

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Métodos de Monitoramento de Fermentação Alcoólica

Fernanda Correia Santos

Trabalho de Graduação apresentado ao
Departamento de Engenharia Química da
Universidade Federal de São Carlos

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Thais Suzane Milessi Esteves**

São Carlos

2022

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thais Suzane Milessi Esteves, DEQ/UFSCar

Convidada: Prof^a. Dr^a. Fernanda Perpétua Casciadori, DEQ/UFSCar

Professor da Disciplina: Ernesto Antonio Urquieta-Gonzalez, DEQ/UFSCar

Trabalho de Graduação apresentado no dia 13 de setembro de 2022 perante a banca
examinadora

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer à minha família, que sempre apoiou minhas decisões e acreditou em mim. Ao meu irmão Rodrigo, com quem eu sei posso contar para o que precisar e que se tornou uma das pessoas em qual opinião eu mais confio. Ao meu pai Eduardo, que me ensinou a dar valor para o que realmente importa e a olhar para o copo meio cheio, porque as coisas sempre acabam dando certo no final. À minha mãe Silvia, que sempre fez tudo pelos filhos, que sempre deu seu apoio incondicional a tudo que eu almejei fazer e que eu sei que, independentemente de para onde eu for, sempre estará do meu lado. À minha avó Emília e ao restante da minha família, que me acompanharam ao longo da vida e que ajudaram a me tornar a pessoa que eu sou hoje.

Quero agradecer a todos os amigos que fiz em São Carlos, que fizeram parte de uma fase tão importante da minha vida, longe de casa, e que me mudou para melhor, em parte por causa deles. Obrigada pelos momentos de estudo, de comemoração, de organização de eventos, pelas conversas, os abraços, os ombros amigos quando eu precisei e pela amizade que eu sei que vai durar toda a minha vida.

Quero agradecer também aos amigos de São Paulo, com quem eu cresci junto e, mesmo depois de ter ido morar fora, vejo que se tornaram mais próximos do que nunca e hoje fazem parte da minha família.

Gostaria de agradecer a professora Thais, minha orientadora, que apesar do prazo desafiador, me ajudou a completar o meu trabalho de graduação com confiança no trabalho que eu produzi.

E por fim gostaria de agradecer à UFSCar e ao DEQ pela graduação em engenharia química em uma universidade federal, onde eu pude conhecer pessoas que me ensinaram muito e onde entendi que acertei na escolha de curso e de universidade que fiz e de onde saio pronta para enfrentar os próximos desafios como profissional.

“Quero sentir tudo que há para sentir, pensou ele. Deixem-me sentir cansaço, agora, deixem que eu sinta o cansaço. Não posso esquecer, estou vivo, sei que estou vivo, não posso esquecer isso essa noite, em amanhã, nem depois de amanhã.”

(Ray Bradbury)

RESUMO

A cultura da cana de açúcar e a produção de etanol no Brasil têm participação ativa na economia do país, o açúcar desde a colonização no século XVI e o etanol desde o século passado, tendo atualmente uma participação importante nos setores de combustíveis e alimentício, movimentando a economia do país. Dado o cenário, o presente trabalho de graduação apresenta as principais variáveis do processo de fermentação alcoólica e algumas das metodologias de análise disponíveis utilizadas no seu monitoramento. As variáveis são divididas entre físico-químicas, que englobam os parâmetros físicos (como turbidez e temperatura) e químicos (como pH e concentrações celular, de substrato e de etanol), e as variáveis microbiológicas, que dizem respeito à levedura responsável pela fermentação e ao controle da contaminação do processo por outros microrganismos. O presente trabalho apresenta uma revisão bibliográfica sobre a fermentação alcoólica e descreve as metodologias de obtenção das principais variáveis de processo. Por fim, uma análise crítica das tecnologias atuais e da perspectiva do setor são apresentadas de forma a gerar um documento útil para auxiliar no direcionamento da escolha do monitoramento da fermentação alcoólica.

Palavras-chave: fermentação, levedura, etanol, monitoramento.

ABSTRACT

Sugarcane cultivation and ethanol production in Brazil has an active role in the country's economy, sugar since colonization in the 16th century and ethanol since the last century, currently having an important participation in the fuel and food sectors, moving the country's economy. Given the scenario, the present graduation paper presents the main variables of the alcoholic fermentation process and some of the available analysis methodologies used in its monitoring. The variables are divided between physicochemical, which include physical parameters (such as turbidity and temperature) and chemical (such as pH and cell, substrate and ethanol concentrations), and microbiological variables, which concern the yeast responsible for the fermentation and the process' contamination control by other microorganisms. This paper presents a literature review on alcoholic fermentation and describes the methodologies for obtaining the main process variables. Finally, a critical analysis of current technologies and the industry perspective are presented in order to generate a useful document to help guide the choice of monitoring alcoholic fermentation.

Keywords: fermentation, yeast, ethanol, monitoring.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1. Produção Industrial de Etanol.....	16
3.1.1. Aproveitamento de Resíduos e Subprodutos	18
3.1.2. Indústria 4.0.....	19
3.2. Fundamentos da Fermentação Alcoólica.....	20
3.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
3.2.2. Substratos	21
3.2.3. Formas de Operação.....	21
3.3. Cinética de Fermentação Alcoólica.....	24
4. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS.....	28
4.1. pH.....	28
4.2. Temperatura.....	31
4.3. Concentração de açúcares.....	33
4.3.1. Método de determinação do Brix por refratometria.....	35
4.3.2. Método do ácido 3, 5-dinitrosalicílico	37
4.3.3. Método de Somogyi-Nelson.....	39
4.3.4. Cromatografia Líquida	41
4.3.5. Espectroscopia no infravermelho médio por transformada de Fourier ..	45
4.4. Concentração de etanol.....	47
4.4.1. Determinação por densidade	47
4.4.2. Determinação por refratometria	49
4.4.3. Método da oxidação por dicromato de potássio.....	51
4.4.4. Cromatografia gasosa.....	53
4.4.5. Determinação da concentração de outros álcoois	56
4.5. Eficiência.....	56
5. PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS.....	59

5.1.	Concentração de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
5.1.1.	Contagem celular em Câmara de Neubauer	60
5.1.2.	Contador de células automatizado.....	64
5.1.3.	Método da massa seca.....	65
5.1.4.	Método da densidade óptica.....	67
5.1.5.	Método da turbidimetria.....	70
5.2.	Parâmetros relacionados à vitalidade da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	72
5.2.1.	Viabilidade celular	72
5.2.1.1.	Método da coloração diferencial.....	72
5.2.1.2.	Método da diluição seriada e plaqueamento	73
5.2.2.	Brotamento	76
5.2.3.	Floculação	77
5.3.	Leveduras Contaminantes	78
5.3.1.	Identificação de leveduras através de diluição seriada e plaqueamento em meios de cultura seletivos	79
5.3.2.	Identificação de leveduras através de cariotipagem molecular por meio da eletroforese em campo pulsado	80
5.4.	Bactérias	82
5.4.1.	Teor de bactérias	83
5.4.1.1.	Contagem direta ao microscópio.....	84
5.4.1.2.	Diluição seriada e plaqueamento em meios de cultura	85
5.4.1.3.	Coloração de Gram	85
5.4.2.	Monitoramento da sensibilidade de bactérias a antimicrobianos.....	88
5.4.2.1.	Método turbidimétrico	89
5.4.2.2.	Teste de acidez do meio	91
6.	CONCLUSÃO.....	92
7.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	92
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma do processo de produção de açúcar e álcool.....	17
Figura 2	Representação das etapas de um processo descontínuo.....	22
Figura 3	Representação das etapas de um processo descontínuo alimentado.....	23
Figura 4	Representação das etapas de um processo contínuo.	24
Figura 5	pHmetro.....	29
Figura 6	Representação de uma sonda de pH.....	30
Figura 7	Termômetro a laser.....	32
Figura 8	Sistema de controle de temperatura com sensor <i>online</i> e manipulação de válvula de resfriamento.....	33
Figura 9	Representação da mudança da direção do feixe de luz ao mudar de meio, onde o ângulo de incidência i é diferente do ângulo de refração r	36
Figura 10	Refratômetro digital.....	36
Figura 11	Refratômetro analógico portátil, onde é possível verificar diretamente o valor de grau BRIX.	37
Figura 12	Reação de redução da molécula ADNS em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.....	38
Figura 13	Representação do procedimento experimental do método do ácido 3, 5-dinitrosalicílico para determinação de concentração de açúcares redutores.....	39
Figura 14	Reações de oxidação e redução do método Somogyi-Nelson.....	40
Figura 15	Representação das etapas de execução do método Somogyi-Nelson para determinação de concentração de ART.....	40
Figura 16	Representação do escoamento da amostra em coluna contendo uma fase estacionária.....	42

Figura 17	Representação das etapas de execução do método cromatográfico líquido de alta eficiência.....	44
Figura 18	Representação do cromatograma de uma amostra de caldo de fermentação alcoólica.....	45
Figura 19	Representação do sistema montado para análise usando espectrofotometria de infravermelho médio com transformada de Fourier.....	46
Figura 20	Fluxograma do procedimento de análise de teor alcoólico por densidade.	48
Figura 21	Fluxograma do processo de análise de teor alcoólico por refratometria....	49
Figura 22	Refratômetro Abbe com visor digital.....	50
Figura 23	Reação de oxidação do etanol por dicromato de potássio em meio ácido..	51
Figura 24	Etapas do procedimento de determinação de teor alcoólico empregando dicromato de potássio.....	52
Figura 25	Fluxograma do sistema de análise de cromatografia gasosa.....	54
Figura 26	Representação de gráfico do número de células viáveis no tanque ao longo do tempo de acordo com Bastos (2015).....	60
Figura 27	Câmara de Neubauer.....	61
Figura 28	Representação da grade da Câmara de Neubauer, onde A é um quadrante com 0,25 mm de lado, B um quadrante retangular de 0,25 por 0,20 mm e C um quadrante com 0,20 mm de lado.....	62
Figura 29	Quadrantes centrais da câmara de Neubauer que serão contabilizados para análise do número de células na amostra diluída de caldo fermentado.....	63
Figura 30	Representação da passagem da célula e gráfico correspondente da corrente ao longo do tempo.....	64

Figura 31	Procedimento de determinação de teor de células a partir de um volume conhecido de amostra através do método gravimétrico.....	66
Figura 32	Processo de lavagem das células da amostra.....	68
Figura 33	Procedimento de determinação da concentração celular por densidade óptica.....	69
Figura 34	Representação do princípio de funcionamento do turbidímetro.....	71
Figura 35	Representação de uma amostra corada com azul de metileno, com células viáveis (incolores) e mortas (azuis).....	73
Figura 36	Representação do método da diluição seriada e plaqueamento.....	74
Figura 37	Representação do procedimento analítico de diluição seriada com plaqueamento em profundidade (<i>pour plate</i>).....	75
Figura 38	Representação dos estágios do brotamento de uma nova célula de levedura.....	76
Figura 39	Representação de amostras com células de levedura dispersas e células floculadas por contaminação bacteriana.....	77
Figura 40	Exemplo de um cariótipo eletroforético gerado a partir da análise de quatro amostras diferentes.....	81
Figura 41	Procedimento de análise de cariotipagem molecular por eletroforese em campo pulsado.....	82
Figura 42	Coloração das células Gram-positivas e Gram-negativas durante as etapas de coloração e descoloração da análise de coloração de Gram.....	86
Figura 43	Representação do processo da análise por coloração de Gram.....	87
Figura 44	Procedimento de monitoramento da sensibilidade de bactérias a antimicrobianos pelo método turbidimétrico.....	90

1. INTRODUÇÃO

Introduzida no Brasil pelos portugueses em Pernambuco no século XVI, a cana-de-açúcar e a consequente produção nacional de açúcar projetaram-se mundialmente, levando consigo palavras de origem portuguesa ligadas ao açúcar como “marmelada” e “mascavo” (FREYRE, 2007).

Com o mercado europeu como principal destino e operando com mão de obra escrava, a produção de açúcar desempenhou um importante papel econômico durante o período colonial e contribuiu para a ocupação territorial através da criação de engenhos (SALLA, 2008). Sua manufatura em grande escala tornou o Brasil o maior fornecedor mundial de açúcar no final do século XVI, com um produto de qualidade superior ao procedente da Índia e mais barato devido aos grandes volumes produzidos (MEDINA, s.d.).

Ainda que a produção de cachaça como produto fermentado do caldo de cana tenha surgido junto com o desenvolvimento da economia açucareira colonial, apenas séculos depois, na década de 1920, se iniciou no Brasil o interesse pelo etanol como combustível. Em meio à crise de superprodução de etanol no começo da década de 1930 iniciou-se o movimento de intervencionismo governamental, instaurando o decreto que obrigava a gasolina importada a ser acrescida em 5% com etanol. Em 1933, durante o Governo Vargas, foi criado o Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA), com o intuito de estimular e controlar a produção de açúcar e etanol em todo território nacional (SZMRECSÁNNYI, 2021).

Mais tarde, em 1975, foi criado o Programa Nacional do Alcool (Proálcool), em resposta à crise global do petróleo que se deu a partir de 1973 (SALLA, 2008). A partir de subsídios e incentivos fiscais do governo foram estimuladas a produção de etanol e sua pesquisa e desenvolvimento, quando foram observadas vantagens de seu uso como combustível pelo viés da sustentabilidade, uma vez que sua produção gera menor emissão de CO₂ para a atmosfera em relação a outros combustíveis e apresenta balanço energético positivo (o processo produz mais energia do que consome), diferente de combustíveis fósseis e do etanol produzido a partir de milho.

Apesar do bom desempenho nos primeiros anos, o IAA foi extinto e o Proálcool acabou sendo abandonado em 1990 pelos grandes custos que trazia ao governo devido aos subsídios, pela queda do preço do barril de petróleo, tornando o etanol menos competitivo, e pelos diversos períodos em que houve desabastecimento nos postos devido à queda no estímulo à produção do combustível (SZMRECSÁNNYI, 2021). Ainda que a porcentagem de etanol anidro na gasolina comum tenha aumentado desde 1930, chegando a 22% em 1993, a queda

na oferta fez com que muito etanol tenha sido importado de outros países de modo a garantir tal volume (OHASHI, 2008).

Segundo Ohashi (2008), a recuperação da indústria do etanol a partir da cana-de-açúcar, que era voltada à produção de açúcar pela maior demanda, deu-se a partir de 2003 em grande parte pelo desenvolvimento de carros *flex fuel*, capazes de funcionar com etanol, gasolina ou uma mistura dos dois, em uma época em que o preço do petróleo mostrava um aumento devido a conflitos entre Estados Unidos e Iraque. Entre 1975 e 2006 ocorreu um aumento de 413% na produção de cana-de-açúcar e de 226,3% de área plantada, mostrando um aumento na produtividade que chegou em 2006 a 74,1 toneladas de cana por hectare plantado, tornando o preço do etanol mais competitivo (OHASHI, 2008). A busca mundial por fontes combustíveis mais sustentáveis, impulsionada pelo Protocolo de Kyoto em 1997, estimulou ainda mais a produção brasileira, que se tornou mais lucrativa com a exportação de parte da produção, ainda mais pelo fato de o etanol de cana-de-açúcar ter um custo de manufatura mais baixo em relação a outras matérias primas como milho e cereais.

Ao longo dos anos o percentual de etanol anidro combustível na gasolina comum, determinado pelo governo, sofreu alterações, mantendo-se dentro da faixa de 20 a 27%. Desde 16 de março de 2015 foi determinado que tal percentual é de $27\% \pm 1$ para gasolina comum e $25\% \pm 1$ para gasolina comum aditivada, conforme Portaria MAPA nº 75, de 05/03/15 e Resolução CIMA nº 01/2015.

Segundo Trevisan e Moschini (2018), a produção de etanol no Brasil durante as safras de 2000/01 e de 2017/18 somou, respectivamente, 10,5 mil m³ e 27,7 mil m³, o que corresponde a um aumento de 164% na produção brasileira. Já a produção de cana-de-açúcar no país foi de 254,9 milhões de toneladas na safra de 2000/01 e de 633,3 milhões de toneladas na de 2017/18, indicando um crescimento do setor sucroalcooleiro como um todo. De acordo com os dados coletados pelo Sindicato da indústria do açúcar e do álcool no estado de Alagoas em 2021, a produção de etanol na safra de 2020/21 chegou a 32,5 mil m³, concentrada na região centro-sul (responsável por 93% do volume produzido na safra de 2020/21). A busca cada vez mais ávida por fontes alternativas aos combustíveis fósseis faz com que mundialmente a demanda por biocombustíveis seja cada vez maior. O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e segundo maior produtor de etanol do mundo, responsável por 29% da produção mundial de etanol em 2019 e ficando atrás apenas dos Estados Unidos, que respondeu por 54% da quantidade produzida no ano (SALLA, 2008; VIDAL, 2021).

Atestada a importância da produção de etanol no contexto econômico atual brasileiro e mundial, é importante que a indústria almeje sempre o maior aproveitamento de modo a maximizar os ganhos com a produção. A produção de etanol é realizada principalmente via fermentativa, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Uma vez que os processos fermentativos são realizados por microrganismos, cujo metabolismo está sujeito às condições do meio, como temperatura, pH e a contaminação por outros microrganismos (DE SOUSA, MONTEIRO, 2011), busca-se fornecer as condições mais próximas das ideais e mantê-las ao longo do processo. Para tal, o processo e os agentes fermentativos são estudados e são determinados os set-points de suas variáveis, que definem a faixa de valor que propicia o melhor desempenho do processo.

Dada a influência das condições de processo e do ambiente no rendimento, o controle e o monitoramento das variáveis de processo são de suma importância para a otimização e viabilidade do mesmo, de forma que o presente trabalho poderá servir como um manual de consulta para tomadas de decisão no processo.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho de graduação teve como objetivo compilar e apresentar as metodologias de obtenção das principais variáveis monitoradas no processo industrial de fermentação alcoólica a partir de cana-de-açúcar, de modo a criar um manual de consulta para tomadas de decisão.

Objetivos específicos:

- Identificar as variáveis físico-químicas e microbiológicas do processo de fermentação alcoólica;
- Detalhar as tecnologias disponíveis para o monitoramento das variáveis de fermentação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Produção Industrial de Etanol

A produção de etanol no Brasil ocorre em destilarias autônomas, que produzem exclusivamente etanol a partir de caldo de cana, ou em destilarias anexas a indústrias produtoras de açúcar, produzindo açúcar e etanol. De acordo com Sonogo (2016), as destilarias anexas representam 70% das destilarias produtoras de etanol combustível no Brasil. Nas destilarias anexas, a escolha da matéria-prima para a preparação do mosto pode variar entre o caldo de cana, melaço (um subproduto da produção de açúcar) diluído em água ou uma mistura dos dois, de modo que a concentração de açúcares fermentescíveis fique na ordem de 20° BRIX (VELOSO, 2019). Uma das vantagens da destilaria anexa é a possibilidade de favorecer a produção de etanol ou de açúcar dependendo da demanda por cada um dos produtos (RODRIGUES, ROSS, 2020).

O valor de concentração de etanol em uma solução pode ser expresso em termos de massa por volume (kg/m^3), volume por volume (°GL) ou massa por massa (°INPM) (RODRIGUES, ROSS, 2020). A graduação em °GL, graus Gay-Lussac, representa quantos mL de álcool existe em 100 mL de solução à 20°C, equivalente à porcentagem em volume de álcool em solução (%v/v). De forma similar, a graduação em °INPM representa a massa de álcool em 100 g de solução (%m/m).

O processo de produção de açúcar e etanol em uma usina pode ser dividido em três etapas principais: tratamento inicial da cana, produção de açúcar e produção de etanol. Durante a primeira etapa a cana é lavada, o caldo é extraído e tratado com cal e ácido fosfórico (ARAÚJO, 2017) e depois decantado para remover impurezas. Ao final do processo é obtido o caldo clarificado, que segue para a produção de açúcar e etanol, e são gerados como subprodutos a água de lavagem, reaproveitada no processo, o lodo (separado durante a decantação), o bagaço e a palha da cana (LOPES, BORGES, 2011).

Para a fabricação de açúcar o caldo tratado passa por evaporadores para ser concentrado e em seguida é cristalizado e centrifugado para que os cristais sejam separados do melaço. Os cristais passam por um secador para que o restante da umidade seja removido.

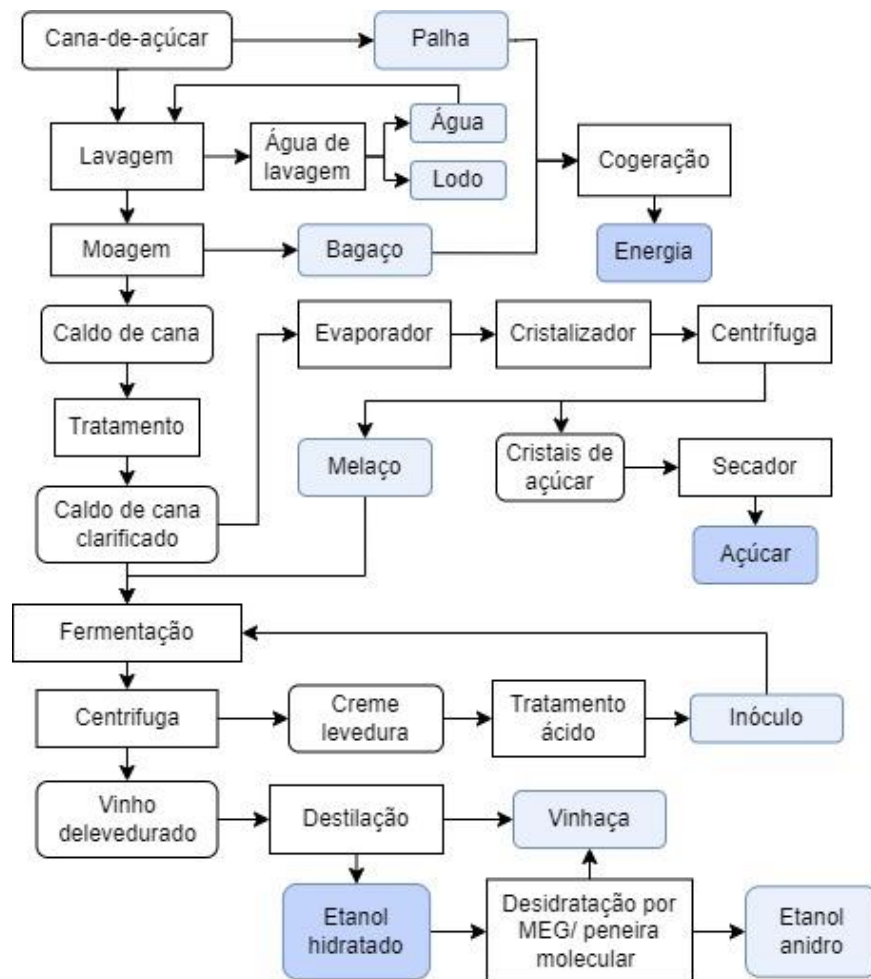
A produção do etanol começa com a preparação do mosto, onde é misturada a solução contendo sacarose (melaço com caldo de cana, por exemplo) com outros componentes importantes para o processo, como sais minerais (DE SOUSA, MONTEIRO, 2011). O mosto é então alimentado à dorna contendo o inóculo, uma suspensão de levedura definida como pé-de-cuba, dando início à fermentação. Ao final da fermentação, com o esgotamento do

substrato do meio, o vinho é centrifugado, promovendo a separação em vinho delevedurado e creme levedura. Parte do creme levedura pode ser reutilizado na produção seguinte após passar por um tratamento com ácido sulfúrico, que reduz a incidência de contaminação bacteriana (VELOSO, 2019). O processo fermentativo que emprega o reciclo de levedura é denominado Melle-Boinot (SONEGO, 2016).

O vinho delevedurado segue para colunas de destilação para que o etanol seja separado da vinhaça, majoritariamente composta de água. Através da destilação é possível obter etanol hidratado de até 95,6°GL devido ao azeótropo formado pela água e etanol (SONEGO, 2016). Com uma etapa extra de separação, como a desidratação por monoetilenoglicol (MEG) ou adsorção via peneira molecular, obtém-se o etanol anidro com concentração de 99,6°GL (SANTOS et. al, 2019).

No fluxograma ilustrado na Figura 1 são representadas as principais etapas do processo de produção de açúcar e álcool, junto aos produtos principais e subprodutos.

Figura 1: Fluxograma do processo de produção de açúcar e álcool.



Fonte: Acervo Pessoal

3.1.1. Aproveitamento de Resíduos e Subprodutos

Além do açúcar e do etanol, o processamento da cana-de-açúcar em usinas gera resíduos e subprodutos com potencial de fonte adicional de renda, ao mesmo tempo que auxiliam na redução do volume de rejeitos. Segundo Ribeiro, Blumer e Horii (1999), os principais subprodutos da indústria sucroalcooleira são a palha e o bagaço de cana-de-açúcar, a torta de filtro, a vinhaça, o óleo fúsel e o excesso de levedura.

A palha pode ser utilizada como cobertura vegetal onde é plantada a cana, mantendo as condições de temperatura e umidade do solo, ou utilizada junto ao bagaço de cana, gerado na ordem de 280 kg por tonelada de cana (SALLA, 2008; RIBEIRO, BLUMER, HORII, 1999). Suas principais aplicações são na cogeração de energia elétrica através da queima em caldeira, para a produção de celulose, utilizada na produção de etanol de segunda geração (2G) ou ainda na obtenção de outros bioprodutos dentro do conceito de biorrefinaria.

De acordo com Ribeiro, Blumer e Horii (1999), a vinhaça, o principal subproduto separado do etanol durante a destilação, é gerada na proporção de 12 a 18 litros por litro de etanol. A torta de filtro, obtida durante o tratamento inicial da cana, e a vinhaça podem ser aplicados na fertilização de solos, produção de metano, entre outros, pelo fato de serem ricos em matéria orgânica. O óleo fúsel, outro subproduto separado durante a destilação, é composto majoritariamente por álcoois superiores (principalmente pelo álcool isoamílico), é obtido na ordem de 0,5 a 2 mL por litro de etanol e é usualmente refinado e aplicado em diversos processos como solvente.

Após a separação do creme levedura do vinho, uma fração de levedura em excesso é sangrada. Devido ao seu alto teor proteico e de vitamina B, o fermento pode ser utilizado para a produção de levedura seca (*dry-yeast*) e processado na forma de farinha, cuja principal aplicação é de suplementação alimentar, como na complementação de rações animais (RIBEIRO, BLUMER, HORII, 1999).

Por meio do aproveitamento dos diversos resíduos da produção, como as cinzas da caldeira, que podem ser utilizadas na produção de concreto ou como adsorvente em algumas aplicações, é possível aumentar a margem de lucro da planta através de sua venda e reduzir o gasto com descarte de resíduos e tratamento de efluentes. Além disso, a redução da geração de resíduos aumenta a sustentabilidade da planta e contribui para o desenvolvimento de uma economia circular, contribuindo para a transição da matriz energética. Observa-se, portanto, o potencial do setor sucroalcooleiro no que diz respeito à sustentabilidade e redução de impacto ambiental.

3.1.2. Indústria 4.0

Segundo Ikeziri *et al.* (2020), a quarta revolução industrial, denominada Indústria 4.0, é uma união dos conceitos dos Sistemas Ciber-Físicos (CPS), que integram processos físicos e sistemas de controle através de sistemas computacionais, e da Internet das Coisas (IoT), onde sistemas ciber-físicos são conectados à internet e a outros dispositivos de modo a compartilhar informação. O uso destes conceitos tem como objetivo criar um sistema de gestão e controle através da interação entre os componentes físicos do processo e a informação e processamento computacional.

Considerando o contexto da fermentação industrial realizada por microrganismos, onde as condições do meio podem afetar seu metabolismo e, conseqüentemente, o rendimento da fermentação, é importante o acompanhamento das variáveis de processo e sua manutenção dentro das faixas pré-determinadas empiricamente que favoreçam a produção de etanol.

A Internet das Coisas aplicada à processos industriais permite o acompanhamento de variáveis através da automação de sua análise e do envio da informação a um sistema de controle, que pode disparar um alerta caso o parâmetro esteja fora da faixa de valor esperado. O parâmetro pode ser analisado de maneira constante ou periódica e o conjunto de dados obtido pode ser aplicado em estudos de otimização do processo.

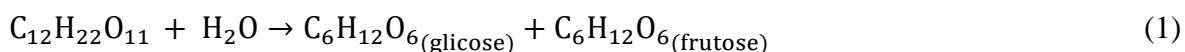
Para mais, uma análise automatizada aplica o procedimento de forma mais padronizada, desde que o equipamento esteja calibrado adequadamente, pois análises de laboratório podem ser realizadas por diferentes pessoas, além de estarem sujeitas à erros de contagem, de diluição, entre outros. Outra vantagem é a possibilidade de associar um sistema de controle ao conjunto, responsável por interpretar o resultado obtido pela análise e corrigi-lo (IKEZIRI *et al.*, 2020). Como exemplo, pode-se mencionar um sensor de temperatura ligado a um sistema de controle que, ao detectar que a temperatura está abaixo do valor esperado, abre a válvula de vapor ligada à camisa do reator, aquecendo o sistema até que o *set-point* seja atingido.

A aplicação dos conceitos da Indústria 4.0 à processos de manufatura permite o acompanhamento padronizado e constante do processo e suas variáveis, o que permite que os desvios sejam identificados rapidamente, além da manutenção das variáveis dentro da faixa esperada, o que colabora para a obtenção de altos rendimentos do processo.

3.2. Fundamentos da Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico realizado por alguns microrganismos para a obtenção de energia na ausência de oxigênio. Segundo Veloso (2019), a fermentação consiste no consumo de açúcares fermentescíveis, como a glicose, que são oxidados através de reações enzimáticas gerando energia celular na forma de ATP, com etanol e gás carbônico (CO₂) como subprodutos.

Processos utilizando sacarose como fonte de açúcar podem ser divididos em duas etapas: a primeira, representada pela equação 1, refere-se à hidrólise da sacarose pela enzima invertase, convertendo-a em glicose e frutose, denominados açúcares redutores totais (ART); a segunda, representada pela equação 2, os açúcares redutores totais (ART: glicose e frutose) são fermentados pela levedura, resultando em duas moléculas de etanol e duas de gás carbônico.



3.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

Ainda que outros microrganismos sejam capazes de realizar fermentação alcoólica, como a bactéria *Zymomonas mobilis*, por motivos econômicos o processo industrial tende a ser realizado por leveduras, comumente do gênero *Saccharomyces* (PACHECO, 2010). A escolha da espécie e cepa do microrganismo utilizada interfere diretamente no rendimento do processo, uma vez que parâmetros relacionados à cinética da fermentação e à resistência ao etanol e pH variam entre espécies.

No Brasil a produção de etanol a partir de cana-de-açúcar é realizada pela levedura *S. cerevisiae*, uma levedura de alta eficiência fermentativa e cujas cepas possuem características diversas, selecionadas por sua compatibilidade com o processo (PACHECO, 2010). Ao longo da fermentação, além do fornecimento de nutrientes, são mantidas condições adequadas do meio de cultura, como a concentração de certos sais minerais e vitaminas, que garantem o ambiente adequado para o crescimento e desenvolvimento das leveduras.

3.2.2. Substratos

Os principais substratos usados para a produção de etanol são a sacarose, proveniente de cana-de-açúcar ou beterraba, o amido, proveniente de milho e da mandioca (SALLA, 2008), e a celulose, oriunda de materiais lignocelulósicos como o bagaço da cana (ROSSETO *et al.*, 2017). Em razão da fermentação ter como matéria prima a glicose e a frutose faz-se necessária uma etapa prévia para hidrolisar as moléculas mais complexas. No caso da sacarose, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* sintetiza a enzima invertase que promove a hidrólise rápida da sacarose em glicose e frutose (ANTONINI, 2012). Por sua vez, polímeros de glicose, como o amido e a celulose, demandam uma etapa prévia de hidrólise realizada por enzimas, que são adicionadas ao mosto e usualmente não são reaproveitadas (SALLA, 2008). Ainda, por serem macromoléculas, tal etapa prévia é mais complexa e acaba demandando mais tempo.

No Brasil a principal matéria-prima usada na fermentação etanólica é a cana-de-açúcar, dado que a cultura do açúcar desde o período do império e as condições edafoclimáticas propícias do país para seu cultivo favorecem seu uso em detrimento de outros (SALLA, 2008). Além disso, o rendimento em etanol por hectare de cana plantada é de aproximadamente 7000 L/ha, enquanto o do milho fica em torno de 3500 L/há (ROSSETO *et al.*, 2017). Por possuir duas safras, a do Centro-Sul e a do Nordeste, a segunda começando no final da primeira, a cana-de-açúcar é colhida em boa parte do ano, além de seguir rebrotando por 5 anos. Adicionalmente, a produção de etanol usando milho possui um balanço energético negativo, gastando 29% a mais de energia (usualmente fóssil) em sua produção do que a energia que será fornecida pelo etanol (SALLA, 2008). Em contrapartida, a quantidade de energia fornecida pela rota da cana-de-açúcar é 8,06 vezes maior que a energia fóssil consumida para a sua produção.

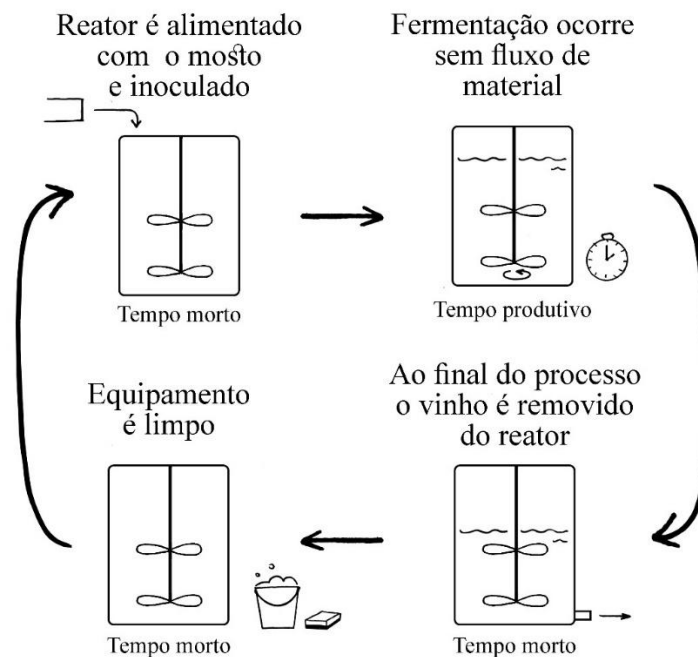
3.2.3. Formas de Operação

De acordo com Sonego (2006), as principais formas de conduzir uma fermentação são a descontínua, a descontínua alimentada e a contínua, que diferem pelo momento e forma que é inserido e removido material do fermentador.

Na forma descontínua, também conhecida como batelada, todo o mosto é adicionado ao reator junto com o inóculo no início do processo e todo o vinho fermentado é retirado do reator após o final da fermentação, conforme ilustrado na Figura 2. De acordo com Carvalho e Sato (2001), ao longo do processo são adicionados apenas oxigênio, antiespumantes e

soluções reguladoras de pH conforme necessidade. O final da fermentação é marcado pelo esgotamento dos açúcares no reator ou pela inibição das leveduras, e então todo o conteúdo do reator é transferido para a etapa seguinte e o fermentador tem que ser higienizado antes de um novo processo.

Figura 2: Representação das etapas de um processo descontínuo.



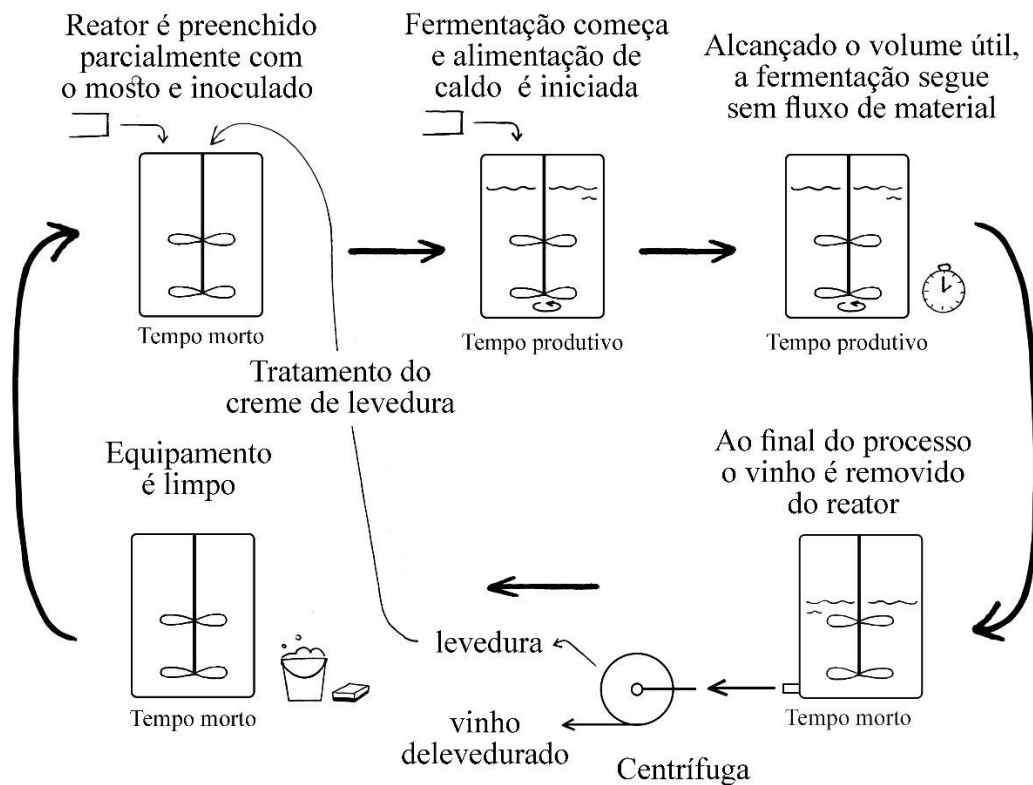
Fonte: Acervo Pessoal

As principais características do processo são a possibilidade de inibição por substrato, uma vez que no início do processo a concentração de açúcares é máxima no reator, e ocorrência do denominado “tempo morto” entre bateladas. O “tempo morto” corresponde ao período improdutivo onde não ocorre fermentação no tanque, quando o tanque é preenchido para iniciar o processo, quando o produto pronto está sendo retirado do tanque e durante a limpeza.

A forma descontínua alimentada, representada na Figura 3, se assemelha à forma descontínua pela remoção do produto fermentado de uma só vez do tanque apenas no final do processo. Segundo Carvalho e Sato (2001), o que difere a batelada alimentada da batelada comum é a adição de um ou mais insumos ao longo do processo, o que permite que o problema de inibição por substrato seja contornado. A vazão de alimentação, o momento em que é iniciada a alimentação e sua duração, podendo ser contínua ou intermitente, podem variar dependendo das condições do processo e produto desejado. Comparando as duas

formas de operação deve-se notar que, apesar da batelada não contar com alimentação depois da adição do mosto ao fermentador, a dorna demora para ser preenchida devido à sua grande capacidade, o que de certa forma configura um processo de batelada alimentada (a não ser que o pé-de-cuba seja adicionado ao meio posteriormente).

Figura 3: Representação das etapas de um processo descontínuo alimentado.



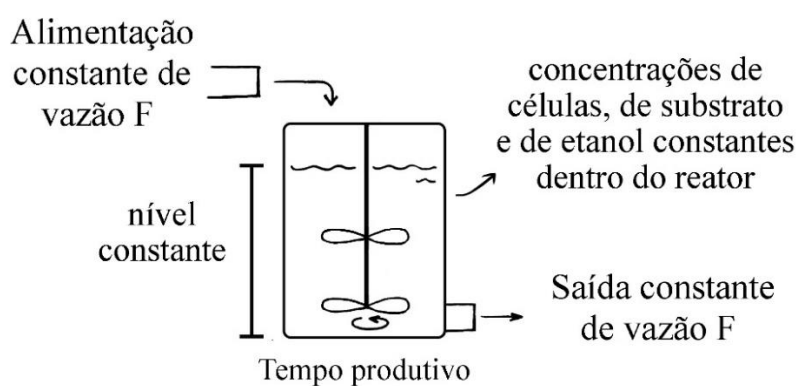
Fonte: Acervo Pessoal

De acordo com Guidini (2013), a combinação da adição de substrato durante parte do processo e do reciclo do fermento entre bateladas é característico do processo de batelada alimentada e é denominado processo Melle-Boinot. A massa de leveduras é separada do vinho fermentado através de centrifugação e então tratada para ser reutilizada. O tratamento ácido realizado traz grandes vantagens pois a maioria das bactérias e células velhas de leveduras não sobrevivem em ambientes excessivamente ácidos, diferente das células jovens de levedura, retornando um pé-de-cuba saudável para o próximo ciclo.

A fermentação contínua, ilustrada na Figura 4, difere das formas apresentadas anteriormente pelo fato de não haver um momento de parada do processo, em que todo o conteúdo do fermentador seria esvaziado. Ao invés disso, é mantido um regime permanente onde o reator recebe uma vazão constante de alimentação e a mesma vazão é retirada de

caldo fermentado, de modo que o nível de material no reator se mantenha o mesmo ao longo do tempo, assim como a concentração do substrato, células e produto (FACCIOTTI, 2001). De acordo com Guidini (2013), o processo de separação do vinho das leveduras e sua recuperação são utilizados em processos de fermentação contínua, onde as células tratadas são reintroduzidas juntamente com a vazão de alimentação. Ainda que traga a vantagem de eliminar a ocorrência de tempo morto que acontece nos processos descontínuos, o processo contínuo traz os riscos de contaminação por outras leveduras ou bactérias e possível mutação das leveduras contidas no reator, potencialmente reduzindo o rendimento do processo.

Figura 4: Representação das etapas de um processo contínuo.



Fonte: Acervo Pessoal

Uma vez que a *Saccharomyces cerevisiae* é inibida por substrato em excesso e para reduzir o risco de contaminação pelo sistema ser aberto, a maioria das usinas localizadas no Brasil opta por operar de forma descontínua alimentada (ANTONINI, 2012). A possibilidade de variação da vazão e composição da alimentação, junto com o fornecimento de oxigênio e agitação, permite o direcionamento do processo para formação de produtos de interesse em detrimento de outros, como subprodutos ou o crescimento celular exacerbado.

3.3. Cinética de Fermentação Alcoólica

A cinética da fermentação alcoólica trata da velocidade em que ocorre o processo e é monitorada a partir da medida de concentração ao longo do tempo de nutrientes consumidos e produtos produzidos no meio fermentativo, sendo os principais as hexoses glicose e frutose (açúcares redutores), etanol e células de levedura. Sua compreensão é essencial para o entendimento dos processos fermentativos, pois por meio dela é possível compreender a

dinâmica do processo e suas limitações, como inibições por substrato ou produto, e assim melhorar a eficiência através de condições mais adequadas à levedura ou pela busca por leveduras mais adaptadas às condições do processo. A eficiência da fermentação (η_{Et}) é um índice que determina o quão próximo o processo real está da situação ideal onde todo o substrato disponível no meio seria convertido em etanol e gás carbônico.

A fermentação se trata de um processo biológico para obtenção de energia, usada para a manutenção e reprodução das células, e que tem como subproduto o etanol (VELOSO, 2019). Pode-se afirmar, deste modo, que o etanol é um produto associado ao crescimento celular e, portanto, a velocidade de produção de etanol está atrelada à velocidade de crescimento celular (SONEGO, 2016). Analogamente, uma vez que os açúcares fermentescíveis são consumidos pela levedura para realizar a fermentação, pode-se afirmar que a velocidade de consumo de substrato está atrelada à velocidade de crescimento celular.

Considerando um processo em batelada, o processo é iniciado com uma concentração inicial de substrato e de células. Com o decorrer do processo, o substrato será consumido pelas células realizando fermentação e, conseqüentemente, produzindo etanol. Desta forma, a concentração de ART diminuirá conforme as concentrações de células e de etanol aumentam, até que o substrato acabe ou a concentração de etanol atinja um nível que iniba a produção (por volta de 80,0 kg/m³, segundo Veloso (2019)).

A velocidade de crescimento celular (r_x), representada pela equação 3, é definida como o produto da velocidade específica de crescimento celular (μ), intrínseco ao tipo de célula, e da concentração celular (C_x) (SONEGO, 2016).

$$r_x \left(\frac{g_x}{L.h} \right) = \mu \left(\frac{1}{h} \right) \cdot C_x \left(\frac{g_x}{L} \right) \quad (3)$$

Conforme mencionado anteriormente, a velocidade de consumo de substrato durante a fermentação é associada à velocidade de crescimento celular. Desconsideradas inibições, pode-se descrever μ a partir do modelo de Monod (equação 4), onde μ_{max} representa a velocidade específica máxima de crescimento celular, K_S a constante de saturação e C_S a concentração de substrato (SONEGO, 2016).

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S} \quad (4)$$

Uma vez que a levedura *S. cerevisiae* tem seu crescimento inibido por etanol, pode-se afirmar que a velocidade com que as células crescem é função da concentração de etanol (C_{Et}) no meio, além da concentração de substrato. O modelo de Levenspiel (equação 5) é um dos modelos que explica a inibição por etanol a partir de um fator de correção empírico (n) (VELOSO, 2019).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \cdot \left(1 - \frac{C_{Et}}{C_{Et}^*}\right)^n \quad (5)$$

onde C_{Et}^* a concentração de etanol a partir da qual se interrompe o crescimento celular, característico para cada levedura e função da temperatura. Conforme a concentração de etanol no meio (C_{Et}) aumenta e se aproxima do valor máximo C_{Et}^* , o fator C_{Et}/C_{Et}^* se aproxima de 1, reduzindo a velocidade específica de crescimento celular (μ) até o momento em que as células param de crescer e o etanol de ser produzido.

Segundo Sonogo (2012), além da inibição por produto, altas concentrações de substrato (S) podem também inibir o crescimento celular, como acontece no caso da *S. cerevisiae*. A alta concentração de açúcar pode afetar o funcionamento das células através da alteração da pressão osmótica do meio, o que justifica a escolha da batelada alimentada como forma de operação por permitir a manutenção de uma concentração de substrato abaixo do valor inibitório. Um modelo matemático que explica a inibição por substrato é o modelo de Andrews, descrito pela equação 6, que contém um fator de correção que reduz a velocidade conforme a concentração de substrato aumenta, de forma similar ao modelo de Levenspiel para inibição por produto.

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s + \frac{C_s^2}{K_{IS}}} \quad (6)$$

onde K_{IS} representa a constante de inibição pelo substrato.

Tendo em vista a influência tanto do substrato quanto do produto, um modelo usualmente empregado para descrever a velocidade específica de crescimento celular (μ) da *S. cerevisiae* durante o processo de fermentação alcoólica é um modelo híbrido de Andrews-Levenspiel (equação 7), que considera as inibições por substrato (S) e por produto (Et) (SONEGO, 2016).

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \frac{C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_{IS}}} \cdot \left(1 - \frac{C_{Et}}{C_{Et}^*}\right)^n \quad (7)$$

O coeficiente de rendimento teórico de substrato (S) a células (X) é obtido a partir da estequiometria da fermentação alcoólica (equação 2), onde o consumo de um mol de ART ($C_6H_{12}O_6$) gera 2 mols de etanol. Considerando as massas molares de hexose (ART) e etanol iguais a 180 e 46g/mol, respectivamente, cada grama consumida de ART gera 0,511 g de etanol, conforme mostrado na equação 8.

$$\left(Y_{Et/ART}\right)_{\text{Estimado}} = \frac{2 \cdot 46}{180} = 0,511 \frac{g_{Et}}{g_{ART}} \quad (8)$$

Para o cálculo do coeficiente partindo da sacarose, como a hidrólise da sacarose produz duas moléculas de hexose (equação 1), 1 mol de sacarose gera 4 mols de etanol.

4. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

A categoria físico-química das variáveis de processo engloba os parâmetros físicos, como turbidez e temperatura, e parâmetros químicos, como pH e concentrações de substrato e de etanol. O monitoramento dos parâmetros físico-químicos é uma prática essencial do processo de produção de etanol, pois as condições do meio, como o pH e a temperatura, afetam diretamente o rendimento do processo e o tempo de duração da fermentação (GUIDINI, 2013). A frequência de aferição, cálculo e análise de cada parâmetro pode ser diária, diversas vezes ao dia ou no início e final do processo, dependendo da relevância e flutuação do parâmetro. Com o avanço dos métodos analíticos e desenvolvimento de sensores mais acessíveis, a coleta automatizada de alguns tipos de dado permite que as aferições sejam realizadas continuamente.

Para que a análise caracterize adequadamente o mosto ou o caldo de fermentação, é importante que a amostra seja coletada de forma a representar todo o conteúdo do tanque. Segundo Lopes e Borges (2011), em caso de dornas abertas, deve-se coletar amostras compostas pelo conteúdo de todo o perfil vertical, o que pode ser obtido por um amostrador que colete amostra de diferentes níveis do tanque de uma só vez ou coletando amostras de diferentes níveis e misturando-as para obter uma amostra global. No caso de tanques fechados, o coletor de amostra deve ser localizado próximo a áreas com maior movimentação de material, por exemplo na saída do trocador de calor, cujo fluxo de escoamento provoca uma maior homogeneidade.

4.1. pH

O potencial hidrogeniônico (pH) é uma escala adimensional usada para indicar atividade do íon hidrônio (H_3O^+) em uma solução. De acordo com Atkins e Jones (2012), seu valor é convencionalmente calculado como o valor negativo do logaritmo da atividade do íon hidrônio e em soluções suficientemente diluídas, consideradas ideais, pode-se considerar o valor da atividade do íon hidrônio equivalente a concentração do íon na solução em mol/L, conforme mostrado na equação 9. Uma vez que o valor do pH é calculado a partir do valor negativo do logaritmo, quanto maior a concentração do íon hidrônio e, portanto, mais ácida a solução, menor será o valor do pH. Experimentalmente as concentrações do íon hidrônio em soluções variam entre 1 e 10^{-14} mol/L, definindo uma faixa de valores de pH que vão de 0 a 14, onde 7 equivale a um pH neutro e 14 uma solução extremamente básica.

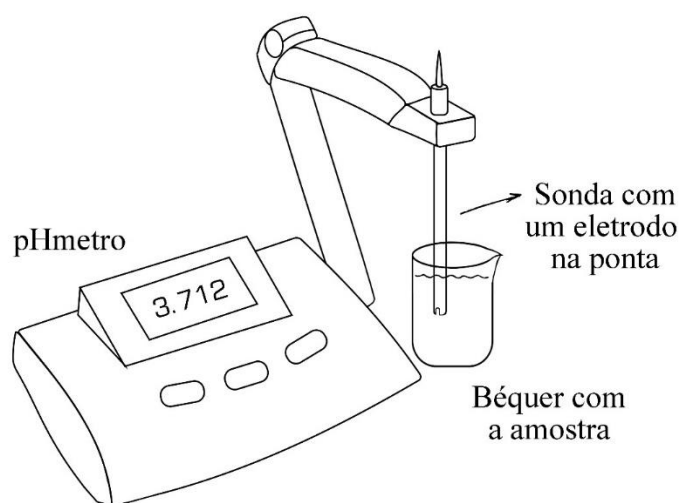
$$\text{pH} = -\log_{10}[\text{H}_3\text{O}^+] \quad (9)$$

Segundo De Souza e Monteiro (2011), o monitoramento do pH é de extrema importância para o processo fermentativo, pois influencia as velocidades de crescimento das leveduras, de fermentação e de formação de subprodutos durante o processo. Enquanto o pH do meio deve ser mantido entre 4 e 5 para favorecer a produção de etanol, um meio com pH menor que 4 pode favorecer a produção de álcoois superiores e um meio com pH maior que 5 favorece a produção de furfural e ácido acético. Além disso, o estabelecimento do pH abaixo de 5 afeta diretamente o rendimento da fermentação alcoólica ao prevenir a contaminação bacteriana (VELOSO, 2019). Segundo Antonini (2012), as bactérias crescem melhor em condições estáveis de pH próximos à neutralidade (entre 6,5 e 7,5).

A manutenção do pH em uma faixa ácida também é um fator determinante do tratamento do creme levedura, realizado após sua separação do vinho no final da fermentação para ser reaproveitado na fermentação subsequente. Durante o tratamento, o pH é reduzido para uma faixa entre 2,0 e 3,2 a partir de sua diluição com água e ácido sulfúrico para reduzir a contaminação bacteriana e a floculação (GUIDINI, 2013).

O monitoramento do pH do meio pode ser realizado de forma *offline* empregando um pHmetro (ilustrado na Figura 5), cuja análise deve ser repetida periodicamente para garantir a manutenção da faixa esperada do parâmetro, ou através de uma sonda inserida no reator que mede o valor de pH em tempo real (método *online*).

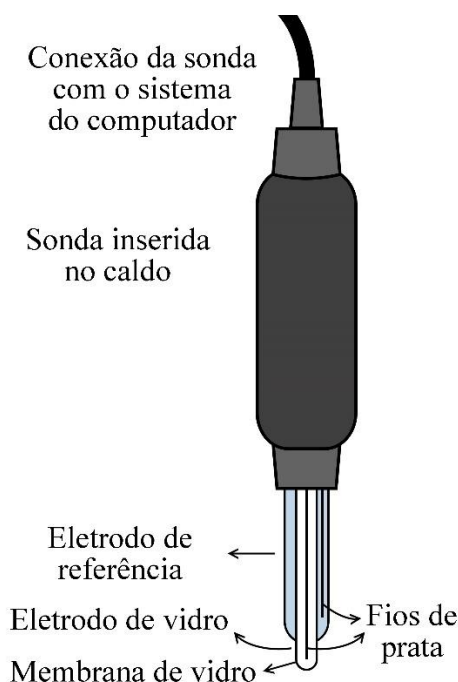
Figura 5: pHmetro.



Fonte: Acervo Pessoal

Segundo Barral e Pereiralima (2001), a sonda utilizada possui um eletrodo de vidro, constituído por uma membrana de vidro com um fio de prata submerso em uma solução de AgCl saturada com KCl sólido, e um eletrodo de referência de mesma composição (Figura 6). A medida do pH se dá pelo contato do eletrodo de vidro com a solução, pois a diferença de potencial medida entre os dois eletrodos é proporcional à concentração dos íons na solução, uma vez que o tampão de KCl mantém a concentração de íons H^+ dentro do eletrodo constante. Através da calibração do equipamento, a diferença de potencial é convertida para a escala de pH.

Figura 6: Representação de uma sonda de pH.



Fonte: Acervo Pessoal

As grandes vantagens do emprego do método *online* com a sonda são o acompanhamento do valor em tempo real, que reduz o número de análises feitas em laboratório e permite a automatização da manutenção do parâmetro dentro da faixa esperada ao conectá-lo a um sistema de controle, e a redução do número de vezes que amostras são coletadas de dentro do reator, que de acordo com Cunha (2002) podem aumentar o risco de contaminação do meio devido à abertura do sistema e contato do caldo com o amostrador. Para mais, existem sondas como a AcquaLink-TP (Acqua Nativa) capazes de monitorar simultaneamente a temperatura e o pH do meio, reduzindo o número de equipamentos necessários para acompanhar o processo.

4.2. Temperatura

A temperatura é uma medida de energia cinética média de moléculas ou átomos que compõem a matéria e, segundo Naves *et al.* (2010), é um dos parâmetros mais influentes para a atividade dos microrganismos. A maioria dos seres vivos tem uma faixa de temperatura ótima de sobrevivência e podem vir a morrer caso ela se afaste muito da faixa, devido à dependência do metabolismo celular com relação à temperatura.

No caso de processos fermentativos, onde busca-se o desempenho ótimo da levedura para produzir etanol e evitar a produção de produtos secundários e a contaminação por outros microrganismos, o controle de temperatura é essencial por sua influência sobre a velocidade de crescimento e metabolismo da levedura, sua viabilidade celular e capacidade fermentativa (NAVES *et al.*, 2010). Ainda que o aumento da temperatura promova o aumento da energia cinética das moléculas, aumentando a velocidade do processo fermentativo, seu excesso pode afetar diretamente o funcionamento da membrana plasmática celular e das proteínas, como as enzimas, que em temperaturas mais extremas estão sujeitas à desnaturação, um processo irreversível onde a proteína deixa de ser ativa.

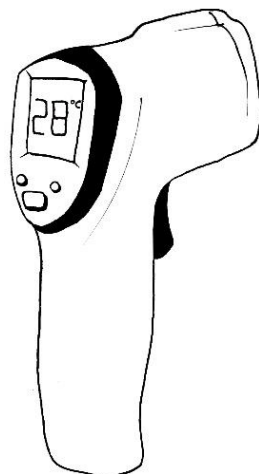
A faixa de temperatura ideal para processos de produção industrial de etanol é de 25 a 35°C (DE SOUSA, MONTEIRO, 2012). Segundo Guidini (2013), temperaturas superiores, ainda que aumentem a velocidade de fermentação até certo ponto, podem favorecer a contaminação bacteriana, tornar a levedura mais sensível ao etanol e fazer com que parte do produto evapore, reduzindo o rendimento da fermentação. Por outro lado, a redução da temperatura reduz a atividade da levedura, aumentando o tempo necessário para que o processo ocorra e conseqüentemente prejudicando o nível de produtividade da planta.

Uma vez que a safra da cana-de-açúcar ocorre entre abril e novembro (SALLA, 2008), a maioria das destilarias tende a iniciar a operação durante o outono, quando a temperatura ambiente na região Centro-Sul fica próxima de 15°C, demandando aquecimento do caldo antes do começo da fermentação (DE SOUSA, MONTEIRO, 2011). Pela fermentação ser um processo exotérmico não é necessário manter o aquecimento ao longo do processo. Conforme passam-se os meses e a temperatura ambiente aumenta, a demanda pelo monitoramento da temperatura muda da garantia do valor mínimo para assegurar que ela não supere o limite superior das condições ideais para a levedura.

Os principais métodos usados na indústria são o termômetro digital a laser (ilustrado na Figura 7), que opera de maneira *offline* e cuja aferição deve ser realizada periodicamente para garantir que a temperatura siga dentro da faixa esperada, e através do uso de sensores

de temperatura *online*, localizados dentro da dorna realizando aferição constante. A grande vantagem do uso do controlador está na medida contínua da temperatura e a possibilidade de alerta quando o valor extrapolar da faixa pré-estabelecida e sua correção automática através de um sistema de controle.

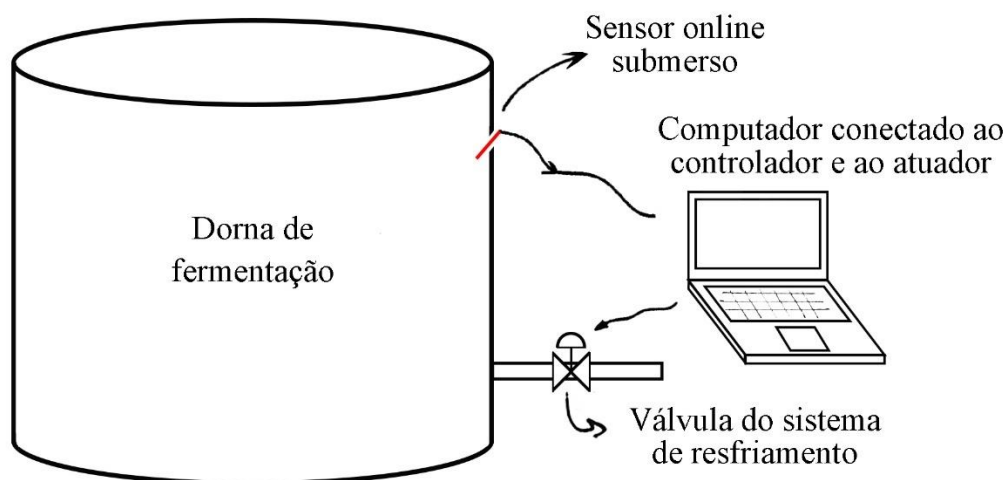
Figura 7: Termômetro a laser.



Fonte: Acervo Pessoal

Entre os sensores *online* de temperatura podem ser citados o bimetálico, o termopar e a termorresistência (SOUZA, ROCHA, VIANA, 2015). Os sensores tipo bimetálicos são compostos por dois metais soldados e com uma extremidade fixa; a mudança de temperatura faz com que os metais contraiam ou dilatem e pode ser calculada a partir do deslocamento da extremidade livre de cada um dos metais, uma vez que possuem coeficientes de dilatação diferentes. Os sensores tipo termopares operam a partir da pequena diferença de potencial gerada pela mudança de temperatura em dois metais ou ligas metálicas distintos soldados. As termorresistências funcionam medindo a variação da resistência elétrica que ocorre com os metais proporcionalmente à variação da temperatura. De acordo com Barral e Pereiralima (2001), a medida de temperatura em processos fermentativos é majoritariamente feita usando termorresistências compostas por cobre, níquel, platina ou uma liga de ródio e ferro. É representado na Figura 8 um sistema de aferição e controle *online* de temperatura em uma dorna.

Figura 8: Sistema de controle de temperatura com sensor *online* e manipulação de válvula de resfriamento.



Fonte: Acervo Pessoal

4.3. Concentração de açúcares

Conforme descrito anteriormente, no Brasil a principal fonte de açúcar utilizada para a produção de etanol é a cana-de-açúcar, na forma de caldo ou como melaço. O açúcar contido na cana é majoritariamente sacarose, com um pouco de glicose e frutose (ARAÚJO, 2017). Devido à enzima invertase presente na parede celular da levedura, o processo de hidrólise da sacarose, que produz uma molécula de glicose e uma de frutose, acontece rapidamente do lado de fora da célula (ANTONINI, 2012). Deste modo, pode-se considerar os açúcares presentes no mosto majoritariamente glicose e frutose, também denominados açúcares redutores totais (ART).

Durante o processo de fermentação, as moléculas de ART são metabolizadas, produzindo majoritariamente etanol e gás carbônico (VELOSO, 2019). A concentração do substrato no meio varia ao longo do tempo conforme é consumido e, em virtude do ART ser a única fonte de carbono disponível no meio para a fermentação e da produção de etanol estar atrelada à velocidade de crescimento celular, pode-se afirmar que com o esgotamento do ART no caldo a fermentação, e conseqüentemente a produção de etanol, cessa.

Paralelamente, em razão da inibição da *S. cerevisiae* pelo etanol, a velocidade de consumo de ART diminui conforme a concentração de etanol alcança níveis tóxicos, até que a fermentação deixe de acontecer. O substrato remanescente acabará descartado junto com a vinhaça, gerando desperdício de recursos e produzindo uma vinhaça com maior teor

orgânico (SONEGO, 2016). A implicação do maior teor orgânico da vinhaça é o aumento da demanda biológica e química de oxigênio para sua decomposição, poluindo mais um ecossistema aquático caso fosse descartado sem tratamento, o que se traduz em um maior gasto despendido no tratamento dos efluentes da planta.

Pode-se calcular a quantidade de ART que será empregada em uma fermentação partindo da equação 8 e da eficiência do processo (η_{FA}): para um processo de alta eficiência, com η_{Et} próximo a 90% (PACHECO, 2010), poderia ser obtido 0,460kg de etanol por kg de ART, conforme exposto na equação 10.

$$(Y_{Et/ART})_{real} = 0,511 * 0,90 = 0,460 \frac{kg_{Et}}{kg_{ART}} \quad (10)$$

Tomando o valor de concentração máxima fornecido por Veloso (2019) de 80,0 kg de etanol por metro cúbico de caldo, quando o efeito inibitório por produto se torna expressivo (equivalente a aproximadamente 10°GL), pode-se calcular a concentração máxima de ART que poderia ser fermentada na dorna até que ocorresse a inibição por etanol (equação 11).

$$C_{ART\ max} = 80 \frac{kg_{Et}}{m^3} * \frac{1}{0,460} \frac{kg_{ART}}{kg_{Et}} = 173,9 \frac{kg_{ART}}{m^3} \quad (11)$$

Partindo da equação 11 e do volume do tanque é possível calcular a massa total de ART para que seja produzida a quantidade máxima de etanol, em um processo de alta eficiência. Em caso de a levedura apresentar tolerância superior ou inferior ao valor típico de 10°GL seria necessário apenas ajustar o valor na equação.

Além da importância do controle da concentração de ART para a verificação da velocidade de consumo, seu monitoramento é importante para verificar a eficiência do processo. O consumo de ART não acompanhado do aumento da concentração de etanol pode indicar uma contaminação ou priorização de outros processos frente à fermentação pela *S. cerevisiae*, que reduziria o rendimento da produção (PACHECO, 2010).

Na literatura são encontradas diferente metodologias de determinação da concentração dos açúcares, que podem ser empregadas para quantificá-los em dornas de fermentação. A seguir são apresentadas as principais delas.

4.3.1. Método de determinação do Brix por refratometria

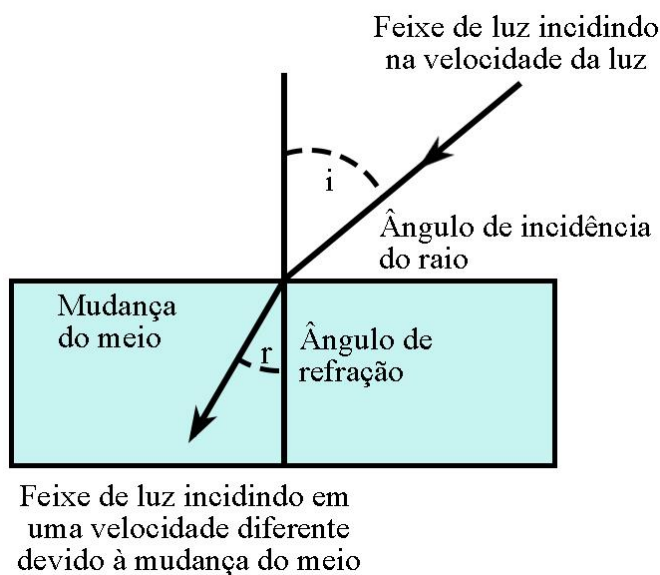
A medida em grau BRUX ($^{\circ}\text{Bx}$) determina a quantidade de sólidos solúveis presentes em uma amostra, sendo 1°Bx equivalente a 1 g de sólidos a cada 100 g de solução (FERNANDES, 2017). A medição por refratometria é baseada no fato do índice de refração ser constante para uma substância, dadas as condições de pressão e temperatura, identificado de maneira não seletiva o teor de sólidos solúveis na solução (INSTITUTO DOLFO LUTZ, 2008; FERNANDES, 2017).

A aplicação deste método para determinar o teor de açúcares no contexto da fermentação industrial parte do pressuposto que os sólidos solúveis presentes no mosto são majoritariamente moléculas de ART e, portanto, a variação do índice de refração obtido se daria em razão da variação do teor de açúcares na amostra. A facilidade de aplicação da análise e seu baixo custo fazem com que o procedimento seja amplamente aplicado no acompanhamento do processo. Por outro lado, deve-se atentar à concentração de etanol na solução, que pode interferir na medida segundo Rizzon (2010).

Através da análise de amostras coletadas ao longo da fermentação é possível acompanhar o comportamento do consumo de ART pelas leveduras. Pelo fato de existirem outros sólidos solúveis em concentrações menores na amostra, o resultado pode apresentar erros de possível ganho em relação à concentração real de ART (ARAÚJO, 2017). O fim da fermentação pode ser identificado pela estabilização do valor do grau BRUX obtido, indicando que o ART deixou de ser consumido ou foi esgotado no caldo. A presença de outros sólidos solúveis pode fazer com que o resultado estabilize em um valor maior que zero. A prevalência de ART pode ser verificada através de uma análise mais específica, como por métodos químicos ou por cromatografia.

O valor de BRUX pode ser determinado de forma simples por densimetria ou por refratometria. O refratômetro funciona a partir da determinação do ângulo de refração, que é causado pela mudança de direção que acontece quando a luz muda de meio ao incidir em um líquido, e a conversão do ângulo em um índice de refração, conforme representado na Figura 9. Uma vez que o índice específico de uma substância depende de sua concentração, da temperatura e do comprimento de onda da luz, é possível definir a partir do ângulo de refração a concentração da substância.

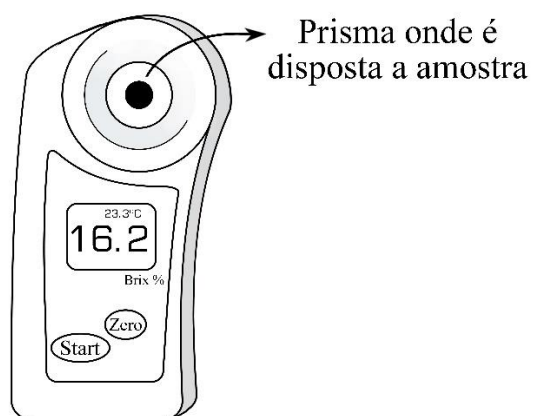
Figura 9: Representação da mudança da direção do feixe de luz ao mudar de meio, onde o ângulo de incidência i é diferente do ângulo de refração r .



Fonte: Acervo Pessoal

Dentre os principais modelos de refratômetro pode-se citar o refratômetro Abbe, equipamento de bancada que possui um sistema de circulação de água que mantém a temperatura constante, e o digital, que possui especificidades de escala, como de salinidade, teor de BRIX e teor alcoólico, representado na Figura 10.

Figura 10: Refratômetro digital.



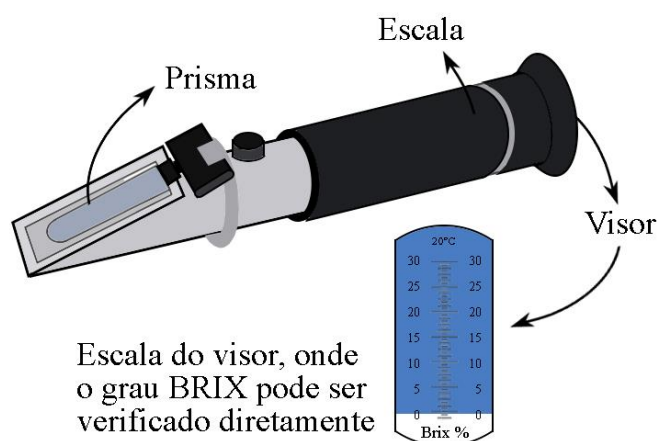
Fonte: Acervo Pessoal

O procedimento descrito por Rizzon (2010) consiste na adição de algumas gotas da amostra no prisma do equipamento, que deve estar limpo e livre de ranhuras e cobrir o prisma com a tampa. A medida do grau BRIX pelo refratômetro é realizada a partir de um feixe de

luz que incide no prisma, gerando o ângulo de refração que é medido e convertido em índice de refração pelo equipamento (FERNANDES, 2017). Pelo fato do ângulo de refração variar com a temperatura, deve-se verificar se a amostra está a 20°C e, se não estiver, deve-se corrigir o grau BRIX a partir de uma tabela em função da temperatura (RIZZON, 2010). No caso de um refratômetro com banho termostático acoplado, como o caso do refratômetro Abbe, é necessário apenas ajustar a temperatura do banho para 20°C.

No caso de refratômetros projetados para determinação de grau BRIX, como o analógico portátil (ilustrado na Figura 11), o resultado de BRIX é mostrado diretamente no visor. No caso dos equipamentos não especializados, é necessário determinar o valor do grau BRIX a partir do índice de refração. Para tal é possível utilizar tabelas de índices de refração para soluções de água com glicose em função da concentração do açúcar ou de uma curva de calibração obtida a partir de soluções de concentração conhecida.

Figura 11: Refratômetro analógico portátil, onde é possível verificar diretamente o valor de grau BRIX.

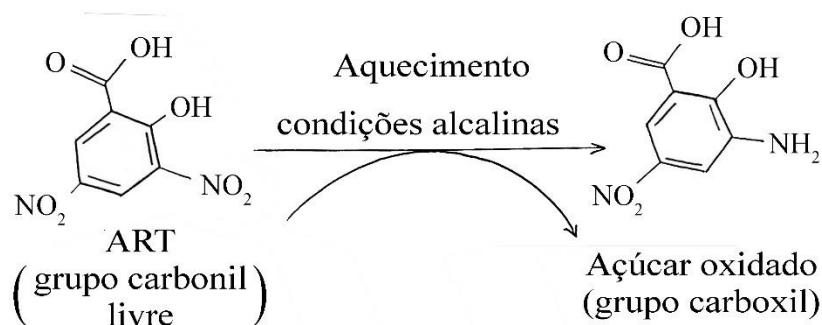


Fonte: Acervo Pessoal

4.3.2. Método do ácido 3, 5-dinitrosalicílico

O método do ácido 3, 5-dinitrosalicílico (ADNS) é um método espectrofotométrico baseado na mudança de coloração do ADNS, uma molécula amarelada, que é reduzida em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico na presença de açúcares redutores (glicose e frutose), apresentando coloração avermelhada, conforme ilustrado na Figura 12 (SOUZA *et al.*, 2018). Uma vez que o ADNS é reduzido pelos açúcares redutores totais, o método determina a concentração de ART na amostra, desconsiderando a sacarose. Sua aplicação para análise de açúcares redutores em meio básico foi desenvolvida por Miller em 1959.

Figura 12: Reação de redução da molécula ADNS em ácido 3-amino-5-nitrosalicílico.



Fonte: Acervo Pessoal

De acordo com a metodologia descrita por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013), o procedimento pode ser dividido em três fases: o preparo da solução de ADNS, a obtenção de uma curva de calibração utilizando glicose como padrão, relacionando a concentração de glicose e a absorvância da solução resultante e a leitura da absorvância da solução resultante.

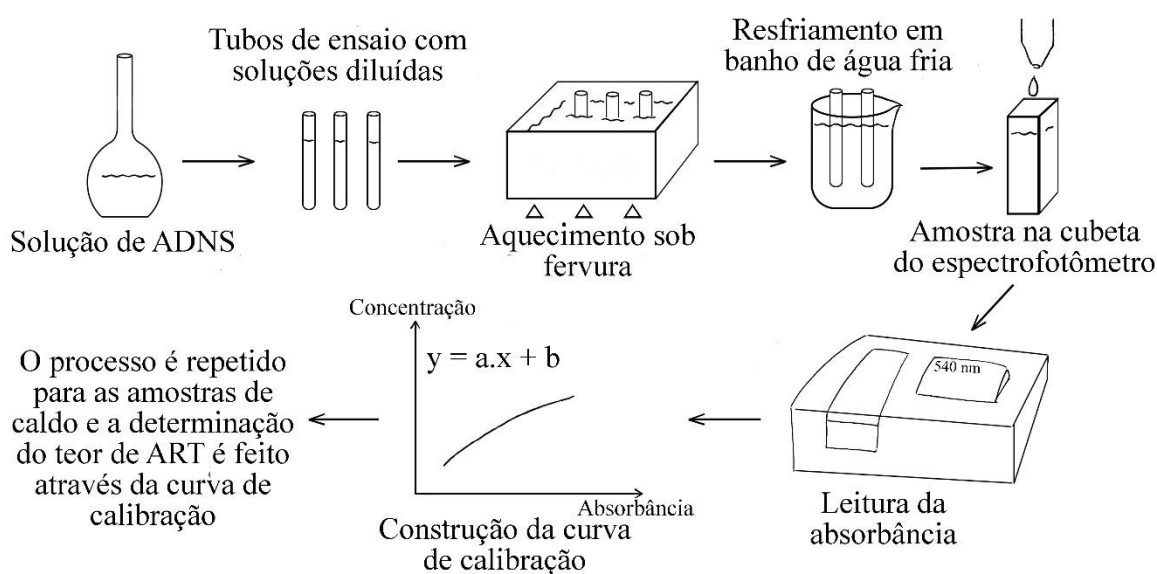
Segundo Miller (1959), a solução reagente de ADNS é composta de 1% de ADNS, 18,2% de tartarato de sódio e potássio (sal de Rochelle), 0,2% de fenol, 0,05% de bissulfito de sódio e 1% de hidróxido de sódio, completada com água destilada. O preparo da solução parte da dissolução do tartarato de sódio e potássio em metade do volume total de água destilada sob aquecimento e agitação constantes. Em seguida, adiciona-se o ADNS dissolvido em uma solução de hidróxido de sódio 2 M com o restante dos componentes. Após a homogeneização da solução, ela é transferida para um balão volumétrico e o restante da água é adicionada (VASCONCELOS, PINTO, ARAGÃO, 2013).

Para a elaboração da curva padrão, parte-se de uma solução de glicose de concentração conhecida, separada e diluída de modo a obter soluções com concentrações entre 0,1 e 1,0 g/L de glicose. Uma alíquota de 3 mL do reagente de ADNS é adicionada a cada tubo de ensaio com 3mL de solução de glicose, incluindo uma amostra de água destilada pura no lugar da glicose para servir de referência ("branco"). Os tubos são agitados vigorosamente e aquecidos em fervura a 100°C por 5 minutos. A reação é finalizada pela inserção do tubo em água à temperatura ambiente. A solução é então adicionada a uma cubeta limpa e com a superfície livre de riscos, que é inserida no espectrofotômetro para a leitura de absorvância a 575nm. A reta de calibração é obtida a partir da regressão linear dos valores de absorvância

em função dos valores de concentração de glicose, cujos valores de concentração deverão ser corrigidos para estar de acordo com as diluições realizadas (MILLER, 1959).

O procedimento para a amostra de caldo fermentado é semelhante, onde um volume conhecido é colocado no tubo de ensaio, completado com água destilada e misturado com a solução de ADNS. Depois de misturado e aquecido o conteúdo do tubo é resfriado e submetido à medida de absorvância, cujo valor é colocado na reta de calibração para que seja obtida sua concentração. Os passos para a análise são representados na Figura 13.

Figura 13: Representação do procedimento experimental do método do ácido 3, 5-dinitrosalicílico para determinação de concentração de açúcares redutores.

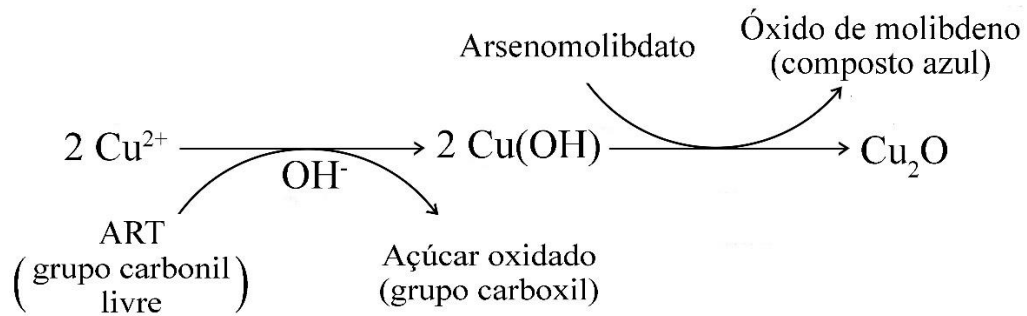


Fonte: Acervo Pessoal

4.3.3. Método de Somogyi-Nelson

O método de Somogyi-Nelson é baseado na redução do íon Cu^{2+} a Cu^+ , produzindo óxido cuproso Cu_2O , que por sua vez reduz o composto arsenomolibdato a óxido de molibdênio, que possui coloração azul (MALDONADE *et al.*, 2013) (Figura 14). Pelo fato do cobre ser reduzido pelos açúcares redutores totais (glicose e frutose), o método determina a concentração de ART na amostra, desconsiderando a sacarose. Dado que a concentração do composto azul é proporcional à concentração de óxido de cobre, por sua vez proporcional à concentração de ART, é possível determinar a concentração dos açúcares redutores presentes na amostra. O método apresenta uma faixa de determinação de ART com valor de concentração entre 25 e 500 mg/L.

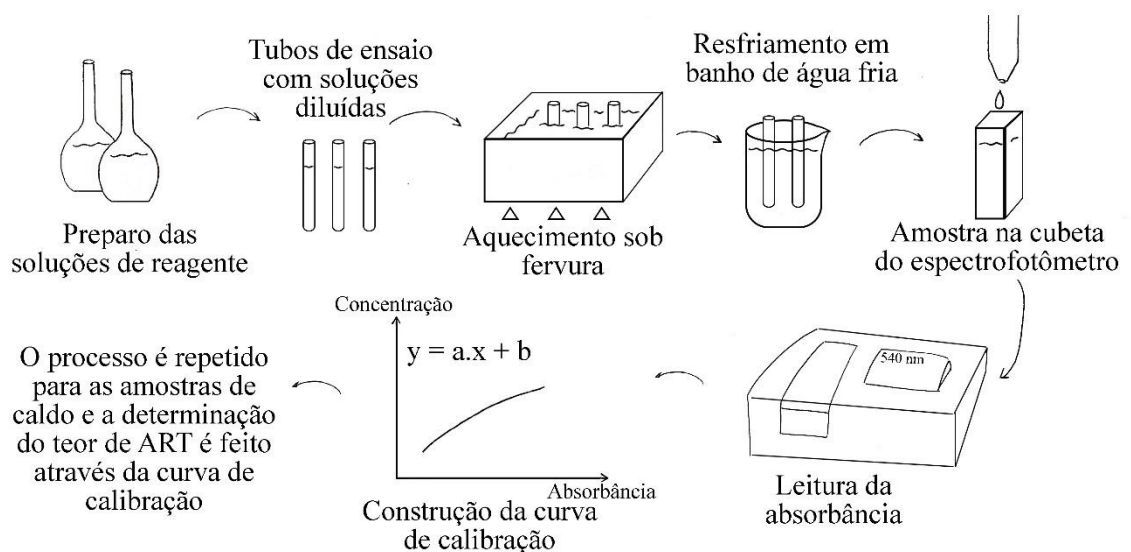
Figura 14: Reações de oxidação e redução do método Somogyi-Nelson.



Fonte: Acervo Pessoal

O processo descrito por Maldonade *et al.* (2013) ocorre de forma semelhante ao método do ácido 3, 5-dinitrosalicílico (Figura 15). É preparada uma solução com os reagentes, obtida uma curva de calibração utilizando glicose como ART e, a partir da medida de absorbância da amostra de caldo de fermentação, calcula-se a concentração de ART.

Figura 15: Representação das etapas de execução do método Somogyi-Nelson para determinação de concentração de ART.



Fonte: Acervo Pessoal

O reagente de Somogyi-Nelson é preparado como duas soluções diferentes. A primeira é composta por 4 g de sulfato de cobre anidro, 24 g de carbonato de sódio, 16 g de bicarbonato de sódio, 12 g de tartarato duplo de potássio e 18 g de sulfato de sódio anidro dissolvidos em 600 mL de água destilada posteriormente completada até totalizar 1000 mL em um balão volumétrico. Após 24 horas de repouso, a solução é filtrada com papel de filtro. A segunda

solução de reagente é composta por 50 g de molibdato de amônio anidro, 900 mL de água destilada e 42 mL de ácido sulfúrico misturados a uma solução de 6 g de arseniato dibásico de sódio anidro dissolvido em 50 mL de água destilada e mantida em repouso por 24 horas.

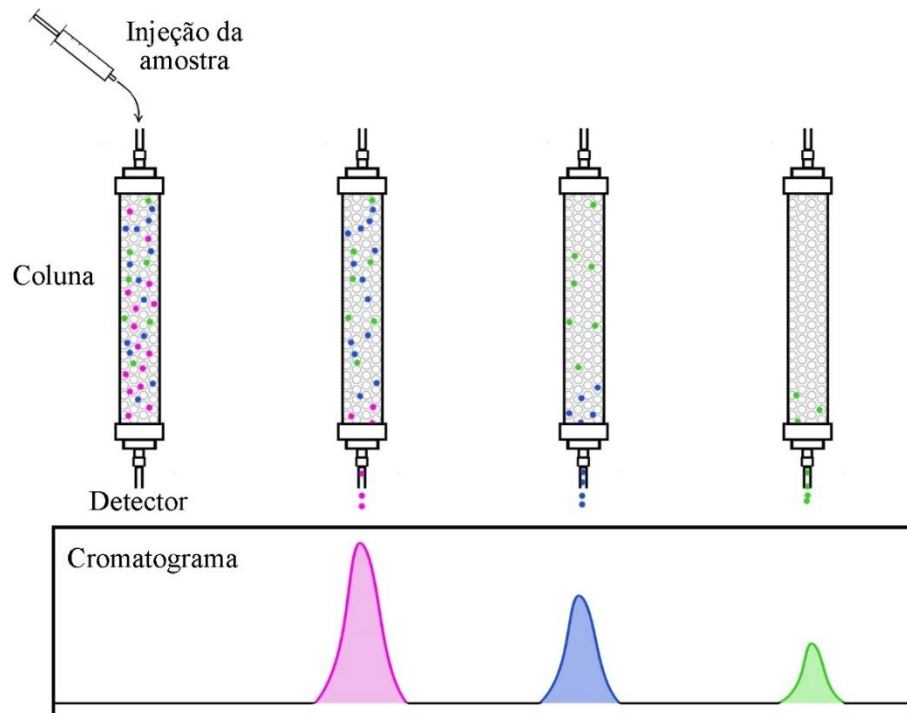
A curva de calibração é obtida a partir de medidas de absorvância do produto da reação de soluções de glicose com concentrações entre 50 e 500 mg/L com o reagente. Um volume de 1,0 mL da solução de glicose é inserido em um tubo de ensaio e são adicionados 2 mL da primeira solução de reagente. O tubo de ensaio é agitado e aquecido em fervura por 6 minutos e resfriado por 5 minutos em um banho de gelo. Em seguida, 2,0 mL da segunda solução de reagente é adicionada e o tubo agitado e mantido em repouso por 5 minutos. São adicionados 25,0 mL de água destilada e é realizada a leitura da absorvância em espectrofotômetro a 540 nm. O procedimento é repetido para diversos valores de concentração de glicose e a amostra “em branco”, onde a solução de ART é substituída por água destilada para compor a referência nula de absorvância. A partir da regressão linear dos valores de concentração de glicose das amostras (eixo y) em função da absorvância (eixo x) obtém-se a curva de calibração.

Para a análise de uma amostra retirada do fermentador, são repetidos os procedimentos de diluição e mistura realizados para a solução padrão de glicose. Substituindo o valor de absorvância obtido pelo espectrofotômetro na curva de calibração, obtém-se a concentração de ART que, multiplicada pela diluição, fornecerá o valor de ART da amostra.

4.3.4. Cromatografia Líquida

A análise por cromatografia é baseada na separação dos componentes de uma amostra que são distribuídos entre duas fases, a fase estacionária (recheio) e a fase móvel (eluente), que escoam através da fase estacionária. A amostra é arrastada pela fase móvel e a separação de seus componentes se dá pela interação de cada substância contida na amostra com as fases estacionária e móvel, resultando em diferentes tempos de retenção na coluna de acordo com as propriedades da molécula (SKOOG *et al.*, 2006), conforme representado na Figura 16.

Figura 16: Representação do escoamento da amostra em coluna contendo uma fase estacionária.



Fonte: Acervo Pessoal

Segundo Skoog *et al.* (2006), a análise cromatográfica pode ser realizada sobre uma placa (cromatografia planar) ou mais comumente em uma coluna, usualmente de vidro ou de metal. A cromatografia em coluna é realizada com uma fase estacionária sólida e pode ter a fase móvel gasosa ou líquida. A cromatografia gasosa é aplicada para compostos voláteis, enquanto a líquida pode ser usada para analisar compostos voláteis e não-voláteis.

Para determinar as fases estacionária e móvel para a análise deve-se selecionar a técnica cromatográfica adequada para separar os componentes da amostra de acordo com suas propriedades diferenciais. A cromatografia pode ser de adsorção, de partição (baseada na solubilidade dos componentes em duas fases homogêneas), de troca iônica e de exclusão (cujo princípio é a diferença de tamanho das moléculas). A cromatografia de partição de fase normal, por exemplo, utiliza como fase estacionária um solvente líquido polar imobilizado sobre as partículas do recheio (como o trietileno glicol imobilizado sobre sílica) e uma fase móvel apolar (como o hexano) e a separação se dá pela diferença na polaridade dos compostos da amostra, pois os compostos polares interagem mais fortemente com a fase estacionária que atravessam a coluna com uma velocidade menor que os componentes apolares, cuja velocidade é similar à da fase móvel (SKOOG *et al.*, 2006).

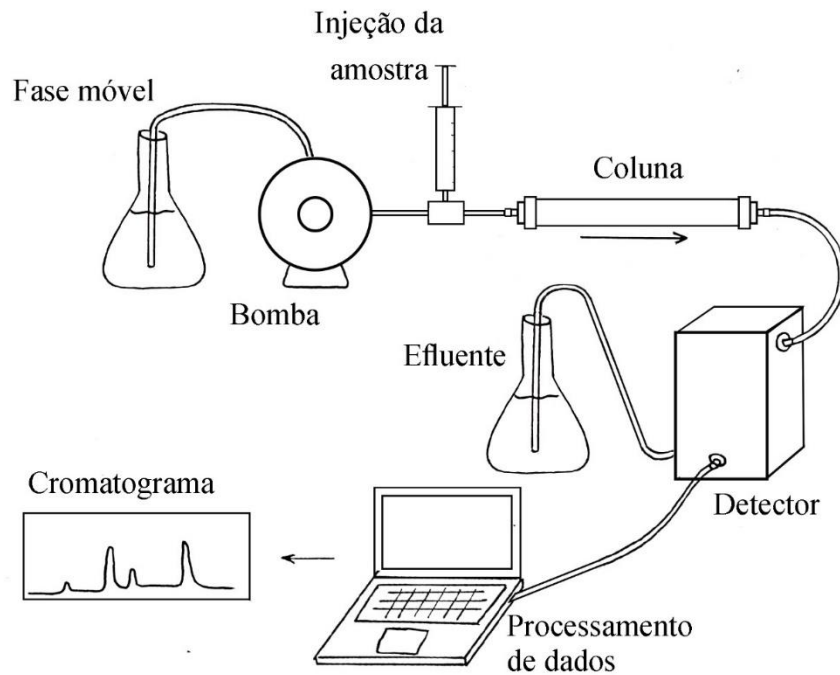
A identificação de cada composto é realizada por um detector conectado à saída da coluna. O detector analisa a composição da fase móvel ao longo do tempo de retenção na coluna e registra os sinais captados na forma de picos, cada um representando uma substância, em um cromatograma. De acordo com Skoog *et al.* (2006), o detector mais adequado deverá ser selecionado de acordo com as propriedades das substâncias contidas na amostra, podendo realizar a análise por índice de refração (IR), por condutividade, por ultravioleta-visível (UV-VIS), entre outros.

A concentração de cada um dos componentes é determinada através de curvas de calibração construídas com soluções padrão, partindo do pressuposto que a área sob cada pico do cromatograma é proporcional à concentração do composto. A medida da concentração de ART da amostra é calculada a partir da soma da área correspondente ao pico dos açúcares redutores totais.

A cromatografia aplicada para a análise de concentração de açúcares em caldos de fermentação requer o uso de uma fase móvel líquida, dado que os açúcares são compostos não-voláteis. Pode-se aplicar a cromatografia líquida clássica (CLC) ou de alta eficiência (CLAE), que diferem principalmente pela forma de inserção da amostra e da fase móvel e pela detecção dos componentes. Enquanto na CLC a amostra e a fase móvel são inseridas manualmente, atravessando a coluna por ação da gravidade e sendo coletadas em frações manualmente, a CLAE utiliza uma bomba que insere o conteúdo na coluna sob pressão e realiza a coleta das frações continuamente através de um detector ligado à coluna.

Conforme representado na Figura 17, o sistema montado para análise por cromatografia líquida de alta eficiência é composto pela coluna, recheada com a fase estacionária, ligada a uma bomba que introduz a fase móvel continuamente na coluna. A outra extremidade da coluna é ligada ao detector, que realiza a análise do conteúdo eluído da coluna e produz o cromatograma.

Figura 17: Representação das etapas de execução do método cromatográfico líquido de alta eficiência.



Fonte: Acervo Pessoal

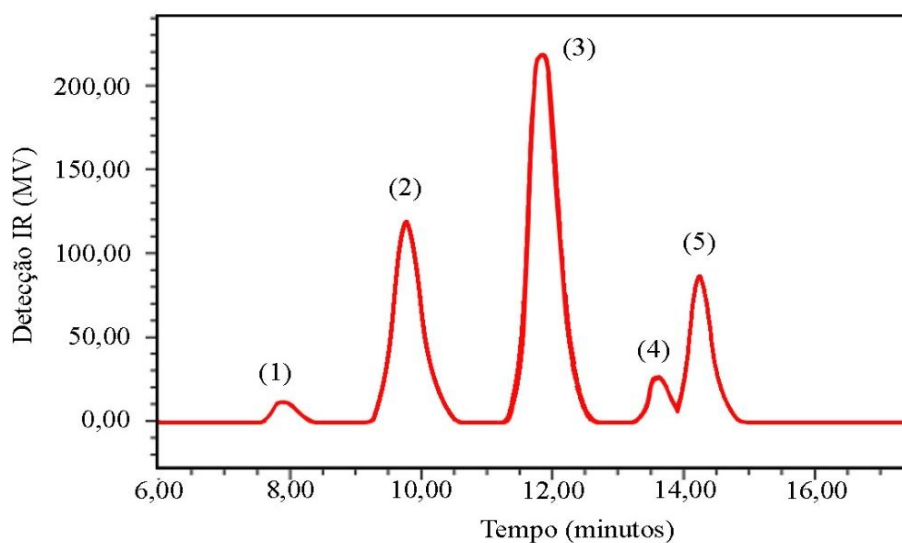
A análise do mosto por HPLC pode ser realizada utilizando uma coluna Sugar-Pak I (Waters), de dimensões 300 x 6,5 mm e fase estacionária de 10 μm de diâmetro e mantida a 80°C, ligada a um detector de índice de refração, conforme relatado por Rodrigues *et al.* (2018). Água ultrapura com vazão de 0,5 mL/min é usada como eluente e como padrões para calibração utiliza-se soluções de sacarose, glicose, frutose, etanol e glicerol de concentração entre 0,1 e 8,0 g/L para que sejam determinados os picos de cada substância. Porém, outras colunas próprias para quantificação de açúcares estão disponíveis no mercado.

Após a calibração, a amostra é injetada na entrada da coluna, sendo arrastada pela fase móvel através da coluna e, após a interação com a fase estacionária, as substâncias são eluídas em diferentes tempos de retenção e passam pelo detector. Com base nas curvas de calibração obtidas previamente, é possível identificar o pico correspondente a cada substância e através da determinação da área sob o pico e da concentração da solução padrão utilizada calcula-se a concentração de cada composto.

A Figura 18 é a representação de um cromatograma obtido na análise cromatográfica de uma fermentação alcoólica, realizada de acordo com o procedimento descrito anteriormente. Além de identificar as moléculas de açúcar, sacarose (1), glicose (2) e frutose

(3), são identificados simultaneamente os picos de etanol (4) e glicerol (5). Nota-se observando o cromatograma que o processo de fermentação alcoólica ilustrado está no início, pois a área sob o pico do etanol é pequena e dos açúcares é grande. Além disso, é possível verificar que, como a sacarose é rapidamente hidrolisada pela levedura, sua concentração é baixa em relação à glicose e a frutose.

Figura 18: Representação do cromatograma de uma amostra de caldo de fermentação alcoólica.



Fonte: Acervo Pessoal

A cromatografia é apontada como um dos métodos mais complexos e precisos para determinar a composição de amostras, por simultaneamente identificar e quantificar diversos componentes em uma única análise, além da possibilidade de automação de parte da metodologia através da injeção automática da amostra e tratamento dos dados. No caso da coluna mencionada anteriormente, como ilustrado na Figura 18, é possível com uma mesma análise determinar teores de diferentes açúcares (glicose, frutose e sacarose) e produtos (etanol e glicerol) da amostra. Como pontos negativos do método pode-se citar o alto custo de operação, devido ao uso, tratamento e reposição das diferentes fases estacionárias, e a necessidade de um operador com maior conhecimento técnico para realizá-lo.

4.3.5. Espectroscopia no infravermelho médio por transformada de Fourier

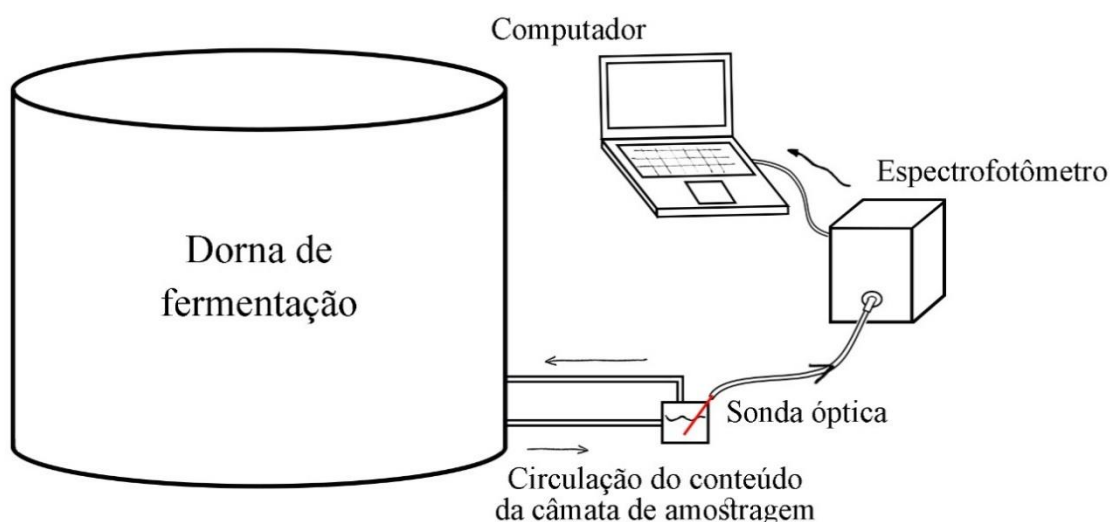
Segundo Rodrigues *et al.* (2018), a análise através de espectroscopia no infravermelho médio por transformada de Fourier (FT MIR) é apontada como uma alternativa à análise

cromatográfica devido à maior simplicidade, pelo custo reduzido, pela possibilidade de realizar a análise de forma *online* e apresentar, assim como a análise cromatográfica, o resultado rápido e acurado de diversos componentes simultaneamente.

A espectroscopia no infravermelho médio pode ser empregada na determinação do teor de frutose, glicose, sacarose, etanol e glicerol simultaneamente. A identificação dos componentes se dá pelos espectros de absorção na região de infravermelho através da calibração do equipamento (SANTOS *et al.*, 2022). A calibração do equipamento requer um método complexo, pois os espectros de infravermelho geram bases de dados complexos (RODRIGUES *et al.*, 2018), as faixas de absorção dos açúcares e álcoois contidos no mosto são próximas e a composição do meio muda ao longo de um processo em batelada alimentada (SANTOS *et al.*, 2022). De acordo com Rodrigues *et al.* (2018), usualmente utiliza-se a regressão multivariada dos mínimos quadrados parciais (PLS) para a calibração do equipamento quando empregado para analisar bioprocessos.

O sistema descrito por Rodrigues *et al.* (2018), ilustrado na Figura 19, é composto por uma sonda de fibra óptica de reflexão atenuada total (ATR) ligada a um espectrofotômetro de infravermelho por transformada de Fourier ReactIR 45m (Mettler-Toledo AutoChem, Inc.) e um detector nitrogênio líquido – mercúrio resfriado – cádmio – telúrio (MCT). A sonda entra em contato com o caldo através de uma câmara amostrada, que tem seu conteúdo recirculado para o fermentador por uma bomba.

Figura 19: Representação do sistema montado para análise usando espectrofotometria de infravermelho médio com transformada de Fourier.



Fonte: Acervo Pessoal

Como pontos negativos do uso do método pode-se citar a susceptibilidade à baixa homogeneidade das amostras transferidas para a câmara pela bomba, a possível formação de biofilme na superfície do detector e presença de bolhas que podem prejudicar a análise e, conforme já mencionado anteriormente, a necessidade de curvas de calibração robustas.

4.4. Concentração de etanol

O acompanhamento do teor de etanol ao longo da fermentação alcoólica é de extrema importância por se tratar do principal produto de interesse no processo. Para além do monitoramento da eficiência da fermentação, o acompanhamento da concentração de etanol permite identificar o final do processo, sinalizado pela estabilização do parâmetro, que pode ser causado pelo esgotamento de ART ou pelo alcance da concentração inibitória de etanol, na qual se interrompe o crescimento celular (C_{Et}^*) e, por consequência, a biossíntese do etanol. Caso as leveduras sejam inibidas antes do esgotamento do ART, deve-se atentar à possível mutação da cepa de *S. cerevisiae* utilizada para uma com menor tolerância ao etanol: segundo Paulillo (2015), espera-se um número de $1,2 \cdot 10^{11}$ de mutantes espontâneos por ciclo durante a fermentação realizada em um tanque de mil metros cúbicos.

A aferição da concentração de etanol ao longo do processo permite o acompanhamento da velocidade de reação. A duração para além do esperado da fermentação pode ser um indicativo de contaminação, de redução na viabilidade da levedura ou da quantidade insuficiente de pé-de-cuba (inóculo) utilizada no início do processo (RIBEIRO, BLUMER, HORII, 1999). De acordo com Cruz (2019), o tempo médio de duração de um processo fermentativo varia de 6 a 11 horas. Além disso, o consumo do substrato não acompanhado pela produção de etanol pode indicar que as leveduras não estão realizando fermentação ou que há contaminação do caldo.

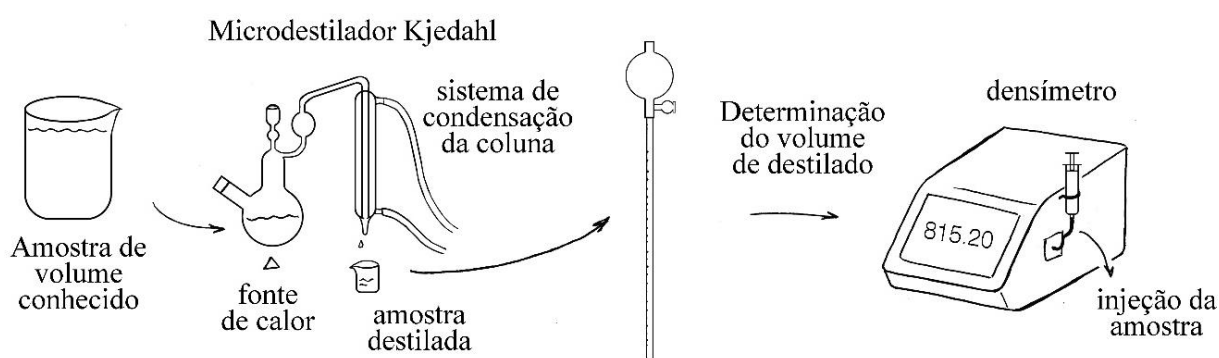
4.4.1. Determinação por densidade

O processo para determinação do teor alcoólico do caldo por densidade consiste na separação do etanol e da água do restante dos componentes da amostra por destilação e da obtenção da concentração do destilado por meio de uma tabela de densidade de soluções hidroalcoólicas em função de sua composição. A partir do volume de amostra de caldo e do volume obtido de destilado calcula-se o teor alcoólico do caldo.

Ainda que possam existir outros componentes voláteis no destilado, como o metanol, considera-se sua concentração baixa o suficiente para ser desprezada. O método tem como vantagem a rapidez da realização da análise e a precisão do resultado

O procedimento descrito por Amorim, Zago e Gutierrez (1979), ilustrado na Figura 20, emprega um microdestilador Kjedadhl acoplado a um condensador para produzir a solução hidroalcolica e um densímetro Paar DMA-45 com temperatura de banho controlada à 20°C. A temperatura do banho deve ser controlada na mesma temperatura utilizada pela tabela de conversão devido à relação entre densidade e temperatura (SKOOG *et al.*, 2006).

Figura 20: Fluxograma do procedimento de análise de teor alcoólico por densidade.



Fonte: Acervo Pessoal

Uma amostra de 25 mL de caldo é coletada com uma pipeta, transferida para o microdestilador e o destilado é coletado em um balão volumétrico de 50 mL. O volume do balão é completado com água destilada e agitado para remover as bolhas de ar da solução, que podem interferir na medida do densímetro. Uma amostra da solução de destilado diluída é injetada no densímetro para obter-se a densidade da solução hidroalcolica.

Para determinar a concentração do destilado consulta-se a tabela de conversão, que contém a densidade e o respectivo o grau alcoólico em termos mássico e volumétrico para cada valor de temperatura. Conhecendo a temperatura controlada do densímetro e o valor de densidade obtido pelo aparelho obtém-se o teor do destilado diluído.

Conhecendo-se o volume total do destilado ($V_{\text{destilado}}$) é possível determinar o volume total de etanol na amostra ($V_{\text{Etanol amostra}}$), conforme equação 12.

$$V_{\text{Etanol amostra}} = V_{\text{destilado}} * \text{grau alcoólico } \%V/V \quad (12)$$

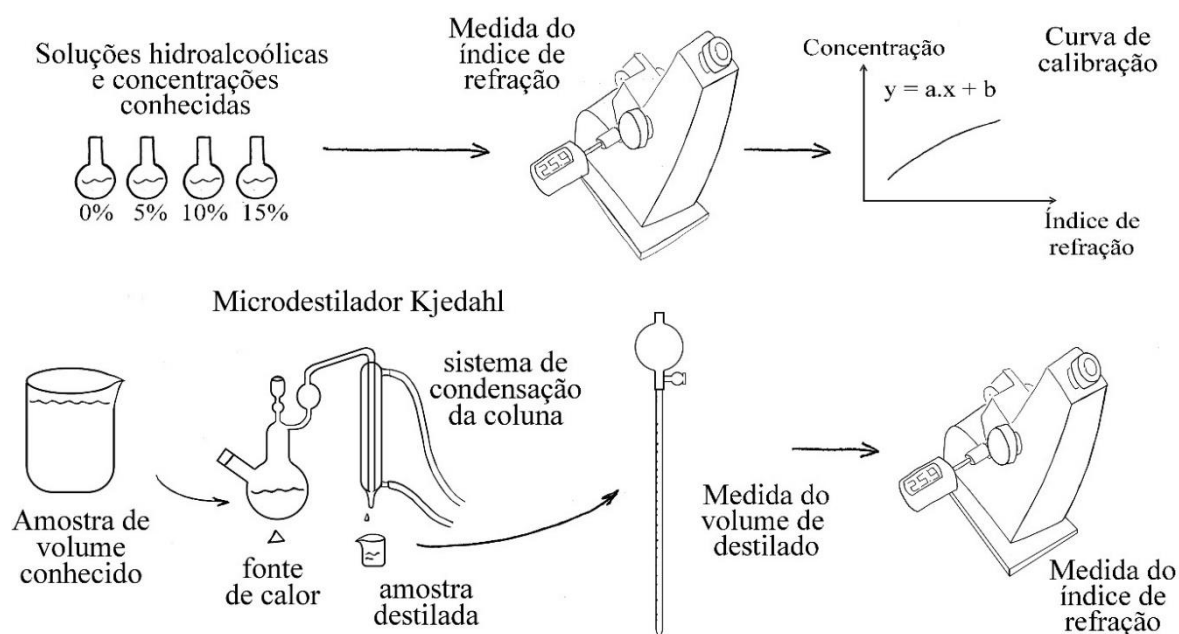
Dividindo o volume de etanol pelo volume total da amostra (V_{amostra}) antes da destilação obtém-se o teor de etanol em °GL (% v/v), equação 13.

$$\text{Teor Etanol}(\% \text{ v/v}) = \frac{V_{\text{Etanol amostra}}}{V_{\text{amostra}}} \quad (13)$$

4.4.2. Determinação por refratometria

A determinação do teor alcoólico por refratometria é realizada de forma similar à determinação por densidade, contemplada na seção anterior. A água e o etanol são separados do restante dos componentes da amostra por destilação e, então, determina-se o índice de refração da solução hidroalcoólica obtida. A concentração da solução pode ser determinada com o auxílio de uma curva de calibração produzida a partir de soluções hidroalcoólicas padrão e suas respectivas medidas de refração. Por fim, conhecidos o volume da amostra original e da solução hidroalcoólica obtida, é possível determinar a concentração de etanol da amostra de caldo. As etapas do procedimento experimental são representadas na Figura 21.

Figura 21: Fluxograma do processo de análise de teor alcoólico por refratometria.



Fonte: Acervo Pessoal

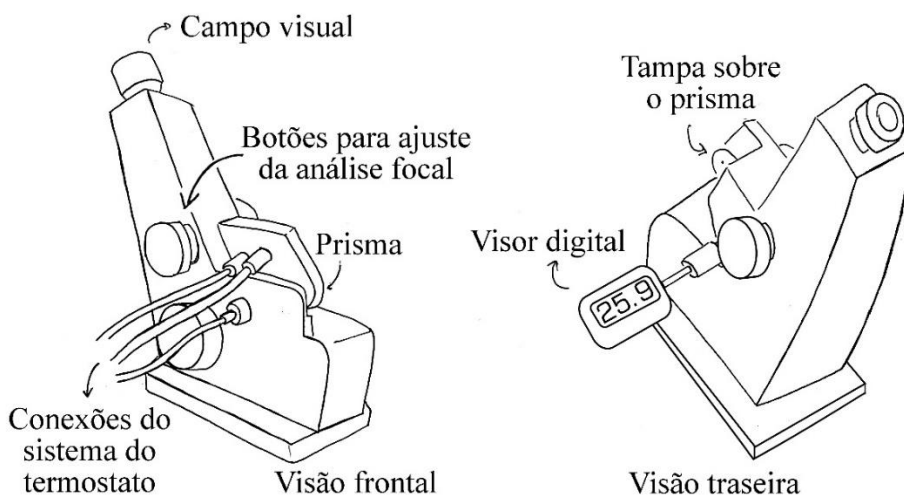
O procedimento experimental é iniciado com a construção da curva de calibração a partir da medida de refração de soluções padrão hidroalcoólicas de concentração conhecida.

Dado que a concentração de outros componentes voláteis em solução, como o metanol, é considerada baixa o suficiente para ser desprezada, as soluções são compostas apenas por água destilada e etanol. Para minimizar o erro deve-se buscar garantir que os pontos de maior e menor concentração de etanol da curva sejam, respectivamente, superior e inferior aos valores das amostras retiradas da dorna. Considerando que a inibição por produto faz com que a produção seja interrompida ao alcançar em torno de 10% de etanol, os valores de concentração de etanol para os pontos da curva podem ir, por exemplo, de 0% a 15%.

Pelo fato de o ângulo de refração variar em função da temperatura, a análise deve ser realizada em um equipamento que controle a temperatura da amostra, como o refratômetro de bancada Abbe, ou deve-se garantir que a amostra se encontre na mesma temperatura que as soluções utilizadas para a construção da curva de calibração (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Pode-se garantir uma temperatura padronizada das soluções mantendo-as em uma geladeira.

A análise no refratômetro Abbe é iniciada com a disposição do destilado no prisma com uma pipeta. Dependendo do tipo de refratômetro, a leitura do índice de refração pode ser feita por um visor digital, como o representado na Figura 22, ou analogicamente através de uma escala presente no campo visual. A partir do valor obtido calcula-se a concentração de etanol usando a curva de calibração.

Figura 22: Refratômetro Abbe com visor digital.



Fonte: Acervo Pessoal

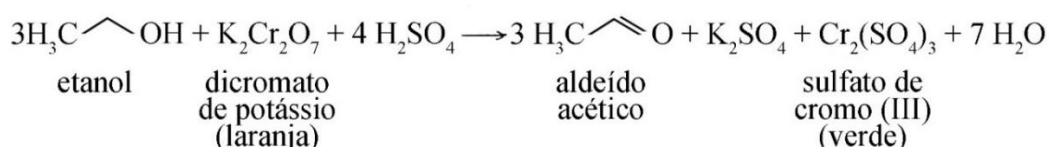
Uma vez que a análise é realizada para a fração destilada da amostra, a correção é realizada utilizando o volume total da amostra (V_{amostra}) e o volume de destilado ($V_{\text{destilado}}$), retratada na equação 14, sendo $C_{\text{destilado}}$ o valor de concentração obtido para o destilado e C_{Etanol} a concentração de etanol na amostra.

$$C_{\text{Etanol}}\left(\frac{\%V}{V}\right) = \frac{C_{\text{destilado}} * V_{\text{destilado}}}{V_{\text{amostra}}} \quad (14)$$

4.4.3. Método da oxidação por dicromato de potássio

O método é baseado na oxidação do etanol pelo dicromato de potássio, um forte agente oxidante de cor alaranjada. A redução do dicromato em meio ácido, representada na Figura 23, produz sulfato de cromo (III), que possui coloração verde. A análise da concentração baseada mudança de cor do reagente pode ser realizada empregando um espectrofotômetro ajustado para comprimento de onda de 590 nm (SANTOS JÚNIOR, 2012).

Figura 23: Reação de oxidação do etanol por dicromato de potássio em meio ácido.



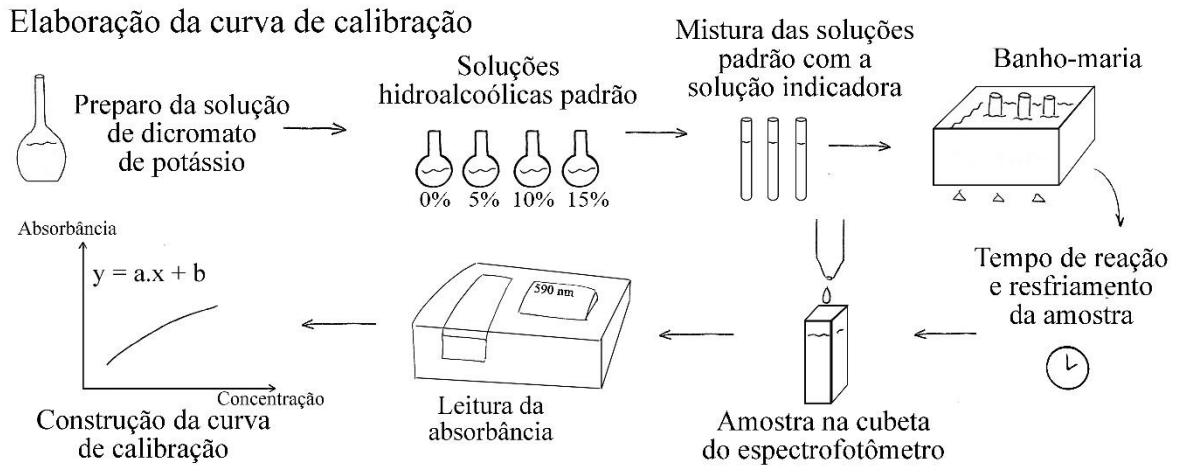
Fonte: Acervo Pessoal

Para a análise da amostra de mosto deve-se realizar a separação do etanol dos demais compostos (PACHECO, 2010). Ainda que existam outros componentes voláteis em solução, como o metanol, sua concentração é considerada baixa o suficiente para ser desprezada.

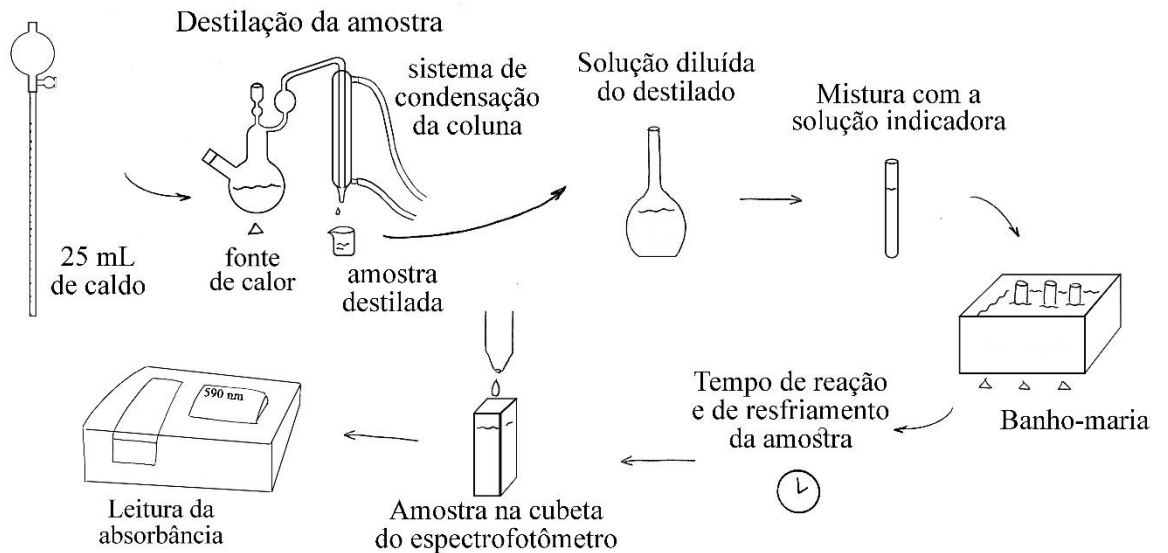
A solução indicadora de dicromato de potássio descrita por Santos Junior (2012) tem concentração de 0,20 M de dicromato e é preparada a partir da diluição de 5,88 g do sólido em 22,0 mL de solução de ácido sulfúrico 4,0 M, com o volume completado com água destilada para totalizar 100 mL.

O procedimento retratado por Pacheco (2010), representado na Figura 24, consiste na mistura de 5 mL de solução com 2 mL de água destilada e 2 mL do reagente em um tubo de ensaio, que deve ser submetido a banho-maria a 60°C por 30 minutos e depois resfriado a temperatura ambiente. Por fim, a amostra é inserida em uma cubeta limpa e livre de ranhuras (pelo risco de interferir na medida) e a absorvância da amostra é mensurada.

Figura 24: Etapas do procedimento de determinação de teor alcoólico empregando dicromato de potássio.



Determinação da absorbância da amostra



Fonte: Acervo Pessoal

Para a construção da curva de calibração devem ser preparadas soluções hidroalcoólicas de composição conhecida. Um volume conhecido de cada solução e de água destilada pura para servir de referência (“branco”) deve ser inserido em um tubo de ensaio, e misturado com o mesmo volume da solução indicadora. A curva de calibração é obtida a partir da regressão linear dos valores de absorbância em função dos valores de concentração de etanol, que deverão ser corrigidos para estar de acordo com as diluições realizadas.

Para a análise do caldo, deve-se inicialmente destilar a amostra para separar o etanol diluído em água dos demais componentes do meio. Para a destilação, mistura-se 25 mL de caldo com 50 mL de água destilada. Os primeiros 50 mL de destilado, majoritariamente

composto de etanol e água, são diluídos em um balão volumétrico 25 vezes. Após homogeneização, o processo de mistura com a solução de dicromato é realizado e a absorvância do destilado diluído é determinada.

A partir da absorvância pode-se determinar a concentração de etanol no destilado usando a curva de calibração. Com o volume de destilado e o volume da amostra inicial é possível calcular o teor de etanol na amostra conforme equação 15.

$$\text{Teor Etanol}(\% V/V) = \frac{C_{\text{Etanol destilado}} * V_{\text{destilado}}}{V_{\text{amostra}}} \quad (15)$$

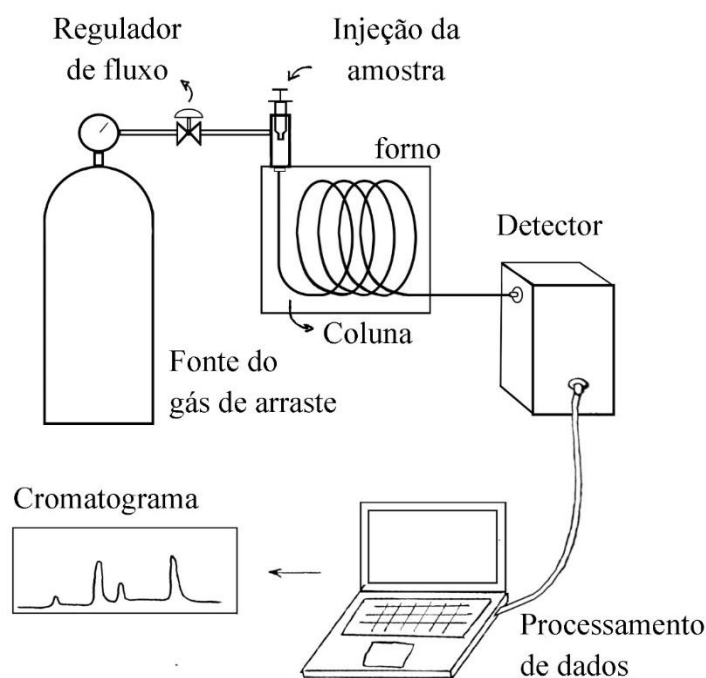
Apesar da análise ser simples e rápida de ser realizada, tem-se como pontos negativos o fato de o dicromato de potássio ser uma substância cancerígena e prejudicial ao meio ambiente. A periculosidade do processo pode ser contornada através do uso de equipamentos que realizam os testes automaticamente e em tubos fechados, reduzindo o risco e volume de efluente utilizado.

Além disso, Amorim, Zago e Gutierrez (1979) mencionam a possível influência de outros compostos orgânicos presentes na amostra que podem ser oxidados também, gerando valores de concentração de etanol superiores ao real. No entanto, pode-se considerar a concentração de tais compostos pequena o suficiente para ser desprezada.

4.4.4. Cromatografia gasosa

O teor alcoólico da amostra pode ser mensurado por cromatografia líquida (conforme descrito na seção 4.3.4) e por cromatografia gasosa, dado que é um composto volátil. A cromatografia gasosa (ilustrada na Figura 25) segue os mesmos princípios da cromatografia líquida, sendo baseada na separação dos componentes da amostra através da interação de cada um com as fases estacionária (líquida ou sólida) e móvel (gasosa).

Figura 25: Fluxograma do sistema de análise de cromatografia gasosa.



Fonte: Acervo Pessoal

A cromatografia gás-líquido, mais comumente empregada, tem a fase líquida imobilizada sobre superfície de um sólido. Já a fase móvel, denominada gás de arraste, emprega um gás inerte, usualmente hélio, argônio, nitrogênio ou oxigênio. As colunas utilizadas em análises de cromatografia gasosa são usualmente longas (podendo chegar a 50 m) e são enroladas em bobinas, que são mantidas em fornos termostáticos para o controle de temperatura preciso que o método requisita (SKOOG *et al.*, 2006).

A seleção do detector é relacionada às características dos componentes da amostra, deve possuir a sensibilidade de acordo com a análise e boa estabilidade em diferentes concentrações, vazões e temperaturas. De acordo com Skoog *et al.* (2006), o detector de ionização de chama (DIC) é o detector mais comumente aplicado em análises de cromatografia gasosa, aplicável para hidrocarbonetos. Seu princípio de funcionamento é baseado na produção de íons e elétrons a partir da pirólise da maior parte dos compostos orgânicos à temperatura de uma chama de ar/hidrogênio. A detecção dos componentes é feita através da aplicação de um potencial elétrico na chama e a medida da corrente produzida, relacionando o número de íons gerado na pirólise com o número de átomos de carbono reduzidos presentes na chama ao longo do tempo. Outros detectores utilizados em análises de cromatografia gasosa são o de condutividade térmica (um detector universal), de captura

de elétrons (aplicado para compostos halogenados) e de espectrômetro de massas (que pode ser ajustado para diferentes compostos).

Além da identificação de compostos, a cromatografia gasosa, assim como a cromatografia líquida, pode ser utilizada para determinar a concentração de cada composto através da relação entre a área sob o pico e as curvas de calibração dos padrões. A cromatografia gasosa usualmente conta com o uso de padrões externos, que consistem em soluções padrão de composição similar à da amostra utilizados para construir as curvas de calibração, e um padrão interno, que é adicionado aos padrões externos e à amostra para minimizar as incertezas entre as medidas via comparação dos perfis. Deve-se atentar para que o padrão interno utilizado não esteja presente na amostra e que seu pico seja ao mesmo tempo distinto, mas próximo dos demais componentes (SKOOG *et al.*, 2006).

Após a construção das curvas de calibração, o procedimento é repetido para a amostra misturada ao padrão interno. Para a análise da amostra deve-se separar o etanol dos outros componentes, como as células, que poderiam interferir na medida e prejudicar o equipamento. Pode-se separar a amostra via centrifugação ou conforme descrito por Batistote *et al.* (2010), que aplicou um ultrafiltro de 0,22 μm . Após a injeção da amostra no equipamento, o cromatograma é analisado e, utilizando as retas de calibração determina-se o teor de etanol da fração separada da amostra, seguido pela correção das diluições partindo-se do volume inicial da amostra.

O procedimento aplicado para a análise de etanol em caldos de fermentação alcoólica, descrito por Batistote *et al.* (2010), utiliza o cromatógrafo a gás CG 3900 com detector de ionização em chama (Varian) e uma coluna capilar de sílica de 30 m de comprimento (ZB-5). 1 μL da amostra é passada pelo ultrafiltro e então injetada na coluna. Um divisor de amostra é utilizado com razão de split 1:20, cuja função é de enviar apenas uma amostra de volume reduzido e adequado para a análise (SKOOG *et al.*, 2006). Como retratado na Figura 25, a amostra é injetada na coluna com o fluxo do gás de arraste aberto. Conforme a amostra vaporizada passa pela coluna as diferentes moléculas interagem de maneira distinta com o recheio da coluna (fase sólida), saindo e sendo identificadas separadamente pelo detector. As temperaturas do injetor e do detector são mantidas a 240°C e a do forno é ajustada inicialmente a 90°C, sendo aumentada conforme o andamento da análise para vaporizar os compostos menos voláteis.

A principal vantagem da aplicação da cromatografia gasosa é a grande especificidade, separando o etanol dos demais compostos voláteis contidos na amostra que usualmente interferem em outros tipos de análise, determinando a presença e concentração

de mais de um componente por vez. Além disso, pode-se mencionar a velocidade de análise, sua simplicidade, custo relativamente baixo e alta aplicabilidade (SKOOG *et al.*, 2006).

4.4.5. Determinação da concentração de outros álcoois

Durante a fermentação são formados outros produtos além do etanol, devido à forma de condução do processo e suas condições, à matéria prima utilizada, à linhagem de levedura, entre outros. Dentre os compostos mais frequentes pode-se citar o metanol, os álcoois com três ou mais carbonos, denominados superiores (mistura majoritariamente composta pelos álcoois propílico, butílico e pentílico), aldeídos e ésteres, sendo o teor de cada componente dependente das condições do processo (LOPES, BORGES 2011).

A produção destes compostos usualmente se traduz em perdas do processo, uma vez que são produzidos ao invés do etanol. Entretanto, como mencionado na seção 2.1.1, a combinação de álcoois superiores, denominada óleo fúsel, pode ser vendida como um subproduto, ainda que apresente menor valor agregado. Para aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica ou de cosméticos o conhecimento do teor de cada componente é importante por razões de segurança, uma vez que os produtos poderão ser ingeridos ou serem colocados em contato com a pele.

Para determinar as substâncias voláteis presentes e suas respectivas concentrações pode-se aplicar a cromatografia gasosa, realizando a análise simultaneamente para o etanol.

De acordo com Lopes e Borges (2011), a reação de Barbet, ou reação do permanganato, pode ser utilizada para identificar substâncias redutoras, como o acetaldeído e o metanol, sendo amplamente aplicada para álcool refinado, usando em fármacos e perfumes. O teste qualitativo se dá pela mudança de cor do permanganato de potássio, um agente oxidante de coloração violeta, que reduzido adquire tonalidade alaranjada salmão. A análise é realizada a partir do tempo necessário para que ocorra mudança de cor do permanganato, pois quanto maior a concentração de substâncias redutoras, mais rápida é a reação. Segundo Lopes e Borges (2011), o teste de um etanol neutro, com baixo teor de compostos como aldeídos e metanol, deve levar mais de 30 minutos para ocorrer completamente.

4.5. Eficiência

A eficiência da fermentação (η_{Et}) é o índice que determina o quão próximo o processo está do aproveitamento máximo teórico do substrato, onde todo o ART seria catabolizado via fermentação, produzindo etanol e gás carbônico.

De acordo com Pacheco (2010), em condições ideais de fermentação por volta de 5% da glicose consumida é destinada à reprodução celular e às reações secundárias, cujos principais produtos são o glicerol, ácidos orgânicos e os álcoois superiores, sendo os outros 95% utilizados para a fermentação produzindo etanol. Todavia, para um processo fermentativo industrial de cana-de-açúcar pela *Saccharomyces cerevisiae* busca-se uma eficiência de 90%. A razão da redução da eficiência esperada é, além da produção de células e outros subprodutos, a presença de gomas e fibras no meio e a presença de bactérias e leveduras contaminantes, que competem pelo substrato disponível. A presença de ácidos láctico e acético é usualmente um indicativo de contaminação bacteriana.

O acompanhamento do valor da eficiência é de extrema importância e calculado diariamente na indústria, pois valores baixos de η_{Et} podem indicar contaminação ou aumento da produção dos compostos secundários pela *S. cerevisiae*, causados por alterações no meio ou mutações da cepa original (BASTOS, 2015).

A determinação da eficiência, representada na equação 16, é dada pela relação entre os rendimentos real e estimado, a partir dos coeficientes (RIBEIRO, BLUMER, HORII, 1999).

$$\eta_{Et} = \frac{\left(Y_{Et/ART}\right)_{Real}}{\left(Y_{Et/ART}\right)_{Estimado}} * 100\% \quad (16)$$

O cálculo do $\left(Y_{Et/ART}\right)_{Estimado}$, conforme ilustrado na equação 8, é dado pelo balanço da reação de fermentação, gerando 0,511 quilogramas de etanol por quilograma de glicose.

O valor do coeficiente $\left(Y_{Et/ART}\right)_{Real}$ é determinado experimentalmente partindo dos dados de teor de etanol e concentração de ART, dividindo-se a massa produzida de etanol pela massa consumida de ART. A massa de etanol produzida pode ser calculada através da multiplicação do volume de mosto pela concentração de etanol no tanque, obtida através dos métodos descritos na seção 4.4. A massa de substrato consumida pode ser determinada por um balanço de massa (equação 17).

$$Entra - Sai = Acumula \pm Reage \quad (17)$$

O valor de saída de ART é nulo, pois o processo é realizado em batelada alimentada. O termo de reação retrata a massa de ART que é consumida durante a fermentação, apresentando sinal negativo pelo fato de sua quantidade diminuir ao longo do processo.

Reorganizado a equação do balanço para evidenciar a massa de ART consumida, tem-se a equação 18.

$$ART_{\text{Consumido}} = \text{Acumula} - \text{Entra} \quad (18)$$

O valor equivalente à entrada é a massa de ART adicionada com as leveduras no início da fermentação somada com o ART adicionado através da alimentação até o momento do cálculo. O acúmulo equivale ao volume de mosto multiplicado pela concentração de ART no tanque, calculada de acordo com os procedimentos da seção 4.3. Portanto, tem-se a equação 19.

$$ART_{\text{Consumido}} = \text{Concentração}_{\text{ART}} * \text{Volume}_{\text{caldo}} - \sum \text{Massa}_{(\text{Inicial}+\text{Alimentada})} \quad (19)$$

Desta forma, a equação 19 da eficiência pode ser calculada conforme a equação 20.

$$\eta_{\text{Et}} = \frac{\text{massa etanol produzido/massa de ART consumido}}{0,511} * 100\% \quad (20)$$

5. PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS

Os parâmetros microbiológicos abrangem as variáveis relacionadas ao metabolismo e à concentração de células da *Saccharomyces cerevisiae* e as variáveis relacionadas aos microrganismos contaminantes que podem afetar o processo produtivo por competirem com a *S. cerevisiae* pelo substrato disponível. A grande prevalência de contaminação durante a fermentação alcoólica da cana-de-açúcar pode ser explicada pela disposição de glicose e outros nutrientes, como sais minerais, além de pH e temperatura favoráveis (VELOSO, 2019).

De acordo com Guidini (2013), a contaminação por bactérias e leveduras selvagens se dá do cultivo da cana até o processo fermentativo em si, podendo ser oriundas da cana-de-açúcar, do depósito onde ela é armazenada, da água utilizada no processo ou do ambiente produtivo. A presença de pontos mortos nos equipamentos e sua limpeza insuficiente, o reciclo sem o devido tratamento do creme de levedura, fermentação realizada em dornas abertas e a falta de controle microbiológico podem perpetuar a contaminação ao longo de diferentes bateladas.

Para além do consumo de parte do substrato, a contaminação microbiológica pode ter como consequência a floculação do fermento, maior duração do processo, a formação de compostos que inibam a fermentação e a morte de parte das leveduras e o consumo do etanol produzido (ROSA, 2008).

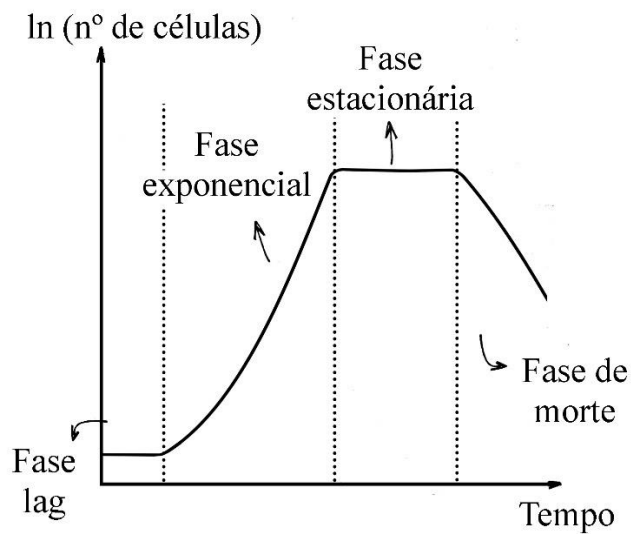
5.1. Concentração de células de *Saccharomyces cerevisiae*

Pelo fato da *Saccharomyces cerevisiae* ser a responsável pela produção do etanol, é essencial que seja acompanhado o teor de células ao longo do processo, juntamente com as variáveis pertinentes a ela para garantir o andamento adequado do processo. O monitoramento do teor de células junto com outros parâmetros que afetam diretamente o desempenho da fermentação, como pH, temperatura e teor alcoólico, permite avaliar o comportamento da levedura sob diferentes condições e determinar as cepas mais favoráveis para um processo de maior rendimento.

O monitoramento da concentração de células viáveis ao longo do processo indica em qual fase do crescimento celular as leveduras se encontram, sendo elas a fase *lag*, fase exponencial, fase estacionária e fase de morte (BASTOS, 2015), representadas na Figura 26. A fase *lag* corresponde a fase após a adição do pé-de-cuba ao tanque, na qual as leveduras se adaptam ao meio, quando praticamente não há crescimento celular. Durante a fase exponencial a levedura passa a fermentar o substrato disponível no meio, atingindo o valor

máximo da velocidade específica de crescimento celular. A fase estacionária é caracterizada pelo equilíbrio entre morte e crescimento celular, com o número de células viáveis praticamente constante. A queda na concentração celular sinaliza a fase de morte, onde a morte celular causada pelo esgotamento de substrato e inibição pela maior concentração de etanol supera a velocidade de crescimento.

Figura 26: Representação de gráfico do número de células viáveis no tanque ao longo do tempo de acordo com Bastos (2015).

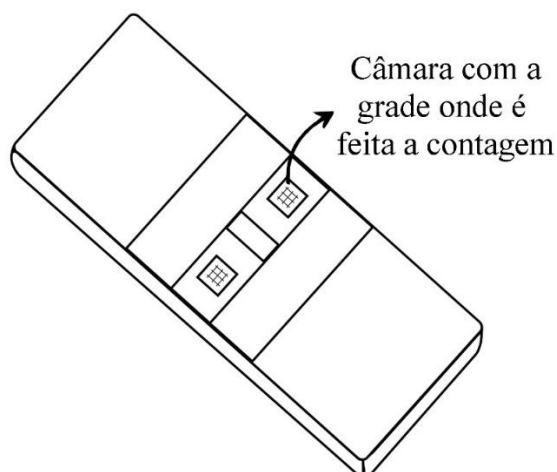


Fonte: Acervo Pessoal

5.1.1. Contagem celular em Câmara de Neubauer

A câmara de Neubauer, também conhecida como hemacitômetro, é um dispositivo usado para a determinação de concentração celular a partir da contagem de células (VIEIRA, FERNANDES, 2012). Representada na Figura 27, a câmara possui uma depressão quadrada com uma grade de contagem, onde é colocada a amostra e uma lamínula por cima. A contagem é realizada através do exame da câmara por um microscópio.

Figura 27: Câmara de Neubauer.

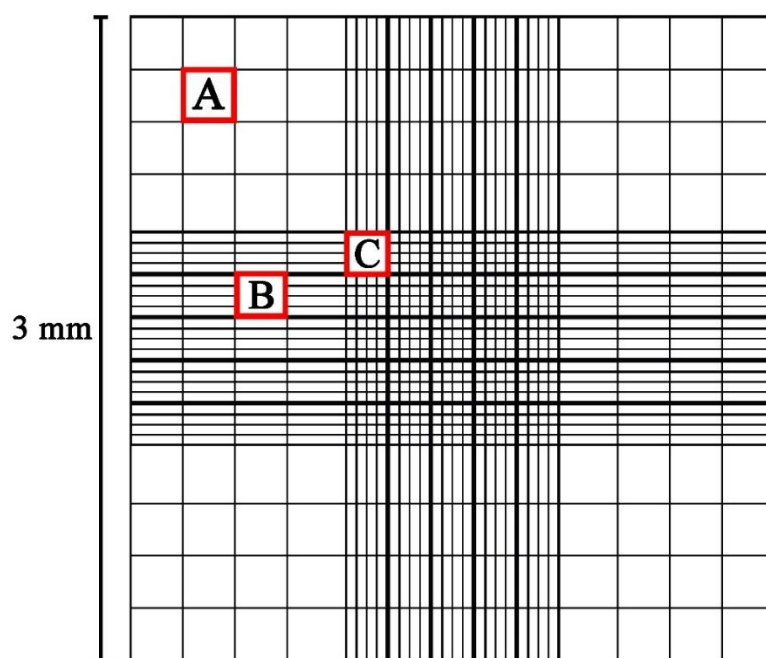


Fonte: Acervo Pessoal

O cálculo do teor de células é realizado a partir do número de células contabilizadas em determinados quadrantes da grade dividido pelo volume de amostra contido nos quadrantes, que por sua vez é calculado a partir da multiplicação da área dos quadrantes pela profundidade da depressão que contém a amostra. A concentração de células é obtida em número de células por mL de amostra (células/mL).

A grade de contagem é um quadrado 3 mm de lado e 0,10 mm de profundidade, dividida em nove quadrados de 1 mm (ilustrada na Figura 28). Os quadrantes nas quinas (indicado pela letra A) são quadrados com 0,25 mm de lado, os das laterais são retângulos de 0,25 mm por 0,20 mm (letra B) e o quadrado central é dividido em 25 quadrantes de 0,20 mm de lado (representado pela letra C), cada um por sua vez dividido em 16 retículos (VIEIRA, FERNANDES, 2012).

Figura 28: Representação da grade da Câmara de Neubauer, onde A é um quadrante com 0,25 mm de lado, B um quadrante retangular de 0,25 por 0,20 mm e C um quadrante com 0,20 mm de lado.



Fonte: Acervo Pessoal

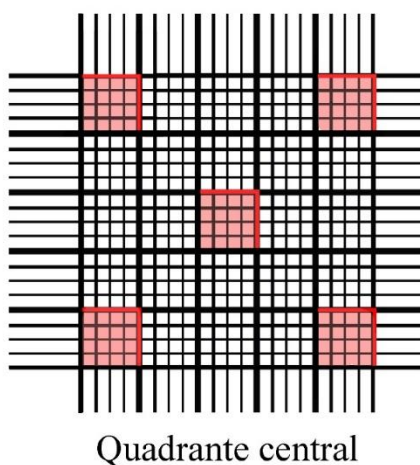
A contagem das células é realizada em alguns quadrantes, cujo tamanho depende do tamanho das células, sendo as maiores contabilizadas nos quadrantes A. As células de levedura, pelo tamanho pequeno, são contabilizadas nos quadrantes menores (C).

Como no meio estão contidas tanto células vivas quanto mortas, é importante diferenciá-las para contabilizar apenas as que ainda participam da fermentação, denominadas células viáveis. Dentre os métodos existentes, os baseados na coloração diferencial das células são amplamente utilizados, como o do azul de metileno, descrito na seção 5.2.1 (ANTONINI, 2012). Outro ponto a ser considerado durante a contagem é a formação de conglomerados de células, que dificultam a contagem. Como forma de reduzir os grumos, Antonini (2012) adiciona papaína à amostra, seguida de repouso por 5 minutos antes da realização da análise.

De acordo com Antonini (2012), recomenda-se que existam entre 300 e 500 células na câmara e pelo menos 60 células no quadrante para maior precisão na contagem. Caso seja necessário, deve-se diluir a amostra, atentando-se para a correção posterior da concentração, incluindo diluições devido à adição do corante. A amostra preparada é adicionada à câmara e coberta com a lamínula. Deve-se atentar para a presença de bolhas, que alterariam o volume total em cada quadrante.

A câmara é colocada em um microscópio, onde é feita a contagem do número de células em alguns quadrantes. Antonini (2012) sugere a contagem de 5 quadrantes na segunda coluna e 5 na quarta coluna, dos quatro retículos centrais de cada quadrante ou dos quatro quadrantes dos cantos e o central (representado na Figura 29), totalizando 100 retículos contabilizados. No caso das células em cima dos limites do quadrante, devem ser duas extremidades que serão contabilizadas como parte do quadrante e duas que não serão para evitar que uma célula seja contabilizada duas vezes (por exemplo, são contadas as células sobre as linhas superior e direita e desprezadas as sobre as linhas inferior e esquerda).

Figura 29: Quadrantes centrais da câmara de Neubauer que serão contabilizados para análise do número de células na amostra diluída de caldo fermentado.



Fonte: Acervo Pessoal

A partir do número de células, pode-se calcular a concentração da amostra através da determinação do volume nos quadrantes contabilizados. Sabendo que a área do quadrante C é $0,04 \text{ mm}^2$ e a profundidade $0,1 \text{ mm}$, tem-se que o volume de amostra contido em um quadrado de lado $0,20 \text{ mm}$ é $0,004 \text{ mm}^3$. Dividindo o número de células contabilizadas pelo volume e corrigindo as diluições obtém-se o valor de concentração em n° de células/ mm^3 .

O método de contagem tem como grandes vantagens a possibilidade de diferenciação de células viáveis e não viáveis através da aplicação do corante azul de metileno, o baixo custo, a praticidade e rapidez do método. Em contrapartida, por requerer contagem humana, o valor final está sujeito a erros.

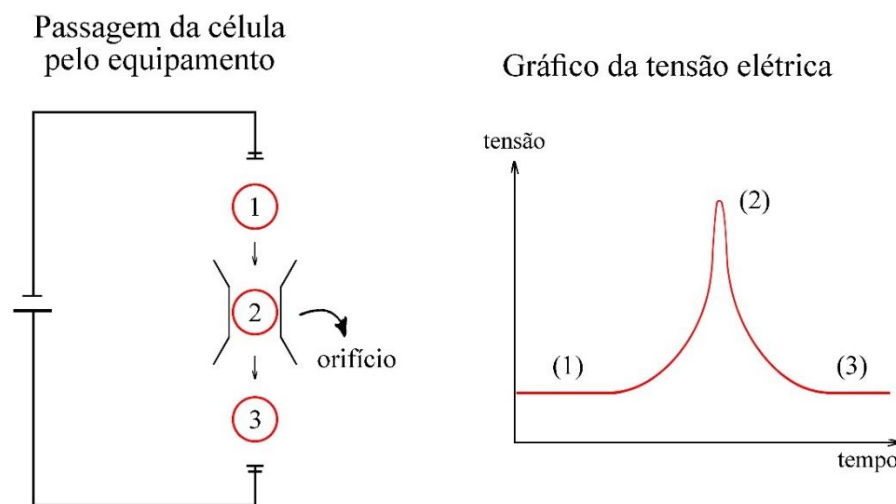
5.1.2. Contador de células automatizado

A contagem automática de células parte do princípio de Coulter, um método usado para contar e dimensionar partículas baseado na variação da impedância elétrica gerada pela presença de partículas não condutoras suspensas em uma solução eletrolítica (RHYNER *et al.*, s.d.).

O equipamento é composto por duas câmaras repletas de uma solução eletrolítica, conectadas por um pequeno orifício. Através de dois eletrodos, um em cada câmara, é gerada uma corrente elétrica. Devido à propriedade não-condutiva da membrana plasmática lipídica, a passagem da célula pelo orifício cria uma resistência à passagem da corrente, gerando um pico de tensão.

A passagem de uma célula pelo equipamento é ilustrada na Figura 30 juntamente com o gráfico da tensão ao longo da passagem, onde a posição 2 representa o pico causado pela passagem da célula. Através da contagem dos picos de tensão detectados determina-se a quantidade de células, que dividida pelo volume injetado no equipamento corresponde ao número de células por mL.

Figura 30: Representação da passagem da célula e gráfico correspondente da corrente ao longo do tempo.



Fonte: Acervo Pessoal

Para além da função de contagem, o equipamento pode ser utilizado para definir o tamanho das células. Como a velocidade de passagem da amostra é constante, o tamanho do pico de tensão gerado será proporcional ao volume da célula, pois quanto maior for a célula, maior será a resistência gerada à passagem de corrente. A partir da calibração do

equipamento tem-se o volume da célula equivalente ao pico de tensão gerado. Segundo Rhyner *et al.* (s.d.), a análise da distribuição de tamanho pode ser utilizada para avaliar diversos parâmetros, como a morte celular, que pode acontecer por necrose (onde as células aumentam de tamanho até que a membrana se rompe) e por apoptose (onde a célula diminui de tamanho).

A contagem automatizada tem como pontos positivos a alta velocidade de contagem, o baixo volume de amostra necessário e a capacidade de determinar o tamanho das células contidas na amostra. Além disso, por ser automática, a contagem não está sujeita ao erro humano, como é o caso da contagem usando a câmara de Neubauer. Em contrapartida pode-se citar o alto custo do equipamento e o risco de erro por não diferenciar as células viáveis das não-viáveis, além de pedaços de levedura ou outros organismos contaminantes de tamanho similar. Pelo fato da contagem ser realizada em função do tamanho e da não-condutividade da molécula, o uso de coloração diferencial para detectar células viáveis não funcionaria para o equipamento.

5.1.3. Método da massa seca

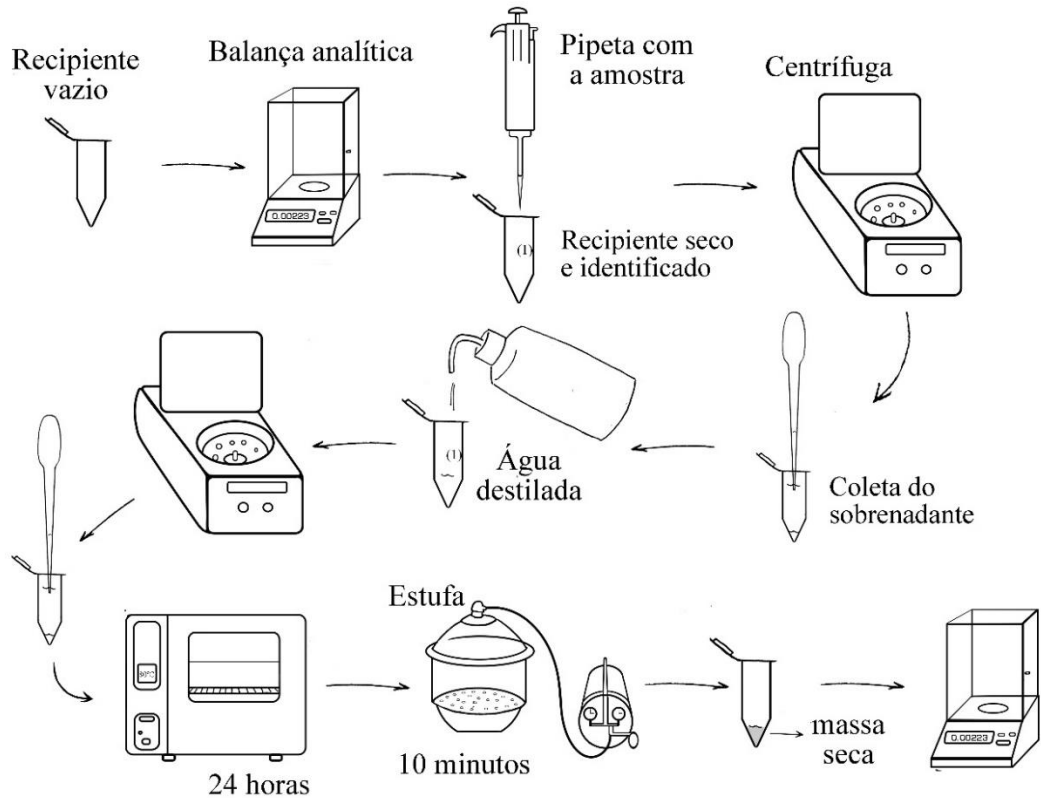
A determinação da massa seca, também conhecida como método gravimétrico, consiste na secagem de um volume de amostra seguido de sua pesagem. A massa remanescente após a secagem dividida pelo volume inicial de amostra equivale à concentração de células. A massa das células é determinada na ausência de água devido à dificuldade da determinação de água dentro das células e em sua superfície, que produzem um resultado menos preciso (CARVALHAL, 2008).

A determinação da massa de células é feita a partir da massa final do recipiente contendo as células menos a massa do recipiente vazio, que deve ser determinada antes do início do procedimento com uma balança de precisão analítica. Os recipientes devem ser identificados e pesados e então cada um deverá receber uma alíquota de amostra. O volume inicial de amostra deve ser determinado de modo que a massa final de células seja superior à casa decimal do algarismo de incerteza da balança analítica para a minimizar o erro da medida.

O procedimento descrito por Sonego (2016), representado na Figura 31, parte da centrifugação da amostra de caldo a 10.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante deve ser removido e o corpo de fundo é lavado duas vezes a partir da adição de água destilada à amostra e a repetição do processo de centrifugação. Em seguida, as amostras são dispostas por 24h em uma estufa a 80°C para secar. De acordo com Carvalhal (2008), devido ao caráter

higroscópico das células, os recipientes das amostras devem ser colocados em um dessecador antes da pesagem.

Figura 31: Procedimento de determinação de teor de células a partir de um volume conhecido de amostra através do método gravimétrico.



Fonte: Acervo Pessoal

Por fim, a massa de cada recipiente contendo a amostra seca é determinada na balança analítica. A massa final subtraída da massa do recipiente vazio é equivalente à massa contida dentro dele. Dividindo-se a massa pelo volume de amostra, conforme equação 16, pode-se calcular a concentração em base seca da amostra ($C_{X_{ms}}$), obtida como massa de células por volume de amostra (g/mL).

$$C_{X_{ms}} = \frac{\text{massa final} - \text{massa do recipiente}}{\text{Volume de amostra}} \quad (16)$$

O método gravimétrico tem como principal vantagem sua efetividade na determinação celular, além da separação do sobrenadante da amostra que pode ser aproveitado para outras

análises. Por outro lado, o tempo para o preparo da amostra de um dia é muito superior aos demais. Por estes motivos, usualmente utiliza-se o método da massa seca combinado com o método da densidade óptica, descrito em sequência, conforme aplicado por Veloso (2017). O método da massa seca é aplicado para a obtenção dos valores de concentração das soluções padrão usadas para a curva de calibração e então a concentração das amostras de caldo é determinada a partir de sua absorvância, de acordo com o método da densidade óptica.

5.1.4. Método da densidade óptica

A análise espectrofotométrica da densidade óptica (D.O.) é baseada na interação da luz com as partículas não dissolvidas em suspensão. O método consiste na aferição da absorvância da amostra e no cálculo da concentração em função do valor obtido através da lei de Beer. O método da densidade óptica tem como vantagem a maior rapidez na análise frente à determinação por massa seca, apesar de não ter a capacidade de diferenciar células viáveis e mortas e de ser um método *offline*.

Skoog *et al.* (2006) definem a transmitância (T) de uma solução como a fração da radiação que incide sobre ela e é transmitida, ou seja, a fração da energia luminosa que, ao encontrar uma partícula não dissolvida na solução, não é absorvida e trespassa a partícula. Seu valor é determinado a partir da diferença entre a potência radiante inicial do feixe (P) e a potência radiante após atravessar a partícula (P₀). A absorvância (A) da amostra, por sua vez, pode ser descrita como complementar ao valor da transmitância, pois corresponde à parte da potência radiante que é absorvida pela partícula, sendo determinada segundo a equação 17 como o logaritmo inverso da transmitância.

$$A = -\log T = \log \frac{P}{P_0} \quad (17)$$

A lei de Beer (equação 18), também conhecida como lei de Beer-Lambert ou lei de absorção, afirma que o valor da absorvância de uma amostra é função da concentração de partículas no meio (C), pois quanto mais partículas, maior será a proporção da potência radiante absorvida, e do comprimento percorrido pela luz (l), pois um caminho maior expõe a luz a uma quantidade proporcionalmente maior de partículas.

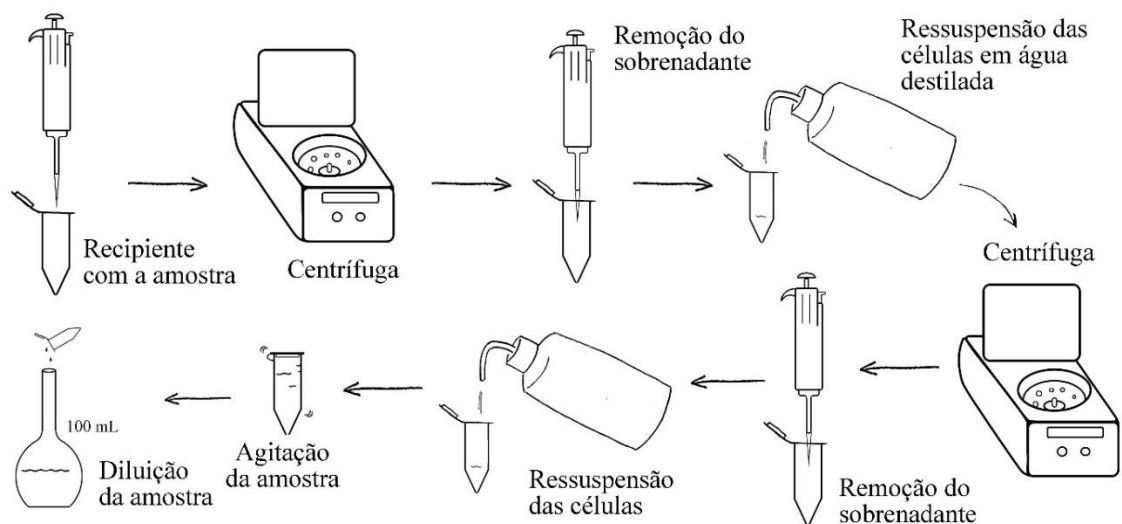
$$A = a * l * C \quad (18)$$

Onde a é a constante de proporcionalidade absorvidade.

A análise de densidade óptica aplicada para a determinação de concentração celular pode ser realizada com uma amostra sem tratamento (diretamente do fermentador) ou com uma amostra que passou por uma lavagem das células. O que difere a análise com a amostra não tratada da com células lavadas é que o processo de lavagem retira alguns componentes do meio e as bolhas de CO_2 presentes na amostra, que podem interferir na leitura da absorbância (VELOSO, 2017).

O processo de lavagem das células descrito por Veloso (2017) (Figura 32) consiste na inserção de uma alíquota de amostra de volume conhecido em um recipiente, que é submetido à centrifugação a 9000 rpm a 4°C por 10 minutos. O sobrenadante então é removido, as células ressuspensas em água destilada e o processo repetido. Finalizado o processo, a amostra estará pronta para ter as células ressuspensas e a amostra diluída para a realização da análise.

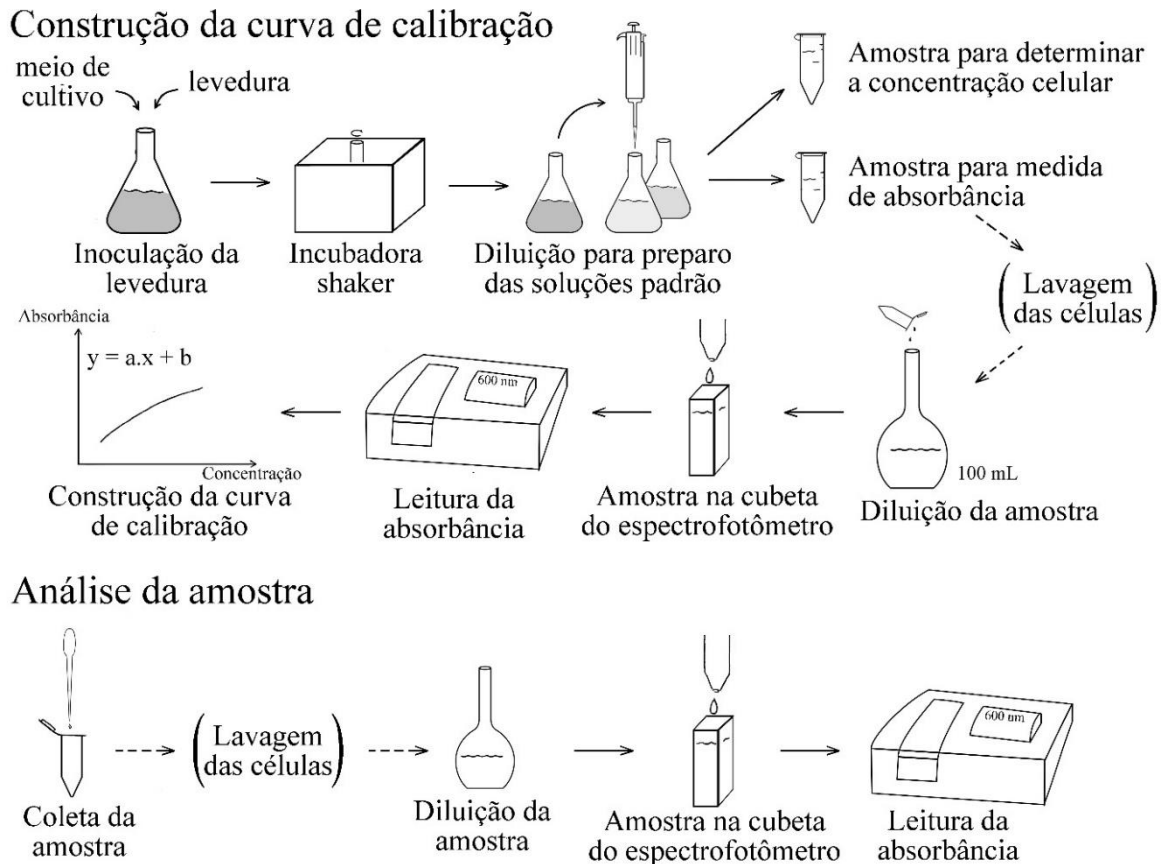
Figura 32: Processo de lavagem das células da amostra.



Fonte: Acervo Pessoal

O processo de análise retratado por Veloso (2017), ilustrado na Figura 33, consiste na elaboração de uma curva de calibração e na análise subsequente da amostra. A concentração das soluções utilizadas não deve apresentar valor de absorbância maior a 0,900 para respeitar as limitações da lei de Beer e, caso necessário, as amostras devem ser diluídas com água destilada.

Figura 33: Procedimento de determinação da concentração celular por densidade óptica.



Fonte: Acervo Pessoal

As amostras para a curva de calibração podem ser preparadas a partir da inoculação da levedura seca em 100 mL do meio de cultura, produzindo soluções de concentração entre 5 e 25 g/L, ou partindo de soluções sem a levedura liofilizada. A determinação da concentração celular das amostras pode ser determinada através do método de massa seca descrito na seção 5.1.3. Caso pretenda-se realizar a análise com células lavadas, as amostras deverão passar pelo processo de lavagem antes da medida de absorbância para garantir representatividade da curva.

Deve-se ainda garantir que a amostra respeitará o limite de absorbância da lei de Beer (entre 0,1 e 0,8) através da diluição da amostra, a qual será de acordo com a quantidade de células presentes em suspensão. Por exemplo, Veloso (2017) diluiu a amostra 60 vezes. Uma alíquota da solução homogeneizada deve então ser transferida para uma cubeta limpa e livre de riscos, que por sua vez deverá ser inserida no espectrofotômetro para a tomada da medida da absorbância com comprimento de onda de 600 nm. A solução de referência (“branco”)

utilizada para a análise da amostra não tratada deverá ser uma amostra do meio de cultura não inoculado, enquanto para as células lavadas pode-se utilizar água destilada pura.

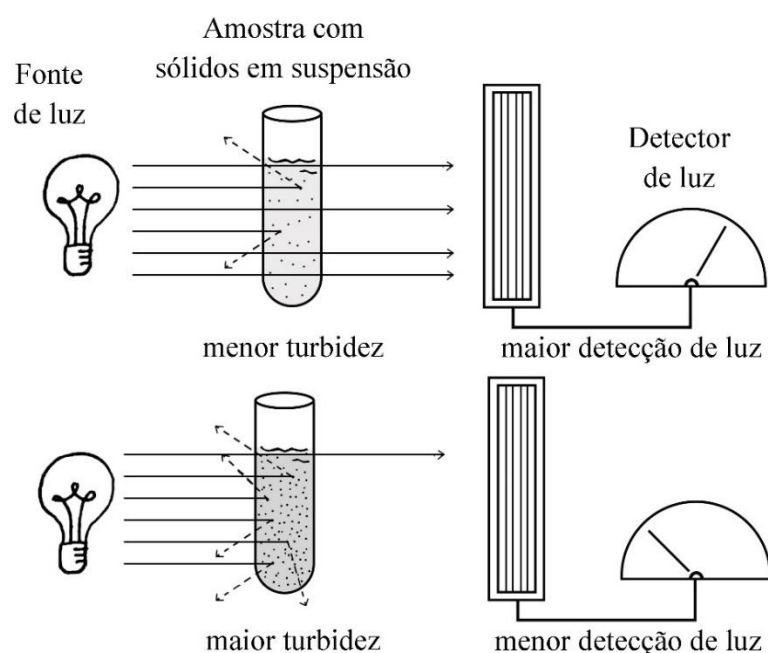
Com a absorvância e a concentração de cada solução padrão é possível desenhar o gráfico de concentração em função da absorvância e determinar a equação de calibração para as amostras que serão coletadas do fermentador. Cada amostra de vinho fermentado deverá passar pelo mesmo procedimento e a partir da equação determina-se sua concentração.

5.1.5. Método da turbidimetria

A determinação por turbidimetria da concentração de partículas não dissolvidas em suspensão se dá através da medida de turbidez da solução, onde o aumento da turbidez é relacionado diretamente ao aumento do número de partículas suspensas. A principal vantagem do método frente aos métodos de massa seca e densidade óptica é que ele é um método *online*, o que permite o acompanhamento contínuo do teor de células durante a fermentação (CUNHA, 2002).

O funcionamento do turbidímetro é baseado na transmissão de luz usando uma fibra óptica, que atravessa o material e incide sobre um transdutor, que converte a luz em fotocorrente (CUNHA, 2002; VELOSO, 2017). Um feixe de luz pode entrar em contato com uma partícula e ser dispersado em uma direção diferente ou não entrar em contato com nenhuma partícula e atravessar a amostra (representado na Figura 34). A turbidez do material é calculada pela diferença entre a luz gerada pela fibra óptica e a luz captada pelo transdutor. Quanto maior for a concentração de sólidos em suspensão na amostra, maior será a probabilidade de haver uma partícula no caminho do feixe de luz, reduzindo a quantidade de luz que atravessa a amostra e é detectada pelo transdutor (CUNHA, 2002).

Figura 34: Representação do princípio de funcionamento do turbidímetro.



Fonte: Acervo Pessoal

O procedimento descrito por Veloso (2017) utiliza um transmissor Trb 8300 e um sensor InPro 8100 (Mettler Toledo) e parte da calibração multiponto do equipamento. Para a calibração são produzidas soluções de concentração 14, 16, 18 e 22 g/L de levedura em 350 mL de solução de NaCl 0,9 M, além de uma amostra de meio puro onde a concentração de leveduras é nula. O uso da solução salina em detrimento do meio de cultivo para as soluções padrão é justificado pelo autor pelo fato da fermentação acontecer durante o processo de calibração, que afeta o resultado pelo aumento no número de células e principalmente pela produção de CO₂, pois as bolhas interferem na medida. A concentração real de teor celular de cada amostra é determinada via densidade óptica e inserida no painel do equipamento conforme sua turbidez é medida.

Após a calibração do equipamento, o sensor é inserido dentro da dorna para determinar os valores de turbidez ao longo do tempo. Segundo Veloso (2017), é importante que o sensor seja mantido a alguns centímetros de distância da parede para que não haja interferência na medida devido a reflexos. Como ponto de atenção mencionado pelo autor, deve-se atentar ao método utilizado para determinar a concentração celular das amostras para a calibração, pois o método da densidade óptica é restrito ao limite da linearidade da Lei de Beer.

Além dos turbidímetros *online*, existem equipamentos que fazem medidas turbidimétricas *offline*, como o turbidímetro digital TU430 (AKZO), que apresenta menos

problemas de interferência do gás pela análise ser realizada fora do reator, mas não tem a vantagem da medida contínua.

5.2. Parâmetros relacionados à vitalidade da *Saccharomyces cerevisiae*

Para além do acompanhamento do teor celular, a avaliação da condição das leveduras presentes influencia o rendimento da produção, pois apenas células viáveis participam da fermentação. Ao longo da fermentação, novas leveduras nascem, produzem etanol e morrem, além de poderem ser prejudicadas pelas condições ambientes ou contaminação por outros microrganismos, tornando-se inviáveis. A diferenciação das células que não participam do processo expõe a conversão real realizada pelas células viáveis e a necessidade de ajuste das condições de processo (VIEIRA, FERNANDES, 2012).

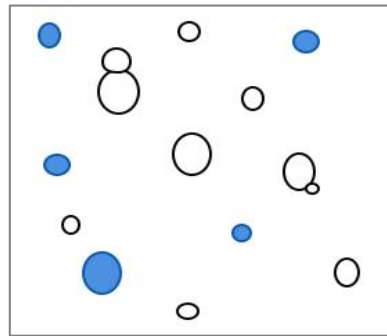
5.2.1. Viabilidade celular

Da perspectiva da produção industrial de etanol, uma célula viável é uma célula viva e capaz de realizar a fermentação do substrato disponível para produzir energia, tendo o etanol como subproduto. A morte celular implica no fim da conversão de substrato em etanol pela levedura, deixando de contribuir para o rendimento do processo.

5.2.1.1. Método da coloração diferencial

Uma das formas de diferenciar células viáveis das mortas é através da coloração diferencial, onde são empregados usualmente o azul de metileno (de coloração azul) ou a eritrosina (de coloração rosa). De acordo com Cruz (2019), o azul de metileno é azul na forma oxidada e incolor quando é reduzido. A diferenciação das células pela cor se dá pelo fato das células viáveis terem alta atividade fisiológica, reduzindo o corante que adentra a membrana, enquanto nas células mortas, pela ausência de atividade fisiológica, o corante permanece azul (ANTONINI, 2012). Desta forma, conforme representado na Figura 35, é possível contabilizar as células incolores (viáveis) e as coloridas (mortas).

Figura 35: Representação de uma amostra corada com azul de metileno, com células viáveis (incolores) e mortas (azuis).



Fonte: Acervo Pessoal

O procedimento para a análise de viabilidade celular através da coloração diferencial descrito por Antonini (2012) consiste na aplicação do método de contagem celular utilizando a câmara de Neubauer, descrito na seção 5.1.1, com células coradas. O corante utilizado é uma solução composta por 0,01 g de azul de metileno diluído em água destilada com 2 g de citrato de sódio, diluídos em um balão volumétrico de 1000 mL com água destilada. A coloração das células deve ser realizada após a diluição das amostras, através da mistura de um mesmo volume da amostra diluída e da solução corante.

Através da contagem das células coloridas e não coloridas é possível calcular a porcentagem de células viáveis no caldo conforme a equação 24, que indica a porcentagem de células viáveis contidas no vinho.

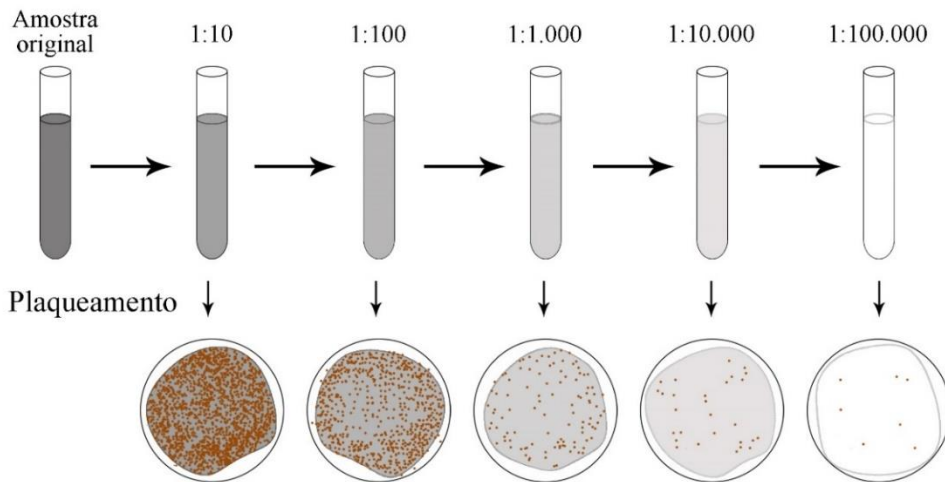
$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Número de células viáveis}}{\text{Número total de células (viáveis+inviáveis)}} * 100\% \quad (24)$$

5.2.1.2. Método da diluição seriada e plaqueamento

O método da diluição seriada tem como ponto de partida o princípio de que cada colônia é oriunda de uma célula viável, também conhecida como unidade formadora de colônia (UFC) (VIEIRA, FERNANDES, 2012). Para determinar a quantidade de UFCs em um volume de caldo são feitas sucessivas diluições e a cada nova diluição uma alíquota é semeada em uma placa, ilustrado na Figura 36. Após o tempo de incubação são contabilizadas as colônias, cujo total representa o número de células viáveis da amostra inicial (TORTORA, FUNKE, CASE, 2017).

Figura 36: Representação do método da diluição seriada e plaqueamento.

Diluição das amostras



Fonte: Acervo Pessoal

O procedimento experimental descrito por Antonini (2012) tem como ponto de partida a lavagem das células, para garantir que os nutrientes vindos do vinho não afetem o teste. 10 mL de amostra devem ser centrifugados por 5 minutos a 4000 rpm e depois o sobrenadante descartado. As células devem ser ressuspensas em água destilada ou solução salina com 0,85% de NaCl e a centrifugação e descarte do sobrenadante repetidos. Todas as diluições subsequentes poderão ser feitas com água destilada ou a mesma solução salina.

As células devem ser ressuspensas uma vez mais completando 10 mL e depois de homogeneizada 1 mL da solução deverá ser transferido para um tubo de cultura. O tubo deverá ser completado com 9 mL de água ou solução salina, caracterizando a diluição de 10 vezes das células. Após a homogeneização do conteúdo do tubo, 1 mL deverá ser colocado em um novo tubo de cultura, que deverá ser completado com 9 mL da mesma forma para uma nova diluição.

Com pelo menos três soluções com diluições distintas, deve-se realizar a semeadura em placas de Petri. A semeadura pode ser realizada em profundidade (*pour plate*), a partir de 1 mL da amostra diluída e o meio de cultivo liquefeito e resfriado a 45°C, ou em superfície, pipetando 0,1 mL sobre o meio de cultivo já solidificado e espalhando-o utilizando uma alça de Drigalsky. Com pelo menos duas placas por diluição, deve-se incubá-las a aproximadamente 30°C entre 2 e 3 dias.

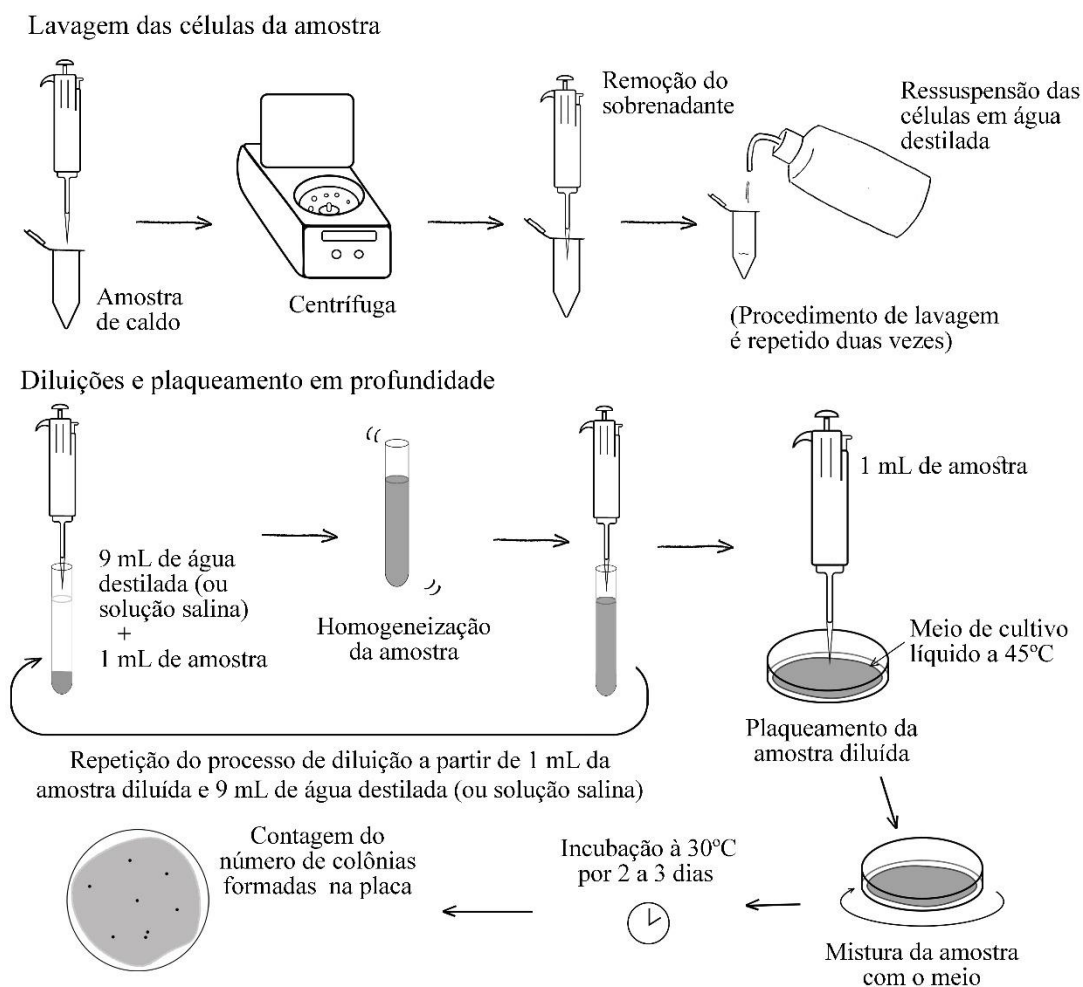
A contagem das placas deve ser feita preferencialmente nas que contenham entre 30 e 300 colônias, pois a presença de um número muito grande de colônias pode reprimir algumas células, interferindo no valor final de colônias formadas (TORTORA, FUNKE e CASE,

2017). O cálculo da concentração das unidades formadoras de colônia deverá levar em consideração as diluições realizadas e ser a média do resultado das duas placas semeadas com a mesma diluição.

A determinação do número unidades formadoras de colônias por volume de amostra (n° UFC/mL) é feita a partir da média do número de unidades contadas nas duas placas com mesma diluição divididas pela respectiva diluição.

Como pontos positivos do método, ilustrado na Figura 37, Antonini (2012) menciona a contagem apenas das células viáveis e a possibilidade de identificar diferentes leveduras, aprofundado na seção 5.3.1. Em contraponto, o procedimento é trabalhoso e demanda de dois a três dias de incubação, além da possibilidade de erros na quantidade final de UFCs acarretada por erros de diluição.

Figura 37: Representação do procedimento analítico de diluição seriada com plaqueamento em profundidade (*pour plate*).



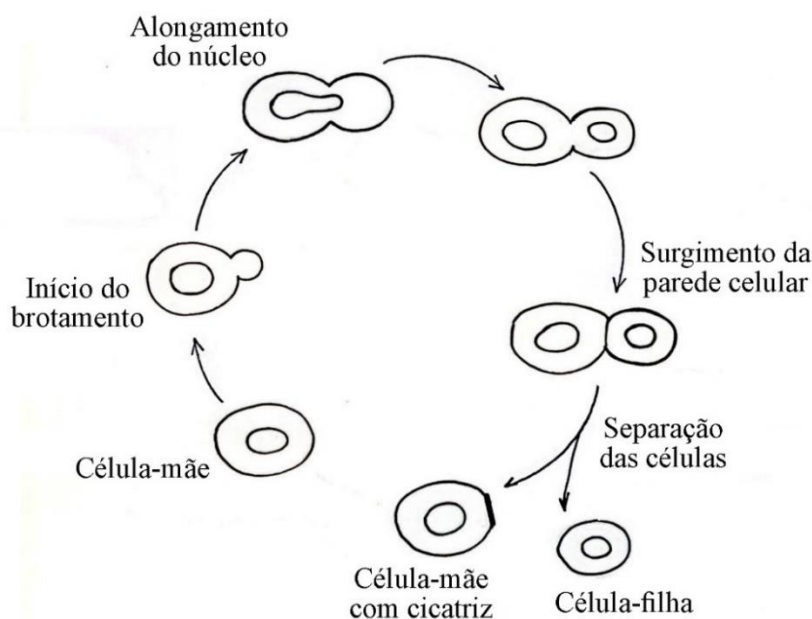
Fonte: Acervo Pessoal

5.2.2. Brotamento

A reprodução da *Saccharomyces cerevisiae* em condições normais acontece de forma assexuada por brotamento (ou gemulação), representado na Figura 38, originando células desiguais (TORTORA, FUNKE e CASE, 2017). Uma célula-mãe pode produzir mais de 24 novas células por brotamento, ficando com uma cicatriz na parede celular após a separação da célula-filha. Em condições de nutriente limitado, a *S. cerevisiae* pode se reproduzir sexuadamente como uma alternativa de menor consumo energético (ANTONINI, 2012).

Segundo Tortora, Funke e Case (2017), a reprodução por brotamento começa com a formação de uma protuberância (broto) na parede celular da célula-mãe. Conforme o broto se desenvolve, o núcleo celular da célula-mãe se alonga e se divide em dois, um deles migrando para o broto. Por fim, com a formação de uma parede celular entre o broto e a célula-mãe, elas se dividem, originando uma nova célula de levedura.

Figura 38: Representação dos estágios do brotamento de uma nova célula de levedura.



Fonte: Acervo Pessoal

Devido à sua morfologia, células em brotamento podem ser facilmente identificadas por microscopia. A contagem das células na amostra de caldo pode ser feita com uma Câmara de Neubauer, cuja operação está descrita na seção 5.1.1, juntamente com a análise da viabilidade e teor de células (VIEIRA, FERNANDES, 2012). A porcentagem de células viáveis em brotamento pode ser calculada conforme a equação 25. O número pode indicar a

fase do processo (pelos perfis de fase do crescimento celular, representados na Figura 26) e se as condições do mosto estão adequadas para a manutenção da população de leveduras.

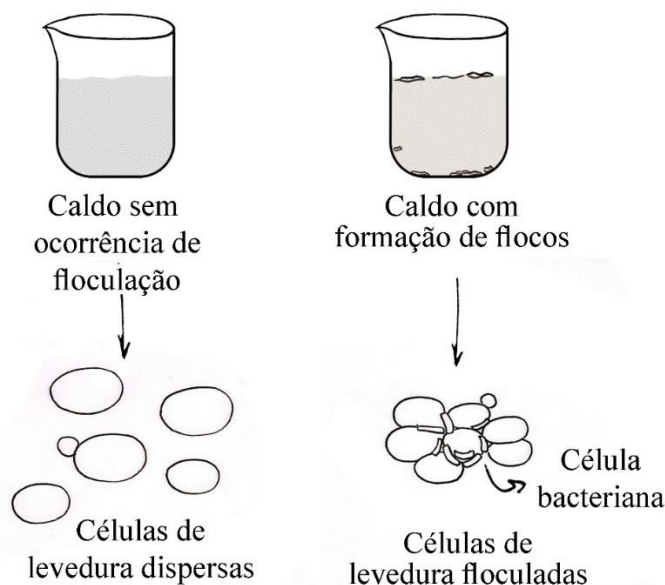
$$\text{Brotamento (\%)} = \frac{\text{Total de células viáveis em brotamento}}{\text{Total de células viáveis}} * 100\% \quad (25)$$

5.2.3. Flocculação

A flocculação se trata de um fenômeno onde as células de levedura se aglomeram formando flocos, conforme ilustrado na Figura 39 (GUIDINI, 2013). Ela pode ser causada por bactérias sintetizadoras de goma, pelo contato com bactérias indutoras de flocculação, por leveduras flocculantes ou pela própria *S. cerevisiae* quando exposta a certos fatores de estresse, como falta de nutrientes ou condições inadequadas de pH e temperatura (ROSA, 2008).

De acordo com Rosa (2008), os flocos usualmente decantam devido à massa superior ou são arrastados para cima pelas bolhas de gás do mosto. As principais consequências da flocculação são a redução do rendimento da fermentação devido à diminuição da superfície de contato das leveduras, o entupimento de tubulações e centrífugas e um menor rendimento no tratamento e recuperação das leveduras.

Figura 39: Representação de amostras com células de levedura dispersas e células flocculadas por contaminação bacteriana.



Fonte: Acervo Pessoal

De acordo com Rosa (2008), uma vez que a floculação é usualmente causada por contaminação, controlando-se a contaminação através da assepsia adequada dos equipamentos e do uso de antibióticos quando necessário é possível reduzir a ocorrência e a intensidade da floculação. Entretanto, quando acontece é necessário tratar os flocos.

O método tradicional para lidar com a levedura floculada é a redução do pH abaixo de 3,0, comumente realizado durante o tratamento do creme levedura entre bateladas usando ácido sulfúrico (ROSA, 2008). Ainda que seja efetivo em dispersar os flocos e não apresente custo muito elevado, a redução do pH não trata a origem do problema e pode afetar a viabilidade celular dependendo da duração do tratamento. Ao retornar para a dorna, o fermento é misturado com o caldo, de pH superior, levando o pH do mosto para uma faixa de 3,8 a 4,2, fazendo com que parte da levedura volte a flocular (ANTONINI, 2012).

Como uma alternativa mais efetiva, pode-se realizar um tratamento enzimático, que controla a floculação utilizando a papaína ou proteases (ROSA, 2008), que possuem faixa de pH ótimo ampla e não afetam a viabilidade da levedura na concentração utilizada. Entretanto, pelo custo elevado das enzimas faz-se necessária a busca por alternativas mais economicamente viáveis para a aplicação em escala industrial, como a reutilização das enzimas através de sua recuperação ou imobilização.

5.3. Leveduras Contaminantes

A presença de leveduras contaminantes no mosto implica na competição pela fonte de carbono disponível, afetando diretamente o rendimento da fermentação. Além disso, a contaminação pode prolongar o tempo de fermentação e aumentar a viscosidade do mosto, podendo acarretar na formação de espuma e impactar o sistema do fermentador (RIBEIRO, BLUMER, HORII, 1999).

Segundo Paulillo (2015), as leveduras não-*cerevisiae* do gênero *Saccharomyces* são as mais frequentemente encontradas no mosto, ainda que outras, como as das famílias *Dekkera* e *Candida*, também sejam comuns. Isso pode ser explicado, de acordo com Vieira e Fernandes (2015), pelo teor de etanol nas dornas, que usualmente impossibilita a permanência de leveduras não *Saccharomyces*.

A mudança nas condições do processo, somada ao comportamento competitivo das linhagens contaminantes, pode fazer com que elas predominem no mosto em detrimento das linhagens industriais da *S. cerevisiae*, reduzindo sua população e a produção de etanol do lote (ANTONINI, 2012). Por outro lado, existe a possibilidade da identificação de novas

cepas de levedura com melhor desempenho fermentativo (BASTOS, 2015). Neste caso, é possível separá-las e reaproveitá-las para as bateladas seguintes, obtendo maiores rendimentos.

De acordo com Antonini (2012), uma vez que a contaminação tenha atingido níveis altos, a principal estratégia para combatê-la é realizar uma sangria de parte do creme levedura contaminado ou seu descarte por completo, seguido de sua substituição por uma nova solução de pé-de-cuba composta pela cepa original. Para mais, é essencial garantir que as condições operacionais sejam mantidas de forma a evitar a reincidência, como a condição asséptica das tubulações, garantia das condições da água alimentada ao mosto, eficiência do tratamento do creme levedura, entre outros (ROSA, 2008).

5.3.1. Identificação de leveduras através de diluição seriada e plaqueamento em meios de cultura seletivos

O método de diluição e plaqueamento empregando meios de cultura seletivos serve como método de diferenciação das leveduras, uma vez que cada levedura necessita de nutrientes em concentrações específicas e é sensível a certas substâncias, como antibióticos e corantes (ANTONINI, 2012). A partir da disposição das células de levedura em diferentes meios de cultura é possível identificar as espécies que compunham a amostra inicial.

De acordo com Antonini (2012), a diferenciação de espécies *Saccharomyces* das demais pode ser feita usando meios contendo o antifúngico actidione ou com lisina como a única fonte de nitrogênio por elas não sobreviverem em nenhuma das condições em sua maioria. Já dentro do gênero *Saccharomyces*, as leveduras podem ser detectadas em meios contendo cristal violeta com exceção da espécie *cerevisiae*, o que permite diferenciá-la das demais.

Para além das vantagens mencionadas na seção 5.2.1.2, a principal vantagem do método analítico é a capacidade de isolar as espécies, tanto da *S. cerevisiae* quanto das demais leveduras contaminantes, o que possibilita sua identificação e estudo subsequente. Entretanto, como diferentes leveduras podem ter certas especificidades em comum, normalmente é necessária a exposição a diversos meios de cultura diferentes, o que demanda muito tempo e vidraria, além da possibilidade do erro de contagem ou experimental pelas diversas diluições em sequência.

5.3.2. Identificação de leveduras através de cariotipagem molecular por meio da eletroforese em campo pulsado

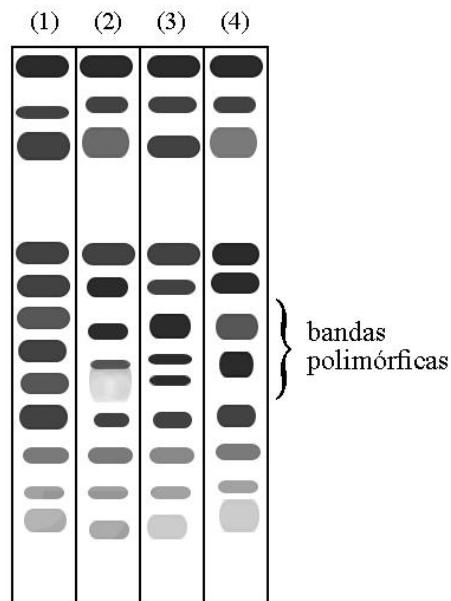
A técnica de cariotipagem é uma técnica de identificação e especificação realizada a partir da análise dos polimorfismos moleculares de uma levedura, as variações fenotípicas que existem entre os DNAs de diferentes cepas ou espécies de levedura (LUCENA, 2004). A cariotipagem de moléculas por meio da eletroforese em campo pulsado (PFGE) é adequada para o estudo de fungos, que possuem cromossomos pequenos demais para o estudo por microscopia (ANTONINI, 2012). Segundo Lucena (2004), a PFGE pode separar cromossomos inteiros, que são moléculas muito longas, permitindo sua visualização por completo.

De acordo com Lobo (2012), a eletroforese é realizada em um meio líquido sobre um gel, usualmente agarose ou poliacrilamida, que serve como um filtro em função do tamanho das moléculas. Pelo fato de os ácidos nucleicos possuírem carga negativa em pH neutro, a aplicação de um campo elétrico no sistema faz com que as moléculas migrem do polo negativo ao positivo. A velocidade de cada molécula depende de seu tamanho, sendo o logaritmo de sua massa função aproximadamente linear da distância percorrida pelo gel. Desta forma, a partir do uso de moléculas de tamanho já conhecido como padrões, é possível determinar o tamanho dos fragmentos a partir de seu deslocamento.

A aplicação do campo pulsado faz com que os fragmentos mudem de direção repetidamente. Os fragmentos menores se locomovem com maior facilidade pelo gel, pelo fato de terem menos massa, e mudam de direção com maior facilidade com a inversão da direção do campo, formando bandas de tamanho e intensidade específicos (LOBO, 2012).

A diferenciação entre leveduras e a identificação de cada uma é realizada a partir da análise do cariótipo eletroforético gerado pela análise sobre o gel, que é o conjunto de bandas formado a partir da amostra, pois o número de bandas, o tamanho de cada uma e sua intensidade são específicos para cada linhagem (ANTONINI, 2012). Durante a análise de mais de uma amostra, são denominadas bandas polimórficas as bandas diferentes entre as amostras, que são usadas para diferenciá-las. Na Figura 40 está ilustrado um exemplo de cariótipo eletroforético gerado para quatro amostras diferentes (representadas pelas colunas 1, 2, 3 e 4), onde é possível identificar as bandas polimórficas de cada uma, mostrando que cada amostra pertence a uma linhagem diferente.

Figura 40: Exemplo de um cariótipo eletroforético gerado a partir da análise de quatro amostras diferentes.



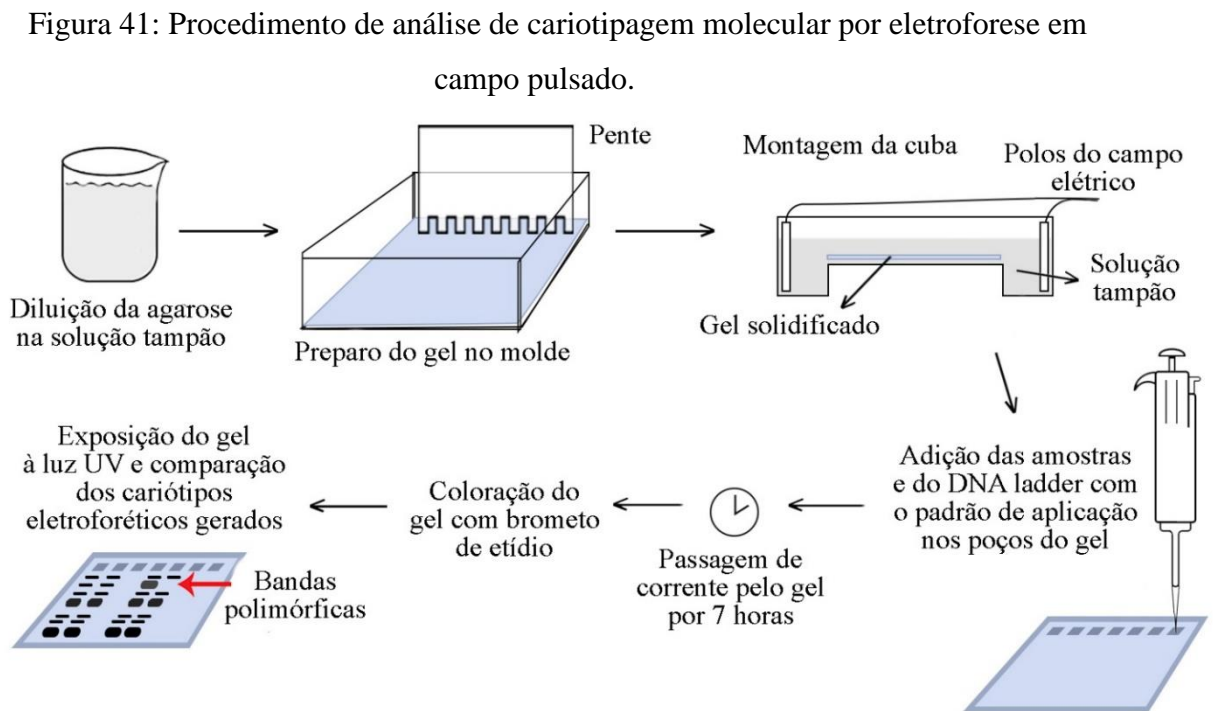
Fonte: Acervo Pessoal

O processo descrito por Lobo (2012) é iniciado com a preparação do gel de agarose, que é diluído em uma solução tampão e colocado em um molde para solidificar com um pente em uma das extremidades, que formará os poços onde serão colocadas as amostras. Após a solidificação do gel, o pente é removido e o molde com o gel inserido dentro da cuba e coberto pela solução tampão, responsável pela condução da corrente e a manutenção do pH em um valor estável.

Cada amostra de DNA é misturada a um tampão de aplicação, responsável pelo aumento da densidade da amostra, que a mantém no poço e evita sua dissolução na solução tampão, e pela possibilidade de visualizar o processo analítico devido ao corante em sua composição. As amostras são adicionadas aos poços, juntamente com o padrão (DNA *ladder*). O padrão utilizado por Lucena (2004) foram cromossomos de *S. cerevisiae* da linhagem YNN295 fornecidos pela Amersham-Pharmacia Biotech. O padrão é composto por fragmentos de DNA de comprimentos conhecidos e servirá como referência ao final do processo.

Com o sistema montado, a fonte de energia deverá ser ligada, criando o campo elétrico. O processo descrito por Lucena (2004) utilizou o sistema Gene Navigator (Amersham-Pharmacia Biotech) para realizar a análise e a corrida foi feita a 12°C utilizando pulsos de 75 e 15 segundos intercalados por 7 horas. Para a avaliação dos resultados, o gel é corado

com solução de brometo de etídio, que permite sua visualização sob luz ultravioleta (LOBO, 2012). As etapas do procedimento analítico são representadas na Figura 41.



Fonte: Acervo Pessoal

De acordo com Antonini (2012), a técnica de cariotipagem molecular por meio da eletroforese em campo pulsado permite a seleção de cepas mais eficientes para o processo e o acompanhamento das linhagens através de bateladas e tratamentos sequenciais do creme levedura, nível de detalhamento que não é identificado empregando os métodos microbiológicos tradicionais. Como principais pontos negativos pode-se citar o alto custo devido aos equipamentos, os reagentes e a necessidade de mão-de-obra qualificada e a ausência da avaliação dos polimorfismos gênicos, que podem causar mudanças nos organismos e conseqüentemente no rendimento da fermentação.

5.4. Bactérias

Bactérias são microrganismos vivos unicelulares que, assim como as leveduras contaminantes, competem com a *S. cerevisiae* pelo substrato disponível e podem prejudicar o rendimento do processo. As bactérias presentes no mosto vêm de diversas fontes, como da lavoura da cana, do solo, dos armazéns onde a cana é mantida antes do início do processo e

da água utilizada na diluição do pé-de-cuba (CORAÇA, 2012). Pelas características da cana e das condições como é conduzido o processo, que contém pontos mortos, não é 100% estéril e conta com um tratamento térmico ineficiente (ANTONINI, 2012), a presença das bactérias e a necessidade de reduzir sua população é parte do processo.

A produção de substâncias tóxicas pelas bactérias pode promover a floculação das leveduras, inibi-las ou matá-las, prejudicando a fermentação (CORAÇA, 2012). Além disso, a contaminação pode afetar o rendimento pelo aumento da produção de glicerol pelas leveduras em resposta ao estresse osmótico (ANTONINI, 2012) e pelo consumo pelas bactérias de parte do etanol produzido (NAVES *et al.*, 2010).

Segundo Coraça (2012), as bactérias Gram-positivas são as mais frequentemente encontradas no mosto, principalmente as dos gêneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus*, e a Gram-negativa do gênero *Acetobacter*. A concentração usual de bactérias no mosto é da ordem de 10^7 bactérias/mL, sendo 65% Gram-positiva.

Uma das formas mais comuns para o controle da população bacteriana é o tratamento do pé-de-cuba com ácido sulfúrico. O processo é realizado depois que o creme levedura é separado do vinho, antes de ser utilizado na fermentação seguinte, e pode reduzir a contaminação em até 44,3% em razão da maior sensibilidade das bactérias a valores mais baixos de pH (CORAÇA, 2012). Além de reduzir a população bacteriana, o tratamento contribui para a diminuição da floculação, mas pode afetar o metabolismo e fisiologia da *S. cerevisiae* em condições mais extremas de pH ou tempo excessivo de exposição ao ácido.

Diante dos riscos apresentados, tem-se como primordial o controle da população bacteriana, tanto em quantidade quanto em tipos, assim como a efetividade dos antimicrobianos em uso no mosto.

5.4.1. Teor de bactérias

O acompanhamento do teor de bactérias é importante para verificar a dimensão da contaminação e sua influência no rendimento e para avaliar a eficiência do tratamento antimicrobiano utilizado, que pode ser ajustado conforme necessidade. Segundo Antonini (2012), o controle da concentração bacteriana em diferentes partes do equipamento reflete na eficiência do tratamento ácido do creme levedura e nas condições do equipamento, a efetividade do procedimento de limpeza do fermentador e seus pontos mortos.

5.4.1.1. Contagem direta ao microscópio

A contagem de bactérias no microscópio é majoritariamente aplicada para bastonetes em amostras de caldo retiradas durante a fermentação (caldo primário e misto) ou após a fermentação (vinho ou creme levedura antes e depois do tratamento), devido a concentração superior de bactérias. Segundo Vieira e Fernandes (2012), o método é mais adequado para amostras com 1 a 10 milhões de células bacterianas por mL. Assim como a determinação do teor de leveduras (descrita na seção 5.1), a diferenciação das células viáveis e não viáveis pode ser feita a partir da coloração diferencial.

O procedimento analítico descrito por Vieira e Fernandes (2012) tem como etapa inicial a homogeneização da amostra e, na presença de impurezas sólidas em suspensão, de filtração subsequente. A amostra deve ser diluída de forma que o número de células no campo do microscópio seja de 3 a 5 e, em seguida, 1 mL da amostra diluída é misturada em um tubo de ensaio com 1 mL da solução corante, composta por sulfato azul de Nilo e azul de metileno.

A seguir, 3 µL da amostra homogeneizada são adicionados em uma lâmina de vidro com a lamínula por cima sem que haja formação de bolhas. A contagem das células não coradas é feita em um microscópio óptico utilizando objetiva de imersão com aumento de 100 vezes e a quantidade de campos contabilizados é determinada pela dimensão da contaminação esperada na amostra: para vinho e creme levedura deverão ser contados 50 campos, para caldo primário ou misto deverão ser contados 70 campos e para caldo clarificado e mosto 100 campos.

O princípio da coloração diferencial funciona da mesma maneira que para a análise de leveduras viáveis: a enzima presente na célula viável reduz o corante, voltando a ser incolor, enquanto a célula inviável apresenta a enzima inativa e permanece azul. A partir da contagem dos bastonetes não corados na lamínula, do volume de amostra disposto sobre a lamínula e a diluição da amostra é possível determinar a concentração dos bastonetes, conforme equação 26.

$$N^{\circ} \text{ bastonetes/mL} = \frac{FM * N^{\circ} \text{ bastonetes} * \text{Diluição}}{N^{\circ} \text{ de campos contados} * \text{Volume de amostra}} \quad (26)$$

Onde FM é o fator do microscópio, calculado pela divisão da área de preparação da lamínula pela área do campo do microscópio, e a diluição deverá levar em consideração a diluição inicial da amostra e a diluição por dois com a adição dos corantes na amostra.

Segundo Vieira e Fernandes (2012), as principais vantagens do método são a velocidade de contagem e a precisão nas condições de concentração adequada.

5.4.1.2. Diluição seriada e plaqueamento em meios de cultura

Assim como descrito na seção 5.2.1 para a identificação de leveduras contaminantes, a diluição seriada associada ao plaqueamento em diferentes meios de cultura pode ser aplicada para a identificação de espécies diferentes de bactérias presentes no vinho. Segundo Vieira e Fernandes (2012), o processo experimental utilizado para o plaqueamento aplicado para bactérias é o mesmo que o aplicado para leveduras (seção 5.2.1), com a diferença de não demandar a centrifugação inicial da amostra de acordo com Antonini (2012).

Para a contagem de bactérias, Antonini (2012) recomenda o plaqueamento em meios pobres em carboidrato para evitar a produção de cápsula em excesso, que pode fazer com que as células grudem umas nas outras. Os meios mais usados para bactérias têm proteínas em sua composição, como o Ágar Nutriente, composto por peptona, extrato de carne e ágar, e o Ágar Padrão de Contagem, composto por triptona, glicose e vitaminas oriundas da levedura.

5.4.1.3. Coloração de Gram

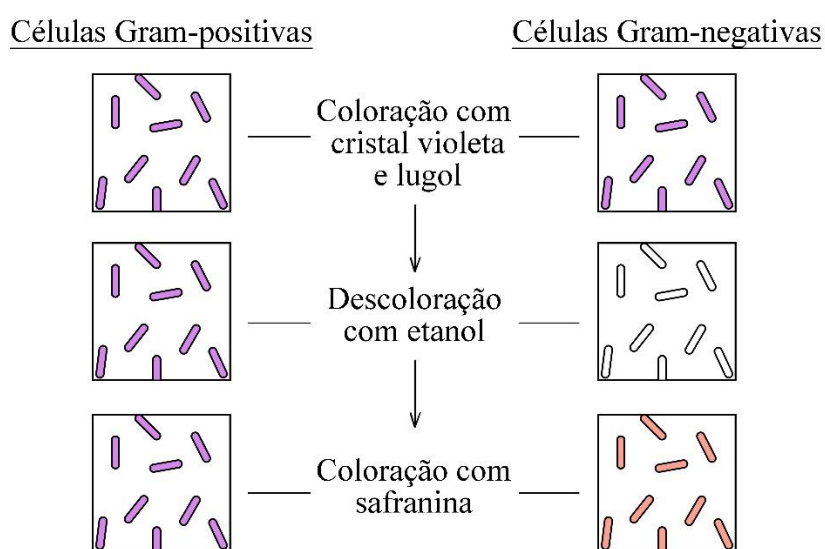
O método de coloração de Gram foi desenvolvido em 1884 por Hans Christian Gram e consiste na distinção pela cor de células em dois grupos: células Gram-positivas, de cor roxa, e Gram-negativas, de cor vermelha. O teste consiste na exposição das células a um corante cristal violeta, seguido de um agente descolorante e por fim um segundo corante (safranina), de cor avermelhada. A diferenciação da coloração final das células se dá pela composição distinta de sua parede celular (VIEIRA, FERNANDES, 2012).

Segundo Breijjyeh, Jubeh e Karaman (2020), as células Gram-positivas possuem uma única parede celular grossa composta majoritariamente de peptidoglicanos, enquanto a parede das células Gram-negativas é composta por três membranas: a externa, uma parede celular intermediária formada por peptidoglicanos e a interna. A membrana externa é uma membrana protetora composta por fosfolipídios, lipopolissacarídeos e proteínas que permitem a passagem de pequenas proteínas, que permite a passagem do agente descolorante. Sua maior complexidade e resistência faz com que as bactérias Gram-negativas apresentem maior resistência a diversos antibióticos, como a penicilina, além de maior toxicidade pela liberação de endotoxinas quando danificada.

A classificação de uma bactéria como Gram-positiva ou negativa restringe a gama de espécies possíveis, diminuindo o número de testes subsequentes para determiná-la com exatidão, além de indicar antibióticos que poderiam ser efetivos ou não devido à resistência das bactérias Gram-negativas a diversos antimicrobianos. Para além da identificação, a coloração das células facilita a avaliação morfológica das células pelo contraste das cores (ANTONINI, 2012).

De acordo com Vieira e Fernandes (2012), a análise é composta pela fase de coloração, onde as células são expostas ao cristal violeta e em seguida ao lugol, que formam um composto violeta insolúvel. Em seguida, as células são expostas a etanol: a grossa parede celular de peptidoglicanos das bactérias Gram-positivas não permite a passagem dos cristais, enquanto as células Gram-negativas perdem a cor devido à ação do descolorante. De modo a melhorar a visualização das células descoloridas é adicionada safranina ao final do processo, responsável pela coloração avermelhada das células Gram-negativas. Na Figura 42 são representadas a coloração das células Gram-positivas e Gram-negativas a cada etapa da análise.

Figura 42: Coloração das células Gram-positivas e Gram-negativas durante as etapas de coloração e descoloração da análise de coloração de Gram.

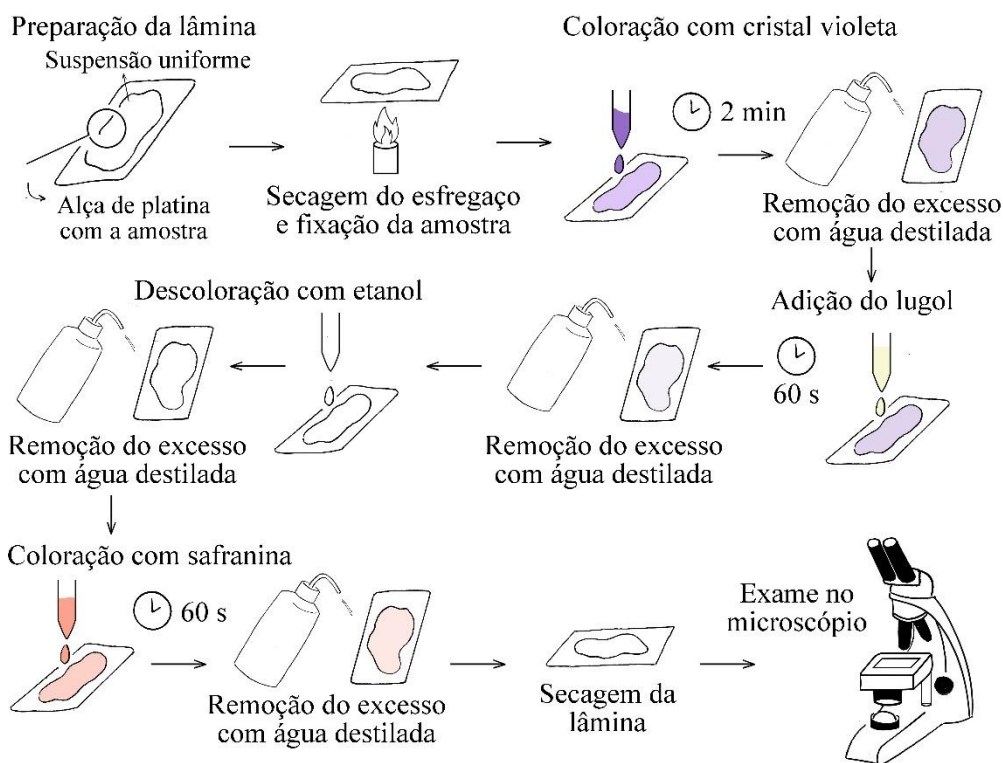


Fonte: Acervo Pessoal

O procedimento experimental descrito por Vieira e Fernandes (2012), ilustrado na Figura 43, começa com o preparo da lâmina, que pode utilizar uma amostra em estado líquido ou de cultivo sólido. No primeiro caso, a amostra é aplicada com uma alça de platina sobre a

lâmina limpa. Já no caso do cultivo sólido, uma gota de água é disposta sobre a lâmina e a cultura de bactéria é suspensa nela usando uma alça de platina e espalhada uniformemente pela lâmina. Antes da adição dos demais componentes, a lâmina seca naturalmente e a amostra é fixada por aquecimento, formando o esfregaço, que deve estar em temperatura ambiente para a aplicação dos corantes.

Figura 43: Representação do processo da análise por coloração de Gram.



Fonte: Acervo Pessoal

O processo de coloração e descoloração consiste na adição de soluções sobre o esfregaço, seguida por um determinado tempo de contato e por fim na remoção do excesso da solução lavando-a com água destilada. A coloração é feita com uma solução de cristal violeta, que após dois minutos de contato deve ser lavada da lâmina com água destilada. O processo é repetido usando uma solução de iodo (lugol) e a lavagem da lâmina deve ser realizada com água destilada fria após um minuto de contato. Após a aplicação do cristal violeta e do lugol, todas as células possuirão coloração violeta devido à formação dos cristais insolúveis.

Para a descoloração, etanol hidratado ou uma solução de etanol e acetona é aplicado sobre a lâmina até que a solução saia da lâmina incolor (indicando que não é possível remover mais corante) e então a lâmina é lavada com água destilada. A seguir, é aplicada

solução de safranina, que fica por um minuto em contato com a lâmina, seguida pela lavagem com água destilada. Após a secagem da lâmina, a verificação da coloração das células é realizada com um microscópio óptico. As células com coloração roxa são Gram-positivas e as vermelhas Gram-negativas.

5.4.2. Monitoramento da sensibilidade de bactérias a antimicrobianos

De acordo com Antonini (2012), de forma geral, as bactérias têm a capacidade de dobrar sua população em apenas 28 minutos, o que pode trazer um grande impacto para fermentação, que dura aproximadamente 10 horas. Segundo Coraça (2012), o uso de antibióticos para combater as bactérias é altamente custoso para o processo e muitas vezes requer aplicação frequente, além de usualmente ser necessária a aplicação de mais de uma variedade de antibiótico de uma vez devido à variedade de microrganismos no mosto (ROSA, 2008). Existe também o risco do desenvolvimento de bactérias super resistentes devido à exposição excessiva a antibióticos, que deve ser evitada através do uso ponderado do medicamento. Para mais, a presença de antibióticos nos subprodutos pode impossibilitar seu aproveitamento, como a vinhaça, que é aplicada no solo de plantio, e o excedente do creme levedura, cuja destinação na forma seca para suplementação alimentar é controlada por órgãos regulatórios.

Dentre os principais antibióticos aplicados para fermentação alcoólica, Coraça (2012) cita a penicilina, a tetraciclina, o cloranfenicol, a virginamicina e o Kamoran. Segundo Vieira e Fernandes (2012), os antibióticos podem ter ação bactericida, matando as bactérias, ou bacteristática, onde o crescimento das bactérias é inibido. Devido à diversidade de antibióticos no mercado e a possibilidade de contaminação simultânea do caldo por mais de um tipo de bactéria, faz-se necessário o monitoramento da sensibilidade das bactérias aos produtos utilizados.

Além da sensibilidade, é importante determinar a concentração inibitória mínima do antimicrobiano (CIM), ou seja, qual a menor quantidade que inibe completamente o crescimento da bactéria em questão (ANTONINI, 2012). Em razão disso, é importante que sejam feitos testes com diferentes concentrações de um mesmo antimicrobiano, além do uso simultâneo de mais de um para combater diferentes bactérias que possam estar presentes no mosto. Para que o efeito do antibiótico seja efetivo e os gastos minimizados, é importante que seja determinado o produto mais adequado para cada caso e a dosagem compatível com a dimensão da contaminação.

O monitoramento da sensibilidade das bactérias é importante também pelo risco do surgimento de cepas resistentes ao antibiótico em uso pela exposição prolongada. Nestes casos, o agente antimicrobiano deve ser substituído por outro que obtenha maior resposta nos testes de sensibilidade.

5.4.2.1. Método turbidimétrico

A análise turbidimétrica aplicada para sensibilidade de bactérias parte do mesmo princípio do método quando aplicado para células de levedura, descrito na seção 5.1.5. O processo analítico descrito por Antonini (2012) consiste na determinação da absorbância antes da adição de agentes antimicrobianos e depois de um período de repouso para verificar a dimensão do crescimento microbiano, posto que quanto maior for a concentração de bactérias, maior será a turbidez do meio e, conseqüentemente, o valor de absorbância determinado.

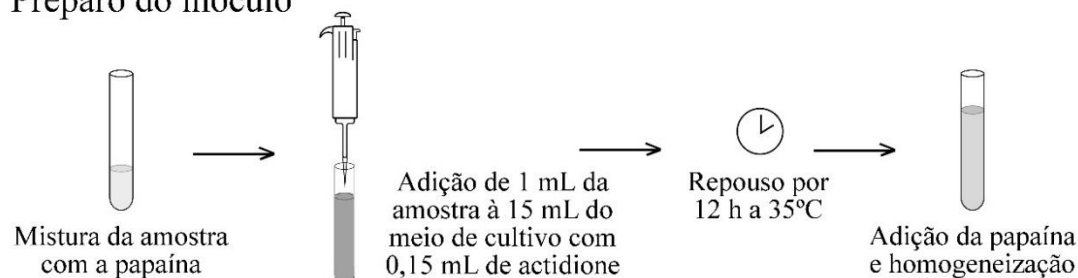
Quando menor for o valor da variação de absorbância, menor terá sido o aumento da população bacteriana, sendo que um valor negativo pode indicar a redução da população pela ação do antimicrobiano. A partir da análise do resultado de cada amostra é possível determinar os antimicrobianos mais adequados e a concentração que deverá ser utilizada no caldo.

Uma vez que a turbidez também pode ser usada para determinar o teor de levedura, é importante que seu crescimento seja inibido para que tenha o mínimo possível de interferência na tomada da medida (ANTONINI, 2012). Papaína é utilizada como um agente desfloculante e actidione é utilizado como um inibidor do crescimento da levedura, que poderia afetar o valor medido de absorbância. A solução de actidione (cicloheximida) pode ser preparada a partir de 0,1g da substância dissolvida em 100 mL de água destilada esterilizada

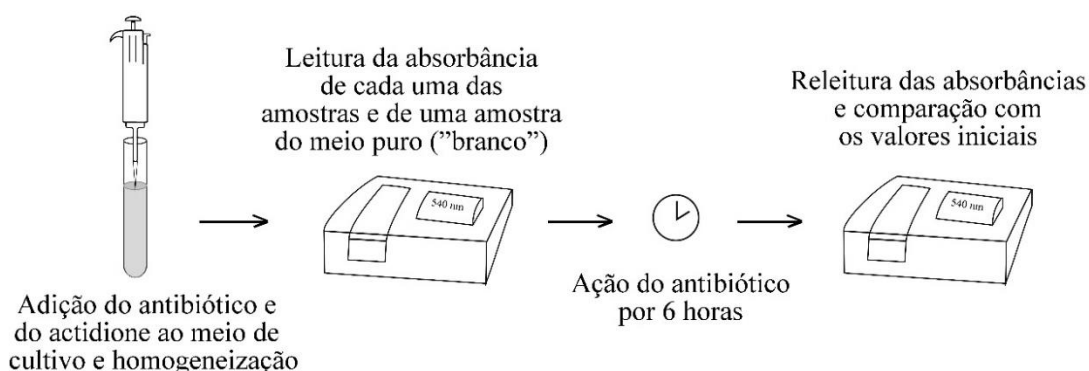
O preparo do inóculo descrito por Antonini (2012), ilustrado na Figura 44, se inicia com a mistura de 5 mL de vinho coletado da dorna com aproximadamente 5 mg de papaína em tubos de ensaio, homogeneizados e mantidos em repouso por 5 minutos. 1 mL da solução é então adicionado a 15 mL de meio de cultivo esterilizado, acrescida de 0,15 mL de uma solução de actidione e incubada por 12h a uma temperatura de 35°C. Passadas as 12 horas, deve-se adicionar papaína e homogeneizar as soluções dos tubos.

Figura 44: Procedimento de monitoramento da sensibilidade de bactérias a antimicrobianos pelo método turbidimétrico.

Preparo do inóculo



Teste dos antibióticos



Fonte: Acervo Pessoal

Com o inóculo pronto, deve-se transferir 0,15 mL de actidione a cada tubo com o meio de cultivo e o volume de antimicrobiano equivalente à concentração que deverá ser testada. Dentre os meios de cultura possíveis, Antonini (2012) menciona o Caldo Nutriente, composto por peptona, extrato de carne e cloreto de sódio, e GLT, composto por extrato de levedura, triptona e glicose.

A calibração do espectrofotômetro deve ser realizada com uma amostra do meio de cultivo sem o inóculo, que servirá como referência ("branco"), com comprimento de onda de 540 nm. Cada cubeta deverá ter a superfície livre de riscos e ser lavada com a própria amostra para evitar erros de diluição. A amostra então deve ser inserida na cubeta, por sua vez colocada no equipamento para que a absorbância seja mensurada. Os valores de absorbância medidos devem ser anotados com as respectivas concentrações de antimicrobianos e os tubos de ensaio contendo as amostras identificados.

Após as leituras, cada tubo deve ser tamponado com algodão e mantido em uma estufa por 6 horas a 35°C sob ação do antimicrobiano e depois homogeneizado. A leitura da absorbância deve ser repetida para o conteúdo de todos os tubos e o valor final anotado para que seja comparado ao valor inicial.

A variação de absorvância (Δ ABS) pode ser determinada percentualmente conforme a equação 27.

$$\Delta\text{ABS} = (\text{ABS}_{\text{final}} - \text{ABS}_{\text{inicial}}) * 100\% \quad (27)$$

5.4.2.2. Teste de acidez do meio

O teste da acidez do meio pode ser utilizado para determinar a sensibilidade a antibióticos de bactérias produtoras de ácidos acético ou láctico, uma vez que o aumento da população das bactérias tem como consequência o aumento na produção de ácido, que reduz o pH do meio (ANTONINI, 2012).

A análise é realizada a partir da disposição de amostras de caldo em tubos de ensaio e a comparação do valor de pH obtido para as amostras contendo antibiótico com uma amostra referência, não exposta a nenhum antibiótico. Caso o antibiótico iniba por completo o desenvolvimento das bactérias, o valor de pH final seria igual ao inicial, pois a produção de ácido cessaria. Através do teste de múltiplos antibióticos em diferentes concentrações é possível determinar o antibiótico mais efetivo e sua respectiva concentração como aquele que apresentar a menor variação de acidez no tempo decorrido de teste.

6. CONCLUSÃO

Pelo fato da fermentação alcoólica ser um processo complexo, onde o metabolismo das leveduras está sujeito às condições do meio, é importante que se faça o acompanhamento das variáveis do processo para a obtenção de um bom rendimento e para o estudo de sua otimização.

Cada uma das variáveis possui diversos métodos de análise descritos na literatura, que devem ser selecionados de acordo com as necessidades e especificidades do sistema operacional, forma de operação, microrganismo selecionado, entre outros.

Dentre os métodos apresentados, os métodos *online* apresentam uma grande vantagem pela possibilidade de análises contínuas ou periódicas que não requerem a abertura do sistema, reduzindo a chance de contaminação, nem a mão-de-obra qualificada para realizar a análise. Além disso, a conexão dos dados com um sistema de controle permite o controle dos dados à distância ou automático, reduzindo o tempo que a variável poderia permanecer fora da faixa ideal.

Considerando as perspectivas do acompanhamento de parâmetros de processo com o avanço da busca pela modernização dos sistemas de controle trazida pela indústria 4.0, espera-se que nos próximos anos a tendência seja pela maior aplicação de métodos de acompanhamento *online* conectados à malhas de controle que façam a manutenção dos parâmetros automaticamente, possibilitando o monitoramento constante e simultâneo das variáveis de processo. Atualmente, parâmetros mais simples de serem analisados, como temperatura e pH, já são monitorados utilizando sondas de maneira *online*.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Detalhar tecnologias disponíveis para o monitoramento de variáveis ligadas à contaminação de forma online;
- Desenvolver e avaliar experimentalmente um sistema que utilize apenas métodos *online* para monitoramento das variáveis.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, H. V.; ZAGO, E. A.; GUTIERREZ, L. E. **Método rápido para o controle da fermentação e destilação**. *Saccharum*, v. 2, n. 4, p. 31-34, 1979.

ANTONINI, S. R. C. **Microbiologia da fermentação alcoólica: A importância do monitoramento microbiológico em destilarias**. Coleção UAB–UFSCar: Tecnologia das fermentações. São Carlos, EdUFSCAR, 2012.

ARAÚJO, F. A. D. **Intensificação do processo de purificação do caldo da cana-de-açúcar por decantação química e adsorção**. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2017.

ATKINS, P. W.; JONES, L. **Princípios de Química: questionando a vida moderna o meio ambiente**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2012.

BARRAL, M. F.; PEREIRALIMA, P. S. **Automação e controle de processos fermentativos**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. V. 2, 1ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. Cap. 18.

BASTOS, R. G. **Tecnologia das fermentações: fundamentos de bioprocessos**. Coleção UAB–UFSCar: Tecnologia das fermentações. São Carlos, EdUFSCAR, 2015.

BATISTOTE, M. *et al.* Desempenho de leveduras obtidas em indústrias de Mato Grosso do Sul na produção de etanol em mosto a base de cana de açúcar. **Ciência e Natura**, Vol. 32 No. 2. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS. 2010.

BRASIL. Portaria Nº 75, de 5 de março de 2015. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, Nº 44, p. 17, 6 de mar. de 2015.

BREIJYEH, Z; JUBEH, B; KARAMAN, R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. **Molecules**. 2020; 25(6):1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>.

CARVALHAL, M. L. C. **Técnicas básicas em microbiologia**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. V. 2, 1ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. Cap. 2.

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. **Fermentação Descontínua e Fermentação Descontínua Alimentada**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. V. 2, 1ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. Cap. 9 e 10.

CORAÇA, A. C. M. **Utilização de ácido sulfúrico no tratamento das leveduras na fermentação etanólica**. Dissertação (Pós-Doutorado em Gestão de Produção Industrial) – Universidade Federal de São Carlos, Piracicaba, SP. 2012.

CRUZ, M. L. **Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 2019.

CUNHA, F. R. **Projeto e aplicações de sensor ótico por turbidimetria**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ. 2002.

DE SOUSA, J.L.U; MONTEIRO, R.A.B. Fatores Interferentes na Fermentação Alcoólica para a Produção de etanol. **FAZU em Revista**, n. 8, 2011. Uberaba, MG. ISSN: 1806-1699.

FACCIOTTI, M. C. R. **Fermentação Contínua**. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. V. 2, 1ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda, 2001. Cap. 12.

FERNANDES, S. R. N. **Implementação e validação de um novo método para determinação de dextrose equivalente em cereais hidrolisados enzimaticamente**. Dissertação (Mestre em Bioquímica Alimentar) – Universidade de Aveiro, Portugal. 2017.

FREYRE, G. **Açúcar: Uma sociologia do doce, com receitas de bolos e doces do Nordeste do Brasil**. Editora Global. 5ª edição revista. São Paulo, Global Editora, 2007.

GUIDINI, C. Z. **Fermentação Alcoólica e Batelada Alimentada Empregando *Saccharomyces cerevisiae* de Características Floculantes**. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG. 2013.

IKEZIRI, L. M. *et al.* A perspectiva da indústria 4.0 sobre a filosofia de gestão Lean Manufacturing. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v. 6, n. 1, p.1274-1289. 2020. ISSN 2525-8761.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4ª ed. (1ª Edição digital). 2008.

LOBO, A. E. **Relatório de atividade profissional**. Mestrado em Ciências – Universidade do Minho, Braga, Portugal. 2012.

LOPES, C. H.; BORGES, M. T. M. R. **Controle químico do processamento sucroalcooleiro**. Coleção UAB–UFSCar: Tecnologia das fermentações. São Carlos, EdUFSCAR, 2011.

LUCENA, B. T. L. **Análise de polimorfismos cromossômicos em linhagens de leveduras de fermentação alcoólica**. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE. 2004.

MALDONADE, I. R. *et al.* **Protocolo para determinação de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson**. Embrapa: Comunicado técnico 86. Mar. de 2013. ISSN 1414-9850.

MEDINA, J. **Cana-de-açúcar: a Cultura que potencializou o Brasil!** s.d. Disponível em: <https://agropos.com.br/cana-de-acucar/>. Acesso em 07/11/2021.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, US, v. 31, n. 3, p. 426- 428. 1959.

NAVES, R. F. *et al.* Contaminação microbiana nas etapas de processamento e sua influência no rendimento fermentativo em usina alcooleira. **Enciclopédia Biosfera**, vol.6, N.11. Centro Científico Conhecer - Goiânia, GO. 2010.

OHASHI, F. H. **O advento, crescimento, crise e abandono do Proálcool**. Trabalho de graduação. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2008.

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

PAULILLO, S. C. L. **Leveduras personalizadas para a produção de etanol: seleção dirigida pelo processo**. Fermentec – Tecnologias em Açúcar e Etanol Ltda, Piracicaba, SP. 2015.

RHYNER, M. *et al.* **Cellular Analysis using the Coulter Principle**. Beckman Coulter. s.d. Disponível em: <https://www.beckman.com/resources/reading-material/application-notes/cellular-analysis-using-the-coulter-principle>. Acesso em 08/08/2022.

RIBEIRO, C. A. F.; BLUMER; S. A. G.; HORII, J. **Fundamentos de tecnologia sucroalcooleira, 2ª parte**. Piracicaba, SP, 1999. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/2214646/mod_resource/content/1/Apostila%20de%20%C3%A1lcool.pdf. Acesso em 06/02/2022.

RIZZON, L. A. (editor técnico). **Metodologia para análise de mosto e suco de uva**. 1ª edição - Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2010.

RODRIGUES, G. S. S. C.; ROSS, J. L. S. A agroindústria sucroalcooleira e o proálcool. **A trajetória da cana-de-açúcar no Brasil: perspectivas geográfica, histórica e ambiental** [online]. EDUFU Uberlândia, MG, 2020. ISBN: 978-65-86084-00-9.

RODRIGUES, K. C. S. *et al.* Real-Time Monitoring of Bioethanol Fermentation with Industrial Musts Using Mid-Infrared Spectroscopy. **Industrial & Engineering Chemical Research**, v. 57, 2018, 10823–10831.

ROSA, H. **Técnicas de reciclo de protease visando a desfloculação celular de *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP. 2008.

ROSSETO, R. E. *et al.* Panorama do etanol brasileiro. **Acta Iguazu**, v. 6, n. 5, p. 13-22, 2017. ISSN: 2316-4093.

SALLA, D. A. **Análise energética de sistemas de produção de etanol de mandioca, cana-de-açúcar e milho**. Dissertação (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, SP. Maio de 2018.

SANTOS JUNIOR, F. G. **Desenvolvimento de uma nova versão do injetor comutador automático: determinação fotométrica de etanol em bebidas destiladas**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Carlos, SP. 2012.

SANTOS, L. M. A. *et al.* Produção de álcool anidro mais limpa. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**. Ano 04, Ed. 11, Vol. 03, pp. 67-80. 2019.

SANTOS, M. V. *et al.* Real-Time Monitoring of Ethanol Fermentation Using Mid-Infrared Spectroscopy Analysis of the Gas Phase. **Industrial & Engineering Chemical Research**, v. 61, 2022, 7225–7234.

Sindicato da indústria do açúcar e do álcool no estado de Alagoas. **Evolução da produção de etanol no Brasil de 1978/1979 a 2020/2021**. Disponível em: <https://www.sindicucar-al.com.br/app/uploads/2022/02/Producao-Etanol-Brasil.pdf>. Acesso em 13/08/2022.

SKOOG, D. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª edição norte-americana. São Paulo: Editora Thomson, 2006.

SONEGO, J. L. S. **Estudo da produção de etanol de sacarose por fermentação extrativa utilizando arraste com dióxido de carbono**. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 2016.

SOUZA, H. F. *et al.* **Uso do método ácido 3,5-dinitrosalicílico (ADNS) para quantificação de lactose em alimentos e suas aplicações**. 12º Fórum de Ensino, Pesquisa, Extensão e Gestão (FEPEG). Universidade Estadual de Montes Claros, MG. 2018. ISSN: 1806-549X

SOUZA, L. C.; ROCHA, A. F. F.; VIANA, T. N. **Análise da implementação do controle de temperatura em uma indústria automotiva**. Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia. Resende, Rio de Janeiro. 2015.

SZMRECSÁNNYI, T.; SÁ, A. C. **Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA)**. Disponível em: <http://www.fgv.br/cpdoc/acervo/dicionarios/verbete-tematico/instituto-do-acucar-e-do-alcool-iaa>. Acesso em 07/11/2021.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2017.

TREVISAN, D. P.; MOSCHINI, L. E. Evolução do mercado de cana-de-açúcar. **Revista de Ciências Agroambientais**, v. 16, n. 2, São Carlos, 2018. DOI: 10.5327/Z1677-606220192515.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGAO, F. A. S. **Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e**

estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocessos. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, CE. 2013

VELOSO, I. I. K. **Uso de diferentes técnicas de medida da concentração celular de *Saccharomyces cerevisiae* em meio fermentativo.** Trabalho de graduação em Engenharia Química – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 2017.

VELOSO, I. I. K. **Modelagem e otimização da fermentação alcoólica em batelada alimentada a baixa temperatura.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2019.

VIDAL, M. F. Produção e mercado de etanol. **Caderno Setorial do Escritório Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste**, n. 159 – Banco do Nordeste. Abril de 2021. Disponível em: https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/906/1/2021_CDS_159.pdf. Acesso em 13/08/2022.

VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. Q. **Microbiologia Aplicada.** Rede e-Tec Brasil. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Inhumas, 2012.