

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**CULTIVO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EM PROCESSOS
DESCONTÍNUO E DESCONTÍNUO ALIMENTADO UTILIZANDO MEL
INVERTIDO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Mestrando: Fernando Henrique da Silva

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Olivo

Maringá, Julho de 2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**CULTIVO DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EM PROCESSOS
DESCONTÍNUO E DESCONTÍNUO ALIMENTADO UTILIZANDO MEL
INVERTIDO PARA PRODUÇÃO DE ETANOL**

Fernando Henrique da Silva

Eng. Químico, UEM, 2013

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Olivo

Dissertação de Mestrado submetida à
Universidade Estadual de Maringá como
parte dos requisitos necessários à
obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Química, área de
Desenvolvimento de Processos

Maringá – PR – Brasil, Julho de 2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S586c Silva, Fernando Henrique da
Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em processos descontínuo e descontínuo alimentado utilizando mel invertido para produção de etanol / Fernando Henrique da Silva. -- Maringá, 2016.
146 f.: il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Olivo.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

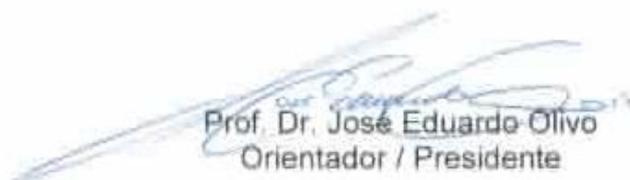
1. Biotecnologia. 2. Processos bioquímicos. 3. Fermentação alcoólica. 4. Mel invertido. 5. Regime descontínuo. 6. Regime descontínuo alimentado. 7. Levedura *Saccharomyces cerevisiae* I. Olivo, José Eduardo, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

21.ed. 660.6

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Esta é a versão final da Dissertação de Mestrado apresentada por Fernando Henrique da Silva perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 28 de julho de 2016.

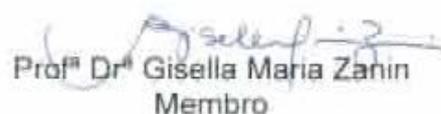
COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. José Eduardo Olivo
Orientador / Presidente



Profª Drª Rita de Cássia Bergamasco
Membro



Profª Drª Gisella Maria Zanin
Membro

Agradecimentos

À minha mãe, Lucilene Palletini, meu avô materno Pedro Poletini Neto, meu irmão Vítor Palletini Nascimento e todos os outros familiares que sempre me apoiaram e incentivaram em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Olivo, por toda a orientação e ajuda recebidos para o desenvolvimento deste trabalho; à Prof.^a Dr.^a Gisella Maria Zanin, por todo o auxílio que me proporcionou para a realização do mestrado; à banca examinadora, pelas sugestões apresentadas para o aprimoramento dessa dissertação; a Celso Lellis Bueno Netto (in memoriam) e a Renam Luis Acorsi, pelo auxílio que seus trabalhos proporcionaram no desenvolvimento dessa dissertação; ao aluno de iniciação científica Slan Henrique Marques, pela ajuda fornecida na realização das fermentações; aos técnicos dos laboratórios, em especial a Luiza P. V. Calsavara e Lauro M. Kambara, por toda a ajuda recebida nas diversas etapas experimentais realizadas; e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química por possibilitar a produção deste trabalho.

Aos amigos, em especial a Ramiro Picoli Nippes, que me ajudou em vários momentos no desenvolvimento dessa dissertação; e também a Deyvid dos Anjos, Bruno Borges, Luis de Souza, Celso Maeda, Rafael Ferro, Rafael Santiago e Fernando Kalinke, que sempre me apoiaram na busca dos meus objetivos e com quem tive bons momentos que me permitiram estar psicologicamente melhor para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

*“O universo não foi feito à medida do ser humano, mas tampouco lhe é
adverso: é-lhe indiferente.”*

(Carl Sagan)

Glossário

AR – Açúcares Redutores (Todos os monossacarídeos e dissacarídeos, com exceção da Sacarose);

ART – Açúcares Redutores Totais (Glicose, Frutose, Sacarose e outros açúcares fermentescíveis);

Fatores de Conversão do Substrato em Produto ($Y_{P/S}$) e em Células ($Y_{X/S}$) – Frações mássicas do consumo de ART pelo micro-organismo que são convertidas em Etanol e em Células. É dado em $((g \text{ (Etanol, Células)})/g \text{ ART})$;

Inversão – Processo de hidrólise da Sacarose em Glicose + Frutose;

Inversão com Enzima Invertase – Método de inversão da sacarose presente em uma solução utilizando-se da enzima invertase como agente da reação;

Inversão por Hidrólise Ácida – Método de inversão da sacarose presente em uma solução utilizando-se de pH ácido como agente da reação;

Mel Invertido – Mel que passou por processo de inversão completa da Sacarose presente em si, não possuindo mais esse açúcar praticamente em sua composição;

Método DNS – Método utilizado para determinação da concentração de ART de uma determinada amostra, que tem como elemento fundamental para seu funcionamento a substância química Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS);

Rendimento Percentual em Etanol (η_{Etanol}) da Fermentação – Porcentagem de conversão mássica de ART em Etanol quando comparada com o valor máximo estequiometricamente possível (0,511 g Etanol/g ART);

Velocidades de Consumo do Substrato (r_s), Geração de Produto (r_P) e Crescimento Celular (r_X) – Velocidades em que o micro-organismo consome o ART, produz etanol e se reproduz aumentando sua massa no fermentador, respectivamente. É dada em $((g \text{ (ART, Etanol, Células)})/L.h)$;

Resumo

Nesse trabalho foram realizados ensaios fermentativos com mel de usina como substrato e utilizando o micro-organismo na forma de fermento fresco prensado, a temperatura de 32°C e com concentração celular massa seca de 15 g/L, e tendo como variáveis a inversão ou não inversão prévia da sacarose do mel de usina, as concentrações iniciais de ART (150, 200 e 250 g/L) e o regime de operação das fermentações (descontínuo, descontínuo alimentado em pulsos e descontínuo alimentado com alimentação constante).

Nesses experimentos coletava-se a cada trinta minutos ou a cada hora uma amostra de mosto do fermentador, e analisava-se as concentrações de ART (Substrato) (S), Etanol (Produto) (P) e Celular (X) do mesmo. Utilizou-se para as análises de concentração: de ART, o método DNS Modificado; de Etanol, microdestilação seguida de análise em cromatografia a gás; e Celular, diluições adequadas da levedura contida no mosto e leitura em espectrofotômetro. Com isso foi possível analisar as velocidades de consumo de ART, produção de etanol e de crescimento celular, bem como os fatores de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$) e em massa celular ($Y_{X/S}$).

Observaram-se maiores valores de ($Y_{P/S}$) nas fermentações com inversão prévia da sacarose (0,429 g Etanol/g ART) quando comparadas às fermentações que não sofreram esse processo (0,382 g Etanol/ g ART). Contudo, a altas concentrações de ART (200 e 250 g/L), nas fermentações descontínuas, observaram-se menores valores de velocidades de reação para as fermentações com inversão prévia (27,0 g ART/ L.h e 10,1 g Etanol/ L.h) quando comparadas as sem inversão (14,6 g ART/ L.h e 6,1 g Etanol/ L.h). Obtiveram-se maiores valores de ($Y_{P/S}$) nas fermentações descontínuas alimentadas (0,413 g Etanol/ g ART) quando comparadas com as descontínuas (0,396 g Etanol/ g ART). Observaram-se maiores velocidades de reação para as fermentações no regime descontínuo (28,3 g ART/ L.h e 10,5 g Etanol/ L.h) comparativamente às fermentações descontínuas alimentadas (21,2 g ART/ L.h e 8,4 g Etanol/ L.h) nas fermentações sem inversão prévia da sacarose, e não se observou grandes efeitos nas velocidades de reação devido ao regime adotado nas fermentações com inversão prévia do mel.

Palavras-Chave: Fermentação Alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae*, Mel Invertido

Abstract

In this work were performed fermentative tests using as substrate honey of sugar and alcohol plant and using the micro-organism in the form of fresh pressed yeast, at the temperature of 32°C and with cells concentration on dry basis of 15 g/L, and having as variables the previous inversion or non-inversion of the saccharose of the honey, the initial concentrations of Total Reduced Sugars (TRS) (150, 200 and 250 g/L) and the way of operation of the fermentations (batch, fed-batch in pulses and fed-batch with constant alimentation).

In these experiments, samples of must were collected every half an hour or every hour, and the concentrations of TRS (Substrate) (S), Ethanol (Product) (P) and Cells (X) of the samples were analyzed. It was used for the concentration analysis: of TRS, the Modified 3,5 – Dinitrosalicilic Acid (DNS) method; of Ethanol, microdestilation followed by gas chromatography analysis; and Cells, adequate dilutions of the yeast existing in the must and reading in spectrophotometer. With this, it was possible to analyze the rates of consumption of TRS, production of ethanol and cells growth, as well as the factors of conversion of the substrate in product ($Y_{P/S}$) and in cells ($Y_{X/S}$).

It was observed higher values of ($Y_{P/S}$) in the fermentations with previous inversion of the saccharose (0,429 g Ethanol/ g TRS) when compared with the fermentations that not suffered this process (0,382 g Ethanol/ g TRS). However, at high concentrations of TRS (200 and 250 g/L), in the batch fermentations, it was observed lower values of reaction rates to the fermentations with previous inversion (27,0 g TRS/ L.h e 10,1 g Ethanol/ L.h) when compared to the without inversion (14,6 g TRS/ L.h e 6,1 g Ethanol/ L.h). It was obtained higher values of ($Y_{P/S}$) in the fed-batch fermentations (0,413 g Ethanol/ g TRS) when compared with the batch (0,396 g Ethanol/ g TRS). It was observed higher reaction rates to the batch fermentations (28,3 g TRS/ L.h e 10,5 g Ethanol/ L.h) comparatively to the fed-batch fermentations (21,2 g ART/ L.h e 8,4 g Ethanol/ L.h) for the fermentations without previous inversion of the saccharose, and it wasn't observed great effects in the reaction rates due to the way of operation adopted in the fermentations with previous inversion of the saccharose.

Key Words: Alcoholic Fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*, Inverted Honey

Lista de Figuras

Figura 1: Aspecto Visual de Dornas de Fermentação. Fonte: SERMATEC (2016).....	9
Figura 2: Processo de Fermentação Descontínuo. Fonte: ZAMBELLI (2016) .	10
Figura 3: Processo de Fermentação Descontínua Alimentada. Fonte: VAZ et al (2016).....	11
Figura 4: Célula de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Reprodução por Brotamento). Fonte: BATISTOTE (2006).....	14
Figura 5: 1ª Diluição Inicial do Mel Rico (a); Inversão da Sacarose Quando Houve Adição de Invertase e Tampão de Acetato Antes da 1ª Diluição Inicial do Mel Rico (b); Fonte: O Autor.....	30
Figura 6: Segunda Diluição no Balão Volumétrico e Mel Transferido para Erlenmeyer e Fechado (a); Elementos Inseridos na Autoclave para Esterilização (b). Fonte: O Autor	35
Figura 7: Instrumentos e Frascos Inseridos na Capela de Fluxo Laminar Antes da Fermentação (a); Aspecto Visual do Fermentador Durante a Fermentação (b); Fonte: O Autor	47
Figura 8: Amostra de Mosto Coletada do Fermentador (a); Amostra de Mosto Colocada em Tubos de Fundo Cônico (b); Centrífuga Utilizada (c); Fonte: O Autor.....	48
Figura 9: Da Esquerda para Direita: Amostras de Mosto, da Primeira e da Segunda Lavagens Retiradas da Centrífuga (a); Amostras de Mosto, da Primeira e da Segunda Lavagens Após Inserção de Água Destilada (b); Amostras de Mosto e da Primeira Lavagem Ressuspendidas (c). Fonte: O Autor.....	49
Figura 10: Aspecto Visual do Resultado da Análise DNS a Cada Hora de Uma Fermentação Alcoólica Realizada. Fonte: O Autor.....	52
Figura 11: Transferência da Massa de Levedura Para Balão Volumétrico (a); Série de Amostras de Massas Celulares Suspensas em Balões Volumétricos (b); Diluição da Solução dos Balões Volumétricos (c). Fonte: O Autor	55
Figura 12: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 1	63

Figura 13: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 1	63
Figura 14: Variação das Concentrações de ART, AR e Sacarose Com o Tempo na Fermentação 1	64
Figura 15: Comparação das Inversões por Hidrólise Ácida e por Invertase na Fermentação 1	64
Figura 16: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 2	65
Figura 17: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 2	65
Figura 18: Variação das Concentrações de ART, AR e Sacarose Com o Tempo na Fermentação 2	66
Figura 19: Comparação das Inversões por Hidrólise Ácida e por Invertase na Fermentação 2	66
Figura 20: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 3	67
Figura 21: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 3	67
Figura 22: Variação das Concentrações de ART, AR e Sacarose Com o Tempo na Fermentação 3	68
Figura 23: Comparação das Inversões por Hidrólise Ácida e por Invertase na Fermentação 3	68
Figura 24: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 4	69
Figura 25: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 4	69
Figura 26: Variação das Concentrações de ART, AR e Sacarose Com o Tempo na Fermentação 4	70
Figura 27: Comparação das Inversões por Hidrólise Ácida e por Invertase na Fermentação 4	70
Figura 28: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 5	71
Figura 29: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 5	71

Figura 30: Variação das Concentrações de ART, AR e Sacarose Com o Tempo na Fermentação 5	72
Figura 31: Comparação das Inversões por Hidrólise Ácida e por Invertase na Fermentação 5	72
Figura 32: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 6	73
Figura 33: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 6	73
Figura 34: Variação das Concentrações de ART, AR e Sacarose Com o Tempo na Fermentação 6	74
Figura 35: Comparação das Inversões por Hidrólise Ácida e por Invertase na Fermentação 6	74
Figura 36: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 7	75
Figura 37: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 7	76
Figura 38: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 8	77
Figura 39: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 8	77
Figura 40: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 9	78
Figura 41: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 9	79
Figura 42: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 10	80
Figura 43: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 10	80
Figura 44: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 11	83
Figura 45: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 11	84
Figura 46: Variação das Concentrações de ART, AR e Sacarose Com o Tempo na Fermentação 11	85

Figura 47: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo em Modelo Unificado para a Fermentação 11	86
Figura 48: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 12	87
Figura 49: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 12	88
Figura 50: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo em Modelo Unificado para a Fermentação 12	89
Figura 51: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 13	90
Figura 52: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 13	91
Figura 53: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo em Modelo Unificado para a Fermentação 13	92
Figura 54: Variação das Massas Adicionadas e Consumidas de ART e Produzidas de Etanol no Fermentador com o Tempo na Fermentação 14	94
Figura 55: Variação da Massa de Células no Fermentador com o Tempo na Fermentação 14	95
Figura 56: Variação das Massas Adicionadas e Consumidas de ART e Produzidas de Etanol no Fermentador com o Tempo na Fermentação 15	96
Figura 57: Variação da Massa de Células no Fermentador com o Tempo na Fermentação 15	96
Figura 58: Ajustes de r_s (a) e r_p (b) em Função de S para Fermentações Descontínuas Sem Inversão Prévia da Sacarose e de r_s (c) e r_p (d) em Função de S para Fermentações Descontínuas Com Inversão Prévia da Sacarose..	103
Figura 59: Análise DNS: Inserção de Solução de Glicose+Frutose (a); Inserção de Solução DNS (b); Exemplo de Amostra após 10 Minutos de Fervura (c); Amostra Após Adição de Água Destilada (d). Fonte: O Autor	128
Figura 60: Gradiente de Cor de uma Curva Padrão DNS (a); Espectrofotômetro Shimadzu Utilizado nas Leituras de Absorbância (b). Fonte: O Autor.....	129
Figura 61: Método de Inversão por Hidrólise Ácida Aplicado em Série: Balões Imersos em Banho a 65 - 70°C (a); Neutralização de Acidez com Uso de pHmetro (b). Fonte: O Autor.....	130

Figura 62: Solução de Invertase e Tampão de Acetato (a); Amostra que Passou pelo Método de Inversão da Sacarose Utilizando Invertase. Fonte: O Autor .	131
Figura 63: Soluções de Levedura Utilizadas Para Obtenção da Curva-Padrão de Concentração Celular. Fonte: O Autor	132
Figura 64: Levedura Seca em Estufa pelo Método Direto (a); e pelo Método com Microfiltração (b); e Equipamento Utilizado para Microfiltração (c). Fonte: O Autor	135
Figura 65: Microdestilador (a); Cromatógrafo à Gás (b). Fonte: O Autor	137
Figura 66: Representação de um Cromatograma Típico (a); Valores das Áreas de Etanol e Água Calculados pelo Software para o Cromatograma (b)	140
Figura 67: Ajuste da Curva Padrão da Análise DNS para o 1º Lote de Reagente	141
Figura 68: Ajuste da Curva Padrão da Análise DNS para o 2ª Lote de Reagente	142
Figura 69: Ajuste da Curva Padrão de Massa Celular	144

Lista de Tabelas

Tabela 1: Planejamento das Condições Iniciais das Fermentações Realizadas	26
Tabela 2: Cálculo das Diluições Iniciais do Mel Rico de Usina Sucroalcooleira	33
Tabela 3: Concentração de ART, AR e Sacarose e Porcentagem de Sacarose do Mel Utilizado nas Fermentações	34
Tabela 4: Cálculo do Volume Total de Mosto e Volumes de Ureia e Triplofosfato Adicionados das Fermentações Descontínuas	36
Tabela 5: Massas de Levedura e de Mosto Totais Pesadas nas Fermentações Descontínuas	37
Tabela 6: Cálculo do Volume Total de Mosto Após a Primeira Inserção de Mel e Volumes de Ureia e Triplofosfato Adicionados das Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação de Mel em Pulsos	38
Tabela 7: Massas de Levedura e de Mosto Totais Pesadas nas Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação de Mel em Pulsos	39
Tabela 8: Massas e Volumes Totais de Mosto Antes e Depois das N-ésimas Inserções de Mel e de Mosto Primário Inserido nas N-ésimas Inserções de Mel	40
Tabela 9: Preparação das Soluções de Etanol	57
Tabela 10: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 1	63
Tabela 11: Variação das Concentrações de ART com Inversão por Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 1	64
Tabela 12: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 2	65
Tabela 13: Variação das Concentrações de ART com Inversão por Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 2	66
Tabela 14: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 3	67

Tabela 15: Variação das Concentrações de ART com Inversão por Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 3	68
Tabela 16: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 4	69
Tabela 17: Variação das Concentrações de ART com Inversão por Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 4	70
Tabela 18: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 5	71
Tabela 19: Variação das Concentrações de ART com Inversão por Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 5	72
Tabela 20: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 6	73
Tabela 21: Variação das Concentrações de ART com Inversão por Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 6	74
Tabela 22: pH do Mosto e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 7	75
Tabela 23: pH do Mosto e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 8	76
Tabela 24: pH do Mosto e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 9	78
Tabela 25: pH do Mosto e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 10	79
Tabela 26: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 11	83
Tabela 27: Variação das Concentrações de ART com Inversão por Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 11	84
Tabela 28: Análise dos Três Pulsos de Mel Adicionados em Modelo Unificado Para a Fermentação 11	85

Tabela 29: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 12	87
Tabela 30: Variação das Concentrações de ART com Inversão com Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 12	88
Tabela 31: Análise dos Três Pulsos de Mel Adicionados em Modelo Unificado Para a Fermentação 12.....	88
Tabela 32: pH do Mosto e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 13	90
Tabela 33: Análise dos Três Pulsos de Mel Adicionados em Modelo Unificado Para a Fermentação 13.....	91
Tabela 34: Variações de Volume de Mel Total e de Massas de ART Adicionado e Consumido, de Etanol Produzido e de Células no Decorrer da Fermentação 14	94
Tabela 35: Variações de Volume de Mel Total e de Massas de ART Adicionado e Consumido, de Etanol Produzido e de Células no Decorrer da Fermentação 15	95
Tabela 36: Valores de Velocidade de Consumo de ART, de Etanol Produzido, de $Y_{P/S}$ e de Rendimento em Etanol Para as Fermentações	97
Tabela 37: Porcentagem de Sacarose Invertida e Erro da Técnica de Inversão por Invertase na Primeira Amostra Coletada do Fermentador	100
Tabela 38: Dados Utilizados Para Ajuste dos Modelos Realizado	102
Tabela 39: Ajustes das Velocidades de Consumo de Açúcares e Produção de Etanol para os Modelos Linear, Exponencial e Hiperbólico	102
Tabela 40: Valores de Concentração Inicial de ART, r_s , r_p e $Y_{P/S}$ para cada Inserção de Mel Realizada nas Fermentações 11, 12 e 13.	104
Tabela 41: Concentrações Residuais de ART no Final da Fermentação de Cada Inserção de Mel no Fermentador.....	106
Tabela 42: Valores de Velocidade de Consumo de ART, de Crescimento Celular e de $Y_{X/S}$ Para as Fermentações.....	110
Tabela 43: Preparação de Soluções de Glicose + Frutose de 0 a 1 g/L com Passo Crescente de 0,1 g/L	127
Tabela 44: Relação da Concentração de Glicose + Frutose com a Medida de Absorbância Obtida pela Análise DNS Para o 1º Lote de Reagente.....	141

Tabela 45: Relação da Concentração de Glicose + Frutose com a Medida de Absorbância Obtida pela Análise DNS Para o 2º Lote de Reagente.....	142
Tabela 46: Valores de Concentração de ART Após a Inversão por Hidrólise Ácida e por Invertase	143
Tabela 47: Relação da Concentração Celular com a Medida de Absorbância Obtida por Leitura no Espectrofotômetro	143
Tabela 48: Cálculo da Porcentagem de Massa Seca Pelo Método Direto	144
Tabela 49: Cálculo da Massa Úmida Microfiltrada	145
Tabela 50: Cálculo da Massa Seca da Membrana.....	145
Tabela 51: Cálculo da Porcentagem de Massa Seca Pelo Método com Microfiltração.....	145
Tabela 52: Cálculo da Precisão da Cromatografia Gasosa e Eficiência do Microdestilador.....	146

Lista de Equações

Equação 1: Relação Entre a Densidade e Concentração de uma Solução Açucarada	27
Equação 2: Relação entre a Massa e o Volume de uma Solução Açucarada .	27
Equação 3: Equação da 1ª Diluição a Partir do Mel Rico.....	28
Equação 4: Equação da 2ª Diluição a Partir do Mel da 1ª Diluição	28
Equação 5: Cálculo da Massa Máxima de Sacarose em uma Alíquota de Mel Rico	29
Equação 6: Cálculo da Massa de Invertase Utilizada nas Fermentações	29
Equação 7: Cálculo do Volume Total de Mosto para as Fermentações Descontínuas	36
Equação 8: Cálculo da Massa Total de Mosto para as Fermentações Descontínuas	36
Equação 9: Cálculo da Massa de Levedura Adicionada para as Fermentações Descontínuas	36
Equação 10: Cálculo do Volume de Ureia e Triplofosfato Adicionados para as Fermentações Descontínuas.....	36
Equação 11: Cálculo do Volume de Mosto Primário Adicionado na 1ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	37
Equação 12: Cálculo do Volume Total de Mosto na 1ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	37
Equação 13: Cálculo da Massa Total de Mosto na 1ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	38
Equação 14: Cálculo da Massa de Levedura Adicionada na 1ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	38
Equação 15: Cálculo do Volume de Ureia e Triplofosfato Adicionados na 1ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos.....	38

Equação 16: Cálculo da Concentração de Etanol Ajustada Para a 1ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	39
Equação 17: Cálculo da Concentração de Etanol Ajustada Para o Primeiro Ponto da 2ª e da 3ª Inserções de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	39
Equação 18: Cálculo da Concentração de Etanol Ajustada Para o i-ésimo Ponto da 2ª e da 3ª Inserções de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	39
Equação 19: Cálculo da Concentração Celular Ajustada Para a 1ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	39
Equação 20: Cálculo da Concentração Celular Ajustada Para o Primeiro Ponto da 2ª e da 3ª Inserções de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	40
Equação 21: Cálculo da Concentração Celular Ajustada Para o i-ésimo Ponto da 2ª e da 3ª Inserções de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	40
Equação 22: Valores Sequenciais de i	40
Equação 23: Cálculo do Tempo Ajustado para o Modelo Unificado na 1ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos.....	41
Equação 24: Cálculo do Tempo Ajustado para o Modelo Unificado no Primeiro Ponto na 2ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	41
Equação 25: Cálculo do Tempo Ajustado para o Modelo Unificado no i-ésimo Ponto na 2ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	41
.....	41
Equação 26: Cálculo do Tempo Ajustado para o Modelo Unificado no Primeiro Ponto na 3ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	41

Equação 27: Cálculo do Tempo Ajustado para o Modelo Unificado no i-ésimo Ponto na 3ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	41
Equação 28: Cálculo da Concentração de Etanol Ajustada para o Modelo Unificado na 1ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	41
Equação 29: Cálculo da Concentração de Etanol Ajustada para o Modelo Unificado no Primeiro Ponto na 2ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos.....	41
Equação 30: Cálculo da Concentração de Etanol Ajustada para o Modelo Unificado no i-ésimo Ponto na 2ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos.....	41
Equação 31: Cálculo da Concentração de Etanol Ajustada para o Modelo Unificado no Primeiro Ponto na 3ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos.....	41
Equação 32: Cálculo da Concentração de Etanol Ajustada para o Modelo Unificado no i-ésimo Ponto na 3ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos.....	41
Equação 33: Cálculo da Concentração de ART Ajustada para o Modelo Unificado no Primeiro Ponto na 1ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos.....	41
Equação 34: Cálculo da Concentração de ART Ajustada para o Modelo Unificado no i-ésimo Ponto na 1ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos.....	41
Equação 35: Cálculo da Concentração de ART Ajustada para o Modelo Unificado no Primeiro Ponto na 2ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos.....	42
Equação 36: Cálculo da Concentração de ART Ajustada para o Modelo Unificado no i-ésimo Ponto na 2ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos.....	42
Equação 37: Cálculo da Concentração de ART Ajustada para o Modelo Unificado no Primeiro Ponto na 3ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos.....	42

Equação 38: Cálculo da Concentração de ART Ajustada para o Modelo Unificado no i-ésimo Ponto na 3ª Inserção de Mel para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos.....	42
Equação 39: Cálculo do Volume de Mosto Primário Alimentado para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante	42
Equação 40: Cálculo da Massa de Mosto Primário Alimentado para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante	42
Equação 41: Cálculo do Volume de Solução de Levedura Inicial para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante	42
Equação 42: Cálculo da Massa de Solução de Levedura Inicial para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante	42
Equação 43: Cálculo do Volume de Mosto no Fermentador em um Tempo t para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante	43
Equação 44: Cálculo da Massa de ART Adicionada no Fermentador em um Tempo t para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante.....	43
Equação 45: Cálculo da Massa Residual de ART no Fermentador em um Tempo t para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante.....	43
Equação 46: Cálculo da Massa de ART Consumida no Fermentador em um Tempo t para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante.....	43
Equação 47: Cálculo das Massas de Etanol Produzidas e de Células no Fermentador em um Tempo t para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante.....	43
Equação 48: Cálculo das Concentrações de ART, Etanol e Celular Ajustadas das Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante para Comparação com as Fermentações Descontínuas	43
Equação 49: Equação de um Modelo Linear para Representar as Curvas de Consumo do Substrato, de Geração de Produto e de Crescimento Celular	43
Equação 50: Definição de Velocidades de Consumo do Substrato (r_S), de Geração do Produto (r_P) e de Crescimento Celular (r_X)	44
Equação 51: Inserção do Modelo Linear nas Equações de Velocidade.....	44

Equação 52: Equação de Velocidade para um Modelo Linear Após Derivação	44
Equação 53: Cálculo dos Valores de Frações Mássicas de Conversão de Substrato em Etanol e Células ($Y_{(P,X)/S}$).....	44
Equação 54: Cálculo do Rendimento em Etanol	44
Equação 55: Fórmula Fundamental da Diluição e Extrapolação da Fórmula Fundamental da Diluição para Diluições Múltiplas	51
Equação 56: Cálculo da Concentração de ART de Uma Amostra de Mosto Coletada no Fermentador	52
Equação 57: Cálculo da Concentração Teórica de ART da Solução de Sacarose Preparada Para Teste Comparativo Entre as Técnicas de Inversão da Sacarose Por Hidrólise Ácida e Utilizando Invertase	53
Equação 58: Cálculo da Concentração de Sacarose de uma Determinada Amostra.....	53
Equação 59: Cálculo da Concentração Celular Massa Seca de Uma Amostra de Mosto Coletada no Fermentador.....	55
Equação 60: Cálculo da Porcentagem Mássica de Etanol de Uma Amostra de Mosto Coletada no Fermentador.....	56
Equação 61: Cálculo da Densidade de Solução Alcoólica de Uma Amostra de Mosto Coletada no Fermentador.....	57
Equação 62: Cálculo da Concentração de Etanol de Uma Amostra de Mosto Coletada no Fermentador	57
Equação 63: Cálculo da Porcentagem de Erro da Cromatografia.....	58
Equação 64: Cálculo da Eficiência da Destilação	58
Equação 65: Modelo de Monod Relacionando as Velocidades de Consumo do Substrato (r_s) e de Geração do Produto (r_p) com a concentração de Substrato(S).....	101
Equação 66: Modelo de Ghose e Tyagi Relacionando as Velocidades de Consumo do Substrato (r_s) e de Geração do Produto (r_p) com a concentração de Substrato(S)	101
Equação 67: Modelo de Aiba et al Relacionando as Velocidades de Consumo do Substrato (r_s) e de Geração do Produto (r_p) com a concentração de Substrato(S).....	101

Equação 68: Modelo de Andrews Relacionando as Velocidades de Consumo do Substrato (r_s) e de Geração do Produto (r_p) com a concentração de Substrato(S)	101
Equação 69: Equação da Curva-Padrão da Análise DNS.....	128
Equação 70: Equação da Curva-Padrão da Concentração Celular	132
Equação 71: Cálculo da Massa de Fermento Seco para Medida de Porcentagem de Massa Seca pelo Método Direto	133
Equação 72: Cálculo da Porcentagem de Massa Seca pelo Método Direto ..	133
Equação 73: Cálculo da Massa de Solução Microfiltrada para Medida de Porcentagem de Massa Seca pelo Método com Microfiltração.....	134
Equação 74: Cálculo do Volume de Solução Microfiltrada para Medida de Porcentagem de Massa Seca pelo Método com Microfiltração.....	134
Equação 75: Cálculo da Massa Úmida de Fermento Microfiltrada para Medida de Porcentagem de Massa Seca pelo Método com Microfiltração.....	134
Equação 76: Cálculo da Massa do Filtro Seco Utilizado Para Determinação da Porcentagem de Massa Seca do Filtro para Medida de Porcentagem de Massa Seca pelo Método com Microfiltração	134
Equação 77: Cálculo da Porcentagem de Massa Seca do Filtro para Medida de Porcentagem de Massa Seca pelo Método com Microfiltração.....	134
Equação 78: Cálculo da Massa do Filtro Seco Utilizado na Microfiltração da Solução de Levedura para Medida de Porcentagem de Massa Seca pelo Método com Microfiltração	135
Equação 79: Cálculo da Massa de Fermento Seca Microfiltrada para Medida de Porcentagem de Massa Seca pelo Método com Microfiltração.....	135
Equação 80: Cálculo da Porcentagem de Massa Seca pelo Método com Microfiltração	135

Sumário

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. O Etanol	3
2.2. A Cana de Açúcar	4
2.3. Produção de Etanol.....	5
2.3.1. Lavagem.....	5
2.3.2. Moagem.....	6
2.3.3. Eliminação de Impurezas.....	7
2.3.4. Fermentação.....	7
2.3.4.1. Processo Descontínuo.....	9
2.3.4.2. Processo Descontínuo Alimentado.....	10
2.3.4.3. Processo Contínuo	12
2.3.5. Destilação e Desidratação	12
2.4. O Agente da Fermentação Alcoólica.....	13
2.5. Fatores que Afetam a Fermentação Alcoólica	16
2.5.1. pH	16
2.5.2. Temperatura	17
2.5.3. Inibição e Repressão	18
2.5.4. Concentração do Substrato	19
2.5.5. Concentração de Produto (Etanol).....	19
2.5.6. Oxigênio Dissolvido	20
2.5.7. Contaminação Bacteriana.....	21
2.6. Motivação do Trabalho.....	22
3. Materiais e Métodos	24
3.1. Materiais	24
3.1.1. Meio de Cultura.....	24

3.1.2. Suplementação de Nutrientes do Meio de Cultura.....	24
3.1.3. Micro-Organismo	24
3.1.4. Fermentador	24
3.1.5. Elementos Diversos Utilizados em Preparos e Análises.....	25
3.2. Métodos	26
3.2.1. Ensaio Fermentativo	26
3.2.1.1. Preparação do Substrato.....	27
3.2.1.1.1. Diluição Inicial e Inversão.....	27
3.2.1.1.2. Suplementação de Nutrientes	34
3.2.1.1.3. Esterilização	34
3.2.1.2. Cálculo de Parâmetros Para Fermentações Descontínuas	35
3.2.1.3. Cálculo de Parâmetros Para Fermentações Descontínuas Alimentadas com Inserção de Mel em Pulsos.....	37
3.2.1.4. Cálculo de Parâmetros Para Fermentações Descontínuas Alimentadas Com Inserção de Mel em Vazão Constante	42
3.2.1.5. Método de Análise dos Resultados das Fermentações.....	43
3.2.1.6. Inserção de Instrumentos e Frascos na Capela e Esterilização Adicional com Ultravioleta	44
3.2.1.7. Preparo do Inóculo	45
3.2.1.8. Início da Fermentação	45
3.2.1.9. Retirada de Amostras	47
3.2.2. Medida da Concentração de Açúcares Redutores Totais (ART): Análise DNS	50
3.2.2.1. Preparação da Solução de DNS.....	51
3.2.2.2. Obtenção da Curva-Padrão da Solução de DNS	51
3.2.2.3. Análise da Concentração de ART em uma Determinada Amostra	51
3.2.2.4. Método de Inversão da Sacarose por Hidrólise Ácida	52

3.2.2.5. Método de Inversão da Sacarose Utilizando Invertase	52
3.2.2.6. Comparação dos Métodos de Inversão da Sacarose por Hidrólise Ácida e Utilizando Invertase	53
3.2.2.7. Medida da Concentração de Sacarose em uma Amostra	53
3.2.3. Medida da Concentração Celular.....	53
3.2.3.1. Curva-Padrão de Concentração Celular.....	53
3.2.3.2. Obtenção da Porcentagem de Massa Seca da Levedura	54
3.2.3.2.1. Por Método Direto	54
3.2.3.2.2. Por Método com Microfiltração.....	54
3.2.3.3. Medida da Concentração Celular Massa Seca de uma Determinada Amostra.....	54
3.2.4. Medida da Concentração de Etanol.....	56
3.2.4.1. Análise da Concentração de Etanol de uma Determinada Amostra	56
3.2.4.1.1. Microdestilação	56
3.2.4.1.2. Cromatografia a Gás	56
3.2.4.1.3. Concentração de Etanol com Resultado da Cromatografia a Gás.....	56
3.2.4.2. Análise da Precisão da Cromatografia e da Eficiência da Destilação.....	57
4. Resultados e Discussão.....	59
4.1. Curva Padrão da Análise DNS.....	59
4.2. Teste Comparativo dos Métodos de Inversão por Hidrólise Ácida e por Invertase	59
4.3. Curva Padrão da Concentração Celular	60
4.4. Cálculo da Porcentagem de Massa Seca – Método Direto.....	60
4.5. Cálculo da Porcentagem de Massa Seca – Método com Microfiltração	60
4.6. Teste da Precisão da Cromatografia Gasosa e da Eficiência da Destilação	61

4.7. Resultados das Fermentações Descontínuas.....	61
4.7.1. Introdução dos Resultados das Fermentações Descontínuas.....	61
4.7.2. Fermentação 1 – Resultados.....	63
4.7.3. Fermentação 2 – Resultados.....	65
4.7.4. Fermentação 3 – Resultados.....	67
4.7.5. Fermentação 4 – Resultados.....	69
4.7.6. Fermentação 5 – Resultados.....	71
4.7.7. Fermentação 6 – Resultados.....	73
4.7.8. Fermentação 7 – Resultados.....	75
4.7.9. Fermentação 8 – Resultados.....	76
4.7.10. Fermentação 9 – Resultados.....	78
4.7.11. Fermentação 10 – Resultados.....	79
4.8. Resultados das Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação de Mel em Pulsos.....	81
4.8.1. Introdução dos Resultados das Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos.....	81
4.8.2. Fermentação 11 – Resultados.....	83
4.8.3. Fermentação 12 – Resultados.....	87
4.8.4. Fermentação 13 – Resultados.....	90
4.9. Resultados das Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante.....	93
4.9.1. Introdução dos Resultados das Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante.....	93
4.9.2. Fermentação 14 – Resultados.....	94
4.9.3. Fermentação 15 – Resultados.....	95
4.10. Discussão do Resultado das Fermentações Realizadas.....	97
4.10.1. Análise Geral das Fermentações para as Velocidades de Consumo do Substrato e Geração do Produto, ($Y_{P/S}$) e Rendimento em Etanol.....	97

4.10.2. Análise dos Resultados das Fermentações Descontínuas	98
4.10.3. Análise dos Resultados das Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos	104
4.10.4. Análise dos Resultados das Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante	107
4.10.5. Análise Geral das Fermentações para as Velocidades de Consumo do Substrato e Crescimento Celular, de $Y_{X/S}$ e valores de pH.	109
5. Conclusões.....	111
6. Referências	114
Apêndice A – Preparação de Soluções Auxiliares Utilizadas Para a Realização dos Experimentos.....	124
A.1. Preparação de Solução de Tampão de Acetato 1 mol/L pH 4,5.....	124
A.2. Preparação da Solução de Ureia 40 g/L.....	124
A.3. Preparação da Solução de Triplofosfato de Sódio 100 g/L.....	124
A.4. Preparação da Solução de DNS.....	124
A.5. Preparação da Solução de Ácido Clorídrico a 1,3 mol/L	126
A.6. Preparação da Solução de Hidróxido de Sódio a 4 mol/L	126
Apêndice B – Detalhamento de Metodologia	126
B.1. Obtenção da Curva-Padrão da Solução de DNS.....	126
B.2. Método de Inversão da Sacarose por Hidrólise Ácida	129
B.3. Método de Inversão da Sacarose Utilizando Invertase.....	130
B.4. Obtenção da Curva-Padrão de Concentração Celular	131
B.5. Obtenção da Porcentagem de Massa Seca da Levedura Pelo Método Direto	132
B.6. Obtenção da Porcentagem de Massa Seca da Levedura Pelo Método Com Microfiltração	133
B.7. Metodologia de Realização da Microdestilação.....	135
B.8. Metodologia de Realização da Cromatografia a Gás	136

Apêndice C – Figuras e Tabelas de Curvas-Padrão e Análise de Parâmetros Operacionais	141
C.1. Curva Padrão da Análise DNS	141
C.2. Teste Comparativo dos Métodos de Inversão por Hidrólise Ácida e por Invertase	143
C.3. Curva Padrão da Concentração Celular	143
C.4. Cálculo da Porcentagem de Massa Seca – Método Direto	144
C.5. Cálculo da Porcentagem de Massa Seca – Método com Microfiltração	145
C.6. Teste da Precisão da Cromatografia Gasosa e da Eficiência da Destilação	146

1. Introdução

A energia é essencial para o funcionamento e desenvolvimento de um país nos tempos contemporâneos. A energia é obtida da natureza de diversas formas, formas essas que definem a chamada matriz energética. Dentro da matriz energética mundial atual, os combustíveis fósseis (petróleo, carvão mineral e gás natural) compõem 80,3% da oferta mundial de energia (energia primária) e 66,7% do consumo energético final mundial, sendo, portanto, elementos essenciais na obtenção de energia pelo ser humano. Entretanto, os combustíveis fósseis não são renováveis e possuem reservas limitadas, o que gera a necessidade de desenvolver fontes alternativas de energia, de preferência renováveis (BARROS, 2007). O aumento de interesse por fontes de energia renováveis deve-se também a motivos econômicos e ambientais, como os preços flutuantes do petróleo, o controle de preços realizado por relativamente poucos países produtores, a emissão de gases poluentes e sua relação com o aquecimento global, entre outros (NASS et al, 2007).

Uma fonte de energia renovável que tem se mostrado bastante atrativa nos tempos atuais é o etanol, sendo o Brasil um dos maiores produtores e exportadores do mundo desse combustível (GOMES, 2009). A produção atual mundial de etanol combustível é em torno de 97 bilhões de litros, sendo cerca de 95% dessa quantidade produzida pela fermentação de açúcares fermentescíveis pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (RENEWABLE FUELS ASSOCIATION, 2016). Nesse contexto, qualquer melhoria em produtividade e/ou rendimento em etanol que se consiga desenvolver no processo de fermentação alcoólica realizado nas usinas brasileiras pode resultar em um aumento da produção em milhares ou até milhões de litros.

Desta forma, esse trabalho teve como objetivo realizar fermentações alcoólicas utilizando como substrato mel rico de usina sucroalcooleira diluído e suplementado e como micro-organismo responsável pela fermentação a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, tendo como variáveis a inversão ou não-inversão da sacarose presente no mel antes da realização da fermentação, da concentração inicial de ART (150, 200 e 250 g/L) e do regime de operação utilizado (descontínuo, descontínuo alimentado com alimentação do substrato

em pulsos e descontínuo alimentado com alimentação constante de substrato), e analisar como essas variáveis interferem nas velocidades de consumo de ART, produção de etanol e variação da concentração celular, fração mássica de ART consumida convertida em etanol ($Y_{P/S}$) e em massa celular ($Y_{X/S}$) e rendimento em etanol (η_{Etanol}), e com base nos resultados obtidos encontrar os parâmetros operacionais mais interessantes de acordo com as condições de resposta que se deseja possuir.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. O Etanol

Nos anos 70 e 80, o barril de petróleo teve alta de preços de US\$2,50 em 1973, US\$10,50 em 1974 e US\$34,40 em 1981 (BERTELLI, 1992). Esse fator, juntamente com uma estrutura existente adequada (existência de mão-de-obra de baixa qualificação, terras e clima aptos, experiência em produção industrial de etanol, setor açucareiro desenvolvido e com capacidade ociosa) favoreceu a criação em 1975 do Programa Nacional do Álcool (PROALCOOL), que em uma primeira fase fez a produção de etanol anual brasileira subir de 600 milhões de litros na safra 1975/76 para 3,4 bilhões de litros na safra 1979/80 (CARVALHO, 1996), e em uma segunda fase registrou um pico de 11,8 bilhões de litros na safra de 1985/86, tornando o Brasil o maior produtor de etanol por via fermentativa na época (MAGALHÃES et al, 1991).

O uso de etanol como combustível carburante se mostrou muito interessante para países com grande extensão territorial para a plantação de cana-de-açúcar e poucas reservas petrolíferas. Com o fim do PROALCOOL e com o aumento da atividade petrolífera e redução dos preços internacionais da gasolina na década de 90, ocorreu uma retração no consumo de etanol, o que mudou a partir de 2003 com a criação dos veículos flexfuel e devido a questões econômicas, políticas e ambientais, elevando novamente o consumo de álcool no Brasil (STEINLE, 2013), sendo a produção anual de álcool total no Brasil de 14,74 bilhões de litros na safra 2003/04 e 28,39 bilhões de litros na safra 2014/15 (UNICA⁽¹⁾, 2016). O Brasil foi ultrapassado pelos Estados Unidos em 2007 como maior produtor mundial de etanol (VALDES, 2007), contudo a maior parte do etanol estadunidense é produzida por fermentação utilizando o milho como matéria-prima, que possui um balanço energético de 1,3 unidades de energia obtidas por unidade de energia gasta para a produção de etanol, muito inferior ao valor de 8,0 obtido no Brasil por fermentação utilizando a cana-de-açúcar como matéria-prima (LEITE, 2005).

O setor sucroalcooleiro é responsável pela movimentação de 2% do PIB brasileiro, sendo responsável por milhões de empregos diretos e indiretos, permitindo ao Brasil ser o único país a ter um programa de combustível

alternativo ao petróleo implantado em larga escala, com vantagens sociais, ambientais e econômicas (MAPA, 2016).

O etanol pode ser aproveitado de diversas formas pela sociedade. Em sua forma hidratada (com cerca de 5% de água), é utilizado como combustível automotivo diretamente no Brasil, na produção de bebidas, alimentos, produtos de limpeza, remédios, entre outros. Já em sua forma pura (álcool anidro) é usado como aditivo obrigatório misturado à gasolina na proporção de 20% e aditivo opcional até a porcentagem de 8% no diesel no Brasil, além de ser matéria prima de solventes, aerossóis, tintas, entre outros (NOVACANA⁽¹⁾, 2016). O etanol anidro é também matéria-prima para a produção de biodiesel, combustível renovável obtido da reação de transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois de cadeia curta que vem tendo sua proporção de mistura ao diesel de petróleo gradativamente aumentada com o passar dos anos no Brasil (BIODIESELBR, 2016).

2.2. A Cana de Açúcar

A cana-de-açúcar é uma gramínea semi-perene pertencente a família Poaceae, do gênero *Saccharum*, originária do sudeste da Ásia e que foi trazida primeiramente ao Brasil pelos colonizadores portugueses (KLEIN, 2010). A disseminação da cana-de-açúcar ocorreu em menos de um século de sua chegada ao Brasil, as lavouras se desenvolveram principalmente em faixas costeiras ou ainda próximas a rios navegáveis (CASADEI, 2012). As famílias, na grande maioria portuguesas, se colocavam ao redor dos engenhos, unidades econômicas características daquela época, estas comunidades eram estratificadas em forma de uma pirâmide social, com os senhores de engenho no topo e os escravos na base dessa pirâmide (BRANDÃO, 1985). Por séculos, as bebidas destiladas foram o único álcool produzido no Brasil, a produção de etanol industrial começou a se desenvolver na Europa em meados do século 19, contudo a produção industrial de etanol no Brasil começou praticamente somente no último quarto do século passado, com as sobras de melaço da indústria açucareira, que ampliava a sua capacidade produtiva (LIMA et al, 2001).

A cana-de-açúcar é uma planta que se desenvolve bem em áreas ensolaradas, quentes e tropicais (EMBRAPA, 2016), e consegue se desenvolver até mesmo em solos com características mais hostis, sendo cultivada em diversas partes do Brasil (MARIN, 2016). Quanto ao histórico de área de plantação de cana-de-açúcar colhida no Brasil, houve um crescimento quase que constante no começo dos anos 80, indo de 2,77 milhões de hectares em 1980 até 4,13 milhões de hectares em 1986, então esse valor anual se manteve praticamente constante até 1995, quando começou a crescer novamente, mais lentamente até 2005, ano onde a produção atingiu 5,80 milhões de hectares, e mais rapidamente no período 2005-2015, obtendo nesse último ano uma produção de 9,70 milhões de hectares. Os estados brasileiros com maior área colhida de cana-de-açúcar em 2015 foram São Paulo (50,8%), Minas Gerais (9,4%), Goiás (9,0%), Mato Grosso do Sul (7,1%) e Paraná (7,0%) (UNICA⁽²⁾, 2016). A cana-de-açúcar tem produtividade de cerca 6500 litros de etanol por hectare plantado, valor superior aos 4200 litros do milho e 5500 litros da beterraba utilizados na produção de etanol por Estados Unidos e União Europeia, respectivamente (BRASKEM, 2016).

A composição média da cana-de-açúcar saudável é de 73-76% de água, 10-16% de sólidos solúveis e 11-16% de fibra (seca). Desses sólidos solúveis (constituintes do caldo de cana), tem-se 70-88% de sacarose, 2-4% de glicose, 2-4% de frutose, 3,0-4,5% de sais e 1,5-5,5% de ácidos orgânicos, proteínas, amido, gomas, entre outros (CHEN & CHOU, 1993).

2.3. Produção de Etanol

No processo industrial fermentativo de produção do etanol, pode-se classificar como etapas principais: lavagem, moagem, eliminação de impurezas, fermentação, destilação e desidratação (NOVACANA⁽²⁾, 2016).

2.3.1. Lavagem

Na recepção, antes da admissão da cana-de-açúcar na usina, a cana é recebida e amostrada aleatoriamente para se aferir a sua qualidade (teor de sacarose e de fibras, pureza do caldo, entre outros) (NOVACANA⁽³⁾, 2016). Após o corte, a cana pode perder a qualidade rapidamente em função das condições ambientais, do modo de despalha, tipo de corte e infestação por

pragas. Os colmos de cana-de-açúcar podem se deteriorar mediante processos enzimáticos, com destaque para a ação da enzima invertase, que converte a sacarose em glicose e frutose, promovendo redução da pureza; por processos químicos em que a inversão é causada por condições ácidas; e por processos microbiológicos, primariamente causados pelas bactérias *Leuconostoc sp* e *Lactobacillus sp* (IRVINE, 1993).

Em estudo da deterioração de toletes de cana armazenados por 3 dias, em função do tamanho, encontraram-se reduções significativas do pH dos caldos e da pureza da cana. A acidificação do caldo é provocada pela presença de ácido láctico produzido por *Leuconostoc sp.* e *Lactobacillus sp.*, podendo provocar floculação e interrupção da fermentação, mesmo ainda havendo açúcares nas dornas. Valores de pureza reduzidos implicam menor disponibilidade de açúcares redutores totais para ser convertido em etanol pelas leveduras, levando a perdas em eficiência e econômicas no processo industrial (GENTRY & GASCHO, 1972; EGGLESTON et al, 2001 e FIGUEIREDO et al, 2008).

Após a recepção da cana-de-açúcar proveniente dos canaviais, faz-se a abertura do feixe com um tambor nivelador situado acima da passagem da cana, formando um colchão de aproximadamente dois ou três colmos de espessura, para garantir a boa limpeza dos colmos. Então, com uso de um banho hidráulico, separam-se pedras e areia que por possuir maior densidade se dirigem ao fundo do banho. Em seguida, a cana é lavada em uma esteira por um fluxo turbulento de água, eliminando a terra por ranhuras na rampa, migrando posteriormente para rolos eliminadores de impurezas como ponteiros, folhas e raízes, chegando depois ao setor de moagem (PAYNE, 1989).

2.3.2. Moagem

A cana é conduzida em uma esteira rolante até os picadores e desfibradores, formando um colchão de cana, e então a extração do caldo é feita por esmagamento da cana por rolos das moendas que exercem uma forte pressão sobre o colchão, extraindo-se cerca de 96% do caldo de cana (MACHADO, 2012). A moenda é normalmente formada por quatro a sete

ternos de rolos em série, após a passagem pelo primeiro terno, fica difícil extrair o caldo residual, sendo necessário realizar a embebição da cana, que consiste em injetar água para auxiliar a extração. A embebição pode ser simples, composta e com recirculação, sendo a composta a mais utilizada, onde se injeta a água na camada de cana entre os últimos dois ternos e o caldo de cana da saída de cada terno é injetado na entrada do terno anterior (com exceção do primeiro terno). Normalmente o caldo extraído do primeiro terno, de melhor qualidade, é enviado para o setor de produção de açúcar e o restante do caldo para a produção de etanol (NOVACANA⁽³⁾, 2016).

O bagaço que resta do processo de moagem com composição média de 46% de fibra, 50% de água e 4% de sólidos dissolvidos na quantidade de cerca de 260 Kg por tonelada de cana moída, é armazenado e posteriormente queimado em caldeira, gerando vapor que movimenta turbinas que geram praticamente toda a energia necessária para operar os equipamentos da usina, tornando o balanço energético do processo muito mais favorável (NOVACANA⁽³⁾, 2016).

2.3.3. Eliminação de Impurezas

Para a retirada de resíduos presentes no melado (areia, bagaço, entre outros), passa-se o líquido em uma peneira, e depois dirige-se o mesmo até um tanque para realizar a decantação das impurezas, que se depositam no fundo do tanque. Após esse processo, o melado puro é extraído e recebe o nome de caldo clarificado. Por último, realiza-se a esterilização do caldo, onde este é aquecido para eliminar os micro-organismos presentes (NOVACANA⁽²⁾, 2016).

2.3.4. Fermentação

Após a conclusão do processo de purificação, o caldo segue para a etapa de fermentação onde ocorre a transformação dos açúcares em etanol. O caldo é levado a dornas (tanques) onde se adiciona a ele um fermento com leveduras (fungos, sendo mais comum a levedura de *Saccharomyces cerevisiae*). Esses micro-organismos se nutrem do açúcar presente no caldo. Nesse processo, as leveduras hidrolisam as moléculas de glicose, produzindo

etanol e gás carbônico. É necessário que as dornas sejam fechadas para recuperar o álcool arrastado pelo gás carbônico e o uso de trocadores de calor para manter a temperatura nas condições ideais para as leveduras. A fermentação é regulada para 28 a 30°C e tem duração média de 06 a 08 horas. Após o processo é obtido um vinho, chamado também de vinho fermentado, que possui leveduras, açúcar não fermentado e cerca de 10% de etanol (DUARTE et al, 2006).

O processo industrial de fermentação alcoólica pode ser dividido em três fases: fermentação preliminar ou pré-fermentação, fermentação principal ou tumultuosa e fermentação complementar ou pós-fermentação. A fermentação preliminar é caracterizada pela multiplicação das leveduras, com consequente consumo de açúcares e lenta produção de álcool. Na fase de fermentação ocorre intensa produção de álcool e liberação de CO₂; aumento da temperatura, a qual deve ser controlada por resfriamento; progressivo aumento de espumas e elevação da acidez do mosto. Na pós-fermentação verifica-se a diminuição da temperatura do vinho, elevação da acidez e a diminuição da atividade de fermentação da levedura pela ação do acúmulo de determinadas substâncias, do esgotamento dos carboidratos e das toxinas dos contaminantes (PACHECO, 2010).

A fermentação pode ser conduzida de formas diferentes. O processo fermentativo pode ser operado de forma descontínua, semicontínua, descontínua alimentada (ou batelada alimentada) ou contínua, todos podendo trabalhar com ou sem recirculação do fermento. Na produção industrial de etanol em grande escala, os processos fermentativos se classificam em processos em batelada e contínuos, sendo que a denominação batelada na prática industrial da produção de etanol se refere à batelada alimentada (SCHIMIDELL et al, 2001). Neste trabalho as fermentações foram conduzidas de forma descontínua, descontínua alimentada com alimentação em pulsos e descontínua alimentada com alimentação constante. Os biorreatores industriais, chamados de dornas, são feitos de aço e possuem agitação, em geral são fechados e mantidos a uma temperatura em torno de 33 a 35°C até a conclusão do processo. Nas dornas fechadas é comum a utilização de um sistema de lavagem do gás de saída para recuperação do etanol evaporado

(DUARTE et al, 2006). A Figura 1 apresenta o aspecto visual de dornas de fermentação utilizadas na indústria.



Figura 1: Aspecto Visual de Dornas de Fermentação. Fonte: SERMATEC (2016)

2.3.4.1. Processo Descontínuo

O processo em batelada, também conhecido como descontínuo, se caracteriza pela inserção completa do substrato e do inóculo no início da fermentação. O procedimento de condução consiste em: prepara-se um meio de cultura adequado à nutrição e ao desenvolvimento do micro-organismo e também ao acúmulo do produto desejado; coloca-se este meio de cultura em um biorreator; adiciona-se o micro-organismo responsável pelo processo biológico e se aguarda que o processo ocorra. A fermentação é considerada como finalizada quando cessa a atividade biológica por falta de nutrientes (açúcar, por exemplo) ou por excesso de produto inibidor, no caso o etanol. Após o fim da fermentação, retira-se o caldo fermentado do reator e executam-se as operações unitárias necessárias para a recuperação do produto (SCHIMIDELL et al, 2001). A Figura 2 representa simplificada um reator em regime descontínuo.

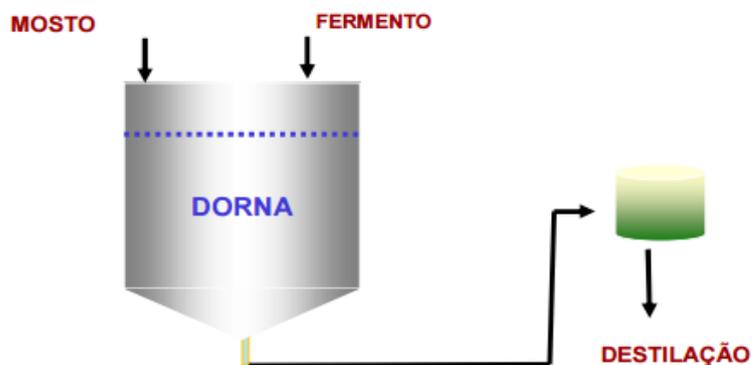


Figura 2: Processo de Fermentação Descontínuo. Fonte: ZAMBELLI (2016)

As vantagens de se usar a fermentação em regime descontínuo são as boas condições de assepsia e possibilidade de manutenção sempre que necessário, menores riscos de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação, condição de controle mais estreito da estabilidade genética do micro-organismo, bem como a capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto. Em contrapartida a fermentação descontínua pode levar a baixos rendimentos e produtividade, pois quando o substrato é adicionado de uma só vez no início da fermentação ele exerce efeitos de inibição repressão, ou desvia o metabolismo celular a produtos que não interessam. O uso desse tipo de processo fica restrito a fermentações laboratoriais, farmacêuticas e na produção de cachaça (SCHIMIDELL et al, 2001).

2.3.4.2. Processo Descontínuo Alimentado

O processo descontínuo alimentado é uma forma desenvolvida a partir das formas mais básicas com o objetivo de contornar problemas inerentes aos processos de fermentação. É definido como um modo de operação no qual um ou mais nutrientes (incluindo substrato), ou mesmo todos os nutrientes são adicionados gradualmente durante o processo de fermentação e os produtos formados permanecem no meio até o tempo final. Algumas características peculiares a este regime são: O volume varia durante o decorrer da fermentação (embora possa ser pequena variação em alguns casos), a vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, e a adição de mosto

pode ser contínua ou intermitente e é possível controlar a concentração de substrato na fermentação (podendo assim interferir no metabolismo microbiano, levando a diferentes perfis de concentração não só de substrato, mas também de células e produto) (CARVALHO & SATO, 2001).

O processo descontínuo alimentado foi introduzido com o intuito de aumentar a produtividade em relação ao regime descontínuo. Os processos descontínuos alimentados são mais eficientes e versáteis na grande maioria dos processos fermentativos, inclusive nas fermentações alcoólicas. As principais vantagens de sua aplicação são: Economia de açúcar para reprodução celular, maior rendimento em etanol, eliminação de contaminantes pela centrifugação ou sedimentação do meio fermentado, fermentação mais pura devido ao tratamento ácido e grande potencial para a automação de processos e redução de custos operacionais (LEE et al, 1999).

No Brasil a migração das plantas de batelada alimentada para contínua ocorre de forma lenta. Cerca de 70% das destilarias instaladas ainda utilizam o processo do tipo descontínuo alimentado (ANDRIETTA et al, 2006). A Figura 3 a seguir mostra simplificada o funcionamento de uma fermentação descontínua alimentada (Processo Melle Boinot).

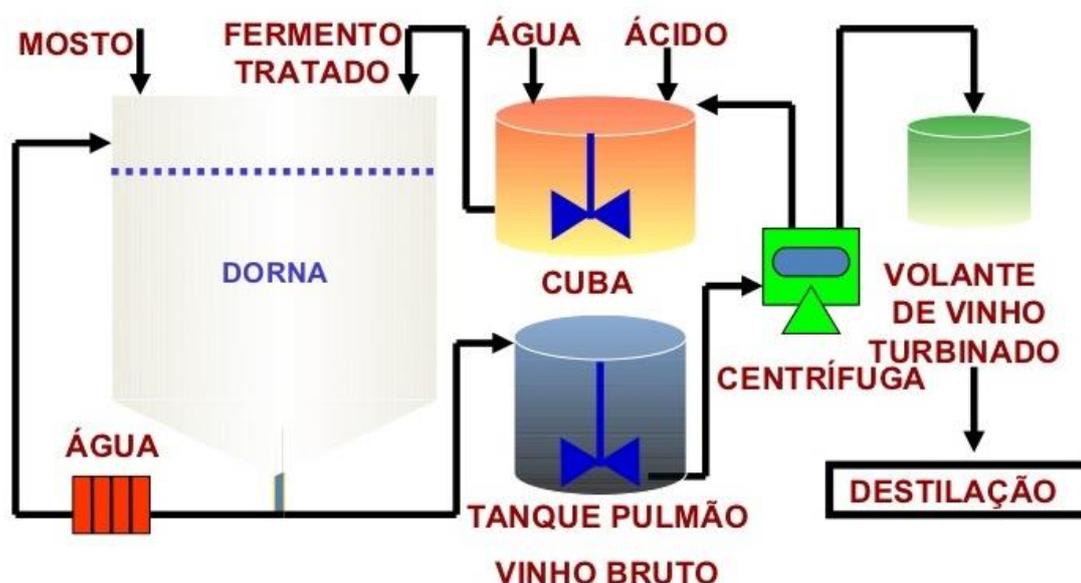


Figura 3: Processo de Fermentação Descontínua Alimentada. Fonte: VAZ et al (2016)

2.3.4.3. Processo Contínuo

O processo de fermentação em regime contínuo caracteriza-se por possuir alimentação de meio de cultura a uma vazão constante, sendo o volume de reação no fermentador mantido constante, e a retirada contínua do caldo fermentado. O volume de reator precisa ser mantido de forma constante com o intuito de que o sistema atinja a condição de estado estacionário ou regime permanente, condição na qual as variáveis de estado (concentração de células, de substrato limitante e de produto) permanecem constantes ao longo do tempo de operação do sistema. Esta condição é muito difícil de ser alcançada em termos práticos, pois para a manutenção de volume constante no reator é necessário, teoricamente, contar com vazões idênticas de alimentação e de retirada de meio (SCHIMIDELL et al, 2001).

O processo contínuo tem como principais vantagens, decorrentes da operação em estado estacionário, a obtenção de caldo fermentado uniforme, maior facilidade no emprego de controles avançados, aumentam a produtividade, reduzem o tempo não produtivo (tempos mortos, carga, descarga, limpeza), manutenção das células em um mesmo estado fisiológico. Algumas desvantagens deste processo são: Possibilidade de ocorrência de mutações genéticas espontâneas (resultando mutantes menos produtivos), maior possibilidade de contaminações dificuldade de operação em estado estacionário e maior investimento inicial na planta (SCHIMIDELL et al, 2001).

2.3.5. Destilação e Desidratação

Na etapa de destilação, a primeira operação é a epuração do vinho, que consiste em um processo de purificação visando livrar-se de algumas impurezas constantes no vinho, que é realizado em uma coluna de destilação epuradora. Dessa operação, além do vinho epurado, obtêm-se também a fração denominada álcool de segunda, bruto ou de cabeça (mistura de etanol e água impura com teor alcoólico variando de 92 a 94°GL, que corresponde a fração volumétrica de etanol presente na mistura). O vinho epurado é submetido a uma segunda etapa de destilação, em uma coluna de destilação propriamente dita, de onde obtêm-se duas frações: o flegma (produto principal de destilação) que é uma mistura hidroalcoólica impura, com teor alcoólico

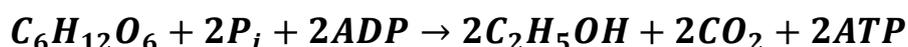
variando de 45 a 50°GL, e a vinhaça (resíduo aquoso da destilação) que contem todas as substâncias não voláteis e algumas voláteis do vinho (CASTRO, 2011).

O flegma é encaminhado para uma outra coluna de destilação (coluna de retificação), onde é produzido o etanol hidratado (com graduação alcoólica entre 92,6 e 93,8% em massa de etanol) e a flegmassa que segue o mesmo destino da vinhaça. O etanol hidratado pode ser comercializado nessa forma ou ainda ser conduzido para a coluna de desidratação, onde pela adição de ciclohexano como agente desidratante é produzido o etanol anidro (graduação alcoólica de 99,3 a 100% em massa de etanol). Ainda no processo de destilação é retirado o óleo fúsel, composto por álcoois amílicos e butílicos que são formados no processo de fermentação (ALCOESTE, 2016).

2.4. O Agente da Fermentação Alcoólica

As leveduras são microrganismos utilizados para produção de etanol. Elas são micro-organismos unicelulares, biologicamente classificados como fungos e que têm uma excelente capacidade natural que consiste em sobreviver sem oxigênio. De fato, na presença do ar, os micro-organismos multiplicam-se, mas, na ausência de oxigênio, fermentam os açúcares transformando-os em álcool. As reações realizadas pela levedura com a ausência e com a presença de oxigênio são as seguintes, respectivamente:

Equação de Gay-Lussac (Produção de Etanol) - Ausência de Oxigênio



$$E = 57 \text{ Kcal}$$

Equação do Ciclo de Krebs (Respiração Celular) - Presença de Oxigênio



$$E = 688 \text{ Kcal}$$

Existem centenas de variedades de leveduras sendo que, habitualmente, se dividem em dois grandes grupos: as leveduras de fermentação alta (*Saccharomyces cerevisiae*, típicas das Ale) e as leveduras

de fermentação baixa (*Saccharomyces uvarum*, antes conhecidas por *Saccharomyces carlsbergensis*, típicas das Lager). As primeiras são as leveduras mais utilizadas na produção de etanol, apresentam-se normalmente na forma unicelular e com 2 a 8 micrômetros de diâmetro. Essas se reproduzem basicamente por gemação (brotamento), onde a célula mãe, após um período de união entre citoplasmas, dá origem a uma nova célula como mostra a Figura 4 (STECKELBERG, 2001).



Figura 4: Célula de *Saccharomyces cerevisiae* (Reprodução por Brotamento).
Fonte: BATISTOTE (2006)

As leveduras possuem metabolismo anaeróbico facultativo crescendo tanto na presença como na ausência de oxigênio. Leveduras crescem melhor em um ambiente de pH neutro ou ligeiramente ácido (PELCZAR, 1997).

Para crescimento das leveduras são necessários alguns elementos, como água, fontes de carbono (açúcares, sais de ácidos orgânicos, glicerina ou etanol), nitrogênio, oxigênio e minerais. A deficiência de alguns nutrientes, como fósforo, magnésio, manganês, zinco e vitaminas (biotina, niacina, ácido pantotênico e pirimidina), pode afetar seu metabolismo. Já a existência de estresses, como de temperaturas tanto alta como baixa, pressão osmótica, etanol e acidez podem afetar também o comportamento da levedura (WALKER, 1998).

Na execução da fermentação alcoólica a levedura mais empregada é a do gênero *Saccharomyces*. Os fatores que consagram esse micro-organismo como o mais indicado são a capacidade de transformar rapidamente açúcares

em etanol, alta tolerância ao produto formado, tolerância a grandes variações de temperatura e atividade celular em ambientes ácidos. Na indústria brasileira a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ainda é a mais empregada (ANDRIETTA et al., 2006).

A escolha da linhagem apropriada é de extrema importância para o êxito da fermentação. Na literatura é possível encontrar pesquisas empenhadas no melhoramento das leveduras com o intuito de potencializar a sua eficiência na produção de etanol, como fez Alexandrino (2012) que em seu trabalho buscou linhagens de leveduras capazes de suportar os estresses impostos por uma fermentação com alto teor alcoólico. Para tal, três entre as melhores linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* atualmente disponíveis (CAT-1, PE-2 e SA- 1), foram utilizadas num programa para a seleção de híbridos para tolerância múltipla aos estresses etanólico, osmótico, ácido, além de outros, inerentes à fermentação com alto teor de etanol. A partir dos resultados a autora concluiu que o híbrido 35B (híbrido entre CAT-1 e PE-2) foi o que apresentou maior destaque entre todos os híbridos testados com atributos fermentativos superiores aos exibidos pelos parentais, sendo assim uma promissora linhagem a conduzir a fermentação com alto teor alcoólico.

Já Galzerani (2010) "domesticou" a linhagem JAY270, um isolado da cepa industrial Pedra-2, tornando-a de fácil manipulação genética, plataforma para a introdução de características que melhorem o desempenho dela nas indústrias. A estratégia de domesticação foi baseada no sistema de manipulação Delitto Perfetto, para que o seu genoma altamente heterozigoto fosse preservado e assim mantivesse as suas características de interesse industrial. Dois cassetes integrativos com marcas de seleção diferentes foram construídos a partir de plasmídeos e utilizados na deleção das duas cópias do gene URA3 da levedura. O fragmento homólogo de reparo foi usado na retirada das marcas genéticas de seleção evitando a permanência de quaisquer resquícios de transgenia. Ao final do processo de domesticação a JAY270 passou a apresentar auxotrofia para uracila, mantendo intacta a sua arquitetura genômica heterogênea e, assim, o seu vigor híbrido, os quais têm sido relacionados à boa atividade fermentativa da linhagem industrial. Embora tenha sido um processo bastante laborioso, o resultado alcançado pelo autor deverá facilitar novos estudos que necessitem de técnicas de manipulação genética

como a do Delitto Perfetto para melhorar características fermentativas da linhagem industrial.

Em seu trabalho Cavalheiro (2013), buscou encontrar mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* que apresentassem maior resistência a altas concentrações de etanol e altas temperaturas concomitantemente. Para isso, o autor utilizou como modelo a coleção YKO (Invitrogen®), que contém 4,828 linhagens mutantes para genes não essenciais na levedura. Primeiramente, foi estabelecido as condições de estresse (concentração de etanol e temperatura) que fossem limitantes para o crescimento da linhagem isogênica selvagem (BY4741). Foram estabelecidas as condições de estresse em 10% de etanol em conjunto com aumento de temperatura para 37°C, que foram então utilizadas para testar a tolerância das linhagens mutantes agrupadas em 53 pools. Foram identificadas as linhagens mutantes para as ORFs UBP15, THI12, CLA4, DIT1 e MTC7 que suportaram tais condições, se mostrando possíveis candidatos para melhora genética em linhagens industriais como PE2 e CAT1.

De um modo geral, toda inovação aplicada no melhoramento da produção de etanol é de extrema importância para a renovação da atual matriz energética mundial assim como novas técnicas, que venham proporcionar melhorias no processo de produção de etanol e agreguem de forma positiva para futuras pesquisas na área.

2.5. Fatores que Afetam a Fermentação Alcoólica

2.5.1. pH

O pH tem grande influência no rendimento em etanol, uma vez que é capaz de restringir o crescimento microbiano. O pH utilizado nas usinas para o mosto fica na faixa entre 4,5 e 5,5, e o pH ótimo do mosto durante a fermentação alcoólica utilizando *Saccharomyces cerevisiae* em geral se encontra entre 4 e 5. O caldo de cana em geral se adapta bem nessa faixa de pH, pois seu pH natural fica geralmente entre 5,2 a 6,8. Nos processos onde se realiza a reutilização da levedura, realiza-se tratamento da levedura com ácido sulfúrico em pH de 2,0 a 3,2 por uma ou duas horas, procedimento esse que embora cause bastante estresse a levedura, é bastante eficaz na diminuição da

contaminação bacteriana por reduzir significativamente o número de bactérias (AMORIM et al, 1996, LIMA et al, 2001, ROMÃO, 2011 e STECKELBERG, 2001).

2.5.2. Temperatura

A produção de etanol nas indústrias é conduzida na faixa de 25-35°C, devendo essa ser realizada em torno de 30°C quando se pretende levar ao máximo a produção de etanol, contudo no Brasil, por conta de condições climáticas e operacionais, estas são conduzidas em temperaturas maiores que esta (STECKELBERG, 2001). A levedura *Saccharomyces cerevisiae* em temperaturas mais altas tem seu metabolismo afetado de forma a haver uma diminuição da tolerância ao etanol e maior formação de metabólitos secundários como o glicerol (WALKER, 1998 e OLIVEIRA, 1998). Aliado a isso, as bactérias lácticas são capazes de tolerar temperaturas mais elevadas que as toleradas pelas células de leveduras, e desta forma a competição entre a levedura e as bactérias pelo substrato aumenta juntamente com a temperatura (EPSTEIN & GROSSOWICZ, 1969 e BALAKUMAR et al, 2001).

Quanto a trabalhos realizados analisando o efeito de temperatura, Morimura et al (1997) observou diminuições na produção em etanol com aumento gradual da temperatura de 30 a 35°C em fermentações batelada repetidas. Contudo Laluece et al (2002), utilizando um sistema de cinco reatores em série com temperaturas decrescentes à jusante do fluxo, obteve maiores valores de viabilidade celular e de biomassa no último reator, que se encontrava a temperatura de 35°C.

As principais referências utilizadas para a realização deste trabalho foram o de Bueno Netto (1982), que executou fermentações descontínuas alimentadas com alimentação constante de mel de usina sucroalcooleira não-invertido previamente a temperatura de 32°C, e o de Acorsi (2012), que realizou fermentações descontínuas com mel de usina previamente invertido em temperaturas de 32, 34 e 37°C. Com base nestes trabalhos, optou-se para fins de comparação executar as fermentações na temperatura de 32°C.

2.5.3. Inibição e Repressão

Denomina-se inibição a capacidade de certos compostos que, quando presentes no meio de fermentação, são capazes de diminuir a atividade do micro-organismo. Existem basicamente dois tipos de inibidores: os competitivos e os não-competitivos.

Os inibidores competitivos possuem forma estrutural similar à do substrato para poderem se ligar às enzimas metabólicas do micro-organismo. Como essas substâncias não possuem grupos químicos para concretizar a reação de fato, elas atuam competindo pelos sítios ativos das enzimas metabólicas do micro-organismo. A potência do efeito inibitório depende das concentrações relativas de substrato e inibidor e da afinidade da enzima pelo substrato e pelo inibidor, o que torna a inibição competitiva bastante específica, o que justifica seu grande uso para terapia e controle de vias metabólicas.

Os inibidores não-competitivos tem mecanismos bastantes diversos de atuação, não possuem semelhança estrutural com o substrato, e costumam ligar-se às enzimas em componentes estruturais desta que não compõem o sítio ativo necessariamente, o que modifica estruturalmente a enzima e prejudica parcial ou totalmente o seu funcionamento. Logo, são bastante inespecíficos, e sua presença em um micro-organismo pode afetar não só uma, mas várias enzimas de uma ou mais rotas metabólicas, podendo ter efeito bastante nocivo em um cultivo de micro-organismos. (BORZANI, 2001)

Chama-se de repressão o efeito de inibição da transcrição de determinados genes quando micro-organismos como a *Saccharomyces cerevisiae* são cultivados em substratos facilmente fermentescíveis, como a glicose, por exemplo. Alguns genes que costumam ser reprimidos por exemplo são genes da gliconiogênese, de funções mitocondriais e de catabolismo de açúcares de fermentação lenta.

Embora outros açúcares possam causar efeito de repressão, a glicose é o açúcar com maior poder de realizar esse feito, e costuma-se dessa forma chamar o efeito de repressão pela glicose. O termo também pode ser utilizado para representar taxas de degradação de RNA mensageiro e expressão de genes de controle da eficiência da transcrição. A glicose é responsável também

por aumentar a taxa de degradação de proteínas e inibição de certas enzimas, para que assim o seu consumo como substrato seja o preferencial (KLEIN, 1998).

2.5.4. Concentração do Substrato

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de fermentar os açúcares que compõem a cana-de-açúcar, que são basicamente a glicose, a frutose e a sacarose. Como as leveduras possuem uma osmotolerância limitada, as fermentações nas indústrias geralmente são realizadas em concentrações próximas a 200 g/L. O substrato utilizado para produção industrial pode ser tanto o caldo de cana como este acrescido do mel proveniente da produção de açúcar, que contém além de açúcares outros compostos que podem inibir a fermentação. Altas concentrações de açúcares (maiores que 150 g/L), também exercem ação inibitória sobre a fermentação alcoólica. (STECKELBERG, 2001).

O uso de altas concentrações de açúcares gera maior efeito de osmolaridade externa, que gera redução do crescimento, redução do tamanho celular (por perda de água por osmose do citoplasma) e perda de viabilidade celular devido às perturbações geradas pelo gradiente osmótico através da membrana plasmática (SOUZA, 2009).

Bueno Netto (1982), realizou os ensaios fermentativos descontínuos alimentados de seu trabalho em concentração de 180 g/L, enquanto que Acorsi (2012) realizou fermentações descontínuas em concentrações diversas (30, 50, 75, 100, 150 e 250 g/L). Como se tinha por objetivo nesse trabalho avaliar os possíveis efeitos de inibição pelo substrato existentes nas fermentações, adotou-se como variáveis de concentração inicial de açúcares nesse trabalho os valores de 150, 200 e 250 g/L.

2.5.5. Concentração de Produto (Etanol)

Do ponto de vista fisiológico, o etanol é capaz de inibir o crescimento e a viabilidade celular por operar de forma negativa sobre diferentes sistemas de transportes (incluindo permeases de aminoácidos), sobre a sinalização celular

da glicose e a atividade de enzimas chaves da via glicolítica (ALEXANDRE & CHARPENTIER, 1998 e BISSON, 1999).

O etanol atua aumentando a fluidez da membrana plasmática, o que resulta em mudanças na permeabilidade de íons, principalmente prótons (LLOYD et al, 1993 e CARTWRIGHT et al, 1986), e parece alterar o grau de polaridade da membrana celular, o que causa paralização do crescimento em concentrações elevadas. (LYND et al, 1991). Vários fatores podem atuar de forma a aumentar a tolerância da levedura ao etanol, como concentrações elevadas de ácidos graxos insaturados, vitaminas e proteínas, composição do meio, acúmulo intracelular de etanol, entre outros (D'AMORE & STEWART, 1987).

Holzberg et al (1967) concluíram em suas pesquisas que o crescimento celular não sofre inibição até 26 g/L de concentração de etanol, mas que quando a concentração de etanol atinge 68,5 g/L o crescimento é completamente inibido. Luong (1984) observou que o etanol apresentava efeito significativo sobre a velocidade de crescimento celular já na concentração de 15 g/L, que a 100 g/L o crescimento celular era ausente e que a 105 g/L de concentração de etanol a produção de etanol pela levedura é completamente inibida. Daugulis & Swaine (1987) acharam valores de concentração de etanol onde se observou ausência de crescimento celular entre 87,5 e 140 g/L utilizando para o teste algumas variedades de leveduras. Esses resultados devem ser analisados com cautela, pois dependem de algumas variáveis juntamente com a concentração de etanol, como o meio de cultura, temperatura, entre outros (SOUZA, 2009)

2.5.6. Oxigênio Dissolvido

Quando existem altas concentrações de oxigênio, a fermentação alcoólica acaba sendo inibida pelo chamado Efeito Pasteur. Esse efeito se nota principalmente em leveduras que já se encontram na fase estacionária, onde se observa grande diminuição no consumo de glicose, o que não se observa significativamente quando a levedura está em fase exponencial, onde o consumo em presença ou ausência de ar é o mesmo (STECKELBERG, 2001).

A ausência completa de oxigênio é prejudicial ao processo de produção de etanol. Observou-se porcentagens mais altas de produção de etanol e mais baixos de glicerol em fermentações onde se encontrava certa quantidade de oxigênio presente (ALFENORE et al apud SOUZA, 2009). Condições onde se tem 0,5% de saturação (microaeróbicas) permitem aumento do consumo de açúcares e maior tolerância do micro-organismo ao etanol sem perda de rendimento em etanol, o que se deve ao fato da levedura precisar de pequenas quantidades de oxigênio para sintetizar certos ácidos graxos, indispensáveis a viabilidade celular e que ajudam junto com os esteróis a aumentar a permeabilidade da membrana plasmática ao etanol (MAIA, 1989). Quando há grandes concentrações de açúcares no meio fermentativo, as enzimas respiratórias ficam inibidas e têm-se produção de etanol mesmo em condições aeróbicas. Chama-se esse fenômeno de Efeito Crabtree (LIMA et al, 1986).

2.5.7. Contaminação Bacteriana

Geralmente nas dornas de fermentação existe competição entre a levedura e bactérias que também se encontram no mosto. Uma fermentação sadia apresenta níveis de bactérias próximos a 10^5 células/mL de mosto (ANDRIETTA et al., 2006).

Quando a contaminação bacteriana supera a quantidade de 10^7 células/mL de mosto, pode ocorrer significativa perda de rendimento em etanol (AMORIM et al, 1981). Entre os fatores que contribuem para isso pode-se citar a floculação das leveduras, que gera perda de células no fundo da dorna e dificulta a centrifugação, o desvio de nutrientes para a multiplicação bacteriana (cada molécula de açúcar utilizada na produção de ácido láctico resulta na perda de duas moléculas de etanol), a perda de viabilidade celular pela contaminação devido à substâncias como os ácidos láctico e acético e a competição por nutrientes do meio (GOMES, 2009).

Rosales (1989) avaliou amostras de fermento centrifugado, após tratamento com ácido sulfúrico, mosto, vinho inicial e final e identificou como principais bactérias contaminantes do processo, em porcentagem e em ordem decrescente de quantidade: *Lactobacillus sp.* (45,0%), *Leuconostoc mesenteroides* (14,4%), *Bacillus sp.* (9,5%), *Acetobacter sp.* (7,4%),

Enterobacter sp. (6,7%), *Sporolactobacillus sp.* (3,6%), *Pseudomonas fluorescens* (1,3%), *Escherichia coli* (1,3%) e *Citrobacter sp* (0,5%).

Oliva-Neto (1995) e Cherubin (2003), afirmam que as bactérias lácticas (contaminante mais comum em dornas de fermentação), tem pH ideal de crescimento entre 5,5 e 6,2, mas se desenvolvem também em pH inferior a 5,0, toleram temperaturas relativamente mais altas, desenvolvem-se rapidamente e são capazes de inibir a viabilidade celular da levedura devido à pressão osmótica no meio de cultivo. Oliva-Neto (1995) relata também que o ácido acético é solúvel nos lipídios da membrana celular e inibe por interferência química o transporte de fosfato pela membrana, e como é mais solúvel que o ácido láctico, seu poder de inibição é mais forte, efeito que pode ser diminuído com a simples lavagem da célula de levedura com água.

Sabe-se que algumas substâncias e antibióticos são capazes de inibir com eficácia o crescimento de bactérias lácticas, antibióticos como a penicilina e a virginiamicina são usados na produção comercial de bioetanol atualmente. Contudo do ponto de vista ecológico o uso de antibióticos pode não ser preferível, pois os resíduos gerados podem ser reaproveitados como fertilizantes, por exemplo. Além disso, antibióticos são caros, requerem aplicação constante e o custo-benefício pode não ser interessante (GOMES, 2009).

2.6. Motivação do Trabalho

Esse trabalho tem por intuito dar continuidade aos estudos do processo de fermentação alcoólica, tendo como principais referências os trabalhos de Bueno Netto (1982) e Acorsi (2012).

Bueno Netto (1982) realizou fermentações em regime descontínuo alimentado com alimentação constante utilizando melaço de cana-de-açúcar não-invertido, variando nos ensaios a concentração celular inicial e o tempo de enchimento. O autor concluiu que em concentrações celulares iniciais massa seca de até 50 g/L a produtividade em etanol e células ainda depende da concentração celular, e observou que a produtividade máxima em etanol é função linear decrescente do tempo de enchimento da dorna.

Acorsi (2012) realizou fermentações descontínuas utilizando como substrato mel de usina invertido em concentrações iniciais diversas de ART (de 30 a 250 g/L) e a diferentes temperaturas (32, 34 e 37°C), observando uma diminuição exponencial do fator de conversão do substrato em células com o aumento da temperatura e da concentração inicial de ART e não observando grande efeito da temperatura no rendimento em etanol, o qual foi maior nas concentrações iniciais de ART entre 75 e 100 g/L.

Nesse trabalho, teve-se como objetivo dar continuidade ao trabalho de Acorsi (2012), trabalhando-se em ensaios com mel invertido e não-invertido em mesmas condições operacionais (a fim de evitar efeitos secundários à inversão do mel na fermentação), dando maior foco aos experimentos a altas concentrações de ART (de 150 a 250 g/L), e expandindo os estudos utilizando mel invertido para o regime descontínuo alimentado.

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Meio de Cultura

Foram utilizadas como meio de cultura nos ensaios fermentativos soluções diluídas de mel rico final de cana-de-açúcar cedido pela Usina Santa Teresinha - Unidade Iguatemi, coletado da saída da centrífuga contínua de mel A, que abastece os tanques da destilaria. Segundo informações fornecidas pela empresa, o mel se encontrava na concentração aproximada de 600 g/L de Açúcares Redutores Totais (ART).

3.1.2. Suplementação de Nutrientes do Meio de Cultura

Utilizaram-se soluções de Ureia e de Superfosfato Triplo para suplementar possíveis carências de nitrogênio e fósforo, respectivamente, que o meio de cultura pudesse vir a ter, para que se garantisse o ART como substrato limitante da fermentação alcoólica.

3.1.3. Micro-Organismo

Foi utilizado o micro-organismo *Saccharomyces cerevisiae* na forma de Fermento Fresco Comercial Itaiquara, vendido em blocos fechados de 500 gramas. O fermento foi comprado fechado no dia anterior à execução da fermentação, e devido à validade curta, provavelmente foram utilizados lotes diferentes do produto, contudo sempre se utilizou o mesmo produto oferecido pela empresa em todos os ensaios.

3.1.4. Fermentador

Fez-se uso de um frasco Kitasato de 2 litros como fermentador, munido de uma rolha na parte superior e de uma mangueira lateral cuja saída permanecia imersa em um béquer com água, dessa forma tornando-o um frasco fechado. Para conservar a temperatura do fermentador constante, este permaneceu imerso em banho termostaticado da marca TECNAL modelo TE-184 durante todo o período fermentativo analisado. A alimentação e a

amostragem eram feitos pela parte superior do Kitasato, com retirada e posterior recolocação da rolha.

3.1.5. Elementos Diversos Utilizados em Preparos e Análises

Os compostos químicos utilizados ao longo de todo o trabalho foram: Água Destilada, Hidróxido de Sódio, Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (DNS), Fenol Comum, Tartarato de Sódio e Potássio (sal de Rochelle), Sulfito de Sódio, Glicose, Frutose, Etanol, Acetato de Sódio, Ácido Acético, Enzima Invertase, Ureia, Triplofosfato de Sódio, Ácido Clorídrico e Sacarose. Utilizou-se também diversos equipamentos, que incluem agitadores de hélice e magnéticos, banhos termostáticos, pHmetro, balanças, termômetro, cronômetro, microdestilador, cromatógrafo a gás, entre outros. Foi utilizada também uma vasta gama de vidrarias e elementos de plástico, que incluem tubos de ensaio, béqueres, erlenmeyers, balões volumétricos, provetas, pipetas volumétricas, pipetas automáticas, entre outros.

3.2. Métodos

3.2.1. Ensaio Fermentativos

Na Tabela 1, constam as condições iniciais em que cada ensaio fermentativo foi realizado nesse trabalho. As variáveis principais que foram analisadas, como se pode observar na tabela, foram as seguintes: o regime de operação da fermentação (descontínuo, descontínuo alimentado em pulsos e descontínuo alimentado com alimentação de mel constante durante o tempo de enchimento; a inversão ou não inversão da sacarose presente no mel previamente à fermentação; e a concentração de ART (150 g/L, 200 g/L e 250 g/L), que é, para cada regime de operação: a concentração inicial da fermentação, para as fermentações descontínuas; a somatória das três concentrações do mosto logo após as respectivas inserções de mel, para as fermentações descontínuas alimentadas com alimentação em pulsos; e a concentração final do mosto caso todo o mel planejado fosse alimentado no fermentador e não tivesse sido metabolizado pela levedura, para as fermentações descontínuas alimentadas com alimentação constante. Todas as fermentações realizadas nesse trabalho foram realizadas a temperatura de 32°C e com concentração celular inicial massa úmida de 50 g/L.

Tabela 1: Planejamento das Condições Iniciais das Fermentações Realizadas

Ensaio	Regime de Operação	Inversão Prévia da Sacarose	Concentração de ART (g/L)
1			150
2			200
3			200
4		Não	200
5			250
6	Descontínuo		250
7			150
8			200
9		Sim	200
10			250
11	Descontínuo		150
12	Alimentado C/ Alim. em Pulsos	Não	200
13		Sim	200
14	Desc. Alim. C/ Alim. Const.	Não	250
15		Sim	250

3.2.1.1. Preparação do Substrato

Antes de se utilizar o substrato, foi necessário realizar algumas operações no mesmo para adequá-lo propriamente para os ensaios de fermentação alcoólica, dentre os quais pode-se incluir: Diluição Inicial, Inversão, Suplementação de Nutrientes e Esterilização.

3.2.1.1.1. Diluição Inicial e Inversão

O Mel de Usina Sucroalcooleira em altas concentrações de ART é um substrato bastante viscoso, adere fortemente às paredes do recipiente que o contém, o que dificulta em parte a sua transferência quantitativa entre recipientes. Por isso, optou-se por trabalhar com medidas mássicas de mel e não volumétricas para realizar as diluições, pois com isso o mel poderia ser inserido diretamente no recipiente de diluição, evitando a necessidade de utilização de instrumentos intermediários. Contudo, para isso foi necessário realizar conversões de volume para massa das medidas de mel, o que foi feito com uso de uma equação obtida com base em uma tabela de densidade de soluções açucaradas. Utilizou-se a tabela da empresa Sucrana (2016), e com base nesta obteve-se a Equação 1 relacionando a densidade da solução açucarada (ρ_{SolART}) com a concentração de ART presente nessa solução (S), com (R^2) = 0,9999. Tendo essa densidade em mãos, com a Equação 2, obtêm-se a conversão do volume de mel (V_{Mel}) que deveria ser adicionado na diluição para a massa de mel (M_{Mel}) que deve ser adicionada.

$$\rho_{SolART} = 0,4 \cdot S + 1001,9 \quad (1)$$

$$M_{Mel} = \rho_{SolART} \cdot V_{Mel} \quad (2)$$

Para as fermentações descontínuas e para a primeira fermentação descontínua alimentada por pulsos, optou-se por preparar em simultâneo o substrato para mais de uma fermentação com concentrações por vezes diferentes. Nesses casos realizou-se duas diluições com água destilada: uma primeira, de forma a se obter um volume desejado ($V_{Mel1^{Dil}}$) suficiente para a preparação de todas as soluções, e na concentração desejada ($S_{Mel1^{Dil}}$) para a maior concentração de fermentação; e uma segunda, para se diluir um pouco

mais essa solução para as concentrações desejadas ($S_{Mel2^{a}Dil}$) para as fermentações de menor concentração, e em um volume ($V_{Mel2^{a}Dil}$), que sempre foi de um litro. Para as fermentações de maior concentração nesse caso, não se fez necessariamente uma segunda diluição, aferindo-se tão somente um litro da solução da primeira diluição preparada. O valor de ($S_{Mel2^{a}Dil}$) foi planejado de forma que, após a inserção do inóculo, suplementação de nutrientes e inserção de água de diluição, se tivesse a concentração inicial desejada de ART da fermentação em um volume total de mosto de 1,7 litros. Para as demais fermentações, realizou-se somente a primeira diluição citada, e o mel foi preparado somente para aquela fermentação no caso. As equações utilizadas nessas diluições foram as Equações 3 e 4.

$$\frac{M_{MelRico}}{\rho_{MelRico}} = \frac{S_{Mel1^{a}Dil} \cdot V_{Mel1^{a}Dil}}{S_{MelRico}} \quad (3)$$

$$\frac{M_{Mel1^{a}Dil}}{\rho_{Mel1^{a}Dil}} = \frac{S_{Mel2^{a}Dil} \cdot V_{Mel2^{a}Dil}}{S_{Mel1^{a}Dil}} \quad (4)$$

A metodologia de diluição inicial e inversão (procedimento que foi realizado apenas para os ensaios fermentativos em que se utilizou mel previamente invertido, que foi feita de forma praticamente simultânea a primeira diluição inicial) foi realizada, portanto, da forma a seguir:

1) Pesou-se em um béquer de capacidade suficiente para conter o volume ($V_{Mel1^{a}Dil}$) com relativa folga uma massa de mel rico ($M_{MelRico}$);

2) Metodologia de Inversão do Mel de Usina Sucroalcooleira

2.1) Adicionou-se ao mel rico pesado com uma proveta um volume de solução-tampão de acetato (preparado pela metodologia presente no Apêndice A.1.) igual a 5% do volume total de diluição ($V_{Mel1^{a}Dil}$). Então pesou-se uma massa de Enzima Invertase Novo Nordisk Ferment Ltda. Lote M691 na proporção ($P_{Invertase}$) de 0,0002 gramas Invertase para cada grama de Sacarose máxima na solução (caso todo o ART na mesma fosse sacarose), inserindo-a no mel rico pesado com auxílio de água destilada. Chamando a massa máxima de sacarose possível no mel rico de ($M_{SacMaxMelRico}$) e a massa

de invertase adicionada de ($M_{Invertase}$), tem-se os seus valores pelas Equações 5 e 6:

$$M_{SacMaxMelRico} = S_{MelRico} \cdot \frac{M_{MelRico}}{\rho_{MelRico}} \quad (5)$$

$$M_{Invertase} = P_{Invertase} \cdot M_{SacMaxMelRico} \quad (6)$$

2.3) Adiciona-se água destilada até o volume total de solução ($V_{Mel1ªDil}$), homogeneizando-se na medida do possível com um bastão de vidro. Coloca-se então o béquer coberto por papel alumínio em banho termostático a 50°C sob agitação mecânica e deixa-se nessa condição por um período de duas horas;

3) Para os casos onde se realizou a fermentação do mel sem a inversão prévia deste, tão somente diluiu-se a massa pesada de mel rico ($M_{MelRico}$) com água destilada até o volume ($V_{Mel1ªDil}$), homogeneizando-se na medida do possível com bastão de vidro e deixando-se sob agitação mecânica por um período de 40 minutos;

A Figura 5 ilustra a realização da primeira diluição realizada (a); e o processo de inversão da sacarose (b).

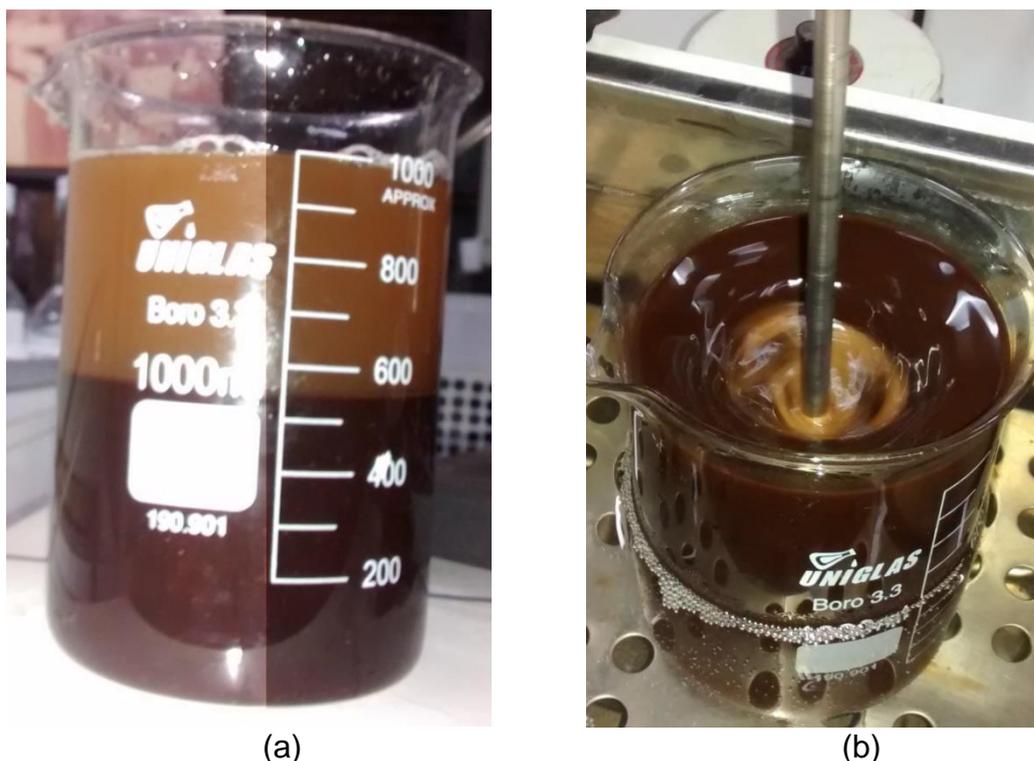


Figura 5: 1ª Diluição Inicial do Mel Rico (a); Inversão da Sacarose Quando Houve Adição de Invertase e Tampão de Acetato Antes da 1ª Diluição Inicial do Mel Rico (b); Fonte: O Autor

4) Para as fermentações descontínuas e para a primeira fermentação descontínua alimentada em pulsos, realizou-se a segunda diluição. Para isso, pesou-se uma massa de mel da primeira diluição ($M_{\text{Mel}1^{\text{a}}\text{Dil}}$) inserindo-a em um balão volumétrico de um litro tarado com um funil em seu bocal, completando o seu volume com água destilada e homogeneizando-se a solução com agitação vigorosa. Em seguida, transferiu-se a solução o mais quantitativamente possível para um erlenmeyer de dois litros, com auxílio de 50 mL de água destilada para fazer os enxagues necessários;

5) Para as duas últimas fermentações descontínuas alimentadas com inserção de mel em pulsos realizadas, inseriu-se as massas aproximadas de mel da diluição ($M_{1^{\text{a}}\text{InsMel}} = 202,4 \text{ g}$, ($M_{2^{\text{a}}\text{InsMel}} = 303,6 \text{ g}$ e ($M_{3^{\text{a}}\text{InsMel}} = 303,6 \text{ g}$ em três erlenmeyers tarados de meio litro. Para as fermentações descontínuas alimentadas com vazão constante de alimentação, inseriu-se a massa aproximada de 1000 g de mel da diluição em dois erlenmeyers de dois litros;

6) Antes de se inserir o mel diluído nos erlenmeyers, para o mel que passou pelo processo de inversão, retiraram-se em duplicata alíquotas de 0,5

mL para medida da concentração de ART pela análise DNS por diluição direta (ver subitem 3.2.2.3), e para o mel que não passou pelo processo de inversão, retiraram-se em duplicata alíquotas de 5 mL para a medida da concentração de ART após a Hidrólise Ácida da Sacarose (ver subitem 3.2.2.4.) e de 0,5 mL para medida da concentração de Sacarose (ver subitem 3.2.2.7.). O valor de concentração de ART aqui obtido é o que foi utilizado como concentração do mel diluído para os devidos cálculos, por ser mais confiável que o valor esperado com as diluições, o que se deve ao fato de ser medido diretamente e já a partir de uma amostra mais diluída e homogênea;

A Tabela 2 mostra resumidamente como foi realizado o processo de diluição inicial do mel rico de usina sucroalcooleira para a posterior realização das quinze fermentações realizadas nesse trabalho. Podemos dividir a tabela em duas partes: a superior, onde a partir de um valor (S_{MelRico}) estimado que se tem em mãos e com base nos valores de (M_{MelRico}), ($V_{\text{Mel1ªDil}}$), ($M_{\text{Mel1ªDil}}$) e ($V_{\text{Mel2ªDil}}$) obtêm-se um valor de concentração de mel diluído ($S_{\text{Mel2ªDil}}^{\text{Pesado}}$) tão próximo quanto possível do desejado ($S_{\text{Mel2ªDil}}^{\text{Teórico}}$); e a inferior, onde a partir do valor de ($S_{\text{MostoPrim}}$) obtido com a análise DNS do mel diluído, obtêm-se qual seria a concentração original do mel rico (S_{MelRico}) com os mesmos valores de (M_{MelRico}), ($V_{\text{Mel1ªDil}}$), ($M_{\text{Mel1ªDil}}$) e ($V_{\text{Mel2ªDil}}$) da coluna superior. Os números pequenos de ⁽¹⁾ a ⁽⁸⁾ presentes nas colunas (S_{MelRico}) se referem aos valores de concentração de mel rico da tabela inferior dos quais se calculou a média para utilizar como estimativa da concentração de mel rico na tabela superior. Pode-se perceber que os números pequenos assinalam uma primeira diluição igual para todas as amostras que apresentam o mesmo número (foi utilizado o mesmo mel da primeira diluição, portanto), e a necessidade dessa indicação numérica ocorreu devido a rearranjo da ordem cronológica de execução dos experimentos para uma ordem mais interessante para comparação e análise dos resultados.

O valor de 600 g/L utilizado como referência inicial (marcado como ⁽⁰⁾ na coluna (S_{MelRico}) da tabela superior) é um valor que tinha sido informado pela usina como a concentração em que o mel rico se encontrava, contudo esse valor não se mostrou representativo de toda a extensão volumétrica do mel rico, devido a sua grande heterogeneidade (variações de concentração

acentuadas em porções volumétricas diferentes do mel, devido principalmente a fatores como: supersaturação da solução; a alta viscosidade e dificuldade de mistura; e a sedimentação gradual de cristais de açúcar presentes, tornando o fundo do tonel de mel rico mais concentrado que a superfície), por isso optou-se por utilizar a estimativa da concentração de mel rico com base na preparação da diluição das fermentações anteriores, pois pelo menos teria-se como referência alíquotas volumétricas de mel mais próximas umas das outras (as amostras eram retiradas de galões de cinco litros para onde tinha sido transferido o mel rico de um tonel maior sem o conhecimento se esse mel era do topo ou do fundo do mesmo, e agitava-se bem o galão antes da retirada do mel deste).

Uma vez que o valor utilizado como base para atingir a concentração inicial da fermentação ($S_{\text{InicialFerm}}$) foi o valor obtido com a leitura da concentração obtida com a análise DNS (última coluna da tabela inferior, ($S_{\text{MostoPrim}}$)), a diluição inicial realizada não tinha um caráter quantitativo tão acentuado, contudo tentou-se realizar a mesma da melhor forma possível, para evitar grande diferença de volumes totais de fermentação ($V_{\text{TotalMosto}}$) nos ensaios realizados. Os valores das duas últimas colunas ($S_{\text{Mel2ªDil}}^{\text{Pesado}}$) e ($S_{\text{Mel2ªDil}}^{\text{Teórico}}$) da tabela superior não foram coincidentes devido a pequenas diferenças entre valores teóricos e experimentais pesados e avolumados, contudo pode-se notar que são bastantes próximos entre si, com erros sempre menores que 1,50%.

Tabela 2: Cálculo das Diluições Iniciais do Mel Rico de Usina Sucroalcooleira

Projeção da Concentração Final Teórica Com Base na Concentração Estimada de Mel Rico da Preparação de Mel Diluído das Fermentações Anteriores								
Ensaio	S_{MelRico}	M_{MelRico}	$V_{\text{Mel1}^{\text{a}}\text{Dil}}$	$M_{\text{Mel1}^{\text{a}}\text{Dil}}$	$V_{\text{Mel2}^{\text{a}}\text{Dil}}$	$S_{\text{Pesado Mel2}^{\text{a}}\text{Dil}}$	$S_{\text{Teórico Mel2}^{\text{a}}\text{Dil}}$	% Erro Conc.
1	714 ⁽⁴⁾	1848,16	3,0	854,20	1,0	256,3	255	0,51
2	764 ⁽²⁾	1115,20	1,5	911,45	1,0	336,8	340	0,94
3	650 ⁽¹⁾	2103,10	2,5	930,12	1,0	342,9	340	0,85
4	714 ⁽⁴⁾	1848,16	3,0	1138,09	1,0	341,5	340	0,44
5	764 ⁽²⁾	1115,20	1,5	1141,82	1,0	421,9	425	0,73
6	650 ⁽¹⁾	2103,10	2,5	1160,86	1,0	428,0	425	0,71
7	600 ⁽⁰⁾	2185,21	2,5	696,53	1,0	251,2	255	1,49
8	600 ⁽⁰⁾	2185,21	2,5	929,33	1,0	335,2	340	1,41
9	669 ⁽³⁾	803,09	1,0	943,90	1,0	341,1	340	0,32
10	600 ⁽⁰⁾	2185,21	2,5	1164,77	1,0	420,1	425	1,15
11	714 ⁽⁴⁾	1848,16	3,0	1137,58	1,0	341,3	340	0,38
12	704 ⁽⁵⁾	927,22	1,0	-	-	508,6	510	0,27
13	721 ⁽⁶⁾	918,61	1,0	-	-	513,3	510	0,65
14	703 ⁽⁷⁾	1438,78	2,5	-	-	315,3	313	0,73
15	702 ⁽⁸⁾	1134,13	2,0	-	-	310,3	313	0,86
Estimativa da Concentração do Mel Rico Usando Como Referência a Análise DNS								
Ensaio	$S_{\text{MostoPrim}}$	$V_{\text{Mel2}^{\text{a}}\text{Dil}}$	$M_{\text{Mel1}^{\text{a}}\text{Dil}}$	$V_{\text{Mel1}^{\text{a}}\text{Dil}}$	M_{MelRico}	S_{MelRico}		
1	276,8	1,0	854,20	3,0	1848,16	800,5 ⁽⁵⁾		
2	289,1	1,0	911,45	1,5	1115,20	609,9 ⁽³⁾		
3	341,0	1,0	930,12	2,5	2103,10	644,6 ⁽²⁾		
4	274,3	1,0	1138,09	3,0	1848,16	525,7 ⁽⁵⁾		
5	408,5	1,0	1141,82	1,5	1115,20	727,4 ⁽³⁾		
6	521,5	1,0	1160,86	2,5	2103,10	884,1 ⁽²⁾		
7	254,5	1,0	696,53	2,5	2185,21	611,4 ⁽¹⁾		
8	339,6	1,0	929,33	2,5	2185,21	611,5 ⁽¹⁾		
9	356,2	1,0	943,90	1,0	803,09	713,9 ⁽⁴⁾		
10	477,6	1,0	1164,77	2,5	2185,21	726,7 ⁽¹⁾		
11	363,6	1,0	1137,58	3,0	1848,16	784,1 ⁽⁵⁾		
12	518,0	-	-	1,0	927,22	720,8 ⁽⁶⁾		
13	503,5	-	-	1,0	918,61	703,4 ⁽⁷⁾		
14	314,9	-	-	2,5	1438,78	701,8 ⁽⁸⁾		
15	347,5	-	-	2,0	1134,13	813,3		

Unidades: (S_{MelRico}), ($S_{\text{Pesado Mel2}^{\text{a}}\text{Dil}}$), ($S_{\text{Teórico Mel2}^{\text{a}}\text{Dil}}$) e ($S_{\text{MostoPrim}}$) em g ART/L; (M_{MelRico}) e ($M_{\text{Mel1}^{\text{a}}\text{Dil}}$) em g ART; ($V_{\text{Mel1}^{\text{a}}\text{Dil}}$) e ($V_{\text{Mel2}^{\text{a}}\text{Dil}}$) em L.

A Tabela 3 mostra as concentrações de ART, de AR (que são quase que totalmente glicose e frutose) e de Sacarose constantes no mosto primário para as quinze fermentações realizadas.

Obteve-se uma porcentagem de sacarose média de 72,8%, com um desvio padrão relativamente significativo, o que provavelmente está relacionado com a heterogeneidade e supersaturação do mel e com a sedimentação de cristais de sacarose. Essas diferenças existentes na porcentagem de sacarose dos méis utilizados podem ter acarretado em pequenos desvios no comportamento das fermentações realizadas.

Tabela 3: Concentração de ART, AR e Sacarose e Porcentagem de Sacarose do Mel Utilizado nas Fermentações

Ensaio	S _{ART}	S _{AR}	S _{Sacarose}	% _{Sacarose}
1	276,8	88,8	178,6	67,9
2	289,1	37,7	238,8	87,0
3	341,0	74,7	253,0	78,1
4	274,3	87,7	177,3	68,0
5	408,5	52,6	338,1	87,1
6	521,5	137,9	364,4	73,6
7	254,5	254,5	0	0
8	339,6	339,6	0	0
9	356,2	356,2	0	0
10	477,6	477,6	0	0
11	363,6	121,6	229,9	66,6
12	518,0	183,3	318,0	64,6
13	503,5	503,5	0	0
14	314,9	118,5	186,6	62,4
15	347,5	347,5	0	0
Média ± Desvio Padrão Sem Inversão Prévia da Sacarose				72,8 ± 9,33
Unidades: (S_{ART}) em g ART/L; (S_{AR}) em g AR/L; (S_{Sacarose}) em g Sacarose/L.				

3.2.1.1.2. Suplementação de Nutrientes

A suplementação de nutrientes propriamente dita é feita instantes antes do início da fermentação (ver subitem 3.2.1.7.). Para a suplementação, foram utilizadas soluções de Ureia e Triplofosfato de Sódio preparadas conforme descrição presente nos Apêndices A.2. e A.3., respectivamente.

3.2.1.1.3. Esterilização

1) Embalou-se uma série de instrumentos que foram utilizados nas fermentações realizadas, dentre os quais pode-se destacar: os erlenmeyers com mel diluído, com ureia e com triplofosfato de sódio, um erlenmeyer de um litro com cerca de 800 mL água de diluição, um erlenmeyer de meio litro vazio e Kitasatos de dois litros (Fermentadores) com algodão na abertura das mangueiras, todos selados com tampão justo de algodão e gaze no bocal seguido de papel jornal ou Kraft amarrado com barbante; pipetas volumétricas de vidro de 20 mL com algodão na parte superior, espátula grande, bastão de vidro, rolhas dos fermentadores e mangueiras com algodão nas extremidades (para os ensaios descontínuos alimentados), embalados com fita adesiva e papel de fax ou Kraft;

2) Colocou-se os instrumentos em autoclave, fechou-se a mesma e deixou-se por 25 minutos a pressão relativa de 1 atm (aproximadamente 120°C), desligando-se o equipamento e retirando-se algumas horas depois, após o resfriamento do mesmo.

A Figura 6 mostra a segunda diluição realizada e a transferência do mel para o erlenmeyer para autoclavagem (a); e a inserção dos elementos necessários na autoclave para esterilização (b).

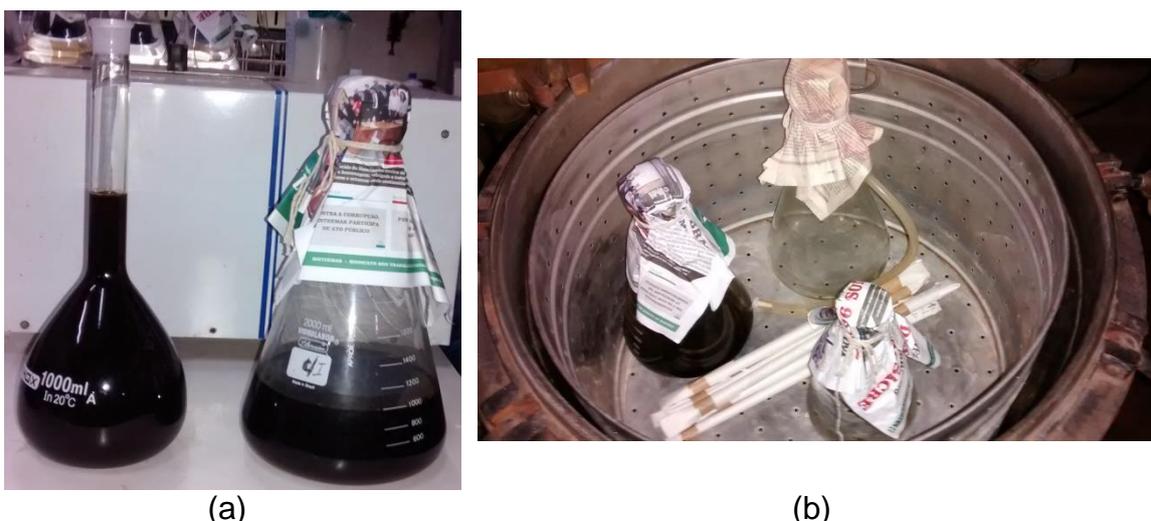


Figura 6: Segunda Diluição no Balão Volumétrico e Mel Transferido para Erlenmeyer e Fechado (a); Elementos Inseridos na Autoclave para Esterilização (b). Fonte: O Autor

3.2.1.2. Cálculo de Parâmetros Para Fermentações Descontínuas

A partir da concentração obtida de ART (glicose + frutose + sacarose + outros açúcares residuais) pela análise DNS do mel diluído e esterilizado nos erlenmeyers que foi chamado de Mosto Primário ($S_{\text{MostoPrim}}$), obtiveram-se os valores de volume e de massa total de mosto da fermentação com a levedura ($(V_{\text{TotalMosto}})$ e $(M_{\text{TotalMosto}})$, respectivamente), de massa de fermento adicionada ($(M_{\text{LeveduraAdic}})$ e de Volumes de Ureia e Triplofosfato de Sódio adicionados ($(V_{\text{UreiaFosfato}})$).

Dessa forma, para as fermentações descontínuas, sendo $(V_{\text{MostoPrim}})$ o volume de mosto primário adicionado, $(S_{\text{InicialFerm}})$ a concentração inicial de ART da fermentação desejada, $(\rho_{\text{MostoConclnicial}})$ a densidade de uma solução açucarada com concentração inicial de ART de fermentação $(S_{\text{InicialFerm}})$, $(X_{\text{MassaÚmidalnicial}})$ a concentração de levedura massa úmida inicial no mosto

(sempre se utilizou 50 g/L nas fermentações), ($C_{UreiaFosfatoInicialMosto}$) a concentração inicial de Ureia e Triplofosfato no mosto (sempre 0,4 g/L e 1 g/L, respectivamente) e ($C_{UreiaFosfatoSolPreparada}$) a concentração inicial das soluções de Ureia e Triplofosfato preparadas (sempre 40 g/L e 100 g/L, respectivamente), calculou-se pelas Equações de 7 a 10 os valores desejados.

$$V_{TotalMosto} = \frac{S_{MostoPrim} \cdot V_{MostoPrim}}{S_{InicialFerm}} \quad (7)$$

$$M_{TotalMosto} = \rho_{MostoConcInicial} \cdot V_{TotalMosto} \quad (8)$$

$$M_{LeveduraAdic} = X_{MassaÚmidaInicial} \cdot V_{TotalMosto} \quad (9)$$

$$V_{UreiaFosfatoAdic} = \frac{C_{UreiaFosfatoInicialMosto} \cdot V_{TotalMosto}}{C_{UreiaFosfatoSolPreparada}} \quad (10)$$

Na Tabela 4 constam os cálculos realizados para a obtenção do volume total de mosto que deveria existir nos fermentadores, o qual se planejou nas diluições iniciais que fosse de 1,7 litros, volume esse que teve de ser alterado em algumas fermentações devido às diferenças nos valores de concentração de ART desejados ($S_{Mel2^{a}Dil}^{Teórico}$) e obtidos com a análise DNS ($S_{MostoPrim}$). Juntamente a esse volume, obteve-se também os volumes de Ureia e Triplofosfato que deveriam ser adicionados em cada fermentação.

Tabela 4: Cálculo do Volume Total de Mosto e Volumes de Ureia e Triplofosfato Adicionados das Fermentações Descontínuas

Ensaio	$S_{MostoPrim}$	$V_{MostoPrim}$	$S_{InicialFerm}$	$V_{TotalMosto}$	$V_{UreiaFosfatoAdic}$
1	276,8		150	1,85	0,0185
2	289,1		200	1,45	0,0145
3	341,0		200	1,71	0,0171
4	274,3		200	1,37	0,0137
5	408,5	1,0	250	1,63	0,0163
6	521,5		250	2,09	0,0209
7	254,5		150	1,70	0,0170
8	339,6		200	1,70	0,0170
9	356,2		200	1,78	0,0178
10	477,6		250	1,91	0,0191

Unidades: ($S_{MostoPrim}$) e ($S_{InicialFerm}$) em g ART/L; ($V_{MostoPrim}$), ($V_{TotalMosto}$) e ($V_{UreiaFosfatoAdic}$) em L.

A Tabela 5 mostra o cálculo das massas totais de levedura e de mosto adicionadas nas fermentações realizadas.

Os valores de massa teóricos planejados e experimentais pesados não foram coincidentes devido a pequenos erros de pesagem, contudo apresentaram erros sempre menores que 1,67%.

Tabela 5: Massas de Levedura e de Mosto Totais Pesadas para as Fermentações Descontínuas

Ensaio	$\rho_{\text{MostoConcln}}$	$V_{\text{TotalMosto}}$	$M_{\text{TotalMosto}}^{\text{Teórico}}$	$M_{\text{TotalMosto}}^{\text{Pesada}}$	% Erro Mosto	$M_{\text{LevAdic}}^{\text{Teórica}}$	$M_{\text{LevAdic}}^{\text{Pesada}}$	% Erro Lev.
1	1061,9	1,85	1964,52	1950,41	0,72	92,50	92,23	0,29
2	1081,9	1,45	1568,76	1593,11	1,55	72,50	73,71	1,67
3	1081,9	1,71	1850,05	1827,93	1,20	85,50	85,03	0,55
4	1081,9	1,37	1482,20	1503,37	1,43	68,50	69,54	1,52
5	1101,9	1,63	1796,10	1795,93	0,01	81,50	81,99	0,60
6	1101,9	2,09	2302,97	2288,52	0,63	104,50	104,31	0,18
7	1061,9	1,70	1805,23	1796,11	0,51	85,00	85,04	0,05
8	1081,9	1,70	1839,23	1829,76	0,51	85,00	84,98	0,02
9	1081,9	1,78	1925,78	1895,18	1,59	89,00	87,52	1,66
10	1101,9	1,91	2104,63	2098,37	0,30	95,50	95,22	0,29

Unidades: ($\rho_{\text{MostoConcln}}$) em g/L; ($M_{\text{TotalMosto}}^{\text{Teórico}}$), ($M_{\text{TotalMosto}}^{\text{Pesada}}$), ($M_{\text{LevAdic}}^{\text{Teórica}}$) e ($M_{\text{LevAdic}}^{\text{Pesada}}$) em g; ($V_{\text{TotalMosto}}$) em L;

3.2.1.3. Cálculo de Parâmetros Para Fermentações Descontínuas Alimentadas com Inserção de Mel em Pulsos

Para as fermentações descontínuas alimentadas com alimentação em pulsos, utilizou-se basicamente as mesmas Equações 7 a 10, com a ressalva que foi utilizado como mosto primário o mosto da primeira inserção de mel, então gerando as Equações modificadas de 11 a 15, sendo: ($M_{\text{MostoPrim}}^{1^{\text{aIns}}}$) e ($V_{\text{MostoPrim}}^{1^{\text{aIns}}}$) a massa e o volume de mosto primário da primeira inserção de mel, respectivamente; ($S_{\text{InicialFerm}}^{\text{Após1^{\text{aIns}}}}$) a concentração inicial de ART da fermentação após a primeira inserção de mel; ($V_{\text{TotalMosto}}^{\text{Após1^{\text{aIns}}}}$) e ($M_{\text{TotalMosto}}^{\text{Após1^{\text{aIns}}}}$) o volume e a massa totais de mosto após a primeira inserção de mel, respectivamente.

$$V_{\text{MostoPrim}}^{1^{\text{aIns}}} = \frac{M_{\text{MostoPrim}}^{1^{\text{aIns}}}}{\rho_{\text{MostoPrim}}} \quad (11)$$

$$V_{\text{TotalMosto}}^{\text{Após1^{\text{aIns}}}} = \frac{S_{\text{MostoPrim}} \cdot V_{\text{MostoPrim}}^{1^{\text{aIns}}}}{S_{\text{InicialFerm}}^{\text{Após1^{\text{aIns}}}}} \quad (12)$$

$$M_{TotalMosto}^{Após1ªIns} = \rho_{MostoConcInicial} \cdot V_{TotalMosto}^{Após1ªIns} \quad (13)$$

$$M_{LeveduraAdic} = X_{MassaÚmidaInicial} \cdot V_{TotalMosto}^{Após1ªIns} \quad (14)$$

$$V_{UreiaFosfatoAdic} = \frac{C_{UreiaFosfatoInicialMosto} \cdot V_{TotalMosto}^{Após1ªIns}}{C_{UreiaFosfatoSolPreparada}} \quad (15)$$

Na Tabela 6 constam os cálculos realizados para a obtenção do volume total de mosto após a primeira inserção de mel que deveria existir nos fermentadores, o qual se planejou nas diluições iniciais que fosse de 1,7 litros, volume esse que teve de ser alterado em algumas fermentações devido às diferenças nos valores de concentração de ART desejados ($S_{Mel2ªDil}^{Teórico}$) e obtidos com a análise DNS ($S_{MostoPrim}$). Juntamente a esse volume, obteve-se também os volumes de Ureia e Triplofosfato que deveriam ser adicionados em cada fermentação.

Tabela 6: Cálculo do Volume Total de Mosto Após a Primeira Inserção de Mel e Volumes de Ureia e Triplofosfato Adicionados das Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação de Mel em Pulsos

Ensaio	$S_{MostoPrim}$	$M_{MostoPrim}^{1ªIns}$	$V_{MostoPrim}^{1ªIns}$	$S_{InicialFerm}^{Após1ªIns}$	$V_{TotalMosto}^{Após1ªIns}$	$V_{UreiaFosfatoAdic}$
11	363,6	267,27	0,233		1,69	0,0169
12	518,0	202,99	0,168	50	1,74	0,0174
13	503,5	202,82	0,169		1,70	0,0170

Unidades: ($S_{MostoPrim}$) e ($S_{InicialFerm}^{Após1ªIns}$) em g ART/L; ($M_{MostoPrim}^{1ªIns}$) em g; ($V_{MostoPrim}^{1ªIns}$), ($V_{TotalMosto}^{1ªIns}$) e ($V_{UreiaFosfatoAdic}$) em L.

A Tabela 7 mostra o cálculo das massas totais de levedura e de mosto adicionadas nas fermentações realizadas.

Os valores de massa teóricos planejados e experimentais pesados não foram coincidentes devido a pequenos erros de pesagem, contudo apresentaram erros sempre menores que 1,24%.

Tabela 7: Massas de Levedura e de Mosto Totais Pesadas para as Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos

Ensaio	$\rho_{\text{MostoConcl}}^{\text{Após1ªDil}}$	$V_{\text{TotalMosto}}^{\text{Após1ªIns}}$	$M_{\text{TotalMosto}}^{\text{TeoApós1ª}}$	$M_{\text{TotalMosto}}^{\text{PesApós1ª}}$	% Erro Mosto	$M_{\text{LevAdic}}^{\text{TeoApós1ª}}$	$M_{\text{LevAdic}}^{\text{PesApós1ª}}$	% Erro Lev.
1		1,69	1727,01	1735,28	0,48	84,50	85,00	0,59
2	1021,9	1,74	1778,11	1764,22	0,78	87,00	86,34	0,76
3		1,70	1737,23	1745,00	0,45	85,00	83,95	1,24

Unidades: ($\rho_{\text{MostoConcl}}^{\text{Após1ªDil}}$) em g/L; ($M_{\text{TotalMosto}}^{\text{TeoApós1ª}}$), ($M_{\text{TotalMosto}}^{\text{PesApós1ª}}$), ($M_{\text{LevAdic}}^{\text{TeoApós1ª}}$) e ($M_{\text{LevAdic}}^{\text{PesApós1ª}}$) em g; ($V_{\text{TotalMosto}}^{\text{Após1ªIns}}$) em L.

Foi necessário realizar correções nas leituras de concentrações experimentais de etanol e massa celular a partir da segunda inserção de mel no reator devido ao efeito de diluição acarretado por esse procedimento. Dessa forma, sendo: (**N**) o número da inserção de mel realizada (2ª ou 3ª); ($t_0^{\text{NªIns}}$), ($t_1^{\text{NªIns}}$), ($t_2^{\text{NªIns}}$), ($t_3^{\text{NªIns}}$) e assim por diante os tempos onde foram coletadas a primeira, a segunda, a terceira, a quarta e assim por diante amostras após a N-ésima inserção do mel; ($V_{\text{TotalMosto}}^{\text{AntesNªIns}}$) e ($V_{\text{TotalMosto}}^{\text{ApósNªIns}}$) os volumes totais de mosto antes e depois da N-ésima inserção de mel, respectivamente; ($P_{\text{Exper}}^{\text{ApósNªIns}}(t_i^{\text{NªIns}})$) o valor experimental, determinado na cromatografia, para o etanol para a amostra retirada no tempo ($t_i^{\text{NªIns}}$); ($P_{\text{ExperAjust}}^{\text{ApósNªIns}}(t_i^{\text{NªIns}})$) o valor da concentração de etanol ajustado para a amostra retirada no tempo ($t_i^{\text{NªIns}}$); ($X_{\text{Exper}}^{\text{ApósNªIns}}(t_i^{\text{NªIns}})$) o valor experimental, obtido no espectrofotômetro, da concentração celular para a amostra retirada no tempo ($t_i^{\text{NªIns}}$); e ($X_{\text{ExperAjust}}^{\text{ApósNªIns}}(t_i^{\text{NªIns}})$) o valor da concentração celular ajustado para a amostra retirada no tempo ($t_i^{\text{NªIns}}$); pelas Equações 16 a 22 obtêm-se os valores ajustados de concentração de etanol e celular que foram utilizados nesse trabalho.

$$P_{\text{ExperAjust}}^{\text{ApósNªIns}}(t_i^{\text{1ªIns}}) = P_{\text{Exper}}^{\text{ApósNªIns}}(t_i^{\text{1ªIns}}) \quad (16)$$

$$P_{\text{ExperAjust}}^{\text{ApósNªIns}}(t_0^{\text{NªIns}}) = P_{\text{Exper}}^{\text{ApósNªIns}}(t_0^{\text{NªIns}}) \cdot \left(\prod_2^N \frac{V_{\text{TotalMosto}}^{\text{ApósNªIns}}}{V_{\text{TotalMosto}}^{\text{AntesNªIns}}} \right) \quad (17)$$

$$P_{\text{ExperAjust}}^{\text{ApósNªIns}}(t_{i+1}^{\text{NªIns}}) = P_{\text{ExperAjust}}^{\text{ApósNªIns}}(t_i^{\text{NªIns}}) + \left(P_{\text{Exper}}^{\text{ApósNªIns}}(t_{i+1}^{\text{NªIns}}) - P_{\text{Exper}}^{\text{ApósNªIns}}(t_i^{\text{NªIns}}) \right) \quad (18)$$

$$X_{\text{ExperAjust}}^{\text{ApósNªIns}}(t_i^{\text{1ªIns}}) = X_{\text{Exper}}^{\text{ApósNªIns}}(t_i^{\text{1ªIns}}) \quad (19)$$

$$X_{ExperAjust}^{ApósN^aIns}(t_0^{N^aIns}) = X_{Exper}^{ApósN^aIns}(t_0^{N^aIns}) \cdot \left(\prod_2^N \frac{V_{TotalMosto}^{ApósN^aIns}}{V_{TotalMosto}^{AntesN^aIns}} \right) \quad (20)$$

$$X_{ExperAjust}^{ApósN^aIns}(t_{i+1}^{N^aIns}) = X_{ExperAjust}^{ApósN^aIns}(t_i^{N^aIns}) + \left(X_{Exper}^{ApósN^aIns}(t_{i+1}^{N^aIns}) - X_{Exper}^{ApósN^aIns}(t_i^{N^aIns}) \right) \quad (21)$$

$$i = 0, 1, 2, 3, 4, \dots \quad (22)$$

A Tabela 8 mostra as massas e volumes inseridos nas N-ésimas inserções de mel em cada fermentação, bem como as massas e volumes totais de mosto no fermentador antes e depois das N-ésimas inserções. As somas dos valores antes da N-ésima inserção com o valor inserido de mel nesta podem divergir um pouco do valor depois da N-ésima inserção devido a utilização de um pouco de água destilada para transferência quantitativa do mel para o fermentador.

Tabela 8: Massas e Volumes Totais de Mosto Antes e Depois das N-ésimas Inserções de Mel e de Mosto Primário Inserido nas N-ésimas Inserções de Mel

Fermentação	N-ésima Inserção de Mel	$M_{TotalMosto}^{AntesN^aIns}$	$V_{TotalMosto}^{AntesN^aIns}$	$M_{MostoPrim}^{N^aIns}$	$V_{MostoPrim}^{N^aIns}$	$M_{TotalMosto}^{ApósN^aIns}$	$V_{TotalMosto}^{ApósN^aIns}$
11	1	-	-	267,27	0,233	1735,28	1,698
	2	1371,80	1,372	166,21	0,145	1538,35	1,505
	3	1178,95	1,179	200,67	0,175	1379,33	1,350
12	1	-	-	202,99	0,168	1764,22	1,726
	2	1345,82	1,346	303,52	0,251	1688,70	1,636
	3	1367,36	1,367	303,83	0,251	1738,91	1,685
13	1	-	-	202,82	0,169	1745,00	1,708
	2	1478,75	1,479	303,84	0,253	1857,70	1,800
	3	1563,48	1,563	303,56	0,252	1966,55	1,906

Unidades: ($M_{TotalMosto}^{AntesN^aIns}$), ($M_{MostoPrim}^{N^aIns}$) e ($M_{TotalMosto}^{ApósN^aIns}$) em g; ($V_{TotalMosto}^{AntesN^aIns}$), ($V_{MostoPrim}^{N^aIns}$) e ($V_{TotalMosto}^{ApósN^aIns}$) em L.

Com a finalidade de comparar os regimes de operação descontínuo e descontínuo alimentado em pulsos, propôs-se um modelo unificado de forma que as três inserções de mel fossem representadas como se tivesse ocorrido apenas uma única inserção de mel. Para isso foi necessário o desenvolvimento de um tempo unificado (τ_i) obtido a partir dos tempos ($t_i^{N^aIns}$), gerando com isso valores de concentração de Etanol e ART ajustados ($P(\tau_i)$) e ($S(\tau_i)$) com base nos valores experimentais ($P(t_i^{N^aIns})$) e ($S(t_i^{N^aIns})$), respectivamente. Foram utilizados somente os pontos onde havia atividade fermentativa mais intensa, o que gerou a necessidade da criação de valores de ($t_i^{N^aIns}$) iguais a ($t_{(f1)}^{1^aIns}$),

$(t_{(f2)}^{2^{a}Ins})$ e $(t_{(f3)}^{3^{a}Ins})$, valores que representam os tempos onde a velocidade da reação de fermentação a partir desses se tornou praticamente nula por exaustão quase completa do ART, para a primeira, segunda a terceira inserções de mel respectivamente, o que não se modificou até a possível inserção seguinte de mel no fermentador. As Equações de 23 a 38 a seguir mostram como foram calculados os valores ajustados para a análise unificada.

Cálculo do Tempo no Modelo Unificado (τ_i):

$$\tau_i = t_i^{1^{a}Ins} \rightarrow i = 0, 1, 2, \dots, (f1) \quad (23)$$

$$\tau_{(f1)+1} = \tau_{(f1)} + (t_1^{2^{a}Ins} - t_0^{2^{a}Ins}) \quad (24)$$

$$\tau_{(f1)+i+2} = \tau_{(f1)+i+1} + (t_{i+2}^{2^{a}Ins} - t_{i+1}^{2^{a}Ins}) \rightarrow i = 0, 1, 2, \dots, ((f2) - 2) \quad (25)$$

$$\tau_{(f1)+(f2)+1} = \tau_{(f1)+(f2)} + (t_1^{3^{a}Ins} - t_0^{3^{a}Ins}) \quad (26)$$

$$\tau_{(f1)+(f2)+i+2} = \tau_{(f1)+(f2)+i+1} + (t_{i+2}^{3^{a}Ins} - t_{i+1}^{3^{a}Ins}) \rightarrow i = 0, 1, 2, \dots, ((f3) - 2) \quad (27)$$

Cálculo da Concentração de Etanol no Modelo Unificado ($P(\tau_i)$):

$$P(\tau_i) = P(t_i^{1^{a}Ins}) \rightarrow i = 0, 1, 2, \dots, (f1) \quad (28)$$

$$P(\tau_{(f1)+1}) = P(\tau_{(f1)}) + (P(t_1^{2^{a}Ins}) - P(t_0^{2^{a}Ins})) \quad (29)$$

$$P(\tau_{(f1)+i+2}) = P(\tau_{(f1)+i+1}) + (P(t_{i+2}^{2^{a}Ins}) - P(t_{i+1}^{2^{a}Ins})) \rightarrow i = 0, 1, 2, \dots, ((f2) - 2) \quad (30)$$

$$P(\tau_{(f1)+(f2)+1}) = P(\tau_{(f1)+(f2)}) + (P(t_1^{3^{a}Ins}) - P(t_0^{3^{a}Ins})) \quad (31)$$

$$P(\tau_{(f1)+(f2)+i+2}) = P(\tau_{(f1)+(f2)+i+1}) + (P(t_{i+2}^{3^{a}Ins}) - P(t_{i+1}^{3^{a}Ins})) \rightarrow i = 0, 1, 2, \dots, ((f3) - 2) \quad (32)$$

Cálculo da Concentração de ART no Modelo Unificado ($S(\tau_i)$):

$$S(\tau_0) = (S(t_0^{1^{a}Ins}) - S(t_{(f1)}^{1^{a}Ins})) + (S(t_0^{2^{a}Ins}) - S(t_{(f2)}^{2^{a}Ins})) + S(t_0^{3^{a}Ins}) \quad (33)$$

$$S(\tau_{i+1}) = S(\tau_i) + (S(t_{i+1}^{1^{a}Ins}) - S(t_i^{1^{a}Ins})) \rightarrow i = 0, 1, 2, \dots, ((f1) - 1) \quad (34)$$

$$S(\tau_{(f1)+1}) = S(\tau_{(f1)}) + (S(t_1^{2aIns}) - S(t_0^{2aIns})) \quad (35)$$

$$S(\tau_{(f1)+i+2}) = S(\tau_{(f1)+i+1}) + (S(t_{i+2}^{2aIns}) - S(t_{i+1}^{2aIns})) \rightarrow i = 0, 1, 2, \dots, ((f2) - 2) \quad (36)$$

$$S(\tau_{(f1)+(f2)+1}) = S(\tau_{(f1)+(f2)}) + (S(t_1^{3aIns}) - S(t_0^{3aIns})) \quad (37)$$

$$S(\tau_{(f1)+(f2)+i+2}) = S(\tau_{(f1)+(f2)+i+1}) + (S(t_{i+2}^{3aIns}) - S(t_{i+1}^{3aIns})) \rightarrow i = 0, 1, 2, \dots, ((f3) - 2) \quad (38)$$

3.2.1.4. Cálculo de Parâmetros Para Fermentações Descontínuas Alimentadas Reais (Com Inserção de Mel em Vazão Constante)

Para as fermentações descontínuas alimentadas com alimentação constante, fixou-se o volume total de mosto ($V_{TotalMosto}$), e sendo ($S_{Máx}$) a concentração máxima de ART que existiria nesse volume total caso a levedura não tivesse metabolizado nada (equivalente da concentração inicial da fermentação) e ($S_{MostoPrimário}$) a concentração de ART do mosto primário, achou-se o volume de mosto primário alimentado ($V_{MostoPrimárioAlim}$), com a densidade do mosto primário ($\rho_{MostoPrimário}$) achou-se a massa de mosto primário alimentado no fermentador ($M_{MostoPrimárioAlim}$), e obteve-se também o volume e a massa iniciais de solução de levedura ($V_{SolLeveduraInicial}$) e ($M_{SolLeveduraInicial}$), respectivamente, sendo a densidade da solução de levedura inicial ($\rho_{SolLeveduraInicial}$) aproximadamente igual a 1000 g/L. Para os cálculos para esse regime de operação portanto, substituiu-se as Equações 7 e 8 pelas de 39 a 42.

$$V_{MostoPrimárioAlim} = \frac{S_{Máx} \cdot V_{TotalMosto}}{S_{MostoPrimário}} \quad (39)$$

$$M_{MostoPrimárioAlim} = \rho_{MostoPrimário} \cdot V_{MostoPrimárioAlim} \quad (40)$$

$$V_{SolLeveduraInicial} = V_{TotalMosto} - V_{MostoPrimárioAlim} \quad (41)$$

$$M_{SolLeveduraInicial} = \rho_{SolLeveduraInicial} \cdot V_{SolLeveduraInicial} \quad (42)$$

Dado um tempo (t) de fermentação decorrido, foi possível obter os valores de massas de ART Consumido ($M_{ARTCons}(t)$), Etanol Produzido ($M_{EtanolProd}(t)$) e de Células no Fermentador ($M_{Celular}(t)$) nesse tempo (t) com as Equações de 43 a 47, sendo: ($V_{MostoPrimAdic}(t)$) e ($V_{MostonoFerm}(t)$) o volumes de

mosto primário adicionado e de mosto total no fermentador no tempo (t) , respectivamente; $(M_{ARTAdic}(t))$ e $(M_{ARTRes}(t))$ as massas de ART Adicionado e Residual no fermentador no tempo (t) , respectivamente; $(S_{Res}(t))$, $(P_{Prod}(t))$ e $(X_{Cresc}(t))$ os valores lidos de concentração de ART, Etanol e Celular para as amostras coletadas no tempo (t) .

$$V_{MostonoFerm}(t) = V_{SolLeveduraInicial} + V_{MostoPrimAdic}(t) \quad (43)$$

$$M_{ARTAdic}(t) = S_{MostoPrimário} \cdot V_{MostoPrimAdic}(t) \quad (44)$$

$$M_{ARTRes}(t) = S_{Res}(t) \cdot V_{MostonoFerm}(t) \quad (45)$$

$$M_{ARTCons}(t) = M_{ARTAdic}(t) - M_{ARTRes}(t) \quad (46)$$

$$M_{EtanolProd,Celular}(t) = (P_{Prod}, X_{Cresc})(t) \cdot V_{MostonoFerm}(t) \quad (47)$$

Para realizar uma comparação entre os regimes descontínuo e descontínuo alimentado com alimentação constante, utilizou-se a Equação 48 para obter concentrações ajustadas de ART Consumido (S_{Cons}^{Ajust}), Etanol Produzido (P_{Prod}^{Ajust}) e Celular (X_{Cresc}^{Ajust}) para esse fim.

$$(S_{Cons}^{Ajust}, P_{Prod}^{Ajust}, X_{Cresc}^{Ajust})(t) = \frac{M_{ARTCons,EtanolProd,Celular}(t)}{V_{TotalMosto}} \quad (48)$$

3.2.1.5. Método de Análise dos Resultados das Fermentações

Foram utilizados nesse trabalho modelos lineares para descrever os comportamentos das curvas de consumo de Açúcares Redutores Totais (S), produção de Etanol (P) e aumento da Massa Celular (X) no decorrer da fermentação. Para a comparação entre os regimes trabalhados, foi necessário utilizar concentrações de ART ($S(t)$), Etanol ($P(t)$) e Celulares ($X(t)$) nos tempos (t) ajustadas para os regimes descontínuos alimentados como visto nos subitens 3.2.1.3. e 3.2.1.4. Dessa forma, a Equação 49 define basicamente o modelo utilizado.

$$(S, P, X)(t) \left(\frac{g}{L} \right) = a_{S,P,X} \cdot t(h) + b_{S,P,X} \quad (49)$$

As velocidades de Consumo de ART (r_s), de Produção de Etanol (r_p), e de Aumento da Massa Celular (r_x) são dadas pela derivada temporal das suas respectivas concentrações, o que permite concluir que essas velocidades são obtidas pelo coeficiente angular da reta ajustada, conforme se pode ver pelas Equações 50, 51 e 52.

$$r_{(S,P,X)} \left(\frac{g}{L \cdot h} \right) = \frac{d(S,P,X)(t)}{dt} \quad (50)$$

$$r_{(S,P,X)} \left(\frac{g}{L \cdot h} \right) = \frac{d(a_{(S,P,X)} \cdot t(h) + b_{(S,P,X)})}{dt} \quad (51)$$

$$r_{(S,P,X)} \left(\frac{g}{L \cdot h} \right) = a_{(S,P,X)} \quad (52)$$

Com base nos valores de velocidade obtidos, obtêm-se os valores de ($Y_{P/S}$) e ($Y_{X/S}$) (fração mássica de Etanol e Células produzidos em relação a quantidade de ART consumidos, respectivamente) e o rendimento em etanol (η_{Etanol}) pelas Equações 53 e 54, sendo ($Y_{P/S}^{GL}$) o máximo rendimento possível de etanol a partir de monossacarídeos oriundo do balanço estequiométrico da reação $1 C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2$, 0,511 g Etanol / g ART.

$$Y_{(P,X)/S} \left(\frac{g \text{ Etanol, Células}}{g \text{ ART}} \right) = \frac{r_{(P,X)} \left(\frac{g \text{ Etanol, Células}}{L \cdot h} \right)}{r_s \left(\frac{g \text{ ART}}{L \cdot h} \right)} \quad (53)$$

$$\eta_{Etanol}(\%) = \left(\frac{Y_{P/S} \left(\frac{g \text{ Etanol}}{g \text{ ART}} \right)}{Y_{P/S}^{GL} \left(\frac{g \text{ Etanol}}{g \text{ ART}} \right)} \right) \cdot 100 \quad (54)$$

3.2.1.6. Inserção de Instrumentos e Frascos na Capela e Esterilização Adicional com Ultravioleta

Colocou-se em capela de fluxo laminar limpa com Álcool 70% os instrumentos esterilizados em autoclave, um maço de papéis-toalha e uma balança, em seguida fechou-se a capela, cobrindo-se o vidro com uma lona e deixou-se o interior da capela exposto a radiação ultravioleta (UV) por um período de vinte minutos. Desligou-se o UV e ligou-se o fluxo laminar da

capela. Frequentemente passou-se Álcool 70% nas mãos nas operações realizadas no interior da capela.

3.2.1.7. Preparo do Inóculo

1) Levou-se o bloco de fermento fresco dentro de um béquer de um litro fechado com filme plástico para dentro da capela. Abriu-se o erlenmeyer de meio litro vazio, abriu-se o pacote de fermento e inseriu-se com auxílio de uma espátula grande uma massa de fermento ($M_{LeveduraAdic}$) no frasco aberto;

2) Inseriu-se os volumes de Ureia e Triplofosfato ($V_{UreiaFosfato}$) com uma pipeta volumétrica de vidro no frasco contendo a levedura, então abriu-se o erlenmeyer de um litro com água de diluição e inseriu-se a mesma até um volume por volta de 400 mL nesse mesmo frasco, homogeneizando-se a levedura na medida do possível com o auxílio do bastão de vidro;

3) Para as fermentações descontínuas alimentadas com alimentação constante, abriu-se o Kitasato (fermentador), tarou-se e transferiu-se quantitativamente a solução de levedura para este, completando em seguida com água autoclavada até a massa ($M_{SolLeveduraInicial}$).

3.2.1.8. Início da Fermentação

1) Para as fermentações descontínuas e descontínuas alimentadas em pulso, abriu-se o frasco de mel diluído, abriu-se o Kitasato vazio, tarou-se o Kitasato na balança e inseriu-se no mesmo o mel quantitativamente com auxílio de água autoclavada;

2) Adicionou-se quantitativamente com auxílio de água autoclavada a solução de levedura ao Kitasato com mel, e completou-se com água autoclavada no Kitasato até a massa total de mosto ($M_{TotalMosto}$). Deve-se tomar cuidado em todas as transferências para não ultrapassar o valor de massa total de mosto;

3) Fechou-se o Kitasato com a rolha, homogeneizou-se a solução agitando-o na medida do possível, retirou-se o Kitasato da capela e levou-se até o banho termostático previamente ligado a 32°C (temperatura em que se realizou todas as fermentações), retirando o algodão da ponta da mangueira do

Kitasato e emborcando-a em um béquer de um litro quase cheio de água com hipoclorito. Acionou-se o cronômetro, sinalizando-se o início da fermentação;

4) Para as fermentações descontínuas alimentadas com alimentação constante, inseriu-se os dois erlenmeyers com mel em um segundo Kitasato vazio com um filtro de ar na saída da mangueira, tampou-se com rolha e levou-se os dois Kitasatos da capela até o ambiente onde a fermentação seria executada, onde tinha-se montado o sistema de bombeamento composto de mangueiras e bomba peristáltica;

5) Inseriu-se o Kitasato com levedura no banho termostático com um peso para que afundasse, e deixou-se o Kitasato com mel sobre uma balança, inserindo-se o sistema de bombeamento neste. Ligou-se a bomba praticamente no mínimo possível de sua rotação e bombeou-se até que o mel atravessasse todas as mangueiras, e aferiu-se a vazão de mel com um cronômetro e uma proveta;

6) Uma vez feito isso, acoplou-se a saída da vazão de mel no Kitasato com a levedura, tarou-se a balança e acionou-se o cronômetro, dando início a fermentação. A balança foi utilizada com o intuito de medir a massa de mel que estava saindo do Kitasato, o que juntamente com o cronômetro permitia monitorar a vazão de mel alimentada no fermentador.

A Figura 7 retrata os elementos utilizados para a realização do ensaio fermentativo na capela de fluxo laminar (a); e o fermentador acoplado no banho termostático com o mosto com processo de fermentação em desenvolvimento (b).

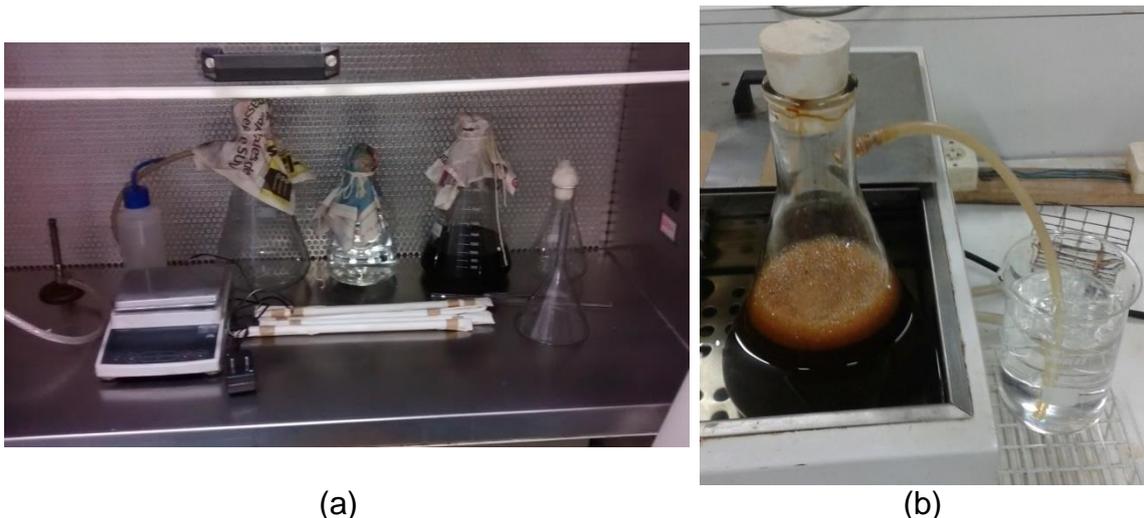


Figura 7: Instrumentos e Frascos Inseridos na Capela de Fluxo Laminar Antes da Fermentação (a); Aspecto Visual do Fermentador Durante a Fermentação (b); Fonte: O Autor

3.2.1.9. Retirada de Amostras

1) No início da fermentação, a cada hora para as fermentações descontínuas e a cada trinta minutos para as descontínuas alimentadas, agitou-se o fermentador na medida do possível e retirou-se amostras de mosto com uma pipeta de vidro de 20 mL autoclavada. Utilizou-se uma pequena tocha para flambar a pipeta antes e depois da coleta (a pipeta era devolvida para o invólucro de papel em que foi autoclavada após o uso para coleta, após algumas coletas trocava-se de pipeta) e para manter na abertura do fermentador enquanto se coletava a amostra em um tubo de ensaio. Coletou-se amostras de (V_{LevAm}) de 20 mL para as fermentações com sacarose previamente invertida e de 26 mL para fermentações sem a inversão prévia da mesma;

2) Inseriu-se o tubo de ensaio contendo o mosto em banho de água com gelo por um período de três minutos, agitando-o dentro do banho para o melhor resfriamento da amostra. Então, transferiu-se o mosto equitativamente para dois tubos de centrífuga de 15 mL de fundo cônico, fechou-se os tubos e inseriu-se na centrífuga por oito minutos a 5000 rpm;

A Figura 8 apresenta a retirada de uma alíquota de mosto do fermentador utilizando pipeta volumétrica (a); o mosto retirado inserido em tubos de fundo cônico (b); e os tubos de fundo cônico inseridos em centrífuga para centrifugação (c).

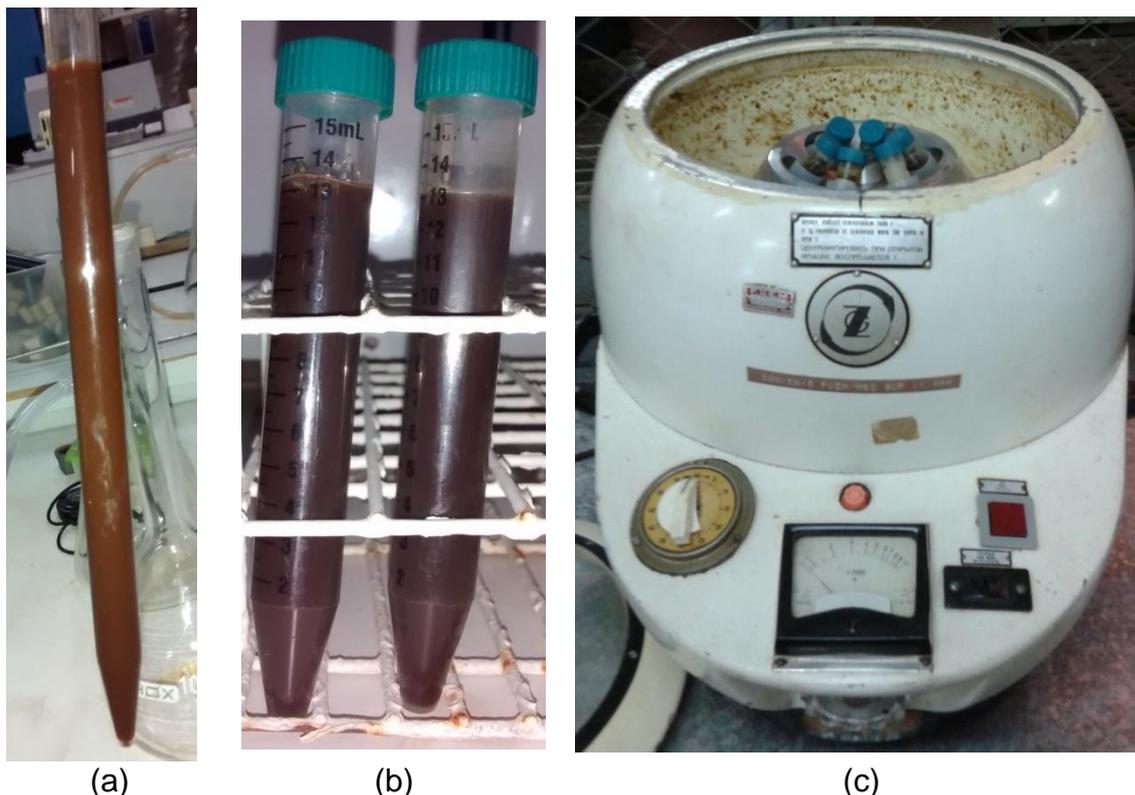


Figura 8: Amostra de Mosto Coletada do Fermentador (a); Amostra de Mosto Colocada em Tubos de Fundo Cônico (b); Centrífuga Utilizada (c); Fonte: O Autor

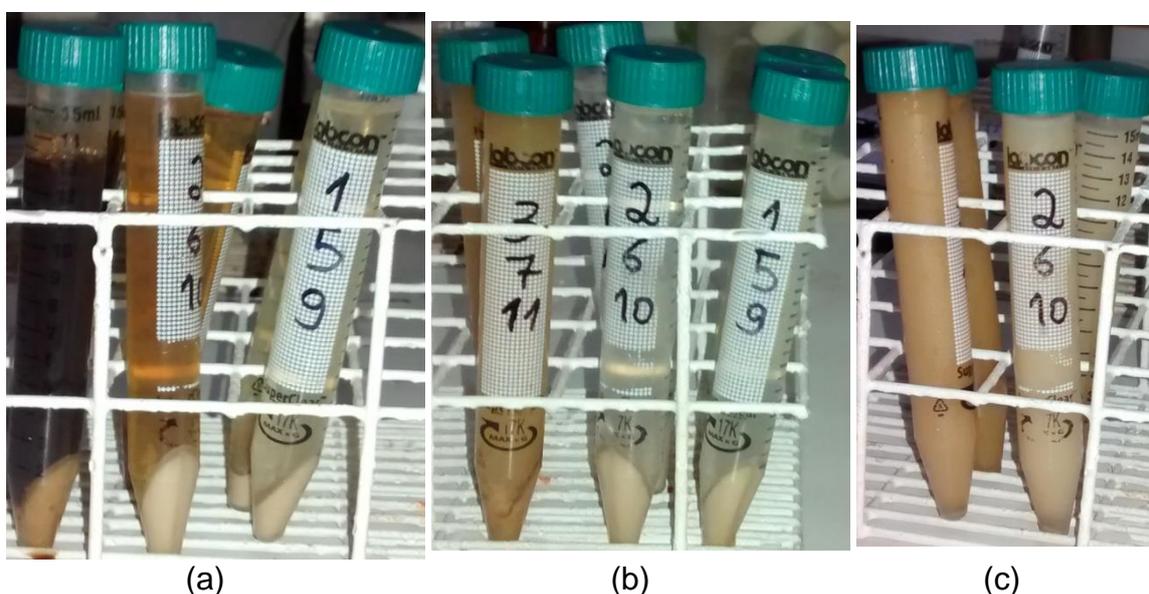
3) Retirou-se o tubo de fundo cônico da centrífuga e separou-se o sobrenadante da massa celular despejando-se o sobrenadante em um tubo de ensaio identificado, tampando-o com uma rolha perfurada e colocando-o no banho de gelo;

4) A massa celular que ficou alojada no tubo de fundo cônico foi utilizada para a leitura da concentração celular (ver subitem 3.2.3.3.), porém antes foram realizadas duas lavagens dessa levedura para retirar resíduos de sobrenadante que ainda ali permaneciam. Para realizar uma lavagem, ressuspendeu-se a levedura no tubo em que se encontrava em 15 mL de água destilada com auxílio de uma haste metálica e do agitador vortex e reinsereu-se o tubo na centrífuga;

5) Por praticidade, as operações de lavagem eram feitas simultaneamente à centrifugação do mosto. Dessa forma, colocou-se sempre para centrifugar, juntamente com o mosto (última amostra retirada) as amostras de massa celular ressuspendidas da primeira lavagem da penúltima amostra e da segunda lavagem da antepenúltima amostra. Ao terminar a centrifugação,

descartava-se a água residual da penúltima e da antepenúltima amostra, inseria-se água destilada nos seis tubos de fundo cônico, guardava-se a antepenúltima amostra em geladeira para posterior leitura da concentração celular, e ressuspensava-se a levedura nos outros quatro tubos, colocando-se os tubos no banho gelado até a próxima retirada de amostra do fermentador.

A Figura 9 apresenta o aspecto visual dos tubos de fundo cônico: após sair do processo de centrifugação (a); após a retirada do sobrenadante dos tubos e posterior inserção de água destilada (b); e após ressuspensão da levedura na água destilada (c);



(a) (b) (c)
Figura 9: Da Esquerda para Direita: Amostras de Mosto, da Primeira e da Segunda Lavagens Retiradas da Centrifuga (a); Amostras de Mosto, da Primeira e da Segunda Lavagens Após Inserção de Água Destilada (b); Amostras de Mosto e da Primeira Lavagem Ressuspensas (c). Fonte: O Autor

6) Nas fermentações descontínuas, fez-se a leitura do pH do sobrenadante utilizando o pHmetro, devolvendo-o em seguida para o tubo de ensaio em que tinha sido anteriormente inserido. Nas fermentações descontínuas, por inviabilidade experimental, fez-se essas leituras das amostras congeladas em um dia posterior ao da execução da fermentação;

7) Com o sobrenadante, realizou-se a destilação de 10 mL do mesmo em microdestilador (subitem 3.2.4.1.1.), congelando-se o destilado em freezer

para posterior análise da concentração de etanol por cromatografia gasosa (ver subitem 3.2.4.1.2.);

8) Após o sucesso da microdestilação, inseriu-se o tubo de ensaio com o resto do sobrenadante em banho com água fervente por um período de dez minutos, retirando-o e congelando em freezer também, para posterior análise das concentrações de ART, (ver subitens 3.2.2.4., 3.2.2.5. e 3.2.2.3. para amostras sem inversão prévia e subitem 3.2.2.3. para amostras previamente invertidas) e de AR e Sacarose para amostras sem inversão prévia (ver subitens 3.2.2.7. e 3.2.2.3.). Todas as análises de concentração celular, concentração de açúcar e concentração de etanol foram feitas em duplicata.

3.2.2. Medida da Concentração de Açúcares Redutores Totais (ART): Análise DNS

Para a análise da quantidade de Açúcares Redutores Totais (que são todos os monossacarídeos e dissacarídeos, com exceção da sacarose), foi utilizado o método DNS Modificado. O método DNS foi proposto primeiramente por Samner (1921), e baseia-se na redução do Ácido 3,5-Dinitrosalicílico (de cor amarelada) a Ácido 3-Amino-5-Nitrosalicílico ao mesmo tempo em que o grupo aldeído do açúcar é oxidado a grupo carboxílico, com o desenvolvimento de coloração avermelhada escurecida, lida em espectrofotômetro a 540 nm. O método modificado utilizado nesse trabalho é uma variação dos métodos proposto por Samner (1921) e por Miller (1959) desenvolvida pelo Laboratório Lawrence Berkeley (Universidade da Califórnia), no que se refere à preparação do reagente e à mudança do comprimento de onda de leitura no espectrofotômetro de 540 nm para 600 nm, com uma modificação adicional de diluição da amostra com água após o desenvolvimento da cor proposta por Zanin & Moraes (1987), descrito também por Bergamasco et al (2000).

Além do Ácido 3,5-Dinitrosalicílico, elemento-chave do funcionamento da técnica por sua alteração de cor, outros elementos são inseridos no preparo da solução que é utilizada no teste com funções específicas, dentre os quais podemos citar: o Hidróxido de Sódio, para reduzir a ação da glicose sobre o Ácido 3,5-Dinitrosalicílico; Fenol Comum, para intensificar a cor produzida; Tartarato de Sódio e Potássio, para prevenir o reagente da ação do oxigênio

dissolvido; e Sulfito de Sódio, para estabilizar a cor obtida na presença do Fenol Comum.

3.2.2.1. Preparação da Solução de DNS

A preparação da solução de DNS utilizada nesse trabalho foi realizada por metodologia padronizada, a qual se apresenta no Apêndice A.4.

3.2.2.2. Obtenção da Curva-Padrão da Solução de DNS

A metodologia de obtenção da curva-padrão da solução de DNS utilizada nesse trabalho é apresentada no Apêndice B.1.

3.2.2.3. Análise da Concentração de ART em uma Determinada Amostra

Para descobrir a concentração de ART (S_{Am}) em uma determinada amostra, utilizou-se a mesma metodologia aplicada para a confecção dos pontos da curva-padrão, porém ao invés de inserir os 0,5 mL de solução de Glicose + Frutose que eram adicionados ao tubo de ensaio, inseriu-se 0,5 mL da solução que se desejava aferir a concentração de ART. Contudo, é necessário que a solução adicionada ao tubo de ensaio esteja com concentração de ART entre 0 e 1 g ART/L (que é a amplitude da curva-padrão obtida anteriormente a essa análise), quando não esteve dentro dessa faixa (maioria dos casos), foi necessário realizar diluições até que a concentração de ART caísse dentro desse intervalo. Para realizar uma diluição, adicionou-se um volume de Solução (V_{Sol}) em um tubo de ensaio e em seguida adiciona-se um volume de água destilada ($V_{Água}$). Então tem-se um fator de diluição (FD), e tem-se uma diluição ($1:FD$), sendo (FD) dado pela primeira parte da Equação 50. Quando foi necessário realizar mais de uma diluição, o fator de diluição final (FD_{Final}) foi dado pela segunda parte da Equação 55, sendo (j) o número de diluições realizado.

$$FD = \frac{V_{Sol}(mL) + V_{Água}(mL)}{V_{Sol}(mL)} ; FD_{Final} = \prod_{i=1}^j FD_i \quad (55)$$

Sempre que se foi realizar uma análise de concentração de ART foi necessário preparar um novo branco para zerar a leitura de absorvância no espectrofotômetro. Com base na leitura de absorvância ($Abs(600nm)_{Am}$) obtida para a amostra, obteve-se pela equação da curva-padrão (Equação 49) o valor

da concentração de ART da amostra. Quando se realizou diluições, multiplicou-se o valor de concentração obtido pelo fator de diluição (FD_{Final}) utilizado. A concentração de ART de uma amostra (S_{Am}), sendo $(Abs(600nm))_{Am}$ a leitura de absorvância do espectrofotômetro para a amostra pela análise DNS, é dada na Equação 56, portanto.

$$S_{Am} \left(\frac{g}{L} \right) = \left(\frac{(Abs(600 nm))_{Am} - b_{ART}}{a_{ART}} \right) \cdot FD_{Final} \quad (56)$$

A Figura 10 mostra visualmente o resultado da análise DNS a cada hora de uma fermentação alcoólica realizada nesse trabalho.



Figura 10: Aspecto Visual do Resultado da Análise DNS a Cada Hora de Uma Fermentação Alcoólica Realizada. Fonte: O Autor

3.2.2.4. Método de Inversão da Sacarose por Hidrólise Ácida

Como dito no subtópico 3.2.2., o método DNS não é capaz de identificar a sacarose presente em uma amostra, logo quando se deseja obter a concentração total de açúcares (ART) em uma amostra (incluindo a concentração de sacarose), é necessário realizar a hidrólise das moléculas de sacarose presentes nesta amostra, processo que é chamado de inversão, e que têm como produtos Glicose e Frutose, açúcares esses sim que são identificados pelo método DNS. O método de inversão utilizado nesse trabalho foi proposto por Falcone & Marques (1965), e é realizado pelo método constante no Apêndice B.2.

3.2.2.5. Método de Inversão da Sacarose Utilizando Invertase

O método que será descrito está sendo proposto nesse trabalho, e consiste na descrição apresentada no Apêndice B.3.

3.2.2.6. Comparação dos Métodos de Inversão da Sacarose por Hidrólise Ácida e Utilizando Invertase

1) Pesou-se em um béquer de 200 mL uma massa de 35,00 g de Sacarose, solubilizou-se a mesma em cerca de 45 mL de água destilada com auxílio de um bastão de vidro e um banho termostático a 38°C, e adicionou-se quantitativamente a solução em um balão volumétrico de 100 mL, completando-se o balão com água destilada e homogeneizando-se;

2) Utilizou-se as técnicas de inversão da sacarose por hidrólise ácida (subitem 3.2.2.4.) e por invertase (subitem 3.2.2.5.) seguidas da análise DNS (subitem 3.2.2.3.) para obter a concentração experimental de ART ($S_{\text{ExpARTBalão}}$) para vinte amostras coletadas da solução de sacarose do balão (dez para cada método de inversão). Para encontrar a concentração de ART teórica do balão ($S_{\text{TeorARTBalão}}$), utilizou-se a Equação 57, sendo a concentração de sacarose teórica no balão ($S_{\text{TeorSacBalão}}$) igual a 350 g/L nesse caso.

$$S_{\text{TeorARTBalão}} \left(\frac{g \text{ ART}}{L} \right) = S_{\text{TeorSacBalão}} \left(\frac{g \text{ Sacarose}}{L} \right) \cdot \left(\frac{360 g \text{ ART}}{342 g \text{ Sacarose}} \right) \quad (57)$$

3.2.2.7. Medida da Concentração de Sacarose em uma Amostra

Após a leitura da Concentração de Açúcares Redutores Totais (S_{ART}) realizada com a técnica de inversão por Hidrólise Ácida (subitem 3.2.2.4) de uma amostra, pegou-se uma alíquota de 0,5 mL da mesma amostra original sem inverter, e simplesmente diluiu-se a mesma propriamente e fez-se a leitura de sua concentração de Açúcares Redutores (AR) (S_{AR}) pela análise DNS (subitem 3.2.2.3.). Assim sendo, a concentração de Sacarose é dada pela Equação 58.

$$S_{\text{Sacarose}} \left(\frac{g}{L} \right) = \left(S_{\text{ART}} \left(\frac{g}{L} \right) - S_{\text{AR}} \left(\frac{g}{L} \right) \right) \cdot \left(\frac{342 g \text{ Sac.}}{360 g \text{ Glic.+Frut.}} \right) \quad (58)$$

3.2.3. Medida da Concentração Celular

3.2.3.1. Curva-Padrão de Concentração Celular

O método de obtenção da curva-padrão de concentração celular utilizado nesse trabalho foi o proposto por Olivo (1985), com algumas pequenas modificações, e é apresentado no Apêndice B.4.

3.2.3.2. Obtenção da Porcentagem de Massa Seca da Levedura

3.2.3.2.1. Por Método Direto

O método direto utilizado nesse trabalho foi proposto por Ribbons & Norris (1969) e foi realizado conforme apresentado no Apêndice B.5.

3.2.3.2.2. Por Método com Microfiltração

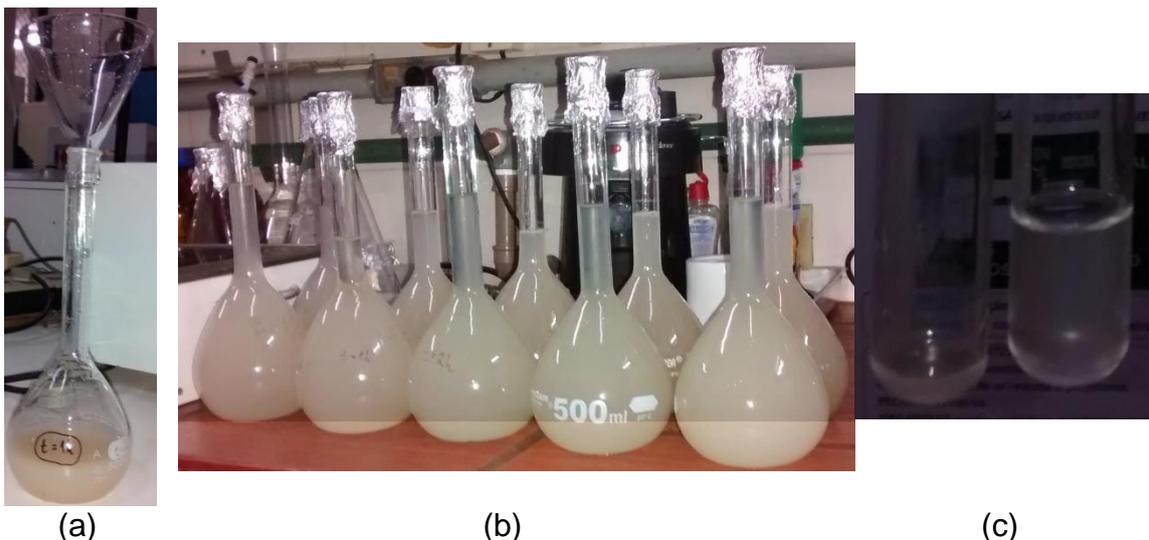
O método utilizado para a obtenção da porcentagem de massa seca da levedura utilizando microfiltração está detalhado no Apêndice B.6.

3.2.3.3. Medida da Concentração Celular Massa Seca de uma Determinada Amostra

1) Pegou-se toda a massa de levedura que existia em um volume conhecido de amostra (V_{LevAm}) e de concentração celular massa seca desconhecida ($X_{MassaSecaAm}$) e transferiu-se quantitativamente com auxílio de água destilada para um balão volumétrico de volume ($V_{BalãoLev}$), agitando-se bem o balão com volume parcialmente preenchido para homogeneização e depois completando-o com água destilada;

2) Agitou-se vigorosamente o balão, retirou-se parte de seu volume em um béquer e pipetou-se uma alíquota de solução rapidamente em um tubo de ensaio identificado. Pipetou-se em seguida água destilada no tubo caracterizando uma diluição ($1:FD_{Lev}$), fez-se a diluição de forma a se obter 5 mL de solução total no tubo de ensaio.

A Figura 11 mostra a etapa de transferência quantitativa da levedura para o balão volumétrico (a); uma série de amostras suspensas em balões volumétricos completos com água destilada (b); e a diluição adicional necessária da levedura para leitura no espectrofotômetro (c).



(a) (b) (c)
 Figura 11: Transferência da Massa de Levedura Para Balão Volumétrico (a); Série de Amostras de Massas Celulares Suspensas em Balões Volumétricos (b); Diluição da Solução dos Balões Volumétricos (c). Fonte: O Autor

3) Agitou-se o tubo de ensaio em agitador vortex, e rapidamente se transferiu a solução para cubetas plásticas e fez-se a leitura da Absorbância em 610 nm ($\text{Abs}(610\text{nm})_{Am}$) em Espectrofotômetro Shimadzu, zerando o espectro com água destilada. O volume do balão volumétrico e a diluição foram escolhidos de forma a se obter no tubo de ensaio uma solução com concentração celular massa úmida ($X_{DilMassaÚmida}$) entre 0 e 0,6 g/L (que é a amplitude da curva-padrão de massa celular obtida previamente). Com a leitura de Absorbância ($\text{Abs}(610\text{nm})_{Am}$) obtida, é possível saber a concentração da solução no tubo de ensaio ($X_{DilMassaÚmida}$) pela equação da curva-padrão (Equação 70), e a Concentração Celular Massa Seca da Amostra ($X_{MassaSecaAm}$) é dada pela Equação 59.

$$X_{MassaSecaAm} \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{\left(\frac{\text{Abs}(610\text{nm})_{Am} - b_{Cél}}{a_{Cél}} \right) \cdot FD_{Lev} \cdot V_{BalãoLev}(L) \cdot \%MassaSecaMicrof.}{V_{LevAm}(L)} \quad (59)$$

3.2.4. Medida da Concentração de Etanol

3.2.4.1. Análise da Concentração de Etanol de uma Determinada Amostra

3.2.4.1.1. Microdestilação

Foi utilizado para a realização da destilação um microdestilador da marca TECNAL, modelo TE-012. O método para realização da microdestilação de uma amostra é apresentado no Apêndice B.7.

3.2.4.1.2. Cromatografia a Gás

Foi utilizado para a realização das análises cromatográficas um cromatógrafo da marca VARIAN, modelo 3300, utilizando coluna Porapaq Q. O injetor e detector do cromatógrafo foram mantidos a 120 °C e a coluna foi mantida a 100 °C. Hélio foi utilizado como gás de arraste, numa vazão de 18,75 mL/min. A metodologia de análise cromatográfica a gás de uma amostra é apresentada no Apêndice B.8.

3.2.4.1.3. Concentração de Etanol com Resultado da Cromatografia a Gás

Tendo em mãos as áreas (A_{Etanol}) e ($A_{Água}$), foi necessário primeiramente multiplicar os valores por fatores de correção (FC_{Etanol}) e ($FC_{Água}$), que são 0,64 e 0,55 respectivamente, obtendo valores corrigidos de área (AC_{Etanol}) e ($AC_{Água}$). Com esses valores, foi possível saber o valor da Porcentagem Mássica de Etanol ($\%_{MásEt}$), com essa porcentagem foi possível obter a Densidade da Solução de Etanol (ρ_{SolEt}), sendo a Densidade do Etanol Puro (ρ_{EtPuro}) 789 g/L e a Densidade da Água Pura ($\rho_{ÁguaPura}$) 1000 g/L. Com a Porcentagem Mássica de Etanol, a Densidade da Solução de Etanol e a Eficiência da Microdestilação (η_{Dest}).(ver subitem 3.2.4.2.), obtêm-se enfim o valor da Concentração de Etanol P , pelas Equações 60, 61 e 62.

$$\%_{MásEt} = \left(\frac{AC_{Etanol}}{AC_{Etanol} + AC_{Água}} \right) \cdot 100 \quad (60)$$

$$\rho_{SolEtanol} \left(\frac{g \text{ Solução}}{L \text{ Solução}} \right) = \frac{1}{\left(\frac{\%MásEt}{100} \left(\frac{g \text{ Etanol}}{g \text{ Solução}} \right) \right) \left(\frac{g \text{ Etanol}}{L \text{ Etanol}} \right) + \left(\frac{100-\%MásEt}{100} \right) \left(\frac{g \text{ Água}}{g \text{ Solução}} \right) \left(\frac{g \text{ Água}}{L \text{ Água}} \right)} \quad (61)$$

$$P \left(\frac{g \text{ Etanol}}{L \text{ Solução}} \right) = \frac{\left(\frac{\%MásEt}{100} \left(\frac{g \text{ Etanol}}{g \text{ Solução}} \right) \right) \cdot \rho_{SolEtanol} \left(\frac{g \text{ Solução}}{L \text{ Solução}} \right)}{\left(\frac{\eta_{Dest.}^{Média}}{100} \right)} \quad (62)$$

3.2.4.2. Análise da Precisão da Cromatografia e da Eficiência da Destilação

1) Deixou-se em geladeira por algumas horas um frasco de solução de Etanol Absoluto com pureza mínima de 99,5% e água destilada. Pesou-se rapidamente 24,12 g de solução de Etanol e transferiu-se quantitativamente com auxílio da água destilada para um balão volumétrico de 200 mL, completando o balão, homogeneizando-se e obtendo-se dessa forma uma solução 120 g/L de Etanol;

2) Em tubos de ensaio com tampa de rosca, com uso de pipeta automática, preparou-se dez soluções de 10 mL com a Solução de Etanol 120 g/L e água destilada, sendo duas de cada de acordo com a Tabela 9, tentando sempre preservar os líquidos o mais frio possível para evitar evaporações de Etanol.

Tabela 9: Preparação das Soluções de Etanol

Amostra	Volume de Solução de Etanol (mL)	Volume de Água Destilada (mL)	Concentração (g/L)
1	2,0	8,0	24
2	4,0	6,0	48
3	6,0	4,0	72
4	8,0	2,0	96
5	10,0	0,0	120

3) Guardou-se na geladeira uma das baterias de amostra de 1 a 5, e destilou-se a outra bateria de amostras no microdestilador, coletando-se o destilado no mesmo tubo em que estava antes da destilação. Então fez-se a

leitura da concentração de etanol por cromatografia gasosa das dez amostras. Chamou-se a concentração de etanol teórica obtida na pipetagem de ($P_{\text{Pesada}}^{\text{Teórica}}$), e as concentrações experimentais obtidas na cromatografia gasosa sem e com microdestilação de ($P_{\text{Cromat}}^{\text{Exp.}\tilde{\text{N}}\text{Dest}}$) e ($P_{\text{Cromat}}^{\text{Exp.Dest}}$), respectivamente. Avaliou-se a precisão da cromatografia pela análise das amostras não-destiladas pelo erro experimental percentual da cromatografia $\%_{\text{ErroCrom}}$ dado pela Equação 63, e a eficiência da destilação com a análise das amostras destiladas pelo valor de eficiência percentual da destilação η_{Dest} , pela Equação 64.

$$\%_{\text{ErroCrom}} = \left(\frac{|P_{\text{Pesada}}^{\text{Teórica}}(g/L) - P_{\text{Cromat}}^{\text{Exp.}\tilde{\text{N}}\text{Dest}}(g/L)|}{P_{\text{Pesada}}^{\text{Teórica}}(g/L)} \right) \cdot 100 \quad (63)$$

$$\eta_{\text{Dest}} = \left(\frac{P_{\text{Cromat}}^{\text{Exp.Dest}}(g/L)}{P_{\text{Pesada}}^{\text{Teórica}}(g/L)} \right) \cdot 100 \quad (64)$$

4. Resultados e Discussão

4.1. Curva Padrão da Análise DNS

Foram preparadas no decorrer desse trabalho para análise da concentração de Açúcares Redutores Totais presente nas amostras coletadas dois lotes de solução DNS, sendo o primeiro lote utilizado nas dez fermentações descontínuas e o segundo nas cinco fermentações descontínuas alimentadas. Nas Tabelas 44 e 45 e Figuras 67 e 68 no Apêndice C.1. se encontram os dados experimentais utilizados para o ajuste da curva padrão que relaciona o valor de absorbância lido no espectrofotômetro com a concentração de glicose + frutose (ART) da solução padrão para os dois lotes de DNS preparados.

Observou-se nas curvas-padrões um bom valor de R^2 obtido com utilização de regressão linear, o que indica um bom ajuste da curva-padrão com esse modelo, que contudo se mostrou um pouco mais ineficiente no intervalo entre 0 e 0,1 g/L de concentração de glicose+frutose, devendo-se portanto evitar trabalhar nessa faixa de concentração. As equações de curvas-padrão obtidas para os dois lotes de DNS produzidos foram:

$$Abs (600 \text{ nm}) = 0,4864 \cdot S \left(\frac{g}{L} \right) - 0,0260 \quad R^2 = 0,996 \text{ (1º Lote)}$$

$$Abs (600 \text{ nm}) = 0,4668 \cdot S \left(\frac{g}{L} \right) - 0,0207 \quad R^2 = 0,996 \text{ (2º Lote)}$$

4.2. Teste Comparativo dos Métodos de Inversão por Hidrólise Ácida e por Invertase

A Tabela 46 no Apêndice C.2. mostra os resultados obtidos da análise da concentração de ART de soluções de sacarose a 350 g/L previamente preparadas após a realização da inversão dessas amostras pelos métodos de hidrólise ácida e utilizando invertase. Aparentemente, observando os valores obtidos pelas análises, as duas técnicas se mostraram bastantes eficientes na inversão da sacarose presente na solução. As relativas divergências observadas podem ter ocorrido devido à viscosidade da solução de sacarose (o que poderia interferir em parte na pipetagem da solução) e pequenos erros

acumulados das diversas diluições que foram necessárias até a obtenção dos valores finais.

4.3. Curva Padrão da Concentração Celular

Na Tabela 47 e na Figura 69 no Apêndice C.3. encontram-se os dados experimentais que relacionam a concentração celular em massa úmida de uma solução de levedura com os valores experimentais de absorvância obtidos experimentalmente por leitura no espectrofotômetro, bem como o ajuste da curva padrão de concentração celular com base nessa relação.

A partir de uma regressão linear, obteve-se um ótimo R^2 no ajuste, considerando ainda que o mesmo foi feito com amostras em quadruplicata, isso reforça o bom comportamento da curva-padrão desenvolvida dentro do intervalo analisado. A equação da curva-padrão de massa celular obtida é a seguinte:

$$Abs(610\text{ nm}) = 1,0913 \cdot X_{\text{MassaÚmida}} \left(\frac{g}{L} \right) + 0,0081 \quad R^2 = 0,9996$$

4.4. Cálculo da Porcentagem de Massa Seca – Método Direto

A Tabela 48 no Apêndice C.4. mostra o cálculo da porcentagem de massa seca que compõe a levedura que foi utilizada na realização dos ensaios de fermentação constantes nesse trabalho, pelo método direto. Obteve-se o valor médio de 31,9% para o método direto. O valor encontrado é similar aos valores obtidos de 30,4% por Acorsi (2012) e de 31,1% por Olivo (1985).

4.5. Cálculo da Porcentagem de Massa Seca – Método com Microfiltração

Na Tabela 49, encontra-se o cálculo da massa úmida de fermento que foi microfiltrada para a execução do método, na Tabela 50 encontra-se o cálculo utilizado para obter o valor da massa seca da membrana Millipore utilizada na microfiltração e na Tabela 51 encontra-se o cálculo realizado para a obtenção do valor de porcentagem de massa seca pelo método da microfiltração. As Tabelas 49, 50 e 51 se encontram no Apêndice C.5. Obteve-se o valor médio de 30,0% para o método com microfiltração, valor similar ao valor de 30,9% obtido por Bueno Netto (1982). As pequenas diferenças podem

se apresentar por diferença de cepas e lotes de fermento utilizados nos diversos trabalhos.

Houve uma pequena diferença dos valores obtidos pelos métodos direto e com microfiltração nesse trabalho, que pode ter sido acarretada pela presença de algum composto adicionado ao fermento com alguma função específica que provavelmente passou pela microfiltração.

4.6. Teste da Precisão da Cromatografia Gasosa e da Eficiência da Destilação

A Tabela 52 no Apêndice C.6. mostra os resultados relativos ao teste de precisão de leitura da cromatografia a gás e da eficiência do microdestilador em recuperar o etanol de uma amostra de concentração conhecida.

Observou-se um erro médio na precisão da cromatografia de 4,2%, o que mostra que o equipamento tem uma precisão aceitável. As diferenças também podem ter ocorrido devido a fatores como fração mássica de etanol levemente superior ou inferior à informada no rótulo do reagente, pequenos erros de diluição e pequena perda por evaporação do etanol da solução da preparação até a leitura. Quanto à eficiência da destilação, observou-se o valor de 89,2%, o que aparentemente indica que ao se destilar uma amostra no microdestilador, perde-se o valor médio de 10,8% do etanol presente na mesma. Logo, utilizou-se esse valor para realizar um ajuste das concentrações de etanol obtidas pelas análises cromatográficas realizadas.

4.7. Resultados das Fermentações Descontínuas

4.7.1. Introdução dos Resultados das Fermentações Descontínuas

As Tabelas 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 23, 24 e 25 apresentam uma série de informações relativas às amostras de mosto coletadas a cada hora do fermentador nas fermentações descontínuas de 1 a 10 realizadas, respectivamente, dentre as quais se encontram: pH do mosto; pH da amostra com a neutralização da mesma após a inversão da sacarose por hidrólise ácida (somente para as fermentações 1 a 6, sem inversão prévia da sacarose); e concentrações de ART pelo método de hidrólise ácida, de Etanol e Celular do mosto.

As Tabelas 11, 13, 15, 17, 19 e 21 apresentam uma série de informações relativas às amostras de mosto coletadas a cada hora do fermentador nas fermentações descontínuas de 1 a 6 (sem inversão prévia da sacarose) realizadas, respectivamente, dentre as quais se encontram: Concentração de ART pelo método de inversão utilizando invertase, Concentração de AR e Concentração de Sacarose (obtida com base na concentração de ART por hidrólise ácida e na concentração de AR) do mosto.

As Figuras 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 38, 40 e 42 apresentam os valores de Concentração de ART e Etanol do mosto obtidos experimentalmente a cada hora de fermentação para as fermentações descontínuas de 1 a 10, respectivamente. Utilizou-se um modelo linear para descrever as curvas de consumo de ART e produção de Etanol nesses gráficos, e apresentaram-se nas figuras as equações de reta obtidas com seus respectivos valores de R^2 .

As Figuras 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 39, 41 e 43 apresentam os valores de Concentração Celular do mosto obtidos experimentalmente a cada hora de fermentação para as fermentações descontínuas de 1 a 10, respectivamente. Apresentou-se nas figuras uma linha-base que representa a concentração celular massa seca inicial que se utilizou em todos os ensaios (15,0 g/L).

As Figuras 14, 18, 22, 26, 30 e 34 apresentam os valores de Concentrações de ART com inversão da sacarose pelo método de hidrólise ácida, de AR e de Sacarose (com base nos valores de concentração de ART e AR) obtidos experimentalmente a cada hora de fermentação para as fermentações descontínuas de 1 a 6, respectivamente.

As Figuras 15, 19, 23, 27, 31 e 35 apresentam os valores de Concentrações de ART com inversão da sacarose pelo método de hidrólise ácida e pelo método utilizando enzima invertase obtidos experimentalmente a cada hora de fermentação para as fermentações descontínuas de 1 a 6, respectivamente.

4.7.2. Fermentação 1 – Resultados

Tabela 10: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 1

Tempo (h)	pH Mosto	pH Hidr. Ácida	Concentração ART Hidrólise Ácida (g/L)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração Celular Massa Seca (g/L)
0,05	5,14	5,42	151	0,00	5,69
1,10	4,87	5,69	126	8,88	10,2
2,35	4,87	6,01	83,2	25,8	8,22
3,25	4,89	5,39	46,9	42,0	15,1
4,20	4,88	5,90	14,1	47,4	10,9
5,10	4,85	5,76	1,98	51,8	10,1
6,20	4,90	6,39	0,98	52,1	9,14
7,20	4,90	4,97	1,32	54,0	8,39
8,20	4,90	5,48	1,41	54,3	8,42

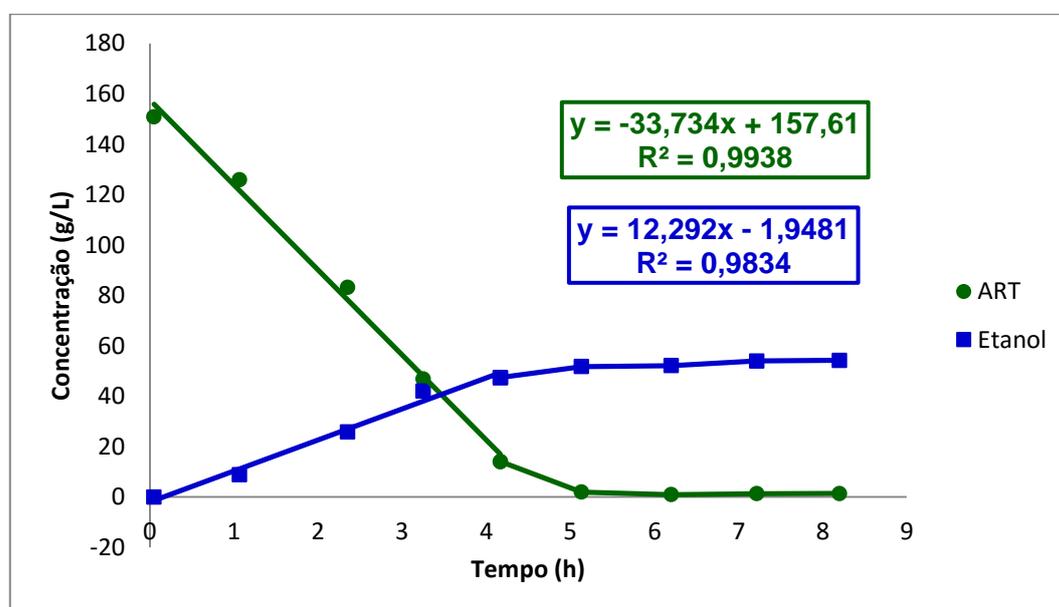


Figura 12: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 1

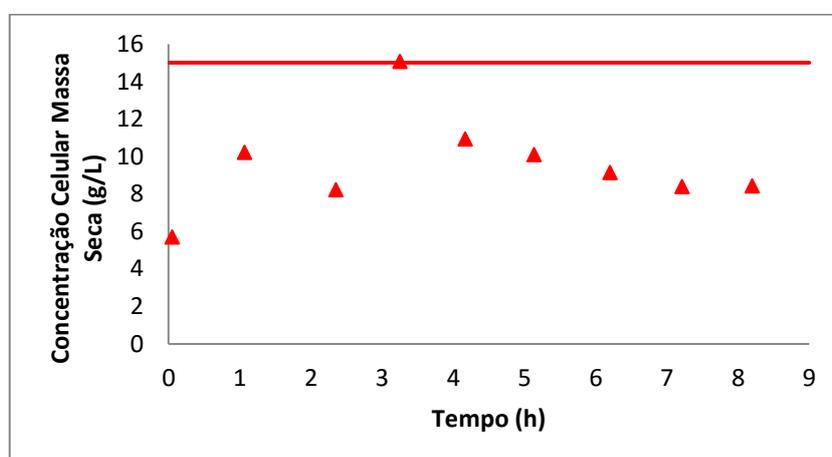


Figura 13: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 1

Tabela 11: Variação das Concentrações de ART com Inversão por Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 1

Tempo (h)	Concentração ART Invertase (g/L)	Concentração AR (g/L)	Concentração de Sacarose (g/L)
0,05	152	109	39,7
1,10	132	129	0,00
2,35	85,8	83,0	0,22
3,25	46,0	41,8	4,81
4,20	22,5	16,0	0,00
5,10	1,67	1,73	0,24
6,20	1,91	1,68	0,00
7,20	0,89	0,94	0,36
8,20	0,88	1,32	0,09

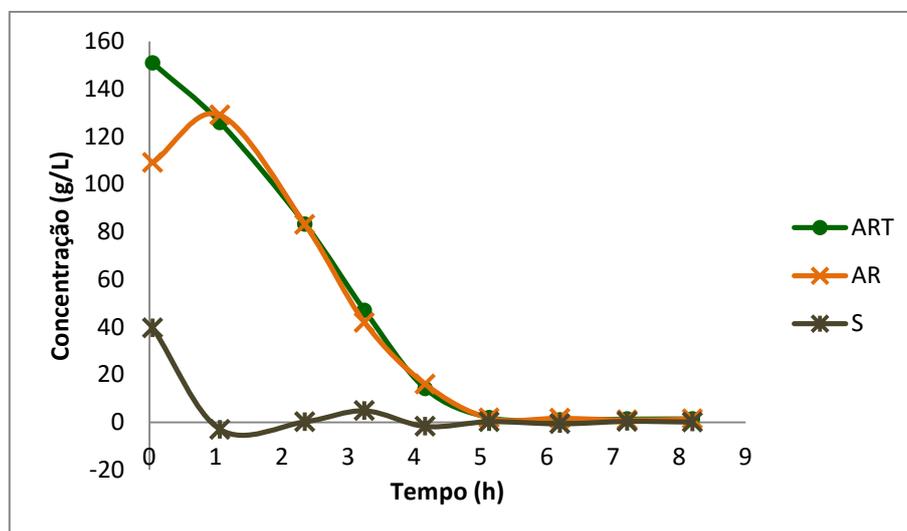


Figura 14: Variação das Concentrações de ART, AR e Sacarose Com o Tempo na Fermentação 1

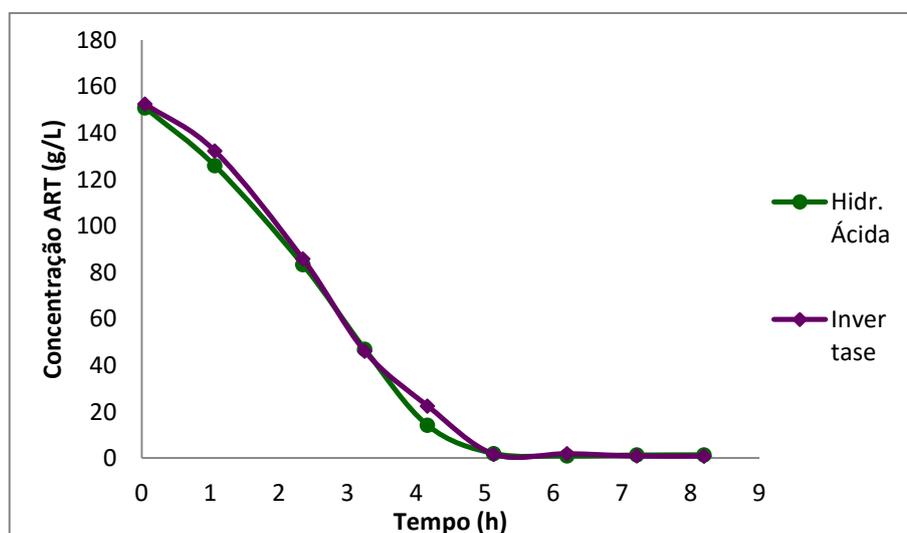


Figura 15: Comparação das Inversões por Hidrólise Ácida e por Invertase na Fermentação 1

4.7.3. Fermentação 2 – Resultados

Tabela 12: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 2

Tempo (h)	pH Mosto	pH Hidr. Ácida	Concentração ART Hidrólise Ácida (g/L)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração Celular Massa Seca (g/L)
0,05	5,29	5,26	195	0,00	15,8
1,30	5,01	5,69	172	11,8	14,8
2,35	4,92	6,32	134	25,5	17,3
3,35	4,91	5,67	102	40,2	20,0
4,45	4,88	5,87	65,0	51,7	20,0
5,50	4,89	5,42	36,0	64,7	20,3
6,45	4,90	6,01	4,17	72,0	20,8
7,55	4,94	5,33	2,26	76,0	18,8
8,70	4,95	5,98	2,41	74,0	14,0
9,70	4,97	5,74	1,99	71,6	16,8

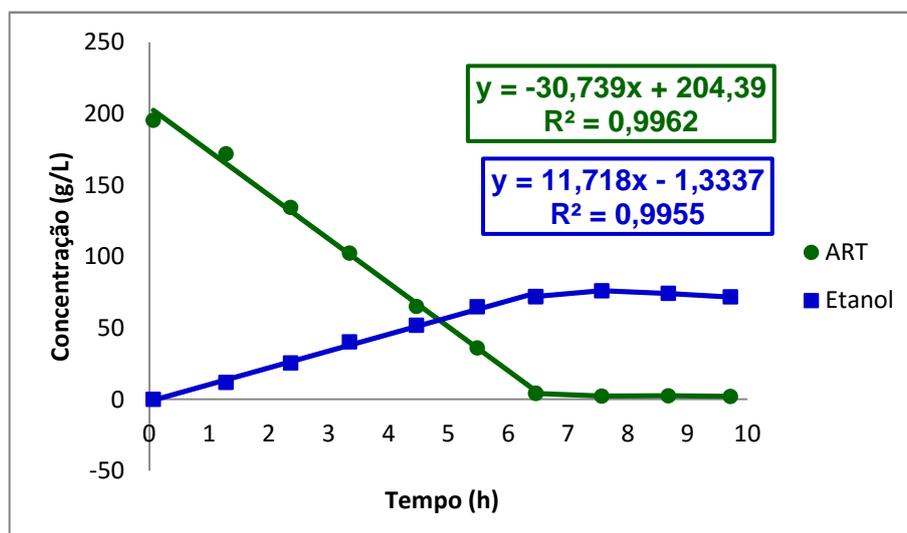


Figura 16: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 2

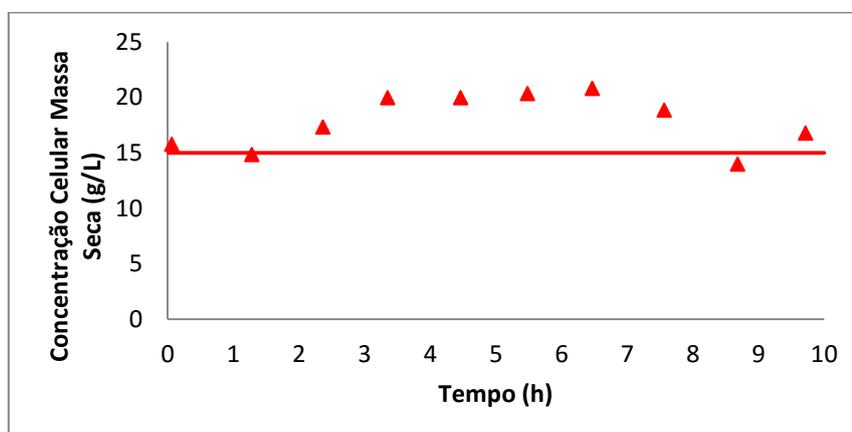


Figura 17: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 2

Tabela 13: Variação das Concentrações de ART com Inversão por Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 2

Tempo (h)	Concentração ART Invertase (g/L)	Concentração AR (g/L)	Concentração de Sacarose (g/L)
0,05	200	142	50,8
1,30	173	171	0,49
2,35	139	133	1,39
3,35	106	99,8	2,33
4,45	70,6	59,4	5,37
5,50	37,4	38,7	0,00
6,45	3,91	5,08	0,00
7,55	2,31	2,16	0,10
8,70	1,78	2,30	0,10
9,70	2,06	2,07	0,00

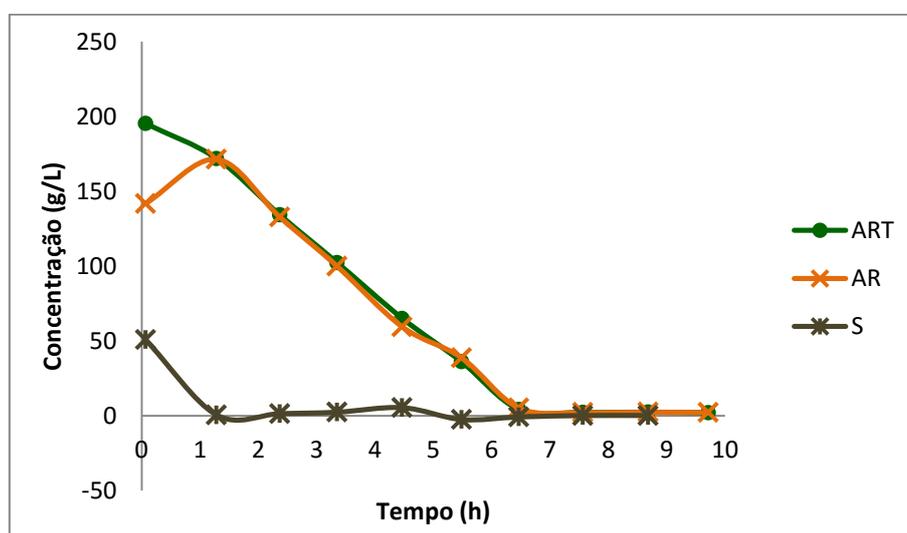


Figura 18: Variação das Concentrações de ART, AR e Sacarose Com o Tempo na Fermentação 2

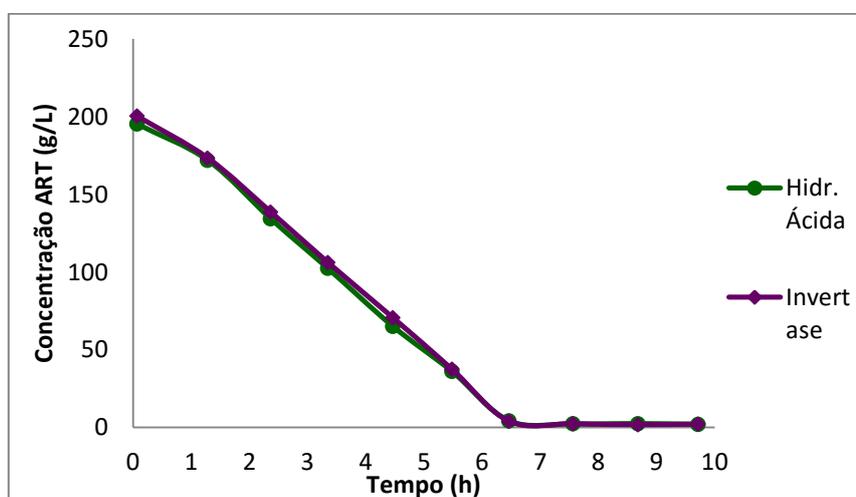


Figura 19: Comparação das Inversões por Hidrólise Ácida e por Invertase na Fermentação 2

4.7.4. Fermentação 3 – Resultados

Tabela 14: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 3

Tempo (h)	pH Mosto	pH Hidr. Ácida	Concentração ART Hidrólise Ácida (g/L)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração Celular Massa Seca (g/L)
0,10	5,11	6,20	199	0,0	13,0
1,20	4,82	4,54	174	10,3	21,8
2,05	4,75	6,03	133	20,5	18,1
3,05	4,71	7,37	106	32,5	15,8
4,15	4,77	6,95	65,6	43,7	12,0
5,25	4,77	7,94	26,8	52,4	18,3
6,50	4,81	4,67	2,08	67,5	20,1
8,15	4,86	4,63	1,96	68,3	28,0
9,20	4,87	6,88	2,21	65,5	28,4

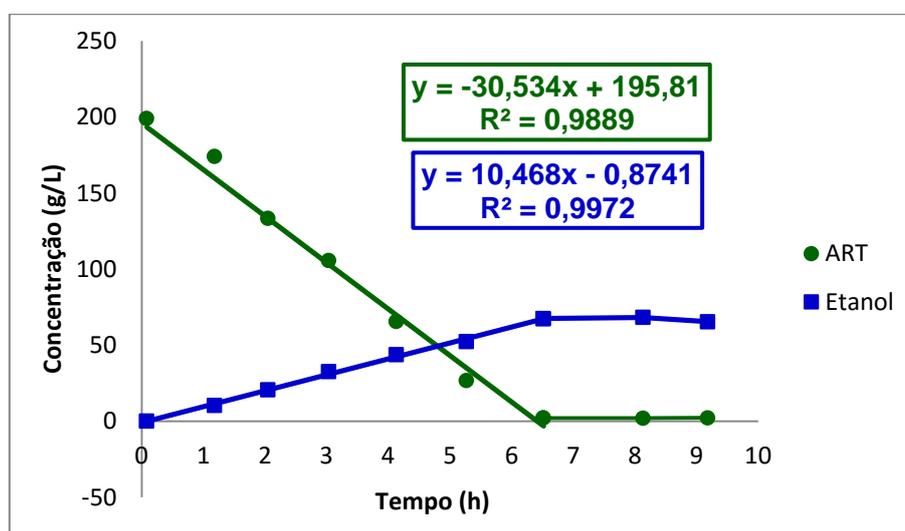


Figura 20: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 3

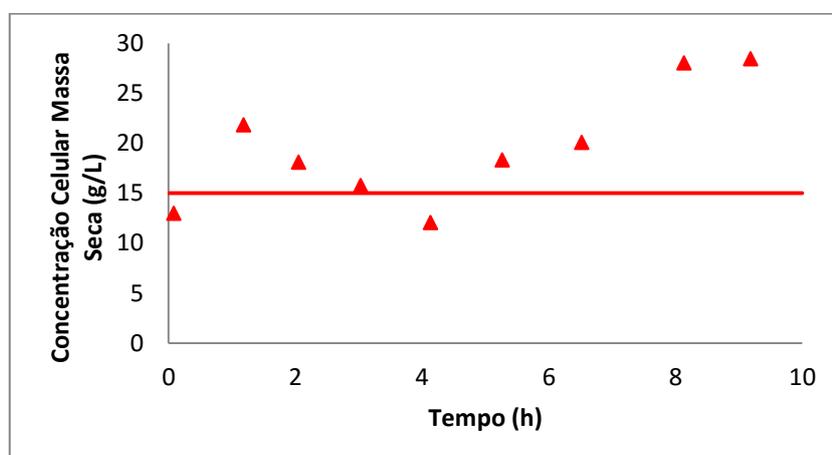


Figura 21: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 3

Tabela 15: Variação das Concentrações de ART com Inversão por Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 3

Tempo (h)	Concentração ART Invertase (g/L)	Concentração AR (g/L)	Concentração de Sacarose (g/L)
0,10	199	180	17,9
1,20	172	163	10,5
2,05	138	136	0,00
3,05	99,0	96,2	9,02
4,15	54,4	56,3	8,82
5,25	21,3	22,5	4,01
6,50	2,13	2,10	0,00
8,15	1,91	2,32	0,00
9,20	2,46	1,97	0,23

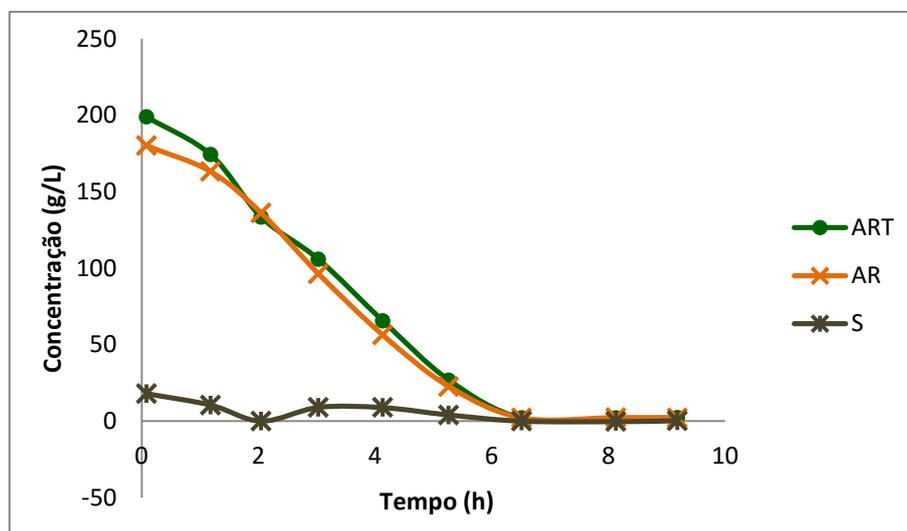


Figura 22: Variação das Concentrações de ART, AR e Sacarose Com o Tempo na Fermentação 3

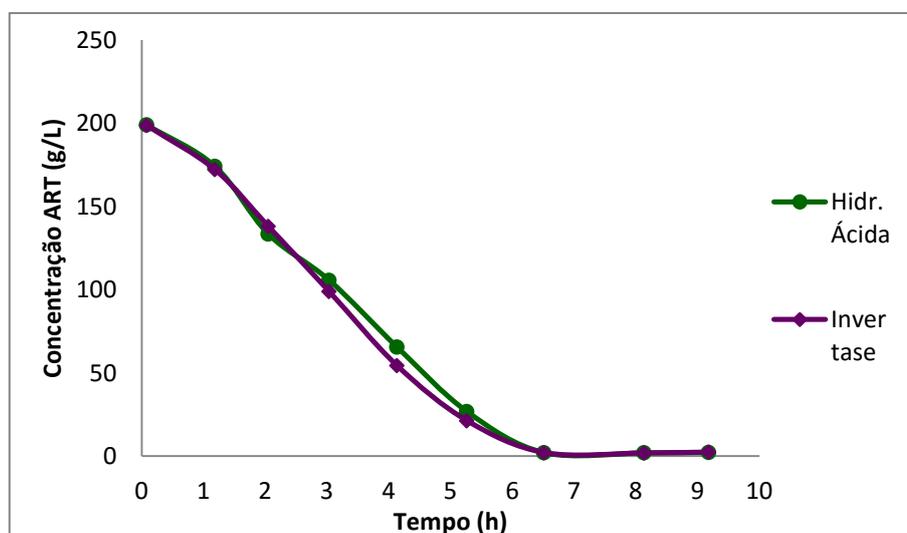


Figura 23: Comparação das Inversões por Hidrólise Ácida e por Invertase na Fermentação 3

4.7.5. Fermentação 4 – Resultados

Tabela 16: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 4

Tempo (h)	pH Mosto	pH Hidr. Ácida	Concentração ART Hidrólise Ácida (g/L)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração Celular Massa Seca (g/L)
0,05	5,21	5,66	201	3,26	8,68
1,15	5,10	5,30	171	5,50	13,8
2,05	4,99	5,48	140	8,41	15,3
3,05	4,92	4,95	132	10,6	14,5
4,00	4,87	4,82	125	13,2	15,4
5,15	4,72	5,23	110	17,6	16,5
6,25	4,60	4,84	99,6	21,3	15,4
7,55	4,47	5,13	82,3	24,9	15,9
8,65	4,38	5,22	64,1	29,5	17,4

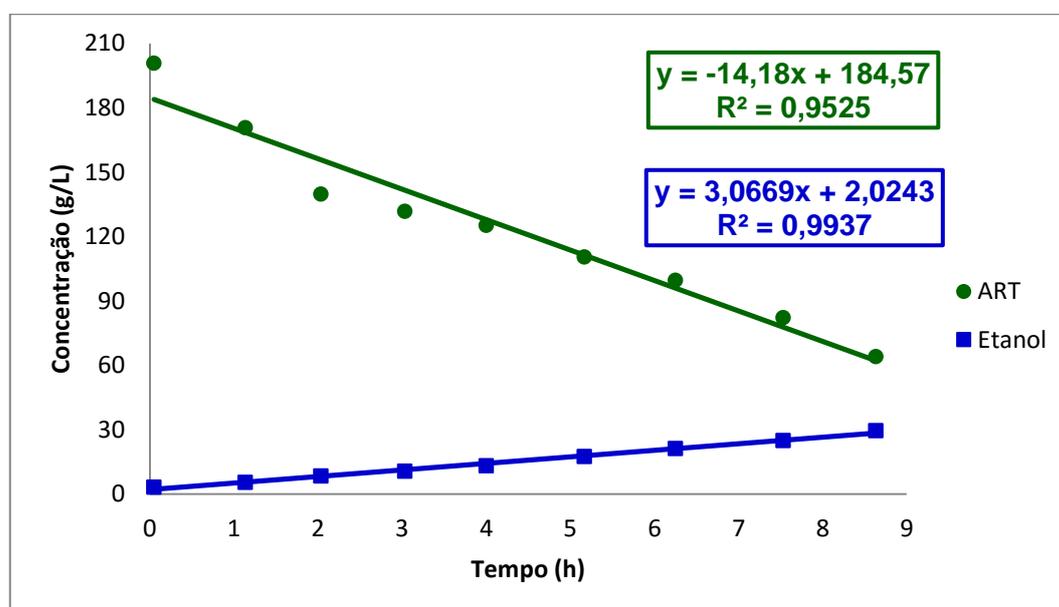


Figura 24: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 4

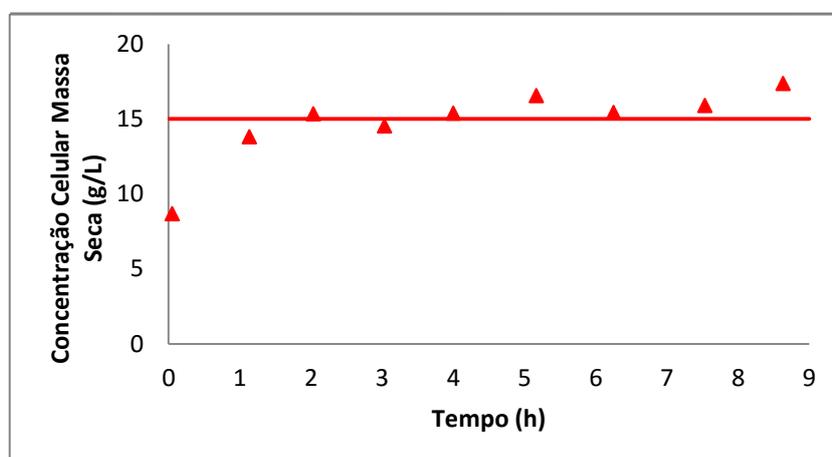


Figura 25: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 4

Tabela 17: Variação das Concentrações de ART com Inversão por Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 4

Tempo (h)	Concentração ART Invertase (g/L)	Concentração AR (g/L)	Concentração de Sacarose (g/L)
0,05	193	105	91,3
1,15	169	159	11,5
2,05	140	129	10,3
3,05	129	118	12,8
4,00	126	117	7,46
5,15	114	99,1	10,8
6,25	102	94,0	5,30
7,55	76,7	78,9	3,18
8,65	69,0	60,5	3,44

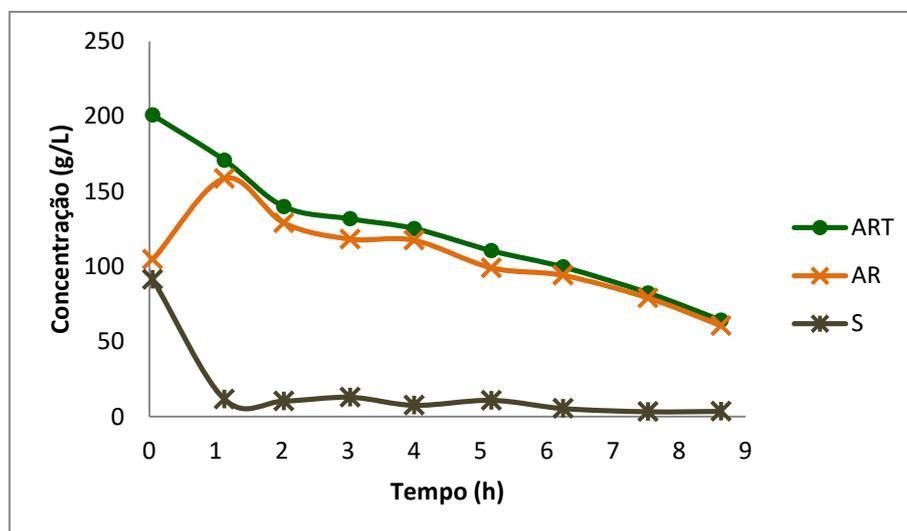


Figura 26: Variação das Concentrações de ART, AR e Sacarose Com o Tempo na Fermentação 4

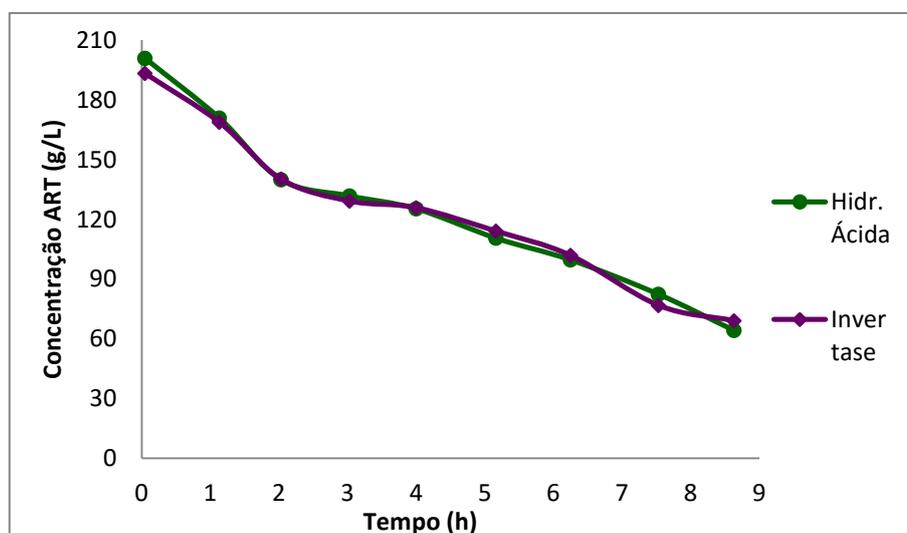


Figura 27: Comparação das Inversões por Hidrólise Ácida e por Invertase na Fermentação 4

4.7.6. Fermentação 5 – Resultados

Tabela 18: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 5

Tempo (h)	pH Mosto	pH Hidr. Ácida	Concentração ART Hidrólise Ácida (g/L)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração Celular Massa Seca (g/L)
0,10	5,12	5,60	263	0,00	14,6
1,70	4,97	5,25	229	13,0	14,7
2,75	4,97	5,38	205	26,6	14,2
3,75	4,90	5,34	174	32,6	15,8
5,15	4,93	5,61	133	44,6	17,4
6,45	4,95	5,40	99,4	56,5	15,6
7,60	4,97	5,16	77,8	69,5	16,0
9,25	4,98	5,50	56,4	84,3	18,1

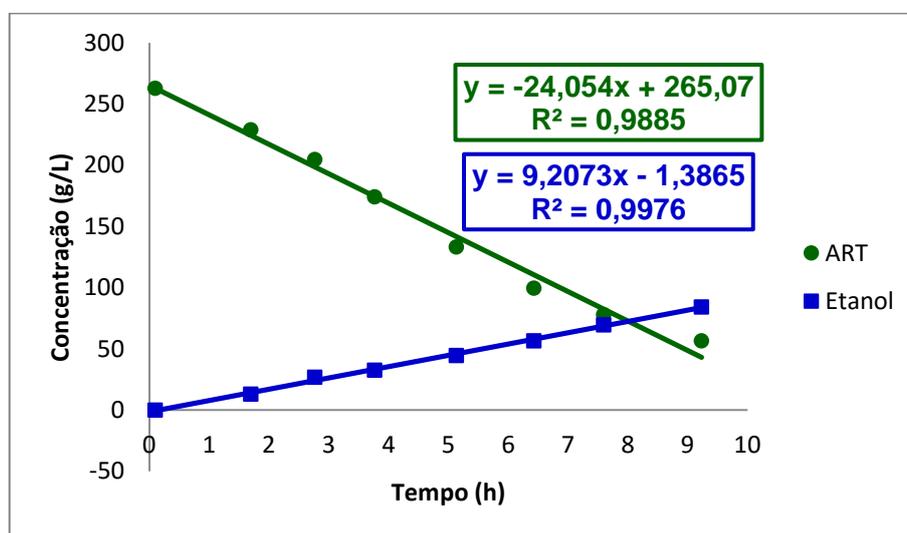


Figura 28: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 5

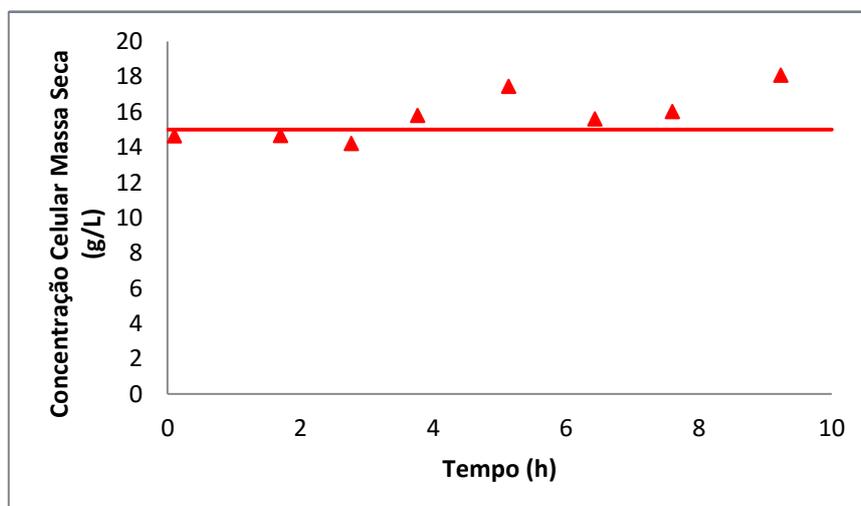


Figura 29: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 5

Tabela 19: Variação das Concentrações de ART com Inversão por Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 5

Tempo (h)	Concentração ART Invertase (g/L)	Concentração AR (g/L)	Concentração de Sacarose (g/L)
0,10	281	205	54,6
1,70	228	228	0,65
2,75	212	200	4,35
3,75	171	167	6,47
5,15	132	127	5,48
6,45	99,3	97,8	1,56
7,60	76,2	74,2	3,35
9,25	51,7	50,0	6,15

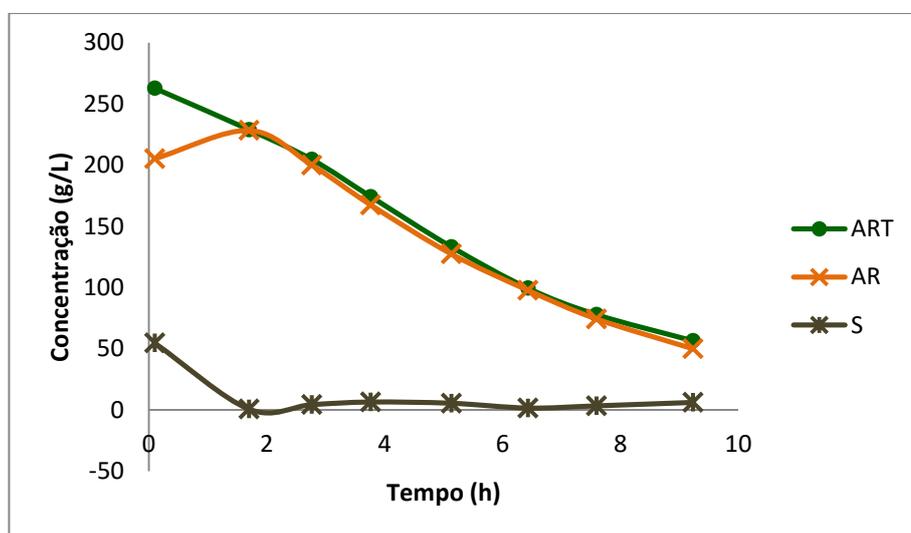


Figura 30: Variação das Concentrações de ART, AR e Sacarose Com o Tempo na Fermentação 5

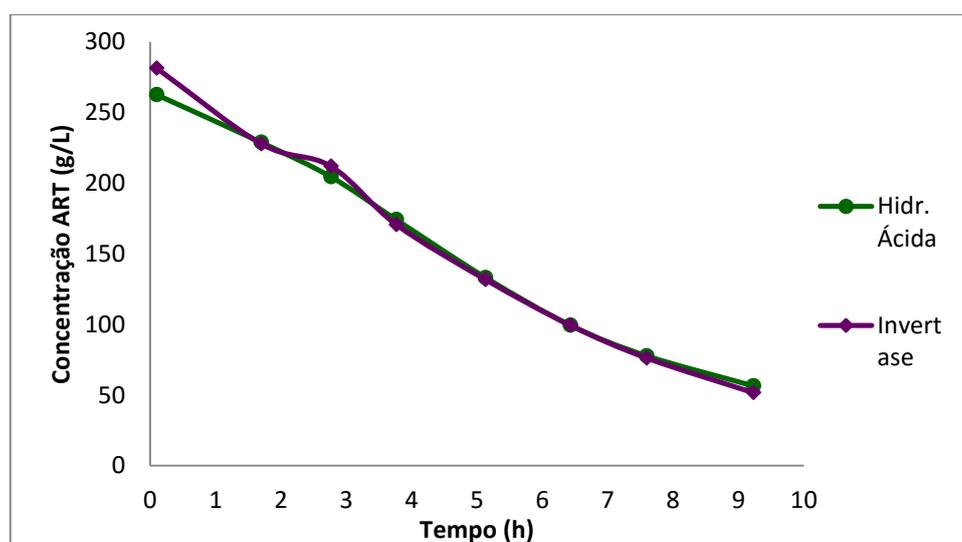


Figura 31: Comparação das Inversões por Hidrólise Ácida e por Invertase na Fermentação 5

4.7.7. Fermentação 6 – Resultados

Tabela 20: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 6

Tempo (h)	pH Mosto	pH Hidr. Ácida	Concentração ART Hidrólise Ácida (g/L)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração Celular Massa Seca (g/L)
0,00	5,14	4,90	267	0,00	20,7
1,20	4,98	4,94	267	6,27	13,9
2,20	4,96	4,92	264	13,1	12,2
3,30	4,89	5,35	-	25,3	15,7
4,50	4,89	4,88	234	38,4	10,7
5,60	4,89	6,33	167	44,5	17,7
6,60	4,90	5,41	102	58,4	20,2
7,60	4,90	5,76	62,5	69,1	16,9
8,75	4,92	6,07	43,5	76,9	17,4
10,20	4,96	5,58	27,2	82,0	16,8
11,35	4,97	6,06	8,05	98,0	16,0
12,45	4,97	6,46	2,64	90,4	18,5

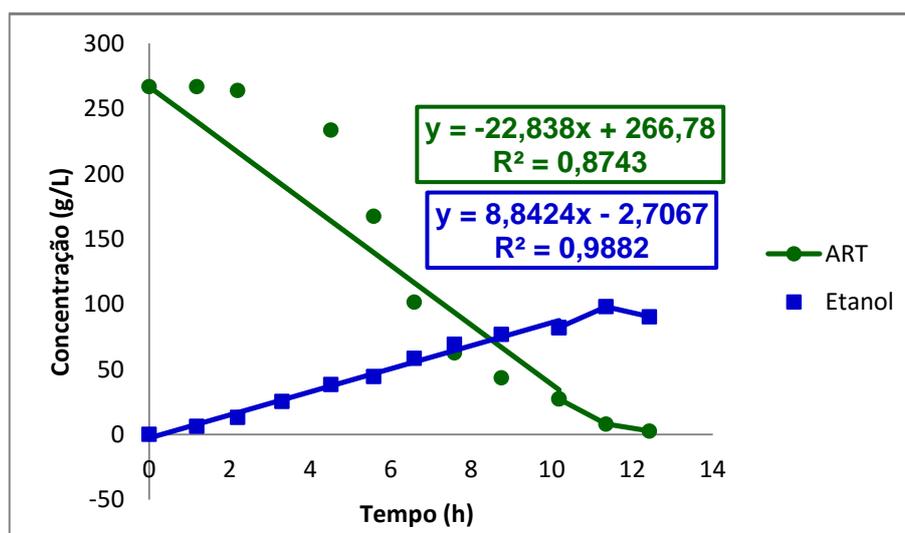


Figura 32: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 6

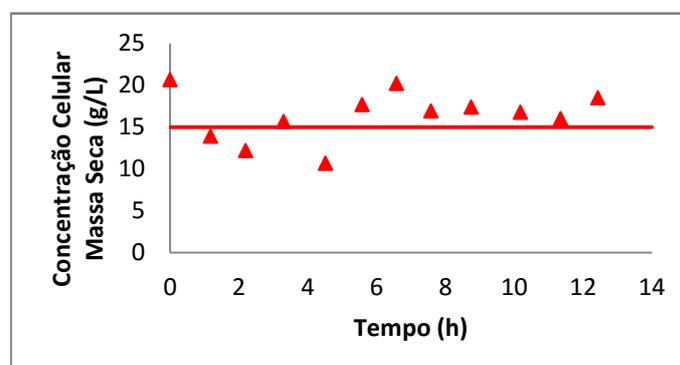


Figura 33: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 6

Tabela 21: Variação das Concentrações de ART com Inversão por Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 6

Tempo (h)	Concentração ART Invertase (g/L)	Concentração AR (g/L)	Concentração de Sacarose (g/L)
0,00	267	223	41,6
1,20	267	234	31,2
2,20	258	-	-
4,50	235	-	-
5,60	161	-	-
6,60	91,3	80,9	19,7
7,60	58,3	54,4	7,71
8,75	39,4	37,2	6,04
10,20	25,3	26,7	0,527
11,35	1,17	5,18	2,73
12,45	2,53	2,49	0,14

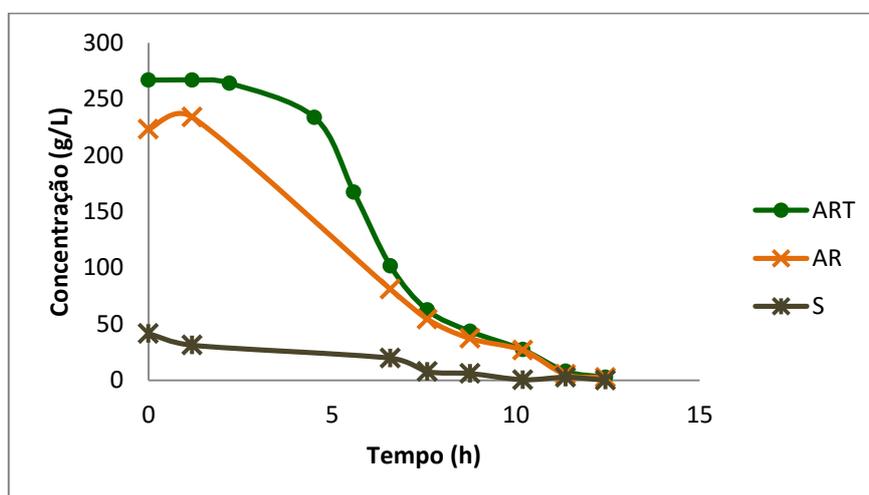


Figura 34: Variação das Concentrações de ART, AR e Sacarose Com o Tempo na Fermentação 6

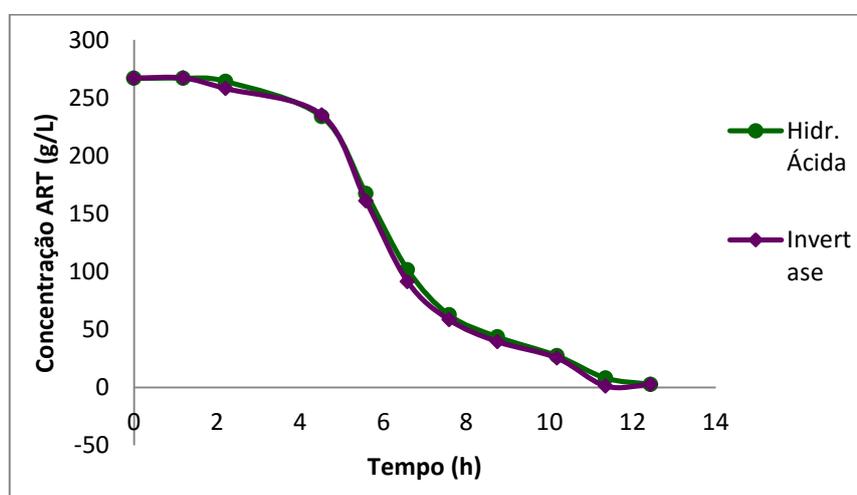


Figura 35: Comparação das Inversões por Hidrólise Ácida e por Invertase na Fermentação 6

4.7.8. Fermentação 7 – Resultados

Tabela 22: pH do Mosto e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 7

Tempo (h)	pH Mosto	Concentração ART (g/L)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração Celular Massa Seca (g/L)
0,10	5,11	149	0,00	19,1
1,00	4,97	127	8,71	12,6
2,00	4,93	106	22,8	11,5
3,00	4,99	67,7	37,4	20,3
4,00	5,04	34,1	51,6	18,3
5,10	5,02	5,49	63,7	22,0
6,05	5,08	2,49	62,1	25,1
7,05	5,09	2,58	55,9	12,8
8,00	5,06	2,31	61,6	19,1
9,00	5,08	2,13	61,3	12,6

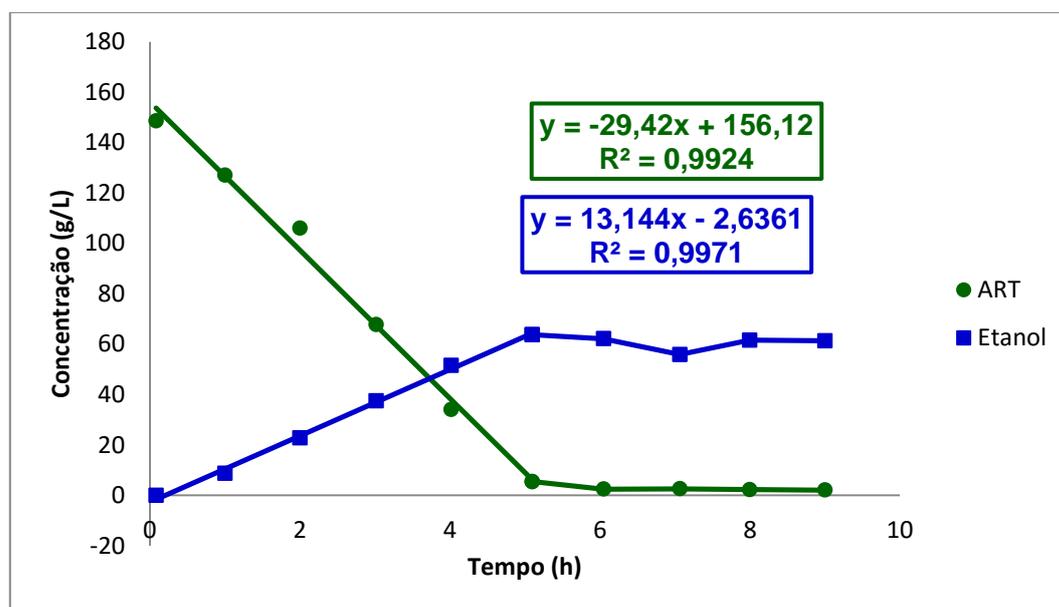


Figura 36: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 7

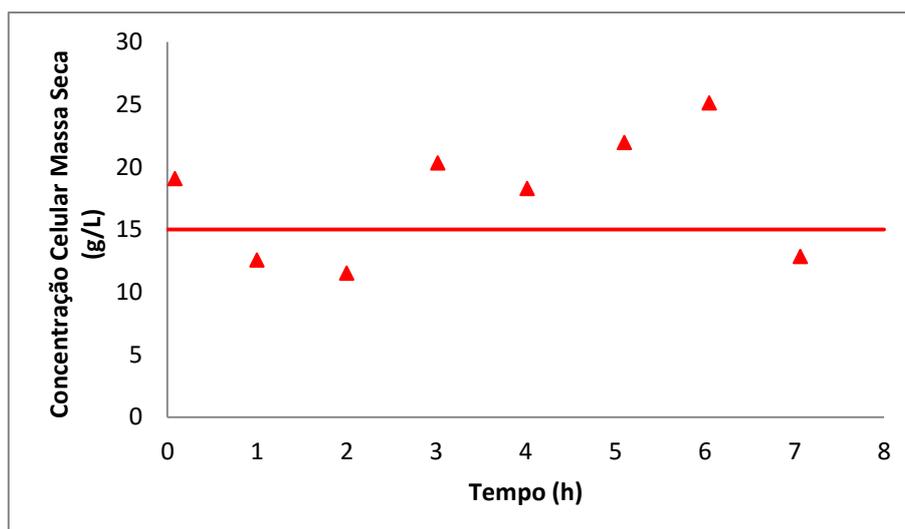


Figura 37: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 7

4.7.9. Fermentação 8 – Resultados

Tabela 23: pH do Mosto e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 8

Tempo (h)	pH Mosto	Concentração ART (g/L)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração Celular Massa Seca (g/L)
0,05	5,20	214	0,00	9,05
1,00	5,03	214	0,00	12,9
2,05	5,02	188	11,0	12,8
3,05	5,02	175	17,9	13,2
4,00	5,02	152	24,7	17,1
5,05	5,01	126	33,9	16,4
6,00	5,00	113	39,7	16,5
7,00	5,08	89,9	48,0	15,4
8,00	5,08	73,8	56,6	15,6
9,00	5,09	58,8	64,5	17,4
10,05	5,09	44,0	78,2	16,9

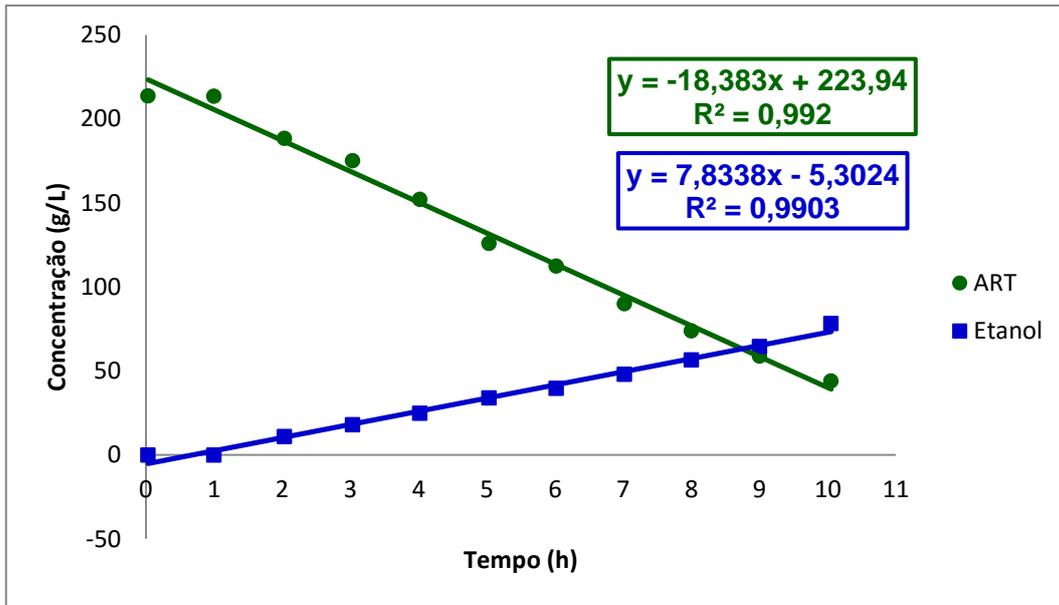


Figura 38: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 8

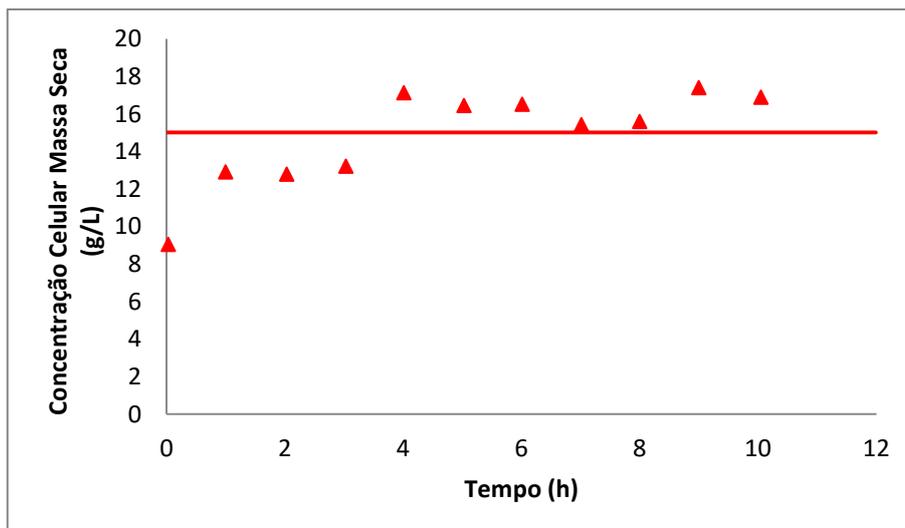


Figura 39: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 8

4.7.10. Fermentação 9 – Resultados

Tabela 24: pH do Mosto e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 9

Tempo (h)	pH Mosto	Concentração ART (g/L)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração Celular Massa Seca (g/L)
0,05	4,75	214	0	19,9
1,05	4,70	214	0	20,2
2,00	4,63	195	11,8	21,1
3,05	4,62	173	21,1	21,6
4,05	4,60	154	29,8	21,0
5,10	4,60	137	36,6	22,1
6,55	4,62	116	42,1	23,7
7,55	4,63	102	48,4	23,4
8,55	4,64	89,7	54,9	22,8
9,55	4,64	76,1	54,8	23,1
10,65	4,66	71,9	55,8	24,8
11,65	4,67	63,0	63,0	26,0
12,65	4,68	58,3	67,0	24,1

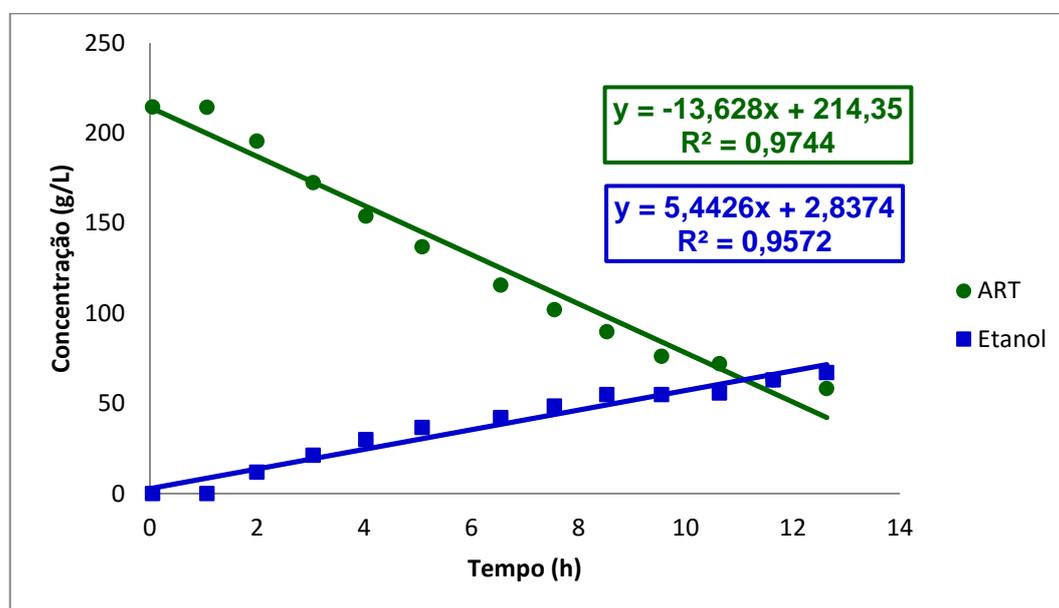


Figura 40: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 9

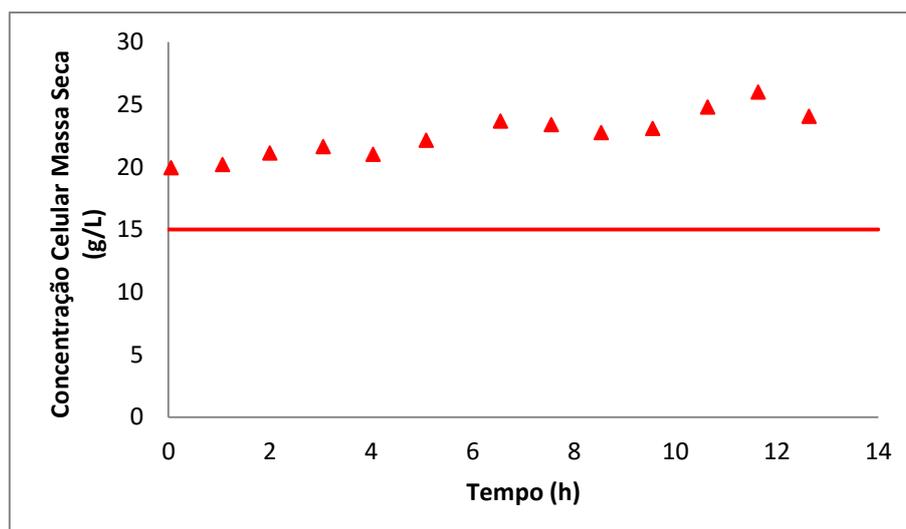


Figura 41: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 9

4.7.11. Fermentação 10 – Resultados

Tabela 25: pH do Mosto e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 10

Tempo (h)	pH Mosto	Concentração ART (g/L)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração Celular Massa Seca (g/L)
0,05	4,90	269	0	17,2
1,05	4,79	261	0	12,1
2,05	4,82	-	2,98	8,76
3,05	4,84	249	9,77	17,9
4,05	4,81	232	16,0	9,18
5,05	4,82	216	22,9	7,03
6,15	4,82	187	28,5	13,9
7,05	4,85	182	36,4	10,0
8,10	4,88	170	39,7	11,8
9,20	4,82	161	43,5	16,4
11,10	4,86	144	50,7	15,0
12,10	4,85	128	53,5	14,2
13,25	4,86	121	61,8	15,3
14,40	4,89	112	69,8	14,5

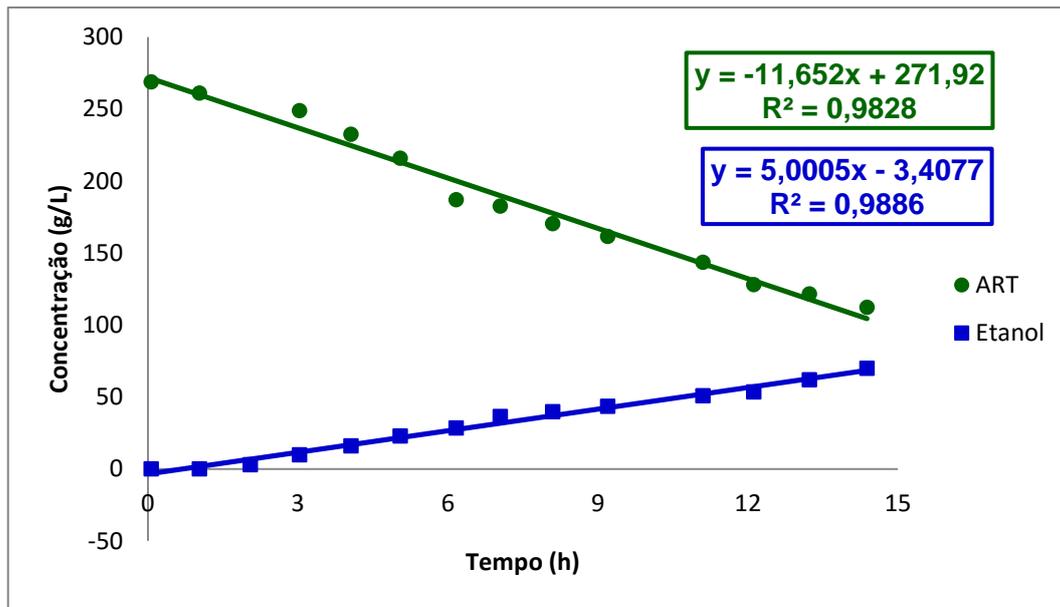


Figura 42: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 10

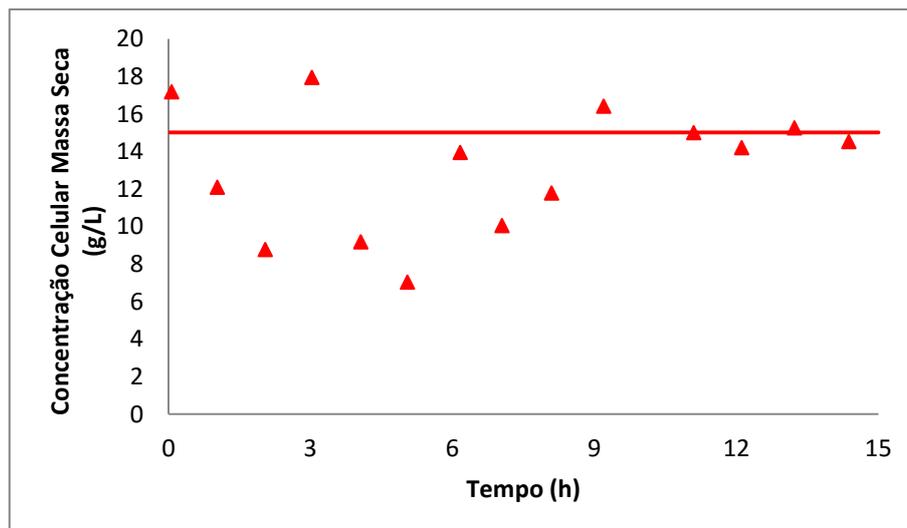


Figura 43: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 10

4.8. Resultados das Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação de Mel em Pulsos

4.8.1. Introdução dos Resultados das Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos

As Tabelas 26, 29 e 32 apresentam uma série de informações relativas às amostras de mosto coletadas a cada trinta minutos do fermentador nas fermentações descontínuas alimentadas com alimentação em pulsos de 11 a 13 realizadas, respectivamente, dentre as quais se encontram: pH do mosto; pH da amostra com a neutralização da mesma após a inversão da sacarose por hidrólise ácida (somente para as fermentações 11 e 12, sem inversão prévia da sacarose); e concentrações de ART pelo método de hidrólise ácida, de Etanol e Celular do mosto. Foram utilizadas linhas pretas no interior da tabela com o intuito de separar as três inserções de mel realizadas.

As Tabelas 27 e 30 apresentam uma série de informações relativas às amostras de mosto coletadas nas fermentações descontínuas alimentadas com alimentação em pulsos 11 e 12 (sem inversão prévia da sacarose) realizadas, respectivamente, dentre as quais se encontram: Concentração de ART pelo método de inversão por hidrólise ácida, Concentração de AR e Concentração de Sacarose (obtida com base na concentração de ART por hidrólise ácida e na concentração de AR) do mosto. Para a fermentação 12 analisou-se apenas as primeiras amostras de mosto após as inserções de mel no fermentador.

As Tabelas 28, 31 e 33 apresentam uma série de informações relativas às amostras de mosto coletadas a cada trinta minutos do fermentador nas fermentações descontínuas alimentadas com alimentação em pulsos de 11 a 13 realizadas, respectivamente, e foram obtidas utilizando o modelo unificado proposto nesse trabalho com base nos valores apresentados nas tabelas 20, 23 e 26, respectivamente. Dentre estas informações se encontram as concentrações de ART pelo método de hidrólise ácida e de Etanol do mosto.

As Figuras 44, 48 e 51 apresentam os valores de Concentração de ART e Etanol do mosto obtidos experimentalmente a cada trinta minutos de fermentação para as fermentações descontínuas alimentadas com alimentação

em pulsos de 11 a 13, respectivamente. Utilizou-se um modelo linear para descrever as curvas de consumo de ART e produção de Etanol nesses gráficos para as três inserções de mel realizadas, e apresentaram-se nas figuras as equações de reta obtidas com seus respectivos valores de R^2 .

As Figuras 45, 49 e 52 apresentam os valores de Concentração Celular do mosto obtidos experimentalmente a cada trinta minutos de fermentação para as fermentações descontínuas alimentadas com alimentação em pulsos de 11 a 13, respectivamente. Apresentou-se nas figuras uma linha-base que representa a concentração celular massa seca inicial que se utilizou em todos os ensaios (15,0 g/L).

A Figura 46 apresenta os valores de Concentrações de ART com inversão da sacarose pelo método de hidrólise ácida, de AR e de Sacarose (com base nos valores de concentração de ART e AR) obtidos experimentalmente a cada trinta minutos de fermentação para a fermentação descontínua alimentada com alimentação em pulsos 11.

As Figuras 47, 50 e 53 apresentam os valores de Concentração de ART e Etanol do mosto obtidos experimentalmente a cada trinta minutos de fermentação para as fermentações descontínuas alimentadas com alimentação em pulsos de 11 a 13, respectivamente, e foram plotados com base nos valores apresentados nas Tabelas 22, 25 e 27, respectivamente, tabelas essas obtidas utilizando o modelo unificado proposto nesse trabalho Utilizou-se um modelo linear para descrever as curvas de consumo de ART e produção de Etanol nesses gráficos, e apresentaram-se nas figuras as equações de reta obtidas com seus respectivos valores de R^2 .

4.8.2. Fermentação 11 – Resultados

Tabela 26: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 11

Tempo (h)	pH Mosto	pH Hidr. Ácida	Concentração ART Hidrólise Ácida (g/L)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração Celular Massa Seca (g/L)
0,05	5,00	5,02	62,1	0	14,1
0,50	4,75	4,87	49,2	6,85	15,0
1,00	4,69	5,34	37,1	12,6	15,7
1,50	4,70	5,13	22,2	18,4	16,7
2,00	4,70	5,57	7,83	22,4	16,7
2,65	4,75	4,93	4,78	26,0	19,4
3,00	4,71	4,94	4,69	28,4	18,2
3,45	4,74	5,17	36,1	26,0	18,0
4,05	4,73	5,41	13,8	32,5	18,8
4,60	4,81	5,00	6,42	38,2	18,8
5,05	4,78	5,39	5,85	38,2	19,5
5,55	4,79	5,51	5,92	38,2	20,6
6,20	4,80	5,69	41,7	39,5	20,1
6,70	4,78	5,07	28,9	45,3	21,3
7,20	4,78	5,31	17,6	47,5	21,9
7,70	4,77	5,28	8,88	53,3	21,8
8,20	4,83	5,50	7,38	56,5	24,2
8,75	4,83	5,18	7,55	52,1	21,9

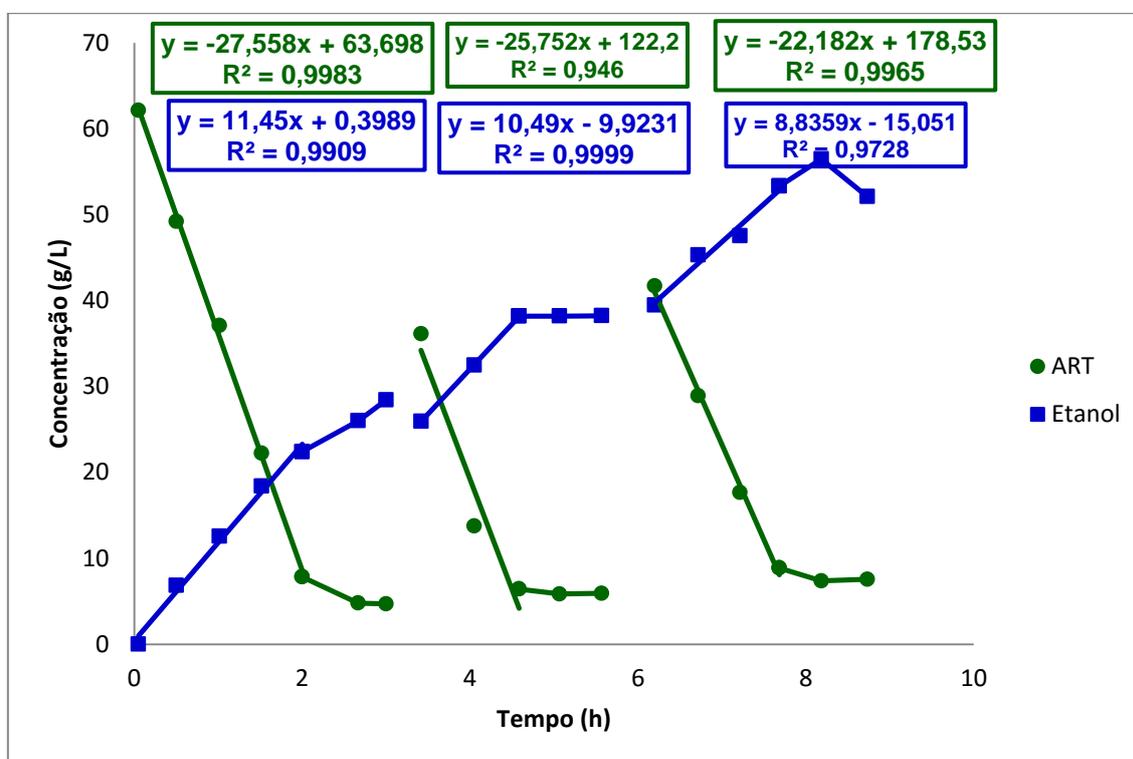


Figura 44: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 11

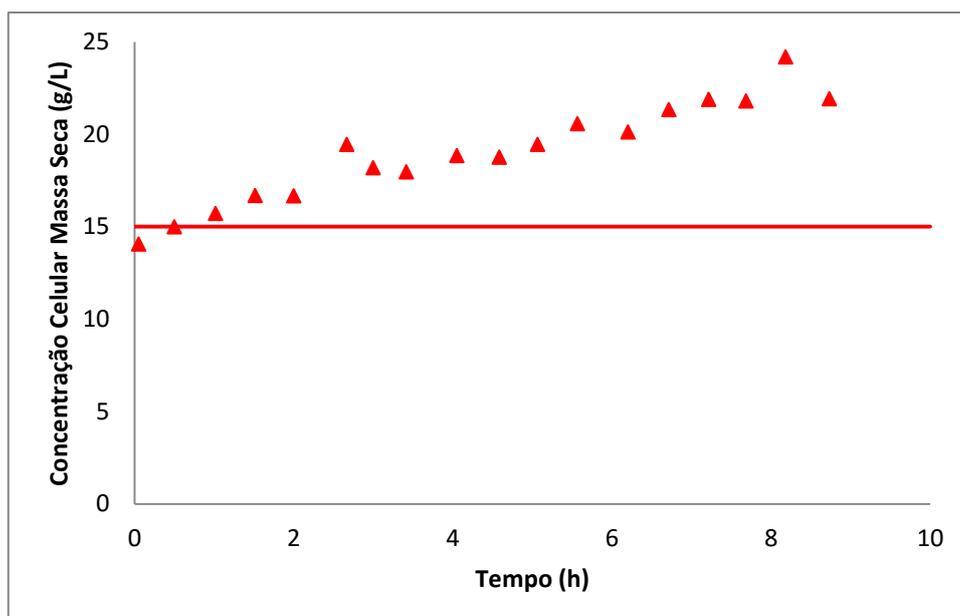


Figura 45: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 11

Tabela 27: Variação das Concentrações de ART com Inversão por Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 11

Tempo (h)	Concentração ART Hidrólise Ácida (g/L)	Concentração AR (g/L)	Concentração de Sacarose (g/L)
0,05	62,1	60,2	1,82
0,50	49,2	48,3	0,795
1,00	37,1	36,7	0,312
1,50	22,2	21,7	0,462
2,00	7,83	7,41	0,397
2,65	4,78	3,59	1,13
3,00	4,69	3,49	1,14
3,45	36,1	35,3	0,759
4,05	13,8	13,2	0,494
4,60	6,42	5,45	0,923
5,05	5,85	4,73	1,06
5,55	5,92	4,95	0,920
6,20	41,7	36,7	4,72
6,70	28,9	28,0	0,860
7,20	17,6	17,0	0,648
7,70	8,88	9,38	0
8,20	7,38	5,94	1,37
8,75	7,55	5,96	1,51

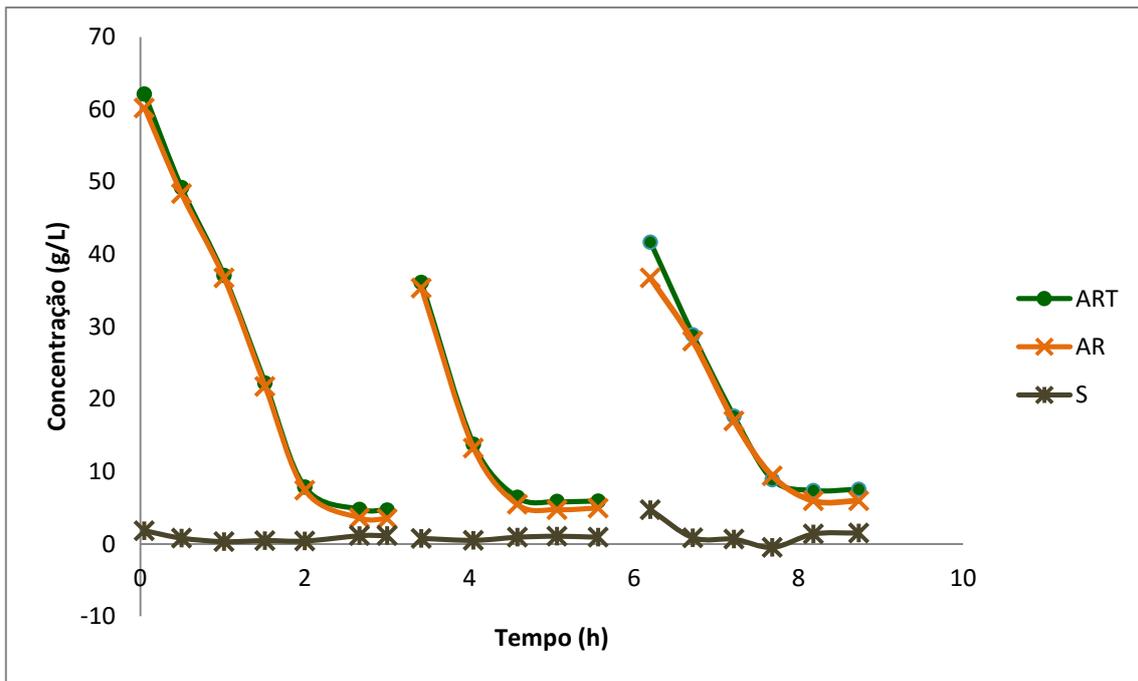


Figura 46: Variação das Concentrações de ART, AR e Sacarose Com o Tempo na Fermentação 11

Tabela 28: Análise dos Três Pulsos de Mel Adicionados em Modelo Unificado Para a Fermentação 11

Tempo (h)	Concentração ART (g/L)	Concentração Etanol (g/L)
0,05	126	0
0,50	113	6,85
1,00	101	12,6
1,50	85,7	18,4
2,00	71,4	22,4
2,65	49,0	28,9
3,15	41,7	34,7
3,70	28,9	40,5
4,20	17,6	42,7
4,65	8,88	48,5

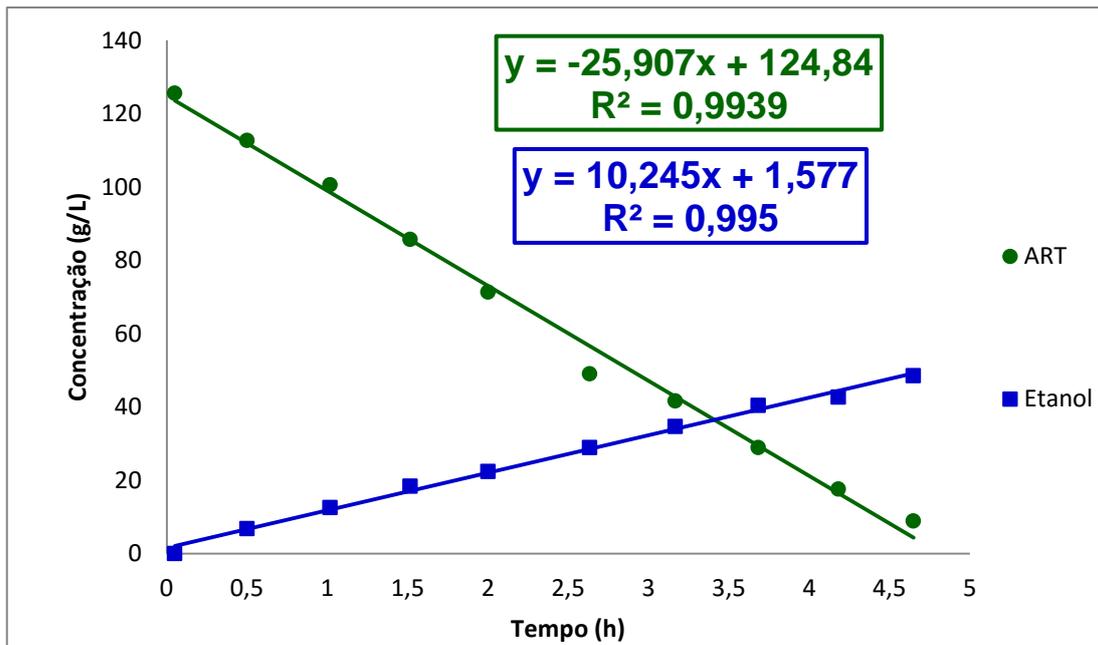


Figura 47: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo em Modelo Unificado para a Fermentação 11

4.8.3. Fermentação 12 – Resultados

Tabela 29: pH do Mosto, pH Após a Neutralização na Inversão por Hidrólise Ácida e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 12

Tempo (h)	pH Mosto	pH Hidr. Ácida	Concentração ART Hidrólise Ácida (g/L)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração Celular Massa Seca (g/L)
0,05	5,37	4,95	42,5	0	14,9
0,65	4,80	5,08	29,2	5,44	15,5
1,00	4,79	6,13	20,4	10,8	16,6
1,55	4,68	6,04	7,83	15,2	17,3
2,05	4,71	5,85	3,34	19,0	17,1
2,60	4,80	5,53	2,77	18,5	24,9
2,90	4,95	5,25	92,1	18,3	21,1
3,45	4,87	5,16	55,4	26,5	18,4
4,00	4,88	5,32	41,0	31,0	18,7
4,70	4,88	5,69	27,6	35,5	20,3
5,20	4,82	5,83	16,3	38,3	19,9
5,75	4,89	6,81	10,6	40,5	20,1
6,25	4,91	4,81	8,05	43,3	20,1
6,50	4,95	5,57	71,5	53,1	19,9
7,00	4,90	4,97	70,8	53,2	20,9
7,50	4,91	5,49	55,0	57,9	21,2
8,00	4,92	5,38	44,4	61,2	21,2
8,55	4,92	5,46	35,5	65,6	21,9
9,10	4,91	5,61	27,0	69,7	21,5
9,75	4,91	5,10	17,2	72,3	20,6
10,90	4,92	5,16	12,8	75,8	28,4

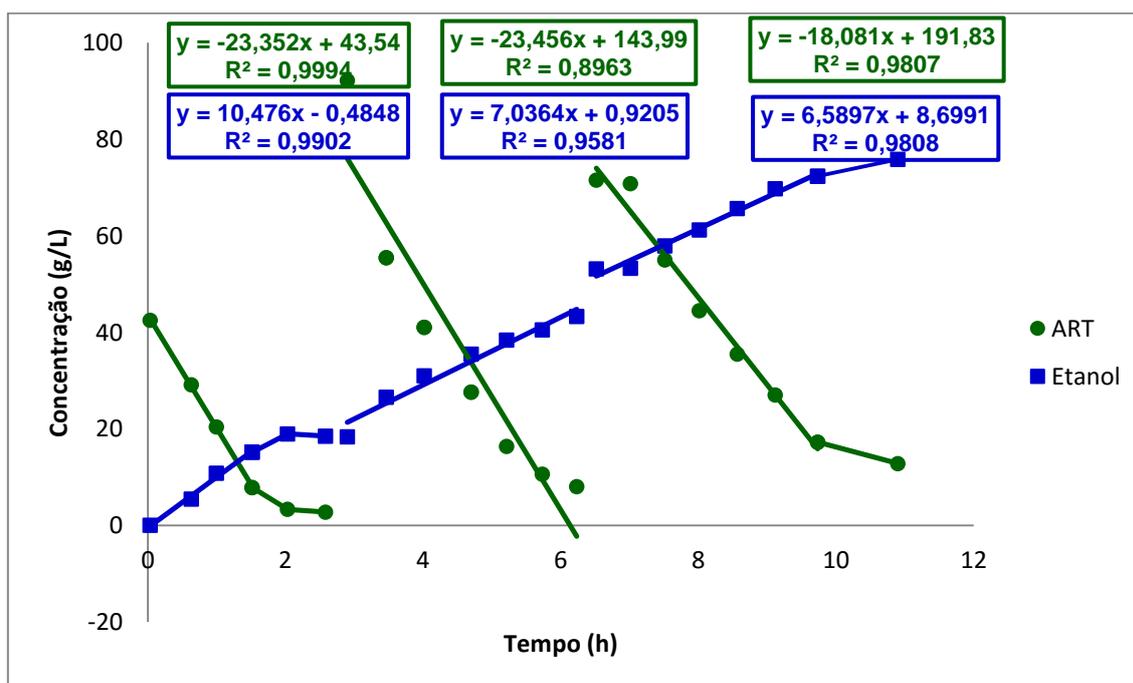


Figura 48: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 12

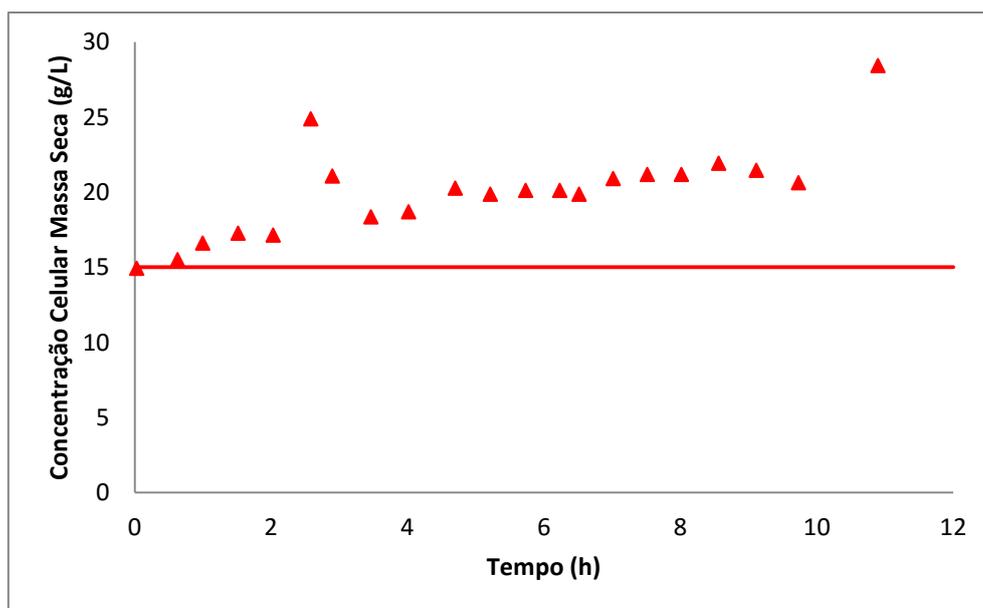


Figura 49: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 12

Tabela 30: Variação das Concentrações de ART com Inversão com Invertase, de AR e de Sacarose com o Tempo para a Fermentação 12

Tempo (h)	Concentração ART Invertase (g/L)	Concentração AR (g/L)	Concentração de Sacarose (g/L)
0,05	42,5	45,7	0,00
2,90	91,8	89,9	1,81
6,50	71,5	60,4	10,6

Tabela 31: Análise dos Três Pulsos de Mel Adicionados em Modelo Unificado Para a Fermentação 12

Tempo (h)	Concentração ART (g/L)	Concentração Etanol (g/L)
0,05	190	0
0,65	177	5,44
1,00	168	10,8
1,50	156	15,2
2,10	119	25,9
2,65	104	30,4
3,30	91,0	34,8
3,85	79,8	37,7
4,35	74,1	39,9
4,85	71,5	42,7
5,35	70,8	42,7
5,85	55,0	47,4
6,35	44,4	50,7
6,90	35,5	55,2
7,45	27,0	59,2
8,05	17,2	61,8

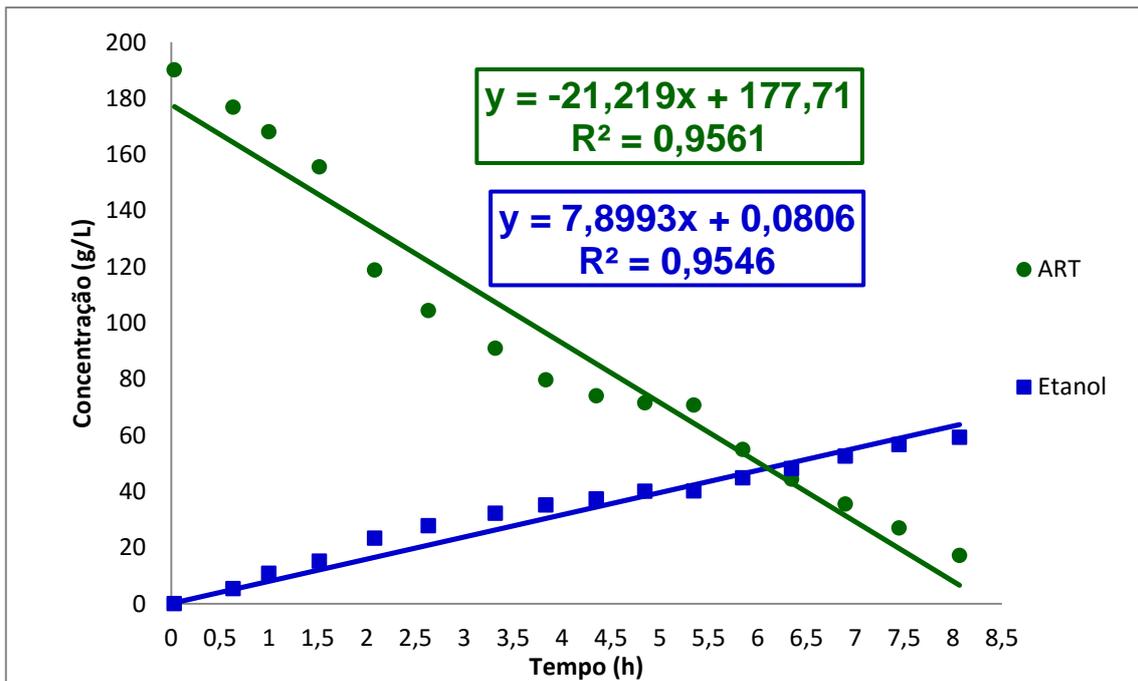


Figura 50: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo em Modelo Unificado para a Fermentação 12

4.8.4. Fermentação 13 – Resultados

Tabela 32: pH do Mosto e Concentrações de ART, Etanol e Celular no Decorrer da Fermentação 13

Tempo (h)	pH Mosto	Concentração ART (g/L)	Concentração de Etanol (g/L)	Concentração Celular Massa Seca (g/L)
0,05	4,96	40,0	0	15,7
0,55	4,71	27,3	6,81	18,4
1,10	4,67	16,6	11,6	14,2
1,60	4,66	3,27	16,5	20,0
2,05	4,78	3,92	18,2	20,8
2,65	4,80	2,70	19,9	27,4
2,95	4,77	68,8	19,3	17,4
3,55	4,84	51,9	25,3	17,2
4,05	4,81	40,9	31,8	19,7
4,60	4,79	24,4	35,8	20,8
5,10	4,77	12,2	40,5	20,7
5,65	4,78	8,59	40,7	20,8
6,15	4,83	7,43	41,1	24,9
6,50	4,84	80,3	43,9	22,4
7,05	4,84	59,9	51,1	21,2
7,55	4,83	50,1	55,7	22,5
8,00	4,82	41,4	58,6	24,2
8,50	4,82	34,0	62,5	24,0
9,05	4,82	25,3	67,2	23,6
9,75	4,86	18,0	68,9	22,6
10,60	4,87	12,8	74,5	27,5

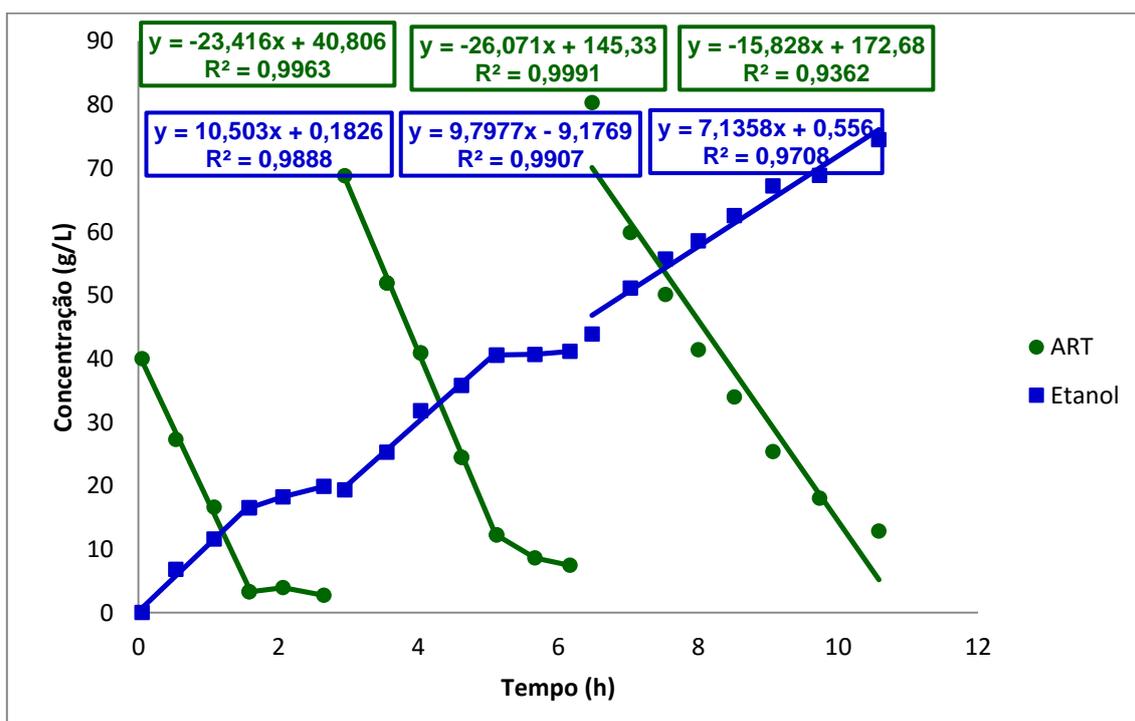


Figura 51: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo na Fermentação 13

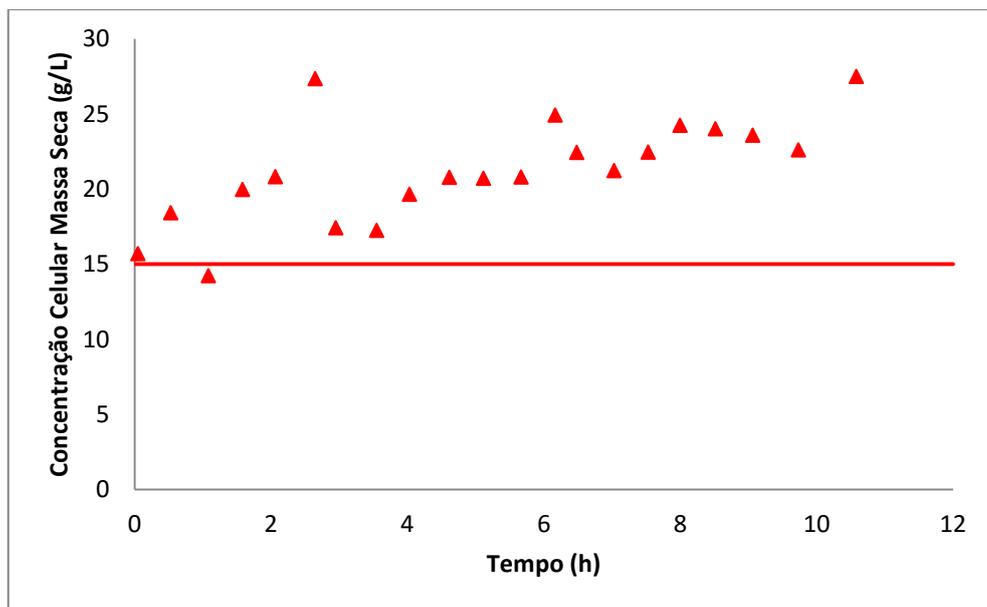


Figura 52: Variação da Concentração Celular com o Tempo na Fermentação 13

Tabela 33: Análise dos Três Pulsos de Mel Adicionados em Modelo Unificado Para a Fermentação 13

Tempo (h)	Concentração ART (g/L)	Concentração Etanol (g/L)
0,05	174	0
0,55	161	6,81
1,10	150	11,6
1,60	137	16,5
2,20	120	25,2
2,65	109	31,8
3,25	92,6	35,7
3,75	80,3	40,5
4,30	59,9	47,8
4,80	50,1	52,3
5,25	41,4	55,2
5,80	33,9	59,2
6,35	25,3	63,8
7,00	18,0	65,5
7,85	12,8	71,1

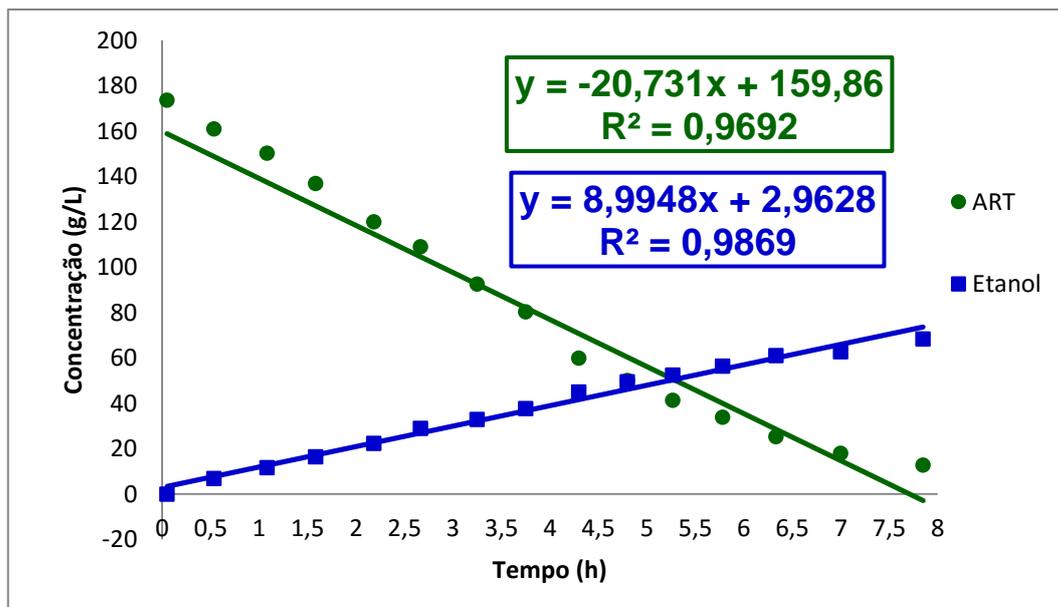


Figura 53: Variação das Concentrações de ART e Etanol com o Tempo em Modelo Unificado para a Fermentação 13

4.9. Resultados das Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante

4.9.1. Introdução dos Resultados das Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante

As Tabelas 34 e 35 apresentam uma série de informações relativas às amostras de mosto coletadas a cada trinta minutos do fermentador nas fermentações descontínuas alimentadas com alimentação constante 14 e 15 realizadas, respectivamente, dentre as quais se encontram: pH do mosto; pH da amostra com a neutralização da mesma após a inversão da sacarose por hidrólise ácida (somente para a fermentação 14, sem inversão prévia da sacarose); Volume Total de Mosto presente no interior do fermentador; Massas de ART Adicionadas e Consumidas no fermentador; e Massas de Etanol e de Células em Base Seca presentes no fermentador. Foi inserida uma linha preta no interior da tabela demarcando o tempo onde foi cessada a alimentação de mel no fermentador (tempo de enchimento). Utilizou-se tempo de enchimento por volta de 4,5 horas.

As Figuras 54 e 56 apresentam os valores de Massas de ART Adicionados e Consumidos e de Etanol Produzidos obtidos experimentalmente a cada trinta minutos de fermentação para as fermentações descontínuas alimentadas com alimentação constante 14 e 15, respectivamente. Utilizou-se um modelo linear para descrever as curvas de consumo de ART e produção de Etanol nesses gráficos, e apresentaram-se nas figuras as equações de reta obtidas com seus respectivos valores de R^2 .

As Figuras 55 e 57 apresentam os valores de Massa de Células em Base Seca obtidos experimentalmente a cada trinta minutos de fermentação para as fermentações descontínuas alimentadas com alimentação constante 14 e 15, respectivamente. Apresentou-se nas figuras uma linha-base que representa a massa celular seca inicial que se utilizou em todos os ensaios (30,0 g).

4.9.2. Fermentação 14 – Resultados

Tabela 34: Variações de Volume de Mel Total e de Massas de ART Adicionado e Consumido, de Etanol Produzido e de Células no Decorrer da Fermentação 14

Tempo (h)	pH Mosto	pH Hidr. Ácida	Volume de Mosto Total no Fermentador (L)	Massa Total de ART Adicionada ao Fermentador (g)	Massa de ART Consumida no Fermentador (g)	Massa de Etanol Presente no Fermentador (g)	Massa Seca de Células Presente no Fermentador (g)
0,00	4,39	5,14	0,590	0	0	0	33,1
0,50	4,67	4,98	0,755	52,0	-	11,1	33,0
1,00	4,71	4,81	0,927	106,0	19,6	18,7	29,7
1,50	4,79	6,57	1,103	161,4	39,5	28,9	35,5
2,00	4,82	5,11	1,290	220,3	51,6	40,4	35,0
2,55	4,88	5,24	1,488	282,5	80,2	48,2	35,9
3,05	4,92	4,77	1,664	337,7	110,1	54,8	37,1
3,55	4,92	7,40	1,840	393,0	134,4	61,4	35,6
4,10	4,93	6,74	2,027	451,9	148,8	71,8	37,1
4,70	4,95	5,76	2,280	531,6	179,0	78,8	34,2
5,20	4,96	7,50	2,280	531,6	195,0	82,4	34,8
5,70	4,95	4,92	2,280	531,6	211,3	95,1	37,0
6,10	4,98	5,08	2,280	531,6	233,6	103,7	40,5
6,60	4,93	4,83	2,280	531,6	256,0	118,3	40,3
7,40	4,93	4,99	2,280	531,6	288,5	127,7	37,2
8,05	4,93	5,18	2,280	531,6	312,5	136,3	36,5
8,70	4,93	5,24	2,280	531,6	334,5	141,3	37,6
9,30	4,93	5,15	2,280	531,6	352,4	156,7	39,3
9,95	4,99	5,04	2,280	531,6	371,8	160,1	37,3
10,75	4,95	5,17	2,280	531,6	396,4	171,4	39,2

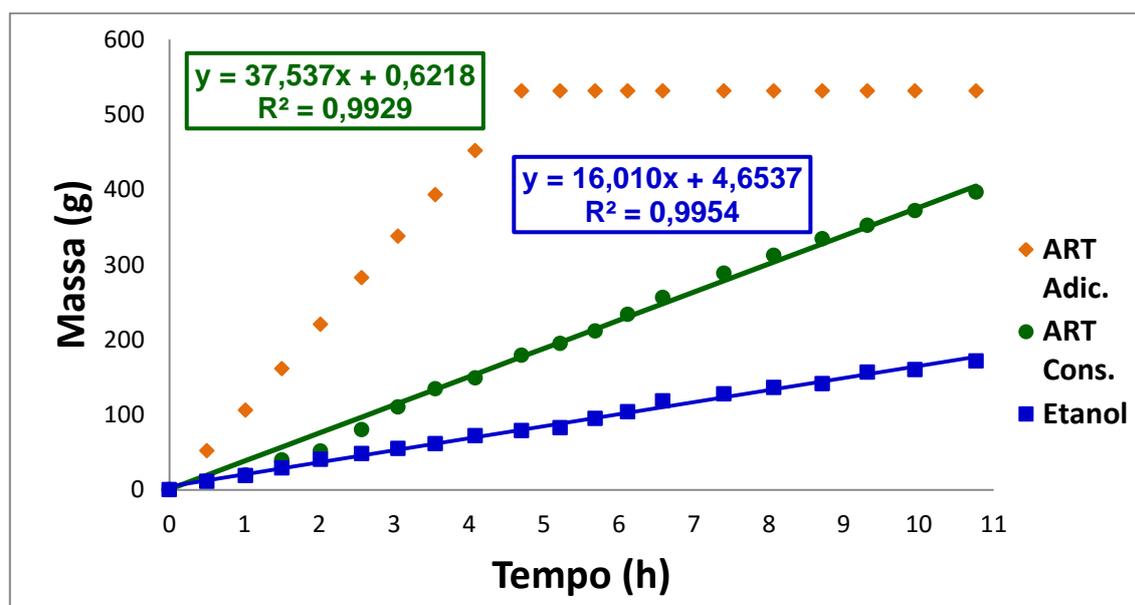


Figura 54: Variação das Massas Adicionadas e Consumidas de ART e Produzidas de Etanol no Fermentador com o Tempo na Fermentação 14

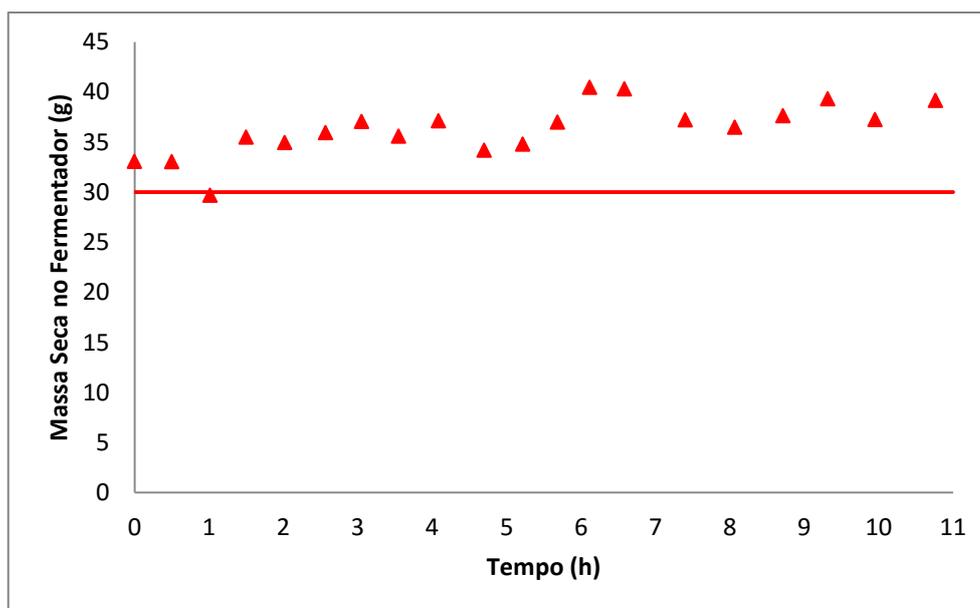


Figura 55: Variação da Massa de Células no Fermentador com o Tempo na Fermentação 14

4.9.3. Fermentação 15 – Resultados

Tabela 35: Variações de Volume de Mel Total e de Massas de ART Adicionado e Consumido, de Etanol Produzido e de Células no Decorrer da Fermentação 15

Tempo (h)	pH Mosto	Volume Total de Mosto no Fermentador (L)	Massa Total de ART Adicionada ao Fermentador (g)	Massa de ART Consumida no Fermentador (g)	Massa de Etanol Presente no Fermentador (g)	Massa Seca de Células Presente no Fermentador (g)
0,00	4,37	0,563	0	0	0	35,6
0,55	4,50	0,751	65,4	23,5	11,8	31,4
1,00	4,62	0,924	125,5	49,9	21,7	34,9
1,50	4,70	1,106	188,8	62,6	30,8	33,0
2,00	4,71	1,292	253,6	92,6	37,1	36,1
2,55	4,72	1,474	316,8	109,1	45,1	36,2
3,10	4,74	1,678	387,8	120,9	54,9	36,8
3,55	4,75	1,828	439,9	142,6	60,3	38,7
4,20	4,76	1,997	498,6	157,0	65,0	38,1
4,75	4,75	1,997	498,6	-	68,6	36,8
5,30	4,78	1,997	498,6	-	73,9	39,5
6,05	4,78	1,997	498,6	217,1	81,0	35,2
6,65	4,78	1,997	498,6	233,1	83,6	36,6
7,30	4,77	1,997	498,6	248,7	90,2	37,9
7,90	4,81	1,997	498,6	258,0	96,2	38,1
8,45	4,78	1,997	498,6	-	98,1	37,8
9,05	4,77	1,997	498,6	269,9	109,7	39,5
9,75	4,76	1,997	498,6	277,9	114,5	37,6
10,55	4,78	1,997	498,6	288,1	117,2	36,8

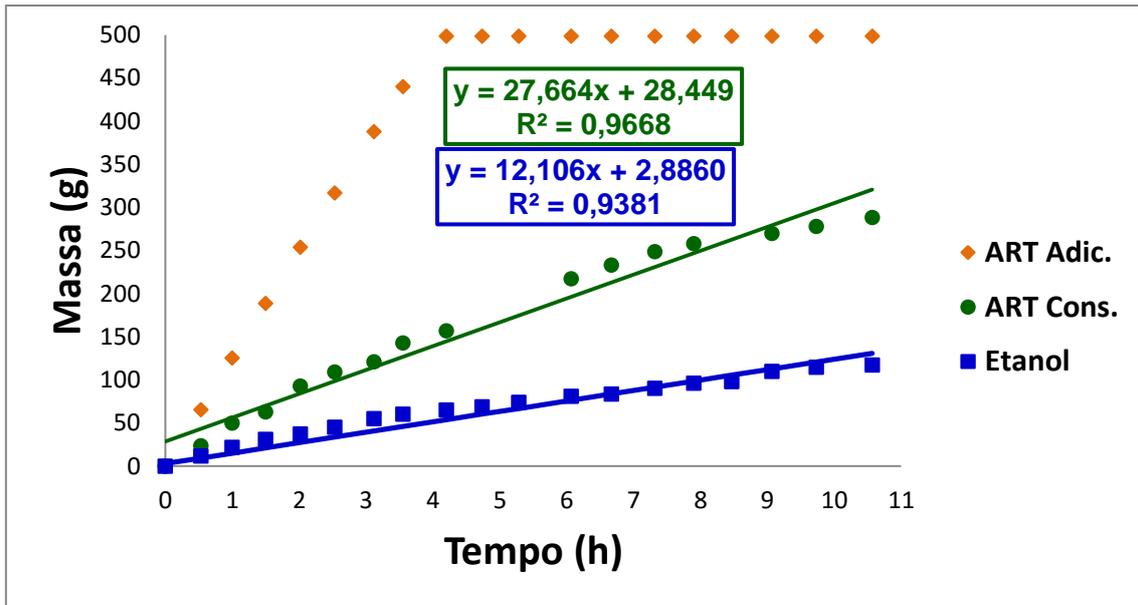


Figura 56: Variação das Massas Adicionadas e Consumidas de ART e Produzidas de Etanol no Fermentador com o Tempo na Fermentação 15

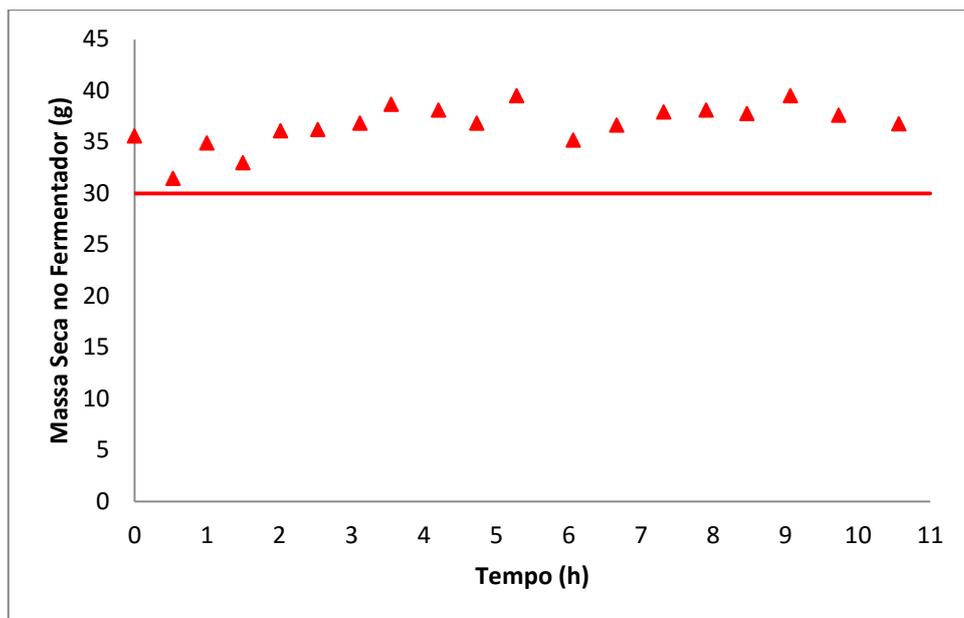


Figura 57: Variação da Massa de Células no Fermentador com o Tempo na Fermentação 15

4.10. Discussão do Resultado das Fermentações Realizadas

4.10.1. Análise Geral das Fermentações para as Velocidades de Consumo do Substrato e Geração do Produto, ($Y_{P/S}$) e Rendimento em Etanol

A Tabela 36 mostra os resultados com os valores de Velocidade de Consumo de ART (r_s) e de Produção de Etanol (r_p), Fração Mássica de ART convertida em Etanol ($Y_{P/S}$) e Rendimento em Etanol (η_{Etanol}) para as fermentações realizadas.

Tabela 36: Valores de Velocidade de Consumo de Açúcares Totais, de Etanol Produzido, de $Y_{P/S}$ e de Rendimento em Etanol Para as Fermentações

Ferm	Regime	Inversão Prévia	Conc. Inicial ART	r_s ($\frac{\text{g ART}}{\text{L} \cdot \text{h}}$)	R^2	r_p ($\frac{\text{g Etan}}{\text{L} \cdot \text{h}}$)	R^2	$Y_{P/S}$ ($\frac{\text{g Etan}}{\text{g ART}}$)	η_{Etanol} (%)
1			151	33,374	0,994	12,292	0,983	0,3683	72,1
2			195	30,739	0,996	11,718	0,996	0,3812	74,6
3			199	30,534	0,989	10,468	0,997	0,3428	67,1
4		Não	201	14,180	0,953	3,067	0,994	0,2163	42,3
5	Descontínuo		263	24,054	0,989	9,207	0,998	0,3828	74,9
6			267	22,838	0,874	8,842	0,988	0,3872	75,8
7			149	29,420	0,992	13,144	0,997	0,4468	87,4
8			214	18,383	0,992	7,834	0,990	0,4261	83,4
9		Sim	214	13,628	0,974	5,443	0,957	0,3994	78,2
10			269	11,652	0,983	5,001	0,989	0,4292	84,0
11	Desc. Alim. C/ Alim. Em Pulsos	Não	129	25,907	0,994	10,245	0,995	0,3955	77,4
12			195	21,219	0,956	7,899	0,955	0,3723	72,8
13		Sim	179	20,731	0,969	8,995	0,987	0,4339	84,9
14	Desc. Alim. C/ Alim. Const.	Não	233	16,476	0,993	7,027	0,995	0,4265	83,5
15			Sim	250	13,860	0,967	6,065	0,938	0,4376

A partir dos resultados pode-se afirmar que os dados experimentais referentes às velocidades de consumo de açúcares (r_s) e produção de etanol (r_p) se ajustaram de forma satisfatória ao ajuste linear aplicado, que apesar de se tratar de um modelo relativamente simples foi capaz de descrever o comportamento das fermentações alcólicas realizadas. Os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados por Bueno Netto (1982) e Acorsi (2012), que também utilizaram ajustes lineares para avaliar os dados experimentais de fermentações alcólicas também utilizando como substrato mel de usina sucroalcooleira em condições bastante semelhantes às empregadas neste trabalho.

4.10.2. Análise dos Resultados das Fermentações Descontínuas

Analisando as fermentações realizadas em regime descontínuo, foi possível observar, tanto para as fermentações sem inversão prévia quanto para as que sofreram esse processo, que houve uma diminuição nas velocidades de consumo de ART e de produção de etanol com o aumento da concentração inicial de ART na fermentação. Esse efeito ocorreu provavelmente devido à inibição pelo substrato, e se apresentou de forma mais intensa nas fermentações que sofreram inversão prévia. Esse efeito também foi observado por Acorsi (2012), utilizando mel invertido como substrato em uma fermentação alcoólica, que ao analisar a velocidade de consumo de açúcares e produção de etanol de fermentações a 100 g/L e 250 g/L observou maiores valores para a menor concentração citada.

Contudo, na menor concentração utilizada (cerca de 150 g/L), pôde-se observar pouca diferença entre as velocidades de consumo de açúcares e produção de etanol entre as fermentações 1 (sem inversão) e 7 (com inversão), diferença que se mostrou maior comparativamente nas fermentações a cerca de 200 e 250 g/L. Já em relação ao rendimento em etanol ainda em regime descontínuo, ele apresentou valores maiores, de uma forma geral, para as fermentações que passaram pelo processo de inversão prévia. O maior valor para o rendimento em etanol foi alcançado na fermentação 7, realizada a 149 g/L, e foi de 87,4%.

Algumas fermentações descontínuas foram realizadas praticamente nas mesmas condições para analisar a reprodutibilidade dos experimentos executados, entre as quais pode-se citar os pares de fermentações 2 e 3, 5 e 6, 8 e 9. Nas fermentações 2 e 3, obteve-se uma boa similaridade na velocidade de consumo de açúcares, contudo esta não se apresentou tão boa na velocidade de produção de etanol. Nas fermentações 5 e 6, houve boa similaridade nas velocidades de reação, com o maior problema sendo o ajuste relativamente pior da reta de consumo de açúcares da fermentação 6. Quanto as fermentações 8 e 9, essas diferiram nas velocidades de reação, contudo no rendimento em etanol obteve-se valores um pouco mais similares entre si. Essas diferenças podem ter ocorrido devido a utilização de lotes diferentes de

fermento, algumas pequenas diferenças de concentração inicial de ART e porcentagem de sacarose (para fermentações não-invertidas) observadas, entre outros fatores.

Entre as fermentações em regime descontínuo, a fermentação 4 foi conduzida de uma forma diferenciada. A levedura nessa fermentação foi reutilizada de uma fermentação anterior, com o intuito de avaliar o seu desempenho, pois se acreditava que essa levedura possivelmente apresentaria bom desempenho fermentativo por estar mais adaptada ao substrato empregado. Porém, a partir dos resultados, pôde-se observar que essa fermentação apresentou desempenho bem inferior no que diz respeito às velocidades de reação e rendimento em etanol quando comparada às outras fermentações realizadas, o que poderia ser explicado por uma possível inibição causada pelo etanol produzido na fermentação anterior. Essa fermentação apresentou valores de pH peculiarmente baixos em seus momentos finais que não foram observados em nenhuma outra fermentação realizada, o que pode indicar contaminação, o que também contribuiria para a queda nas velocidades de reação e no rendimento em etanol.

Também se analisou nas fermentações descontínuas sem inversão prévia do mel como a concentração de sacarose variou com o tempo (Tabelas 11, 13, 15, 17, 19 e 21 e Figuras 14, 18, 22, 26, 30 e 34). Observou-se que a partir da primeira hora de fermentação a sacarose já se encontrava praticamente inexistente no frasco, o que aparentemente indica que o micro-organismo rapidamente inverteu toda a sacarose presente no substrato. Na primeira amostra coletada, todavia, onde o tempo que o micro-organismo teve para inverter o açúcar foi apenas o decorrido entre a inoculação e a coleta da amostra (entre 2 e 3 minutos), ainda se encontrou sacarose presente no meio. Neste ponto, analisou-se a porcentagem de sacarose invertida e o erro da técnica de inversão por invertase quando comparada à hidrólise ácida, como se pode observar na Tabela 37.

Tabela 37: Porcentagem de Sacarose Invertida e Erro da Técnica de Inversão por Invertase na Primeira Amostra Coletada do Fermentador

Ensaio	% Sacarose Antes da Inserção de Levedura no Fermentador	% Sacarose Depois da Inserção de Levedura no Fermentador	% de Inversão da Sacarose	Conc. ART Hidrólise Ácida (g/L)	Conc. ART Invertase (g/L)	Erro Técnica Invertase (%)
1	67,9	27,8	59,1	151	152	0,66
2	87,0	27,2	68,7	195	200	2,56
3	78,1	9,55	87,8	199	199	0,00
4	68,0	47,8	29,7	201	193	3,98
5	87,1	22,1	74,6	263	281	6,84
6	73,6	16,5	77,6	267	267	0,00
Média ± Desvio Padrão		73,6 ± 10,6	Média ± Desvio Padrão		2,34 ± 2,71	

Observou-se já nas primeiras amostras coletadas de cada fermentação uma inversão média de 73,6% da sacarose, o que mostra como o processo de fato ocorre rapidamente, e se obteve um erro relativamente aceitável na técnica de inversão por invertase. A fermentação 4 não foi utilizada no cálculo da média da porcentagem de inversão, por ter sido conduzida de forma excepcional, mas pode-se notar que nesta houve uma dificuldade um pouco maior do micro-organismo para realizar a inversão da sacarose presente no substrato.

Considerando que a primeira inserção de mel nos ensaios descontínuos alimentados com alimentação em pulsos foi basicamente um ensaio descontínuo na concentração inicial observada após essa primeira inserção de mel, foi possível ajustar modelos que conseguem descrever, com relativa precisão, o comportamento das velocidades de consumo de açúcares e de produção de etanol em relação à concentração inicial de ART presente na fermentação mostrados na Tabela 38. O fato de um modelo linear ter-se ajustado bem às curvas de consumo de substrato e de geração do produto foi positivo pelo fato de se observar velocidades aproximadamente constantes no decorrer da fermentação nos pontos analisados (podendo ser utilizadas como representativas das suas respectivas fermentações e associadas com as suas concentrações iniciais), e mostra que o efeito de inibição pelo produto (etanol) não foi muito forte nesses pontos (pois se tivesse sido, a partir de certa concentração de etanol no mosto ter-se-ia redução significativa da velocidade de reação), inibição esta que não será incluída no modelo proposto.

Utilizou-se como modelo fundamental a Equação 65 proposta por Monod (1942) com acréscimo de termos que a adaptam para considerar a inibição pelo substrato sugeridos e adaptados da literatura, dentre os quais foram utilizados os modelos linear da Equação 66 (GHOSE & TYAGI, 1979), exponencial da Equação 67 (AIBA et al, 1968) e hiperbólico da Equação 68 (ANDREWS, 1968). Quanto as variáveis abordadas nas equações tem-se ($r_{S,P}$) sendo as velocidades de consumo do substrato e geração do produto na concentração (S), (r_m) sendo um valor máximo de velocidade que nunca seria ultrapassado, (K_S) a constante de modelagem do modelo de Monod e (K_{IS}) as constantes de modelagem dos modelos de inibição pelo substrato abordados. Com base nos valores de R^2 observados na Tabela 39 para os ajustes dos dados de fermentação obtidos das Equações 66, 67 e 68, observou-se que o modelo de inibição pelo substrato linear foi mais eficiente para as fermentações sem inversão prévia, e que os modelos se ajustaram melhor nessa condição de uma forma geral do que nas fermentações onde houve inversão prévia da sacarose, onde o modelo exponencial se mostrou mais adequado. A Figura 58 mostra graficamente como os modelos se ajustaram aos dados experimentais.

$$r_{S,P} = r_m \cdot \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \quad (65)$$

$$r_{S,P} = r_m \cdot \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \cdot (1 - K_{IS} \cdot S) \quad (66)$$

$$r_{S,P} = r_m \cdot \left(\frac{S}{K_S + S} \right) \cdot (e^{-K_{IS} \cdot S}) \quad (67)$$

$$r_{S,P} = r_m \cdot \left(\frac{S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_{IS}}} \right) \quad (68)$$

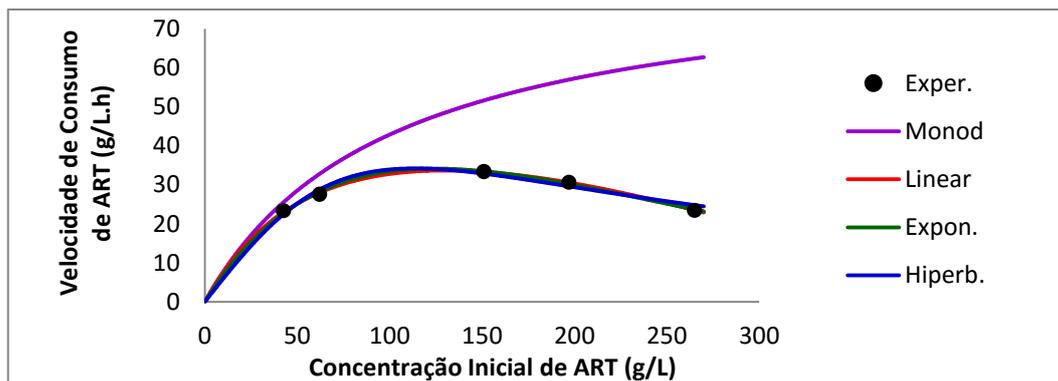
Tabela 38: Dados Utilizados Para Ajuste dos Modelos Realizado

Sem Inversão Prévia da Sacarose			
Ensaio	S (g/L)	r_s (g/L.h)	r_p (g/L.h)
11	42,5	23,352	10,476
12	62,1	27,558	11,450
1	151	33,374	12,292
2 e 3	197	30,637	11,093
5 e 6	265	23,446	9,0245
Com Inversão Prévia da Sacarose			
Ensaio	S (g/L)	r_s (g/L.h)	r_p (g/L.h)
13	40,0	23,416	10,503
7	149	29,420	13,144
8 e 9	214	16,006	6,6385
10	269	11,652	5,0010

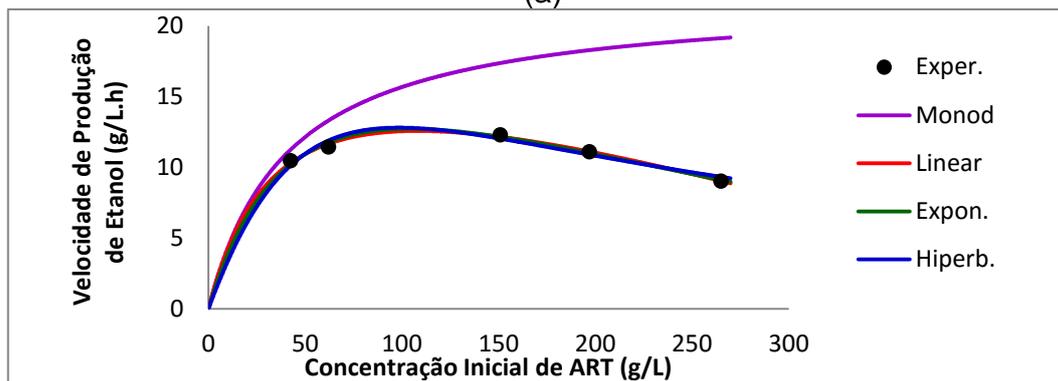
Tabela 39: Ajustes das Velocidades de Consumo de Açúcares e Produção de Etanol para os Modelos Linear, Exponencial e Hiperbólico

Inversão Prévia	Velocidade de Reação	Modelo de Ajuste	r_m	K_s	K_{IS}	R²
Não	r _s	Linear ⁽¹⁾	86,140	101,00	0,0024	0,9952
		Exponencial ⁽²⁾	581,26	768,49	0,0069	0,9851
		Hiperbólico ⁽³⁾	227560	378360	0,0342	0,9303
	r _p	Linear ⁽¹⁾	22,093	40,842	0,0020	0,9837
		Exponencial ⁽²⁾	31,081	67,545	0,0038	0,9655
		Hiperbólico ⁽³⁾	43,098	116,40	83,459	0,9129
Sim	r _s	Linear ⁽¹⁾	74,431	69,796	0,0031	0,9130
		Exponencial ⁽²⁾	16756	17227	0,0113	0,9200
		Hiperbólico ⁽³⁾	1426900	1840000	0,0032	0,7173
	r _p	Linear ⁽¹⁾	32,935	67,850	0,0031	0,8899
		Exponencial ⁽²⁾	11309	25542	0,0116	0,8990
		Hiperbólico ⁽³⁾	440520	1252300	0,0044	0,6934

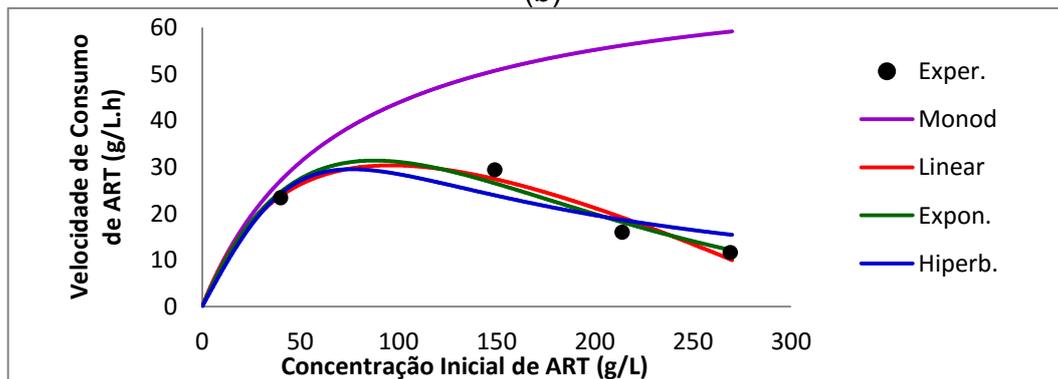
⁽¹⁾ Modelo de Ghose & Tyagi (1979) – Equação 66; ⁽²⁾ Modelo de Aiba et al (1968) – Equação 67; ⁽³⁾ Modelo de Andrews (1968) – Equação 68.



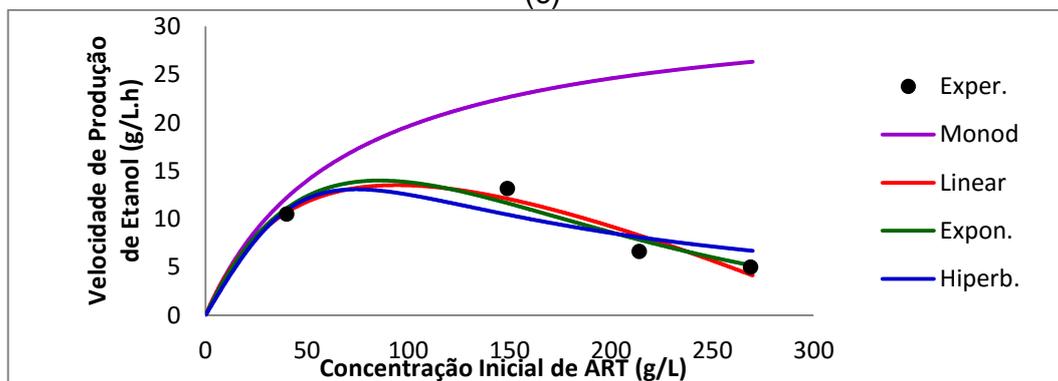
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 58: Ajustes de r_s (a) e r_p (b) em Função de S para Fermentações Descontínuas Sem Inversão Prévia da Sacarose e de r_s (c) e r_p (d) em Função de S para Fermentações Com Inversão Prévia da Sacarose

4.10.3. Análise dos Resultados das Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação em Pulsos

No que se refere às fermentações descontínuas alimentadas com alimentação em pulsos, a Tabela 40 mostra os valores de Concentração Inicial de ART, de Velocidades de Consumo de ART e de Produção de Etanol, e de ($Y_{P/S}$) para cada inserção de mel realizada no fermentador.

Tabela 40: Valores de Concentração Inicial de Açúcares, r_s , r_p e $Y_{P/S}$ para cada Inserção de Mel Realizada nas Fermentações 11, 12 e 13.

Ensaio	Inserção de Mel	Concentr		$r_s \left(\frac{\text{g ART}}{\text{L} \cdot \text{h}} \right)$	R^2	$r_p \left(\frac{\text{g Etan}}{\text{L} \cdot \text{h}} \right)$	R^2	$Y_{P/S} \left(\frac{\text{g Etan}}{\text{g ART}} \right)$
		ação Inicial ART (g/L)						
11	1	62,1	27,558	0,998	11,450	0,991	0,4155	
	2	36,1	25,752	0,946	10,490	1,000	0,4073	
	3	41,7	22,182	0,997	8,8359	0,973	0,3983	
12	1	42,5	23,352	0,999	10,476	0,990	0,4486	
	2	92,1	23,456	0,896	7,0364	0,958	0,2999	
	3	71,5	18,081	0,981	6,5897	0,981	0,3644	
13	1	40,0	23,416	0,996	10,503	0,989	0,4485	
	2	68,8	26,071	0,999	9,7977	0,991	0,3758	
	3	80,3	15,828	0,936	7,1358	0,971	0,4508	

Analisando primeiramente a fermentação 11, percebe-se pequenas variações de velocidades de consumo de ART, produção de etanol e nos valores de ($Y_{P/S}$) entre as inserções de mel realizadas quando comparada às outras duas fermentações, todas decrescentes, o que aparentemente mostra baixo efeito de possíveis inibições pelo substrato e pelo produto (essa última aparentemente interferindo levemente na terceira inserção de mel no fermentador), pelo fato de se estar operando em concentrações relativamente baixas destes em todo o desenvolvimento fermentativo.

Quanto às fermentações 12 e 13, obteve-se na primeira inserção de mel (que é basicamente um ensaio descontínuo na concentração inicial observada) resultados praticamente idênticos para as duas fermentações, mostrando que para baixas concentrações aparentemente não existe nenhum benefício ou malefício devido a inversão prévia da sacarose. Observou-se também relativamente altos valores de ($Y_{P/S}$), bastantes similares aos encontrados por

Acorsi (2012) em experimentos realizados a 32, 34 e 37°C utilizando como substrato mel invertido a 30 e 50 g/L de concentração inicial de ART.

Na segunda inserção de mel, observaram-se velocidades de consumo do substrato e de geração de produto relativamente similares, o que aparentemente indica pequenos efeitos de inibição, contudo observou-se significativa queda do valor de ($Y_{P/S}$) com relação à primeira inserção realizada, o que se mostrou ainda mais intenso na fermentação 12. Desconfia-se que esse efeito foi causado em parte pelo fato de ter havido certo intervalo de tempo entre o esgotamento dos açúcares do mel da primeira inserção e a segunda inserção de mel no fermentador, o que pode ter causado algum efeito de repressão na rota de produção do etanol. Esse efeito foi muito sutil ou até inexistente na fermentação 11, provavelmente isso se deva ao fato de que a segunda inserção de mel no fermentador tornou o mosto bem menos concentrado em açúcares do que nas fermentações 12 e 13. Os experimentos foram realizados desta forma devido a dificuldade experimental de medir a concentração de ART em tempo real (inseria-se portanto o mel da inserção consequente quando se sabia com uma certa margem de segurança que os açúcares da inserção precedente haviam se esgotado).

Quanto à terceira inserção de mel, observou-se uma clara redução das velocidades de reação em ambas as fermentações, e observou-se valores de ($Y_{P/S}$) razoáveis para a fermentação 12 e relativamente bons para a fermentação 13. Acredita-se que a concentração de etanol aliada ao tempo decorrido entre o esgotamento dos açúcares da segunda inserção e a terceira inserção de mel possa ter gerado um efeito de inibição pelo produto mais significativo nesse caso, o que fez com que as velocidades de reação decrescessem. Na fermentação 4 observou-se como a longa exposição das células de levedura ao etanol na ausência de açúcares fermentescíveis pode diminuir drasticamente as velocidades de consumo de açúcares e produção de etanol em uma fermentação alcoólica.

Houve, contudo, uma vantagem em se garantir com certa margem o final da fermentação em cada pulso de mel adicionado, pois assim é possível observar com melhor precisão a concentração residual de ART no final para

cada inserção de mel. Os valores encontrados se apresentam na Tabela 41, foram utilizadas as médias dos valores que podem ser considerados recorrentes que caracterizam o fim da fermentação de cada pulso.

Tabela 41: Concentrações Residuais de ART no Final da Fermentação de Cada Inserção de Mel no Fermentador

Inserção de Mel	Concentração ART Residual (g/L)		
	Ensaio		
	11	12	13
1	4,74	3,06	3,30
2	5,89	8,05	8,01
3	7,47	12,8	12,8

É possível observar para as três fermentações que a concentração residual de ART se mostrou maior nas últimas inserções de mel em relação às primeiras para as três inserções de mel. Esse efeito se mostrou mais intenso para as fermentações 12 e 13 comparando-se com a fermentação 11, e se mostrou muito semelhante nessas duas fermentações, o que aparentemente indica não ter relação com a inversão ou não inversão prévia da sacarose. Acredita-se que esse efeito também pode ser explicado pela presença de etanol no fermentador aliada aos intervalos ociosos do micro-organismo entre o término da fermentação da inserção anterior até o início da fermentação da inserção posterior.

Ainda quanto às fermentações descontínuas alimentadas com alimentação em pulsos, observou-se ao comparar as fermentações sem inversão prévia da sacarose 11 e 12 que para a fermentação 11 (com menor concentração de ART inicial) apresentaram-se maiores valores de velocidades de consumo de ART, produção de etanol e rendimento em etanol, resultado similar ao observado para as fermentações descontínuas 1, 2 e 3 e no modelo linear interpolado para as fermentações descontínuas sem inversão prévia da sacarose. Observou-se uma redução das velocidades de reação ao utilizar o regime descontínuo alimentado em pulsos em comparação ao descontínuo para fermentações sem inversão prévia do mel, mas observou-se também aumento no rendimento em etanol ao adotar esse regime.

Comparando as fermentações descontínuas alimentadas com alimentação em pulsos a cerca de 200 g/L (12 e 13), observou-se que possuem velocidades de consumo de substrato e geração de produto bastante similares, o que indica que as inibições pelo substrato (glicose, frutose ou sacarose) e pelo produto (etanol) não se mostraram aparentemente muito diferentes nessa faixa de concentrações para esse regime. Observou-se também um aparentemente aumento no rendimento em etanol na fermentação 13 (com inversão prévia da sacarose) quando comparada à fermentação 12 (sem inversão prévia), comportamento similar ao observado nas fermentações descontínuas. Comparando-se os valores fornecidos pelo modelo exponencial para fermentações descontínuas com mel previamente invertido a 179 g/L ($r_s = 22,643$ g/L.h; $r_p = 9,8692$ g/L.h; $Y_{P/S} = 0,4359$) com os resultados obtidos para a fermentação 13, obteve-se valores bastantes similares, o que indica que não houve grande ganho em adotar-se o regime descontínuo alimentado com alimentação em pulsos em detrimento do regime descontínuo nessa faixa de concentração.

No que se refere à questão da concentração de sacarose ao longo do tempo de fermentação nos ensaios 11 e 12, observou-se no ensaio 11 que a sacarose se mostrou praticamente inexistente em todos os pontos analisados, mostrando que o regime descontínuo alimentado com alimentação em pulsos, possivelmente devido à inexistência de altas concentrações no fermentador, possibilita uma mais rápida inversão da sacarose pelo micro-organismo. Na fermentação 12, analisou-se somente os pontos iniciais de cada inserção de mel no fermentador, e só se observou valores relevantes de sacarose na terceira inserção, onde a concentração de etanol pode ter interferido no processo.

4.10.4. Análise dos Resultados das Fermentações Descontínuas Alimentadas com Alimentação Constante

Analisando as fermentações descontínuas alimentadas com alimentação constante de mel, quanto à fermentação 14 (sem inversão prévia do mel), comparando-se com os valores de velocidades de consumo do substrato, geração de produto e ($Y_{P/S}$) fornecidos pelo modelo linear ajustado para a

concentração de 233 g/L nas fermentações descontínuas ($r_S = 27,175$ g/L.h; $r_P = 10,0819$ g/L.h; $Y_{P/S} = 0,3710$), obteve-se menores valores de velocidades de reação, contudo observou-se considerável aumento no valor de ($Y_{P/S}$). Como o regime descontínuo alimentado com alimentação constante não possuiu intervalos ociosos de fermentação como ocorreu com as fermentações 11, 12 e 13, isso pode reforçar, em parte, a suposição de que esse tempo ocioso entre o término dos açúcares da primeira inserção e a segunda inserção de mel foi negativo para essas fermentações no que tange ao rendimento em etanol.

Na fermentação descontínua alimentada com alimentação constante 15 (com inversão prévia da sacarose, realizada a 250 g/L), comparando-se com os valores de velocidade de consumo de ART, formação de etanol e ($Y_{P/S}$) observados pelo ajuste exponencial das fermentações descontínuas nessa mesma concentração ($r_S = 14,081$ g/L.h; $r_P = 6,0328$ g/L.h; $Y_{P/S} = 0,4284$) obteve-se valores de velocidades de reação bastantes similares, o que possivelmente indica que não existe grande influência nessas velocidades devido ao regime utilizado nessa faixa de concentrações utilizando mel previamente invertido. Entretanto, obteve-se um leve aumento no valor de ($Y_{P/S}$) observado. Comparando as fermentações 14 e 15, de uma forma geral estas tiveram desempenhos relativamente similares, o que permite inferir que os efeitos de inibição que ocorreram em ambas as fermentações não diferiram tanto entre si.

No trabalho de Bueno Netto (1982), pode-se destacar as fermentações 4 e 5 (fermentações realizadas no regime descontínuo alimentado com alimentação constante, com tempo de enchimento do fermentador de cinco horas, utilizando mel não-invertido com concentração de 180 g/L de ART, e concentrações celulares massa úmida de 45 e 60 g/L) como em condições relativamente próximas as das fermentações 14 e 15 deste trabalho. Observou-se nesses ensaios valores de velocidade de produção de etanol de 8,1 e 9,2 g/L.h, valores um pouco superiores aos vistos nesse trabalho, o que deve ter como causa mais provável ao autor ter utilizado menor concentração inicial de substrato. Quanto aos rendimentos em etanol obtidos pelo autor (79,1 e

74,2%), estes se mostraram levemente inferiores aos observados para as fermentações 14 e 15 (83,5 e 85,6%) deste trabalho.

4.10.5. Análise Geral das Fermentações para as Velocidades de Consumo do Substrato e Crescimento Celular, de $Y_{X/S}$ e valores de pH.

Quanto a análise do crescimento celular, como se pôde ver nas Figuras, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 39, 41, 43, 45, 49, 52, 55 e 57, infelizmente houve grande oscilação dos valores de concentração celular lidos ao longo do tempo de fermentação, sendo essa oscilação mais ou menos intensa dependendo da fermentação analisada. Esse comportamento se deu provavelmente pelo fato de se ter realizado coletas heterogêneas de mosto no que se refere a concentração celular, devido a não-existência de um agitador no fermentador e a uma possível natural conformação não-homogênea do micro-organismo no fermentador (se concentrando mais no fundo ou no topo do frasco, por exemplo). Segundo Gaden (1955) apud Schmidell et al (2001), a fermentação alcoólica segue o modelo de formação de produto associada ao crescimento, modelo que se caracteriza por apresentar curvas de consumo de substrato, geração do produto e crescimento celular muito próximas entre si. Desta forma, considerando que nesse trabalho conseguiu-se utilizar o modelo linear com boa precisão para as curvas de consumo de açúcares e produção de etanol, tentou-se utilizar o mesmo modelo para as curvas de crescimento celular. Para realizar essa análise, foi necessário eliminar alguns pontos por apresentarem valores que eram muito discrepantes do modelo utilizado. Os resultados são apresentados na Tabela 42.

Como se pode notar, os valores de R^2 obtidos foram em geral bastante baixos, o que não permite fazer conclusões com grande precisão dos dados obtidos. Aparentemente houve crescimento celular em todas as fermentações, porém esse não se manifestou tão grande quando comparado com o consumo de substrato, com ($Y_{X/S}$) variando de 0,0132 até 0,0390, e se mostrando de forma geral maiores para menores concentrações iniciais de substrato utilizadas. Não é possível inferir nada a princípio quanto a relação dos valores de ($Y_{X/S}$) com o fato de a sacarose ter ou não sido invertida previamente nas

fermentações, de forma geral observou-se valores bastantes similares ao se comparar as fermentações equivalentes nessas duas condições.

Este comportamento era esperado e foi bem observado e analisado no trabalho de Acorsi (2012), que encontrou para fermentações com concentração inicial de ART a 150 g/L e 250 g/L e a temperaturas de 32, 34 e 37°C valores de ($Y_{x/s}$) que variaram de 0,00766 até 0,0151, valores relativamente inferiores aos encontrados nesse trabalho (o que é positivo em um processo fermentativo), o que pode ser consequência do autor ter utilizado o micro-organismo isolado de uma amostra de levedura da usina sucroalcooleira, que pode ter características diferentes do micro-organismo utilizado nas fermentações deste trabalho.

Tabela 42: Valores de Velocidade de Consumo de Açúcares Totais, de Crescimento Celular e de $Y_{x/s}$ Para as Fermentações

Ferm	Regime	Inversão Prévia	Conc. Inicial ART	$r_s \left(\frac{\text{g ART}}{\text{L} \cdot \text{h}} \right)$	$r_x \left(\frac{\text{g Cél}}{\text{L} \cdot \text{h}} \right)$	R ²	$Y_{x/s} \left(\frac{\text{g Cél}}{\text{g ART}} \right)$
1			151	33,374	0,9648	0,5342	0,0289
2			195	30,739	0,9636	0,8337	0,0313
3			199	30,534	0,9303	0,7539	0,0305
4		Não	201	14,180	0,3448	0,6820	0,0243
5	Descontínuo		263	24,054	0,3472	0,6125	0,0144
6			267	22,838	0,3580	0,5561	0,0157
7			149	29,420	0,8345	0,4998	0,0283
8		Sim	214	18,383	0,4538	0,5792	0,0247
9			214	13,628	0,4008	0,8483	0,0294
10			269	11,652	0,1976	0,7895	0,0170
11	Desc. Alim.		129	25,907	0,9471	0,9173	0,0366
12	C/ Alim. Em	Não	195	21,219	0,6566	0,9019	0,0309
13	Pulsos	Sim	179	20,731	0,8083	0,6795	0,0390
14	Desc. Alim. C/	Não	233	16,476	0,2095	0,5047	0,0127
15	Alim. Const.	Sim	250	13,860	0,2551	0,4618	0,0184

Quanto as medidas de pH realizadas, pôde-se constatar que a partir dos valores iniciais de pH do mosto (que variou de 4,37 a 5,37), a levedura atuou no meio de fermentação de forma a manter o pH de forma geral entre 4,65 e 5,00 (o que já era observado a partir da primeira hora de fermentação em geral) o que aparentemente indica que essa é uma faixa de pH interessante para o desenvolvimento da mesma, e que a levedura atua naturalmente de forma a alcançá-la. Quanto a essa variação de 4,65 a 5,00, ela se deveu principalmente devido a atividade da levedura, quando esta se mostrava mais

ativa, havia maior produção de gás carbônico, o que gerava uma pequena quantidade de ácido carbônico que se ionizava e aumentava levemente a acidez do mosto. De fato, observou-se que nas fermentações que uma maior acidez nas leituras do mosto indicava de forma geral maiores velocidades de consumo do substrato e geração de produto. Contudo, essa é uma variável qualitativa, não sendo possível fazer uma correspondência efetiva direta entre esta e as velocidades de reação observadas.

5. Conclusões

Observou-se de forma geral um bom ajuste linear nas curvas de consumo do substrato e geração do produto nas fermentações realizadas (R^2 médio de 0,979). Os rendimentos em etanol foram maiores em fermentações onde se realizou a inversão prévia da sacarose do mel (média de 84,0%) quando comparadas com fermentações em mesmo regime de operação e concentração inicial de ART em que não se realizou esse procedimento (média de 74,8%) para todos os regimes de operação estudados.

Foi possível com os resultados de ensaios descontínuos ajustar modelos existentes em literatura para analisar como a concentração inicial de substrato influencia nas velocidades de consumo de ART e produção de etanol, ajustes que se mostraram melhores para as fermentações sem inversão prévia (R^2 médio de 0,9621) quando comparados aos ajustes para as fermentações com inversão prévia (R^2 médio de 0,8388). Os modelos que se ajustaram melhor foram os modelos linear para as fermentações não invertidas ($R^2 = 0,9952$ para r_S e $R^2 = 0,9837$ para r_P) e exponencial para as invertidas ($R^2 = 0,9200$ para r_S e $R^2 = 0,8990$ para r_P).

Quanto a inversão da sacarose pela própria levedura nas fermentações em que não se realizou esse processo previamente, observou-se que a levedura rapidamente realiza a inversão, invertendo em poucos minutos cerca de 70% da sacarose presente no mel e extinguindo a sacarose provavelmente antes da primeira hora de fermentação.

Comparando fermentações em regime descontínuo e em mesma concentração inicial de ART para concentrações mais altas (200 e 250 g/L),

observou-se velocidades de consumo de ART e produção de etanol maiores para fermentações onde não se realizou a inversão prévia da sacarose (média de $r_S = 27,0$ g ART/ L.h e $r_P = 10,1$ g Etanol/ L.h) quando comparadas às onde se realizou esse processo no mel (média de $r_S = 14,6$ g ART/ L.h e $r_P = 6,1$ g Etanol/ L.h). Essas diferenças de velocidades de reação, contudo, foram minimizadas: em fermentações a 150 g/L em regime descontínuo; a 179 g/L em regime descontínuo com alimentação em pulsos; e embora um pouco menos até mesmo em fermentações a 232 g/L em regime descontínuo alimentado com alimentação constante.

No que se refere às velocidades de consumo de substrato e geração de produto, obteve-se redução destas ao se utilizar os regimes descontínuos alimentados (média de $r_S = 21,2$ g ART/ L.h e $r_P = 8,4$ g Etanol/ L.h) comparando aos descontínuos (média de $r_S = 28,3$ g ART/ L.h e $r_P = 10,5$ g Etanol/ L.h) nas fermentações sem inversão prévia da sacarose, e não se observou grande diferença nesse ponto para as fermentações com inversão prévia.

Os rendimentos em etanol em mesmas concentrações iniciais de ART e em mel em mesma condição (invertido ou não invertido previamente) foram ligeiramente maiores para as fermentações em regime descontínuo alimentado (média de 80,8%) quando comparadas aos do regime descontínuo (média de 77,5%).

Observou-se também que o etanol desempenhou um efeito inibitório mais intenso quando permaneceu juntamente à levedura no meio de cultura quando os açúcares fermentescíveis deste haviam praticamente se extinguido. Esse efeito também foi capaz de aparentemente reduzir o nível de consumo do substrato para as fermentações descontínuas alimentadas com alimentação em pulsos.

Nas fermentações descontínuas alimentadas com alimentação em pulsos, o intervalo ocioso entre o fim da fermentação do primeiro pulso e o começo da fermentação do segundo pulso provavelmente foi o responsável por um efeito nocivo no rendimento em etanol.

Quando as análises das curvas de crescimento celular, devido a grande irregularidade nas leituras de concentração celular nas diversas fermentações executadas, obtiveram-se baixos valores de R^2 que impossibilitam a obtenção de conclusões mais precisas quanto a essa variável. Contudo, observou-se de forma geral baixos valores de $(Y_{X/S})$ (que indicam baixo crescimento celular) e maiores valores dessa variável em concentrações mais baixas, comportamentos que são experimentalmente esperados. Aparentemente não existiu grande diferença nos valores de $(Y_{X/S})$ para as fermentações com ou sem inversão prévia da sacarose.

Com isso, pode-se afirmar, a partir dos resultados alcançados, que realizar a inversão prévia da sacarose no processo de fermentação alcoólica apresentou-se como uma técnica promissora no que se refere ao rendimento em etanol, porém ainda é necessária a realização de novos estudos que possibilitem a sua aplicação em escala industrial.

6. Referências

- ACORSI, R.L., **Estudo Cinético da Fermentação Alcoólica Descontínua de Mel Invertido**. 2012. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.
- AIBA, S., SHODA, M. & NAGATANI, M., 1968. Kinetics of Product Formation in Alcohol Fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.10, p.845-864.
- ALCOESTE, **Produção de Etanol**. Disponível em: <<http://www.alcoeste.com.br/?pg=producao>>. Recuperado em 25 Junho 2016.
- ALEXANDRE, H.; CHARPENTIER, C. Biochemical Aspects of Stuck and Sluggish Fermentation in Grape Must. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 20, n. 1, p. 20-27, 1998.
- ALEXANDRINO, N. **Melhoramento de Leveduras para Fermentação com Alto Teor Alcoólico Mediante Hibridação e Evolução Adaptativa**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências. Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2012.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; CAMPOS, H. Infecção, Problema Sério na Produção de Álcool. In: Congresso Nacional da Sociedade dos Técnicos Açucareiros do Brasil, 2., Rio de Janeiro, 1981. **Anais**. Piracicaba: STAB p.158-168. 1981.
- AMORIM, H.V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processo de Produção de Álcool - Controle e Monitoramento**. FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP. Piracicaba, 1996
- AMORIM, H.V.; OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A. **Métodos para o Controle Microbiológico na Produção de Álcool e Açúcar**. FERMETNEC/FEALQ/ESALQ-USP. Piracicaba, 1996.
- ANDREWS, J. F., 1968. A Mathematical Model for the Continuous Culture of Microorganisms Utilizing Inhibitory Substrate. **Biotechnology and Bioengineering**, v.10, p.707-723.
- ANDRIETTA, M. da G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. **Bioetanol – Brasil, 30 anos na Vanguarda**. UNICAMP, 2006. Campinas, SP. Disponível

em: < www.multiciencia.unicamp.br/art02_7.htm - 24k > Recuperado em: 25 Jun 2016.

BALAKUMAR, S.; ARASARATNAM, V.; BALASUBRAMANIAM, K. Isolation and Improvement of a Thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* Strain. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17, p. 739-746, 2001.

BARROS, E. V. A Matriz Energética Mundial e a Competitividade das Nações: Bases de uma Nova Geopolítica. **ENGEVISTA**, v. 9, n. 1, p. 47-56, junho 2007.

BATISTOTE, M. **Estudo Fisiológico do Efeito da Complexidade Estrutural da Fonte de Nitrogênio no Meio de Cultura no Metabolismo de Leveduras**. 2006. 155p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - UNESP, Araraquara – SP.

BERGAMASCO, R.; BASSETI, F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M., Characterization of Free and Immobilized Invertase Regarding Activity and Energy of Activation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering (Impresso)**, Brasil, v. 17, n.4-7, p. 873-880, 2000.

BERTELLI, L. G. Dezesesseis anos de Proalcool. **Stab. Açúcar, Álcool e Sub-Produtos**, 11(1): 19-20, 1992.

BIODIESELBR. **O que é Biodiesel?** Disponível em: <<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/definicao/o-que-e-biodiesel.htm>>. Recuperado em 13 Maio 2016.

BISSON, L. F. Stuck and Sluggish Fermentations. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 50, n. 1, p. 107-119, 1999.

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., **Biotecnologia Industrial – Volume 1: Fundamentos**. São Paulo, Edgard Blucher, 2001.

BRANDÃO, A. **Cana-de-açúcar, Álcool e Açúcar na História e no Desenvolvimento Social do Brasil**. Brasília: Horizonte Editora, 1985.

BRASKEM – **O Etanol**. Disponível em: <<http://www.braskem.com/site.aspx/Etanol>>. Recuperado em 15 Maio 2016.

BUENO NETTO, C. L., **Influência da Concentração Inicial de Células e do Tempo de Enchimento da Dorna no Processo Descontínuo Alimentado de**

Fermentação Alcoólica de Mosto de Melão de Cana de Açúcar. 1982. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

CARTWRIGHT, C. P.; JUROSZEK, J. R.; ROSE, A. H. Ethanol Dissipates the Protonmotive Force Across the Plasma-Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 132, p.369-377, 1986. Part 2.

CARVALHO, B. S. **Efeito da Temperatura na Cinética de Morte Celular e em Fermentação Alcoólica Contínua com Reciclo de Células.** 1996. 96 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade de Campinas, Campinas, 1996,

CARVALHO, J. C. M. **Influência de Vazão Exponencialmente Decrescente do Mosto de Melão de Cana-de-Açúcar No Processo Descontínuo Alimentado de Fermentação Alcoólica.** 1989. 238 p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. Fermentação Descontínua. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, v. 2, p. 193-204, 2001.

CASADEI, M. E. **Processos Fermentativos a Partir da Cana-de-Açúcar.** 2012, 39 p. Trabalho (Graduação) – Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2012.

CASTRO, H. F., **Processos Químicos Industriais II – Indústria Alcooleira.** Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo, 2011, 21 p.

CAVALHEIRO, A. de A. **Análise dos Mutantes de Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para Melhoria na Resistência e Produção de Etanol.** Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímica - Farmacêutica. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

CHEN, J. C. P., CHOU, C. **Cane Sugar Handbook: A Manual for Cane Sugar Manufacturers and their Chemists.** 12nd Edition. New York. John Wiley & Sons, 1993.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da Viabilidade da Levedura e da Contaminação Bacteriana na Fermentação Alcoólica.** 2003. 137p. Tese (Doutorado) -

“Escola Superior Luiz de Queiroz” - ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

D'AMORE, T.; STEWART, G. G. Ethanol Tolerance of Yeast. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 9, n. 6, p. 322-330, 1987.

DAUGULIS, A. J.; SWAINE, D. E. Examination of Substrate and Product Inhibition Kinetics on the Production of Ethanol by Suspended and Immobilized Cell Reactor. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 29, p.639-645, 1987.

DUARTE, J. C. et al. **Continuous Culture of Flocculent Yeast for Ethanol Production**. Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Biotechnology Department, Portugal, 2006.

EGGLESTON, G; LEGENDRE, B; RICHARD, C. Effect of Harvest Method and Storage Time on Sugarcane Deterioration I: Cane Quality Changes. **International Sugar Journal**, v.103, n.1232, p. 331-338, 2001.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Clima Favorável à Produção de Cana-de-Açúcar**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/clima_para_cana_000fhc5hpr702wyiv80efhb2aul9p4.pdf>. Recuperado em 14 Maio 2016.

EPSTEIN, I. & GROSSOWICZ, N., Prototrophic Thermophilic Bacillus – Isolation, Properties and Kinetics of Growth. **J. Bacteriol.**, v. 99, n. 2, p. 414, 1969.

FALCONE, M. & MARQUES, A. B. Estudo Sobre as Condições de Hidrólise pelo Ácido Clorídrico na Dosagem de Açúcares Redutores Totais. **Tecnologia de Alimentos e Bebidas**, 4: 24 – 30, 1965.

FIGUEIREDO, I. C., MACIEL, B. F., MARQUES, M. O. **A Qualidade da Cana-de-Açúcar Como Matéria Prima para a Produção de Etanol**. Nucleus, Edição Especial, 2008.

GADEN, E. L. Jr. Fermentation Kinetics and Productivity. **Chemistry and Industry**, February, 12, p. 154-9, 1955.

GALZERANI, F. **Desenvolvimento de Plataformas Industriais: Domesticação de Leveduras para o Melhoramento da Fermentação Alcoólica**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.

GENTRY, J. P; GASCHO, G. J. Deterioration of Sugar Cane as Affected by Length of Cut and Delay in Milling. **Amer. Soc. Agric. Eng.**, 105:1-5, 1972.

GHOSE, T. K. & TYAGI, R. D., 1979. Rapid Ethanol Fermentation of Cellulose Hydrolysis II. Product and Substrate Inhibition and Optimization of Fermentor Design. **Biotechnology and Bioengineering**, v.21, p.1401-1420.

GOMES, F. S. **Antagonismo entre Leveduras e Bactérias Lácticas na Fermentação Alcoólica**. 2009. 171 p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2009.

IRVINE, J. E. Sugarcane. In: CHEN, J.C.P.; CHOU, C.C. (Ed) **Cane Sugar Handbook: A Manual for Cane Sugar Manufactures and their Chemists**. New York, John Wiley & Sons, Inc., 12th ed., 1993, 1090 p.

KLEIN C. J., OLSSON L., NIELSEN J., Glucose Control in *Saccharomyces cerevisiae*: The Role of Mig1 in Metabolic Functions. **Microbiology**. 144(Pt1):13-24, 1998.

KLEIN, V. **Características Agronômicas, Químicas E Bromatológicas de Variedades de Cana-de-Açúcar para Uso Forrageiro**. 2010. 39 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Jataí, 2010.

LALUCE, C.; SOUZA, C. S.; ABUD, C. L.; GATTAS, E. A. L.; WALKER, G. M. Continuous Ethanol Production in a Nonconventional Five-Stage System Operating With Yeast Cell Recycling at Elevated Temperatures. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 29, p. 140-144, 2002.

LEE, J.; LEE, S. Y.; PARK, S.; MIDDELBERG, A. P. J. Control of Fed-Batch Fermentations. **Biotechnology Advances**, v. 17, p. 29-48, 1999.

LEITE, R. C. C. **Biomassa, a esperança verde para poucos**. 2005. Disponível em <<http://www.agrisustentavel.com/san/biomassa.htm>>. Recuperado em: 13 maio 2016.

LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial – Volume 3: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo, Edgard Blucher, 2001.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das Fermentações**. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1986, v.1, 285 p.

LLOYD, D.; MORELL, S.; CARLSEN, H. N.; DEGN, H.; JAMES, P. E.; TOWLANDS, C. C. Effects of Growth with Ethanol on Fermentation and Membrane Fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 9, n. 8, p. 825-833, 1993.

LUONG, J. H. T. Kinetics of Ethanol Inhibition in Alcohol Fermentation. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 27, p.280-285, 1984.

LYND, L. R. et al. Fuel Ethanol From Cellulosic Biomass. **Science (Washington)**, v. 251, n. 4999, p. 1318-1323, 1991.

MACHADO, S. S. **Tecnologia da Fabricação do Açúcar**. Inhumas: IFG; Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 2012. 56 p. : il.

MAGALHÃES, J. P. O., KUPERMAN, N., MACHADO, R. C. **Proálcool: Uma Avaliação Global**, 2ª. Ed., Rio de Janeiro, 1991.

MAIA, A. B. R. A. **Fundamentos de Fermentação Alcoólica**. Apostila do Curso de Engenharia Química. Belo Horizonte, UFMG, 1989.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário Estatístico da Agroenergia, 2010**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Agroenergia/anuario_agroenergia/index.html>. Recuperado em 14 Maio 2016.

MARIN, F. R. **Solos do Brasil e a Cana-de-Açúcar**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_18_3112006152934.html>. Recuperado em 14 Maio 2016.

MILLER G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.

MONOD, J., 1942. Reserches sur la Croissance das Cultures Bacteriennes. **Hermann & Cie.**, Paris.

MORIMURA, S.; LING, Z. Y.; KIDA, K. Ethanol Production by Repeated Batch Fermentation at High Temperature in a Molasses Medium Containing a High

Concentration of Total Sugar by a Thermotolerant Flocculing Yeast With Improved Salt-Tolerant. **J. Ferment. Bioeng.**, v. 83, n. 3, p. 271-274, 1997.

NASS, L. L.; PEREIRA, P. A. A.; ELLIS, D. Biofuels in Brazil: Na Overview. **Crop Science**, Madison, v.47, p.2228-2237, 2007.

NOVACANA⁽¹⁾. **Aplicações e Usos do Etanol**. Disponível em: <<https://www.novacana.com/etanol/aplicacoes/>>. Recuperado em 13 Maio 2016

NOVACANA⁽²⁾. **Processos de Fabricação do Etanol**. Disponível em: <<https://www.novacana.com/etanol/fabricacao/>>. Recuperado em 15 Maio 2016.

NOVACANA⁽³⁾. **Como é Feito o Processamento da Cana-de-Açúcar nas Usinas**. Disponível em: <<https://www.novacana.com/usina/como-e-feito-processamento-cana-de-acucar/>>. Recuperado em 16 Maio 2016.

OLIVA-NETO, P. **Estudos de Diferentes Fatores que Influenciam o Crescimento da População Bacteriana Contaminante da Fermentação Alcoólica por Leveduras**. Campinas, 1995. 183p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

OLIVEIRA, E. S. **Efeito da Adição de Suplementos Nutricionais na Fermentação Alcoólica de Melaço de Cana de Açúcar em Diferentes Temperaturas**. 1988. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1988.

OLIVO, J. E., **Efeito da Concentração Inicial de Microrganismos (*S. cerevisiae*) e da Recirculação de Células em Parâmetros Cinéticos de Processos Simultâneos de Sacarificação e Fermentação de Meios Preparados a Partir de Farinha de Raspa de Mandioca**. 1985. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

PACHECO, T. F. **Fermentação Alcoólica com Leveduras de Características Floculantes em Reator Tipo Torre com Escoamento Ascendente**. Uberlândia, 2010. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

PAYNE, J.H. **Operações Unitárias na Produção de Açúcar de Cana**. Tradução Florenal Zarpelon. São Paulo: Nobel S.A., 1989.

PELCZAR, J. R.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: Conceitos e Aplicações**. 2. ed. São Paulo: Makron Books, 1997. v. 1.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. **Ethanol Industry Statistics 2015**. Disponível em: <<http://www.ethanolrfa.org/pages/statistics>> Recuperado em 13 Maio 2016.

RIBBONS, D.W.; NORRIS, J.R. Methods in Microbiology. **Academic Press Inc.**, p. 527-543, 1969.

ROMÃO, B. B., **Produção de Etanol por Hidrólise Ácida do Melaço de Soja**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

ROSALES, S.Y.R. **Contaminantes Bacterianos da Fermentação Etanólica: Isolamento em Meios Diferenciais, Identificação e Avaliação de Desinfetantes**. Rio Claro, 1989. 200p. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., BORZANI, W., **Biotecnologia Industrial – Volume 2: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, Edgard Blucher, 2001.

SERMATEC, **Açúcar – Tratamento do Caldo**. Disponível em: <<http://www.sermatec.com.br/produtos/tratamento-do-caldo>>. Recuperado em 25 Maio 2016.

SOUZA, C.S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de S. cerevisiae**. 155 p. 2009. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto Butantan/IPT. Universidade de São Paulo, 2009.

STECKELBERG, C., **Caracterização de Leveduras de Processos de Fermentação Alcoólica Utilizando Atributos de Composição Celular e Características Cinéticas**. 215 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2001.

STEINLE, L. A., **Fatores que Interferem na Fermentação Alcoólica**. Monografia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gestão do Setor Sucroenergético – MTA. Sertãozinho, Brasil, 2013.

SUCRANA, **Densidade de Soluções Açucaradas**. Disponível em: <<http://www.sucrana.com.br/tabelas/densidade-solucoes-acucaradas.pdf>>.

Recuperado em 25 Maio 2016.

SUMNER, J. B. Dinitrosalicylic Acid: A Reagent for the Estimation of Sugar in Normal and Diabetic Urine. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 47, p. 5-9, 1921.

UNICA⁽¹⁾ – União da Indústria de Cana-de-Açúcar – **Produção Anual de Etanol Total**. Disponível em: <[http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-](http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2&acao=visualizar&idTabela=1621&produto=etanol_total&safralNi=2003%2F2004&safraFim=2014%2F2015&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR)

[moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2&acao=visualizar&idTabela=1621&produto=etanol_total&safralNi=2003%2F2004&safraFim=2014%2F2015&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR](http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2&acao=visualizar&idTabela=1621&produto=etanol_total&safralNi=2003%2F2004&safraFim=2014%2F2015&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR)> Recuperado em: 13 maio 2016.

UNICA⁽²⁾ - União da Indústria de Cana-de-Açúcar – **Área de Plantação de Cana-de-Açúcar Colhida no Brasil**. Disponível em:

<<http://www.unicadata.com.br/historico-de-area-ibge.php?idMn=33&tipoHistorico=5&acao=visualizar&idTabela=1613&produto=%C3%81rea+colhida&anoIni=1980&anoFim=2015&estado=RS%2CSC%2CPR%2CSP%2CRJ%2CMG%2CES%2CMS%2CMT%2CGO%2CDF%2CBA%2CSE%2CAL%2CPE%2CPB%2CRN%2CCE%2CPI%2CMA%2CTO%2CPA%2CAP%2CRO%2CAM%2CAC%2CRR>>. Recuperado em 15 Maio 2016.

VALDES, C. Ethanol Demand Driving the Expansion of Brazil's Sugar Industry. **Sugar Journal**, New Orleans, v. 70, p. 9-11, 2007.

VAZ, G. C.; PACHOLAK, L.; SANTO, M. E. **Engenharia Bioquímica – Fermentação em Batelada**. Disponível em:

<<http://pt.slideshare.net/thccarneiro/fermentacao-em-batelada>>. Recuperado em 25 Maio 2016.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**. Chichester: John-Wiley, 1998. 350 p.

WALKER, M. W., Yeast Growth. In: WALKER M. W. (Ed.) **Yeast Physiology and Biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1998. p. 101-202.

ZAMBELLI, R. A. **Fermentação Contínua e Fermentação Descontínua**. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAAA7wAAF/fermentacao-descontinua-x-continua>>. Recuperado em 25 Maio 2016.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Tecnologia de Imobilização de Células e Enzimas Aplicada à Produção de Álcool de Biomassas. **Relatório nº 2**, junho/87, pp, 315-321, 1987.

Apêndice A – Preparação de Soluções Auxiliares Utilizadas Para a Realização dos Experimentos

A.1. Preparação de Solução de Tampão de Acetato 1 mol/L pH 4,5

Pesou-se uma massa de 41,22 g de Acetato de Sódio com 99,5% de pureza mínima e transferiu-se a mesma para um balão volumétrico de meio litro, completando-o com água destilada. Em outro balão volumétrico de meio litro, com o uso de uma proveta, adicionou-se 29 mL de Ácido Acético com pureza mínima de 99,5% e completou-se o balão com água destilada. Em um béquer de um litro com agitação magnética, adicionou-se 350 mL da Solução de Acetato de Sódio e em seguida foi-se inserindo aos poucos a solução de Ácido Acético até que se atingisse pH 4,5 em leitura no pHmetro devidamente calibrado. Guardou-se a solução em frasco de vidro âmbar de um litro até a sua utilização;

A.2. Preparação da Solução de Ureia 40 g/L

Pesou-se 8,08 g de Ureia em flocos com pureza mínima de 99% e transferiu-se com auxílio de água destilada para um balão volumétrico de 200 mL, completando-se o balão em seguida com água destilada, homogeneizando-se bem a solução. Transferiu-se a solução para um erlenmeyer de meio litro;

A.3. Preparação da Solução de Triplofosfato de Sódio 100 g/L

Colocou-se 70 gramas de Triplofosfato de Sódio em um erlenmeyer de meio litro e inseriu-se em seguida 180 mL de água destilada. O fosfato está em excesso na solução, logo ficando precipitado em parte no fundo do erlenmeyer, e sua solubilidade máxima é próxima de 100 g/L;

A.4. Preparação da Solução de DNS

1) Em um béquer de um litro, dissolveu-se 48,0 gramas de Hidróxido de Sódio em um volume de 400 mililitros de água destilada. Essa diluição é exotérmica, então fez-se a mesma em banho à temperatura ambiente visando resfriar a solução mais rapidamente. Chamou-se essa solução de Solução 1;

2) Em um béquer de três litros, com auxílio de um agitador magnético, dissolveu-se 16,0 gramas de Ácido 3,5-Dinitrosalicílico em um litro de água destilada. Chamou-se essa solução de Solução 2;

3) Em um béquer de meio litro, pesou-se 10 gramas de Fenol Comum e dissolveu-se em aproximadamente 160 mililitros de água destilada. Aqueceu-se o Fenol em banho-maria a 45-50°C para que se liquefizesse e fosse possível pipetá-lo para preparar a solução. O Fenol é corrosivo e extremamente tóxico e cancerígeno, logo deve-se sempre utilizar luvas de borracha para operar a solução de DNS. Chamou-se essa solução de Solução 3;

4) Em agitador magnético, adicionou-se 30 mililitros da Solução 1 na Solução 3. Chamou-se essa solução de Solução 4;

5) Adicionou-se lentamente o restante da Solução 1 na Solução 2 e misturou-se para dissolução. Chamou-se essa solução de Solução 5;

6) Adicionou-se 400,0 gramas de Tartarato de Sódio e Potássio na Solução 5 até dissolução completa e não mais se observar liberação de bolhas de gás. Chamou-se essa solução de Solução 6;

7) Adicionou-se 12,20 gramas de Sulfito de Sódio na solução de Fenol (Solução 4) e misturou-se até completa dissolução. Chamou-se essa solução de Solução 7;

8) Adicionou-se a Solução 7 na Solução 6 e misturou-se. Chamou-se essa solução de Solução 8. Em um balão volumétrico de 2 litros, adicionou-se a Solução 8 e completou-se até o volume do balão com água destilada;

9) Filtrou-se a Solução 8 em funil de vidro de fundo sinterizado de 100 mL. Adicionou-se ao filtrado 12,20 gramas de Sulfito de Sódio e misturou-se bem até dissolver. Chamou-se essa solução de Solução 9;

10) Guardou-se a Solução 9 em dois frascos de vidro âmbar de um litro cada, inertes, escuros e ao abrigo da luz, rotulando-os. Preparou-se dois lotes de DNS seguindo essa metodologia para a realização de todas as análises presentes nesta dissertação. Todas as transferências de soluções realizadas

na preparação foram quantitativas, usando pequenas alíquotas de água destilada, tomando-se cuidado para não estourar o volume final de 2 litros.

A.5. Preparação da Solução de Ácido Clorídrico a 1,3 mol/L

Em capela com o exaustor ligado, inseriu-se em um balão volumétrico de um litro cerca de 500 mL de água destilada, em seguida inseriu-se lentamente utilizando uma proveta 111 mL de Ácido Clorídrico Concentrado com fração mássica mínima de 36%. Em seguida, completou-se o volume do balão com água destilada, tampando e homogeneizando a solução, transferindo-a para um frasco identificado de vidro limpo de volume um litro;

A.6. Preparação da Solução de Hidróxido de Sódio a 4 mol/L

Pesou-se 80,40 g de Hidróxido de Sódio em flocos com pureza mínima de 99,5% em um béquer de plástico de um litro e dissolveu-se em cerca de 300 mL de água destilada com auxílio de um bastão de vidro em banho a temperatura ambiente até que a solução esfriasse. Despejou-se então a solução quantitativamente em um balão volumétrico de meio litro, completando em seguida o volume do balão com água destilada, homogeneizou-se a solução e guardou-se em frasco identificado de plástico de volume meio litro;

Apêndice B – Detalhamento de Metodologia

B.1. Obtenção da Curva-Padrão da Solução de DNS

1) Pesou-se 0,500 gramas de Glicose e 0,500 gramas de Frutose em béqueres pequenos e transferiu-se quantitativamente estas amostras para um balão de um litro, completando o volume do balão com água destilada. Fez-se assim uma solução padrão de Glicose + Frutose na concentração de 1 g/L. Colocou-se a solução em um frasco de vidro âmbar de um litro limpo e armazenou-se a mesma em geladeira em repouso por pelo menos três horas antes do uso da solução;

2) Com o auxílio de pipetas automáticas de 0,1 – 1 mL e 1 – 5 mL e utilizando água destilada e a Solução Padrão de Glicose + Frutose, preparou-se em tubos de ensaio identificados soluções de volume 5 mL de 0 até 1 g/L de Glicose + Frutose com passo crescente de 0,1 g/L, agitando-se os tubos em

agitador vortex. A Tabela 43 mostra os volumes de água destilada e solução de Glicose + Frutose utilizados;

Tabela 43: Preparação de Soluções de Glicose + Frutose de 0 a 1 g/L com Passo Crescente de 0,1 g/L

Amostra	Volume de Água Destilada Adicionado (mL)	Volume de Solução de Glicose + Frutose Adicionado (mL)	Concentração de Glicose + Frutose (g/L)
1	5,0	0,0	0
2	4,5	0,5	0,1
3	4,0	1,0	0,2
4	3,5	1,5	0,3
5	3,0	2,0	0,4
6	2,5	2,5	0,5
7	2,0	3,0	0,6
8	1,5	3,5	0,7
9	1,0	4,0	0,8
10	0,5	4,5	0,9
11	0,0	5,0	1,0

3) Pipetou-se em duplicata um volume de 0,5 mL das amostras de 1 a 11 exibidas na Tabela 2 em tubos de ensaio identificados;

4) Pipetou-se nos tubos com 0,5 mL de amostra um volume da 2,5 mL de Solução de DNS preparada conforme metodologia já descrita. Adicionou-se rolhas perfuradas nas bocas dos tubos e agitou-se em agitador vortex;

5) Inseriu-se os tubos em banho com água fervente cobrindo externamente todo o volume de solução nos tubos de ensaio e deixou-se os tubos imersos por dez minutos;

6) Retirou-se os tubos de ensaio da água fervente e inseriu-se os mesmos em banho a temperatura ambiente, deixando-se os tubos resfriarem por 5 minutos;

7) Retirou-se as rolhas dos tubos e adicionou-se em cada tubo, com o auxílio de um dispensete, 3,0 mL de água destilada;

A Figura 59 mostra as etapas necessárias para a análise DNS: Inserção de 0,5 mL da solução açucarada (a); inserção de 2,5 mL da solução DNS (b);

amostra após dez minutos em banho de água fervente (c); e adição de 3,0 mL água destilada à amostra (d);

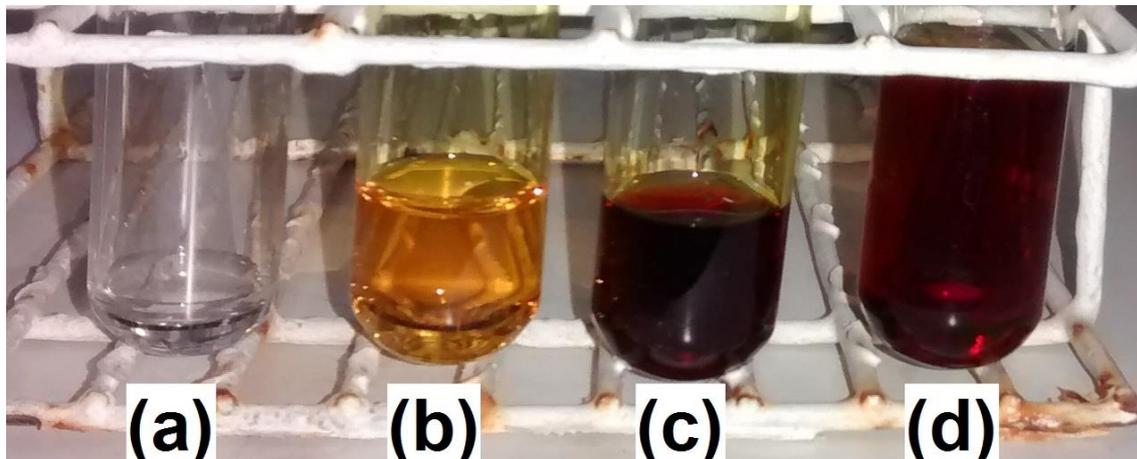


Figura 59: Análise DNS: Inserção de Solução de Glicose+Frutose (a); Inserção de Solução DNS (b); Exemplo de Amostra após 10 Minutos de Fervura (c); Amostra Após Adição de Água Destilada (d). Fonte: O Autor

8) Agitou-se os tubos em agitador vortex e fez-se a leitura da absorbância a 600 nm em cubetas de plástico em Espectrofotômetro Shimadzu, zerando a absorbância com uma das amostras 1 da duplicata (que é o branco, concentração 0 g/L de Glicose + Frutose), em ordem crescente de aumento da concentração. Obtêm-se então uma curva-padrão que relaciona as leituras de Absorbância com as Concentrações de Glicose + Frutose, e com uma regressão linear é possível encontrar uma equação que correlacione essas duas grandezas físicas. Obtêm-se então uma equação na forma da Equação 69.

$$Abs(600\text{ nm}) = a_{ART} \cdot S\left(\frac{g}{L}\right) + b_{ART} \quad (69)$$

A curva-padrão deve ser refeita para toda leva de DNS produzida, então foram necessárias duas curvas-padrão ao decorrer desse trabalho.

A Figura 60 mostra a aparência visual da curva-padrão obtida em uma análise DNS (a) e uma foto do espectrofotômetro SHIMADZU utilizado nas leituras de absorbância deste trabalho (b).



Figura 60: Gradiente de Cor de uma Curva Padrão DNS (a); Espectrofotômetro Shimadzu Utilizado nas Leituras de Absorbância (b). Fonte: O Autor

B.2. Método de Inversão da Sacarose por Hidrólise Ácida

1) Para a execução do método necessita-se preparar duas soluções: uma de Ácido Clorídrico a 1,3 mol/L e outra de Hidróxido de Sódio a 4 mol/L, que foram preparadas conforme descrito nos Apêndices A.5. e A.6., respectivamente;

2) Inseriu-se uma alíquota de 5 mL de solução que se desejou medir a concentração de ART em um balão volumétrico de 100 mL. Em sequência, em capela com exaustão ligada, adicionou-se com uma pipeta de vidro 25 mL de solução de Ácido Clorídrico 1,3 mol/L ao balão, homogeneizou-se o mesmo, tampou-se o balão com uma rolha perfurada e levou-se a banho agitado a 65 - 70°C por 15 minutos;

3) Retirou-se o balão do banho e resfriou-se em banho a temperatura ambiente. Então, inseriu-se com uso de pipeta de vidro 8 mL de solução de Hidróxido de Sódio 4 mol/L no balão, agitando-se o balão e resfriando em banho novamente. Colocou-se cerca de 10 mL das soluções de ácido e base em béqueres de 100 mL e quase encheu-se os mesmos com água destilada, de forma a ter soluções mais diluídas, e arranjou-se um conta-gotas para cada uma delas;

4) Calibrou-se o pHmetro com as soluções-tampão de pH 4 e 7, e em um béquer de 100 mL limpo, adicionou-se a solução do balão e leu-se o seu valor de pH. Com as soluções ácida e básica diluídas produzidas e com o auxílio dos conta-gotas, regulou-se o pH para estar entre 4,5 e 8 (de levemente ácido para praticamente neutro), mexendo com bastão de vidro a cada inserção de solução com conta-gotas e refazendo a leitura do pH. Com o pH devidamente ajustado, devolveu-se quantitativamente a solução para o mesmo balão onde se encontrava com auxílio de água destilada, tomando cuidado

para não estourar o volume do balão, e completou-se o volume do balão com água destilada, homogeneizando a solução. Tem-se então uma solução que sofreu uma diluição 1:20 até aqui;

5) Realizou-se as diluições adicionais que foram necessárias e utilizou-se a análise DNS (subitem 3.2.2.3.) para obter o valor da concentração de ART da amostra.

A Figura 61 mostra os balões com amostra de sobrenadante + ácido clorídrico inseridos em banho termostático para a hidrólise ácida (a); e a neutralização da acidez de uma amostra com auxílio de um pHmetro (b).



Figura 61: Método de Inversão por Hidrólise Ácida Aplicado em Série: Balões Imersos em Banho a 65 - 70°C (a); Neutralização de Acidez com Uso de pHmetro (b). Fonte: O Autor

B.3. Método de Inversão da Sacarose Utilizando Invertase

1) Transferiu-se uma alíquota de 0,5 mL de solução que se desejava obter a concentração de ART com pipeta automática para um tubo de ensaio limpo, em seguida inserindo-se 4,5 mL de água destilada;

2) Pesou-se em um béquer de 10 mL tarado uma massa de aproximadamente 0,0065 g de Invertase Novo Nordisk e transferiu-se quantitativamente essa massa para um balão volumétrico de 250 mL com auxílio de água destilada;

3) Adicionou-se ao balão volumétrico utilizando uma proveta um volume de 28,1 mL de tampão de acetato a pH 4.5, em seguida completando-se o balão com água destilada e homogeneizando-se o mesmo. Essa solução de invertase deve ser preparada e já imediatamente utilizada;

4) Adicionou-se um volume de 10 mL da solução de invertase do balão no tubo de ensaio com a solução que se desejava obter a concentração de ART, adicionou-se uma rolha perfurada ao tubo, agitou-se o mesmo em agitador vortex e deixou-se o mesmo mergulhado em banho termostático a 50°C por um período de duas horas. Fez-se uma diluição 1:30 até então;

5) Realizou-se as diluições adicionais necessárias e efetuou-se Análise DNS (subitem 3.2.2.3.) para obtenção da concentração de ART da amostra.

A Figura 62 mostra a solução de invertase preparada para realizar a inversão da amostra (a); e a amostra de sobrenadante que se deseja inverter a sacarose presente na mesma após a inserção da solução de invertase (b).

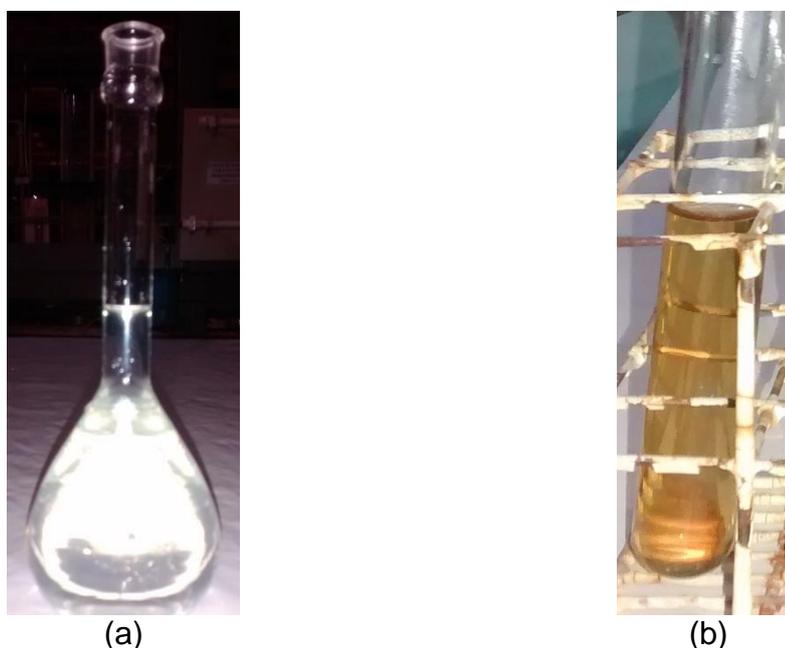


Figura 62: Solução de Invertase e Tampão de Acetato (a); Amostra que Passou pelo Método de Inversão da Sacarose Utilizando Invertase. Fonte: O Autor

B.4. Obtenção da Curva-Padrão de Concentração Celular

1) Pesou-se em béqueres as massas úmidas de 0,2012 g, 0,4000 g, 0,6016 g, 0,4000 g, 0,5005 g, 0,6003 g de Fermento Fresco;

2) Transferiu-se quantitativamente com o auxílio de água destilada a massa de fermento pesada para balões volumétricos, homogeneizando primeiramente com o balão parcialmente cheio e depois completando até o volume do balão com água destilada, sendo balões de dois litros para as três primeiras massas citadas e balões de um litro para as três últimas, gerando

soluções com concentrações aproximadas de 0,1 g/L, 0,2 g/L, 0,3 g/L, 0,4 g/L, 0,5 g/L e 0,6 g/L;

A Figura 63 mostra as soluções de levedura preparadas para a obtenção da curva-padrão de concentração celular.



Figura 63: Soluções de Levedura Utilizadas Para Obtenção da Curva-Padrão de Concentração Celular. Fonte: O Autor

3) Inseriu-se a solução dos balões em cubetas plásticas, agitando bem o balão antes da inserção (mesmo a baixas concentrações, a solução de levedura sofre efeito de decantação, que se tentou minimizar na medida do possível), e leu-se rapidamente a Absorbância em 610 nm em Espectrofotômetro Shimadzu, zerando a absorbância com água destilada. Como a leitura era direta e de fácil realização, fez-se a mesma em quadruplicata. Obtêm-se então uma curva-padrão que relaciona as leituras de Absorbância com as Concentrações Celulares Massa Úmida e com uma regressão linear é possível encontrar uma equação que correlacione essas duas grandezas físicas. Obtêm-se então a Equação 70.

$$Abs(610\text{ nm}) = a_{Cél} \cdot X_{MassaÚmida} \left(\frac{g}{L}\right) + b_{Cél} \quad (70)$$

B.5. Obtenção da Porcentagem de Massa Seca da Levedura Pelo Método Direto

1) Pesou-se as massas ($M_{BéqVazio}$) de nove béqueres identificados na balança;

2) Adicionou-se as massas ($M_{FermÚmido}$) de 3 gramas de Fermento Fresco nos três primeiros béqueres e de 5 gramas nos seis últimos;

3) Colocou-se os béqueres em estufa na temperatura de $105 \pm 2^\circ\text{C}$ e deixou-se os mesmos em seu interior por duas horas;

4) Retirou-se os béqueres utilizando uma pinça e colocou-se os mesmos rapidamente em um dessecador, lacrando-o e deixando-o sob vácuo com uso de bomba de vácuo para que resfriassem até a temperatura próxima a ambiente;

5) Retirou-se os béqueres com o fermento seco um a um do dessecador e pesou-se rapidamente em balança analítica as suas massas ($M_{BéqVazio+FermSeco}$);

Calculou-se a Porcentagem de Massa Seca ($\%_{MassaSecaDireto}$) com base nas Equações 71 e 72.

$$M_{FermSeco}(g) = M_{BéqVazio+FermSeco}(g) - M_{BéqVazio}(g) \quad (71)$$

$$\%_{MassaSecaDireto} = \left(\frac{M_{FermSeco}(g)}{M_{FermÚmido}(g)} \right) \cdot 100 \quad (72)$$

B.6. Obtenção da Porcentagem de Massa Seca da Levedura Pelo Método Com Microfiltração

1) Pesou-se onze vidros de relógio devidamente identificados com massa ($M_{VidroRel}$), tarou-se os mesmos e pesou-se em cada um deles um filtro Millipore de diâmetro de poro $1,2\mu\text{m}$ de massa ($M_{FiltroÚmido}$). Filtrou-se nove soluções onde se conhecia o valor de massa úmida de células ($M_{ÚmidaFiltrada}$), presente em cada uma utilizando os nove filtros Millipore, um para cada solução, colocando em seguida os filtros com levedura nos respectivos vidros de relógio em que haviam sido pesados. Para a execução desse método, foram utilizadas soluções que tinham sido empregadas anteriormente para obter a curva-padrão de concentração celular, soluções onde a concentração celular massa úmida ($X_{MassaÚmida}$) era conhecida. Pesou-se o balão volumétrico em que essas soluções se encontravam primeiramente vazio com massa

($M_{\text{BalãoVazio}}$) e pesou-se depois o balão cheio de solução de massa ($M_{\text{BalãoVazio+Solução}}$). Como as concentrações celulares eram sempre bastante baixas, considerou-se que ($\rho_{\text{Solução}} = \rho_{\text{Água}} = 1000 \text{ g/L}$). Com isso, é possível obter o volume microfiltrado ($V_{\text{Microfiltrado}}$) e em seguida obter o valor de ($M_{\text{ÚmidaFiltrada}}$) pelas Equações 73, 74 e 75.

$$M_{\text{Solução}} (g) = M_{\text{BalãoVazio+Solução}} (g) - M_{\text{BalãoVazio}} (g) \quad (73)$$

$$V_{\text{Microfiltrado}} (L) = \frac{M_{\text{Solução}} (g)}{\rho_{\text{Solução}} \left(\frac{g}{L}\right)} \quad (74)$$

$$M_{\text{ÚmidaFiltrada}} (g) = X_{\text{MassaÚmida}} \left(\frac{g}{L}\right) \cdot V_{\text{Microfiltrado}} (L) \quad (75)$$

2) Colocou-se os vidros de relógio com filtro em estufa na temperatura de $105 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ por um período de 2 horas;

3) Retirou-se os vidros de relógio utilizando uma pinça e colocou-se os mesmos rapidamente em um dessecador, lacrando-o e deixando-o sob vácuo com uso de bomba de vácuo para que resfriassem até a temperatura próxima a ambiente;

4) Retirou-se os vidros de relógio com o filtro e o fermento seco dentro um a um do dessecador e pesou-se rapidamente em balança analítica as suas massas ($M_{\text{VidroRel+FiltroSeco}}$) para os dois filtros onde não se filtrou e ($M_{\text{VidroRel+FiltroSeco+SecaFiltrada}}$) para os nove filtros em que se filtrou solução de levedura. Calculou-se a porcentagem de massa seca dos filtros ($\%_{\text{MassaSecaFiltro}}$) pelas Equações 76 e 77 com base nos dois filtros onde não houve filtração, utilizando a média dos dois valores nos cálculos posteriores.

$$M_{\text{FiltroSeco}} (g) = M_{\text{VidroRel+FiltroSeco}} (g) - M_{\text{VidroRel}} (g) \quad (76)$$

$$\%_{\text{MassaSecaFiltro}} = \left(\frac{M_{\text{FiltroSeco}} (g)}{M_{\text{FiltroÚmido}} (g)} \right) \cdot 100 \quad (77)$$

Para o cálculo da porcentagem de massa seca de levedura ($\%_{\text{MassaSecaMicrof.}}$), foram utilizadas as Equações 78, 79 e 80. Utilizou-se a média das nove amostras para os cálculos de Concentração Celular Massa Seca analisados nesse trabalho.

$$M_{\text{FiltroSeco}}(g) = \left(\frac{\% \text{MassaSecaFiltro}}{100} \right) \cdot M_{\text{FiltroÚmido}}(g) \quad (78)$$

$$M_{\text{SecaFiltrada}}(g) = M_{\text{VidroRel+FiltroSeco+SecaFiltrada}}(g) - M_{\text{VidroRel}}(g) - M_{\text{FiltroSeco}}(g) \quad (79)$$

$$\% \text{MassaSecaMicrof.} = \left(\frac{M_{\text{SecaFiltrada}}(g)}{M_{\text{ÚmidaFiltrada}}(g)} \right) \cdot 100 \quad (80)$$

A Figura 64 mostra o aspecto visual da levedura após a secagem em estufa pelo método direto (a) e pelo método com microfiltração (b) e o equipamento utilizado para realizar a microfiltração (c).

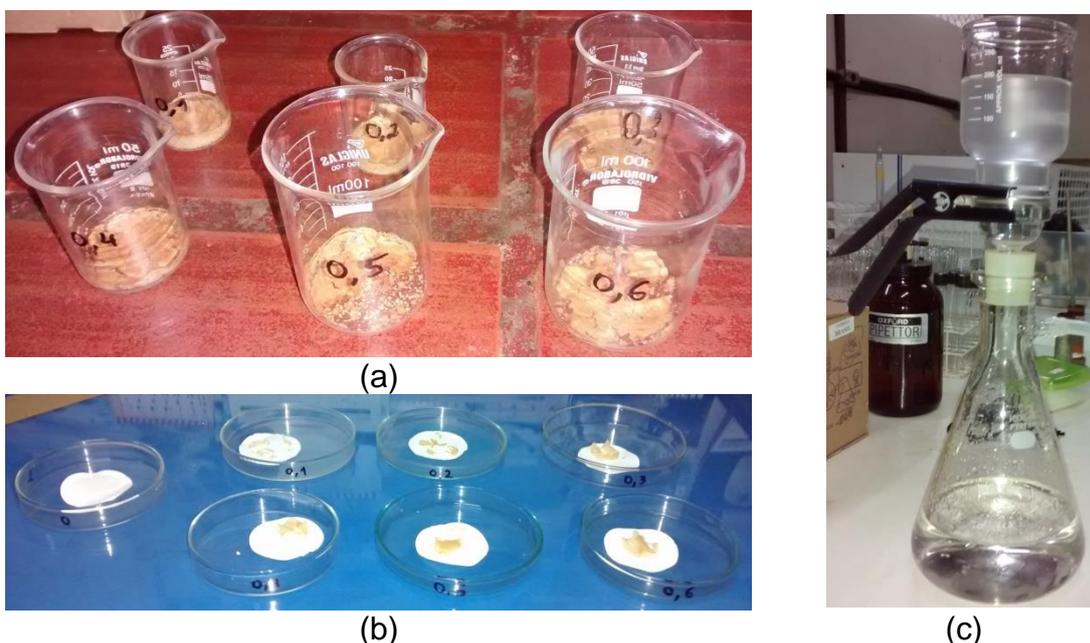


Figura 64: Levedura Seca em Estufa pelo Método Direto (a); e pelo Método com Microfiltração (b); e Equipamento Utilizado para Microfiltração (c). Fonte: O Autor

B.7. Metodologia de Realização da Microdestilação

1) Ligou-se a água de refrigeração do microdestilador, que deve ficar aberta durante todo o processo de destilação. Com as válvulas de admissão e de exaustão fechadas, encheu-se de água destilada o recipiente acima da válvula de admissão e ligou-se a caldeira com o botão de giro posto entre o 6 e o 7 até a fervura da água da caldeira;

2) Abriu-se a válvula de admissão, fechando-a quando toda a água entrou no equipamento, com o intuito de limpar a solução com etanol que foi anteriormente destilada. Inseriu-se 10 mL de solução que se desejou obter a

concentração de etanol no recipiente acima da válvula de admissão, e após um curto tempo de fervura da água inserida no microdestilador, desligou-se a caldeira, esperou-se a solução regredir dos pratos para o fervedor, e abriu-se a válvula de exaustão até a eliminação da água, fechando-a em seguida;

3) Ligou-se novamente a caldeira entre o 6 e o 7, e na fervura da mesma, admitiu-se a amostra de concentração de etanol desconhecida, lavando-se com um pissete com água destilada o recipiente acima da válvula (para inserção quantitativa da amostra) e fechando a válvula rapidamente;

4) Deixou-se a amostra ferver e coletou-se na saída do microdestilador um volume de 10 mL de amostra com uma proveta, colocando a solução em um tubo com tampa de rosca e congelando-o em freezer até a leitura da concentração em cromatografia gasosa. Desligou-se a caldeira, esperou-se a amostra descer dos pratos para o fervedor e abriu-se a válvula de exaustão até a eliminação da amostra, fechando-a novamente em seguida. Não se deve demorar para ejetar a amostra uma vez que se desligou a caldeira, pois ocorre da amostra ser derramada sobre a água da caldeira, contaminando-a e sendo necessário trocar a água destilada da mesma.

B.8. Metodologia de Realização da Cromatografia a Gás

1) Abriu-se completamente a válvula na parte superior do cilindro de hélio que operará como gás de arraste no cromatógrafo, em seguida abriu-se a válvula diafragma preta até a marca negra no manômetro a fim de controlar a pressão de entrada do hélio no cromatógrafo, e por fim abriu-se completamente a válvula vermelha de admissão do gás no cromatógrafo;

2) Ligou-se pelas chaves na parte de trás o estabilizador e o cromatógrafo, ligou-se também o computador anexo ao equipamento. No cromatógrafo, clicou-se em “Reset” e depois “Status”. Esperou-se até que o detector atingisse a temperatura de 150°C e a luz vermelha “Not Ready” passasse para a luz verde “Ready”. Olhou-se as pressões nos manômetros no cromatógrafo, que devem estar próximas a 20 no manômetro superior e próximas a 10 no inferior;

A Figura 65 apresenta fotos tiradas do microdestilador (a) e da cromatografia gasosa (b) utilizados na realização dessa dissertação.



(a)



(b)

Figura 65: Microdestilador (a); Cromatógrafo à Gás (b). Fonte: O Autor

3) Para ligar o detector do cromatógrafo, clicou-se no botão “GC Configure”, clicou-se o botão “Enter” quatro vezes até a pergunta “Turn the Detector On/Off?”, clicou-se o número quatro “Yes” e em seguida “Enter”, surgindo a opção “Detector A On?”, onde também clicou-se “Yes” e “Enter”, com isso ligou-se o detector A que vai ser utilizado. Clicou-se “Status” para voltar às temperaturas da coluna, do detector, entre outros;

4) Descongelou-se a amostra de etanol em banho de água a temperatura ambiente somente momentos antes da leitura na cromatografia, agitando-se em agitador vórtex rapidamente para homogeneizar mas não promover evaporação do etanol. Abriu-se no computador na Barra de Tarefas o ícone de um computador maior com três computadorezinhos em cima, que é o software de interação computador/cromatógrafo;

5) Com uma pipeta graduada de 5 microlitros da marca Hamilton, encheu-se a pipeta com a amostra de etanol e eliminou-se por dez vezes, de modo a lavar a pipeta com a amostra. Pegou-se então com a pipeta uma alíquota de 1 microlitro de amostra, clicou-se no software do cromatógrafo do

computador no ícone de um frasco de tampa vermelha com uma flecha negra à esquerda apontada para ele, identificou-se a amostra e clicou-se em “Inserir”;

6) Com a luz verde e a indicação “Ready” no cromatógrafo e com a troca das palavras vermelhas “Not Ready” para a palavra amarela “Waiting” no software do cromatógrafo, insere-se a pipeta no injetor no topo do cromatógrafo indicado como “B” porém sem apertá-lo, e então injeta-se a amostra em um pulso, apertando o injetor para baixo e iniciando a cromatografia;

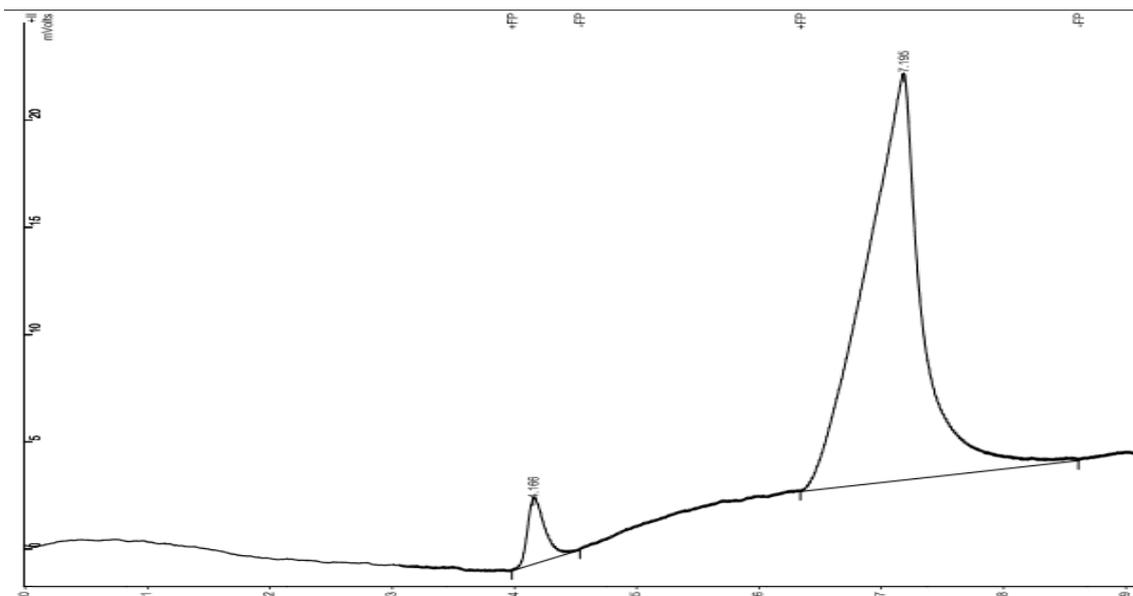
7) Após o término da cromatografia (que leva 10 minutos por amostra), é necessário esperar até que a coluna se resfrie de 90°C para 30°C novamente até que se possa injetar uma nova amostra, com o equipamento trocando de “Not Ready” para “Ready” quando pronto para a próxima injeção. Ao fim do uso do equipamento, com o mesmo na posição “Ready”, deve-se primeiramente desligar o detector antes de desligá-lo, fechando após isso as válvulas de hélio;

8) Para obter a concentração de etanol com o resultado obtido da cromatografia, utiliza-se um elemento complementar do software da cromatografia presente no computador anexo a mesma. Para abrir o software, clica-se na Barra de Tarefas em um ícone que apresenta um gráfico bimodal azul, e já dentro do programa, abre-se o arquivo salvo do resultado da análise cromatográfica, que nesse trabalho se mostra sempre como dois picos em uma linha base, que caracterizam o etanol e a água presentes na amostra analisada;

9) Clicando com o botão direito do mouse na faixa branca logo abaixo da zona negra com a linha resultante da cromatografia, surgem diversas opções. Primeiramente escolhe-se “Adicionar Faixa de Inibição”, surgindo uma linha verde na faixa branca, que deve ter as flechas de amplitude puxadas de forma a cobrir toda a faixa, com isso eliminando toda a identificação de picos, incluindo os pequenos picos de ruído da cromatografia. Então insere-se a opção “Adicionar Pico Forçado” duas vezes, surgindo duas linhas vermelhas na faixa branca, e essas duas linhas vermelhas devem ter as flechas de amplitude colocadas de forma a delimitar da melhor forma possível os picos de etanol e água;

10) Toda vez que se mexer nas flechas de amplitude vermelhas, deve-se clicar no ícone com um símbolo de integral que existe na barra de tarefas superior do software entre outros dois ícones com basicamente o mesmo símbolo. Com os picos delimitados pelas linhas vermelhas, surge na parte inferior dos picos linhas que devem se apresentar de forma a seguir a linha base da melhor forma possível, criando uma área fechada entre os picos e a linha base. O programa é capaz de calcular essas áreas do etanol e da água por integração, e com base nessas áreas é possível saber a concentração de etanol na solução;

11) Para se obter o valor dessas áreas, clica-se com o botão direito do mouse na área escura com a linha da cromatografia, e seleciona-se a opção "Print Standard", salvando as duas páginas de resultados com nomes diferentes, sendo a primeira página o resultado gráfico da linha cromatográfica e da delimitação dos picos e a segunda página o resultado do cálculo das áreas dos picos de etanol (A_{Etanol}) e água ($A_{\text{Água}}$). A Figura 66 mostra como é apresentado um cromatograma gráfico típico e como se observam os valores de áreas de etanol e água nas páginas produzidas pelo software.



(a)

Peak No.	Peak Name	Result (%)	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes
1		4.7026	4.166	0.000	30320	BB	9.8	
2		95.2974	7.195	0.000	614425	BB	27.4	
Totals:		100.0000		0.000	644745			

(b)

Figura 66: Representação de um Cromatograma Típico (a); Valores das Áreas de Etanol e Água Calculados pelo Software para o Cromatograma (b)

Apêndice C – Figuras e Tabelas de Curvas-Padrão e Análise de Parâmetros Operacionais

C.1. Curva Padrão da Análise DNS

Tabela 44: Relação da Concentração de Glicose + Frutose com a Medida de Absorbância Obtida pela Análise DNS Para o 1º Lote de Reagente

Concentração de Glicose + Frutose (g/L)	Medida de Absorbância 1	Medida de Absorbância 2	Medida de Absorbância Média
0	0,0000	-0,0083	-0,0042
0,1	0,0083	0,0092	0,0088
0,2	0,0654	0,0596	0,0625
0,3	0,1025	0,1121	0,1073
0,4	0,1670	0,1733	0,1702
0,5	0,2218	0,2180	0,2199
0,6	0,2695	0,2678	0,2687
0,7	0,3175	0,3208	0,3192
0,8	0,3628	0,3779	0,3704
0,9	0,4039	0,4211	0,4125
1	0,4570	0,4506	0,4538

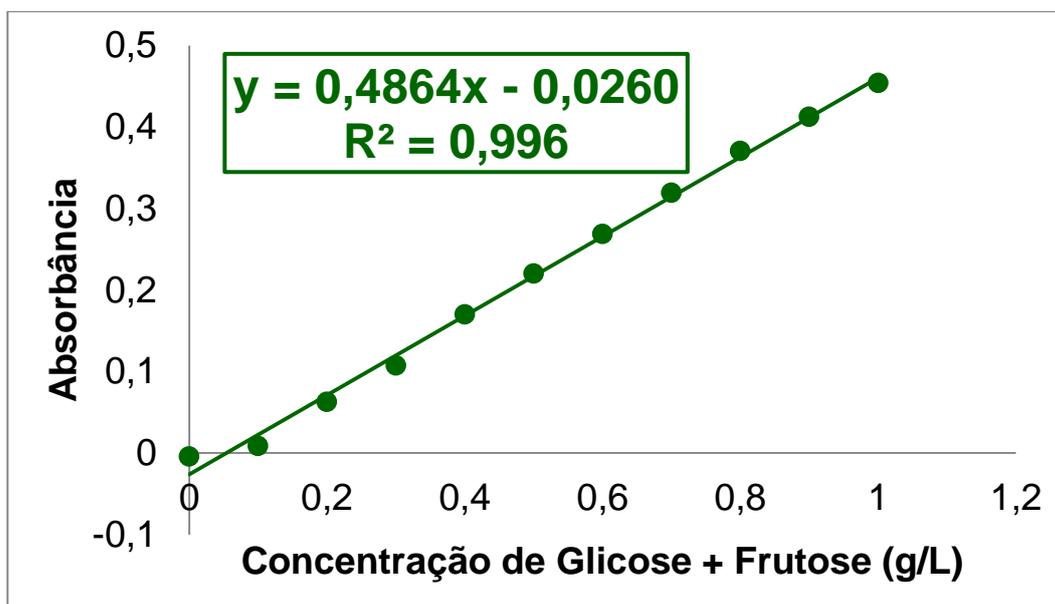


Figura 67: Ajuste da Curva Padrão da Análise DNS para a 1º Lote de Reagente

Tabela 45: Relação da Concentração de Glicose + Frutose com a Medida de Absorbância Obtida pela Análise DNS Para o 2º Lote de Reagente

Concentração de Glicose + Frutose (g/L)	Medida de Absorbância 1	Medida de Absorbância 2	Medida de Absorbância Média
0	0,0000	0,0009	0,0005
0,1	0,0273	0,0199	0,0236
0,2	0,0588	0,0614	0,0601
0,3	0,1202	0,1171	0,1187
0,4	0,1588	0,1542	0,1565
0,5	0,2113	0,2012	0,2063
0,6	0,2504	0,2637	0,2571
0,7	0,3114	0,3075	0,3095
0,8	0,3577	0,3451	0,3514
0,9	0,4114	0,3970	0,4042
1	0,4568	0,4465	0,4517

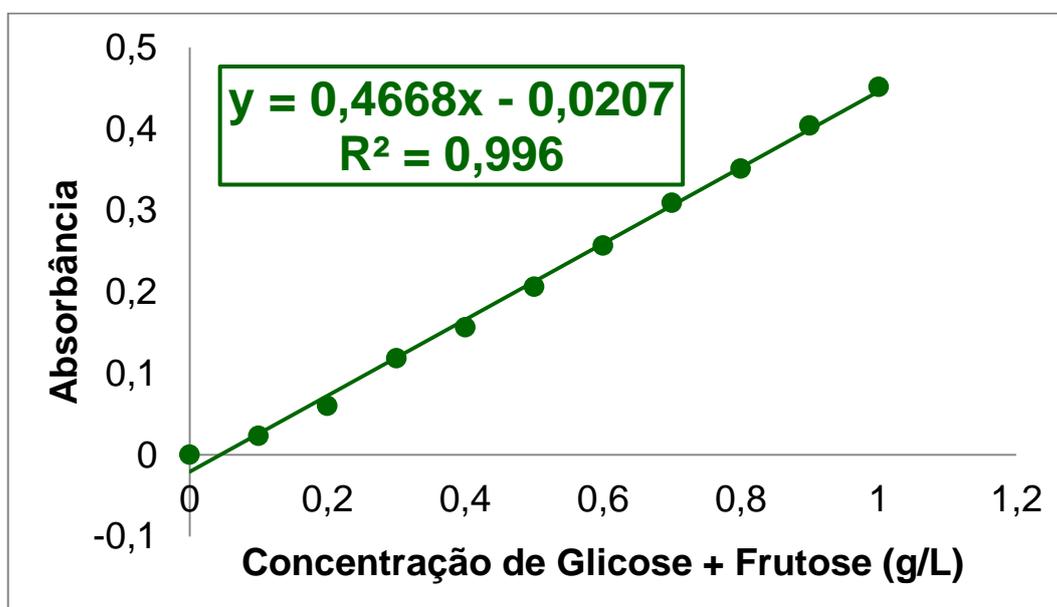


Figura 68: Ajuste da Curva Padrão da Análise DNS para a 2ª Lote de Reagente

C.2. Teste Comparativo dos Métodos de Inversão por Hidrólise Ácida e por Invertase

Tabela 46: Valores de Concentração de ART Após a Inversão por Hidrólise Ácida e por Invertase

Amostra	Concentração Hidrólise Ácida (g/L)	Concentração Invertase (g/L)
1	354,5	371,8
2	359,6	365,3
3	343,8	372,1
4	354,4	391,9
5	345,2	380,3
6	369,1	376,5
7	354,3	382,4
8	361,1	375,3
9	368,0	386,6
10	357,7	386,8
Média ± Desvio Padrão	356,8 ± 8,4	378,9 ± 8,2
Valor Teórico Pesado (g/L)	368,4	

C.3. Curva Padrão da Concentração Celular

Tabela 47: Relação da Concentração Celular com a Medida de Absorbância Obtida por Leitura no Espectrofotômetro

Concentração Celular Massa Úmida (g/L)	Absorbância Medida 1	Absorbância Medida 2	Absorbância Medida 3	Absorbância Medida 4	Absorbância Média
0,0000	0,0000	0,0068	0,0026	0,0001	0,0024
0,1006	0,1122	0,1188	0,1139	0,1227	0,1169
0,2000	0,2358	0,2285	0,2366	0,2393	0,2351
0,3008	0,3242	0,3360	0,3419	0,3402	0,3356
0,4000	0,4340	0,4606	0,4301	0,4680	0,4482
0,5005	0,5419	0,5177	0,5692	0,5853	0,5535
0,6003	0,6703	0,6626	0,6716	0,6318	0,6591

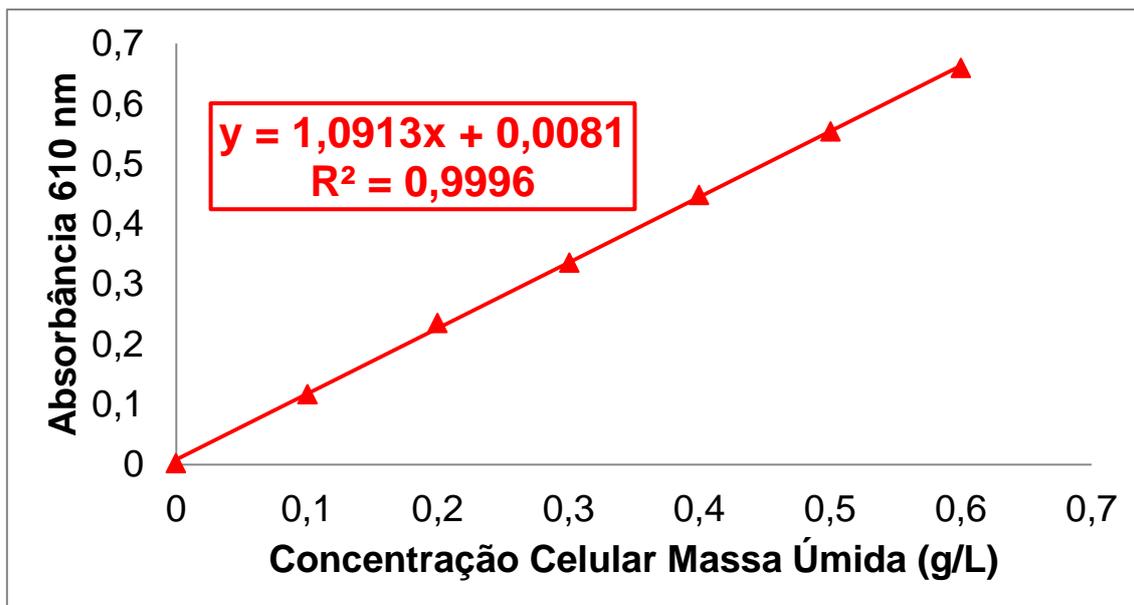


Figura 69: Ajuste da Curva Padrão de Massa Celular

C.4. Cálculo da Porcentagem de Massa Seca – Método Direto

Tabela 48: Cálculo da Porcentagem de Massa Seca Pelo Método Direto

Béquer	$M_{\text{BéqVazio}}$	$M_{\text{FermÚmido}}$	$M_{\text{BéqVazio+FermSeco}}$	M_{FermSeco}	%MassaSecaDireto
1	17,3020	3,0070	18,2500	0,9480	31,5
2	17,4160	2,9990	18,3925	0,9765	32,6
3	15,7850	3,0030	16,7255	0,9405	31,3
4	19,8791	5,0752	21,5015	1,6224	32,0
5	17,2398	5,1036	18,9005	1,6607	32,5
6	29,2496	5,0165	30,8427	1,5931	31,8
7	36,5352	4,9930	38,1253	1,5901	31,9
8	50,6017	5,0122	52,1880	1,5863	31,7
9	55,6610	5,0215	57,2413	1,5803	31,5
Média ± Desvio Padrão					31,9 ± 0,443

Unidades: ($M_{\text{BéqVazio}}$), ($M_{\text{FermÚmido}}$), ($M_{\text{BéqVazio+FermSeco}}$) e (M_{FermSeco}) em g.

C.5. Cálculo da Porcentagem de Massa Seca – Método com Microfiltração

Tabela 49: Cálculo da Massa Úmida Microfiltrada

Balão	$M_{\text{BalãoVazio}}$	$M_{\text{BalãoVazio+Solução}}$	$V_{\text{Microfiltrado}}$	$X_{\text{MassaÚmida}}$	$M_{\text{ÚmidaFiltrada}}$
1	370,33	1318,30	0,9480	0,8001	0,7585
2	266,76	1212,36	0,9456	1,0001	0,9457
3	338,46	792,44	0,4540	1,2006	0,5450
4	648,57	1519,49	0,8709	0,1006	0,0876
5	531,90	1469,80	0,9379	0,2000	0,1876
6	387,74	1194,27	0,8065	0,3008	0,2426
7	346,75	1263,43	0,9167	0,4000	0,3667
8	312,94	1218,41	0,9055	0,5005	0,4532
9	227,48	1127,94	0,9005	0,6003	0,5405

Unidades: ($M_{\text{BalãoVazio}}$), ($M_{\text{BalãoVazio+Solução}}$) e ($M_{\text{ÚmidaFiltrada}}$) em g; ($V_{\text{Microfiltrado}}$) em L; ($X_{\text{MassaÚmida}}$) em g/L.

Tabela 50: Cálculo da Massa Seca da Membrana

Massas	Membrana 1	Membrana 2
M_{VidroRel}	33,4859	38,2979
$M_{\text{FiltroÚmido}}$	0,0753	0,0644
$M_{\text{VidroRel+FiltroSeco}}$	33,5601	38,3617
$M_{\text{FiltroSeco}}$	0,0742	0,0638
% $M_{\text{MassaSecaFiltro}}$	98,5	99,1
Média	98,8	

Unidades: (M_{VidroRel}), ($M_{\text{FiltroÚmido}}$), ($M_{\text{VidroRel+FiltroSeco}}$) e ($M_{\text{FiltroSeco}}$) em g.

Tabela 51: Cálculo da Porcentagem de Massa Seca Pelo Método com Microfiltração

Balão	M_{VidroRel}	$M_{\text{FiltroÚmido}}$	$M_{\text{FiltroSeco}}$	$M_{\text{VidroRel+FiltroSeco+SecaFiltrada}}$	$M_{\text{SecaFiltra}}$	% $M_{\text{MassaSecaMicrof.}}$
1	33,6404	0,0669	0,0661	33,9220	0,2155	28,4
2	30,8521	0,0676	0,0668	31,2009	0,2820	29,8
3	33,5342	0,0539	0,0533	33,7472	0,1597	29,3
4	48,8003	0,0595	0,0588	48,8863	0,0272	31,1
5	45,0114	0,0646	0,0638	45,1300	0,0548	29,2
6	41,3096	0,0565	0,0558	41,4376	0,0722	29,8
7	33,3942	0,0599	0,0592	33,5673	0,1139	31,1
8	58,7012	0,0633	0,0625	58,9003	0,1366	30,1
9	51,1716	0,0666	0,0658	51,4044	0,1670	30,9
Média						30,0 ± 0,922

Unidades: (M_{VidroRel}), ($M_{\text{FiltroÚmido}}$), ($M_{\text{FiltroSeco}}$), ($M_{\text{VidroRel+FiltroSeco+SecaFiltrada}}$) e ($M_{\text{SecaFiltrada}}$) em g.

C.6. Teste da Precisão da Cromatografia Gasosa e da Eficiência da Destilação

Tabela 52: Cálculo da Precisão da Cromatografia Gasosa e Eficiência do Microdestilador

Precisão da Cromatografia Gasosa								
$P_{\text{Pesada}}^{\text{Teórica}}$	A_{Etanol}	$A_{\text{Água}}$	AC_{Etanol}	$AC_{\text{Água}}$	$\%_{\text{MásEt}}$	$\rho_{\text{SolEtanol}}$	$P_{\text{Cromat}}^{\text{Exp.}\bar{N}\text{Dest}}$	$\%_{\text{ErroCrom}}$
24	24712	1153300	15816	634315	0,0243	0,9935	24,17	0,71
48	21180	525705	13555	289138	0,0448	0,9882	44,25	7,8
72	65451	909845	41889	500415	0,0772	0,9798	75,68	5,1
96	58938	583284	37720	320806	0,1052	0,9726	102,33	6,6
120	84352	698525	53985	384189	0,1232	0,9681	119,28	0,60
Média \pm Desvio Padrão								4,2 \pm 3,4
Eficiência da Destilação								
$P_{\text{Pesada}}^{\text{Teórica}}$	A_{Etanol}	$A_{\text{Água}}$	AC_{Etanol}	$AC_{\text{Água}}$	$\%_{\text{MásEt}}$	$\rho_{\text{SolEtanol}}$	$P_{\text{Cromat}}^{\text{Exp.}\text{Dest}}$	η_{Dest}
24	21810	1133900	13958	623645	0,0219	0,9942	21,76	90,7
48	26346	662742	16861	364508	0,0442	0,9883	43,70	91,0
72	55123	934318	35279	513875	0,0642	0,9831	63,16	87,7
96	35901	428762	22977	235819	0,0888	0,9768	86,72	90,3
120	58697	573811	37566	315596	0,1064	0,9723	103,43	86,2
Média \pm Desvio Padrão								89,2 \pm 2,13

Unidades: ($P_{\text{Pesada}}^{\text{Teórica}}$), ($P_{\text{Cromat}}^{\text{Exp.}\bar{N}\text{Dest}}$) e ($P_{\text{Cromat}}^{\text{Exp.}\text{Dest}}$) em g Etanol/ L Solução; ($\rho_{\text{SolEtanol}}$) em g Solução/ mL de Solução.

