

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

**ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE MEL INVERTIDO
E MEL INVERTIDO E CLARIFICADO.**

Mestrando: Rafael Xavier Lopes de Mendonça

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Olivo

Co-Orientador: Prof. Dr. Daniel Tait Vareschini

MARINGÁ, 2018

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

**ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE MEL INVERTIDO
E MEL INVERTIDO E CLARIFICADO.**

Rafael Xavier Lopes de Mendonça

Eng. Químico, UEM, 2016

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Olivo

Co-Orientador: Prof. Dr. Daniel Tait Vareschini

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, 2018

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

M539e Mendonça, Rafael Xavier Lopes de
Estudo cinético da fermentação alcoólica de mel invertido e mel invertido e clarificado / Rafael Xavier Lopes de Mendonça. -- Maringá, 2018.
118 f. : il. (algumas color.)

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Olivo.
Coorientador: Prof. Dr. Daniel Tait Vareschini.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2018.

1. Fermentação alcoólica. 2. Melaço de cana-de-açúcar. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Clarificação do melaço. 5. Regime descontínuo alimentado. 6. Regime descontínuo. I. Olivo, José Eduardo, orient. II. Vareschini, Daniel Tait, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

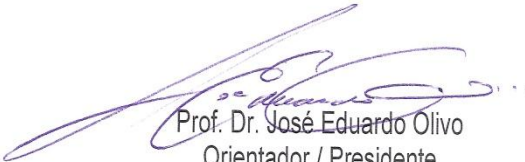
CDD 23.ed. 660.28449

Sintique Raquel de C. Eleuterio - CRB 9/1641

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 Rafael Xavier Lopes de Mendonça perante a Comissão Julgadora do Curso de Mestrado em Engenharia Química em 08 de novembro de 2018.

COMISSÃO JULGADORA



Prof. Dr. José Eduardo Olivo
Orientador / Presidente



Prof.ª Dr.ª Gisella Maria Zanin
Membro



Prof.ª Dr.ª Rita de Cássia Bergamasco
Membro

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, por me permitir a realização desta nova etapa da minha vida, e me fazer superar as dificuldades que surgiram no meio do caminho.

À minha mãe, Fátima Lopes, que durante esta conturbada época, em que foi a realização desse mestrado, sempre se mostrou firme e resiliente para me apoiar nos momentos onde eu já não encontrava forças para poder seguir em frente; Ao meu pai, Milton Xavier (in memoriam), cuja honestidade sempre foi à virtude mais notória em sua grande passagem pela vida, me ensinando sempre a ser correto e fiel aos meus preceitos, além é claro, de ser o maior incentivador de iniciar uma formação superior; Ao meu irmão, Gabriel Xavier, que sempre foi meu melhor amigo e companheiro, sua fé em mim sempre me motivou a ser um irmão e uma pessoa melhor para o mundo; À Maria Catarina, minha namorada e companheira, que é a minha luz nesse caminho, sempre me incentivando e proporcionando força durante toda esta caminhada, sendo ela, o motivo de me fazer voltar aos estudos e a concluir o mestrado, sendo meu suporte nos momentos em que mais pensava em desistir; E por fim, todos os familiares, que de forma indireta, me deram forças para permanecer em pé durante esse percurso.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Olivo, por toda a orientação e ajuda recebida para o desenvolvimento deste trabalho, além, nestes meses, ter sido como um pai, sempre me ajudando tanto na vida acadêmica, quanto na pessoal. Além de encontrar tempo para sanar todas as minhas dúvidas durante este período.

A todos os outros professores e colaboradores, por todo o auxílio que me proporcionaram para a realização do mestrado, em especial; À Márcia Galvão, que sempre contribuiu para a conclusão desta etapa da vida; à banca examinadora, que concederam seu tempo; Ao Fernando Henrique Silva, João Victor Bueno e Emanuel Souza Barros, pelo auxílio que seus trabalhos proporcionaram no desenvolvimento dessa dissertação; aos técnicos dos laboratórios, em especial a Luiza P. V. Calsavara, por toda a ajuda recebida nas diversas etapas experimentais realizadas; Ao Victor Henrique, que me ajudou na realização de vários ensaios experimentais; E ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química por possibilitar a produção deste trabalho.

Aos Médicos, Doutora Márcia Llorente Xavier e ao Doutor Fábio Toshio Kakitani que me acompanharam e estiveram sempre à minha disposição.

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

Glossário

AR – Açúcares Redutores (Glicose e Frutose);

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;

Clarificação – Processo de pré-tratamento do mel invertido, antes do processo fermentativo;

Mel Invertido e Clarificado - Mel que passou pelo processo de inversão completa da Sacarose presente em si e posteriormente pelo processo de tratamento;

Método DNS – Método utilizado para determinação da concentração de ART de uma determinada amostra;

X – Concentração Celular. Dado em [g/L];

S – Concentração de Substrato, em Açúcares Redutores. Dado em [g/L];

Etanol – Concentração de Produto (etanol). Dado em [g/L];

Rendimento Percentual em Etanol (η) – Porcentagem de conversão mássica de ART em Etanol. Dado em (%)

Velocidade de Consumo do Substrato (r_s), Produção de Produto (r_p) e Crescimento Celular (r_x) – Velocidades em que o microrganismo consome ART, produz etanol e se multiplica. Dada em [g (ART, Etanol, Células)/L.min];

Velocidades Específicas de Consumo do Substrato (μ_s), Produção de Produto (μ_p) e Crescimento Celular (μ_x) – Velocidades Específicas em que o microrganismo consome ART, produz etanol e se multiplica. Dada em [g (ART, Etanol, Células)/min];

Fatores de Conversão do Substrato em Produto ($Y_{P/S}$) e em Células ($Y_{X/S}$) – Frações mássicas do consumo de ART pelo microrganismo que são convertidas em Etanol e em Células. Dado em [g(Etanol, Células)/ g ART];

Resumo

Desde o início do século XX, o Brasil já usava o álcool produzido, a partir da cana-de-açúcar, como fonte de energia alternativa. Em 1931, o etanol de cana passou a ser oficialmente misturado à gasolina, que era importada. Apenas em 1975, com o lançamento do Proálcool, que o governo criou as condições necessárias para uso de bicombustíveis.

Neste contexto e movido pelo interesse industrial o presente trabalho tem por objetivo, o estudo cinético das fermentações utilizando mel invertido não clarificado e mel invertido clarificado de cana-de-açúcar, comparando o rendimento do álcool e o consumo de açúcares, em regimes descontínuos e descontínuos alimentados, com ou sem a clarificação prévia do mel. Assim, também se avaliaram os diferentes agentes de clarificação, diferentes regimes de operações, comportamento celular em alta concentração inicial de inóculo, bem como algumas variáveis que afetam os parâmetros cinéticos. Além das velocidades específicas e volumétricas, bem como os fatores de conversão e rendimento do substrato e do produto principal formado, o etanol. Também se verificou a variação do pH, e o desprendimento de gás carbônico durante as fermentações. Utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* como inóculo, com concentrações celulares inicial variando entre 10g/L e 20g/L em massa seca. Todos os ensaios foram realizados em banho térmico a 32°C, sem controle sob o pH inicial. Utilizou-se, biorreatores, na forma kitassatos, com volume útil de até um litro. As concentrações iniciais de substrato estudadas se situaram na faixa de 20 g/L a 150 g/L, de açúcares redutores (AR), tanto em meios constituídos de méis invertidos e não clarificados, por ação da enzima Invertase, quanto em meios constituídos de méis invertidos e clarificados por polímero aniônico de alumínio (PAC). Nos ensaios realizados, coletaram-se amostras, em tempos pré-determinado, e procederam-se as análises das concentrações de Açúcares Redutores (AR), de Etanol (P) e das Células (X) respectivamente pelos métodos, DNS, de micro destilação, seguida de análise em cromatografia gasosa e de espectrofotometria. Com isso foi possível analisar as velocidades de consumo do substrato, produção de etanol, bem como os fatores de conversão do substrato em produto ($Y_{P/S}$). Dos diversos ensaios realizados, observou-se rendimentos máximos da ordem de (72% a

78% do rendimento teórico) para os ensaios descontínuos com mel invertido e de até 84%, para os ensaios com meios constituídos de méis invertidos e clarificados. Já para os ensaios conduzidos de maneira descontínuos alimentado, obtiveram-se resultados de até, 94%, do rendimento teórico com méis invertidos e clarificados. Podendo assim concluir que os procedimentos experimentais adotados, tanto de clarificação quanto na maneira de se conduzir o processo fermentativo, possibilitaram uma melhoria no rendimento alcoólico em escala laboratorial.

Palavras-Chave: Clarificação do melaço. Polímero aniônico de alumínio (PAC). Fermentação alcoólica. *Saccharomyces cerevisiae*. Regime descontínuo. Regime descontínuo alimentado. Melaço de cana-de-açúcar

Abstract

Since the beginning of the 20th century, Brazil had already used alcohol produced from sugar cane as an alternative energy source. In 1931, cane ethanol was officially mixed with gasoline, which was imported. Only in 1975, with the launch of Proálcool, that the government created the necessary conditions for the use of biofuels.

In this context, the objective of this study was to study the kinetics of fermentations using inverted honey and clarified inverted honey from sugarcane, comparing the yield of alcohol and the consumption of sugars in discontinuous and discontinuous regimes fed, with and without prior clarification of honey. Thus, different clarification agents, different operating regimes, cellular behavior at high initial concentration of inoculum, as well as some variables that affect kinetic parameters were also evaluated. In addition to the specific and volumetric speeds. As well as the conversion factors and yield of the substrate and the main product formed, ethanol. Also the variation of the pH, and the evolution of carbonic gas during the fermentations were verified. *Saccharomyces cerevisiae* yeast was used as the inoculum, with initial cell concentrations ranging from 10 g/L to 20 g/L in dry mass. All the tests were performed in a thermal bath at 32°C, without control under the initial pH. Bioreactors were used in the kitassate form with a useful volume of up to one liter. The initial concentrations of substrate studied were in the range of 20 g/L to 150 g/L, reducing sugars (RA), both in media constituted of inverted and unclarified honeys by the enzyme Invertase, as well as in media consisting of inverted and clarified by anionic aluminum polymer (PAC). In the experiments, samples were collected at predetermined times and the concentrations of Reducing Sugars (RA), Ethanol (P) and Cells (X) respectively were analyzed by the methods, DNS, micro distillation, followed by analysis in gas chromatography and spectrophotometry. With this, it was possible to analyze the substrate consumption rates, ethanol production, as well as the conversion factors of the substrate into product ($Y_{P/S}$). From the various tests performed, maximum yields of the order of (72% to 78% of theoretical yield) were observed for the discontinuous tests with inverted honey and up to 84% for the tests with means constituted of clarified inverted honeys. Already for the discontinuously

conducted experiments fed, results of up to 94% of the theoretical yield with clarified inverted honey were obtained. Thus, it was concluded that the experimental procedures adopted, both for clarification and the way of conducting the fermentation process, allowed an improvement in the alcoholic yield on a laboratory scale.

Keywords: Clarification of molasses. Anionic aluminum polymer (PAC). Alcoholic fermentation. *Saccharomyces cerevisiae*. Discontinuous regime. Powered batch mode. Sugar cane molasses

Lista de Figuras

Figura 1 - Modelo elétrico da camada dupla de uma superfície de partícula com carga negativa (FONTE: Adaptado de QMCUEB, 2006, apud CHAO, 2006). ...	8
Figura 2 - Processo de fermentação descontínua alimentada (FONTE: Adaptado de VAZ <i>et al.</i> , 2016).	18
Figura 3 - Influência da temperatura na fermentação alcoólica (FONTE: Adaptado de PHISALAPHONG, SRIRATTANA e TANTHAPNAICHAKOON, 2006).	20
Figura 4 - Rendimento fermentativo em função da alimentação do biorreator (FONTE: Adaptado de MARTINEZ, 2007).	22
Figura 5 - Variação das concentrações de células, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 1.....	40
Figura 6 - Variação de CO ₂ (medida qualitativa em bolhas/min) e pH em função do tempo, para o ensaio 1.....	41
Figura 7 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 1.....	42
Figura 8 - Variação das Concentrações de Células, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 2.....	43
Figura 9 - Variação de CO ₂ (medida qualitativa: bolhas/min) e pH em função do tempo, para o ensaio 2.....	44
Figura 10 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio dois.	45
Figura 11 - Variação das Concentrações Celular, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 3.....	46
Figura 12 - Variação de CO ₂ (medida qualitativa: bolhas/min) e pH em função do tempo, para o ensaio 3.....	47
Figura 13 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 3.....	47
Figura 14 - Variação do pH do meio em função do tempo nos ensaios com mel sem prévia clarificação.	48
Figura 15 - Variação das Concentrações Celular, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 4.....	50

Figura 16 - Variação de CO ₂ (medida qualitativa: bolhas/min) e pH em função do tempo, para o ensaio 4.....	51
Figura 17 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o quarto ensaio.....	51
Figura 18 – Variação das concentrações Celulares, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 5.....	53
Figura 19 - Variação de CO ₂ (medida qualitativa: bolhas/min) e pH em função do tempo, para o ensaio 5.....	53
Figura 20 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 5.....	54
Figura 21 - Variação das concentrações Celulares, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 6.....	55
Figura 22 - Variação de CO ₂ (medida qualitativa: bolhas/min) e pH em função do tempo, para o ensaio 6.....	56
Figura 23 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 6.....	56
Figura 24 – Variação do pH do meio em função do tempo nos ensaios com mel invertido e clarificado.....	57
Figura 25 – Variação do pH do meio em função do tempo no ensaio 6.....	58
Figura 26 - Velocidades de Consumo de AR e Produção de Etanol em função da Concentração de AR, para o ensaio 01.....	59
Figura 27 - Velocidades de Consumo de AR e Produção de Etanol em função da Concentração de AR, para o ensaio 02.....	59
Figura 28 - Velocidades de Consumo de AR e Produção de Etanol em função da Concentração de AR, para o ensaio 03.....	60
Figura 29 - Velocidades de Consumo de AR e Produção de Etanol em função da Concentração de AR, para o ensaio 04.....	61
Figura 30 - Velocidades de Consumo de AR e Produção de Etanol em função da Concentração de AR, para o ensaio 5.....	61
Figura 31 - Velocidades de Consumo de AR e Produção de Etanol em função da Concentração de AR, para o ensaio 06.....	62
Figura 32 - Variação das concentrações de células, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 07.....	66

Figura 33 - Variação de CO ₂ (medida qualitativa em bolhas/min) nas diferentes alimentações e pH em função do tempo, para o ensaio 07.	67
Figura 34 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 07.....	68
Figura 35 - Variação das concentrações Celulares, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 08.....	69
Figura 36 - Variação de CO ₂ (medida qualitativa em bolhas/min) nas diferentes alimentações e pH em função do tempo, para o ensaio 8.	70
Figura 37 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 08.	71
Figura 38 - Variação das Concentrações Celulares, AR e Etanol além da Concentração de AR total alimentada em função do tempo, para o ensaio 9..	74
Figura 39 - Variação de CO ₂ (medida qualitativa em bolhas/min) nas diferentes alimentações e pH em função do tempo, para o ensaio 9.	75
Figura 40 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 9.	76
Figura 41 - Variação das Concentrações Celulares, AR e Etanol além da Concentração de AR total alimentada em função do tempo, para o ensaio 10.	78
Figura 42 - Variação de CO ₂ (medida qualitativa em bolhas/min) nas diferentes alimentações e pH em função do tempo, para o ensaio 10.	78
Figura 43 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 10.	79
Figura 44 - Variação das Concentrações Celulares, AR e Etanol além da Concentração de AR total alimentada em função do tempo, para o ensaio 11.	81
Figura 45 - Variação de CO ₂ (medida qualitativa em bolhas/min) nas diferentes alimentações e pH em função do tempo, para o ensaio 11.	82
Figura 46 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 11.	82
Figura 47 - Variação do pH do meio em função do tempo nos ensaios 9 a 11.	85
Figura 48 - Curva padrão para se determinar a concentração celular	100
Figura 49 - Curva Padrão da Análise DNS.....	101

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Composição da Cana de Açúcar e Sólidos Solúveis no Caldo.	6
Tabela 2 - Especificações Técnicas do Melaço.....	14
Tabela 3 - Condições iniciais dos ensaios realizados.	29
Tabela 4 - Dado sobre os volumes precipitados de coloides e perdas de açúcares redutores.....	38
Tabela 5 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 1. ...	39
Tabela 6 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 2. ...	43
Tabela 7 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio3. ...	45
Tabela 8 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 4. ...	49
Tabela 9 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 5. ...	52
Tabela 10 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 6. ...	54
Tabela 11 - Tabela com os Valores de Conversões para os Ensaios Descontínuos	63

Tabela 12 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 7. ..	65
Tabela 13 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 8. ..	69
Tabela 14 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 9. ..	73
Tabela 15 - Tabela com dados referentes ao mel invertido e clarificado adicionado, como quantidade adicionada, Concentrações de AR em função do tempo, para o ensaio 9.....	73
Tabela 16 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 10.	76
Tabela 17 - Tabela com dados referentes ao mel invertido e clarificado adicionado, como quantidade adicionada, Concentrações de AR em função do tempo, para o ensaio 10.....	77
Tabela 18 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 11.	79
Tabela 19 - Tabela com dados, como quantidade adicionada, Concentrações de AR em função do tempo, para o ensaio 11.	80
Tabela 20 - Tabela com os valores de Conversão em Etanol e Rendimento...	84
Tabela 21 - Tabela com informações d número de bolhas desprendidas por minuto de CO ₂ (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 1.	109

Tabela 22 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO2 (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 2.	109
Tabela 23 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO2 (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 3.	110
Tabela 24 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO2 (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 4.	110
Tabela 25 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO2 (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 5.	111
Tabela 26 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO2 (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 6.	111
Tabela 27 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO2 (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 7.	112
Tabela 28 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO2 (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 8.	113
Tabela 29 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO2 (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 9.	114
Tabela 30 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO2 (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 10.	115
Tabela 31 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO2 (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 11.	116

Lista de Equações

Equação 1 – Hidrólise da Sacarose	15
Equação 2 – Reação Química para produção de Etanol.	16
Equação 3 - Leveduras em função do tempo.....	24
Equação 4 – Produto em função do tempo.	24
Equação 5 - Substrato em função do tempo.	24
Equação 6 - Velocidade específica de crescimento	35
Equação 7 - Velocidade específica de consumo de substrato	35
Equação 8 - Velocidade específica de formação de produto	35
Equação 9 – Velocidade Instantânea de Consumo de Substrato.	35
Equação 10 - Velocidade Instantânea de Produção de Etanol.	36
Equação 11 - Cálculo do fator de conversão do substrato em célula.....	36
Equação 12 - Cálculo do fator de conversão do substrato em produto.....	36
Equação 13 - Equação da curva padrão para determinação da concentração celular.....	100
Equação 14 - Equação da curva padrão da análise DNS	101
Equação 15 – Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 1. ...	101
Equação 16 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 1.	101
Equação 17 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 2. ...	102
Equação 18 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 2.	102
Equação 19 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 3. ...	102
Equação 20 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 3.	102
Equação 21 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 4. ...	102
Equação 22 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 4.	102
Equação 23 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 5. ...	103
Equação 24 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 5.	103
Equação 25 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 6. ...	103

Equação 26 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 6.	103
Equação 27 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 7 (1º Pulso).	103
Equação 28 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 7 (2º Pulso).	104
Equação 29 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 7 (3º Pulso).	104
Equação 30 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 7 (1º Pulso).	104
Equação 31 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 7 (2º Pulso).	104
Equação 32 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 7 (3º Pulso).	104
Equação 33 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 8 (1º Pulso).	105
Equação 34 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 8 (2º Pulso).	105
Equação 35 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 8 (1º Pulso).	105
Equação 36 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 8 (2º Pulso).	105
Equação 37 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 9 (1ª Alimentação).	106
Equação 38 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 9 (2ª Alimentação).	106
Equação 39 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 9 (1ª Alimentação).	106
Equação 40 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 9 (2ª Alimentação).	106
Equação 41 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 10 (1ª Alimentação).	107
Equação 42 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 10 (2ª Alimentação).	107

Equação 43 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 10 (1ª Alimentação).....	107
Equação 44 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 10 (2ª Alimentação).....	107
Equação 45 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 11 (1ª Alimentação).	108
Equação 46 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 11 (2ª Alimentação).	108
Equação 47 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 11 (1ª Alimentação).....	108
Equação 48 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 11 (2ª Alimentação).....	108

SUMÁRIO

1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	3
2.1. Cana de Açúcar	3
2.2. Caldo de Cana	5
2.3. Clarificação do Caldo de Cana	7
2.3.1. Considerações Iniciais	7
2.3.2. Processos clássicos de clarificação do caldo de cana.....	9
2.3.2.1. Calagem	9
2.3.2.2. Sulfitação	10
2.3.2.3. Fosfatação	11
2.3.3. Processos Alternativos de Clarificação do Caldo de cana-de-açúcar. 11	
2.3.3.1. Carbonatação.....	11
2.3.3.2. Floculantes	11
2.3.3.3. Carvão Ativado.....	12
2.3.3.4. Processos Oxidativos Avançados (POA)	12
2.4. Mel Rico ou Melaço	13
2.4.1. Inversão do Melaço (Sacarose)	15
2.5. Etanol.....	15
2.6. Produção de Etanol	16
2.7. Fermentação.....	16
2.7.1. Processo Descontínuo	17
2.7.2. Processo Descontínuo Alimentado	17
2.7.3. Tratamentos Finais.....	18
2.8. Cinética da Fermentação Alcoólica	19
2.8.1 Efeito da Temperatura.....	19
2.8.2. Efeito do pH	20

2.8.3. Concentração de Substrato, Etanol e Fermento	21
2.8.4. Nutrientes.....	22
2.8.5. Tempo de Alimentação	22
2.8.6. Contaminação Bacteriana	23
2.9. Parâmetros Cinéticos.....	23
2.10. Considerações Finais	24
3. Materiais e Métodos	25
3.1. Substrato	25
3.2. Nutrientes	25
3.3. Microrganismo	25
3.4. Fermentador	25
3.5. Processos de Clarificação do Mel.....	26
3.5.1. Método da calagem e adição de polieletrólito	26
3.5.2. Método utilizando polieletrólito aniônico de alumínio (PAC).....	26
3.5.3. Método utilizando ácido sulfúrico e fosfórico	26
3.5.4. Método utilizando EDTA.....	26
3.5.5. Método utilizando terra de diatomácea	27
3.5.6. Utilização de OCTAPOL.....	27
3.6. Diluição inicial, inversão e clarificação.....	27
3.7. Esterilização	28
3.8. Preparo do Inóculo	28
3.9. Condução dos ensaios	29
3.9.1. Ensaios em regime Descontínuo.....	30
3.9.2. Ensaios em regime descontínuo alimentado.....	30
3.10. Métodos Analíticos	33
3.10.1. Medida de pH.....	33
3.10.2. Medida de CO ₂ (medida qualitativa)	33

3.10.3. Medida de Biomassa.....	33
3.10.4. Medida de concentração de substrato	33
3.10.5. Medida de concentração de etanol	34
3.11. Determinação dos parâmetros cinéticos.....	34
3.11.1. Determinação das Velocidades Específicas de Crescimento, Consumo e Produção de Etanol.	35
3.11.2. Determinação das Velocidades de Crescimento, Consumo e Produção de Etanol.....	35
3.11.3. Cálculo dos Fatores de Conversão e Rendimento.....	36
4. Resultados e Discussões	37
4.1. Resultados Clarificação	37
4.2. Resultados das fermentações descontínuas	38
4.2.1. Resultados referentes às fermentações descontínuas utilizando mel invertido.....	39
4.2.3. Resultados referentes às fermentações descontínuas utilizando mel invertido e clarificado.....	49
4.2.4. Discussão geral dos ensaios descontínuos utilizando mel invertido e clarificado	57
4.2.6. Análise Quanto a Conversão e Rendimento das fermentações em função do tempo nos ensaios Descontínuos.....	63
4.3. Resultados das fermentações descontínuas alimentadas	64
4.3.1. Resultados das fermentações descontínuas alimentadas com alimentação em pulsos.....	64
4.3.3. Resultados das fermentações descontínuas alimentadas com alimentação com fluxo constante.	72
4.3.4. Discussão Geral Ensaio Descontínuos alimentados (Ensaio 7 a 11).....	83
4.4. Considerações Finais	85
5. Conclusões.....	86

6. Referências	87
7. Apêndices.....	100
Apêndice A – Curva Padrão Para Medidas de Biomassa por Espectrofotometria	100
Apêndice B – Curva Padrão da Análise DNS.....	100
Apêndice C - Curvas Ajustadas dos Ensaios.	101
C.1. Ensaios Descontínuos.....	101
C.2. Ensaios Descontínuos com Alimentação em Pulsos.....	103
C.3. Ensaios Descontínuos Alimentados Alimentação Variada	106
Apêndice D – Dado sobre quantidade de bolhas de CO ₂ desprendidas pelo tempo de fermentação	109

1. Introdução

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 renovável (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; PEREIRA; ELLIS, 2007).

O uso do álcool, em substituição ou misturado à gasolina, promoveu uma economia de mais de um bilhão de barris de petróleo, o correspondente a 19 meses de produção atuais. Graças ao álcool combustível, nos últimos oito anos deixaram de ser importados bilhões de dólares em barris de petróleo. O etanol brasileiro é produzido utilizando-se cana-de-açúcar (mel e/ou melaço) como matéria prima (BIODIESELBR, 2018).

O rendimento teórico (Gay-Lussac) da produção de etanol é de 0,511 g de etanol por g de substrato. Entretanto, na prática esse valor não é observado devido à utilização de parte do substrato para a produção de glicerol e álcoois superiores. Além disso, parte do substrato pode ser redirecionada para a produção de células (SOUZA, 2009).

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.

Tradicionalmente, o processo de fermentação alcoólica visando a produção de álcool utilizando-se *Saccharomyces cerevisiae* é conduzido em

fermentadores com operação em batelada e em regime de anaerobiose. Por outro lado, alguns estudos apontam que, para a produção de levedura, deve ser utilizado o regime de aerobiose (AIBA, 1973).

Com base nisso, o presente estudo tem por objetivo, o estudo cinético das fermentações utilizando mel invertido e mel invertido e clarificado, comparando a produtividade de álcool e consumo de açúcares redutores em regimes descontínuos e descontínuos alimentados, com e sem a clarificação prévia do mel. Neste sentido, também se avaliou diferentes agentes de clarificação, diferentes regimes de operações, comportamento celular em alta concentração inicial, bem como os parâmetros cinéticos, como fatores que afetam sua velocidade, velocidades específicas e volumétricas, e seus fatores de conversão e rendimento.

2. Revisão Bibliográfica

Neste capítulo serão apresentadas de maneira geral as considerações iniciais para o estudo cinético das fermentações utilizando mel invertido e mel invertido e clarificado, abrangendo aspectos como sua matéria prima a cana de açúcar, para a produção de etanol, além das características do caldo de cana e do mel rico, substrato esse utilizado no presente trabalho, portanto abrangendo também pontos como sua inversão, utilizando a enzima invertase, e os motivos que levaram a propor um tratamento do melaço no presente trabalho.

Considerando os processos de clarificação do caldo de cana, destacando-se algumas propriedades do processo. Com o objetivo de se empregar essas técnicas usualmente utilizadas na clarificação do caldo na produção de açúcar, na clarificação no mel rico final da usina para a produção de etanol.

Também destacando os processos relacionados à fermentação alcoólica bem como regime de operação descontínuo, descontínuo alimentado em pulsos e descontínuo alimentado com fluxo constante. Os fatores que afetam a fermentação, ou seja, sua cinética, além é claro dos parâmetros cinéticos que serão estudados no presente trabalho.

2.1. Cana de Açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) possui diferentes origens, sendo suas espécies da Oceania e outras asiáticas, e devido ao seu alto valor econômico constitui no suporte da maior indústria agrícola do mundo (VILA, 2006). É uma planta perene da família *Poaceae* e gênero *Saccharum*.

Existem cerca de trinta espécies conhecidas e catalogadas. Das espécies reconhecidas pelos botânicos (*Saccharum officinarum*, *S. spontaneum*, *S. sínese*, *S. barbari*, *S. robustum*, *S. edule*), a mais plantada no Brasil é a *S. officinarum*, por apresentar baixo conteúdo de fibras e alto teor de sacarose (ANDRADE, 2001).

No Brasil, a cana-de-açúcar foi introduzida pelo Rei D. João III e trazida para a América em 1532 na expedição de Martim Afonso de Souza, para a capitania de São Vicente, onde foi criado o primeiro Engenho. Aqui a planta

espalhou-se no solo fértil de massapé, com a ajuda do clima tropical quente e úmido e da mão-de-obra escrava trazida da África. Essa descoberta enriqueceu Portugal que espalhou o açúcar brasileiro por toda a Europa, assim como aquele produzido na América Central, pelos franceses, espanhóis e ingleses. O povoado se desenvolveu rapidamente e isso configurou a primeira atividade econômica do Brasil, o ciclo da cana-de-açúcar (JOSINO, COUTINHO & PESSOA, 2005).

Embora sem tecnologia, a cana-de-açúcar marcou decisivamente os três primeiros séculos de nossa história. A cana e um dos seus produtos, o açúcar, definiu a sociedade e a economia do Brasil Colônia. Historicamente, desde que se iniciou o cultivo da cana-de-açúcar no Brasil, além da obtenção de açúcar, iniciou-se a produção artesanal de derivados, principalmente sob a forma de rapadura e da aguardente (ANDRADE, 2005).

No início do século XX, havia 140 usinas de açúcar em funcionamento no Brasil, produzindo açúcar mascavo de boa qualidade. Além dessas usinas, já existiam em todo o Nordeste e Sudeste do Brasil, mais de 10.000 pequenos engenhos produzindo açúcar mascavo e rapadura para consumo e para fins comerciais. Durante o século XX, mais da metade dos engenhos em funcionamento, no país, se encontravam no estado de Minas Gerais (ANDRADE, 2005).

De acordo com a UNICA¹ (2018), o cultivo da cana-de-açúcar no Brasil ocupa aproximadamente 20 milhões de hectares; a produção concentra-se na região centro-sul, que representa 90% da produção total do país. A produção de cana-de-açúcar moída na safra 2014/15, no centro sul, foi de 573,15 milhões de toneladas, enquanto a safra de 2015/16 foi de 617,65 milhões de toneladas. Este resultado é recorde para a região e representa um crescimento de 8%. Já a safra de 2017/18 foi de 596,26 milhões de toneladas. A produção de açúcar referente a safra de 2015/16 foi 2,48% menor que a safra passada (UNICA², 2018). Segundo a UNICA² essa queda se deve a produção de etanol. A produção de etanol contou com crescimento de aproximadamente 18% em relação a safra 2014/15. Comparando-se a safra 2015/16 com a safra de 2017/18 observa-se 14% no aumento na produção de açúcar, enquanto houve uma queda de 8% na produção de etanol.

Seu valor nutricional é dependente de numerosos fatores destacando-se a variedade da cana utilizada, idade, tipo de solo, características climáticas, sistema de corte e condições do processo. Entre os grupos de nutrientes essenciais devem ser citados: carboidratos, minerais, proteínas, vitaminas, ácidos graxos e água, teor de sacarose, além de outros açúcares, denominados redutores, como a glicose e frutose, que possuem grande valor biológico para o organismo (LEHNINGER, NELSON e COX, 1995).

2.2. Caldo de Cana

O caldo de cana está situado entre os entrenós da fase sólida na cana-de-açúcar, considerando que esta seja um composto bifásico sólido – líquido. A fase sólida da cana é constituída por um complexo lignocelulósico integrado por fibras celulósicas que formam os entrenós. Já a fase líquida ou, o caldo de cana propriamente dito, é uma solução aquosa, viscosa, de aparência opaca e cor amarelo esverdeada, espumoso e contendo uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos sendo que destes 90%, aproximadamente, são os açúcares (SPENCER e MEADE, 1967).

O caldo é uma solução impura e diluída de sacarose, constituído de água 75% a 82%, e de sólidos solúveis 18% a 25%, sendo esses últimos divididos em açúcares (18%) e outras substâncias de natureza orgânica (1%) e inorgânica (0,5%). Os açúcares são a sacarose (17%), a glicose e a frutose que perfazem 1,0 % do total. Os demais componentes são constituídos de substâncias nitrogenadas (proteínas, aminoácidos), gorduras, ceras, pectinas, ácidos e materiais corantes (clorofila, sacaretina e antocianinas). As substâncias inorgânicas, representadas pelas cinzas, têm como principais componentes a sílica, potássio, fósforo, cálcio, sódio, magnésio, enxofre, alumínio e outros (DELGADO e CESAR, 1977).

A sacarose é o principal componente dos sólidos solúveis na cana madura, podendo atingir concentrações superiores a 20% (CLARKE e GODSHALL, 1988). Compreendendo água e sólidos dissolvidos. Entre os componentes solúveis do caldo estão sacarose, glicose, frutose, proteínas, oligossacarídeos, polissacarídeos, ácidos orgânicos, aminoácidos e sais. Já o material suspenso consiste de bagacilhos, solo, areia, amido, ceras, gomas e

gorduras (DOHERTY; RACKEMANN, 2008; PAYNE, 1989; STUPIELLO, 2002). As composições, tanto da cana como do caldo, são apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Composição da Cana de Açúcar e Sólidos Solúveis no Caldo.

Componentes da cana de açúcar	(%) em massa na cana de açúcar
Água	73-76%
Sólidos	24-27%
Sólidos Solúveis	10-16%
Fibra (seca)	11-16%
Constituintes do caldo de cana	(%) em sólidos solúveis
Açúcares	75-92%
Sacarose	70-88%
Glicos	2-4%
Frutose	2-4%
Sais	3,0-4,5%
Ácidos orgânicos	1,5-5,5%
Ácidos carboxílicos	1,1-3,0
Aminoácidos	0,5-2,5%
Outros não açúcares orgânicos	
Proteínas	0,5-0,6%
Amido	0,001-0,100%
Gomas	0,30-0,60%
Ceras, gorduras, fofolipídeos	0,05-0,15%

FONTE: Adaptado de CHEN; CHOU, 1993.

A diferença na composição do caldo da cana-de-açúcar é um dos fatores que afetam as diversas operações unitárias de um processo industrial, em especial a purificação do caldo e, no caso de destilarias, a fermentação alcoólica (CESAR *et al.*, 1987).

Destaca-se a influência de inúmeros parâmetros na formação do perfil do caldo de cana. Entre eles: a variedade da cana, tipo de solo, adubação, condições climáticas, grau de maturidade da cana, tipo de colheita, tempo entre a queima, corte e o processamento, conteúdo de pontas e palha e também, por ser uma matéria-prima extrativa, por sua forma de extração (SOUZA, 1988).

A qualidade da cana para a indústria não pode ser avaliada simplesmente pelo seu teor de sacarose, ainda que seja o parâmetro mais importante, mas por todos os fatores citados, que têm consequências diretas da composição tecnológica da cana (PARANHOS, 1987).

A viscosidade apresentada pelo caldo é causada por pectinas, albuminas, gomas e sílica coloidal. A opacidade é causada por proteínas, coloides, pectina, pentosana, e compostos inorgânicos, como a sílica. A cor varia de acordo com a energia do esmagamento e com a variedade de cana, sendo influenciada pela clorofila, antocianina, sacaretina e outras substâncias cromógenas. O pH do caldo varia de 5 a 6 e sua acidez aumenta nas canas queimadas, com presença de pragas, cortadas há mais de 24 horas e verdes (HAMERSKI, 2009).

2.3. Clarificação do Caldo de Cana

2.3.1. Considerações Iniciais

A clarificação tem como objetivo principal eliminar a máxima quantidade de impurezas, visando um caldo claro, límpido e brilhante, sem afetar a concentração de sacarose. Mediante a coagulação de coloides e formação de precipitados que adsorvam e arrastem as impurezas coloidais (SOUZA, 1988).

A clarificação envolve basicamente as etapas de Sulfitação (Absorção de SO_2 pelo caldo), calagem (Adição de leite de cal ao caldo) e/ou adição de compostos poliméricos, que conseqüentemente ocorre a decantação. (TFOUNI, VITORINO e TOLEDO, 2007).

Como o caldo de cana-de-açúcar, é constituído por diferentes elementos, no qual formam uma suspensão coloidal estável, esta estabilidade é causada pela carga elétrica na superfície das pequenas partículas. Devido a esta carga elétrica, os íons tendem a se agrupar em atmosfera iônica (ATKINS; DE PAULA, 2002).

Esta característica dos íons tender a se agruparem estabelece uma diferença de potencial entre as partículas, essas camadas carregadas eletricamente, somadas aos efeitos do movimento térmico, levam à formação de uma dupla camada elétrica. Na figura 1 (apresentada na página seguinte), está representando o modelo de dupla camada, considerando uma partícula carregada negativamente em que prevê a existência de uma camada compacta (dupla camada rígida) com o ordenamento rígido de cargas positivas e negativas nos dois lados (sólido/solução). Completa o modelo, uma segunda

camada móvel com carga elétrica necessária para completar a carga da primeira camada rígida, obtendo-se o equilíbrio de cargas entre as fases em contato (AOKI, 1987).

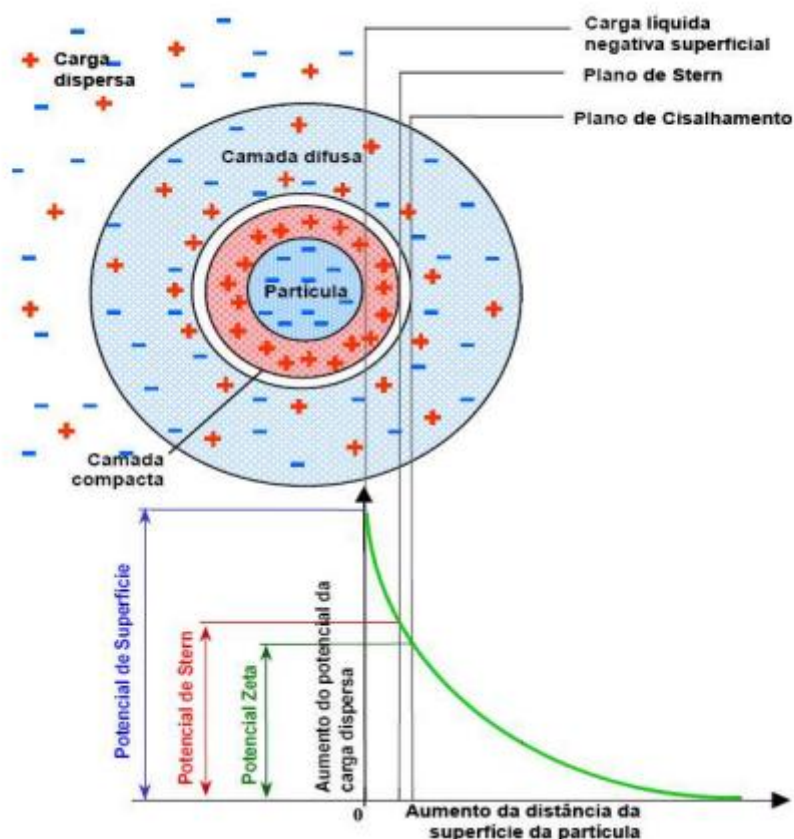


Figura 1 - Modelo elétrico da camada dupla de uma superfície de partícula com carga negativa (FONTE: Adaptado de QMCUEB, 2006, apud CHAO, 2006).

O efeito causado pela formação de cargas elétricas nas interfaces, entre o plano de cisalhamento e o meio é denominado Potencial Zeta, no qual, é responsável pelo comportamento eletrostático da partícula coloidal (AOKI, 1987). O potencial zeta é um indicador útil da carga superficial, usado para prever o comportamento das partículas, estabilidade na dispersão, ou tendências rumo à coagulação.

A neutralização do potencial zeta é considerada a remoção da resistência à aglomeração das partículas. A partir disso, de acordo com Chen e Chou (1993), o processo de clarificação apresenta três estágios básicos:

1. Reduzir o potencial zeta das partículas dispersas o mais próximo de zero possível;
2. Permitir que as partículas coloidais neutras formem aglomerados;
3. Agrupar os aglomerados de maneira a formar grandes flocos com sedimentação rápida.

Portanto, o equilíbrio da dispersão coloidal estável (caldo de cana) pode ser rompido, permitindo a formação de aglomerados. A alteração em determinados parâmetros, tais como, o pH e a temperatura, permitem a desestabilização dos coloides. Visto que a magnitude da carga elétrica das partículas dispersas é dependente do pH e o caldo ao ser aquecido, tem suas proteínas coaguladas ou precipitadas que se depositam sobre as partículas coloidais, iniciando a desestabilização da suspensão (BENNETT, 1973).

Considerando as características apropriadas e o objetivo da clarificação, serão apresentados a seguir os principais métodos utilizados na clarificação do caldo, apresentando métodos clássicos e alguns processos alternativos de maior relevância industrialmente.

2.3.2. Processos clássicos de clarificação do caldo de cana

2.3.2.1. Calagem

A calagem consiste na adição de cal hidratada (hidróxido de cálcio), ao caldo previamente aquecido (75-80°C), tendo como objetivo neutralizar os ácidos orgânicos presentes no caldo. São utilizadas de 500 a 800g de cal por tonelada de cana de modo a obter o pH entre 7,0 e 7,5, logo em seguida o caldo caleado é aquecido a 90-105°C (HONIG, 1953). A presença do Ca(OH)_2 e o aumento da temperatura leva à formação de um precipitado que adsorve e arrasta grande parte do material suspenso no caldo, sendo separado por decantação posteriormente (HUGOT, 1977).

Embora diversos não açúcares sejam precipitados com a calagem, este processo é deficiente na remoção dos polissacarídeos e compostos que conferem cor ao caldo. Visando a melhora da eficiência, podem ser adicionados polieletrólitos, que favorecem a formação de flocos maiores, facilitando a floculação (MADHO; DAVIS, 2001).

Os objetivos da calagem, segundo o centro de Tecnologia COPERSUCAR (2001), são:

- Correção do pH do caldo até o valor desejado (entre 7,0-7,5);
- Reação dos ácidos orgânicos presentes;
- Promover a floculação de coloides e o conseqüentemente agrupamento do material em suspensão.

2.3.2.2. Sulfitação

A sulfitação, consiste na aplicação de dióxido de enxofre gasoso (SO_2) ao caldo misto, pré-aquecido na temperatura de 60°C , até atingir o valor de pH entre 3,8 e 4,2 (aproximadamente de 150-300g de enxofre por tonelada de cana) e posterior alcalinização com leite de cal até pH 7,0-7,2. A neutralização do caldo sulfitado conduz à formação do precipitado pouco solúvel, sulfito de cálcio, o qual atua na adsorção dos compostos coloridos e outras impurezas. Em seguida, o caldo é aquecido à temperatura entre $100-105^\circ\text{C}$ e enviado aos sedimentadores para remoção dos compostos precipitados (HONIG, 1953; DELGADO e CÉSAR, 1977).

A neutralização do caldo sulfitado pela calagem conduz à formação de sulfito de cálcio que age adsorvendo compostos coloridos, bem como outras impurezas. O sulfito também atua na descoloração temporária de alguns compostos, provavelmente devido à combinação do SO_2 com açúcares redutores presentes, com bloqueio do grupo funcional carbonila, impedindo a formação de oligossacarídeos coloridos e malanoidina. Também inibe as reações de *Maillard* (reação entre açúcares redutores e aminoácidos), embora essa reação seja reversível (HONIG, 1953; DAVIS, 2001).

Vercellotti e Clarke (1997) afirmam que compostos com grupos carbonila podem mais tarde se polimerizar, por reações de condensação, gerando compostos aromáticos coloridos. Então mesmo com a remoção momentânea de cor, novos compostos com cor podem surgir.

Determinadas usinas utilizam-se de coadjuvantes para melhorar o processo de clarificação. No caso do caldo de cana possuir baixo teor de fosfato (< 200 ppm) faz-se a adição de fosfatos solúveis permitindo a formação do precipitado fosfato de cálcio que contribui para a retirada de impurezas do meio

(DELGADO; CESAR, 1977). Além disso, 2 a 5 ppm de um polieletrólito dissolvido em água com concentração de 0,1%, são empregados para auxiliar na decantação (BENNETT, 1973).

2.3.2.3. Fosfatação

A fosfatação consiste na adição de ácido fosfórico combinado à calagem. As quantidades expressas em P_2O_5 , variam entre 50 e 200 ppm dependendo do conteúdo de fosfato presente no caldo. Usualmente, a fosfatação é realizada antes da calagem para que o ácido precipite parte dos coloides e a cal neutralize o meio permitindo a formação dos flocos de fosfato de cálcio (HUGOT, 1977).

Segundo El Kader, Mansour e Yassin (1983), o desempenho da fosfatação é superior à sulfitação, removendo maior quantidade de cinzas, ceras, gomas e proteínas.

2.3.3. Processos Alternativos de Clarificação do Caldo de cana-de-açúcar

No sentido de se desenvolver novos processos de clarificação, decorrentes de problemas ambientais.

2.3.3.1. Carbonatação

Este processo consiste em adicionar leite de cal e gás carbônico ao caldo de cana, formando o carbonato de cálcio o qual adsorve e incorpora grande parte da matéria coloidal e insolúvel, em seguida o precipitado é separado por filtração (CHEN e CHOU, 1993; MOODLEY *et al.*, 2003).

2.3.3.2. Floculantes

Este processo consiste em adicionar polieletrólitos visando uma rápida sedimentação de impurezas. Usualmente, utiliza-se polieletrólitos de grande massa molar, os polímeros adotados para a clarificação do caldo de cana são principalmente aniônicos, que carregam a mesma carga das partículas em

suspensão do caldo (DAVIS,2001; CHEN e CHOU,1993). As principais funções dos floculantes, segundo Simpson (1996), são:

- Aumentar a taxa de sedimentação de sólidos insolúveis;
- Diminuir os volumes de lodo;
- Produzir um caldo clarificado translúcido, ou seja, com baixa turbidez;
- Boa filtrabilidade.

São eficientemente removidos então por carbonatação ou fosfatação, sugerindo assim a combinação desses processos.

2.3.3.3. Carvão Ativado

O processo de remoção de corantes pela ação de adsorventes já é aplicada em várias áreas, proporcionando a redução ou remoção de reagentes químicos em processos de purificação e adequação de produtos (NUNES, 2009). Nesse sentido, o processo consiste na adição de carvão ativo, visando uma rápida adsorção de principalmente corantes na clarificação do caldo de cana.

Carbonos ativos podem ser obtidos através do bagaço da cana, são conhecidos como adsorventes devido sua alta porosidade e elevada área superficial (ABREU, 2013). O bagaço de cana-de-açúcar é rentável para o setor sucroalcooleiro despertando grande interesse para preparação de carbono ativado por apresentar-se como uma matéria-prima economicamente atrativa e disponível em abundância (ANDRADE *et al.*, 2018).

2.3.3.4. Processos Oxidativos Avançados (POA)

Estudos utilizando peróxido de hidrogênio, reação de Fenton e ozônio, vêm sendo realizados nos últimos anos (NGUYEN, ZHANG e DOHERTY, 2015; LUCAS, PERES e LI PUMA, 2010; COCA, PEÑA e GONZÁLEZ, 2007; BENÍTEZ *et al.*, 1997 apud FONSECA, 2017).

Nesse sentido, a ozonização é uma técnica aplicada extensivamente no tratamento de água e efluentes, esse interesse se tem se expandido sendo um agente de processamento de alimentos promissor (FONSECA, 2017). Sua

aplicação decompõe-se rapidamente em oxigênio, portanto, não deixa resíduos em alimentos após sua decomposição (O'DONELL *et al.*, 2012).

2.4. Mel Rico ou Melaço

O mel rico ou melaço de cana é considerado um subproduto da etapa de centrifugação no processo de fabricação de açúcar, o qual pode ser utilizado como matéria prima para diversos bioprodutos como o etanol, ração animal, ácido cítrico, entre outros. O melaço trata-se de um líquido viscoso, de cor escura, não cristalizável. Em virtude de sua composição o melaço é empregado fundamentalmente como fonte de carbono, sendo necessário a sua complementação de acordo com o meio nutricional exigido pelo bioprocessamento (JEREZ, 1993).

Segundo Almeida (1966) a composição do melaço varia com os seguintes fatores: a variedade, idade, estado de sanidade, maturação, sistema de cultivo, adubação, tratamentos culturais, condições climáticas e outras, além dos processos de fabricação usualmente utilizados nas indústrias.

Os principais componentes do melaço são a água, carboidratos, compostos orgânicos como aminoácidos, ácidos carboxílicos, proteínas, vitaminas, fenóis entre outros (WOICIECHOWSKI *et al.*, 2013). De acordo com Olbrich (1963), o melaço possui composição média de 20% de água, 62% de açúcar, 10% de material nitrogenado e 8% de constituintes inorgânicos, de acordo com a tabela 2, apresentada na página seguinte.

Tabela 2 - Especificações Técnicas do Melaço

Constituintes	(%)
Água	20,0
Constituintes orgânicos	
<i>Açúcares: Sacarose</i>	32,0
<i>Glicose</i>	14,0
<i>Frutose</i>	16,0
<i>Materiais nitrogenados, ácidos livres e ligados, substâncias solúveis</i>	10,0
Constituintes inorgânicos	
<i>SiO₂</i>	0,5
<i>K₂O</i>	3,5
<i>CaO</i>	1,5
<i>MgO</i>	0,1
<i>P₂O₅</i>	0,2
<i>Fe₂O₃</i>	0,2
<i>Resíduos de sulfato</i>	1,6
<i>Cloretos</i>	0,4

Fonte: Olbrich (1963).

Além também do melaço de cana também poder conter outras substâncias, que aparecem em pequenas quantidades, como exemplo: pesticidas, fungicidas e herbicidas utilizados no cultivo de cana-de-açúcar, bem como substâncias utilizadas como antiespumantes no processo de produção de açúcar. Ambos podem afetar negativamente o uso do melaço. A microflora de melaço pode ser um agente que influencia negativamente sobre o rendimento e produtividade do processo, contendo microrganismos, os mais comuns são espécies de *Bacillus*, às vezes leveduras de espécies de *Cândida*, e muito raramente, bolores de *Penicillium*, *Aspergillus* e outras espécies (LESNIAK, 2002).

Portanto podendo ser relevante um pré-tratamento do melaço para atenuar possíveis contaminações que esse carrega de processos anteriores. Esta tarefa é um tanto complexa, considerando-se que os melaços oriundos de indústrias de álcool e açúcar carregam um meio altamente complexo, como já visto anteriormente pela tabela 2, que por um lado é muito rico em nutrientes e

por outro extrapola traços de metais, microrganismos indesejados, cinzas entre outros (BARROS, 2018).

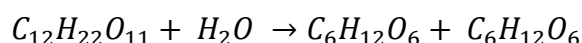
No presente trabalho foram estudados os diferentes métodos de clarificação empregados no caldo de cana, no qual foram empregadas na utilização no melaço invertido com suas devidas adaptações.

2.4.1. Inversão do Melaço (Sacarose)

O açúcar invertido é um xarope composto de glicose, frutose e sacarose residual resultante de uma reação de hidrólise da sacarose (AKGOL *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2000). A hidrólise é conhecida como reação de inversão, pois o xarope dos monossacarídeos (glicose e frutose) desvia um feixe de luz polarizada para a esquerda, enquanto as soluções de sacarose desviam esse feixe para a direita (CABRAL, 1989).

A invertase é uma enzima que catalisa reações de transferência com outros aceptores, além da água. Isso resulta na formação de oligossacarídeos constituídos por unidades de glicose e frutose (VICENTE, 2000). A equação 1, demonstra como ocorre a hidrólise da sacarose.

Equação 1 – Hidrólise da Sacarose



2.5. Etanol

Considerado um dos mais importantes combustíveis renováveis, devido à seus benefícios econômicos e ambientais, sendo uma boa alternativa para substituir o petróleo (BAI *et al.*, 2008 apud APIO e SALAU). Um dos principais fatores ambientais é que a queima de etanol reduz em cerca de 80% as emissões de carbono se comparado à queima da gasolina (LASHINKY & SCHWARTZ, 2006).

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⁾, 2018). O etanol anidro, também é 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 (NOVACANA⁽¹⁾, 2018).

2.6. Produção de Etanol

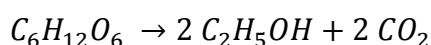
A forma mais simples e antiga, é a fermentação, sendo através dela, que ocorre a produção de álcool. A fermentação, consiste em, adicionar ao caldo de cana-de-açúcar microrganismos que quebram as moléculas de açúcar ($C_6H_{12}O_6$), produzindo duas moléculas de etanol (C_2H_5OH) e duas moléculas de gás carbônico (CO_2) (NOVACANA⁽²⁾, 2018).

Segundo COPERSUCAR, o processo de fermentação da cana se divide em três etapas principais: a extração e disponibilização dos açúcares, a fermentação do mosto e a destilação do produto fermentado (vinho).

2.7. Fermentação

Segundo Silva (2016), O processo de fermentação baseia-se em uma série de reações químicas catalisadas pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, resumindo-se em Sacarose mais levedura resultando em etanol e gás carbônico, conforme a equação 2. O processo dura entre 6 a 12 horas, e como resultado produz o vinho fermentado, que é basicamente leveduras, açúcar não fermentado e cerca de 10% de etanol (NOVACANA⁽³⁾, 2018).

Equação 2 – Reação Química para produção de Etanol.



As dornas em nível industrial são normalmente fechadas, para a recuperação do etanol evaporado ou, que são arrastadas pelo gás carbônico. São mantidas a uma temperatura entre 33 e 35°C até o final do processo.

Existem diversas maneiras de se conduzir a fermentação, podendo ser operada em regime descontínuo, semicontínuo, descontínuo alimentado ou contínuo, podendo ou não trabalhar com recirculação do fermento (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

2.7.1. Processo Descontínuo

Esse processo, também conhecido como batelada, é caracterizado pelo preparo do meio de cultura, colocando-se em um biorreator e adiciona-se o microrganismo e se aguarda que o processo ocorra. Após o processo de fermentação, retira-se o caldo fermentado do reator e realizam-se as operações unitárias necessárias para a recuperação do produto (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

Este processo é considerado o mais seguro, pois o reator pode ser esterilizado ao final de cada batelada (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001). Apresenta-se também, grande flexibilidade de operação pela gama de fabricação de diferentes produtos, além de permitir melhor controle à estabilidade genética do microrganismo (CARVALHO e SATO, 2001).

Entretanto, a fermentação descontínua pode levar a baixos rendimentos e produtividade, devido a efeitos de inibição ou repressão, além também de desviar o metabolismo a produtos que não interessam (CARVALHO e SATO, 2001).

Basicamente, este tipo de processo, é restrito a fermentações laboratoriais, farmacêuticas e algumas destilarias de cachaça (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

2.7.2. Processo Descontínuo Alimentado

O processo, também conhecido como batelada alimentada ou “Melle-Boinot”, consiste em que o substrato é alimentado, sob condições controladas, até atingir o volume do biorreator. A vazão de alimentação pode ser constante

ou variar com o tempo, sendo a adição de mosto contínua ou intermitente (CARVALHO e SATO, 2001). A figura 2, apresentada logo a seguir, esquematiza o processo de fermentação descontínua alimentada.

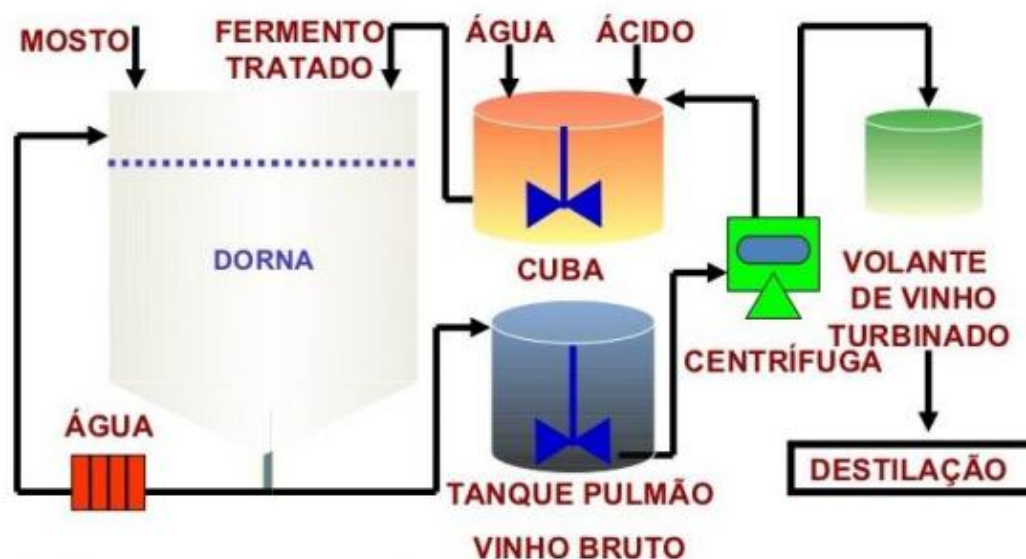


Figura 2 - Processo de fermentação descontínua alimentada (FONTE: Adaptado de VAZ *et al.*, 2016).

O processo descontínuo alimentado permite o controle da concentração de substrato, minimizando desta maneira os efeitos de inibição pelo substrato e permitindo a sua adição em momentos propícios durante a fermentação (MACNEIL e HARVEY, 1990; VIEGAS, 2003).

Segundo TOSETTO (2002), a fermentação alcoólica por processo batelada alimentada apresenta as seguintes vantagens: economia de açúcar pela menor reprodução celular, elevando o rendimento em etanol; eliminação de contaminantes e alimentação da cultura de forma pura, diminuindo a complexidade das operações da planta.

2.7.3. Tratamentos Finais

Concluída a fermentação, as leveduras são separadas por centrifugação, da mistura líquida separa-se o etanol pelo processo de destilação-retificação. 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. 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, 2018).

2.8. Cinética da Fermentação Alcoólica

A fermentação pode ser afetada em termos de rendimento e eficiência da conversão de açúcar em álcool, como fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana) (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

2.8.1 Efeito da Temperatura

Segundo Lima, Basso e Amorim (2001), as temperaturas recomendadas está situada, entre 25 e 36°C. Temperaturas inferiores retardam a fermentação enquanto temperaturas superiores ocasionam a evaporação do etanol, favorecimento de contaminações e a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol.

A produção de etanol nas indústrias é conduzida entre 25 e 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).

Amorim (2005) afirma que, na temperatura de 35°C, se mantendo a contaminação entre 5.10^6 a 1.10^7 bactérias/ml, a levedura se multiplica menos aumentando o rendimento em etanol.

Phisalaphong, Srirattana e Tanthapanichakoon (2006), em seu estudo sobre a investigação do efeito da temperatura nos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica, encontraram que a produção de etanol e biomassa, passando de uma temperatura de fermentação de 30 para 33°C, aumentavam; porém acima de 35°C, estas voltavam a diminuir conforme apresentado na figura 3.

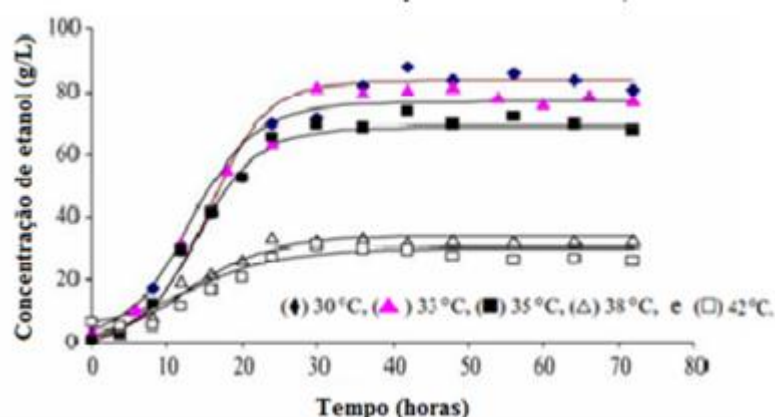


Figura 3 - Influência da temperatura na fermentação alcoólica (FONTE: Adaptado de PHISALAPHONG, SRIRATTANA e TANTHAPNAICHAKOON, 2006).

2.8.2. Efeito do pH

O pH, é um fator significativo para as fermentações industriais devido a sua importância tanto no controle da contaminação bacteriana, quanto ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos (SOUZA, 2009).

Em relação ao pH, sabe-se que as fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores, sendo adequada a faixa entre 4 e 5. Nos mostos industriais, os valores de pH geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5

(LIMA, BASSO e AMORIM, 2001). A tolerância a acidez é outra característica importante para as leveduras industriais (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001). Porém, sabe-se que valores muito baixos de pH, além de ocasionarem perda de nutrientes como nitrogênio e potássio, aumentam a sensibilidade ao etanol, aos ácidos orgânicos e ao SO₂ (GOMES, 1988).

2.8.3. Concentração de Substrato, Etanol e Fermento

O aumento na concentração de açúcares eleva a velocidade de fermentação, no qual resulta em perdas da atividade de transporte de açúcar, assim produzindo menos álcool (STEINLE, 2013). SOUZA (2009), conclui que as leveduras utilizadas em processos industriais apresentam uma osmotolerância limitada, portanto, o estresse induzido pelo aumento da osmolaridade leva a redução em crescimento e perda da viabilidade das células das leveduras.

Para Caldas; Borém e Santos (2012), os açúcares redutores totais (ART) e o etanol, em altas concentrações, exercem efeito de inibição sobre o metabolismo das leveduras, portanto o controle da adição de açúcares é de fundamental importância, não apenas para controlar ou minimizar efeitos inibitórios, tanto também, para aumentar a eficiência e produtividade da fermentação.

Para Fernandes (2008), o etanol afeta diretamente a membrana celular das leveduras. De acordo com Silva *et al.*, (2008), teores alcóolicos em torno de 7,7% (v/v), não foram suficientes para causar grande inibição. Valores acima de 11,1% podem causar inibição no crescimento celular e acima de 15,5% não ocorre mais produção de etanol. Portanto para Alves (2004), a concentração de açúcar deve ser igual a zero e de etanol em torno de 8°GL.

Conforme Lima, Basso e Amorim (2001), elevadas concentrações de inoculo permite fermentações mais rápidas, aumento da temperatura, maior controle sobre as bactérias contaminantes, além de restringir o próprio crescimento. Mas, o elevado teor de levedura exige energia de manutenção maior, ou seja, maior consumo de açúcar para manter as células vivas.

No qual resulta em maior competitividade pelos nutrientes do meio, minerais e vitaminas, diminuindo a viabilidade do fermento, portanto, é importante existir um teor ótimo de levedura na dorna.

2.8.4. Nutrientes

Segundo Lima, Basso e Amorim (2001), a nutrição balanceada das leveduras é um fator que interfere no rendimento. De acordo com Caldas; Borém e Santos (2012), a concentração de nutrientes no mosto é um dos fatores mais importantes, podendo proporcionar reflexos negativos no desempenho fermentativo, afetando a multiplicação celular e a velocidade da fermentação.

2.8.5. Tempo de Alimentação

O tempo de alimentação, que determina a velocidade de alimentação do biorreator, para processos em regime de batelada ou batelada alimentada, influencia diretamente no rendimento de fermentação, conforme ilustrado na figura 4.

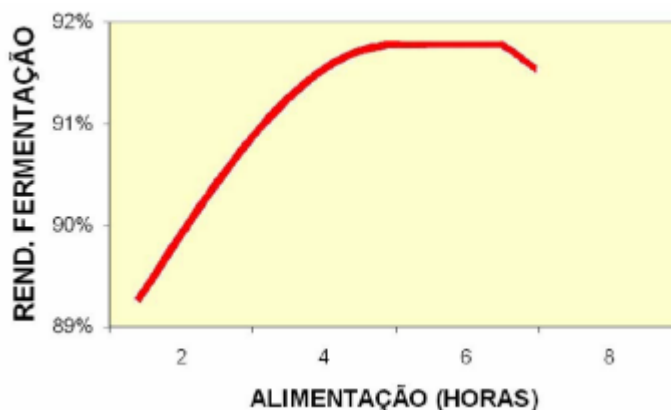


Figura 4 - Rendimento fermentativo em função da alimentação do biorreator (FONTE: Adaptado de MARTINEZ, 2007).

Tempos de enchimento muito pequenos implicam em vazões muito elevadas, que podem provocar transbordamentos do meio em fermentação devido a formação excessiva de espuma, com perdas para o processo, ou mesmo inibição do metabolismo das leveduras pelo acúmulo de substrato no

meio em fermentação. Além dessas perdas, o tempo de fermentação pode aumentar, e por isso, diminuir a produtividade (VASCONCELOS e VALDMAN, 1988).

2.8.6. Contaminação Bacteriana

Quando a contaminação bacteriana supera a quantidade de 10^7 células/ml de mosto, pode ocorrer significativa perda de rendimento em etanol (ALCARDE; HORII; NOBREI, 2007). 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, a perda de viabilidade celular pela contaminação devido a substâncias como os ácidos lático e acético e a competição por nutrientes do meio (GOMES, 2009).

Conforme Martins (1997) apud Paschoaline; Alcarde (2009), a eficiência do processo fermentativo é dada em função direta da manutenção das células ativas dispersas no mosto. A remoção das células, devido à floculação, reduz o rendimento e aumenta o tempo de fermentação.

2.9. Parâmetros Cinéticos

Conforme os fatores que afetam a cinética de fermentação, neste tópico serão introduzidos conceitos dos parâmetros cinéticos utilizados no presente trabalho, como concentração celular, substrato e etanol em função do tempo, velocidades volumétricas de crescimento, consumo do substrato e formação de produto, além das velocidades específicas de crescimento, consumo e formação de produto. Bem como os fatores de conversão.

O estudo cinético de um processo de fermentação é muito importante, pois, permite a aquisição do conhecimento básico do processo. A cinética de fermentação está relacionada com a velocidade de consumo de substrato e de aparecimento de produto e no caso mais específico de processos de fermentação utilizando leveduras, também com a velocidade de crescimento celular e o efeito que estas sofrem por influência das condições do meio em processo (ANDRIETTA, 2007), anteriormente citadas no tópico 2.9. Consiste

inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Esses componentes são: microrganismos, substratos e produtos (Borzani *et al.*, 2001).

Tais valores experimentais quando representados em função do tempo, permitirão os traçados das curvas de ajuste conforme as equações 3, 4 e 5.

Equação 3 - Leveduras em função do tempo.

$$X=X(t)$$

Equação 4 – Produto em função do tempo.

$$P=P(t)$$

Equação 5 - Substrato em função do tempo.

$$S=S(t)$$

No qual representam o ponto de partida para a descrição de uma fermentação, possibilitando uma comparação quantitativa entre as diferentes condições de cultivo, por intermédio de variáveis, como: as velocidades volumétricas, velocidades específicas e fatores de conversão, obtidas a partir das curvas de ajuste citados anteriormente (Borzani *et al.*, 2001).

2.10. Considerações Finais

Diante das considerações apresentadas neste tópico de Revisão Bibliográfica, verifica-se a importância de diversos fatores na fermentação alcoólica e a constante busca de novas tecnologias no aumento do rendimento e produtividade em etanol pelas indústrias. O presente estudo propõe uma utilização de um processo de clarificação do mel, visando não somente a clarificação, mas um estudo cinético da fermentação. No qual se pode citar diferentes formas de conduzir a fermentação, apresentação das velocidades cinéticas de consumo dos açúcares redutores (AR) e de produção do etanol, além das velocidades volumétricas para os ensaios descontínuos, bem como o rendimento e produtividade em etanol dos mesmos.

3. Materiais e Métodos

3.1. Substrato

Foram utilizadas como substrato nos ensaios fermentativos, soluções diluídas, invertidas e clarificadas 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).

3.2. Nutrientes

Utilizaram-se em todos os ensaios fermentativos, 10 ml das soluções de Ureia a 40 g/L e de KH_2PO_4 a 100 g/L para suplementar possíveis carências de nitrogênio, potássio e fósforo, garantindo o açúcares redutores (AR) como substrato limitante da fermentação alcoólica.

3.3. Microrganismo

Foi utilizado o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* na forma de Fermento Seco Fleischmann®.

3.4. Fermentador

Utilizou-se um frasco kitassato de 1 litro como fermentador, provido de uma rolha na parte superior e uma mangueira lateral, cuja saída permanecia imersa em um béquer com água, dessa forma, tornando-se um frasco fechado. Utilizou-se um banho termostático (TECNAL, modelo TE-184) para conservar a temperatura constante.

3.5. Processos de Clarificação do Mel

3.5.1. Método da calagem e adição de polieletrólito

Adicionou-se leite de cal (10%) em mel diluído a 150 g/L de AR, em conta gotas, até o pH entre 7,0 e 7,5, em constante agitação. Adicionou-se o polieletrólito aniônico de alumínio PAC na concentração de 2ppm. Deixou-se em repouso por 24 horas. Utilizou-se o método de Honig (1953) modificado.

3.5.2. Método utilizando polieletrólito aniônico de alumínio (PAC)

Preparou-se uma suspensão de PAC, cedida previamente pela Sanepar, de concentração de 28g/L, no qual, utilizou-se diferentes concentrações no mel invertido a 300g/L, concentrações em v/v de 1%, 2%, 2,5%, 5%, 10%, 15% e 20%. (BARROS, 2018) modificado.

3.5.3. Método utilizando ácido sulfúrico e fosfórico

Foram utilizados amostras de mel a 150g/L. Utilizou-se primeiramente, o ácido sulfúrico e comparou-se com o ácido fosfórico, por este possuir maior poder complexante que o primeiro, podendo, desta forma, retirar principalmente os metais pesados presentes no melaço. Ajustou-se o pH do melaço para 3,0 com o ácido escolhido, deixou-se em repouso por 24 horas a temperatura ambiente; então a amostra foi centrifugada a 5000 rpm por 15 minutos (ROUKAS, 1998).

3.5.4. Método utilizando EDTA

A solução do mel na concentração de 150g/L, foi ajustada para o pH 5.5 utilizando HCl 2N, e aquecida até fervura em torno de 100°C por 15 minutos. O líquido foi então tratado ainda quente, com 100 ppm de EDTA, para se obter a precipitação de metais pesados. A mistura ficou em repouso por 24 horas em

temperatura ambiente, então centrifugada a 5000 rpm por 20 minutos (ROUKAS, 1998).

3.5.5. Método utilizando terra de diatomácea

Inicialmente, utilizou-se terra diatomácea nas concentrações de 4% e 8% (massa/massa) e o mel na concentração de 150g/L de AR. As amostras foram submetidas à agitação por um agitador magnético durante 30 minutos, logo após, deixou em repouso por 24 horas (TREICHEL, 2004) modificado.

3.5.6. Utilização de OCTAPOL

Adicionou-se 100 ml do mel diluído a 150 g/L de Açúcares Redutores (AR), em um balão de fundo chato de 200 ml, equipado com uma tampa. Adicionou-se cerca de 5 a 6 g do reagente OCTAPOL, um clarificante produzido pela Baddley Chemicals Inc., depois tampou-se bem e agitou vigorosamente por cerca de 20 segundos. (Baddley Chemicals Inc.).

3.6. Diluição inicial, inversão e clarificação.

Para o preparo de 6L de mel invertido a 318 g/L de ART seguiu-se a metodologia:

- 1) Mediu-se 3 litros do mel rico concentrado (aproximadamente 600 g/L de ART) e transferiu-se para um erlenmeyer de 6 L;
- 2) Adicionou-se ao Erlenmeyer, 300 mL de uma solução tampão de acetato a pH 4,5;
- 3) Pesou-se 0,36g da enzima invertase e adicionou-se ao erlenmeyer;
- 4) Completou-se o volume do erlenmeyer para 6 L;
- 5) Leva-se o erlenmeyer a um banho termostático a 50°C, com agitação, por, pelo menos, duas horas;
- 6) Em seguida, essa solução foi esterilizada em autoclave, a 121°C, por 20 minutos;

- 7) Por fim, a concentração de ART dessa solução, foi medida em triplicata.

Os ensaios foram realizados diluindo-se a solução obtida, utilizando-se esse método. Após as diluições, faz-se uso do processo de clarificação, dito no item 3.5.6, utilizando polieletrólito aniônico de alumínio.

3.7. Esterilização

- 1) Embalou-se uma série de instrumentos que foram utilizados nas fermentações realizadas, dentre os quais se podem destacar: os erlenmeyers com mel diluído, com ureia e com KH_2PO_4 , um erlenmeyer de um litro com cerca de 1000 ml de água destilada, um erlenmeyer de meio litro vazio e Kitassatos de um litro (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, embalados com fita adesiva e papel jornal ou Kraft;
- 2) Colocaram-se os instrumentos em autoclave, fechou-se a mesma e deixou-se por 20 minutos a pressão relativa de um atm. (aproximadamente 120 °C), desligando-se o equipamento e retirando-se no dia seguinte pela manhã, após o resfriamento do mesmo.

3.8. Preparo do Inóculo

1. Em capela de fluxo laminar, previamente limpa com álcool 70%, suspendeu-se aproximadamente 15-20g de levedura na forma de Fermento Seco, Fleischmann®, em 200 ml de água.
2. Adicionou-se 10 ml de Ureia e 10 ml de KH_2PO_4 com uma pipeta volumétrica no mesmo frasco, conforme citado no item 3.2.

3.9. Condução dos ensaios

Foram utilizados dois tipos de substrato: mel invertido e mel invertido e clarificado. Ambos os açúcares, foram suplementados de acordo com o item 3.2. Os ensaios foram realizados de modo a se obter parâmetros cinéticos e de rendimento, além de verificar o comportamento da levedura. Para este fim, como variáveis, utilizaram-se: a concentração inicial de substrato (S, AR em g/L), o tipo de substrato utilizado como já dito anteriormente (mel invertido ou mel invertido e clarificado), o regime de operação (descontínuo {batelada}, descontínuo alimentado com alimentação em pulsos e descontínuo alimentado com alimentação variada) e a concentração inicial de célula. Mantiveram-se fixas, a temperatura em 32°C e, não foi ajustado o pH inicial. A tabela 1 abaixo resume, de maneira geral, as condições de cada ensaio realizado.

Tabela 3 - Condições iniciais dos ensaios realizados.

Ensaio	Inserção Mel	Regime de Operação	Clarificação Prévia do AR	Concentração de AR (g/L)
1				33,04
2			Não	32,02
3				53,99
4*		Descontínuo		20,77
5*			Sim	27,30
6*				164,03
7*				66,91
8	1 2* 3*	Descontínuo Alimentado C/ Alim. Em Pulsos	Não Sim	33,40 21,55 24,60
9	1 2*		Não Sim	31,62 151,79
10	1 2*		Não Sim	31,52 48,03
11	1 2*	Desc. Alim. C/ Alim. Const.	Não Sim	29,57 71,26
12	1* 2*		Sim	66,91 84,84

*Mel Invertido e Clarificado.

3.9.1. Ensaios em regime Descontínuo

Os ensaios descontínuos, de maneira geral, utilizaram-se os seguintes passos para a sua realização:

1. Esterilizam-se todas as vidrarias e materiais que serão utilizados no ensaio.
2. Em capela de fluxo laminar, previamente limpa com álcool 70%, suspendeu-se aproximadamente 15-20g de levedura em 200 ml de água, adicionando 10 ml de Ureia e 10 ml de KH_2PO_4 , conforme citado no item 3.2. Pesaram-se quantidades de substrato de modo a se obter a concentração inicial desejada de AR. Faz-se necessário a diluição e inversão prévia do mel concentrado, além de para alguns ensaios a prévia clarificação do mel.
3. Ainda em capela de fluxo laminar, também se pesa quantidade suficiente de mel para obter-se a concentração inicial em torno de 20 - 150g/L, e completa-se para se obter uma massa final (Volume) em aproximadamente em 900g de mosto. Transfere-se tudo para frascos kitassatos de 1L.
4. Em seguida, o fermentador, era colocado em banho térmico para controle de temperatura e iniciavam-se as fermentações.
5. A retirada de amostras foi realizada em tempos determinados. Agitou-se o fermentador e retirou-se amostras de mosto com uma pipeta de vidro de 20 ml já autoclavada.
6. As amostras eram levadas a um banho de gelo por 3 minutos e logo após, centrifugadas a 5000 rpm por 5 min.
7. Em seguida, o sobrenadante, era coletado em frascos de 15 ml, medindo seu pH, utilizando pHmetro. As células foram lavadas e centrifugadas mais 2-3 vezes, para retirar resíduos do sobrenadante.
8. Após o ensaio, foram realizadas as análises para medir a concentração de células, AR e etanol.

3.9.2. Ensaios em regime descontínuo alimentado

Os ensaios, em regime descontínuo alimentado, foram realizados pela mesma metodologia do item 3.6.1, apenas o modo de alimentação era diferenciado. Abaixo, segue-se a condução da alimentação para cada ensaio de forma separada.

Ensaio 7 (E7)

Foi conduzida de forma que se adicionaram três pulsos de mel. No primeiro pulso, foram adicionados 300g de mel invertido a 100g/L em um volume final medido em massa em torno de 900g, após a fermentação, no qual, duraram 90 minutos, tendo uma massa final de cerca de 790g.

Logo em seguida, foi inserido mel invertido e clarificado para completar novamente a massa de 900g de mosto. Estes processos de adicionar novamente mel invertido e clarificado levaram cerca de 10 minutos para iniciar novamente as fermentações.

Repetiu-se o processo anterior para o terceiro pulso.

Ensaio 8 (E8)

Este ensaio foi conduzido de forma semelhante ao ensaio 8, todavia, apenas 2 pulsos de mel. O primeiro pulso foi realizado pelo mesmo processo citado anteriormente para o ensaio 8 (E8). Adicionaram-se 300g de mel invertido a 100g/L em uma massa final de 900g e, após a fermentação de 90 minutos, retirou-se cerca de 200g do mosto.

Logo em seguida, foi inserida 305g de mel invertido e clarificado, ou seja, apresentando uma concentração inicial de AR de 150g/L. Neste segundo pulso a fermentação ocorreu em 180 minutos.

Ensaio 9 (E9)

Para o ensaio 9, a alimentação foi conduzida de forma diferente. Ao invés de uma alimentação em pulsos, alimentou-se de forma contínua por um período que denominou-se de “enchimento”, em que adiciona-se mel invertido e clarificado em uma determinada vazão.

Na primeira fase, utilizou-se de uma fermentação descontínua como nos ensaios 7 e 8. Após o término da fermentação, retirou-se quantidade de mosto para que ao se completar com 300g de mel invertido e clarificado, novamente apresentasse massa final de 900g.

Alimentou-se cerca de 300g do mel, na concentração de 150g/L e com vazão de 3 g/min, esse período de alimentação durou 100 minutos. Logo após o término da alimentação, o regime da fermentação volta a se tornar descontínua.

Ensaio 10 (E10)

Para o ensaio 10, alimentou-se de forma contínua por um período conforme o ensaio 9, porém em uma vazão maior, 10 ml/min.

Na primeira fase, utilizou-se de uma fermentação descontínua como nos ensaios 7 e 8. Após o término da fermentação, retirou-se quantidade de mosto para que ao se completar com 300g de mel invertido e clarificado, novamente apresentasse massa final de 900g.

Logo após, alimentou-se cerca de 300g do mel, na concentração de 150g/L e vazão de 10g/min, no qual duraram 30 minutos.

Ensaio 11 (E11)

No ensaio 11, foi conduzida de forma diferente a alimentação. Alimentou-se um pulso e depois de forma contínua por um período em que se denominou de “enchimento”, em que se adicionou mel invertido e clarificado em uma determinada vazão, agora a mesma que para o ensaio 9, 3g/min.

Portanto, conduziu-se o ensaio 11. Na primeira fase, foram adicionadas 100g de mel invertido e clarificado a 210 g/L em um volume de 300g, o que daria aproximadamente uma concentração inicial de 70,00 g/L. Sendo assim, temos que nossa concentração inicial de AR real foi de 66,91 g/L. Logo após a fermentação que durou 90 minutos, no qual foi retirada aproximadamente 15 ml de mosto por amostra, obteve-se, no final, 210g de mosto.

Logo em seguida, foi adicionado quantidade de mel invertido e clarificado para que se complete novamente ao volume final 300g, ou seja, adicionou-se cerca de 90g de mel invertido e clarificado, isto é, adicionou-se primeiramente um pulso na Concentração de 145 g/L.

Também se iniciou a adição de 600g de mel invertido e clarificado, para uma massa final de 900g no seu total, a 145 g/L na vazão de 3 g/min, no qual durou cerca de 163 minutos para o final do “enchimento”.

3.10. Métodos Analíticos

3.10.1. Medida de pH

Após a centrifugação das amostras, separando o vinhedo da levedura, mediu-se o pH das amostras utilizando pHmetro previamente calibrado.

3.10.2. Medida de CO₂ (medida qualitativa)

Após iniciada a fermentação, em tempos distintos, mede-se o número de bolhas de gás carbônico desprendida durante um minuto.

3.10.3. Medida de Biomassa

Método Espectrofotométrico: suspendeu-se uma alíquota da amostra de material celular e, então, mede-se sua absorbância a 610nm. A diluição é feita de modo a concentração celular na amostra diluída estar na faixa de 0 a 0,6 g/L em massa úmida (OLIVO, 1985).

A curva padrão, foi confeccionada medindo a concentração celular de várias amostras pelo método espectrofotométrico, plotando esses valores em um gráfico obtemos a curva padrão utilizada. A curva padrão está apresentada no Apêndice A.

3.10.4. Medida de concentração de substrato

Método DNS modificado: essa metodologia utiliza o DNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico), proposta primeiramente por Sumner, 1921, modificada para um comprimento de onda diferente e uma diluição da amostra com água por Zanin e Moraes, 1987.

A curva padrão foi confeccionada medindo a concentração de AR em várias amostras pelo método DNS. Plotando esses valores em um gráfico, obteve-se a curva padrão utilizada. A curva padrão está apresentada no Apêndice B.

3.10.5. Medida de concentração de etanol

Uma alíquota de 7 ml de cada amostra, foi destilada utilizando um microdestilador (TECNAL TE-012). Em seguida, essas amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás VARIAN, modelo 3300, utilizando coluna Porapak Q. O injetor do cromatógrafo foi mantido a 120°C, o detector a 150°C e a coluna a 100°C. A fase móvel utilizada foi gás hélio. Foram injetados 1 µL de amostra e cada corrida durava 3 minutos (SILVA, 2016).

3.11. Determinação dos parâmetros cinéticos

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste inicialmente na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo (biomassa, substrato, produtos), em função do tempo de fermentação. A concentração microbiana (X) aumenta durante um cultivo descontínuo, aumentando conseqüentemente a concentração do complexo enzimático responsável pela transformação do substrato (S) no produto (P) (HISS, 2001).

A partir dos dados obtidos, foram ajustadas curvas para as futuras análises dos valores de concentrações estudadas. No caso da concentração microbiana, foram utilizados ajustes constantes, no qual se pode indicar o comportamento da concentração celular. Para as concentrações de Substrato e Produto é possível fazer um paralelo, com ajustes polinomiais que melhor representa seus aspectos, em cada ensaio realizado. Os ajustes realizados e suas equações que o regem, estão apresentados no apêndice C.

Desse modo, utilizam-se os valores das velocidades instantâneas de crescimento celular, consumo de substrato e formação do produto com respeito ao valor de X em um dado instante, segundo as equações 6,7 e 8 abaixo (GADEN, 1955):

Equação 6 - Velocidade específica de crescimento

$$\mu_X = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

Equação 7 - Velocidade específica de consumo de substrato

$$\mu_S = \frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt}$$

Equação 8 - Velocidade específica de formação de produto

$$\mu_P = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt}$$

3.11.1. Determinação das Velocidades Específicas de Crescimento, Consumo e Produção de Etanol.

Para se calcular as velocidades específicas de crescimento, consumo e produção de etanol, utilizou-se a metodologia proposta por Gombert, citada por Hiss, 2001. Essa metodologia apresenta uma forma bastante prática e simples de calcular velocidades específicas a partir de dados experimentais de cultivo de células. Para isso, desenvolveu-se uma planilha do Microsoft Excel contendo equações do método geométrico de cálculo de derivadas.

3.11.2. Determinação das Velocidades de Crescimento, Consumo e Produção de Etanol.

As velocidades instantâneas foram calculadas a partir das velocidades específicas de Consumo de Substrato e Produção de Etanol. Segundo as equações 9 e 10.

Equação 9 – Velocidade Instantânea de Consumo de Substrato.

$$r_S = X \cdot \mu_S$$

Equação 10 - Velocidade Instantânea de Produção de Etanol.

$$r_p = X \cdot \mu_p$$

3.11.3. Cálculo dos Fatores de Conversão e Rendimento.

Os fatores de conversão $Y_{X/S}$ e $Y_{P/S}$ foram calculados por meio do coeficiente angular que relaciona a quantidade de microrganismo ou etanol produzido com o consumo do substrato. Foram calculados segundo as equações:

Equação 11 - Cálculo do fator de conversão do substrato em célula

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

Equação 12 - Cálculo do fator de conversão do substrato em produto

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

4. Resultados e Discussões

4.1. Resultados Clarificação

Primeiramente, através da teoria observada no item (2.3.), denota-se que os métodos clássicos de clarificação do caldo de cana, estão cada vez mais em desuso. Pode-se notar que industrialmente, não se empregam mais os métodos separadamente, agora são empregados métodos em conjuntos, como basicamente a sulfitação junto com a calagem e adição de compostos poliméricos. E ainda assim, novos métodos de clarificação estão sendo testados, para substituição dos métodos clássicos no futuro.

No presente trabalho, não se trabalharam com os métodos da sulfitação e da fosfatação, pois os elementos como o enxofre é um composto altamente tóxico, além de produzir como precipitado, sulfito de cálcio. Por este motivo, trabalhou-se com os processos alternativos da clarificação do caldo para se clarificar o mel.

Observaram-se na tabela 4, os dados obtidos dos diversos testes preliminares de clarificação do mel, no qual, constatou-se que, os melhores resultados em volume precipitado de coloides foram: utilização do tratamento de calagem com utilização de polieletrólito e a utilização somente de polieletrólito de alumínio na concentração de 5% em volume. No qual obteve-se em ambos os casos cerca de 20ml de volume precipitado e os melhores resultados referentes a perda de açúcares redutores 10% e 2% respectivamente. Portanto escolheu-se para os ensaios fermentativos o método utilizando polieletrólito de alumínio como processo de clarificação neste trabalho.

Tabela 4 - Dado sobre os volumes precipitados de coloides e perdas de açúcares redutores

Método	V amostra (ml)	V precipitado (ml)	Perda de Açúcar
Octapol®*	50	8	13%
Cal Hidratado	50	20	10%
Ácido Sulfúrico	50	15	15%
Ácido Fosfórico	50	15	15%
EDTA	50	10	13%
Terra Diatomácea	50	20	11%
Polieletrólito	50	20	2%

* O OCTAPOL® é um reagente químico com multi componentes, desenvolvido pela Baddley Chemicals Inc. para clarificação do caldo e a determinação da sacarose contida na cana de açúcar e ou na beterra, nas usinas e destilarias, antes da análise polarimétrica.

4.2. Resultados das fermentações descontínuas

Os resultados referentes às fermentações descontínuas estão apresentados concomitantemente as suas respectivas discussões, tanto ensaio a ensaio, quanto em grupos de ensaios, estes referenciados na tabela 3 do capítulo de materiais e métodos (item 3.9.). As tabelas e figuras que seguem nas próximas páginas apresentam uma série de informações relativas às amostras de mosto coletadas, dentre os quais se encontram: pH do mosto, variação de CO₂ (medida qualitativa), concentração celular, concentração dos açúcares redutores (AR), concentração de etanol e velocidades específicas de consumo de substrato e de produção de etanol em função do tempo. Os dados, referentes ao desprendimento de CO₂, estão apresentados no apêndice D, e suas respectivas tabelas.

Nos ensaios descontínuos, compararam-se os resultados utilizando mel invertido e mel invertido e clarificado, em que se utilizaram concentrações em torno de 20 – 150 g/L, e concentrações celulares da ordem de 13 g/L à concentrações aproximadas de 20 g/L em massa seca. Nos ensaios, de 1 a 3

foram realizados, utilizando mel invertido não clarificado. Por outro lado, nos ensaios 4 a 6 foram utilizados mel invertido e clarificado.

4.2.1. Resultados referentes às fermentações descontínuas utilizando mel invertido

Ensaio 1 (E1)

A tabela 5, apresenta os resultados das diversas variáveis avaliadas durante o tempo de fermentação, como os resultados de pH, concentração celular, concentração de açúcares redutores, concentração de etanol, velocidades específicas de consumo dos açúcares redutores e produção de etanol em função do tempo.

Tabela 5 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 1.

Tempo	pH	X	AR	Etanol	μ_S	μ_P
0	5,18	17,64	33,04	0,73	0,0295	0,0050
15	5,01	17,64	25,28	2,05	0,0312	0,0083
30	4,89	17,64	17,10	4,23	0,0289	0,0100
45	4,86	17,64	9,50	6,86	0,0228	0,0102
60	4,87	17,64	3,49	9,54	0,0129	0,0088
75	4,93	17,64	0,10	11,85	0,0000	0,0059
90	4,95	17,64	0,33	13,40	0,0000	0,0059

A partir da tabela 5, representam-se os dados e as curvas ajustadas, quanto à variação das concentrações de células, AR e etanol em função do tempo, Apresentada na figura 5.

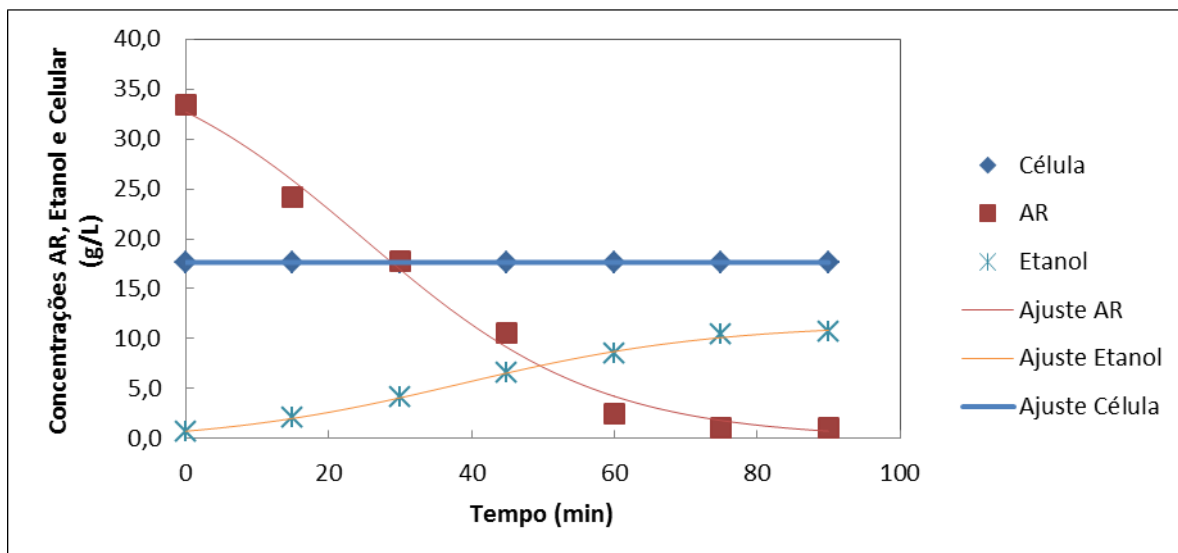


Figura 5 - Variação das concentrações de células, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 1.

Verifica-se, através das curvas da figura 5, nesse ensaio realizado em baixa concentração inicial de açúcares redutores (AR), com cerca de 33,00 g/L, seu consumo se deu em 90 minutos, isso em função da elevada concentração celular utilizada, em torno de 17,7 g/L em massa seca. Tal consumo do AR levou a produção de etanol na ordem de 13,40 g/L, portanto 78,4% do valor estequiometricamente possível.

A figura 6, mostra os dados da variação de gás carbônico (CO_2) e do pH em função do tempo, observou-se desses dados do desprendimento de gás carbônico, um comportamento associado ao consumo do substrato e à formação do etanol, mesmo sendo uma medida meramente qualitativa do número de bolhas desprendidas ao longo da fermentação.

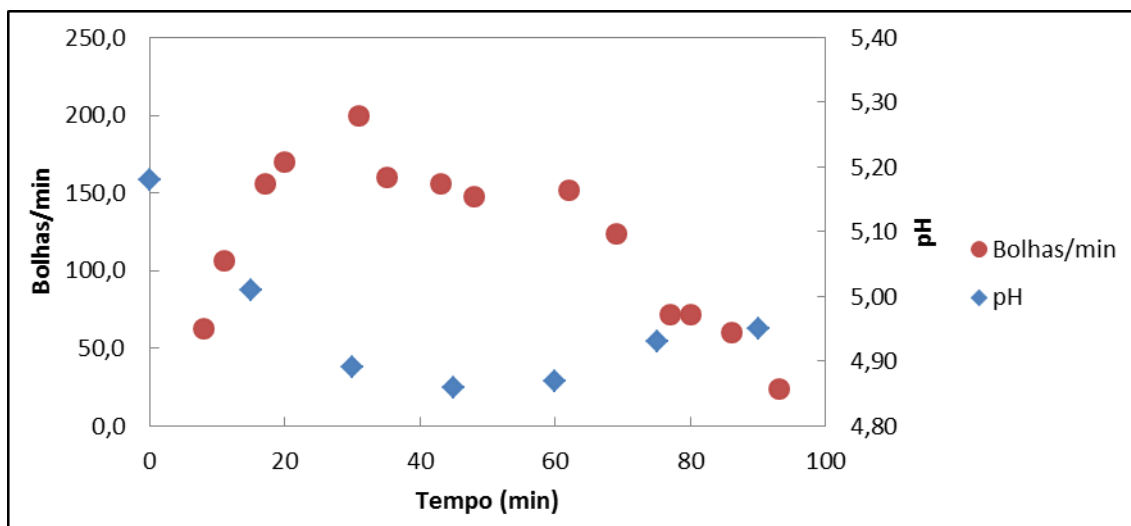


Figura 6 - Variação de CO₂ (medida qualitativa em bolhas/min) e pH em função do tempo, para o ensaio 1.

Em conformidade com a figura 6, verifica-se a diminuição do pH ao longo de grande parte do ensaio, diminuindo de um valor aproximadamente de 5,18 para um mínimo de 4,86, em 45 minutos de fermentação, voltando a subir logo em seguida, e atingindo no final da fermentação valores da ordem de 4,95. Aliado ao que se observa no perfil de pH, constatou-se, que a curva qualitativa de bolhas de dióxido de carbono (CO₂) desprendido ao longo do cultivo, corrobora com tal mudança dos valores de pH. Ou seja, o desprendimento de CO₂ ao longo da fermentação, provoca uma diminuição do pH do meio fermentativo.

A figura 7 apresenta os resultados das velocidades específicas de consumo do substrato e formação de produto calculado, obtidas a partir das curvas ajustadas e pelo método geométrico, conforme citado no capítulo de materiais e métodos.

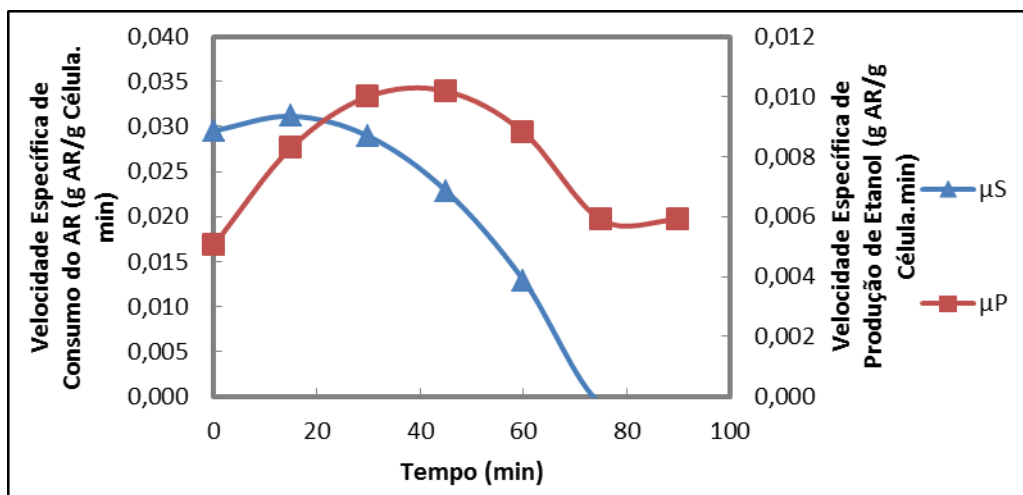


Figura 7 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 1.

Através dessa figura 7, verifica-se para esse ensaio em particular, que a velocidade de consumo do AR foi mais elevada no início do cultivo, chegando ao seu máximo em 15 minutos. Enquanto a velocidade de produção de etanol é mais elevada no meio do cultivo, chegando ao seu máximo em 45 minutos.

Portanto para este primeiro ensaio, observa-se que a produção de etanol parece não estar totalmente associada ao consumo de substrato (AR), mas pode-se supor que essa defasagem esteja ocorrendo devido a imprecisão dos resultados experimentais tanto nas medidas dos dados quanto em seus ajustes e manipulações matemáticas, visto que o processo de produção de etanol é sistematicamente associado ao consumo do substrato.

Ensaio 2 (E2)

A tabela 6 apresentam os resultados das diversas variáveis avaliadas durante o tempo de cultivo, como já descrita anteriormente.

Tabela 6 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 2.

Tempo	pH	X	AR	Etanol	μ_S	μ_P
0	5,14	18,20	32,02	1,00	0,0047	0,0034
15	4,90	18,82	30,60	2,03	0,0111	0,0053
30	4,81	20,00	25,14	4,16	0,0215	0,0080
45	4,83	18,75	17,65	6,78	0,0251	0,0086
60	4,78	21,18	10,15	9,30	0,0215	0,0072
75	4,81	19,97	4,69	11,09	0,0111	0,0038
90	4,81	22,50	3,27	11,55	0,0047	0,0016

A partir dos dados apresentados pela tabela 6, obtém-se as curvas apresentadas pelas figuras 8 e 10.

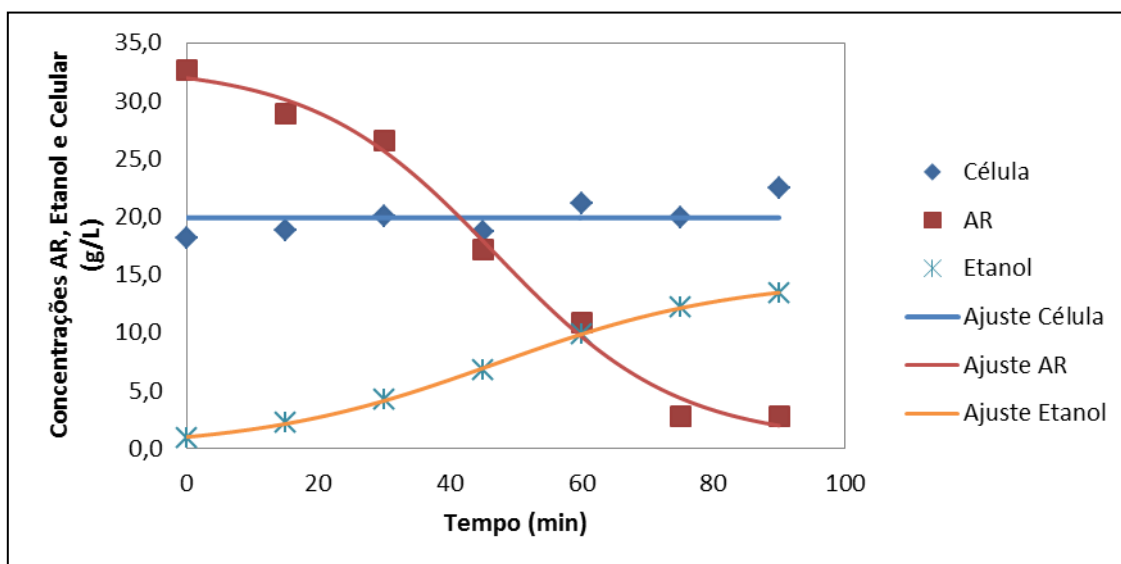


Figura 8 - Variação das Concentrações de Células, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 2.

Na figura 8, constatou-se inicialmente que o ensaio também foi realizado em baixa concentração inicial de açúcares redutores (aproximadamente 32,0 g/L), e que a fermentação se deu em torno de noventa minutos, devido a elevada concentração celular utilizada no inóculo, em torno de 20,0 g/L em massa seca.

Neste ensaio, pode-se perceber a variação na concentração celular e sua dificuldade nas medidas.

Também através da figura 8, pode-se verificar que o consumo de AR, levou a produção de etanol na ordem de 11,5 g/L, portanto 78,6% do valor teórico possível de ser produzido.

A figura 9, diz respeito à variação de gás carbônico (CO₂) em função do tempo, observou-se como uma medida qualitativa do número de bolhas desprendidas ao longo da fermentação.

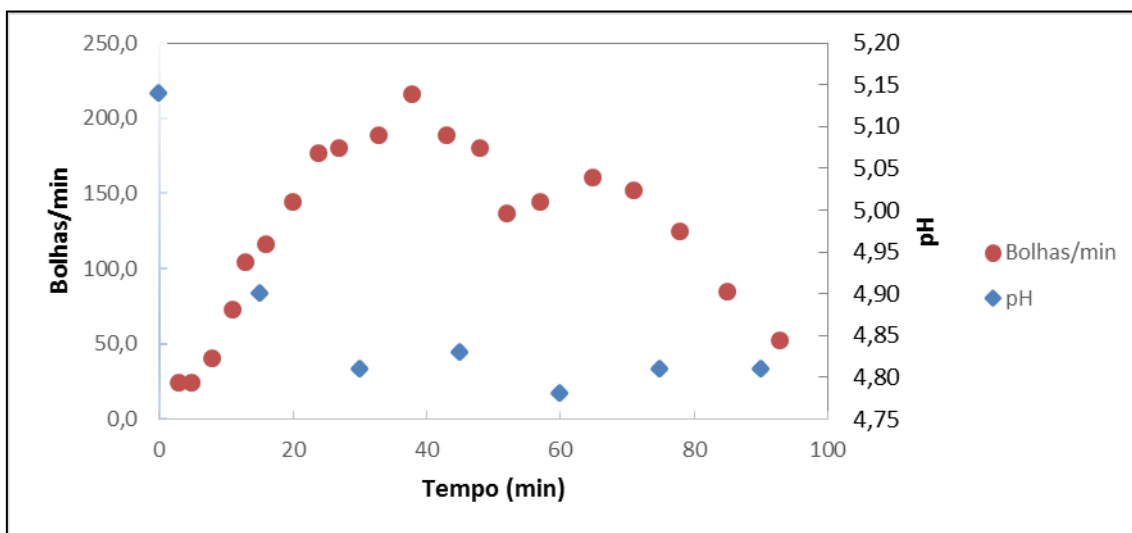


Figura 9 - Variação de CO₂ (medida qualitativa: bolhas/min) e pH em função do tempo, para o ensaio 2.

Através da figura 9, também se notou a ocorrência de uma diminuição do pH, de um valor de 5,14 para um mínimo de 4,81, em 30 minutos de fermentação, e a partir deste valor, verifica-se que o pH se mantém praticamente constante, apresentando apenas variações pequenas no decorrer da fermentação. Neste caso, a curva do gás carbônico demonstra melhor de como se deu a fermentação, apresentando um alto desprendimento de bolhas a partir dos 30 minutos, chegando a apresentar 200 bolhas/min, corroborando assim com a queda de pH. E nos minutos finais, observa-se a queda de CO₂ desprendido, indicando o final da fermentação.

A figura 10, neste ensaio, demonstra o perfil de uma fermentação, em que se observa fielmente que a produção de etanol está associada ao consumo de substrato, no caso, os açúcares redutores.

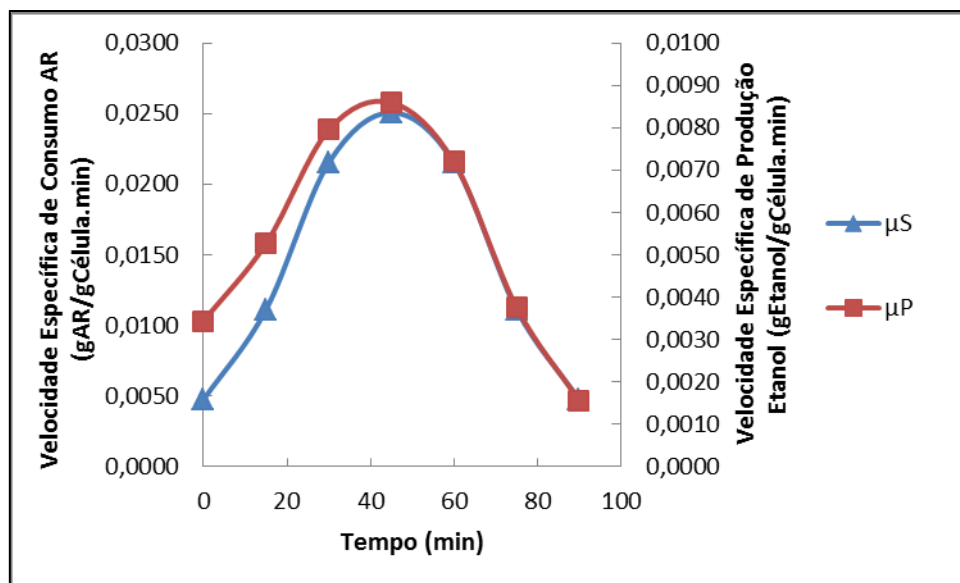


Figura 10 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio dois.

Ensaio 3 (E3)

A tabela 7 apresenta os resultados das diversas variáveis avaliadas durante o tempo de fermentação, conforme os ensaios anteriores.

Tabela 7 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio3.

Tempo	pH	X	AR	Etanol	μ_S	μ_P
0	5,14	19,38	53,99	1,03	0,0133	0,0027
15	4,88	19,38	50,26	1,97	0,0213	0,0053
30	4,84	19,38	40,14	3,46	0,0367	0,0065
45	4,81	21,43	32,17	5,84	0,0320	0,0065
60	4,91	20,00	16,87	8,20	0,0315	0,0070
75	4,95	17,65	9,74	10,92	0,0261	0,0062
90	4,99	20,09	4,56	12,85	0,0159	0,0019

Segundo a tabela 7, avaliaram-se as curvas e dados da variação das concentrações celulares, AR e etanol em função do tempo (figura 11). Variação das curvas das velocidades específicas (μ_S e μ_P) em função do tempo (figura 13). Além dos dados de CO_2 desprendido e pH em função do tempo (figura 12).

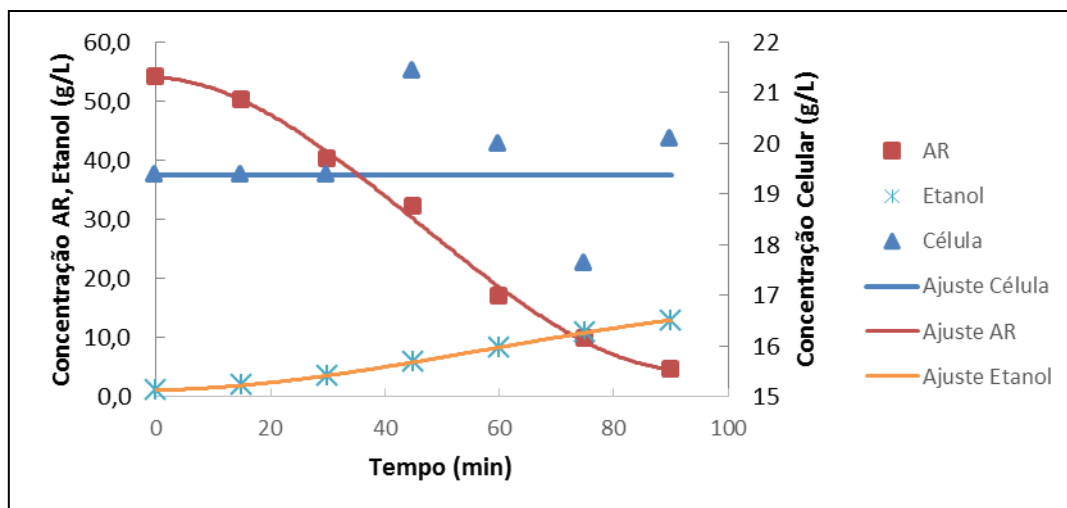


Figura 11 - Variação das Concentrações Celular, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 3.

Através da figura 11, notam-se perfis semelhantes apresentados nos ensaios anteriores, porém diferenciados na produção de etanol. Neste caso, apresentando praticamente um perfil de uma semirreta. Contudo, neste ensaio, a concentração de açúcares redutores inicial, é da ordem de 54 g/L, superior aos dois primeiros ensaios. Além disso, constatou-se que a concentração final de etanol atinge 11,8 g/L de etanol, em vista disso, o valor foi muito abaixo do valor teórico esperado, tendo um rendimento final de cerca de 47%. Aliado a isso, a concentração celular a partir de 50 minutos de fermentação, passa a ter resultados muito controversos, demonstrando uma grande imprecisão nas coletas das amostras que aparentemente afetou os resultados desse ensaio.

Todavia, observa-se através dos dados da figura 8, a ocorrência de uma variação do pH e do desprendimento do gás carbônico compatível com uma fermentação normal, que não foi bem conduzida em sua avaliação tanto na concentração celular quanto da produção do etanol nos períodos finais da fermentação.

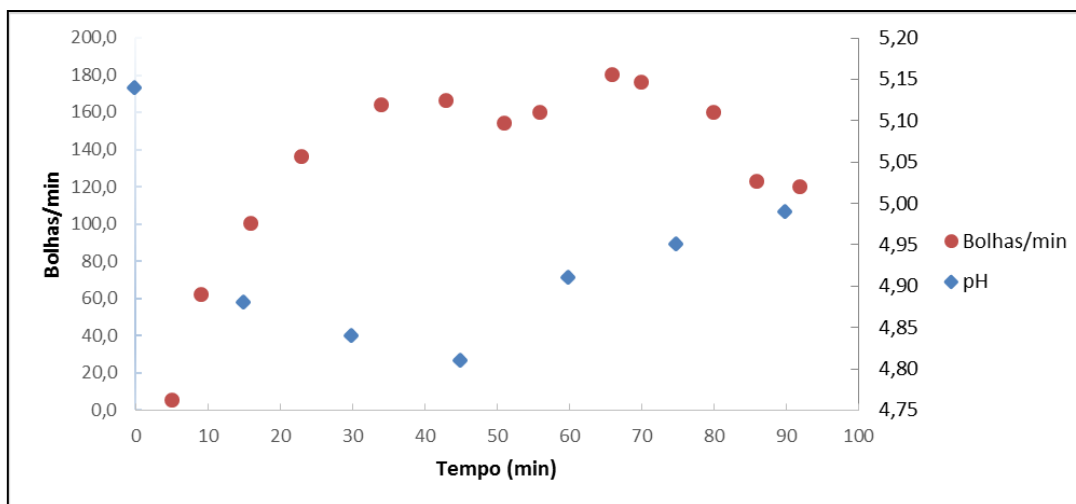


Figura 12 - Variação de CO₂ (medida qualitativa: bolhas/min) e pH em função do tempo, para o ensaio 3.

Embora os resultados obtidos não tenham sido de grande valia, a figura 13, demonstra, novamente, que a produção de etanol está associada ao consumo de substrato, embora em uma escala bastante inferior no caso da produção do etanol.

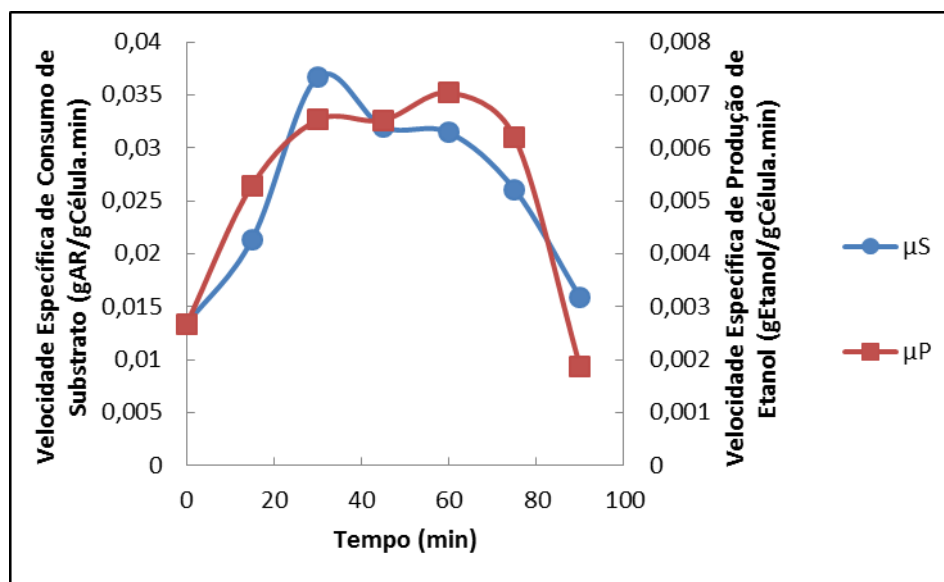


Figura 13 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 3.

4.2.2. Discussão Geral dos ensaios descontínuos utilizando mel invertido

Todos os ensaios apresentaram comportamentos similares quanto a suas cinéticas: de consumo de substrato (AR), e de produção do etanol em função do tempo. Pode-se verificar a não ocorrência de crescimento celular significativo, devido, principalmente ao fato que os ensaios, foram realizados com altos valores de concentração celular inicial em massa seca. Já para as concentrações celulares, observa-se, para os ensaios 2 e 3, as dificuldades e peculiaridades da medição da concentração celular utilizando mel invertido não clarificado, também apresentados nos ensaios de SILVA (2016).

Quanto a produção de etanol, nota-se, rendimentos em torno de 78% para os ensaios 1 e 2 e para o ensaio 3, o rendimento cai para aproximadamente 50%.

Constata-se pela figura 14, que nos ensaios 1 e 3, que tanto o pH quanto a curva de CO₂, são similares, apresentando um aumento no despreendimento das bolhas de CO₂ no ponto de mínimo pH. Ademais com a redução do gás carbônico gerado, ocorre um aumento do pH do meio. Este perfil apresentado pelos ensaios 1 e 3, também foram observados nos ensaios de ACORSI (2012) e SILVA (2016), que trabalharam tanto com mel invertido quanto com mel não invertido. Com exceção do ensaio 2, presenciou-se um comportamento atípico do pH.

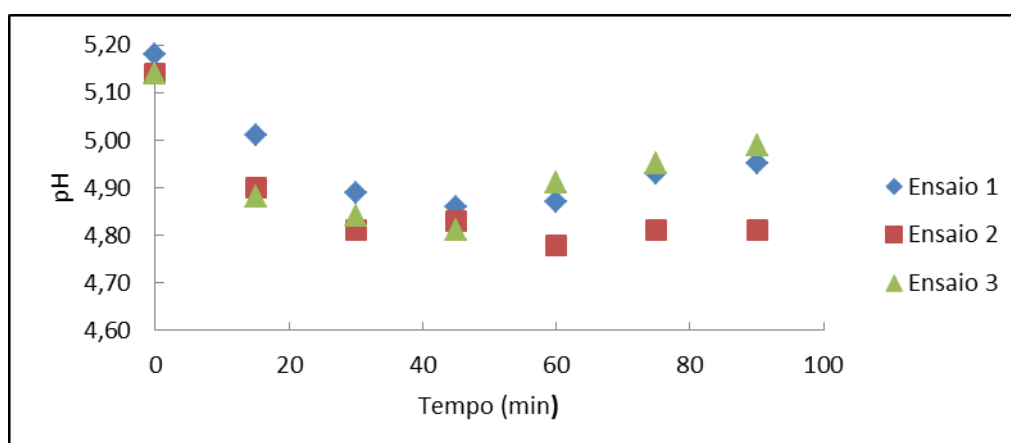


Figura 14 - Variação do pH do meio em função do tempo nos ensaios com mel sem prévia clarificação.

Além de tudo isso, nos ensaios 2 e 3, pode-se notar, que a produção de etanol está associada ao consumo de substrato, modelo este proposto por GADEN (1955).

Ao comparar, as figuras, os seus ajustes das concentrações de consumo de substrato (AR) e produção de etanol, com os dados das bolhas de CO₂ desprendidas, além disso, com as velocidades específicas. Verificou-se que as figuras, apresentam perfis que se assemelham entre si, como por exemplo no ensaio 3. Ao se avaliar o período entre 30 e 80 minutos, constatou-se que as velocidades específicas, mantiveram-se constantes, bem como o gás carbônico desprendido. E ao avaliar com os perfis de consumo e produção, percebe-se nesse mesmo período, uma reta constante na produção de etanol e praticamente uma reta no consumo dos açúcares redutores.

4.2.3. Resultados referentes às fermentações descontínuas utilizando mel invertido e clarificado

Os resultados, para as fermentações descontínuas, utilizando mel invertido e clarificado, serão apresentados, a seguir, seguindo os modelos anteriores, conforme o item 4.2.1. Os dados referentes ao CO₂ em função do tempo estão apresentados no apêndice C.

Ensaio 4 (E4)

A tabela 8, apresentada logo abaixo, exhibe os dados obtidos da fermentação realizada para o quarto ensaio.

Tabela 8 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 4.

Tempo	pH	X	AR	Etanol	μ_S	μ_P
0	5,25	13,47	20,77	1,48	0,0194	0,0074
15	5,20	14,25	15,93	5,37	0,0237	0,0069
30	5,05	11,15	11,82	4,40	0,0271	0,0058
45	5,00	14,47	4,38	4,96	0,0203	0,0049
60	5,03	14,25	2,05	7,64	0,0109	0,0042
75	5,12	14,83	1,51	7,95	0,0047	0,0036
90	5,13	13,89	1,32	8,48	0,0026	0,0033

As figuras 15,16 e 17 a seguir, apresentam, respectivamente, dados e curvas sobre variação das concentrações celulares, dos açúcares redutores (AR) e do produto (etanol), dados de CO₂ desprendido e pH, além da variação das velocidades específicas (μ_S e μ_P), todas em função do tempo.

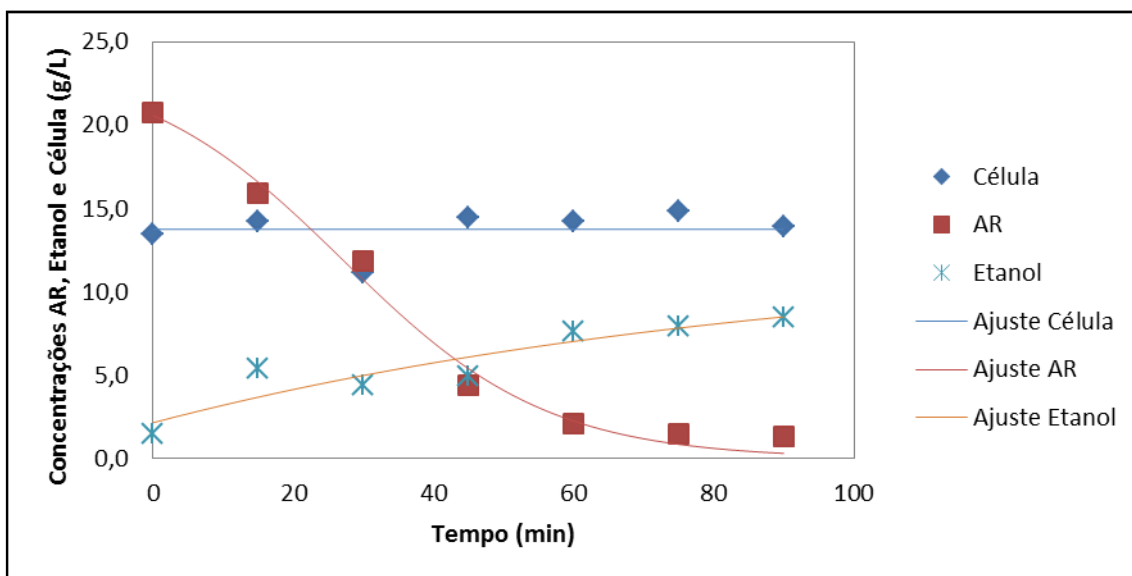


Figura 15 - Variação das Concentrações Celular, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 4.

Pelas curvas da figura 15, verificam-se, no quarto ensaio, os perfis de consumo de AR e de produção de etanol, apresentam perfis semelhantes ao já visto nos ensaios anteriores, demonstrando que a clarificação do mel, não mostrou influência negativa observável na cinética do processo. Observa-se também que o consumo total de AR, se deu em torno de noventa minutos, e que tal consumo, levou a produção de etanol da ordem de 7,0 g/L, sendo 70,43% do valor teoricamente possível.

Outro dado que se pode notar, é a questão da concentração celular, que para este ensaio, mostraram-se em sua grande maioria pontos próximos da reta ajustada, aproximadamente de 14g/L, indicando que a clarificação possibilitou a melhora dos dados de concentração celular.

Neste ensaio, analisou-se pela figura 16, o perfil de pH tende a um ponto de mínimo em 45 minutos, no qual constata-se o máximo número de bolhas desprendidas de CO₂. Conseqüentemente o perfil de pH, está aliada ao perfil de gás carbônico liberado através da fermentação, demonstrando, desta

maneira, como se deu a fermentação para o quarto ensaio. Também se destaca, no segundo período de fermentação, o pH sofre um leve aumento, associado com a diminuição do desprendimento de CO_2 formado.

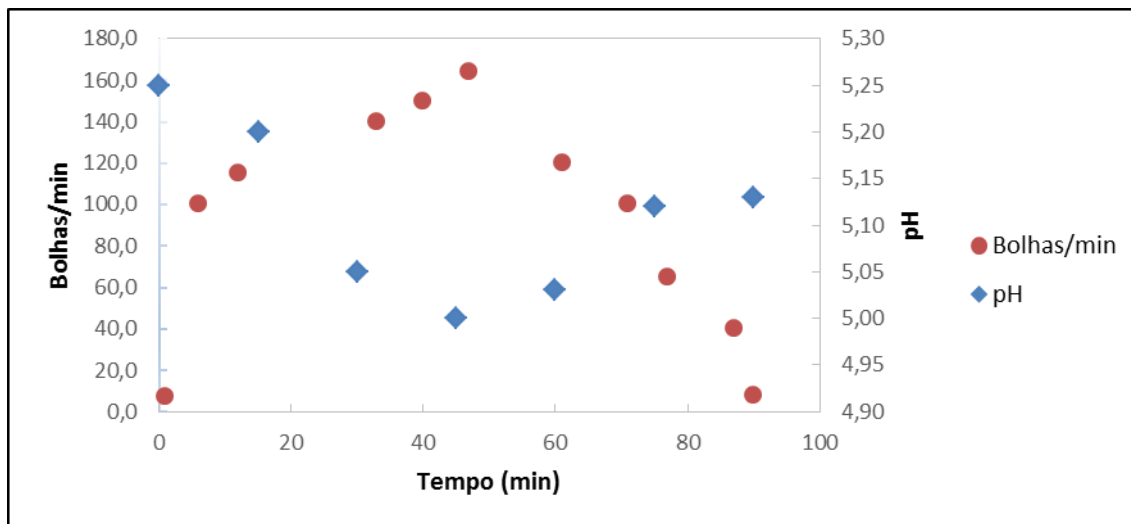


Figura 16 - Variação de CO_2 (medida qualitativa: bolhas/min) e pH em função do tempo, para o ensaio 4.

Na figura 17, nota-se o perfil das velocidades específicas de consumo de substrato (μ_S) e de produção de etanol (μ_P). No qual, se verifica um perfil decrescente de ambas as velocidades. Sendo assim, infere-se que a produção de etanol está associada ao consumo do substrato.

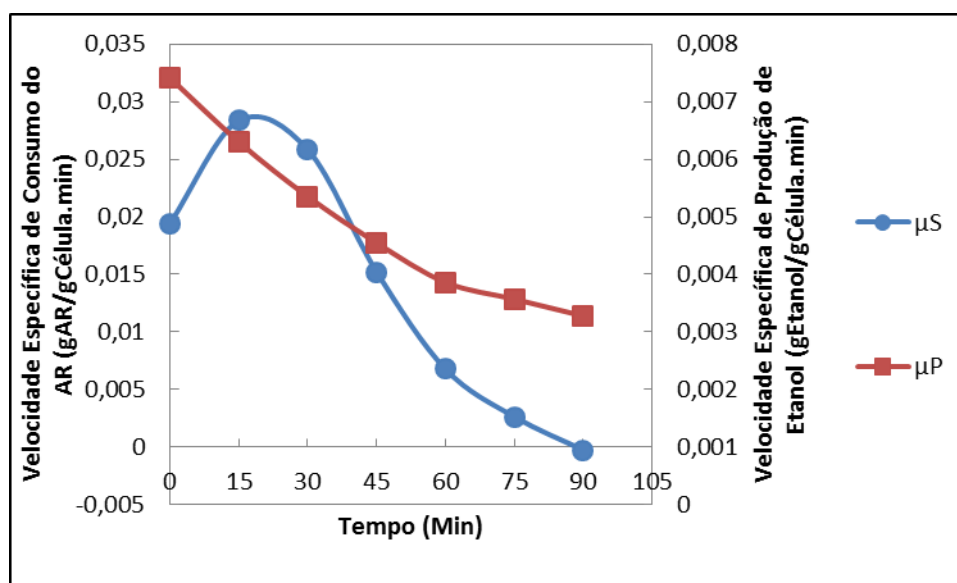


Figura 17 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o quarto ensaio.

Ensaio 5 (E5)

Com base na tabela 9 e dos dados de CO₂, descrevem-se os dados e as curvas ajustadas (figuras 18, 19 e 20).

Tabela 9 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 5.

Tempo	pH	X	AR	Etanol	μ_S	μ_P
0	4,83	16,57	27,30	2,69	0,0415	0,0074
15	4,81	19,08	12,92	5,38	0,0317	0,0071
30	4,85	17,62	12,14	6,60	0,0188	0,0055
45	4,85	18,20	3,83	7,65	0,0111	0,0032
60	4,94	19,63	3,65	8,64	0,0065	0,0015
75	4,9	16,10	1,55	8,47	0,0038	0,0007
90	4,91	17,92	1,23	9,06	0,0033	0,0004

A figura 18 demonstra o perfil da concentração celular, concentração dos açúcares redutores e concentração do produto (etanol). Neste ensaio, pode-se observar o mesmo perfil da variação das concentrações observados nos demais ensaios. Conjuntamente nota-se a variação celular no decorrer da fermentação, indicando a dificuldade na medição da mesma, inclusive presencia-se que a variação celular não ocorre de forma agravante igual nos ensaios 2 e 3, nos quais, foram utilizados mel não clarificado

Outro fator avaliado, o consumo de AR levou a produção de etanol na ordem de 6,37 g/L, indicando 47,8% do valor possível.

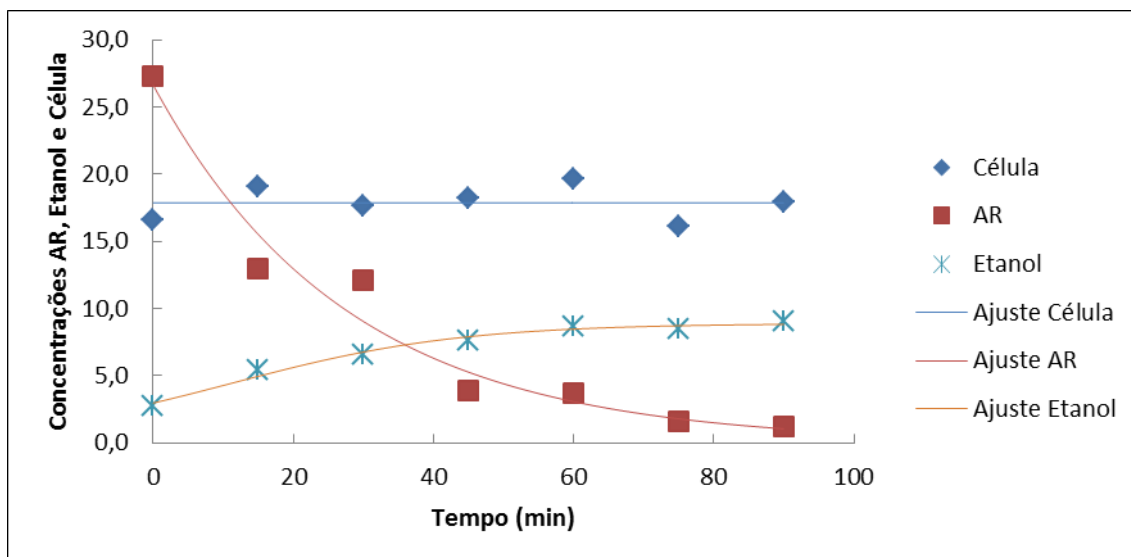


Figura 18 – Variação das concentrações Celulares, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 5.

A figura 19 nos mostra a variação de pH e de CO_2 desprendidas, um comportamento atípico.

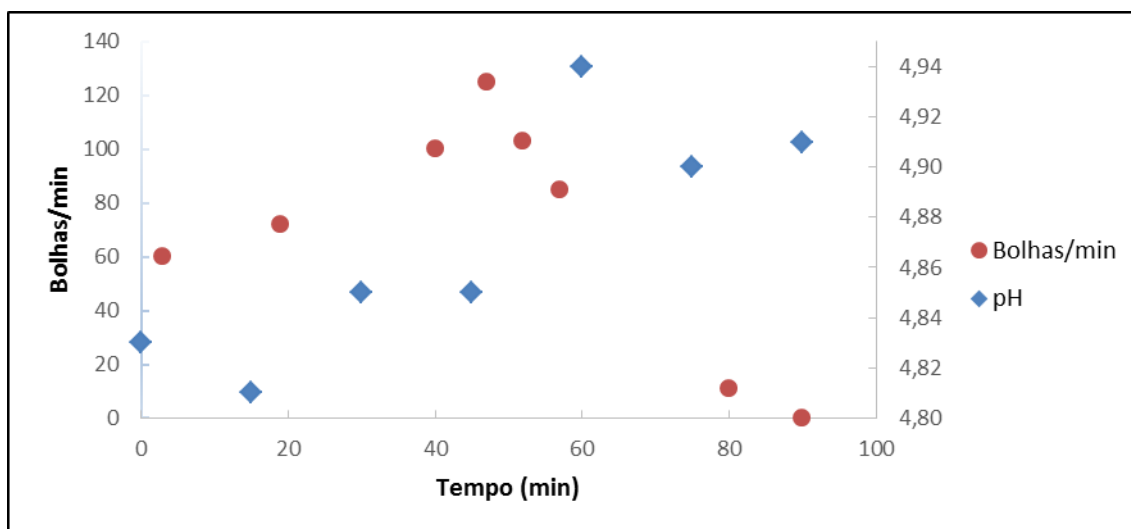


Figura 19 - Variação de CO_2 (medida qualitativa: bolhas/min) e pH em função do tempo, para o ensaio 5.

A partir da figura 20, nota-se novamente, as velocidades específicas, são decrescentes em toda a fermentação. Entretanto, pode-se também inferir que a produção de etanol está associada ao consumo de substrato.

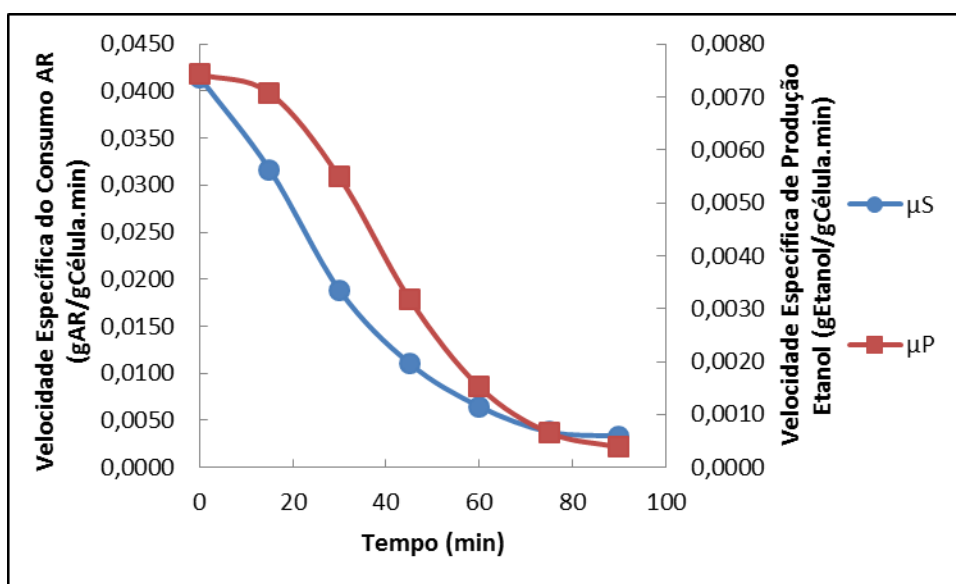


Figura 20 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 5.

Ensaio 6 (E6)

Neste ensaio, podem-se verificar através da tabela 10, os dados obtidos e também neste caso específico, a utilização de mel invertido e clarificado em alta concentração inicial de AR.

Tabela 10 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 6.

Tempo	pH	X	AR	Etanol	μ_S	μ_P
0	4,87	16,70	164,03	1,29	0,0082	0,0101
30	4,78	17,37	142,10	6,49	0,0122	0,0106
60	4,74	14,19	137,40	10,38	0,0225	0,0116
90	4,69	15,74	131,14	16,47	0,0372	0,0122
120	4,70	16,29	122,41	24,52	0,0523	0,0126
150	4,70	15,02	66,02	29,28	0,0578	0,0125
180	4,70	19,41	51,69	34,69	0,0484	0,0121
210	4,70	16,40	36,70	36,42	0,0326	0,0114
240	4,71	15,27	28,79	46,96	0,0190	0,0104
270	4,72	13,72	11,24	52,35	0,0100	0,0093
300	4,73	12,26	11,36	52,89	0,0049	0,0081
330	4,75	15,96	8,88	57,48	0,0032	0,0075

Constatam-se através da figura 21, os perfis de concentrações parecidas, conforme já observados nos ensaios anteriores, porém a produção de etanol é praticamente constante, apresentando-se como uma reta crescente. Neste caso em específico, verifica-se que o perfil de consumo de AR é bem característico. Este consumo de substrato levou a produção de 57,48 g/L em etanol, 70,87% do valor possível teoricamente.

Observa-se que o perfil de concentração celular encontrado na figura 21, apresentam características semelhantes encontradas nos ensaios E4 e E5, que em sua grande maioria, os dados obtidos estão próximos da concentração medida de 15,69 g/L.

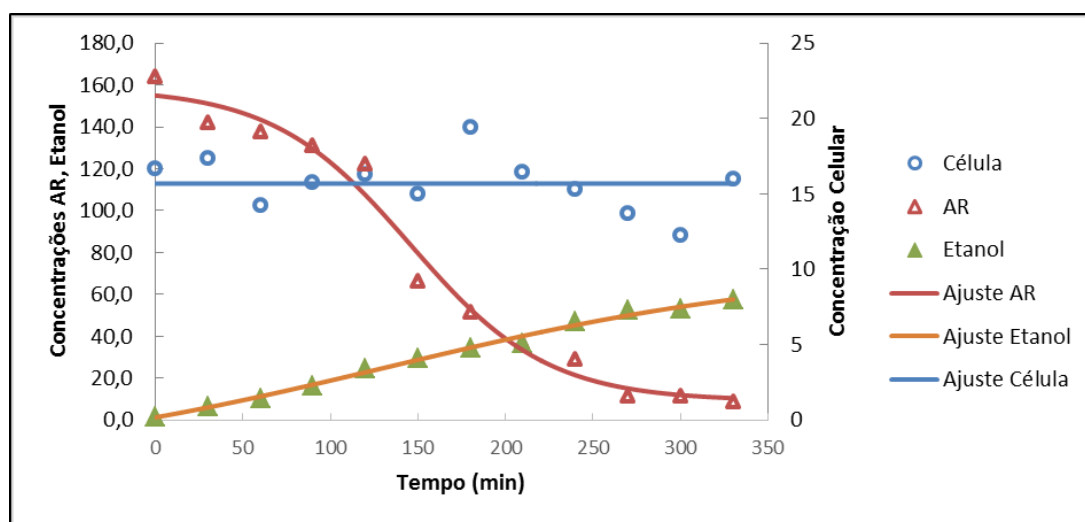


Figura 21 - Variação das concentrações Celulares, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 6.

Através da figura 22, apresentada na próxima página, pode-se observar que o pH decresce de 4,87 até um valor mínimo de 4,69 em 90 minutos, e a partir deste ponto, seu pH se mantém constante até aproximadamente 270 minutos, ocorrendo no final da fermentação um leve aumento de seu pH para um valor de 4,75. Neste ensaio, a curva de gás carbônico desprendido durante a fermentação, demonstra de forma clara como se deu a fermentação, além da mesma estar aliada com a curva de pH, pois no período em que o pH se mantém constante, pode-se verificar que ocorre uma leve diminuição de CO₂ formado até um ponto em que praticamente se mantém constante. E no

período final da fermentação pode-se observar o leve aumento de seu pH e a diminuição da produção de CO₂.

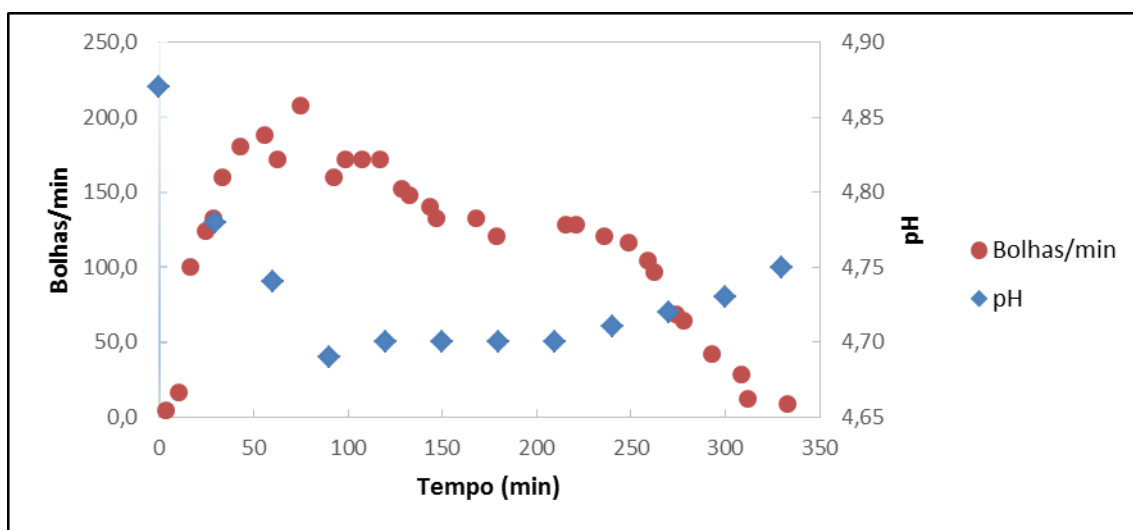


Figura 22 - Variação de CO₂ (medida qualitativa: bolhas/min) e pH em função do tempo, para o ensaio 6.

A figura 23, demonstra o perfil de uma fermentação bem característico, em que se constatou a produção de etanol associada ao consumo de substrato, como nos ensaios 2 e 3.

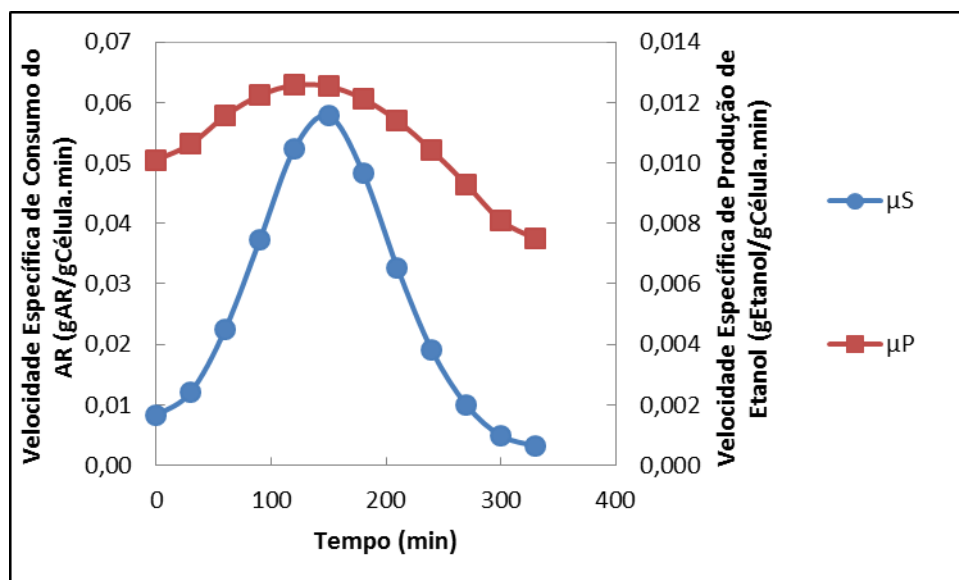


Figura 23 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 6.

4.2.4. Discussão geral dos ensaios descontínuos utilizando mel invertido e clarificado

Todos os ensaios apresentaram comportamentos similares quanto a suas cinéticas: de consumo de substrato (AR) e de produção do etanol em função do tempo. Pode-se verificar que não ocorre crescimento celular, devido ao fato dos ensaios terem sido realizados com altos valores de concentração celular inicial em massa seca.

Para as concentrações celulares, verifica-se alguma variação, agora provavelmente devido à manipulação experimental e não devido à presença de outros sólidos em suspensão.

Quanto a produção de etanol, observa-se rendimentos em torno de 70% para os ensaios 4 e 6 e cerca de 48% para o ensaio 5

Nota-se pelas figuras 24 e 25, que nos ensaios 4 e 6, tanto o pH, quanto a curva de CO₂, são similares, apresentando um aumento no desprendimento das bolhas de CO₂ no ponto de mínimo de pH e com a redução do mesmo, ocorre o aumento do seu pH. Já para o ensaio 5, os resultados foram atípicos.

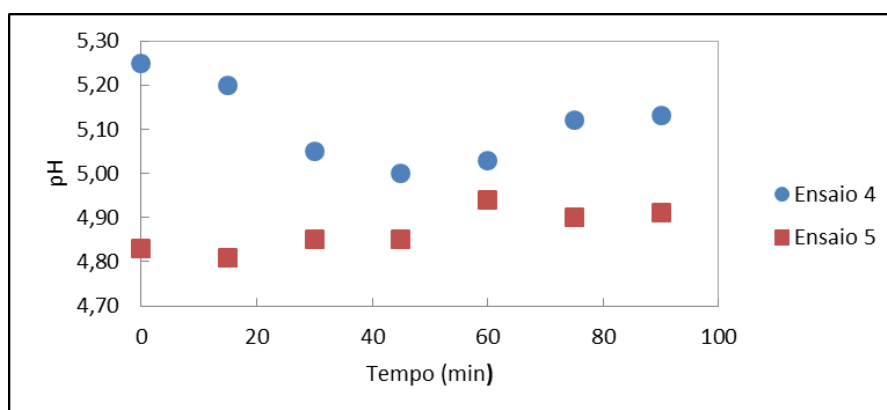


Figura 24 – Variação do pH do meio em função do tempo nos ensaios com mel invertido e clarificado.

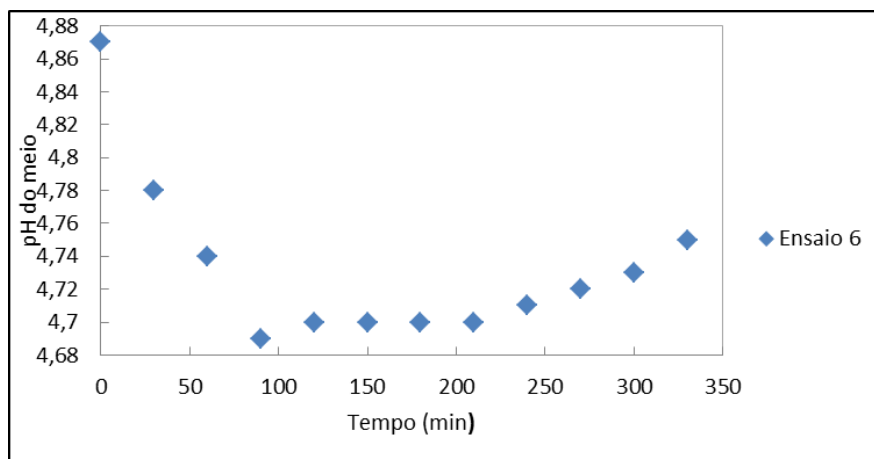


Figura 25 – Variação do pH do meio em função do tempo no ensaio 6.

Como observado pelas figuras 15,18 e 21, pode-se perceber que para os ensaios 4 a 6, a produção de etanol está associada ao consumo de substrato, modelo este proposto por GADEN (1955).

4.2.5. Análise das velocidades de produção de etanol e consumo do substrato em função da concentração de AR nos ensaios descontínuos

Os resultados referentes às velocidades volumétricas de produção de etanol e de consumo de substrato ($\frac{dP}{dt}$ e $\frac{dS}{dt}$, $\frac{g}{L.min}$) em função da concentração de AR (g/L), estão apresentados na figura 26 para o ensaio 1 (E1), apresentado na página seguinte e nas figuras 27 a 31 respectivamente para os ensaios E2 a E6.

*Observar que nas figuras a seguir, devem ser lidas no gráfico da direita para a esquerda, ou seja, da máxima concentração de AR para a mínima concentração.

Ensaio 1 (E1)

Mediante a figura 26, verifica-se que as curvas, mostram uma velocidade volumétrica de consumo de substrato, decrescente em toda sua fermentação. Além disso, apresenta velocidade máxima de consumo de substrato de aproximadamente (0,55 g_{AR}/L.min). Enquanto para a velocidade de produção de etanol ela é crescente, da concentração inicial até aproximadamente uma

concentração residual de 10 g/L de AR e a partir deste ponto se torna decrescente, com uma velocidade máxima de 0,18 g_{ETANOL}/L.min.

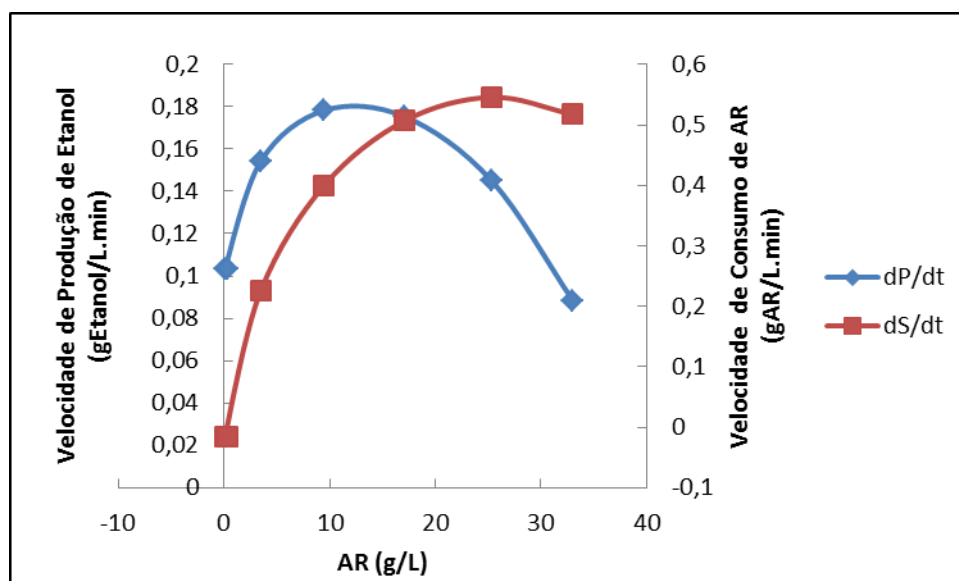


Figura 26 - Velocidades de Consumo de AR e Produção de Etanol em função da Concentração de AR, para o ensaio 01.

Ensaio 2 (E2)

Pela figura 27, observa-se que ambas as curvas de velocidades são crescentes até a concentração aproximadamente de 20,0 g/L e a partir deste ponto, é decrescente.

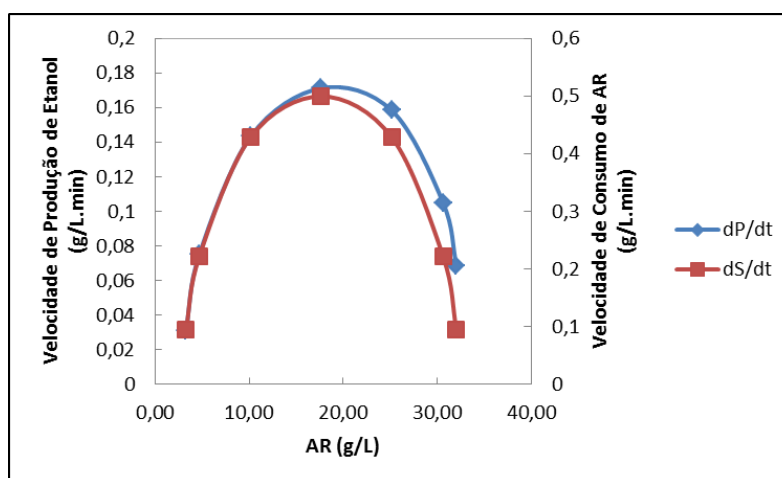


Figura 27 - Velocidades de Consumo de AR e Produção de Etanol em função da Concentração de AR, para o ensaio 02.

Ensaio 3

Observa-se através da figura 28, o mesmo perfil apresentado no ensaio 02, considerando alguns erros experimentais na medição.

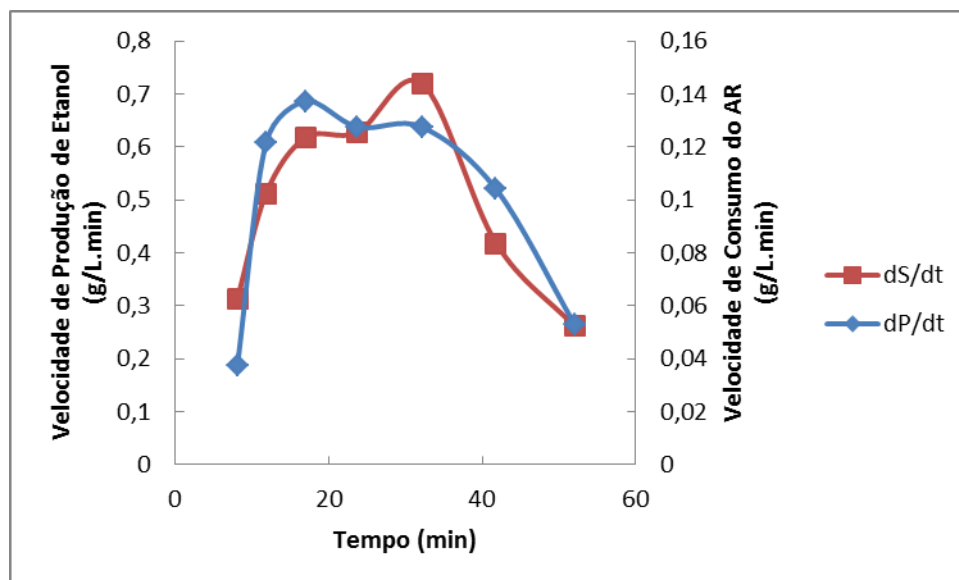


Figura 28 - Velocidades de Consumo de AR e Produção de Etanol em função da Concentração de AR, para o ensaio 03.

Ensaio 4

Através da figura 29, constata-se que a velocidade de produção de etanol é decrescente em toda a sua fermentação, enquanto para o consumo de substrato, observa-se um crescimento na velocidade até que a concentração caia até 10 g/L e se torne decrescente.

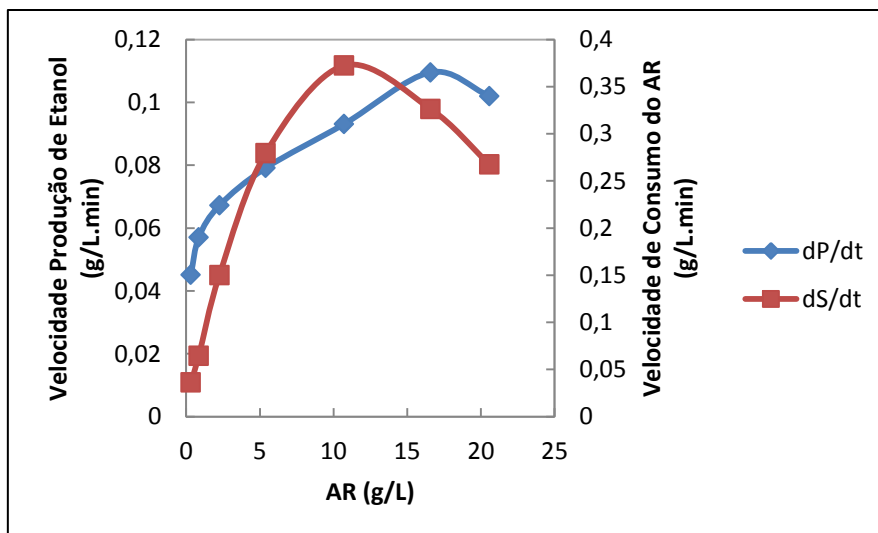


Figura 29 - Velocidades de Consumo de AR e Produção de Etanol em função da Concentração de AR, para o ensaio 04.

Ensaio 5

Através da figura 30, ambas as velocidades são decrescentes em toda a fermentação.

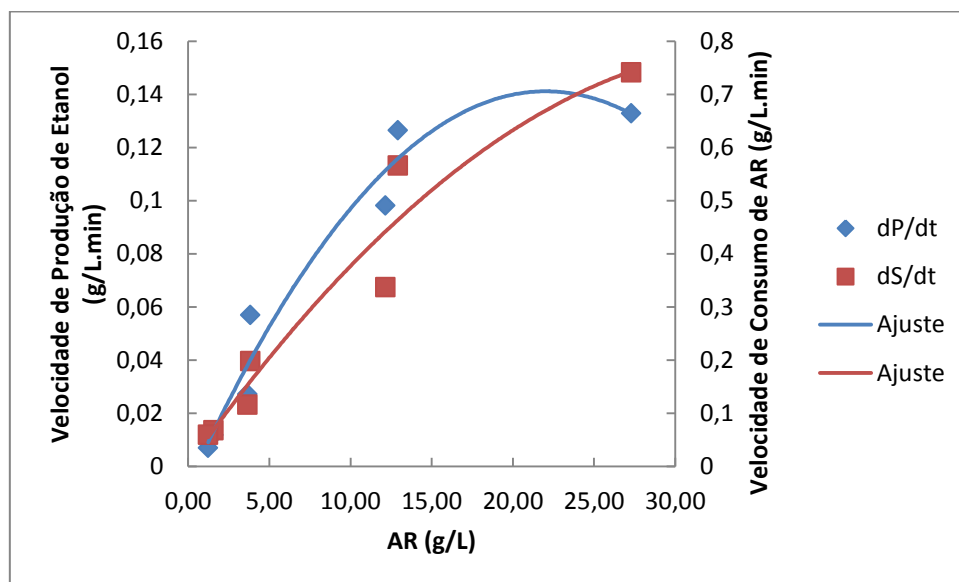


Figura 30 - Velocidades de Consumo de AR e Produção de Etanol em função da Concentração de AR, para o ensaio 5.

Ensaio 6

Através da figura 31, pode-se observar o melhor perfil das velocidades volumétricas dos ensaios descontínuos, observando para a velocidade de produção de etanol um crescente inicial, mantendo-se constante por um longo período e a partir da concentração de 50g/L, observa-se a velocidade decrescente que corrobora com a diminuição dos açúcares redutores do ensaio.

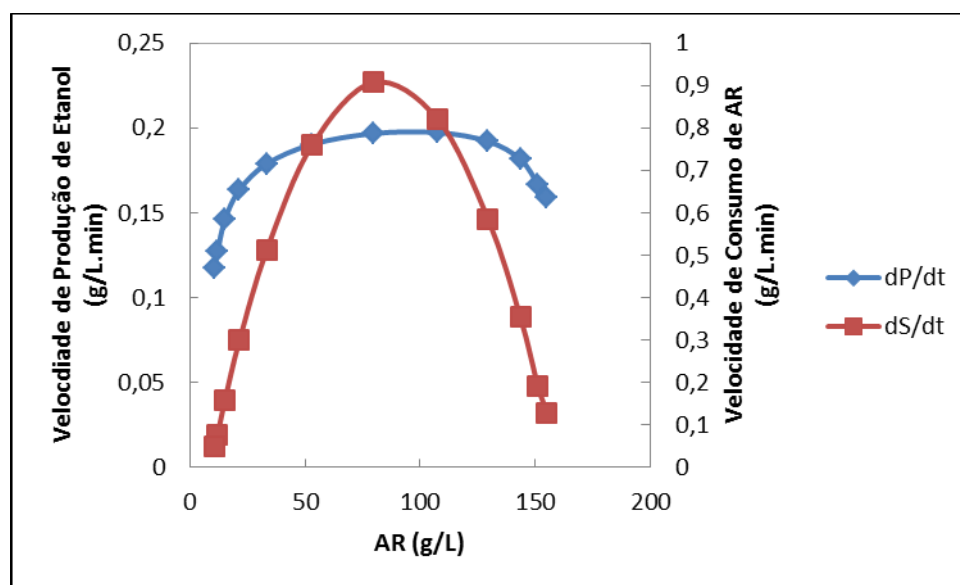


Figura 31 - Velocidades de Consumo de AR e Produção de Etanol em função da Concentração de AR, para o ensaio 06.

Através das análises das figuras anteriores (26 a 31), pode-se observar em praticamente todos os ensaios, uma mudança de velocidade para consumo de substrato de crescente para decrescente muito rapidamente. Esta mudança pode provavelmente ocorrer pela mudança do substrato de glicose para frutose. Através de estudos obtidos por Silva (2016), mostrou-se que a levedura tem preferência por consumir, a glicose primeira ante a frutose.

Outro fator que se pode notar é o aumento das velocidades máximas do consumo de substrato nos ensaios com mel invertido e clarificado, se comparadas com as velocidades nos ensaios utilizando apenas mel invertido não clarificado, obtendo valores muito próximos de 1g/L.min (E6), enquanto apenas 0,5 g/L.min (E2).

4.2.6. Análise Quanto a Conversão e Rendimento das fermentações em função do tempo nos ensaios Descontínuos

Através da pesquisa nos ensaios 1 a 6, obtiveram-se, os seguintes fatores de Conversão $Y_{P/S}$ e $Y_{X/S}$, além dos respectivos Rendimentos Reais e Rendimentos, considerando, o ponto zero ($E_0=0,0$ g/L). Estes dados apresentados na tabela 11. Inclusive, apresentam a razão entre S_0/X_0 .

Tabela 11 - Tabela com os Valores de Conversões para os Ensaios Descontínuos

Ensaio	$Y_{P/S}$ (g Etanol/g AR)	η_{Etanol} (%)	η_{Etanol} (%) Considerando $E_0=0$	Razão (S_0/X_0)
1	0,41	79,40	80,23	1,87
2	0,40	71,80	78,28	1,61
3	0,28	55,48	59,91	2,65
4*	0,43	70,43	84,15	1,51
5*	0,35	47,82	68,49	1,53
6*	0,37	70,87	72,41	10,94

*Mel Invertido e Clarificado

Em relação aos rendimentos dos ensaios, primeiro, observou-se que os pontos iniciais não estão conforme se espera no início da fermentação, pois não deveria ser encontrado etanol nessas amostras. Verificou-se, portanto, os rendimentos em Etanol considerando a Concentração de Etanol no ponto zero ($E_0= 0$ g/L). Para os ensaios utilizando mel invertido não clarificado, obteve-se $E_1=80,23\%$, $E_2=78,28\%$ e $E_3= 59,91\%$. No terceiro ensaio (E_3) esperava-se pela sua razão de substrato inicial por célula inicial que o rendimento em etanol fosse maior, o que a partir dos dados obtidos não ocorre. Este fato pode ter ocorrido por erros experimentais ou algum fator para que a célula não produzisse etanol suficiente, podendo ser falta de nutrientes.

Para os ensaios utilizando mel invertido e clarificado (E_4 , E_5 e E_6), observou-se também que os pontos iniciais em etanol ocorre um aumento

comparado aos ensaios anteriores não clarificados, considerando $E_0=0$ g/L para comparação, obtemos rendimentos parecidos aqueles encontrados nos ensaios com apenas mel invertido não clarificado.

4.3. Resultados das fermentações descontínuas alimentadas

Os resultados referentes às fermentações descontínuas alimentadas apresentadas nas páginas seguintes seguirão o mesmo modelo das discussões dos ensaios anteriores, concomitantemente as suas respectivas discussões, tanto ensaio a ensaio, quanto em grupos de ensaios, estes referenciados na tabela 3 do capítulo de materiais e métodos (item 3.9, página 29).

As tabelas e figuras que seguem nas próximas páginas, apresentam uma série de informações relativas às amostras de mosto coletadas conforme já mencionado, dentre os quais se encontram: pH do mosto, variação de CO_2 (medida qualitativa), concentração celular, concentração dos açúcares redutores (AR), concentração de etanol e velocidades específicas de consumo de substrato e produção de etanol em função do tempo. Os dados, referentes aos dados de CO_2 , também estão apresentados no apêndice C.

Nos ensaios descontínuos alimentados, compararam-se os resultados utilizando mel invertido não clarificado, seguidos de alimentações utilizando mel invertido clarificado, além de alimentação em pulsos ou alimentação em fluxo contínuo, em diferentes concentrações de açúcares redutores utilizados.

O modo de operação utilizado em cada ensaio a seguir, está previamente descrito no item de materiais e métodos (item 3.9, página 28)

4.3.1. Resultados das fermentações descontínuas alimentadas com alimentação em pulsos

Ensaio 7 (E7)

A tabela 12, apresentada na página seguinte, exhibe os resultados das diversas variáveis avaliadas durante o tempo de fermentação, como os resultados de pH, concentração celular, concentração de açúcares redutores,

concentração de etanol, velocidades específicas de consumo dos açúcares redutores e produção de etanol em função do tempo.

A figura 32 representa os dados e as curvas ajustadas relativas às variações de concentração celular, concentração de açúcares redutores e concentração de etanol em função do tempo.

Tabela 12 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 7.

Tempo	pH	X	AR	Etanol	μ_S	μ_P
0	5,18	17,64	33,04	0,73	0,0295	0,0050
15	5,01	17,64	25,28	2,05	0,0312	0,0083
30	4,89	17,64	17,10	4,23	0,0289	0,0100
45	4,86	17,64	9,50	6,86	0,0228	0,0102
60	4,87	17,64	3,49	9,54	0,0129	0,0088
75	4,93	17,64	0,10	11,85	0,0000	0,0059
90	4,95	17,64	0,33	13,40	0,0000	0,0059
90*	4,90	17,28	21,55	8,62	0,030	0,0044
105	4,87	17,89	13,69	10,80	0,021	0,0116
120	4,87	17,23	7,81	12,60	0,013	0,0137
135	4,93	17,12	6,16	17,25	0,008	0,0066
150	4,94	17,62	1,60	18,28	0,000	0,0070
150*	4,84	17,04	24,60	17,83	0,026	0,0003
165	4,84	17,45	17,21	16,93	0,022	0,0014
180	4,83	16,73	11,73	18,06	0,016	0,0053
195	4,85	18,00	8,26	19,22	0,011	0,0067
210	4,86	17,97	3,70	21,03	0,000	0,0057

***Início da Alimentação**

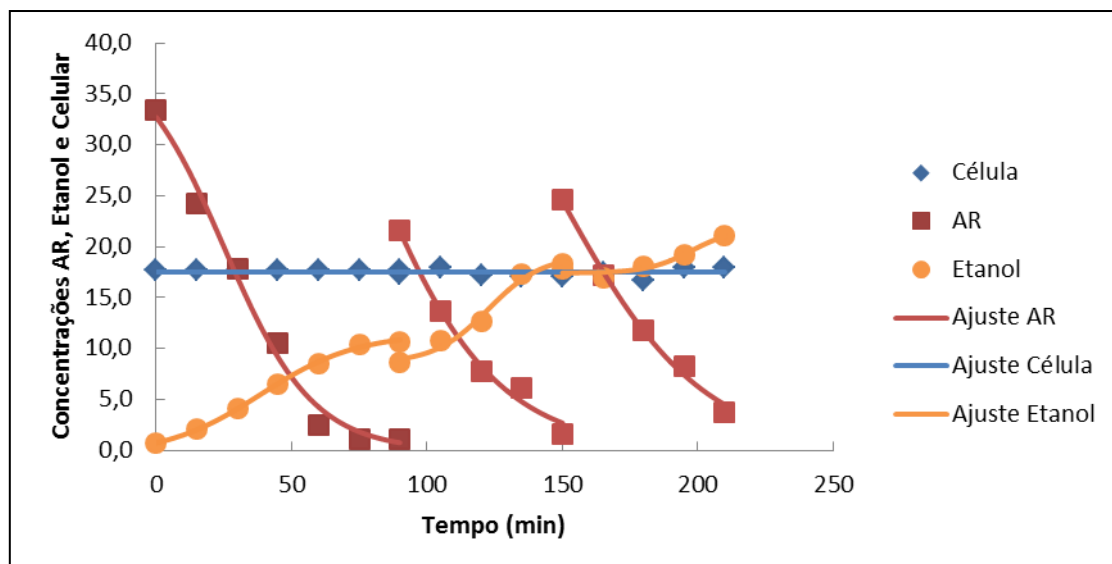


Figura 32 - Variação das concentrações de células, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 07.

Das curvas da figura 32, observa-se o perfil das concentrações de concentração celular, concentração de açúcares redutores e concentração de etanol, bem como o perfil dos três pulsos realizados neste ensaio. Também se observa que este ensaio foi a continuação do ensaio 1, no qual se diz respeito a um ensaio descontínuo utilizando mel invertido não clarificado. Além disso, ocorreram duas alimentações posteriores utilizando mel invertido e clarificado. Todos os perfis apresentam características semelhantes e verifica-se que nos dois pulsos subsequentes a fermentação durou apenas 60 minutos. E levaram a diferentes produções de etanol, obtendo-se rendimentos de 93,93% no segundo pulso, enquanto no terceiro pulso rendimentos de apenas 29,35%.

A figura 33, diz respeito à variação de gás carbônico (CO_2) em função do tempo em todos os pulsos, observou-se esta função como uma medida qualitativa do número de bolhas desprendidas ao longo da fermentação.

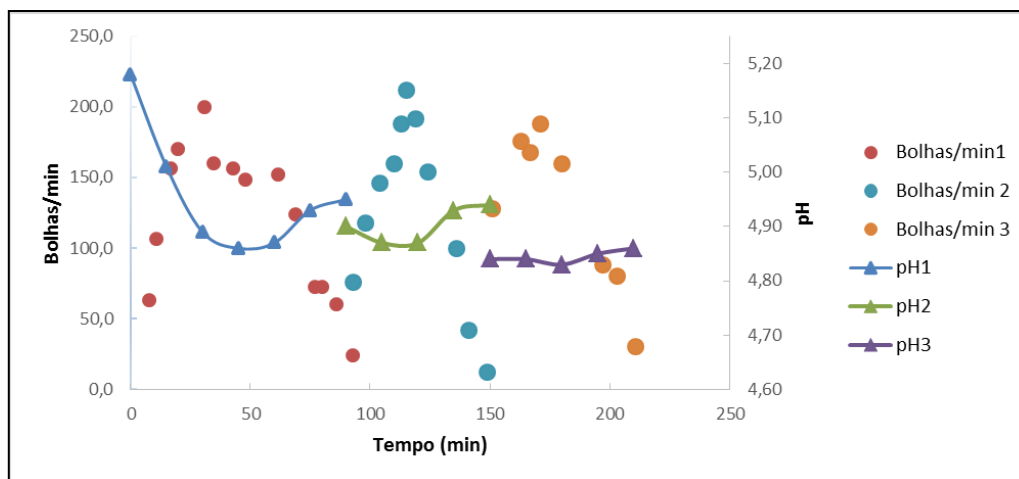


Figura 33 - Variação de CO₂ (medida qualitativa em bolhas/min) nas diferentes alimentações e pH em função do tempo, para o ensaio 07.

Através da figura 33, verifica-se que em sua primeira alimentação, o perfil de pH ocorre de acordo com os ensaios anteriores, como já dito para o ensaio 1, ensaio descontínuo. Aliado ao seu perfil de pH, a curva de CO₂ desprendida se relaciona com tal mudança de pH.

Para os pulsos subsequentes, encontram-se perfis levemente diferenciados. Para o segundo pulso, seu pH aumenta no final da fermentação, resultando em um perfil atípico do que já foi observado nos ensaios anteriores. Enquanto para a terceira alimentação, obtém-se dados de pH praticamente constante durante todo seu período. Além disso, os dados encontrados para o desprendimento de CO₂, que ocorre na fermentação, nota-se perfis parecidos nos três pulsos, além de estarem em consonância com os ensaios anteriores das fermentações descontínuas.

A figura 34 apresenta os resultados das velocidades específicas de consumo do substrato (AR) e formação de produto (etanol), calculado a partir das curvas ajustadas, conforme o método geométrico citado no capítulo de materiais e métodos.

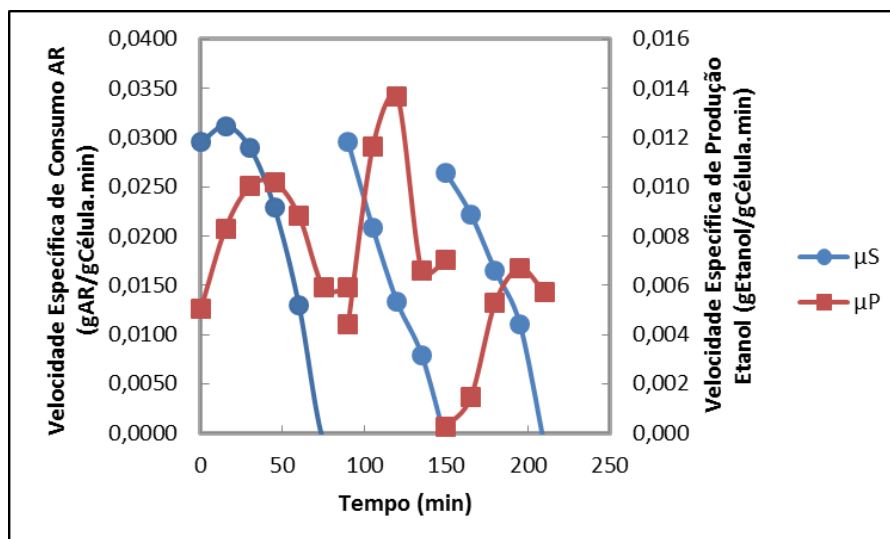


Figura 34 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 07.

Através da figura 34, verifica-se que as velocidades específicas de consumo de açúcares redutores (μ_S) máximas, possuem praticamente o mesmo perfil nas três alimentações e todas são decrescentes em todo o seu período.

Observa-se também, o mesmo perfil para as velocidades específicas de produção de etanol (μ_P). Nota-se que, a velocidade máxima, ocorre no segundo pulso, mesmo pulso onde se obtém o maior rendimento em etanol.

Ensaio 8 (E8)

A tabela 13, apresentada na página seguinte, exibe os resultados das diversas variáveis avaliadas durante o tempo de fermentação, como os resultados de pH, concentração celular, concentração de açúcares redutores, concentração de etanol, velocidades específicas de consumo dos açúcares redutores e produção de etanol em função do tempo. Além disso, observa-se a presença de duas alimentações. A 1ª Alimentação, uma descontínua. Enquanto a 2ª Alimentação, outra descontínua. Portanto uma fermentação descontínua alimentada.

A partir da tabela 13, representam-se os dados e as curvas ajustadas, quanto à variação das concentrações de células, AR e etanol em função do tempo, figura 35.

Tabela 13 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_s) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 8.

Tempo	pH	X	AR	Etanol	μ_s	μ_P
0	5,21	18,75	31,62	0,71	0,0176	0,0053
15	5,15	18,75	25,12	2,39	0,0269	0,0086
30	5,09	17,65	17,99	4,60	0,0284	0,0100
45	4,56	18,75	13,54	7,22	0,0242	0,0110
60	4,65	18,75	3,83	9,67	0,0155	0,0096
75	4,60	17,65	1,07	10,92	0,0079	0,0058
90	4,61	17,75	1,07	11,30	0,0061	0,0022
90*	4,82	8,81	151,79	6,76	0,0965	0,0207
105	4,78	6,57	135,72	10,26	0,1546	0,0221
120	4,78	7,37	133,93	12,53	0,1550	0,0224
135	4,8	7,95	103,58	14,88	0,1508	0,0227
150	4,79	6,96	84,83	18,61	0,1685	0,0208
165	4,8	7,21	64,74	18,34	0,1483	0,0173
180	4,8	6,05	63,84	20,47	0,1511	0,0135
195	4,79	7,90	48,66	22,78	0,0936	0,0098
210	4,78	7,95	28,57	25,91	0,0719	0,0069
225	4,79	7,04	15,18	19,15	0,0607	0,0047
240	4,78	7,73	13,39	27,00	0,0402	0,0031
255	4,79	9,39	12,05	25,51	0,0237	0,0021
270	4,78	10,57	10,71	21,69	0,0000	0,0011

*Início da Alimentação

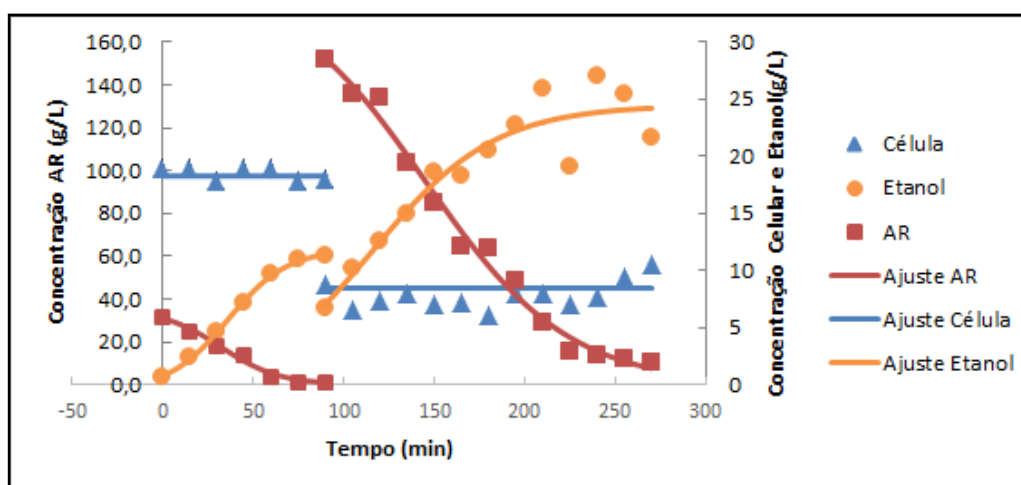


Figura 35 - Variação das concentrações Celulares, AR e Etanol em função do tempo, para o ensaio 08.

Com base nas curvas da figura 35, observa-se que a produção de etanol se dá com o consumo dos açúcares redutores. Os perfis apresentados, nos

pulsos, estão de acordo com os demais ensaios realizados. Observa-se uma queda de concentração celular, em sua segunda alimentação, devido ao fato de retirada, de uma parte de mosto residual da primeira fermentação, e adição posterior de mel invertido e clarificado.

Verifica-se também, neste ensaio, os rendimentos encontrados variaram muito. Enquanto na primeira alimentação obtiveram-se rendimentos de 68,49%, em contrapartida, na segunda alimentação o rendimento caiu para 21,53%. Esta queda de rendimento pode ter sido causada pela falta de nutrientes no meio fermentativo, que como já dito anteriormente, retirou-se uma parcela do meio fermentativo, e com ela, podendo conter uma parcela dos nutrientes.

A figura 36, na página seguinte, retrata os dados de gás carbônico (CO₂) desprendido, além dos valores de pH em função do tempo.

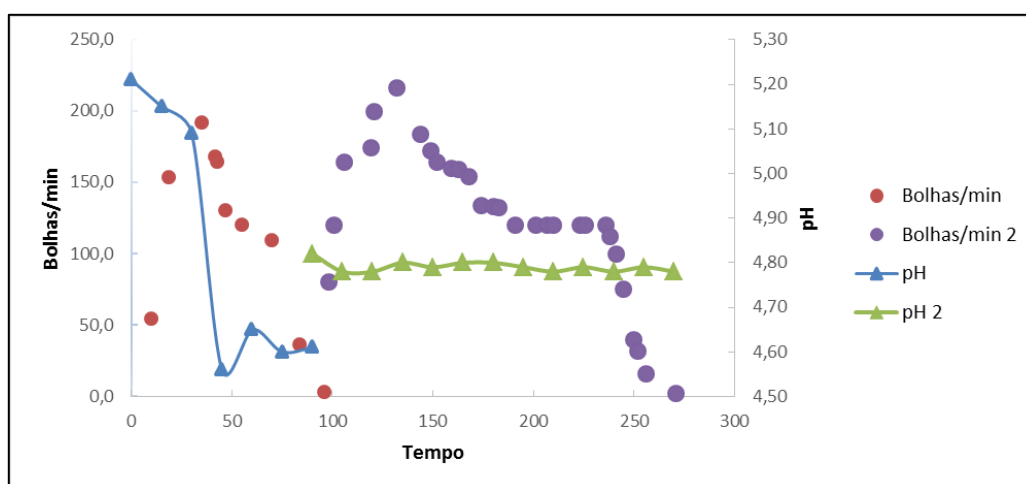


Figura 36 - Variação de CO₂ (medida qualitativa em bolhas/min) nas diferentes alimentações e pH em função do tempo, para o ensaio 8.

Neste ensaio, percebe-se em sua primeira alimentação, o mesmo perfil apresentado nos ensaios anteriores, tanto para variação de CO₂ quanto para variação de pH. Porém, avaliando a segunda alimentação, nota-se que o pH se mantém constante em toda a fermentação.

Em contrapartida os dados de CO₂ desprendidos retrata como realmente se deu a fermentação no segundo pulso, observando um período de alto desprendimento de gás carbônico até aproximadamente 180 minutos, mantendo-se constante até 250 minutos, onde ocorre uma queda de CO₂ liberado.

Através da figura 37, pode-se observar o perfil das velocidades específicas (μ_S e μ_P). Verificando-se as semelhanças entre os perfis, atestando com a teoria de que a produção de etanol está relacionada com o consumo de substrato.

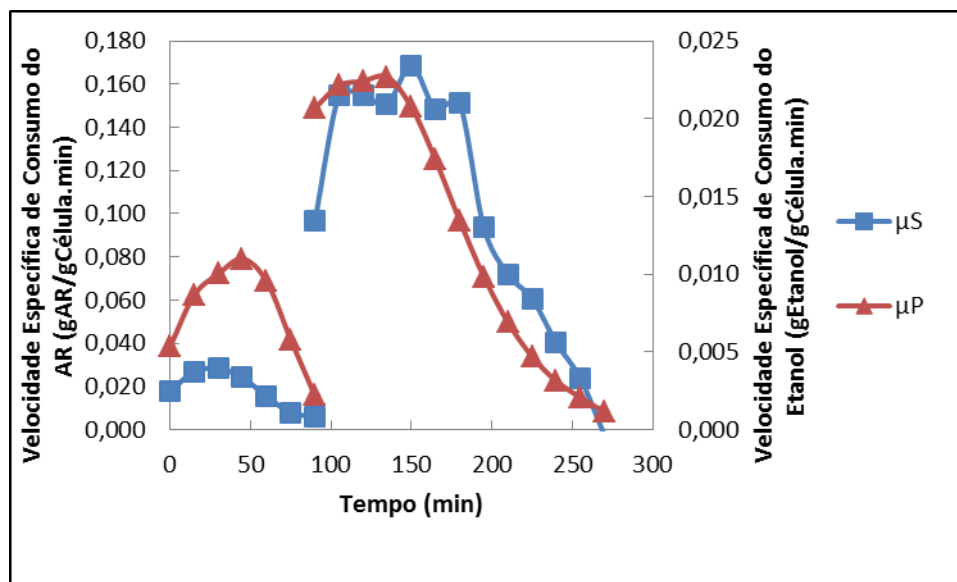


Figura 37 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 08.

4.3.2. Discussão Geral Ensaio Descontínuos alimentados, com alimentação em pulsos (Ensaio 7 e 8).

Analisando, primeiramente o ensaio 7, pode-se observar que a variação nos valores de ($Y_{P/S}$), entre as inserções realizadas neste ensaio. Obteve-se o melhor rendimento em etanol, na segunda alimentação do mel, indicando que a clarificação apresentou benefícios nas fermentações descontínuas alimentadas. Todavia, na terceira alimentação, ocorre uma diminuição muito elevada de seu rendimento, muito provavelmente provocadas por causas ainda não quantificadas, que poderiam ser um efeito inibitório do etanol residual presente no meio, sobre a célula remanescente ou mesmo uma possível inibição pela nova introdução de açúcares redutores.

Enquanto, ao analisar o ensaio 8, nota-se também uma redução de rendimento em etanol. Pode-se também verificar, que no ensaio 8, ocorre fatores de diluição e provavelmente alguma perda de nutrientes.

No ensaio 8, verificou-se uma queda de rendimento, podendo ter sido causado pela falta de nutrientes no meio fermentativo, que como já dito anteriormente, após a retirada de uma parcela do meio fermentativo, parte dos nutrientes foram retirados também.

Ao comparar estas fermentações com os ensaios apresentados por Silva (2016), verifica-se que ocorrem melhores rendimentos com o aumento gradativo da concentração de açúcares redutores nas demais alimentações.

Outro fator analisado, a concentração celular, apresentando-se com pouca variação, ou apenas alguns pontos com erros experimentais utilizando mel invertido e clarificado, pode apresentar benefícios em relação aos valores de concentração celular. Portanto verifica-se que a clarificação influenciou positivamente na medida desta variável.

Comparando as fermentações descontínuas alimentada com alimentação em pulsos observaram-se valores de velocidades específicas de consumo de substrato bastante similares no ensaio 7, em que a concentração de açúcares redutores era bastantes próximas uma das outras, e quanto as velocidades específicas de geração de produto, as velocidades máximas aumentam para o segundo pulso e ocorre uma queda no terceiro pulso.

4.3.3. Resultados das fermentações descontínuas alimentadas com alimentação com fluxo constante.

Ensaio 9 (E9)

As tabelas 14 e 15 apresentam os resultados das diversas variáveis avaliadas durante o tempo de cultivo.

Tabela 14 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 9.

Tempo	pH	X	AR	Etanol	μ_S	μ_P
0	5,14	19,61	31,52	0,99	0,0347	0,0039
15	4,88	19,61	29,61	2,13	0,0338	0,0053
30	4,84	19,61	25,16	4,12	0,0306	0,0081
45	4,81	19,61	17,47	6,93	0,0257	0,0098
60	4,91	19,61	9,23	9,86	0,0202	0,0088
75	4,95	19,61	3,88	12,11	0,0151	0,0061
90	4,99	19,61	1,44	13,45	0,0127	0,0046
90*	4,93	16,19	3,03	12,16	-0,0050	0,0051
105	4,85	14,38	4,27	13,78	-0,0169	0,0056
120	4,83	15,92	11,33	16,28	-0,0286	0,0068
135	4,75	14,54	17,40	16,82	-0,0182	0,0077
150	4,74	14,60	19,90	18,05	-0,0030	0,0083
165	4,76	15,53	18,80	21,33	0,0098	0,0083
180	4,76	15,81	15,36	20,72	0,0166	0,0079
195**	4,76	15,09	11,18	24,85	0,0171	0,0070
210	4,75	16,53	7,51	27,07	0,0135	0,0059
225	4,76	14,16	4,98	27,50	0,0085	0,0048
240	4,74	14,60	3,60	26,62	0,0042	0,0037
255	4,75	15,70	3,07	28,56	0,0002	0,0028
270	4,74	15,37	3,49	29,50	-0,0018	0,0024

*Início da Alimentação ** Fim da Alimentação

Tabela 15 - Tabela com dados referentes ao mel invertido e clarificado adicionado, como quantidade adicionada, Concentrações de AR em função do tempo, para o ensaio 9.

Tempo (min)	Adição Mel (L)	Concentração		Concentração AR meio (g/L)
		AR mel rico adicionado (g/L)	AR mel adicionado (g/L)	
90*	0,00	150	0,00	3,03
105	0,045	150	6,75	9,78
120	0,045	150	6,75	16,53
135	0,045	150	6,75	23,28
150	0,045	150	6,75	30,03
165	0,045	150	6,75	36,78
180	0,045	150	6,75	43,53
195**	0,03	150	4,5	48,03

*Início da Alimentação ** Fim da Alimentação

A figura 38 apresenta os perfis de concentração celular, concentração de açúcares redutores e concentração de etanol, bem como os valores totais de açúcares redutores adicionados com fluxo constante. Pode-se analisar a figura 38, de duas formas: a primeira fermentação no regime descontínuo, no qual se utilizou mel invertido e apresentou perfis semelhantes aos resultados obtidos para as fermentações descontínuas. E em seu segundo período onde ocorre alimentação de fluxo contínuo, no qual perdura por 100 minutos, como já dito no capítulo de materiais e métodos.

Outra análise que pode ser realizada é na concentração celular, em que ocorre uma variação no segundo período em relação ao primeiro período devido a fatores de diluição. Além no segundo período, em que se utilizou mel invertido e clarificado, apresentarem menores erros experimentais em relação ao primeiro período, indicando que as análises de concentração celulares em mel invertido e clarificado apresentar resultados mais fidedignos.

Observou-se que houve alimentação de açúcares redutores na ordem de 73,03g/L, em que produziu no total 28,51 g/L de etanol, resultando 76,40% do estequiometricamente possível, analisando as fermentações em separado, temos que no primeiro período ocorre consumo de 30,06 g/L de AR produzindo 12,46 g/L de etanol, no qual representa 81,11% em rendimento. Já no segundo período, ocorre alimentação de 48,03 g/L de AR produzindo 17,34 g/L de etanol, dando 70,65% em rendimento de etanol.

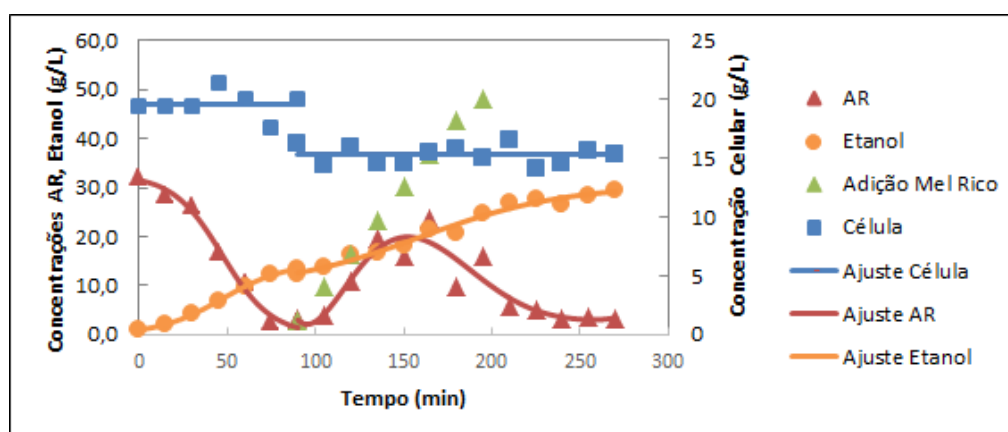


Figura 38 - Variação das Concentrações Celulares, AR e Etanol além da Concentração de AR total alimentada em função do tempo, para o ensaio 9.

Ao analisar os dados presentes na figura 39, apresenta na página seguinte, observa-se que no primeiro período, os mesmos perfis encontrados de pH e desprendimento de CO₂ em relação aos ensaios anteriores de forma descontínua. Enquanto o segundo período pode-se verificar que seu pH se mantém constante praticamente em todo o período de fermentação, somente no início da fermentação observa-se seu pH caindo de 4,93 para 4,75 e a partir deste ponto se mantém constante.

Já o perfil de CO₂ desprendido durante a fermentação, demonstra melhor como se deu a fermentação para este ensaio.

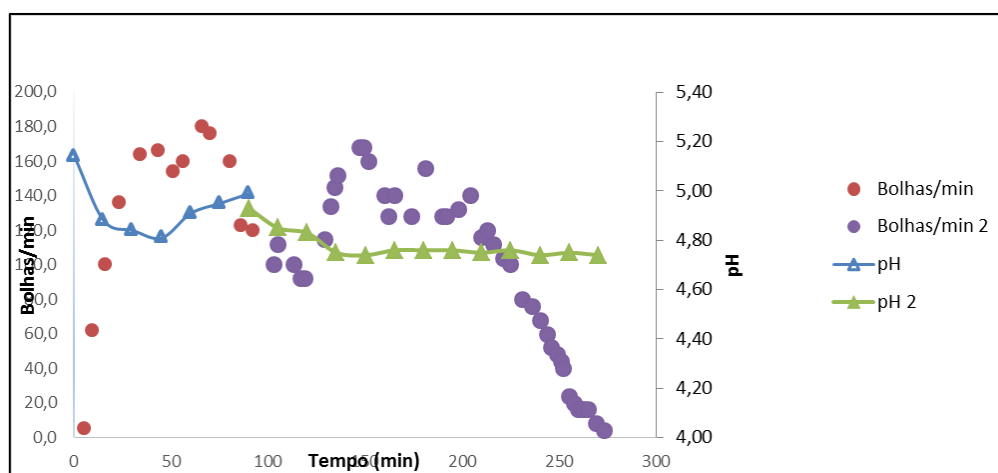


Figura 39 - Variação de CO₂ (medida qualitativa em bolhas/min) nas diferentes alimentações e pH em função do tempo, para o ensaio 9.

Em relação as velocidades específicas de consumo de substrato (μ_S) e produção de etanol (μ_P), observa-se através da figura 40, que em ambos os períodos de fermentação, a produção de etanol está associada ao consumo de substrato.

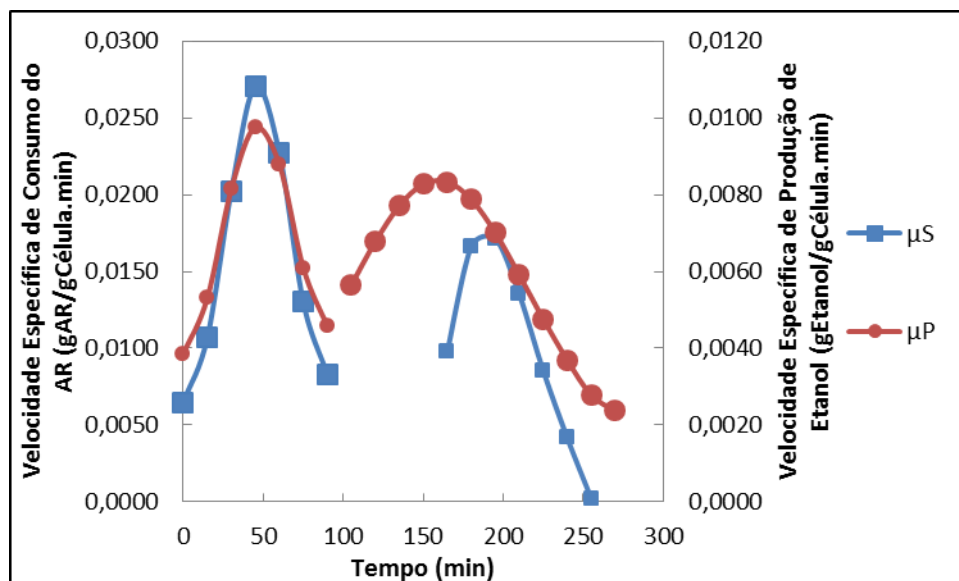


Figura 40 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 9.

Ensaio 10 (E10)

As tabelas 16 e 17 apresentam os resultados das diversas variáveis avaliadas durante o tempo de cultivo.

Tabela 16 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 10.

Tempo	pH	X	AR	Etanol	μ_S	μ_P
0,00	5,31	12,68	22,53	0,36	0,0056	0,0053
15,00	5,03	21,18	29,57	2,16	0,0095	0,0060
30,00	4,99	17,65	24,05	3,37	0,0134	0,0070
45,00	4,94	18,20	29,75	5,45	0,0174	0,0073
60,00	4,91	17,65	4,54	7,76	0,0213	0,0067
75,00	4,93	17,65	1,51	8,88	0,0252	0,0054
90,00	4,95	17,65	9,62	10,36	-0,0017	0,0047
90,00*	4,87	10,81	8,22	11,26	-0,1637	0,0019
120,00**	4,76	10,32	55,63	11,56	-0,0704	0,0027
150,00	4,75	7,78	67,14	11,71	-0,0122	0,0051
180,00	4,76	7,11	63,61	14,15	0,0204	0,0086
210,00	4,76	7,63	55,19	18,76	0,0309	0,0127
240,00	4,74	8,68	45,73	22,41	0,0330	0,0156
270,00	4,73	10,22	36,10	25,85	0,0332	0,0153
300,00	4,71	8,15	26,48	28,47	0,0320	0,0121

330,00	4,72	10,54	17,58	35,22	0,0268	0,0080
360,00	4,72	11,71	10,90	37,07	0,0167	0,0046
390,00	4,73	11,39	7,84	36,60	0,0052	0,0025
420,00	4,73	10,39	7,88	37,58	0,0037	0,0013
450,00	4,75	10,74	5,66	34,54	0,0076	0,0008

* Início da Alimentação ** Fim da Alimentação

Tabela 17 - Tabela com dados referentes ao mel invertido e clarificado adicionado, como quantidade adicionada, Concentrações de AR em função do tempo, para o ensaio 10.

t(min)	Adição Mel (L)	Concentração	Concentração	Concentração AR meio (g/L)
		AR mel adicionado (g/L)	AR mel adicionado (g/L)	
90*	0,00	210,00	0,00	8,22
120**	0,30	210,00	63,05	71,26

* Início da Alimentação ** Fim da Alimentação

Através da figura 41, pode se observar o perfil de concentração das variáveis estudadas, como concentração celular, concentração de açúcares redutores e concentração de etanol em função do tempo. Pode-se verificar que a produção de etanol está relacionada com o consumo do substrato, além de apresentarem perfis semelhantes em relação aos ensaios anteriores para o primeiro período da fermentação, ou seja, fermentação descontínua. Pode observar que no segundo período, a alimentação durou cerca de 30 minutos.

Em relação à concentração celular, observa-se no segundo período que ocorre uma diluição. Neste ensaio os melhores resultados encontraram-se presentes no primeiro período, desconsiderando os dois pontos iniciais que apresentaram muito fora do valor real, já no segundo período ocorrem maiores variações nas medidas, mas não apresentam tantos erros experimentais, pois são valores próximos do valor real de concentração celular.

Neste ensaio, o consumo de açúcares redutores foi de 84,39 g/L produzindo 34,18 g/L em etanol, o qual representa 79,26% de rendimento em etanol. Já o estudo de forma separada, mostra para o primeiro período um consumo de 24,28 g/L de AR, gerando 10,00 g/L de etanol, obtendo rendimento de 80,60% do rendimento teórico, enquanto que para o segundo período consumiu 65,60 g/L e AR gerando 23,28 g/L de etanol, obtendo assim rendimento de 69,45%.

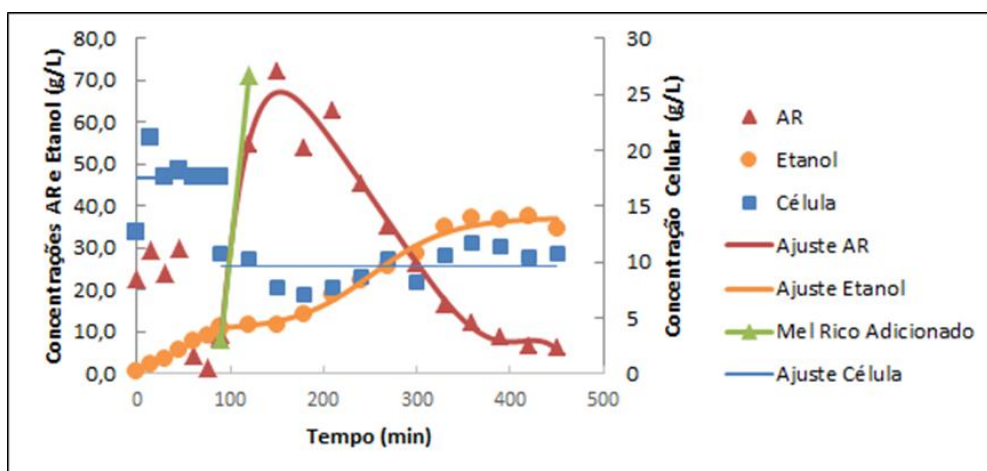


Figura 41 - Variação das Concentrações Celulares, AR e Etanol além da Concentração de AR total alimentada em função do tempo, para o ensaio 10.

Conforme a figura 42 percebe-se na primeira alimentação, o perfil clássico de uma fermentação, já avaliada em ensaios anteriores.

Em oposição, na segunda alimentação, observa-se que o pH, se mantém constante durante todo o período de fermentação. Todavia, ao verificar os dados de CO_2 , nota-se um comportamento característico da evolução do gás carbônico durante a fermentação, se ajustada uma curva mediados dados obtidos.

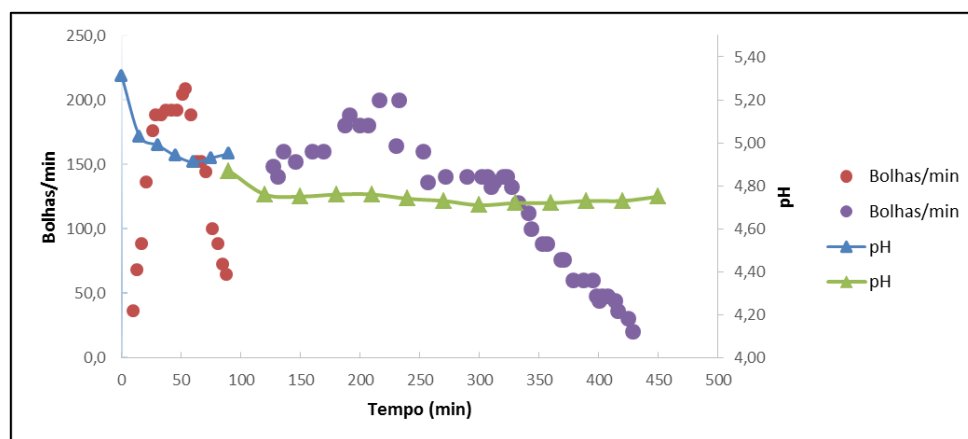


Figura 42 - Variação de CO_2 (medida qualitativa em bolhas/min) nas diferentes alimentações e pH em função do tempo, para o ensaio 10.

Em relação às velocidades específicas de consumo de substrato (μ_S) e produção de etanol (μ_P), observa-se através da figura 43, que em ambos os

períodos de fermentação, a produção de etanol está associada ao consumo de substrato.

Também se verificou que ocorre um aumento das velocidades específicas no segundo período em relação ao primeiro, diferente do que foi observado no ensaio 09, indicando o aumento da concentração de substrato total de 27 g/L para 71,26 g/L. Neste segundo período, constatou-se que a concentração celular cai de aproximadamente 17 g/L para 10 g/L em massa seca.

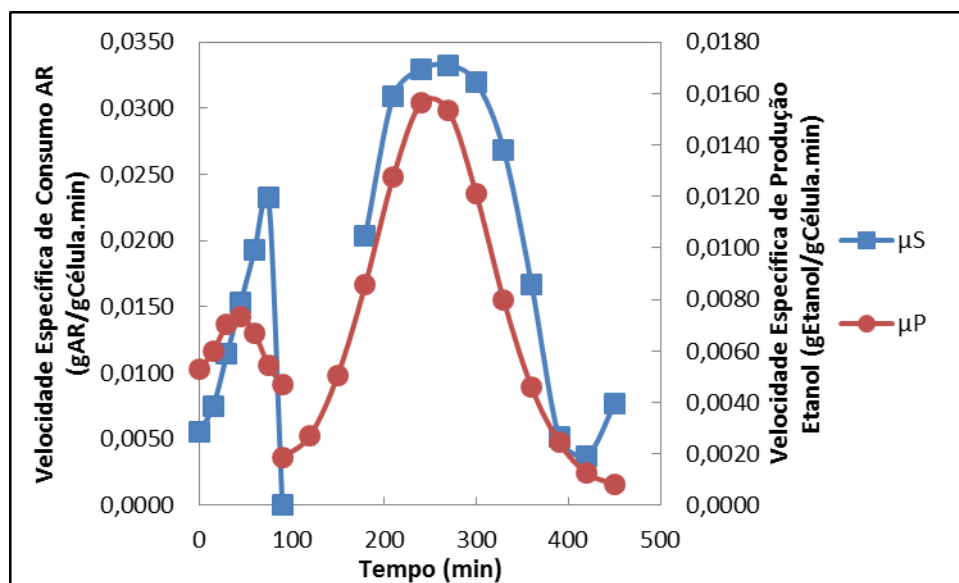


Figura 43 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 10.

Ensaio11 (E11)

As tabelas 18 e 19 a seguir apresentam os dados avaliados durante o tempo de fermentação.

Tabela 18 - Variação do PH do mosto, Concentração Celular (X), Concentração de Açúcares Redutores (AR), Concentração de Produto (Etanol), Velocidade Específicas de consumo de Açúcar Redutor (μ_S) e Velocidades específicas da Produção de Etanol (μ_P) em função do tempo em minutos, para o ensaio 11.

Tempo	pH	X	AR	Etanol	μ_S	μ_P	Tempo
0	5,13	16,81	66,91	3,52	0,00	0,033	0,018
15	5,13	26,70	54,31	5,83	0,00	0,042	0,018
30	5,11	27,53	39,47	13,19	0,00	0,057	0,018
50	4,87	16,81	10,91	16,59	0,00	0,048	0,018
60	4,99	18,67	3,37	22,63	0,00	0,044	0,018

60*	4,96	17,20	44,87	22,23	0,00	-0,029	0,004
90	4,92	18,44	60,05	25,86	0,00	-0,005	0,004
120	4,92	16,37	61,85	26,42	0,00	0,000	0,004
150	4,92	13,39	64,88	30,04	-0,01	-0,003	0,005
180	4,90	11,04	66,23	32,91	-0,01	-0,008	0,006
210	4,86	11,35	62,41	32,63	0,00	-0,001	0,016
223**	4,88	10,24	71,74	34,92	0,00	-0,005	-0,007
240	4,87	8,86	69,38	31,38	0,00	0,030	0,024
300	4,88	8,42	63,42	28,77	0,00	0,033	0,007
360	4,87	9,61	42,70	43,45	0,00	0,038	0,007
375	4,86	6,57	40,54	44,23	0,00	0,037	0,007
390	4,85	7,56	33,78	42,70	0,00	0,033	0,007
420	4,86	11,95	29,98	47,90	0,00	0,030	0,007
450	4,87	10,30	24,36	49,95	0,00	0,030	0,007
480	4,86	9,14	20,16	48,76	0,00	0,027	0,007
510	4,86	10,99	14,71	54,57	0,00	-0,003	0,007

* Início da Alimentação ** Fim da Alimentação

Tabela 19 - Tabela com dados, como quantidade adicionada, Concentrações de AR em função do tempo, para o ensaio 11.

t(min)	Adição Mel (L)	Concentração ART mel adicionado (g/L)	Concentração ART mel adicionado (g/L)	Concentração ART meio (g/L)
60*	0,096	145	13,93	13,93
90	0,090	145	13,05	26,98
120	0,090	145	13,05	40,03
150	0,090	145	13,05	53,08
180	0,090	145	13,05	66,13
210	0,090	145	13,05	79,18
223**	0,039	145	5,66	84,84

* Início da Alimentação ** Fim da Alimentação

A figura 44, apresentada na página seguinte, mostra as concentrações de célula, o consumo dos açúcares redutores e produção de etanol em função do tempo. Pode-se verificar no primeiro ensaio, realizado em concentrações em torno de 67 g/L. O consumo de açúcares redutores em torno de 63,54 g/L produziu 19,11 g/L de etanol, o que se refere 58,86% de rendimento.

Ainda sobre o primeiro período, observa para as concentrações de célula, dois pontos fora do valor médio da concentração celular, indicando erros experimentais.

No segundo período de fermentação, observa-se a alimentação de 600g de mel invertido e clarificado de forma contínua, indicando desta forma a diluição que observa através da concentração celular, além da reposição de 100g de mel no início da alimentação. Observa-se neste caso que a concentração celular mesmo variando durante toda a fermentação, não possui pontos muito fora de sua curva, apresentando assim um padrão de concentração celular mais adequado, visto o não crescimento celular existente nessas condições experimentais.

Em relação ao consumo de AR e produção de etanol, observa-se que foram consumidos 70,13 g/L de açúcares redutores, gerando 32,34 g/L de etanol, portanto 90,24% do rendimento teórico.

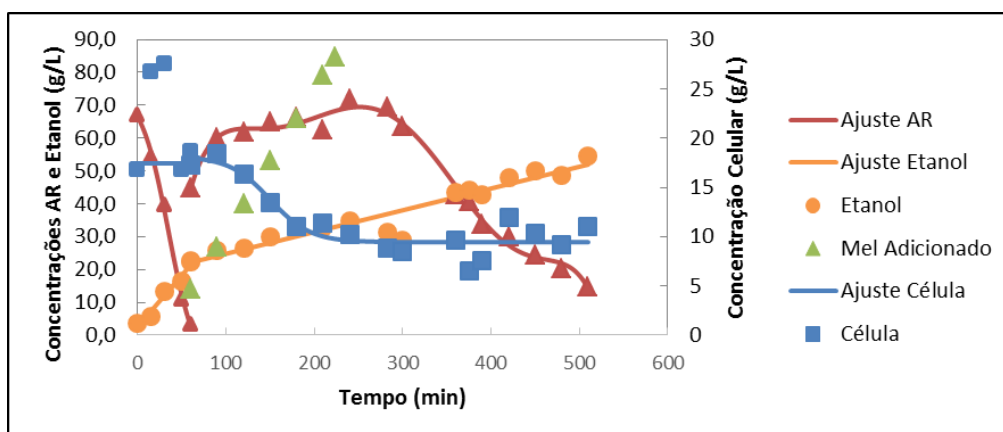


Figura 44 - Variação das Concentrações Celulares, AR e Etanol além da Concentração de AR total alimentada em função do tempo, para o ensaio 11.

Outro fator avaliado nos ensaios, foram o perfil de pH e desprendimento de CO₂ durante a reação em função do tempo, observa-se na figura 45, que no primeiro período da fermentação (fermentação descontínua), seu pH se mantém constante no início e somente a partir dos 50 minutos ocorreu uma diminuição de 5,10 para 4,85. No segundo período (fermentação descontínua alimentada), observou-se que seu pH se mantém constante praticamente durante toda fermentação em torno de 4,85. Neste ensaio os dados de CO₂ desprendido ao longo do tempo de fermentação, mostraram-se muito variável, demonstrando provavelmente alguns erros de leitura, contudo se ajustada uma curva média, esta demonstraria também o comportamento característico da evolução do CO₂ durante a fermentação.

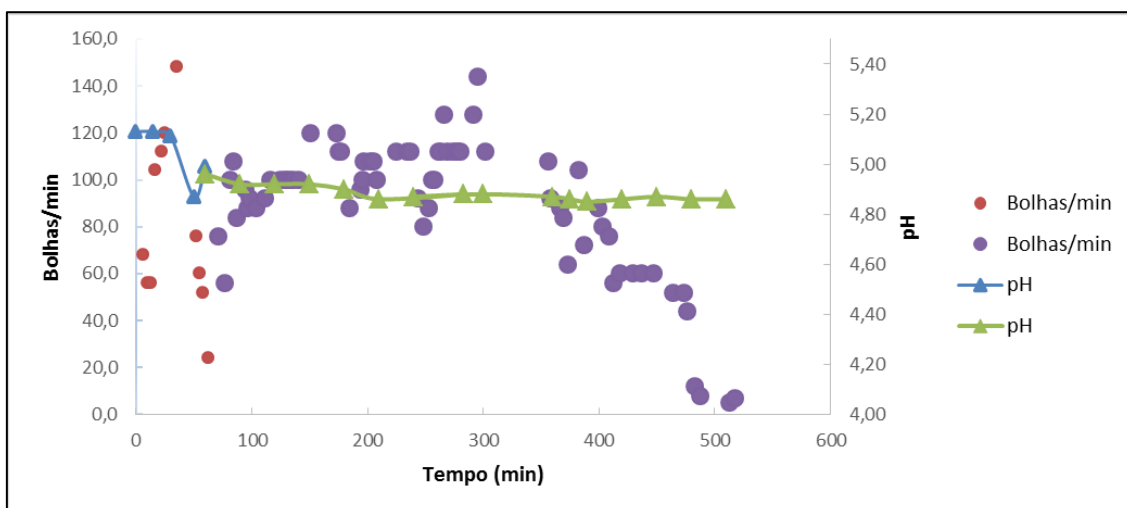


Figura 45 - Variação de CO₂ (medida qualitativa em bolhas/min) nas diferentes alimentações e pH em função do tempo, para o ensaio 11.

Em relação às velocidades específicas de consumo de substrato (μ_S) e produção de etanol (μ_P), observa-se através da figura 46, que as velocidades μ_P são aparentemente constantes nos dois períodos analisados, não permitindo uma melhor análise dos resultados.

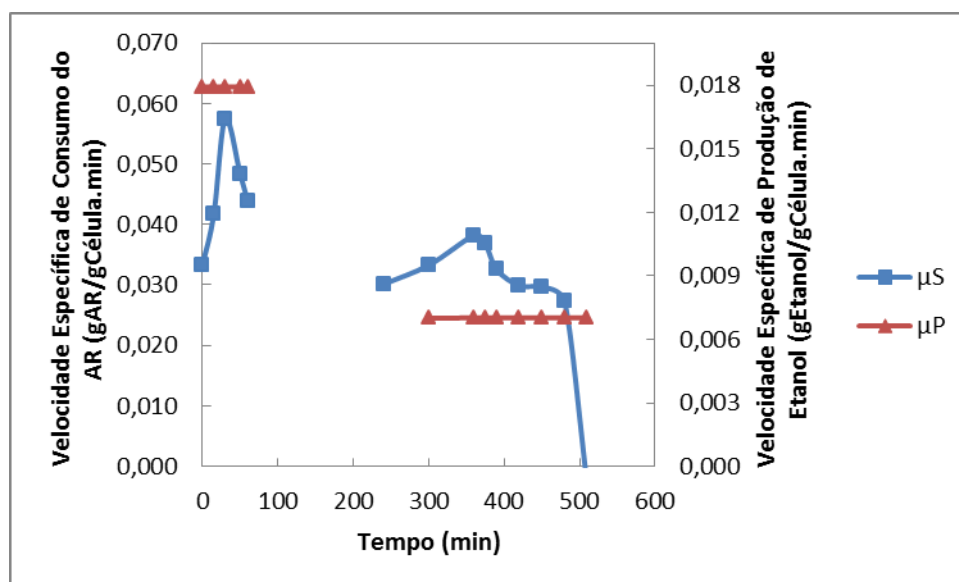


Figura 46 - Variação das velocidades específicas de consumo e produção em função do tempo, para o ensaio 11.

4.3.4. Discussão Geral Ensaios Descontínuos alimentados (Ensaios 7 a 11)

Ao analisar, o consumo de açúcares redutores e produção de etanol, nos ensaios 09 e 11, constatou-se que ocorre uma diminuição das velocidades de consumo de AR e de produção de etanol, em relação às fermentações descontínuas. No entanto para o ensaio 10, ocorre um aumento das velocidades mesmo com o aumento da concentração de AR inicial. Esse efeito também foi observado por Acorsi (2012) e Silva (2016), utilizando mel invertido como substrato, no presente trabalho foi utilizado mel invertido e clarificado. Mesmo obtendo menores valores de velocidades, observaram-se melhores resultados quanto ($Y_{P/S}$). Este fato pode ter ocorrido, pois o regime descontínuo alimentado com alimentação constante não possui intervalos ociosos de fermentação, como ocorreu nos ensaios 07 e 08.

Além disso, os ensaios 9 e 11, em seu segundo período, possuem velocidades menores em relação ao ensaio 10. Esta diminuição em relação ao ensaio 10, provavelmente pode ter sido ocasionada, devido ao fato de que nos ensaios 9 e 11, possuem uma vazão menor, à aquela apresentada no ensaio 10.

Já em relação ao rendimento em etanol, no regime, descontínuo alimentado, apresentaram de forma geral, valores superiores. Apresentando em sua totalidade rendimentos totais em torno de 75% - 80%. Todavia apresentando rendimentos variáveis, em seus diferentes períodos.

Os maiores valores para o rendimento em etanol foi alcançado nos ensaios 07 e 11. Para o ensaio 07-2^o pulso, possuindo rendimento aproximado de 94% e no ensaio 11-2^a Alimentação, rendimento de 90%. Conforme observa-se na tabela 20, apresentada na página seguinte.

Se compararmos os rendimentos em etanol obtidos por Bueno Netto (1982) e Silva (2016), pode observar que os valores encontrados nos ensaios 09 e 10 estão muito próximos ou levemente inferiores. Já nos ensaios 7-2 e 11-2, encontraram-se resultados bem mais elevados que os demais ensaios avaliados, tanto na literatura consultada, quanto dos experimentos anteriores.

Essa comparação possibilita pensar que o processo de clarificação do mel melhorou em parte a produção de etanol. Pode observar esses

rendimentos através da tabela 20, em que se comparou também o rendimento total considerando ou não o ponto inicial de concentração de etanol.

Tabela 20 - Tabela com os valores de Conversão em Etanol e Rendimento.

Ensaio	Inserção Mel	$Y_{p/s}$ (g Etanol/g AR)	η Etanol (%)	η Etanol (%) Total	η Etanol (%) Considerando $E_0=0$	Razão (S_0/X_0)
7	1	0,39	76,32			1,87
	2*	0,48	93,93	54,00	55,95	1,24
	3*	0,15	29,35			1,41
8	1	0,35	68,49			1,73
	2*	0,11	21,53	23,92	24,73	19,43
Ensaio	Inserção Mel	$Y_{p/s}$ (g Etanol/g ART)	η Etanol (%)	η Etanol (%) Total	η Etanol (%) Considerando $E_0=0$	Razão (S_0/X_0)
9	1	0,41	81,11			1,61
	2*	0,36	70,65	74,47	77,36	3,15
10	1	0,41	80,23			1,53
	2*	0,35	69,45	74,42	75,2	7,39
11	1*	0,30	58,71			3,84
	2*	0,46	90,24	74,74	79,89	7,48

*mel invertido e clarificado

Ao observar as análises de pH dos ensaios descontínuos alimentados, considerando apenas para efeito comparativo o segundo período de fermentação, ou seja a alimentação descontínua com fluxo constante. Pode-se verificar que a variação de pH decai rapidamente durante o tempo de alimentação, até um valor mínimo, e a partir do final da alimentação a variação de pH se comporta praticamente de forma constante, isso ocorre em todos os ensaios analisados, como pode ser observado pela figura 47. Estes perfis também foram observados nos ensaios de Acorsi (2012) e Silva (2016), que trabalharam tanto com mel invertido quanto com mel não invertido.

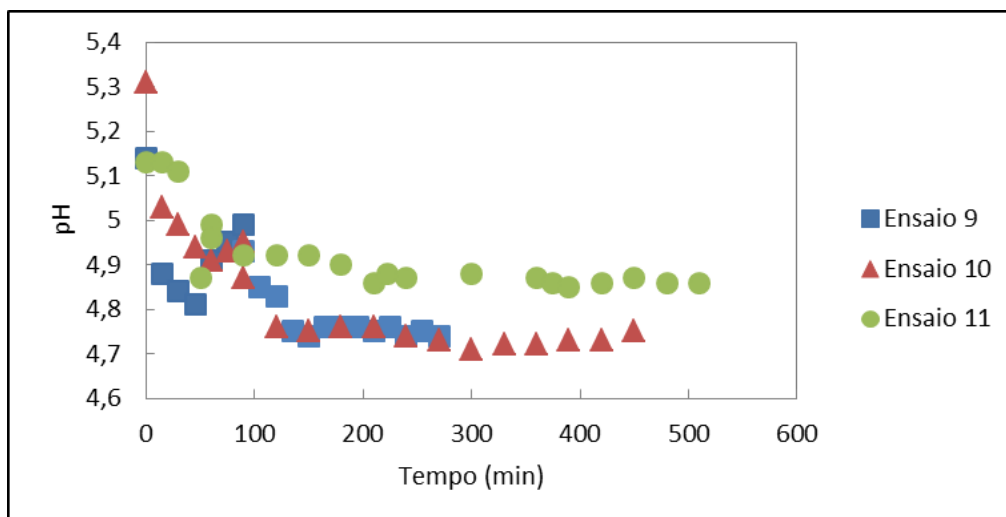


Figura 47 - Variação do pH do meio em função do tempo nos ensaios 9 a 11.

4.4. Considerações Finais

Em resumo pode-se verificar que o estudo cinético da produção de etanol, utilizando mel invertido e mel invertido e clarificado utilizando *Saccharomyces cerevisiae* em alta concentração. Portanto, nesse contexto, foram avaliados os efeitos da concentração inicial de açúcares redutores, do tipo de fermentação utilizada (descontínua ou descontínua alimentada, sendo essa última em pulsos ou em fluxo contínuo) e ainda da prévia ou não clarificação do mel invertido, também se observou as medidas de concentração celular durante o tempo de fermentação.

Pode-se constatar, no presente trabalho, que as melhores fermentações ocorreram para os ensaios 07-2º Pulso e 11-2ª Alimentação, no grupo das fermentações descontínuas alimentadas (em pulso e de fluxo constante, respectivamente).

Já nos ensaios descontínuos apresentaram uma faixa de rendimento de cerca de 80%, presentes nos ensaios 1 e 4, os melhores resultados para as fermentações descontínuas.

5. Conclusões

A clarificação do mel invertido permitiu uma melhor medida das concentrações celulares de *Saccharomyces cerevisiae* ao longo do tempo de ensaios de fermentação;

Que devido a utilização de inóculos altamente concentrados em células de *Saccharomyces cerevisiae* não se observou qualquer crescimento celular nos diferentes ensaios de fermentação.

Que a maioria dos ensaios de fermentação realizados ocorreram segundo o modelo estabelecido por GADEN (1955) onde a velocidade específica de produção de etanol está diretamente associada á velocidade específica de consumo do substrato.

Que os perfil de concentração hidrogeniônica (pH) em função do tempo, em diversos ensaios, foram compatíveis com o desprendimento de dióxido de carbono.

Que a partir da comparação dos ensaios descontínuos e descontínuos alimentados, foi possível fazer um paralelo dos motivos do porque industrialmente as fermentações ocorrerem com variações em sua alimentação, ou controle sob o processo de alguma forma. Como pôde ser avaliado em alguns ensaios, como no ensaio 7-2^o Pulso e no ensaio 11-2^a Alimentação, apresentando melhores rendimentos.

6. Referências

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.

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

BIODIESELBR, Disponível em <<https://www.biodieselbr.com/proalcool/proalcool/programa-etanol>>, acessado em março, 2018.

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.

AIBA, S.; HUMPHREY, A. & MILLIS, NANCY F. **Biochemical Engineering**, 2a ed., University of Tokyo Press, 1973.

VILA, F. C. **Identificação dos flavonoides com atividade antioxidante da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.)**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Carlos.

ANDRADE, L. A. B. **Cultura da Cana-de-açúcar**. In: CARDOSO, M. das G. (Ed.). Produção artesanal de aguardente. Lavras: UFLA, 2001.

JOSINO, A. S.; COUTINHO, M. D. H.; PESSOA, H. L. F. Característica de cultivo e da nutrição. **Revista: Conceitos**, 133-141p. 2005.

ANDRADE, R. R. **Demanda e Perfil Profissional de Técnicos de Nível Médio para o Setor Sucro-alcóoleiro**. 2005. 213 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Educação Agrícola, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2005.

UNICA(1) - 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=](http://www.unicadata.com.br/historico-de-area-ibge.php?idMn=33&tipoHistorico=5&acao=visualizar&idTabela=1613&produto=)
> acessado em abril 2018.

UNICA(2) – União da Indústria de Cana-de-Açúcar **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol.** Disponível em:<
[http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-
moagem.php?idMn=32&tipoHistorico=4&acao=visualizar&idTabela=1984&safra=
=2017%2F2018&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=32&tipoHistorico=4&acao=visualizar&idTabela=1984&safra=2017%2F2018&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)
> acessado em abril 2018.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica.** São Paulo: Sarvier, 1995. 238p.

SPENCER, C.L.; MEADE, G.P. **Manual del azúcar de caña.** 9 ed. Montaner y Simon, Barcelona, 1967, 940 p.

DELGADO, A. A.; AZEREDO CÉSAR, M. A. **Elementos de tecnologia e engenharia do açúcar de cana.** Vol. II. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1977.

CLARKE, M.A.; GODSHALL, M. A. **Chemistry and processing of sugarbeet and sugarcane.** Sugar Series, n. 9, Amsterdam: Elsevier, p. 406, 1988.

DOHERTY, W. O. S.; RACKEMANN, D. W. Stability of sugarcane juice - A preliminary assessment of the colorimetric method used for phosphate analysis. **Zuckerindustrie**, v. 133, n. 1, p. 24-30, 2008.

PAYNE, J.H. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana.** São Paulo, Nobel: STAB, p. 245, 1989.

STUPIELLO, J.P. Conversando com a cana. STAB. **Açúcar, Álcool & Subprodutos**, Piracicaba, v. 20, n. 5, p. 38, 2002.

CHEN, J.C.P.; CHOU, C. Cane Sugar Handbook. **A manual for cane sugar manufacturers and their chemists**. 12nd.ed. New York John Wiley & Sons, 1993.

CESAR, M.A.; DELGADO, A.A.; CAMARGO, A.P.; BISSOLI, B.M.A.; SILVA, F.C. Capacidade de fosfatos naturais e artificiais em elevar o teor de fósforo no caldo de cana-de-açúcar (cana-planta), visando o processo industrial. **STAB: açúcar, álcool e subprodutos**, v.5, n. 5, p. 32-38, 1987.

SOUZA, J. **Estudo da eficiência de alguns polielitrólitos utilizados na clarificação do caldo de cana**. 101 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1988.

PARANHOS, S. B. Cana-de-açúcar: cultivo e utilização. **Fundação Cargil, Campinas – SP**, v. 1, 1987, 431p.

HAMERSKI, F. **Estudo de variáveis no processo de carbonatação de cana-de-açúcar**. 2009. 149f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

TFOUNI, S. A. V.; VITORINO, S. H. P.; TOLEDO, M. C. F. Efeito do processamento na contaminação de cana-de-açúcar e derivados por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n. 1, p. 76-82, 2007.

ATKINS, P.; DE PAULA, J. **Físico-Química: vol. II**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002.

AOKI, I. V. **Clarificação de caldos de cana: comparação entre os processos de sulfitação e carbonatação.** 177 p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1987. QMCUEB. Revista eletrônica da UFSC. Florianópolis – SC. Disponível em http://www.qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/forças_intermoleculares.html.

BENNET, M.C. Flocculation process in sugar manufacturing. **International Sugar Journal**, v. 75, p. 101-109, 1973.

HONIG, P. **Principles of sugar technology.** New York: Elsevier Publishing Company, v. 1, 1953.

HUGOT, E. **Manual da Engenharia Açucareira.** São Paulo: Mestre Jou, v.1, 1977.

MADHO, S.; DAVIS, S.B. Review of proven Technologies available for the reduction of raw sugar colour, **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, v. 81, p. 165-183, 2001.

COPERSUCAR – COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO LTDA. **Manual de controle químico da fabricação de açúcar.** Piracicaba, 2001.

DELGADO, A. A.; AZEREDO CÉSAR, M. A. **Elementos de tecnologia e engenharia do açúcar de cana.** Vol. II. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1977.

DAVIS, S.B. The chemistry of colour removal: a processing perspective. **Proceedings of the South African Sugar Technologists' Association**, Durban, v. 75, p. 328-336, 2001.

VERCELLOTTI, J.R. e CLARKE, M.A. Color removal – chemical treatment. **Proceeding of the South African Sugar Technologists' Association**, v. 56, p. 272-281, 1977.

EL-KADER, A.A.; MANSOUR, A.E.K.; YASSIN, A.A. Influence of clarification on sugar cane juice by the sulphitation and phosphatation processes. In: International Society of Sugar-Cane Technologists, 18, 1983, Cuba. **Proceedings**. Cuba, p. 507- 530, 1983.

MOODLEY, M.; SCHORN, P.M.; WALTHER, D.C.; MASSINGA, P. Optimising the carbonation process. **International Sugar Journal**, v. 105, n. 1249, p. 24-28, 2003.

SIMPSON, R. The chemistry of clarification. **Proceeding of the South African Sugar Technologists' Association**, Durban, v. 70, p. 267-271, 1996.

NUNES, D.L.; **Preparação de carvão ativado a partir de torta prensada de *Raphanus sativus* L. e utilização para clarificação de soluções**. Dissertação (Mestrado Farmácia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2009.

ABREU, M. B. **Preparação de carvão ativado de bagaço de cana-de-açúcar e sua aplicação na adsorção de Cd (II) e Cu (II)**. Apucarana, UTFPR, 2013. TCC, 53p.

ANDRADE, K.A.A.C.; FERREIRA, J.M.; JAGUARIBE, D.C.A.; SANTOS, D.R.; MEDEIROS, L.C.S.; CARVALHO, A.C.S.; **Clarificação do caldo de cana por meio de carbons ativados feitos a partir do bagaço de cana-de-açúcar**. 12º Encontro Brasileiro sobre Adsorção, Gramado, RS, 2018.

NGUYEN, D.M.T.; ZHANG, Z.; DOHERTY, W.O.S. Degredation of hydroxycinnamic acid mixtures in aqueous sucrose. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 63, p. 1582-1592, 2015.

LUCAS, M.S.; PERES, J.A.; LI PUMA, G. Treatment of winery wastewater by ozone-based advanced oxidation processes (O₃, O₃/UV and O₃/UV/H₂O₂) in a pilot-scale bubble column reactor and process economics. **Separation and Purification Technology**, V. 72, P. 235-241, 2010.

COCA, M.; PEÑA, M.; GONZÁLEZ, G. Kinetic study of ozonation of molasses fermentation wastewater. **Journal of Hazardous Material**, v. 149, p. 364-370, 2007.

BENÍTEZ, J.F.; BELTRÁN-HEREDIA, J.; ACERO, J.L.; PINILLA, M.L. Ozonation Kinetics of Phenolic Acids Present in Wastewaters from Olive Oil Mills. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, V. 56, P. 251-27, 1997.

FONSECA, C.R. **Ozonização: uma alternativa para clarificação do caldo de cana-de-açúcar**. Tese (Doutorado) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O'DONNELL, C.; TIWARI, B.K.; CULLEN, P.J.; RICE, R.G. **Ozone in Food Processing**, 1st Ed.; 1.ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2012.

JEREZ, M. C. D. **Estudo comparativo de diferentes métodos e composições de fermentação de melaço de cana de açúcar por *Zimonomas Mobilis* CP4**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas: [s.n.]. 1993.

ALMEIDA, J.R. Matérias Primas. **Semana de Fermentação Alcoólica**, Piracicaba, v. 1, p. 1-13, 1966.

WOICIECHOWSKI, A. L.; CARVALHO, J. C.; SPIER, M. R.; HABU, S.; YAMAGUSHI, C.; GHIGGI, V.; SOCCOL, C. R. Emprego de Resíduos Agroindustriais em Bioprocessos Alimentares. In: Glaucia Maria Pastore; Juliano Lemos Bicas; Mário Roberto Maróstica Junior. (Org.). **Biotecnologia de Alimentos**. 1ed. São Paulo: Atheneu, v. 12, p. 143-172, 2013.

OLBRICH, H. Melazas. In: HONIG, P. **Principios de tecnologia azucarera**. Mexico: Continental S. A., 1974. Cap. 11, p. 425-575.

LESNIAK, W. Fermentation Substrates. In: KRISTIANSEN, B.; LINDEN, J.; MATTEY, M. **Citric Acid Biotechnology**. London: Taylor Francis Ltd, 2002. Cap. 10, p. 149-159.

BARROS, E. S.; Estudo Cinético da Fermentação Cítrica em Sistema Descontínuo a partir de Fontes Sacaríneas. 2018. Dissertação Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, 2018.

AKGOL, S. KAÇAR, Y.; DENIZLI, A.; ARICA, M. Y. Hydrolysis of sucrose by invertase immobilized onto novel magnetic polyvinylalcohol micropheres. **Food Chemistry**, v. 74, p. 281-288, 2001.

RODRIGUES, M. V. N.; RODRIGUES R. A. F.; SERRA G.E; ANDRIETTA S. R.; FRANCO T. T. Produção de xarope de açúcar invertido por hidrólise heterogênea, através de planejamento experimental. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, p. 103-109, 2000.

CABRAL, F. A. **Estudo cinético da invertase livre e imobilizada em alginato de cálcio**. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP), 1989.

VICENTE, A. A. **Preparação de Açúcar Invertido por Meio de Invertase Imobilizada em Sílica**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Química. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2000.

BAI F.W.; ANDERSON, W.A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, 25, p. 89-105, 2008.

APIO, A.; SALAU, P.G. **Estudo comparativo de modelos de coeficientes de atividade da fase líquida para separação da mistura etanol-água**. XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QÚMICA, Florianópolis, Santa Catarina, 2014.

LASHINKY, A.; SCHWARTZ N.D. **How to beat the high cost of gasoline**. 2006.

NOVACANA⁽¹⁾ . **Aplicações e Usos do Etanol**. Disponível em: <https://www.novacana.com/etanol/aplicacoes> . Acessado em Fevereiro, 2018.

NOVACANA⁽²⁾.**Processos de Fabricação do Etanol**. Disponível em: <https://www.novacana.com/etanol/fabricacao> . Acessado em Fevereiro, 2018.

COPERSUCAR. **Como é produzido o Etanol**. Disponível em: <https://www.copersucar.com.br/noticias/como-e-produzido-o-etanol/>. Acessado em Agosto 2018.

SILVA, F. H. **Cultivo de Saccharomyces cerevisiae em processos descontínuo e descontínuo alimentado utilizando mel invertido para produção de etanol**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá, 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/>. Acessado em Fevereiro, 2018.

SCHMIDELL, W., FACCIOTTI, M. C. R. **Biorreatores e Processos Fermentativos**. In: Schimidell, Willibaldo *et al.* (Coord.). **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgar Blucher, p. 179-192. (Biotechnologia Industrial; v.2), 2001.

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

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

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 Maio 2016.

McNEIL, B.; HARVEY, L. M. **Fermentation: A Practical Approach.** 1 ed. IRL PRESS at Oxford University Press, 1990.

VIEGAS, M. C. **Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes.** Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. 150p., 2003.

TOSETTO, G.M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol.** 2002. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, Campinas, 2002.

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

ALCOESTE, **Produção de Etanol.** Disponível em: <http://www.alcoeste.com.br/?pg=producao>. Acessado em Fevereiro 2018.

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de etanol. In: LIMA, U.A.; AQUARONA, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos.** 1 ed. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. Cap. 1, p. 1-40.

STECKELBERG, C. (2001). **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas.** Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas-SP. 215p.

AMORIM, H. V. **Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia**. Piracicaba. São Paulo, 2005. Fermentec, 448p.

PHISALAPHONG, M.; SRIRATTANA, N.; TANTHAPANICHAKOON, W. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v 28. N. 1, p. 36-43. 2006.

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.

GOMES, E. **Efeito do tratamento ácido da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação alcoólica**. (Dissertação-Mestrado- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” USP). Piracicaba, 1988, p. 206.

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.

CALDAS, C.; BORÉN, A.; SANTOS, F. **Cana-de-açúcar Bioenergia, Açúcar e Etanol**. Tecnologia e Perspectivas. 2.ed. Viçosa, MG, 2012. 637p.

FERNANDES, P. M.B. *et al.* **Ácidos Graxos de Membrana e Trealose na Resposta de Levedura a Alta Pressão Hidrostática**. Universidade Federal do Espírito Santo- Vitória, 2008.

SILVA, J. A. *et al.*, **Aplicação da Metodologia de Planejamento Fatorial e Análise de Superfícies de Resposta para Otimização da Fermentação Alcoólica**. V. 31. Universidade Estadual da Paraíba: Química Nova. 2008.

ALVES, J. G. L. F. Mini-Curso de Produção de Cachaça Artesanal. In: Jornada Acadêmica de Engenharia de Alimentos. Departamento de Ciências Exatas e

Tecnologia. Centro Universitário de Belo Horizonte (UNIBH, 3). **Centro de Tecnologia em Cachaça**. Belo Horizonte. Ago./set. 2004.

MARTINEZ, D. S. **Estudo dos processos industriais de produção de etanol por fermentação**. 2007. Dissertação de mestrado – Faculdade de Engenharia Química/ Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

VASCONCELOS, J.N. & VALDMAN, B. **Otimização do Processo de Fermentação Alcoólica através da Batelada Alimentada**. V Simpósio de Avaliação de Safra da Agroindústria da Cana-de-Açúcar em Alagoas. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, v.106, no 2, 38-48, 1988.

ALCARDE, A.R.; HORII, J.; NOBREI, T.P. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p. 20-25, jan./mar. 2007.

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

PASCHOALINI. Glauce; ALCARDE. Valmir. Estudo do processo fermentativo de usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização. **Revista de Ciência & Tecnologia**. v. 16, n. 32, p. 59-68,2009.Disponível em: <https://www.metodista.br/revistas/revistasunimep/index.php/cienciatecnologia/article/view/781/318>.

Acessado em Junho 2018

MARTINS, C. V. B. **Biologia e fusão de protoplastos de leveduras floculantes e H₂ S⁻**, Piracicaba,1997, (Dissertação de Mestrado) – Escola Superior de Agricultura” Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

ANDRIETTA, M. da G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. **Bioetanol – Brasil, 30 anos na Vanguarda**. UNICAMP, 2007. Campinas, SP

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

HONIG, P. **Principles of sugar technology**. New York: Elsevier Publishing Company, v. 1, 1953.

ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. **Process Biochemistry**. v. 33, n. 8, p. 805-810, 1998.

TREICHEL, H.; **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados**. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.

BADDLEY CHEMICALS Inc., Disponível em <https://www.baddley.com/copy-of-laboratory-procedures-in-sp>, acessado em maio 2018.

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.

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.

HISS, H. **Cinética de processos fermentativos**. In: Schmidell, Willibaldo et al. (Coord.) **Biotechnology Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Editora Edgar Blücher, 2001. p. 93-122. (Biotechnology industrial; v.2).

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

ACORSI, R.L., **Estudo Cinético da Fermentação Alcoólica Descontínua de Mel Invertido**. 2012. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2012.

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 Melaço de Cana de Açúcar**. 1982. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1982.

7. Apêndices

Apêndice A – Curva Padrão Para Medidas de Biomassa por Espectrofotometria

Na figura 48 encontram-se, os dados experimentais que relacionam a concentração celular em massa úmida de uma solução de levedura solução da levedura com os valores obtidos de absorbância por leitura em espectrofotômetro. A partir de uma regressão linear obtém-se a curva padrão utilizada (equação 13).

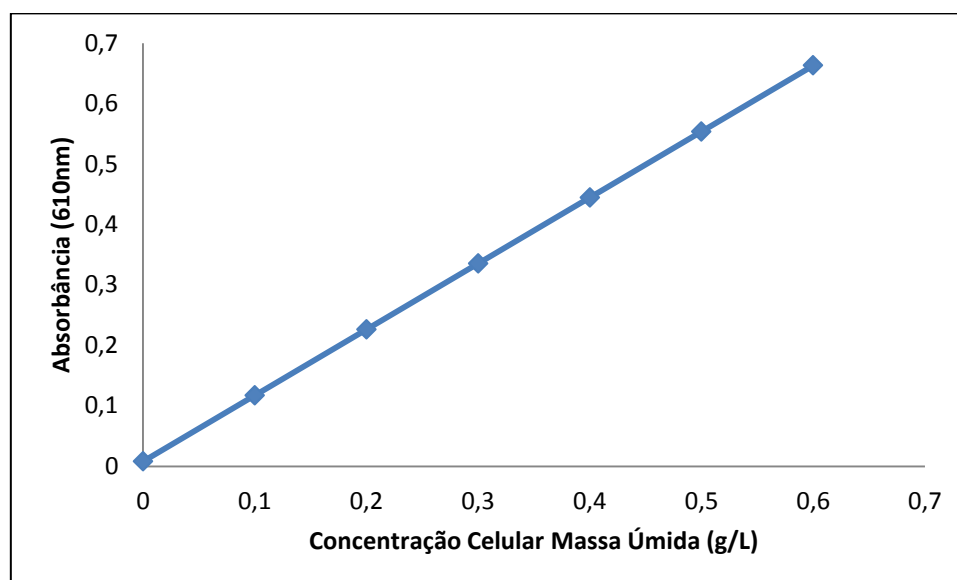


Figura 48 - Curva padrão para se determinar a concentração celular

Equação 13 - Equação da curva padrão para determinação da concentração celular

$$Abs(610 \text{ nm}) = 1,091 \cdot C_{cel} + 0,0081$$

$$R^2 = 0,9974$$

Apêndice B – Curva Padrão da Análise DNS

Na figura 49, encontram-se os dados experimentais que relacionam a concentração de ART de uma solução com os valores obtidos de absorbância por leitura em espectrofotômetro. A partir de uma regressão linear obtém-se a curva padrão utilizada (equação 14).

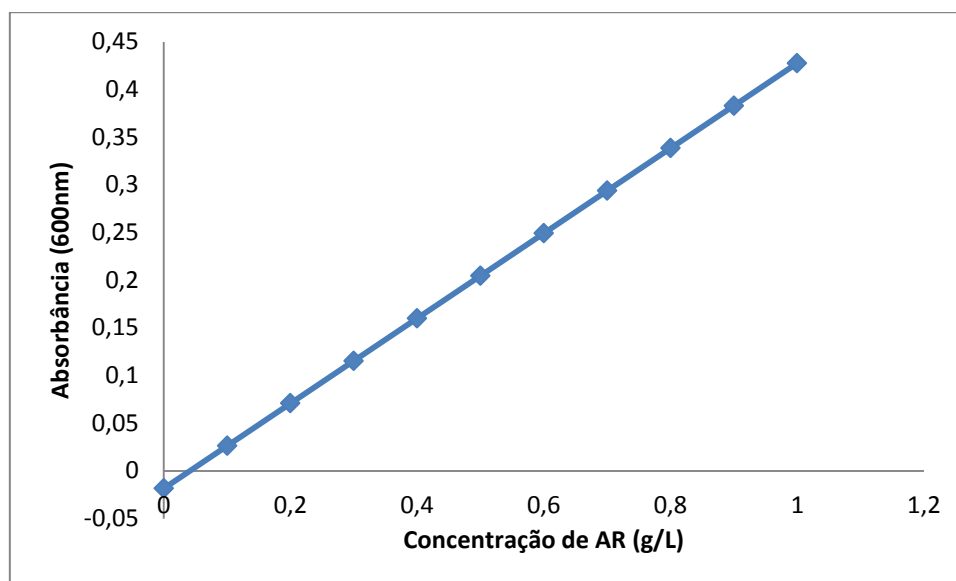


Figura 49 - Curva Padrão da Análise DNS

Equação 14 - Equação da curva padrão da análise DNS

$$Abs (600 \text{ nm}) = 0,446 \cdot C_{ART} \left(\frac{g}{L} \right) - 0,0184$$

$$R^2 = 0,9963$$

Apêndice C - Curvas Ajustadas dos Ensaios.

C.1. Ensaios Descontínuos

Ensaio 1

Equação 15 – Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 1.

$$S = -1E - 06.t^4 + 0,0003.t^3 - 0,0152.t^2 - 0,2809.t + 32,567$$

$$R^2 = 0,98535$$

Equação 16 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 1.

$$P = 2E - 07.t^4 - 5E - 05.t^3 + 0,0044.t^2 + 0,0196.t + 0,8744$$

$$R^2 = 0,99633$$

Ensaio 2

Equação 17 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 2.

$$S = 2E - 06.t^4 - 0,0002.t^3 + 0,0051.t^2 - 0,2307.t + 32,501$$

$$R^2 = 0,9949$$

Equação 18 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 2.

$$P = -2E - 07.t^4 + 1E - 05.t^3 + 0,0016.t^2 + 0,0548.t + 0,9489$$

$$R^2 = 0,9999$$

Ensaio 3

Equação 19 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 3.

$$S = 4E - 07.t^4 + 4E - 05.t^3 - 0,0121.t^2 - 0,109.t + 54,043$$

$$R^2 = 0,9962$$

Equação 20 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 3.

$$P = -1E - 07.t^4 + 9E - 06.t^3 + 0,0013.t^2 + 0,0405.t + 1,0313$$

$$R^2 = 0,9997$$

Ensaio 4

Equação 21 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 4.

$$S = -1E - 06.t^4 + 0,0002.t^3 - 0,0132.t^2 - 0,106.t + 20,402$$

$$R^2 = 0,98337$$

Equação 22 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 4.

$$P = -4E - 09.t^4 + 2E - 06.t^3 - 0,0006.t^2 + 0,1105.t + 2,1571$$

$$R^2 = 0,71215$$

Ensaio 5

Equação 23 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 5.

$$S = 4E - 07.t^4 - 0,0001.t^3 + 0,0149.t^2 - 0,9313.t + 26,545$$

$$R^2 = 0,94548$$

Equação 24 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 5.

$$P = 2E - 07.t^4 - 3E - 05.t^3 + 0,0001.t^2 + 0,1428.t + 2,8854$$

$$R^2 = 0,97585$$

Ensaio 6

Equação 25 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 6.

$$S = 2E - 12.t^6 - 2E - 09.t^5 + 1E - 06.t^4 - 0,0002.t^3 + 0,0122.t^2$$

$$- 0,4392.t + 157,13$$

$$R^2 = 0,98337$$

Equação 26 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 6.

$$P = 9E - 10.t^4 - 1E - 06.t^3 + 0,0005.t^2 + 0,1418.t + 1,3885$$

$$R^2 = 0,71215$$

C.2. Ensaios Descontínuos com Alimentação em Pulsos.

Ensaio 7

1ª- Alimentação

Equação 27 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 7 (1º Pulso).

$$S = -1E - 06.t^4 + 0,0003.t^3 - 0,0152.t^2 - 0,2809.t + 32,567$$

$$R^2 = 0,98535$$

2ª- Alimentação

Equação 28 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 7 (2º Pulso).

$$S = -2E - 07.t^4 + 9E - 05.t^3 - 0,0077.t^2 - 0,7105.t + 97,872$$

$$R^2 = 0,97186$$

3ª- Alimentação

Equação 29 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 7 (3º Pulso).

$$S = -4E - 07.t^4 + 0,0003.t^3 - 0,0824.t^2 + 8,9635.t - 301,04$$

$$R^2 = 0,98855$$

Etanol

1ª- Alimentação

Equação 30 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 7 (1º Pulso).

$$P = 2E - 07.t^4 - 5E - 05.t^3 + 0,0044.t^2 + 0,0196.t + 0,8744$$

$$R^2 = 0,99633$$

2ª- Alimentação

Equação 31 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 7 (2º Pulso).

$$P = -8E - 07.t^4 + 0,0003.t^3 - 0,029.t^2 + 0,9167.t + 16,153$$

$$R^2 = 0,93156$$

3ª- Alimentação

Equação 32 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 7 (3º Pulso).

$$P = -1E - 06.t^4 + 0,0008.t^3 - 0,2188.t^2 + 25,872.t - 1120,7$$

$$R^2 = 0,79137$$

Ensaio 8

AR

1ª- Alimentação

Equação 33 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 8 (1º Pulso).

$$S = -1E - 06.t^4 + 0,0003.t^3 - 0,0172.t^2 - 0,0867.t + 30,533$$

$$R^2 = 0,87884$$

2ª- Alimentação

Equação 34 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 8 (2º Pulso).

$$S = -2E - 07.t^4 + 0,0002.t^3 - 0,0526.t^2 + 4,9402.t + 10,387$$

$$R^2 = 0,83615$$

Etanol

1ª- Alimentação

Equação 35 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 8 (1º Pulso).

$$P = 3E - 08.t^4 - 3E - 05.t^3 + 0,0031.t^2 + 0,0669.t + 0,7266$$

$$R^2 = 0,99971$$

2ª- Alimentação

Equação 36 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 8 (2º Pulso).

$$P = 3E - 08.t^4 - 2E - 05.t^3 + 0,0049.t^2 - 0,2435.t + 3,4879$$

$$R^2 = 0,97707$$

C.3. Ensaios Descontínuos Alimentados Alimentação Variada

Ensaio 9

AR

1ª- Alimentação

Equação 37 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 9 (1ª Alimentação).

$$S = 3E - 07.t^4 + 5E - 05.t^3 - 0,0118.t^2 + 0,0967.t + 30,899$$

$$R^2 = 0,99126$$

2ª- Alimentação

Equação 38 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 9 (2ª Alimentação).

$$S = 4E - 11.t^6 - 5E - 08.t^5 + 2E - 05.t^4 - 0,006.t^3 + 0,8275.t^2 - 57,568.t$$

$$+ 1583,4$$

$$R^2 = 0,83615$$

Etanol

1ª- Alimentação

Equação 39 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 9 (1ª Alimentação).

$$P = -6E - 08.t^4 - 2E - 05.t^3 + 0,0034.t^2 + 0,0164.t + 1,1199$$

$$R^2 = 0,99971$$

2ª- Alimentação

Equação 40 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 9 (2ª Alimentação).

$$P = 2E - 08.t^4 - 2E - 05.t^3 + 0,0047.t^2 - 0,4735.t + 27,491$$

$$R^2 = 0,97707$$

Ensaio 10

AR

1ª- Alimentação

Equação 41 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 10 (1ª Alimentação).

$$S = -0,0023.t^2 - 0,0628.t + 27,002$$

$$R^2 = 0,5771$$

2ª- Alimentação

Equação 42 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 10 (2ª Alimentação).

$$S = -2E - 12.t^6 + 3E - 09.t^5 - 2E - 06.t^4 + 0,000.t^3 - 0,192.t^2$$

$$+ 20,797.t - 838,53$$

$$R^2 = 0,97279$$

Etanol

1ª- Alimentação

Equação 43 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 10 (1ª Alimentação).

$$P = -1E - 07.t^4 + 8E - 06.t^3 + 0,0002.t^2 + 0,0971.t + 0,4151$$

$$R^2 = 0,99623$$

2ª- Alimentação

Equação 44 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 10 (2ª Alimentação).

$$P = 4E - 09.t^4 - 7E - 06.t^3 + 0,0033.t^2 - 0,5419.t + 38,817$$

$$R^2 = 0,98473$$

Ensaio 11

AR

1ª- Alimentação

Equação 45 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 11 (1ª Alimentação).

$$S = 2E - 06.t^4 + 3E - 05.t^3 - 0,0209.t^2 - 0,3949.t + 66,12$$

$$R^2 = 0,99801$$

2ª- Alimentação

Equação 46 - Equação ajustada da concentração de AR para o Ensaio 11 (2ª Alimentação).

$$S = -9E - 13.t^6 + 2E - 09.t^5 - 1E - 06.t^4 + 0,0004.t^3 - 0,0631.t^2$$

$$+ 5,373.t - 116,86$$

$$R^2 = 0,97279$$

Etanol

1ª- Alimentação

Equação 47 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 11 (1ª Alimentação).

$$P = -6E - 14.t^4 - 2E - 11.t^3 + 2E - 09.t^2 + 0,3125.t + 2,6649$$

$$R^2 = 0,96431$$

2ª- Alimentação

Equação 48 - Equação ajustada da concentração de Etanol para o Ensaio 11 (2ª Alimentação).

$$P = 9E - 17.t^4 - 9E - 14.t^3 + 3E - 11.t^2 + 0,0662.t + 18,18$$

$$R^2 = 0,91113$$

Sendo, S e P respectivamente, Concentração de Açúcares Redutores e Concentração de Etanol. E t, o tempo em minutos.

Apêndice D – Dado sobre quantidade de bolhas de CO₂ desprendidas pelo tempo de fermentação

Nas tabelas encontram-se os dados experimentais que relacionam a quantidade de CO₂ desprendidas (medida qualitativa) com o tempo de fermentação para os ensaios de 1 a 11.

Tabela 21 - Tabela com informações d número de bolhas desprendidas por minuto de CO₂ (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 1.

Tempo (min)	Bolhas/min
8	63
11	106
17	156
20	170
31	200
35	160
43	156
48	148
62	152
69	124
77	72
80	72
86	60
93	24

Tabela 22 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO₂ (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 2.

Tempo (min)	Bolhas/min
3	24
5	24
8	40
11	72
13	104
16	116
20	144
24	176
27	180
33	188
38	216
43	188

48	180
52	136
57	144
65	160
71	152
78	124
85	84
93	52

Tabela 23 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO₂ (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 3.

Tempo (min)	Bolhas/min
5	5
9	62
16	100
23	136
34	164
43	166
51	154
56	160
66	180
70	176
80	160
86	123
92	120

Tabela 24 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO₂ (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 4.

t (min)	Bolhas/min
1	7
6	100
12	100
33	140
40	136
47	164
61	80
71	44
77	20
87	36
90	0

Tabela 25 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO₂ (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 5.

Tempo (min)	Bolhas/min
3	60
19	72
40	100
47	60
52	53
57	40
80	11
90	0

Tabela 26 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO₂ (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 6.

Tempo (min)	Bolhas/min
4	4
11	16
17	100
25	124
29	132
34	160
43	180
56	188
63	172
75	208
93	160
99	172
108	172
117	172
129	152
133	148
144	140
147	132
168	132
179	120
216	128
221	128
236	120
249	116
259	104
263	96
274	68
278	64
293	42

309	28
312	12
333	8

Tabela 27 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO₂ (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 7.

t (min)	Bolhas/min
8	63
11	106
17	156
20	170
31	200
35	160
43	156
48	148
62	152
69	124
77	72
80	72
86	60
93	24
93	76
98	118
104	146
110	160
113	188
115	212
119	192
124	154
136	100
141	42
149	12
151	128
163	176
167	168
171	188
180	160
197	88
203	80
211	30

Tabela 28 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO₂ (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 8.

<u>t(min)</u>	<u>Bolhas/min</u>
10	54
19	153
35	192
42	168
43	164
47	130
55	120
70	109
84	36
96	3
98	80
101	120
106	164
119	174
121	200
132	216
144	184
149	172
152	164
159	160
163	159
168	154
174	134
180	133
183	132
191	120
201	120
207	120
210	120
223	120
226	120
236	120
238	112
241	100
245	75
250	40
252	32
256	16
271	2

Tabela 29 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO₂ (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 9.

Tempo (min)	Bolhas/min
5	5
9	62
16	100
23	136
34	164
43	166
51	154
56	160
66	180
70	176
80	160
86	123
92	120
103	100
105	112
113	100
117	92
119	92
129	115
132	134
134	145
136	152
147	168
149	168
152	160
160	140
162	128
165	140
174	128
181	156
190	128
192	128
198	132
204	140
210	116
213	120
216	112
221	104
225	100
231	80
236	76
240	68

244	60
246	52
249	48
251	44
252	40
255	24
258	20
260	16
262	16
263	16
265	16
269	8
273	4

Tabela 30 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO₂ (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 10.

t(min)	Bolhas/min
10	54
19	153
35	192
42	168
43	164
47	130
55	120
70	109
84	36
96	3
98	80
101	120
106	164
119	174
121	200
132	216
144	184
149	172
152	164
159	160
163	159
168	154
174	134
180	133
183	132
191	120
201	120
207	120
210	120

223	120
226	120
236	120
238	112
241	100
245	75
250	40
252	32
256	16
271	2

Tabela 31 - Tabela com informações do número de bolhas desprendidas por minuto de CO₂ (medida qualitativa) pelo tempo em minutos, para o Ensaio 11.

Tempo	Bolhas/min
6	68
10	56
13	56
17	104
22	112
25	120
35	148
52	76
55	60
58	52
63	24
71	76
77	56
81	100
84	108
87	84
94	96
96	88
98	92
104	88
111	92
116	100
124	100
128	100
130	100
133	100
136	100
140	100
151	120
173	120
175	112
177	112

184	88
194	96
196	100
197	108
202	108
205	108
208	100
225	112
234	112
237	112
244	92
248	80
253	88
256	100
258	100
261	112
263	112
266	128
269	112
274	112
276	112
278	112
280	112
291	128
295	144
302	112
356	108
358	92
366	88
369	84
373	64
382	104
387	72
399	88
403	80
409	76
412	56
418	60
429	60
437	60
447	60
464	52
473	52
476	44
483	12
487	8

513	5
517	7