \left( \frac{S}{S_0} \right)}{\left(S_0 - \frac{X_0}{Y}\right)} - \frac{\Delta S}{K_i} \right] + C$$

Tomando como condição inicial  $t=t_0$  e  $t(S=S_0)=0$ , temos:

$$0 = \frac{1}{\mu_m} \left[ \left( -1 - \frac{1}{\left(S_0 - \frac{X_0}{Y}\right)} + \frac{-S_0 + \frac{X_0}{Y}}{K_i} \right) * \ln\left(\frac{0 * Y}{X_0} + 1\right) + \frac{\ln\left(\frac{S_0}{S_0}\right)}{\left(S_0 - \frac{X_0}{Y}\right)} - \frac{0}{K_i} \right] + C$$

$$0 = \frac{1}{\mu_m} \left[ \left( -1 - \frac{1}{\left(S_0 - \frac{X_0}{Y}\right)} + \frac{-S_0 + \frac{X_0}{Y}}{K_i} \right) * \ln(1) + \frac{\ln(1)}{\left(S_0 - \frac{X_0}{Y}\right)} \right] + C \rightarrow C = 0$$

Assim:

$$\begin{cases} t = t_0 \text{ e } t(S = S_0) = 0 \\ C = 0 \end{cases}$$

O resultado é, portanto, a seguinte função:

$$T = T_0 + \frac{1}{\mu_m} \left[ \left( -1 - \frac{1}{\left(S_0 - \frac{X_0}{Y}\right)} + \frac{-S_0 + \frac{X_0}{Y}}{K_i} \right) * \ln\left(\frac{\Delta S * Y}{X_0} + 1\right) + \frac{\ln\left(\frac{S}{S_0}\right)}{\left(S_0 - \frac{X_0}{Y}\right)} - \frac{\Delta S}{K_i} \right] \quad (V)$$