



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**LEILIANE DO SOCORRO SODRÉ DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL PELA  
FERMENTAÇÃO DO CALDO DE MANDIOCABA (*Manihot esculenta* Crantz)**

**BELÉM**  
**2013**

**LEILIANE DO SOCORRO SODRÉ DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL PELA  
FERMENTAÇÃO DO CALDO DE MANDIOCABA (*Manihot esculenta* Crantz)**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Química da  
Universidade Federal do Pará  
(PPEQ) para obtenção do Grau de  
Mestre em Engenharia Química.

ORIENTADOR: Prof. Dr. LUIZ FERREIRA DE FRANÇA

BELÉM  
2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Souza, Leiliane do Socorro Sodré de, 1988-  
Avalia o do processo de produ o de etanol  
pela fermenta o do caldo de mandiocaba (manihot  
esculenta crantz) / Leiliane do Socorro Sodré de  
Souza. - 2013.

Orientador: Luiz Ferreira de França.  
Disserta o (Mestrado) - Universidade Federal  
do Pará, Instituto de Tecnologia, Programa de  
Pós-Gradua o em Engenharia Química, Belém,  
2013.

1.  lcool como combustível. 2.  lcool-  
indústria. 3. Mandioca. 4. Fermenta o. I.  
Título.

CDD 22. ed. 662.88

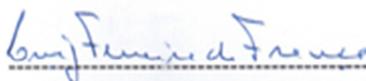
---

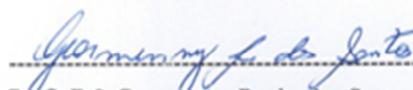
LEILIANE DO SOCORRO SODRÉ DE SOUZA

AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE ETANOL PELA FERMENTAÇÃO  
DO CALDO DE MANDIOCABA (*Manihot esculenta* Crantz)

BANCA EXAMINADORA

Data da Avaliação: 25 / 02 / 2013

  
----- Orientador  
Prof. Dr. Luiz Ferreira de França  
PPEQ/ITEC/UFPA

  
----- Membro  
Prof. Dr. Geormenny Rocha dos Santos  
PREQ/ITEC/UFPA

  
----- Membro  
Prof. Dr. Antonio Manoel da Cruz Rodrigues  
PPGCTA/ITEC/UFPA

*Dedico este trabalho,*

*Aos meus pais, Cilene Sodré e Nonato Oliveira, por toda a dedicação, doação, confiança, amor e carinho depositados na construção do meu futuro, não só como profissional, mas como pessoa; o melhor de mim com certeza vêm de vocês!*

*Aos meus irmãos Renata e Júnior, por todos os momentos alegres que passamos juntos, de grande importância neste momento, e para sempre.*

*Ao meu namorado Anderson Pereira, por estar sempre presente em minha vida.*

*Amo todos vocês!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho me ajudando assim a superar os momentos difíceis.

Aos meus pais, pelo apoio incondicional, e pela sabedoria da valorização da educação na minha criação. Sem vocês nada do que aconteceu em minha vida até hoje seria possível.

Aos professores Dr. Luiz França e Dra. Nádia Cristina, pela amizade, ensinamentos e exemplo profissional, e principalmente por permitirem o meu desenvolvimento através da liberdade e confiança transmitidas para a realização desta dissertação.

Ao meu namorado Anderson Pereira por todo carinho, apoio, amizade e paciência. Você foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao secretário do PPEQ, Ribamar, pela paciência e cooperação, e principalmente pelo exemplo do trabalho realizado com ética e excelência.

A CAPES, pela bolsa concedida.

Ao meu amigo, João Fernando. Espero dividir muitas risadas com você por muito tempo ainda.

A Ana Corrêa e a **Maria de Fatima** Araújo Almeida da Paz, pela realização da análise de teor alcoólico, no laboratório do Ministério da Agricultura (LANAGRO).

A Lorena Maciel pelo auxílio na realização deste trabalho.

A LNF pela doação das leveduras utilizadas neste estudo.

A toda minha família e amigos, por sempre torcerem por mim.

A todos que colaboraram de alguma maneira pelo desenvolvimento deste estudo.

Obrigada a todos!

## RESUMO

Foram realizadas determinações físico-químicas na raiz de mandioca, sendo estas: umidade, fibras, proteínas, cinzas, lipídios totais, açúcares redutores e totais; o caldo foi caracterizado através das análises de pH, sólidos solúveis totais, glicose e acidez titulável. Após o conhecimento dos constituintes físico-químicos da matéria-prima, o caldo de mandioca doce foi extraído e fermentado utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Foram realizados 15 ensaios que seguiam as condições determinadas através do planejamento experimental de Box-Behnken, com 3 variáveis independentes: temperatura (°C) (X1), pH (X2), e concentração de inóculo (g/L) (X3); os limites dos níveis de trabalho foram determinados através de dados encontrados na literatura; a análise estatística foi realizada com  $p > 0,05$ . Através da análise de variância foi proposto um modelo polinomial de segunda ordem para a resposta teor alcoólico (°Gl), e com a utilização da metodologia de superfície de resposta à condição ótima para o desenvolvimento do processo fermentativo do caldo de mandioca doce sem adição de nutrientes e em sua concentração de substrato original (6,46 g/L), a: temperatura de 28°C, pH de 4,88, e concentração de inóculo de 10 g/L. Nestas condições foi realizado um ensaio, cujo objetivo foi o de levantar as curvas de crescimento celular (levedura), produção de CO<sub>2</sub>, consumo de açúcares redutores e produção de etanol, para melhor compreensão do processo de fermentação do caldo de mandioca doce. Através da curva de crescimento celular foi determinada a duração da fase exponencial, utilizando o método de regressão linear; neste estudo esta etapa ocorreu em diferentes intervalos de tempo. O valor de  $\mu_m$  encontrado foi de 0,05 h<sup>-1</sup>.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*, mandioca doce, box-behnken, fermentação, açúcares redutores

## ABSTRACT

The physico-chemical characteristics identified at sweet cassava root, was: moistures (%), fiber (%), protein (%), ash (%), total lipids (%), reducing sugars and total reducing sugars (%); the sap extract from sweet cassava root was characterized by pH, soluble solids (%), glucose and titratable acidity. This study used the yeast *Saccharomyces cerevisiae* PE-2. Was realized 15 tests that followed the conditions determined by the experimental design of Box-Behnken, with 3 independent variables: temperature (°C) (X1), pH (X2) and concentration of inoculum (g/L) (X3). The statistical analysis was performed with  $p > 0,05$ . Through the analysis of variance (ANOVA) was proposed a second order polynomial model to the alcohol content (°GL), and by analysis of response surfaces it was determined the optimum condition to the fermentation of sap extract from sweet cassava root without addition of nutrients, on original substrate concentration of it (6,46 g/L): 28 °C (temperature), 4,88 (pH) and 10 g/L (inoculum concentration). Under these conditions a test was conducted, which aimed to raise the curves of cell growth (yeast), CO<sub>2</sub> production, consumption of sugars and ethanol production, to better understand the process of fermentation broth of sweet cassava. Through the cellular growth curve was determined the duration of the exponential phase, using the method of linear regression; this step in this study occurred at different time intervals. The value found to  $\mu_m$  was 0,05 h<sup>-1</sup>.

Key-words: sweet cassava, *saccharomyces cerevisiae*, box-behnken, fermentation, reducing sugars

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fluxograma 1	Rotas tecnológicas para a produção de bioetanol	18
Figura 1	Estrutura típica da cana-de-açúcar	19
Figura 2	A estrutura do amido (amilose)	20
Figura 3	Esquema ilustrativo da formação da celulose	21
Fotografia 1	Raiz de mandiocaba	22
Reação 1	Sequência das reações enzimáticas na fermentação alcoólica	25
Figura 4	Sistema de fermentação contínua	26
Figura 5	Variáveis que podem influenciar no processo fermentativo	29
Gráfico 1	Influência da temperatura na fermentação alcoólica	30
Figura 6	Célula de levedura ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	34
Figura 7	Gráfico prismático	36
Fotografia 2	Raiz de Mandiocaba com casca e sem casca	43
Fotografia 3	Extração do caldo de Mandioca doce	45
Fluxograma 2	Balanço de massa do processo	46
Fotografia 4	Mosto antes e depois da retiradas das células da levedura	51
Fluxograma 3	Procedimento para produção de etanol	51
Fotografia 5	Destilação do mosto fermentado	54
Fotografia 6	Densímetro digital de bancada	54
Gráfico 2	Cinética de formação de CO <sub>2</sub>	59
Gráfico 3	Cinética de liberação de CO <sub>2</sub> à 25°C	60
Gráfico 4	Cinética de liberação de CO <sub>2</sub> à 30 °C	61
Gráfico 5	Cinética de liberação de CO <sub>2</sub> a 35°C	62

Gráfico 6	Diagrama de Pareto dos efeitos individuais e combinados	64
Gráfico 7	Distribuição de probabilidade normal do modelo	66
Gráfico 8	Superfície de resposta com X1 (temperatura) e X2 (pH)	67
Gráfico 9	Curvas de contorno (X1 e X2)	68
Gráfico 10	Superfície de resposta com X1 (temperatura) e X3 (concentração de inóculo)	69
Gráfico 11	Curvas de contorno (X1 e X3)	69
Gráfico 12	Superfície de resposta com X2 (pH) e X3 (concentração de inóculo)	70
Gráfico 13	Curvas de contorno (X3 e X2)	71
Gráfico 14	Curvas de consumo, crescimento e produção	72

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Comparação da eficiência dos planejamentos PBB e PCC	36
Tabela 2	Delineamento fatorial de Box-Behnken	48
Tabela 3	Variáveis independentes e seus valores codificados	49
Tabela 4	Características físico-químicas da raiz	57
Tabela 5	Características físico-químicas do caldo	58
Tabela 6	Matriz de experimentos de Box-Behnken	58
Tabela 7	Estimativa dos efeitos	63
Tabela 8	Proposta de um modelo polinomial	65
Tabela 9	Resultados das regressões multilinear e linear	73
Tabela 10	Resultados da determinação da fase exponencial de crescimento	74

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
1.1 OBJETIVOS .....	15
<b>1.1.1 Objetivo geral</b> .....	<b>15</b>
<b>1.1.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>15</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>16</b>
2.1 ETANOL .....	16
2.2 MATÉRIAS-PRIMAS PARA OBTENÇÃO DE ETANOL.....	17
<b>2.2.1 Biomassa açucarada</b> .....	<b>18</b>
<b>2.2.2 Biomassa amilácea</b> .....	<b>19</b>
<b>2.2.3 Biomassa lignocelulósica</b> .....	<b>20</b>
2.3 MANDIOCA DOCE .....	21
2.4 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA .....	22
2.5 TIPOS DE PROCESSOS FERMENTATIVOS .....	25
<b>2.5.1 Fermentação contínua</b> .....	<b>26</b>
<b>2.5.2 Fermentação descontínua</b> .....	<b>26</b>
2.6 INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS SOBRE A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA .....	28
<b>2.6.1 Efeito da temperatura</b> .....	<b>29</b>
<b>2.6.2 Efeito do pH</b> .....	<b>30</b>
<b>2.6.3 Nutrientes</b> .....	<b>31</b>
<b>2.6.4 Contaminação por bactérias</b> .....	<b>32</b>
<b>2.6.5 Concentração do inóculo</b> .....	<b>32</b>
<b>2.6.6 Concentração do substrato</b> .....	<b>33</b>
2.7 LEVEDURAS .....	34
2.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	35
2.9 ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	36

2.10 MODELAGEM MATEMÁTICA NOS PROCESSOS FERMENTATIVOS .....	40
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>43</b>
3.1 MANDIOCA DOCE .....	43
3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA RAIZ DE MANDIOCA DOCE .....	43
3.3 EXTRAÇÃO DO CALDO DA MANDIOCA DOCE .....	45
3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO CALDO DA MANDIOCA DOCE .....	46
3.5 EXPERIMENTOS DE FERMENTAÇÃO .....	47
<b>3.5.1 Testes iniciais da fermentação do caldo.....</b>	<b>47</b>
<b>3.5.2 Análise estatística dos dados.....</b>	<b>52</b>
<b>3.5.3 Cinética de fermentação.....</b>	<b>53</b>
3.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	53
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA RAÍZ.....	57
4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO CALDO .....	57
4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO.....	58
4.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CO <sub>2</sub> .....	59
4.5 OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL DA FERMENTAÇÃO .....	62
<b>4.5.1 Efeito das variáveis de entrada.....</b>	<b>62</b>
<b>4.5.2 Gráfico de pareto .....</b>	<b>64</b>
<b>4.5.3 Proposta de um modelo polinomial de segundo grau.....</b>	<b>65</b>
<b>4.5.4 Análise da superfície resposta e contornos.....</b>	<b>66</b>
4.6 PARÂMETROS CINÉTICOS .....	72
<b>4.6.1 Sistema de reações metabólicas.....</b>	<b>73</b>
<b>4.6.2 Fase exponencial .....</b>	<b>73</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>

## 1 INTRODUÇÃO

No início deste século, com a conscientização a nível mundial da necessidade de fontes renováveis de energia e de preservação do meio ambiente, surge uma nova perspectiva de produzir combustíveis a partir de matéria orgânica vegetal renovável (biomassa). Essa biomassa acumula energia luminosa graças à fotossíntese, sendo assim uma forma indireta de utilização da energia solar. Capaz de aliviar preocupantes problemas ambientais, a energia fotossintética traz uma nova dinâmica ao mundo agroindustrial e oferece uma alternativa à evolução industrial em um contexto mais racional e sustentável (MARABEZI, 2009).

A biomassa pode ser obtida de vegetais não-lenhosos, de vegetais lenhosos, como é o caso da madeira e seus resíduos, e também de resíduos orgânicos, nos quais encontramos os resíduos agrícolas, urbanos e industriais. Assim como também se pode obter biomassa dos biofluidos, como os óleos vegetais (por exemplo, mamona e soja) (CORTEZ, LORA E GÓMEZ, 2008).

O etanol é produzido desde os tempos antigos pela fermentação dos açúcares encontrados em produtos vegetais (cereais, beterraba e cana). Ainda hoje, boa parte do etanol industrial é feita por meio da fermentação, embora também seja feita sinteticamente de fontes como o eteno derivado do petróleo (BASTOS, 2007).

A diversidade de matérias prima que podem ser utilizadas para a produção de etanol é cada vez maior, entre elas, destacam-se: as açucaradas (cana de açúcar, beterraba e a mandioca), as lignocelulósicas (madeira, palha da cana de açúcar) e amiláceas (mandioca).

São inúmeras as raízes e tubérculos que apresentam alto teor de carboidratos, na forma de açúcares, amido e outros polissacarídeos que podem ser fermentados para a produção de bebidas alcoólicas e etanol. Este último pode ser usado para fins carburante, farmacêutico, medicinal, químico, doméstico, na produção de bebidas alcoólicas, etc (AGRIANUAL, 1999).

Atualmente, vêm recebendo amplo destaque entre pesquisadores e produtores de mandioca do Brasil e do mundo, o cultivar de mandioca popularmente conhecidos como mandioca açucarada ou mandioca, que armazenam açúcares livres em suas raízes de reserva e não somente amido, como a grande maioria cultivada comercialmente. O acúmulo de grandes quantidades de glicose devido à adaptação das células do parênquima de reserva que antes acumulavam amido é a maior diferença entre a mandioca açucarada e os outros cultivares (CARVALHO, CABRAL e CAMPOS, 2000; CARVALHO *et al.* 2004; VIEIRA, 2011).

A levedura como entidade viva independente, realiza a fermentação do açúcar com o objetivo de conseguir a energia química necessária à sua sobrevivência, sendo o etanol apenas e tão somente um subproduto deste. Se o homem pretende beneficiar-se desta habilidade metabólica, ele deve buscar os conhecimentos que lhe permitam propiciar às leveduras, condições ideais para que as mesmas trabalhem a seu favor, isto é, com maior eficiência na produção de etanol (AMORIM e LEÃO, 2005).

O processo de fermentação pode ser afetado em termos de rendimento e eficiência da conversão de açúcar em álcool, por diversos fatores que podem ser de origem física (temperatura, pressão osmótica), química (inibidores, pH, oxigenação, nutrientes orgânicos e minerais) e microbiológica (linhagem, espécie, contaminação bacteriana, concentração de leveduras) (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

A proposta de produzir etanol a partir da mandioca açucarada é uma opção para incluir outras regiões no setor sucroalcooleiro, como a Amazônia, e o Centro-Oeste, sem que isso signifique concorrência com o etanol de cana-de-açúcar, fator importante visto que os principais indicadores considerados na elaboração do zoneamento agroecológico da cana-de-açúcar foram a vulnerabilidade das terras, o risco climático, o potencial de produção agrícola sustentável e a legislação ambiental vigente, sendo que o bioma Amazônia e outros ficam excluídos, não podendo então haver o cultivo de cana-de-açúcar nestas regiões.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

- Estudar a fermentação do caldo de mandioca doce para a produção de etanol, buscando ajustar modelos representativos das reações metabólicas envolvidas no processo, como forma de viabilizar o entendimento da cinética do processo.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Caracterizar físico-quimicamente a raiz e o caldo da mandioca doce;
- Definir a condição ideal para a fermentação do caldo de mandioca doce, utilizando a metodologia de superfície de resposta para avaliar a influência das variáveis temperatura (°C), pH e concentração de inóculo (g/L);
- Avaliar o desenvolvimento das curvas de consumo de açúcares redutores, crescimento do microrganismo, produção de CO<sub>2</sub> e produção de etanol; nas condições determinadas na metodologia de superfície de resposta;
- Definir, através de regressão multilinear e linear qual o sistema de reações metabólicas da fermentação em estudo;
- Determinar a duração da fase exponencial de crescimento do microrganismo usado.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ETANOL

O uso do etanol como combustível se iniciou na Europa na época da Segunda Guerra Mundial. De 1939 a 1945, ocorreu à falta da gasolina, o que fez necessária a substituição deste combustível por álcool etílico, porém no final da guerra, pela retomada da importação de gasolina, o combustível perdeu sua importância (LIMA, BASSO E AMORIM, 2001).

No Brasil, o uso do etanol como combustível ganhou importância através do Programa Nacional do Álcool – PROÁLCOOL, instituído através do decreto N° 76.593 de 14 de Novembro de 1975 pelo Governo Federal. Desde então o investimento em pesquisa e desenvolvimento tem elevado continuamente as produtividades agrícola e industrial.

O principal uso do etanol é como combustível líquido, misturado à gasolina ou usado como insumo na fabricação de aditivo à gasolina (o etil terc butil éter - ETBE, derivado do petróleo, tem sido proibido pelo risco de contaminação de águas subterrâneas). O uso como combustível (na proporção de 20% a 100%) é praticamente exclusivo do Brasil e dos Estados Unidos, enquanto o uso como aditivo (2% a 10%) ocorre nos EUA, Europa, Índia e China, entre outros países (BASTOS, 2007).

O etanol é uma substância orgânica obtida por meio da fermentação de açúcares, hidratação do etileno (hidrocarboneto alceno) ou redução ao acetaldeído. Possui como fórmula química  $C_2H_5OH$ , e também pode ser chamado de álcool etílico.

O álcool pode ser produzido por três vias: destilatória (a partir de fermentações de resíduos semi-sólidos das vinícolas), por via sintética (a partir dos hidrocarbonetos insaturados, como eteno, etino, de gases de petróleo e da hulha) e a via fermentativa. Na via fermentativa a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a principal responsável pela fermentação do substrato e consequente produção de álcool. A fermentação da sacarose na produção de álcool e sua degradação podem ser feita por leveduras ou ainda por microrganismos contaminantes (MOREIRA *et al.*, 2008).

No país, podem-se considerar dois tipos de destilarias de álcool: as anexas e as autônomas. As primeiras são parte integrante de uma usina de açúcar, podendo utilizar o caldo ou méis e as segundas são independentes com matéria prima própria (CAMPOS, 1980).

O etanol tem sido considerado uma alternativa para diminuir problemas ambientais e energéticos no mundo, em razão da escassez e alta dos preços dos combustíveis fósseis e da

população causada por estes. Comparado com combustíveis fósseis, o etanol apresenta as vantagens de ser uma fonte renovável de energia, que contribui com a redução das emissões de dióxido de carbono (PACHECO, 2010).

As matérias-primas para produção de etanol no mundo são as mais diversas, incluindo melão de cana de açúcar, caldo de cana, mandioca, grãos, madeira, resíduos de agricultura, palha, resíduos domésticos, urbanos e industriais (LIMA, BASSO E AMORIM, 2001).

## 2.2 MATÉRIAS-PRIMAS PARA OBTENÇÃO DE ETANOL

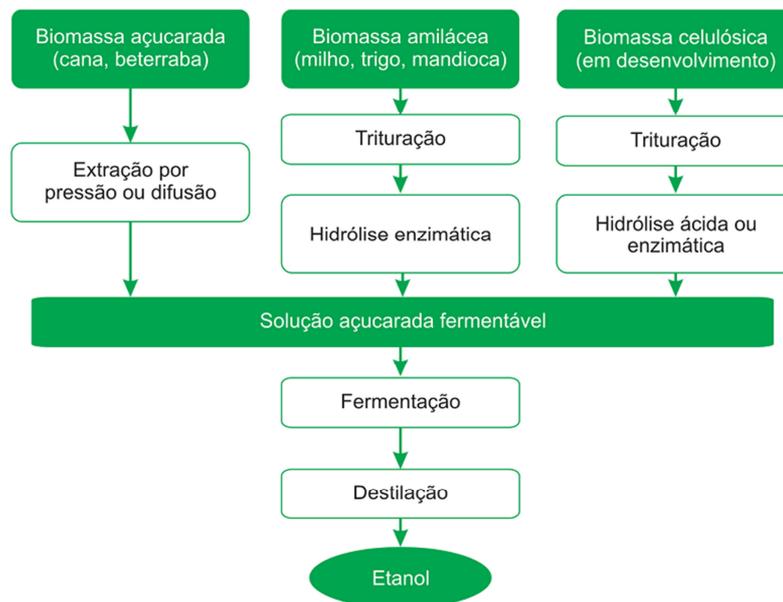
A produção de bioetanol é efetuada em bases comerciais por duas rotas tecnológicas:

- a) A partir de matérias-primas doces, diretamente fermentáveis, como a cana-de-açúcar e a beterraba açucareira;
- b) A partir de matérias-primas amiláceas, como o milho e o trigo, cujo amido deve ser convertido em açúcares (sacarificado) antes da fermentação.

Uma terceira rota, utilizando a biomassa disponível em materiais como o bagaço e a palha, hidrolisando as cadeias celulósicas e produzindo uma solução fermentável de açúcares, vem apresentando grande interesse graças ao baixo custo da matéria-prima.

O Fluxograma 1 apresenta o processamento dos três tipos de matérias-primas citadas acima. O fluxograma mostra que a produção de etanol utilizando a biomassa açucarada não necessita da etapa de hidrólise, fato que torna esse tipo de rota mais simples e com melhor balanço energético.

Fluxograma 1: Rotas tecnológicas para a produção de bioetanol

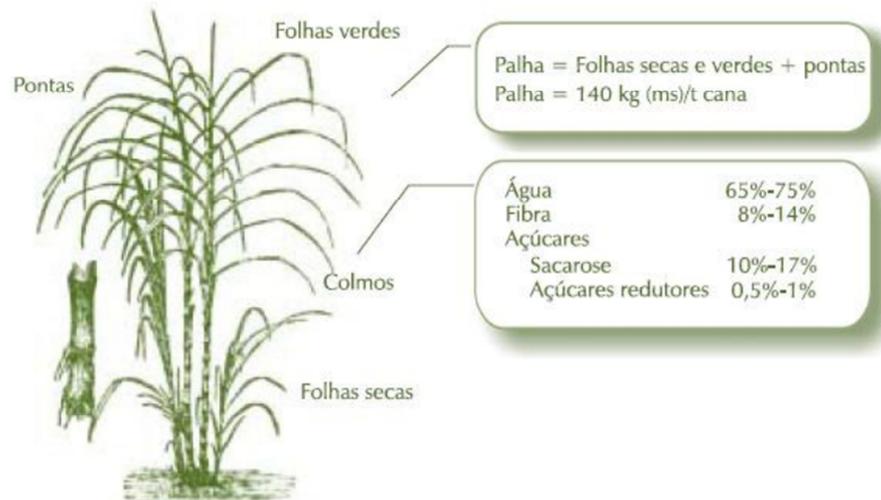


Fonte: NOGUEIRA *et al.*, 2008

### 2.2.1 Biomassa açucarada

A produção com base em biomassa açucarada, como é o caso da cana (Figura 1) e da beterraba, o processo é mais simples, envolvendo menos operações unitárias, uma vez que os açúcares disponíveis na biomassa são diretamente fermentáveis, dispensando etapas de hidrólise, comum nas matérias-primas amiláceas. Simplificadamente, o processo consiste na extração dos açúcares (por meio da moagem e/ou da difusão), que podem seguir diretamente para a fermentação.

Figura 1: Estrutura típica da cana-de-açúcar



Fonte: SEABRA, 2008

Dentre as matérias açucaradas costuma-se distinguir as diretamente fermentáveis e as não diretamente fermentáveis. As primeiras são as que contêm monossacarídeos e se limitam aos sucos de frutas. Sua importância reside na produção de álcool em bebidas como o vinho e a cidra. Já as não diretamente fermentáveis são as que contêm dissacarídeos, que fermentam após uma hidrólise, a qual se dá o nome de inversão, e que se realiza naturalmente por ação da invertase, enzima produzida pelo agente de fermentação. O dissacarídeo sacarose é o representante mais importante dos componentes da cana de açúcar e dos melaços (LIMA, BASSO E AMORIM, 2001).

### 2.2.2 Biomassa amilácea

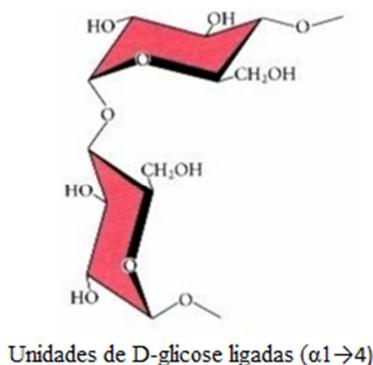
O milho e a cevada são exemplos de biomassa amilácea, estes por sua vez, são os mais utilizados na indústria de fermentação; a batata e a mandioca também são matérias-primas que podem ser citadas para esta mesma finalidade.

A produção de álcool etílico a partir dos resíduos da indústria da mandioca acena como uma alternativa para transformar o resíduo amiláceo em um produto de valor agregado, gerando para a indústria não só receita como todos os benefícios mercadológicos de uma indústria limpa. Este amido (Figura 2) não é disponível à levedura alcoólica e necessita de uma transformação a mono e dissacarídeos fermentescíveis, que pode ser realizada utilizando

amilases no processo de hidrólise. Esta etapa é imprescindível para disponibilizar os açúcares redutores requeridos à fermentação (BRINGHENTI e CABELLO, 2005).

O bioetanol pode ser produzido de milho por meio de dois processos, adotando moagem úmida ou seca. Apesar de desenvolver-se rapidamente no início, o processo de liberação de açúcares reduz sua velocidade em pouco tempo, o que pode exigir tempos de residência nos reatores de 48 a 72 horas para alcançar a máxima sacarificação do amido. Para reduzir esse tempo de residência e o risco de contaminação, muitas unidades desenvolvem a sacarificação e a fermentação de modo simultâneo. Nesse caso, a conversão à glicose também é diminuída, mas, para os processos que utilizam o *backsetting*, os açúcares não convertidos ganham com o reciclo mais uma oportunidade de serem aproveitados. Como no caso do bioetanol de cana, na fermentação, a glicose é transformada em bioetanol pela ação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e o vinho produzido segue para a destilação (NOGUEIRA *et al.*, 2008).

Figura 2: A estrutura do amido (amilose)



Fonte: LEHNINGHER, NEX e COX, 1995

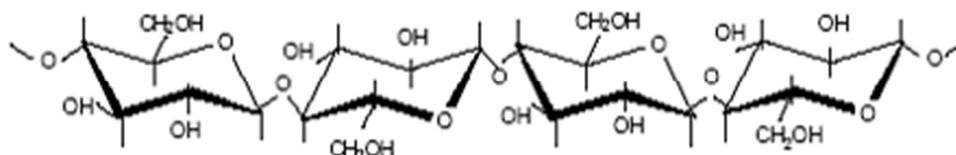
### 2.2.3 Biomassa lignocelulósica

Materiais lignocelulósicos, como o bagaço de cana-de-açúcar (Figura 3), são os mais abundantes complexos orgânicos de carbono na forma de biomassa de planta e consistem principalmente de três componentes: celulose, hemicelulose e lignina (BADHAN *et al.*, 2007).

A fabricação do etanol com base nessas fontes é possível, mas exigirá o domínio de processos e tecnologias ainda não completamente dominados e desenvolvidos no mundo, no

nível comercial. A conversão da celulose e da hemicelulose em etanol é possível, mas os processos são caros e complexos. Essas tecnologias correspondem aos processos de hidrólise ácida (processo químico) ou enzimática (processo biotecnológico), para chegar aos açúcares e, depois, por fermentação, produzir o etanol propriamente dito (BASTOS, 2007).

Figura 3: Esquema ilustrativo da formação da celulose



Fonte: Klock, *et al.*,(2005)

### 2.3 MANDIOCA DOCE

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), espécie da família Euforbiaceae é uma espécie domesticada pelas populações pré-colombianas há cerca de seis a sete mil anos atrás, com o objetivo de armazenar amido nas raízes e ser multiplicada vegetativamente. O processo seletivo foi tão eficiente que a mandioca tornou-se a base alimentar de várias populações indígenas e, complementar para outras. Até os dias de hoje desempenha importante papel sócio-econômico em vários países tropicais, principalmente na África e na América (FAO, 2011).

Atualmente, vêm recebendo amplo destaque entre pesquisadores e produtores de mandioca do Brasil e do mundo, o cultivar de mandioca popularmente conhecidos como mandioca açucarada ou mandiocaba (Fotografia 1), que armazenam açúcares livres em suas raízes de reserva e não somente amido, como a grande maioria cultivada comercialmente. O acúmulo de grandes quantidades de glicose devido à adaptação das células do parênquima de reserva que antes acumulavam amido é a maior diferença entre a mandioca açucarada e os outros cultivares (CARVALHO *et al.* 2004; CARVALHO, CABRAL e CAMPOS, 2000; VIEIRA, 2011).

Fotografia 1: Raiz de mandiocaba



Esta matéria-prima evidencia o seguinte potencial de produção na indústria: xarope de glicose, sem a necessidade da hidrólise do amido; amido com variabilidade na proporção amilose/amilopectina; bebidas fermentadas; e álcool combustível, entre outras utilidades (CARVALHO *et al.* 2004; CARVALHO *et al.* 2000).

Esta variedade de mandioca descoberta na região amazônica pode tornar o processo de produção de bioetanol mais lucrativo. Por conter grande quantidade de açúcares na raiz e menor quantidade de amido, reduz a etapa de hidrólise do amido na produção de álcool.

#### 2.4 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

As origens da fermentação se perdem na história antiga, talvez até mesmo na pré-história. Sabe-se que os antigos egípcios e sumérios tinham conhecimento das técnicas utilizada para converter os grãos de amido em álcool (MCNEIL e HARVEY, 1990).

O termo “fermentação” é derivado do verbo latim *fervere*, ferver, assim, descrevendo a aparência da ação da levedura em extratos de frutos ou de cereais maltados. O aparecimento de ebulição é devido à produção de bolhas de dióxido de carbono causadas pelo catabolismo anaeróbico dos açúcares presentes no extrato (STANBURY, WHITAKER e HALL, 1995).

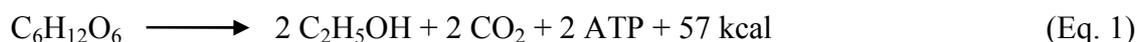
A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico que ocorre com a transformação de açúcares, em etanol e CO<sub>2</sub>, catalisado por enzimas. Este processo é realizado principalmente por leveduras, em nível citoplasmático, com o objetivo de produzir energia, a qual será empregada na realização de suas atividades fisiológicas, e ainda para seu crescimento e reprodução, sendo, o etanol, tão somente, um subproduto desse processo. Pasteur definiu este processo como “vida sem ar” (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001; WENDHAUSEN, 1998).

A transformação do açúcar (glicose) em etanol e CO<sub>2</sub> envolvem 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. Tal aparato enzimático está confinado no citoplasma celular, sendo, portanto nessa região da célula que a fermentação alcoólica se processa. Essas enzimas, referidas como glicolíticas, sofrem ações de diversos fatores (nutrientes, minerais, vitaminas, inibidores, substâncias do próprio metabolismo, pH, temperaturas e outros), alguns que estimulam e outros que reprimem a ação enzimática, afetando o desempenho do processo fermentativo conduzido pelas leveduras (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Existem dois ciclos distintos que definem o processo de transformação de açúcares solúveis em moléculas menores pela ação de levedura. O primeiro denominado glicólise tem a função de quebrar a molécula de glicose até ácido pirúvico, através de uma série de reações catalisadas por enzimas específicas, que se situam na parede celular e no interior da célula. Dois principais modos de utilização de piruvato na produção de energia podem ser distinguidos: respiração e fermentação. Na ausência de oxigênio (fermentação) há uma tendência para a atuação das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase, produzindo etanol e água a partir do ácido pirúvico. Porém na presença de oxigênio (respiração) há um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o ciclo de krebs, onde este será oxidado enzimaticamente a dióxido de carbono e água (SALVATO, 2010).

Os carboidratos considerados substratos para a fermentação tanto podem ser endógenos (constituintes da levedura, como o glicogênio e trealose) como exógenos (sacarose, glicose, frutose e outros), estes últimos fornecidos à levedura (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

De forma global, pode-se representar a fermentação alcoólica pela equação de Gay Lussac (Equação 1), na qual se observa que 1 mol de glicose (180 g) produz 2 moles de etanol (92 g), 2 moles de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (88 g) e 57 kcal de energia (LEHNINGER, NELSON e COLSON, 1995; KOLB, 2002).



Teoricamente, o rendimento é 0,511 para etanol e 0,489 para CO<sub>2</sub> em base mássica, utilizando como substrato uma hexose. Dois ATPs (Adenosina trifosfato) produzidos na glicólise são usados na condução da biossíntese das leveduras, que envolve diversas

bioreações que requerem energia. Portanto, a produção de etanol está fortemente relacionada com o crescimento das leveduras, o que significa que leveduras devem ser produzidas como subproduto. Sem o consumo contínuo de ATP pelo crescimento celular, o metabolismo glicolítico seria interrompido imediatamente, em razão do acúmulo intracelular de ATP, que inibe a fosfofrutoquinase, uma das mais importantes enzimas reguladoras da glicólise (BAI, ANDERSON e MOO-YOUNG, 2008). A Reação 1 apresenta a sequência das reações enzimáticas pela fermentação alcoólica de carboidratos endógenos (glicogênio e trealose) ou exógenos (sacarose e maltose), conduzida por *Saccharomyces cerevisiae*.



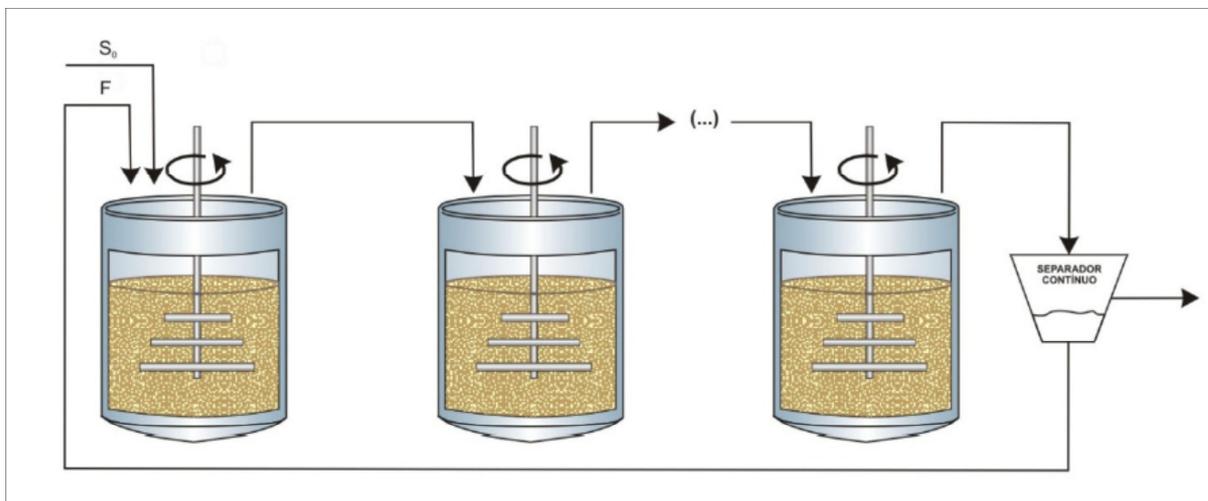
Existem dois tipos básicos de condução de processos fermentativos: a fermentação contínua e a fermentação descontínua.

### 2.5.1 Fermentação contínua

O processo contínuo de fermentação alcoólica pode ser dividido em três partes: unidade de tratamento ácido, fermentadores e unidade de separação de células (centrífugas). O número total de dornas de fermentação e o volume de cada uma delas tem sido objeto de estudo de diversos pesquisadores (VIEGAS, 2003).

Este processo não sofre interrupções, há a retirada contínua do produto a uma vazão igual à da alimentação, permitindo um fluxo contínuo, diminuindo assim, o efeito inibitório do etanol e do substrato, este sistema é representado pela Figura 4, onde  $S_0$  é a alimentação do sistema e  $F$  a realimentação que sai do separador contínuo. Esse tipo de processo atinge, quando bem operado, maior produtividade e rendimento (TOSETTO, 2002).

Figura 4: Sistema de fermentação contínua



Fonte: SANTOS, 2008

### 2.5.2 Fermentação descontínua

A fermentação descontínua ou fermentação por batelada tem seu modo de operação constituído da inoculação com microrganismos da solução nutriente esterilizada no fermentador no instante inicial e depois incubada, de modo a permitir que a fermentação ocorra sob condições ótimas. No decorrer do processo fermentativo nada é adicionado, exceto

oxigênio, no caso de processos aeróbicos (na forma de ar), antiespumante, e ácido ou base para controle do pH (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Conforme Dias (1982), processos descontínuos consistem em se adicionar certo volume de células de leveduras a um meio contendo cerca de 100 a 200 g/l de açúcar e nutrientes (geralmente sais de amônio e fosfato). Ao se adicionar as leveduras, inicia-se a fermentação, caracterizada por uma fase inicial, na qual não se observa fermentação, daí então passando para uma fase onde não se observa mais desprendimento de CO<sub>2</sub>. Este processo todo é realizado industrialmente num período de 6 a 15 horas.

Devido à crescente concentração de etanol nas dornas de fermentação, ocorre inibição no metabolismo do microrganismo diminuindo a velocidade da reação e consequentemente a produtividade (WENDHAUSEN, 1998).

Além do menor risco de contaminação, este processo apresenta grande flexibilidade de operação pela possibilidade de utilização dos fermentadores para a fabricação de diferentes produtos e por permitir uma melhor condição de controle com relação à estabilidade genética do microrganismo (CARVALHO e SATO, 2001), assim como a capacidade de identificar todos os materiais relacionados quando se está desenvolvendo um determinado lote de produto (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Ao término da atividade fermentativa, o meio fermentado (vinho) é enviado para o sistema de destilação. Os processos de fermentação em batelada, geralmente alcançam 92 a 94% do máximo rendimento teórico e apresentam produtividade em torno de 5 g/l.h (ALVES, 1996).

De acordo com Tosetto (2002) podem ser utilizados dois sistemas neste processo:

- a) Sistema de cortes: consiste em realizar inicialmente uma primeira fermentação, para em seguida o volume de mosto fermentado ser dividido em dois reatores, completando ambos com mosto original, e assim sucessivamente;
- b) Sistema de cultura pura ou pé-de-cuba: para cada fermentação, utiliza-se de uma cultura pura, adiciona-se o mosto até completar o volume do reator.

De maneira geral, o modo de operação de um processo descontínuo ou em batelada pode ser descrito da seguinte forma (CARVALHO e SATO, 2001):

- no instante inicial, o meio contendo os nutrientes (mosto) no fermentador, ou dorna, é inoculado com microrganismos;

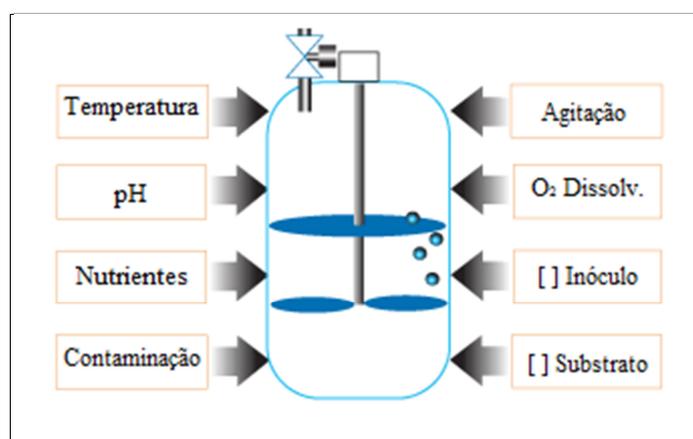
- inicia-se a fermentação, propiciando-se condições ótimas para o microrganismo agente;
- no decorrer do processo fermentativo, quando necessário, adiciona-se antiespumante, para dispersão imediata de espuma gerada;
- ao fim da fermentação, a dorna (fermentador) é descarregada e o meio fermentado segue para tratamentos finais;
- a dorna é lavada e recarregada com fermento e mosto, dando início a outro ciclo de fermentação.

A maior parte dos processos fermentativos utiliza o reator do tipo tanque com agitação convencional mecânica, que nada mais é que um eixo vertical contendo diversos agitadores em forma de pá. O ar estéril é introduzido, geralmente, pela base da dorna e através de dispersores é distribuído por todo o meio através do sistema de agitação. Portanto, a geometria dos fermentadores deve facilitar a eficácia da troca gasosa e as características finais deste fermentador deverão levar em conta os fenômenos de transporte existentes nos processos biológicos (NEVES, 2006).

## 2.6 INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS SOBRE A FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

A fermentação pode ser afetada em termos de rendimento e eficiência da conversão de açúcar em álcool, por diversos fatores que podem ser de origem física (temperatura, pressão osmótica), química (inibidores, pH, oxigenação, nutrientes orgânicos e minerais) e microbiológica (linhagem, espécie, contaminação bacteriana, concentração de leveduras) (Figura 5) (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Figura 5: Variáveis que podem influenciar no processo fermentativo



Fonte: EUROTHERM, 2012

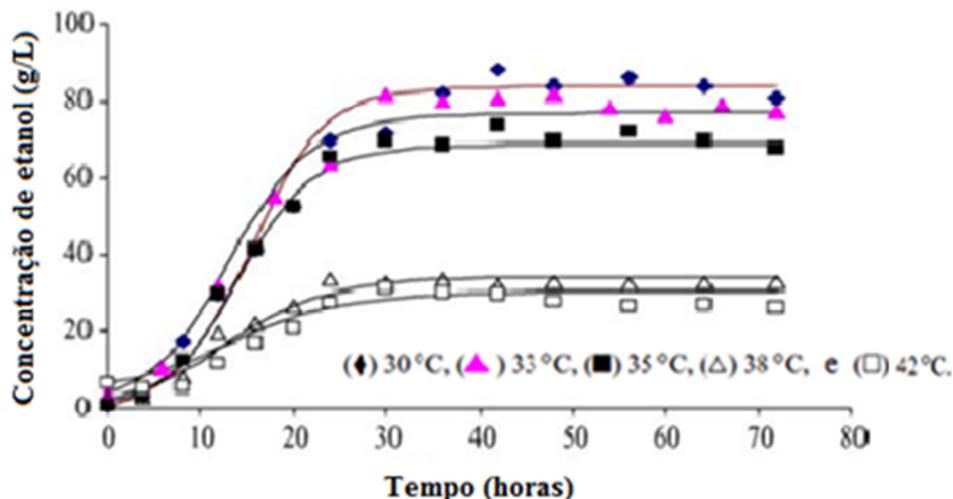
### 2.6.1 Efeito da temperatura

O efeito da temperatura no processo tem se mostrado como um importante fator a ser estudado para a otimização e aumento da produtividade em destilarias de álcool. Segundo Menezes (1980) e Lima, Basso e Amorim (2001) as temperaturas ótimas recomendadas situam-se na faixa de 26 a 35°C. Temperaturas inferiores ao limite retardam a fermentação e temperaturas superiores ocasionam a evaporação do álcool e favorecem o aparecimento de contaminações. À medida que a temperatura aumenta, a contaminação bacteriana é favorecida e a levedura fica mais sensível à toxidez do etanol. As linhagens industriais de *S.cerevisae* são normalmente resistentes à alta temperatura, mas este fator interfere na viabilidade celular quando em sinergia com a presença de etanol ou meio com baixo pH (SILVA FILHO *et al.*, 2005).

Torija *et al.*, (2003) afirmam que o rendimento alcoólico é maior em temperaturas mais baixas (15 a 20°C), porém requer um tempo maior para se alcançar a produção máxima. Quando a temperatura do biorreator é de 25°C a 31°C a taxa inicial de fermentação é maior, mas em temperaturas maiores que 35°C decresce a viabilidade celular.

Phisalaphong, Srirattana e Tanthapanichakoon (2006), em seu estudo sobre a investigação do efeito da temperatura nos parâmetros cinéticos da fermentação alcoólica, utilizando a levedura *S. cerevisiae* M30, em soluções de açúcar redutor (17-22% (p/v)) produzidas a partir de melaço de cana; encontraram que a produção de etanol e biomassa, passando de uma temperatura de fermentação de 30 para 33°C, aumentavam; porém acima de 35°C, estas voltavam a diminuir (Gráfico 1).

Gráfico 1: Influência da temperatura na fermentação alcoólica



Fonte: Phisalaphong, Srirattana e Tanthapanichakoon, (2006)

Resultados experimentais e simulação, de células, açúcar redutor e concentração de etanol em diferentes temperaturas de operação; as linhas correspondem à simulação do modelo enquanto os pontos correspondem aos dados experimentais de *S. cerevisiae* M30; crescimento em melão de cana.

À medida que a temperatura aumenta, eleva-se a velocidade da fermentação, mas favorece a contaminação bacteriana, ao mesmo tempo em que a levedura fica mais sensível a toxidez do álcool, levando a formação de metabólitos secundários como o glicerol. Por outro lado, temperaturas elevadas permitem maior perda de álcool por evaporação em dornas abertas. Tais aspectos justificam o controle da temperatura no processo industrial (LIMA, BASSO e AMORIM., 2001).

### 2.6.2 Efeito do pH

Em relação ao pH, sabe-se que as fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores, sendo adequada a faixa entre 4 e 5. Nos mostos industriais, os valores de pH geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5 (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001). A tolerância à acidez é outra característica importante para as leveduras industriais (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001), porém, sabe-se que valores muito baixos de pH, além de ocasionarem perda de nutrientes como nitrogênio e potássio, aumentam a sensibilidade ao etanol, aos ácidos orgânicos e ao SO<sub>2</sub> (GOMES, 1988).

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

Embora existam exceções, várias generalizações úteis podem ser feitas em relação à dependência de crescimento microbiano no pH. As bactérias crescem geralmente na faixa de pH 4,0 – 8,0; as leveduras preferem de 3,0 – 6,0 e as células eucarióticas superiores de 6,5 – 7,5. Como consequência, o pH pode ser usado para selecionar preferencialmente a levedura sobre as bactérias e, por vezes, para ajudar na manutenção de um ambiente com a susceptibilidade à contaminação mínima. Por exemplo, uma fermentação de leveduras, a pH 3 é improvável que o meio fique contaminado com bactérias (McNEIL e HARVEY, 1990).

### 2.6.3 Nutrientes

As leveduras são microrganismos saprófitas que exigem uma fonte de carbono elaborada – glicose ou outro açúcar – que fornece a energia química e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares, constituídas predominantemente de carbono, oxigênio e hidrogênio. Algumas vitaminas, como tiamina e ácido pantotênico, também são exigidas. O meio deve, igualmente, fornecer nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Além de carbono e nitrogênio, os microrganismos exigem uma série de outros elementos, sob a forma de compostos inorgânicos. Alguns são necessários em quantidades apreciáveis – macronutrientes- enquanto que outros são necessários apenas traços – micronutrientes. Dentre os primeiros destaca-se o fósforo, sob a forma de fosfatos, importante no metabolismo energético e na síntese de ácidos nucleicos; o enxofre, necessário por fazer parte de aminoácidos como cistina e cisteína e para a síntese de vitaminas como a biotina e tiamina; o potássio, ativador de enzimas e regulador da pressão osmótica; e o magnésio que desempenha um importante papel no crescimento da levedura, como co-fator em muitas reações metabólicas (CARVALHO *et al.*, 2007).

### 2.6.4 Contaminação por bactérias

A contaminação bacteriana é certamente um dos fatores preponderantes dentre aqueles que podem afetar a fermentação alcoólica, pois está sempre presente em processos industriais de produção de etanol por via fermentativa (NOBRE, HORI e ALCARDE, 2007).

As leveduras da fermentação alcoólica competem pelo substrato com bactérias que normalmente habitam as dornas. Um processo de fermentação considerado relativamente sadio apresenta níveis de bactéria próximos a  $10^5$  células/mL (ANDRIETTA, STECKELBERG e ANDRIETTA, 2006).

Na tentativa de controle dos contaminantes da fermentação alcoólica, diversas práticas envolvendo a utilização de agentes antimicrobianos são utilizadas, sendo que a aplicação de ácido sulfúrico no preparo de pé-de-cuba é a prática mais utilizada e possibilita reduções de até 44,56% na população de bactérias contaminantes (GALLO, 1990).

A fermentação industrial, pela dimensão do processo se torna difícil de ser conduzida em condições ideais de assepsia e, por isto, a contaminação bacteriana, principalmente de *Lactobacillus* e *Bacillus*, está sempre presente e dependendo de sua intensidade, compromete o rendimento do processo fermentativo. As altas temperaturas de fermentação favorecem a contaminação bacteriana, o aumento do tempo de fermentação e o estresse da levedura. A contaminação bacteriana associa-se ao aumento da formação de ácido láctico e, embora não haja uma confirmação definitiva sobre a causa da floculação da levedura, considera-se, na indústria, que esta contaminação é a principal responsável pelos problemas encontrados na fermentação alcoólica (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

### 2.6.5 Concentração do inóculo

Elevadas concentrações de inóculo na dorna permitem fermentações mais rápidas, seguidas pelo aumento da temperatura, assim com maior produtividade e maior controle sobre as bactérias contaminantes, além de restringir o crescimento da própria levedura. Por outro lado, o elevado teor de levedura exige energia de manutenção maior, isto é, maior consumo de açúcar para manter as células vivas. Como consequência, resulta em maior competição pelos nutrientes do meio, minerais e vitaminas, diminuindo a viabilidade do fermento. Portanto, é importante existir um teor ótimo de levedura na dorna, dependendo das condições especiais do processo industrial (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Fermento desidratado produzido em destilarias é amplamente utilizado como fonte de inóculo para a produção de etanol. A levedura seca ativa é uma cultura especial de *Saccharomyces cerevisiae* que é descrito assim, por ser seco em escala industrial com pouca perda de volatilidade, embora a viabilidade diminua durante o armazenamento (REED, 1973). Para fermentações, um inóculo de 0,5 g/l de levedura seca ( $5-10 \times 10^6$  células  $\text{cm}^{-3}$ ) é recomendado, e uma fase “lag” de várias horas pode ser observada antes que as células que as células propagem uma população para que uma fermentação vigorosa possa ocorrer (LYONS, 1981).

Segundo Bryan e Silman (1991), a fase “lag” verdadeira antes da produção de etanol começar, corresponde aproximadamente ao tempo para as células de levedura desidratados se reidratarem e tornarem-se completamente dispersas e como resultado de seus estudos concluíram que uma fase “lag” de cerca de 15 minutos foi necessária para a levedura seca retomar o crescimento e produzir etanol.

Strehaiano, Mota e Gomes, (1983) conduziram um trabalho com o objetivo de observar a influência do nível de inóculo sobre o rendimento fermentativo e proporção de crescimento. Concluíram que o nível de 2% proporciona longo tempo de fermentação, alta produção de biomassa e bom crescimento específico; com o nível de 10% houve redução do tempo de fermentação e a fase lag foi bastante reduzida.

### **2.6.6 Concentração do Substrato**

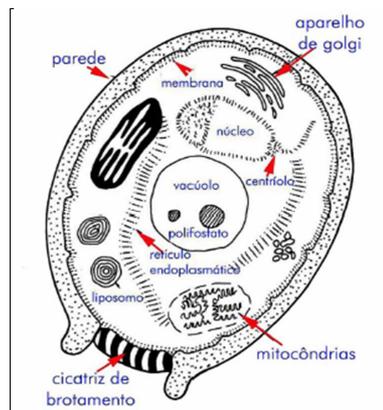
O aumento da concentração de açúcares, conseqüentemente eleva a velocidade de fermentação, resultando em perdas da atividade de transporte de açúcar, produzindo menos álcool. O estresse induzido pelo aumento da osmolaridade externa leva a redução em crescimento e perda da viabilidade das células das leveduras, devido às perturbações no gradiente osmótico através da membrana plasmática. Isto leva, por sua vez, a perdas em volume das células que se contraem por causa de diferenças em pressão osmótica entre o exterior e o interior das células (SOUZA, 2009).

## **2.7 LEVEDURAS**

As leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. Fazem parte do grupo de ascomicetos denominados fungos superiores e são unicelulares, eucarióticos, heterotróficos. Em geral são maiores que as bactérias, possuem quase sempre formas arredondadas, ovais ou elípticas; porém variam consideravelmente no que se refere a suas dimensões, com limites desde 1 a 5  $\mu\text{m}$  de largura e 5 a 12  $\mu\text{m}$  de comprimento (PELCZAR, REID e CHAN, 1980).

Os processos industriais de fermentação alcoólica utilizam quase em sua maioria os microrganismos de gênero *Saccharomyces* (Figura 6) para promover a fermentação. Estes microrganismos produzem, em geral, altos rendimentos nos processos de fermentação alcoólica (90 a 95% de rendimento) com a formação mínima de produtos secundários, apresentando ainda grande capacidade de floculação e manutenção da viabilidade (WENDHAUSEN, 1998).

Figura 6: Célula de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*)



Fonte: NAKANO, 2000.

Devido à importância econômica dos processos biotecnológicos envolvendo a levedura *Saccharomyces*, quer na panificação, na produção de cerveja, vinho e outras bebidas alcoólicas, quer, como no caso do Brasil, na produção de um combustível alternativo e renovável, tal organismo pode ser considerado o eucariótico (célula com núcleo organizado e processo metabólicos compartimentizados) mais estudado e cujo metabolismo é o mais conhecido. Mesmo assim o homem ainda se maravilha com as descobertas sobre os mecanismos de regulação metabólica, em leveduras (LIMA, BASTOS e AMORIM, 2001).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo atrativo de se trabalhar por ser não-patogênico, e devido a sua longa história de aplicação na produção de produtos consumíveis como o etanol e o pão. Ela foi classificada como microrganismo geralmente considerado seguro (GRAS – generally regarded as safe) (OSTERGAARD, OLSSON e NIELSEN, 2000).

## 2.8 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Nos últimos anos, as ferramentas quimiométricas têm sido frequentemente aplicadas para a otimização dos métodos analíticos, considerando-se as suas vantagens, tais como uma redução no número de experiências que necessitam de ser executado, resultando em menor consumo de reagente e trabalho de laboratório consideravelmente menor (FERREIRA *et al.*, 2007).

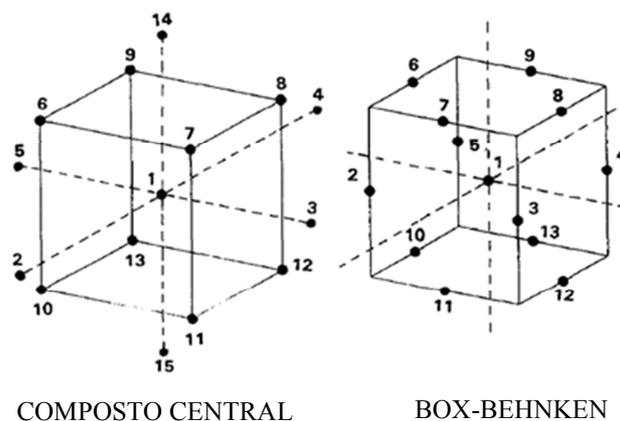
Box e Behnken em 1960 desenvolveram um novo arranjo de três níveis ( $3^k$ ) para o estudo da quantificação de variáveis, em um planejamento de experimentos. Esse arranjo é formado pela combinação fatorial  $2^k$  e um delineamento de bloco incompleto, o que resulta em um projeto que faz uso eficiente das unidades experimentais e que também é rotacional (MASON, GUNST e HESS, 1989).

O número de experimentos necessários para o desenvolvimento do planejamento de Box e Behnken (PBB) é definido através da Equação 2, onde  $N$  é o número de experimentos,  $k$  é o número de variáveis, e  $C_0$  é o número de pontos centrais (FERREIRA *et al.*, 2007).

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \quad (\text{Eq. 2})$$

O PBB diferencia-se do planejamento composto central (PCC), porque não contém pontos nos extremos da região cúbica, criado pelos dois níveis fatorial, e contém um ponto central (MASON, GUNST e HESS, 1989) (Figura 7); e possui maior eficiência, já que a eficiência de um planejamento é definida pela divisão entre o número de coeficientes estimados pelo modelo e o número de experimentos (FERREIRA *et al.*, 2007). A Tabela 1 mostra a eficiência dos planejamentos PBB e PCC.

Figura 7: Gráfico prismático



Fonte: Campaña *et al.*, 1997

Tabela 1: Comparação da eficiência dos planejamentos PBB e PCC

Variáveis ( $k$ )	Número de coeficientes ( $p$ )	Número de Experimentos ( $N$ )		Eficiência ( $p/N$ )	
		PCC	PBB	PCC	PBB
2	6	9	-	0,67	-
3	10	15	13	0,67	0,77
4	15	25	25	0,6	0,6
5	21	43	41	0,49	0,61
6	28	77	61	0,36	0,46
7	36	143	85	0,25	0,42
8	45	273	113	0,16	0,4

Fonte: FERREIRA *et al.*, 2007

Segundo Ferreira *et al.* (2007) Box-Behnken é um bom planejamento para a metodologia de superfície de resposta, pois permite: (i) a estimativa dos parâmetros do modelo quadrático, (ii) construção de projetos sequenciais, (iii) a detecção de falta de ajuste do modelo, e (iv) utilização de blocos.

## 2.9 ESTUDO CINÉTICO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

O objetivo básico do estudo da cinética de processos microbianos é o de quantificar a taxa de crescimento celular, de consumo de substrato e formação de produtos e demais parâmetros relacionados, além de avaliar a influência de fatores externos como pH, temperatura, inibidores, etc. nestas taxas. No caso da fermentação alcoólica, estes valores são essenciais para se projetar adequadamente uma unidade industrial de produção de etanol (VIEGAS, 2003).

A complexidade da descrição cinética que é requerida e apropriada depende das situações físicas e da aplicação pretendida. Não é possível a formulação de um modelo que inclua todas as características e detalhes celulares. O modelo deve ser formulado a partir de algumas aproximações. Primeiramente, com respeito ao meio, é prática comum formular o meio de crescimento a fim de que um componente esteja em alta concentração, de forma que a alteração nas concentrações dos demais não afetem as reações globais. Assim um nutriente torna-se limitante e é necessário considerar apenas a concentração deste componente quando for analisado o efeito da composição do meio na cinética de crescimento. Ocasionalmente é necessário incluir outros componentes do meio, tal como um produto inibidor que se acumula no meio. Com respeito aos outros parâmetros do meio, frequentemente é razoável assumir que

mudanças nestes parâmetros não afetem significativamente a cinética microbiana (STREMEL, 2001).

No decorrer da fermentação alcoólica, o rendimento de biomassa diminui com o aumento da concentração de etanol, indicando uma relação entre o rendimento da biomassa e a inibição pelo produto. O etanol começa a ter efeito inibitório na taxa de crescimento celular acima de 15 g/L, o crescimento celular é totalmente inibido quando a concentração atinge 115 g/L (THATIPALAMA, ROHANI e HILL, 1992; LUONG, 1985; FERREIRA, 1998).

Thatipalama, Rohani e Hill (1992), propuseram o modelo descrito pela Equação 3.

$$\mu = \mu_{max} \left( \frac{S_{max} - S}{S_{max} - S_{min}} \right) \quad (\text{Eq. 3})$$

Sendo:  $S_{max}$  é a máxima concentração de substrato acima da qual não existe crescimento celular e  $S_{min}$  a concentração onde se inicia o efeito de inibição.

Sablayrolles e Barre (1993) utilizaram a determinação do gás carbônico por pesagem em intervalos de tempo, para monitorar e calcular dados cinéticos da fermentação. Neste estudo demonstraram que em fermentações sob diversas condições isotérmicas essa relação varia com as diferentes temperaturas estudadas (16 a 30 C°). A validade desta metodologia para monitorar a fermentação foi demonstrada por El Haloui *et al.*, (1989).

Bryan e Silman (1991) utilizando levedura seca comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) como inóculo mostraram que foi requerida uma lag fase de apenas 15 minutos para que a levedura seca iniciasse o crescimento e produção de etanol. Esses mesmos autores relataram que a concentração de etanol pode ser estimada com precisão através da perda de massa durante a fermentação, com pré-saturação do meio com CO<sub>2</sub> antes do manuseio.

Bely, Sablayrolles e Barre (1990), explicam que a taxa de produção de CO<sub>2</sub> é obtida por acompanhamento polinomial e que as numerosas medidas da evolução do CO<sub>2</sub> e a precisão da pesagem (0,1 ou 0,01g) permitem obter a taxa de produção de CO<sub>2</sub> com boa precisão. Esses autores propõem que a curva de produção de CO<sub>2</sub> possa ter diversas aplicações úteis e significativas. O valor máximo desta taxa fornece uma informação preliminar sobre a fermentabilidade do mosto. A curva de CO<sub>2</sub> pode ser usada para predição da cinética especialmente em fermentações.

Moulin, Boze e Galzy (1980), propuseram duas diferentes expressões para representar a inibição pelo substrato, a primeira delas para  $S > 100$  g/L e  $P < 32$  g/L (Equação 4) e a segunda para  $S > 100$  g/L e  $P > 32$  g/L (Equação 5).

$$\mu = \mu_i^{[K_1(S-100)]} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\mu = \mu_i^{[K_1(S-100)][K_2(S-100)P]} \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que:  $K_1$  e  $K_2$  são constantes empíricas e  $\mu_i$  possui dependência exponencial com o produto (P).

Tosetto (2002) analisou o comportamento cinético da cepa de levedura Y904 em nove diferentes matérias-primas provenientes de unidades produtoras de açúcar e álcool. Estudou-se as cinéticas de produção de etanol, células e de consumo de substrato, assim como o desempenho da cepa em cada matéria-prima com relação à produtividade e rendimento em etanol. Para a avaliação cinética, foram utilizados seis modelos do tipo não estruturado. Os que mais se adequaram aos dados experimentais foram os modelos de Ghose e Thyagi (1979), representado pela Equação 6 e o de Jin, Chiang e Wang (1981), dado pela Equação 7, citados em Tosetto (2002).

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{S+K_s+S^2/K_1} \left(1 - \frac{P}{P_{m\acute{a}x}}\right) \quad (6)$$

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \exp(-K_1P - K_2S) \left(\frac{S}{K_s+S}\right) \quad (7)$$

Esse modelo descrito por Jin, Chiang e Wang (1981), leva em consideração o efeito do substrato limitante ( $K_s$ ), inibição pelo substrato ( $K_i$ ) e inibição pelo produto exponencial ( $P_{m\acute{a}x}$ ).

Levenspiel (1980) generalizou uma equação matemática para o crescimento celular contendo um termo para inibição pelo produto, além de levar em consideração o efeito do substrato limitante ( $K_s$ ), dada pela Equação 8.

$$r_x = \mu X = \mu_{max} \left[1 - \frac{P}{P_m}\right]^n \left[\frac{S}{K_s + S}\right] X \quad (8)$$

Em que  $P_m$  é a concentração limite do produto inibidor. Para uma concentração de  $P$  bem menor que o valor de  $P_m$ , a Equação 8 se reduz à Equação 9, que é equivalente à cinética de Monod (LEVENSPIEL, 1980).

$$r_x = \mu X = \left[\frac{S}{K_s + S}\right] X \quad (9)$$

A multiplicidade de modelos cinéticos que descrevem o crescimento microbiano se deve ao fato de que eles são construídos para uma levedura específica, em condições experimentais pré-definidas (DOURADO *et al.*, 1987).

Vasconcelos, Pinto e Silva (1992) realizaram vários ensaios e observaram que a velocidade específica de produção de etanol esteve vinculada à velocidade específica de crescimento microbiano não causou a diminuição da velocidade específica de produção de etanol, mostrando que as mesmas não estão mais associadas. Estes autores testaram dez modelos cinéticos para o processo de fermentação alcoólica industrial em batelada alimentada e concluíram que o modelo de Ghose e Thyagi (1979) foi o que apresentou os melhores ajustes dos dados experimentais.

## 2.10 MODELAGEM MATEMÁTICA NOS PROCESSOS FERMENTATIVOS

Um modelo matemático é um conjunto de relações entre as variáveis em um sistema em estudo e geralmente pode prever as variáveis de saída e o estado do sistema a partir das variáveis de entrada. Estas relações são normalmente expressas na forma de equações matemáticas, mas também podem ser especificadas como expressões lógicas (ou relações de causa/efeito), as quais são usadas na operação de um processo. Assim, as equações de balanço especificam como os materiais fluem dentro e fora do volume de controle e como são convertidos no interior deste volume. Essa conversão interna no volume de controle é representada pela equação de taxa (também chamada de cinética) e, juntamente com o balanço de massa, especificam o modelo completo (NIELSEN, *et al.*, 2003).

Do ponto de vista da engenharia bioquímica, o desenvolvimento da modelagem matemática dos processos fermentativos permite atingir, entre outros, os seguintes objetivos: organizar informações desconexas a respeito dos fenômenos biológicos num conjunto coerente; pensar (e calcular) logicamente a respeito de quais componentes e interações são importantes num sistema complexo; descobrir novas estratégias para explicar o comportamento das células submetidas a determinados ambientes; corrigir falhas eventualmente existentes no entendimento convencional de determinados fenômenos e, finalmente, entender as características qualitativamente essenciais de determinados processos (BAILEY, 1998).

Os processos fermentativos incorporam uma série de características que os diferenciam dos processos químicos, o que pode explicar as dificuldades encontradas na formulação de modelos matemáticos que representam adequadamente estes processos, ao contrário do que ocorre com os processos químicos convencionais. Entre essas características podem ser citadas as seguintes: baixas concentrações e velocidades de reação, como resultado da utilização de um meio diluído; complexidade da mistura reagente e capacidade do sistema (células microbianas) de sintetizar seu próprio catalisador; conhecimento insuficiente de vários dos fenômenos limitantes das velocidades de produção e falta de sensores para automação on-line; problemas de esterilidade, segurança e eventualmente da toxicidade dos processos fermentativos (ENGASSER, 1988).

### ***Classificação dos modelos matemáticos***

Existem diversas classificações dos modelos matemáticos apresentados por vários autores, para Schwaab e Pinto (2007), o modelo pode ser apresentado de diversas formas, a depender do propósito do pesquisador, das limitações das observações experimentais e da complexidade do fenômeno a ser investigado.

Para Lima, Bastos e Amorim (2001), essa classificação é definida por dois grandes grupos de modelos matemáticos de processos fermentativos a seguir.

**Modelos fenomenológicos:** baseiam-se na formulação de hipóteses e correlações teóricas ou empíricas para explicar os fenômenos e o comportamento das variáveis do processo observado experimentalmente.

São constituídos por equações de balanço ou de conservação (de massa, de energia ou de quantidade de movimento, ou seja, os chamados princípios fundamentais), equações de

velocidade (como, por exemplo, expressões cinéticas que descrevem a geração ou consumo de espécies dentro do sistema) e equações termodinâmicas, que relacionam propriedades termodinâmicas do sistema (pressão, temperatura, densidade e concentração). As equações cinéticas são denominadas modelos cinéticos.

Os modelos cinéticos de processos fermentativos podem ser classificados quanto ao número de componentes usados na representação celular em dois tipos:

- *Modelos não estruturados*: o microrganismo é visto como uma espécie reagente simples, possivelmente com uma composição química fixa, sem considerar variações nos componentes intracelulares;
- *Modelos estruturados*: as células são descritas com maiores detalhes, considerando, por exemplo, componentes intracelulares, permitindo descrever o estado das células e sua adaptação às mudanças do meio ambiente.

Quanto à heterogeneidade da população microbiana os modelos cinéticos podem ser classificados em:

- *Modelos não segregados*: a população é considerada homogênea, isto é, todas as células apresentam o mesmo comportamento.
- *Modelos segregados*: as células são consideradas discretas, como indivíduos de uma população heterogênea, com distribuição de idade, de tamanho e de propriedades celulares.

**Modelos entrada e saída (ou empíricos)**: estabelecem relações empíricas para correlacionar o efeito de variações nas variáveis de entrada ou manipuláveis: (caso, por exemplo, das concentrações iniciais em sistemas operados em batelada ou das concentrações de vazões de alimentação dos sistemas operados em forma contínua) nos valores das variáveis de saída ou medidas do processo (caso do perfil de concentrações possíveis de serem medidas no interior do biorreator, ou no seu efluente ao longo do tempo).

O tipo de modelo mais encontrado na literatura para descrever a fermentação alcoólica é do tipo *não-estruturado e não-segregado*. Existem vários modelos que representam o crescimento microbiano, o mais simples deles é o de Monod (Equação 10), que considera a presença de substrato como limitante para o crescimento e faz uma relação entre velocidade específica de crescimento do microrganismo ( $\mu_x$ ) e substrato (ANDRADE, 2007; HAN e LEVENSPIEL, 1988).

$$\mu_x = \mu_{\max} \cdot \frac{S}{(K_s + S)} \quad (10)$$

Sendo,  $\mu_x$  é a velocidade específica de crescimento,  $\mu_{\max}$  a velocidade máxima específica de crescimento,  $K_s$  a constante de saturação do substrato,  $S$  a concentração do substrato limitante.

No começo da fermentação, onde a concentração de substrato é alta,  $S$  é muito maior que  $K_s$ , e desta forma, a velocidade específica de crescimento atinge um valor máximo, e este valor perdura durante uma boa fase do processo. Conforme o substrato limitante é consumido,  $\mu$  se reduz com o tempo (ANDRADE, 2007).

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 MANDIOCA DOCE

A matéria-prima foi colhida no município de CAMETÁ-PA no mês de dezembro de 2011, após 12 meses de plantio (Fotografia 2). Primeiramente foram eliminadas as raízes ou as porções destas que apresentaram sinais de contaminação microbiana, danos físicos ou outra característica que poderiam ter influência nas respostas do processo, em seguida foram lavadas em água corrente para a retirada de material estranho (terra, folhas, etc.). Em seguida, aproximadamente 800 g foram separados e congelados para as análises de caracterização físico-química. O restante foi descascado e cortado com o auxílio de facas de aço inoxidável, em cubos com 2-3 cm de aresta, para facilitar a extração do caldo através de prensagem. Os ensaios experimentais foram realizados no Laboratório de Operações de Separação (LAOS) da Universidade Federal do Pará (UFPA).

Fotografia 2: Raiz de Mandiocaba com casca e sem casca



#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA RAIZ DE MANDIOCA DOCE

##### Umidade

O teor de umidade foi determinado em estufa (Quimis, Q 314 M 122) a 105°C, de acordo com o método 925.10 da AOAC (1997).

##### Cinzas

O teor de cinzas foi determinado através de calcinação em mufla (Quimis, Q 318 M 24) a 550°C, seguindo o método 923.03 da AOAC (1997).

### **Proteínas**

A análise foi realizada seguindo o método Kjeldahl de determinação das proteínas totais através da medida de nitrogênio, de acordo com a metodologia 920.87 da AOAC (1997).

### **Lipídios totais**

Foi usado o método de extração de gordura a frio que utiliza uma mistura de três solventes: clorofórmio/metanol/água. A análise segue as recomendações do método de Bligh-Dyer (1959). Antes da realização da análise o teor de umidade da amostra foi reduzido para aproximadamente 10%.

### **Açúcares redutores e totais**

Foi utilizado o método titulométrico com soluções de Fehling, de acordo com método 920.183b da AOAC (1997).

Neste método relativamente rápido, uma solução alcalina de  $\text{Cu}^{2+}$  na forma de um complexo com tartarato é titulada com solução do açúcar redutor, formando  $\text{Cu}_2\text{O}$  e o ácido do açúcar. O indicador oxirredutor é o azul de metileno. Uma solução fraca é usada para aumentar a velocidade da reação de oxirredução e para prevenir a entrada de oxigênio, que pode oxidar o azul de metileno, pela formação do vapor de água da ebulição. Faz-se uma primeira titulação, na qual é obtido o conteúdo de açúcares totais. Uma segunda porção é acidificada com ácido concentrado, que hidrolisa os açúcares não-redutores formando açúcares redutores. A titulação desta segunda porção determina açúcares totais (CECCHI, 1999).

### **Fibras**

Foi usado o método fibra em digestão ácido (FDA) (SILVA e QUEIROZ, 2002).

### 3.3 EXTRAÇÃO DO CALDO DA MANDIOCA DOCE

A extração do caldo foi feita em prensa mecânica, como mostrado na Figura 3, sendo imediatamente filtrado e armazenado em frascos de polietileno, que foram posteriormente congelados a uma temperatura de aproximadamente  $-5^{\circ}\text{C}$  em freezer comercial (Electrolux, H 3000). Um balanço de massa do processo pode ser visto no Fluxograma 2.

Fotografia 3: Extração do caldo de Mandioca doce



Fluxograma 2: Balanço de massa do processo



### 3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO CALDO DA MANDIOCA DOCE

#### Sólidos Solúveis Totais (°Brix)

Análise feita através da leitura direta em refratômetro Abbé (Analytic Jæn) a 20°C, seguindo o método 932.12 da AOAC (1997).

#### Acidez total titulável

A análise seguiu o procedimento do método 942.15 da AOAC (1997).

#### Potencial hidrogeniônico (pH)

Para medição do pH foi utilizado pHmetro digital (Handylab, L 7137 A).

## Determinação de glicose

A glicose foi determinada pelo método enzimático (glicose oxidase e peroxidase) associado a um sistema reator de fenol-4-aminofenazona, produzindo um composto colorido, com leitura em espectrofotômetro a 505 nm, utilizando uma curva de calibração que correlaciona a absorbância (Abs) com a concentração de glicose (g/L). Para elaboração dessa curva, soluções padrão de glicose foram preparadas nas seguintes concentrações: 0,15; 0,3; 0,45; 0,6; 0,75; 0,9 e 1 g/L. O resultado desta análise corresponde a concentração de glicose (g/L) presente na amostra.

## 3.5 EXPERIMENTOS DE FERMENTAÇÃO

### 3.5.1 Testes iniciais da fermentação do caldo

Inicialmente foram feitos experimentos de fermentação para determinação da influência da temperatura (°C), do pH (adm.) e da concentração de inóculo (g/L) na produção de etanol.

Para a realização dos testes foi aplicado um planejamento fatorial, onde é necessário selecionar um número fixo de níveis para cada um dos fatores (variáveis), e, então, realizar-se os experimentos com todas as possíveis combinações de níveis, por exemplo, um planejamento de dois níveis ( $2^k$ ) e três variáveis ( $k=3$ ), resulta em oito corridas ( $2^3=8$ ) (BOX, HUNTER e HUNTER; 1978).

A otimização tomou como base o planejamento experimental de Box-Behnken (PBB), aplicado a procedimentos de otimização. O modelo consiste na repetição do ponto central, para somar a variabilidade experimental, mais um conjunto de pontos fatoriais ancorados no ponto central definindo a região de interesse (BOX e BEHNKEN, 1960). O total de 15 corridas era diferenciado pelos níveis em que cada uma das três variáveis se encontrava, seguindo a matriz de experimentos (Tabela 2).

Tab¶la 2: D¶lin¶amento Fatorial d¶Box-B¶hnk¶n

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1	-1	0
2	1	-1	0
3	-1	1	0
4	1	1	0
5	-1	0	-1
6	1	0	-1
7	-1	0	1
8	1	0	1
9	0	-1	-1
10	0	-1	-1
11	0	1	1
12	0	1	1
13	0	0	0
14	0	0	0
15	0	0	0

A d¶t¶rminac¶o dos n¶veis d¶trabalho (Tab¶la 3) foi bas¶ada ¶m dados ¶ncontrados na literatura; para a t¶mp¶ratura ¶studos mostram qu¶ a produc¶o d¶ ¶tanol ¶ biomassa, passando d¶uma t¶mp¶ratura d¶f¶rm¶ntac¶o d¶33 para 30°C aum¶tavam; por¶m acima d¶ 35°C, ¶stas voltavam a diminuir s¶gundo Phisalaphong, Srirattana ¶ Tanthapanichakoon (2005) ¶m s¶u ¶studo sobr¶a inv¶stiga¶o do ¶f¶ito da t¶mp¶ratura nos par¶metros cin¶ticos da f¶rm¶ntac¶o alco¶lica, utilizando a l¶vedura *S. cerevisiae* M30, ¶m solu¶o¶s d¶ a¶u¶ar r¶duzido (17-22% (p/v)) produzidas a partir d¶ m¶lao d¶ cana. Andrad¶ (2007) buscando o d¶s¶nvolvim¶nto d¶ um mod¶lo mat¶m¶tico qu¶ r¶pr¶s¶ntass¶ a f¶rm¶ntac¶o alco¶lica, ¶studou a influ¶ncia da t¶mp¶ratura nos par¶metros cin¶ticos, utilizando o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* ¶m um m¶io sint¶tico cont¶ndo sacaros¶ (20 g/L) ¶concluiu qu¶ a tol¶r¶ncia da *S. cerevisiae* p¶lo ¶tanol ¶ concentra¶o d¶ biomassa mostrou s¶r alta a 31,2°C, ¶ acima d¶st¶ valor d¶ t¶mp¶ratura, t¶nd¶ a d¶cr¶sc¶r; tamb¶m fica claro qu¶ d¶svios d¶ t¶mp¶ratura para valores maior¶s d¶ 36,8°C, l¶vam a uma qu¶da dr¶stica no cr¶scim¶nto microbiano, r¶sultando a uma m¶nor forma¶o d¶ produto, consid¶rando qu¶ a produc¶o d¶ ¶tanol ¶st¶ r¶lacionada ao cr¶scim¶nto.

Tabela 3: Variáveis independentes e seus valores codificados

Níveis	Temperatura - °C (X1)	pH inicial (X2)	Inóculo – g/L (X3)
-1	25	3,5	1
0	30	4,5	5,5
1	35	5,5	10

Assim, neste estudo como limite inferior foi utilizada a temperatura de 25°C, pois temperaturas menores apesar de possuírem bom desempenho em termos quantitativos, proporcionam um processo fermentativo lento, característica não aceitável em possíveis aplicações industriais. No limite superior a temperatura de trabalho foi a de 35°C, pois segundo Walkler (2000) apesar de existirem meios fisiológicos para a regulação da temperatura interna da levedura, um aumento do stress celular acontecendo, promovendo rápido declínio da viabilidade do microrganismo, fato que explica a redução da produtividade nos experimentos citados na literatura, quando realizados em temperaturas superiores a 35°C, sendo então estas evitadas por estar em uma faixa onde se espera baixo crescimento celular. O ponto central foi de 30°C, que além de ser a média entre as temperaturas limítrofes, corresponde exatamente ao ponto ótimo citado por Phisalaphong, Srirattana e Tanthapanichakoon (2005). Apesar da faixa de 25 a 35°C não parecer ampla, esta pode ser justificada pelo fato que as leveduras apresentam grande sensibilidade para pequenas variações de temperatura.

A variável pH foi selecionada devido pesquisas indicarem sua influência no crescimento microbiano. Lima, Basso e Amorim (2001), sugerem como melhor faixa para o desenvolvimento de fermentação a que vai de 4 a 5. Valores muito baixos de pH, ocasionam perda de nutrientes como nitrogênio e potássio (GOMES, 1998). Em contrapartida valores elevados (a partir de 5,5 a 6,0) proporcionam a outros microrganismos, como as bactérias, meio favorável, o que torna possível a competição entre estas e as leveduras pelos nutrientes presentes no meio, sendo este fator prejudicial ao bom desenvolvimento do processo fermentativo. Partindo destes dados os limites estabelecidos foram de 3,5 a 5,5 (com ponto central 4,5), visando não trabalhar com limites já excluídos por outros trabalhos pelos motivos citados anteriormente.

A concentração do inoculo foi tomada a partir das informações de Lyons (1981), que recomenda um inoculo de 0,5 g/L de levedura seca ( $5-10 \times 10^6$  células  $\text{cm}^{-3}$ ) e ainda, considerando que matérias-primas diversas possuem composições diferentes, principalmente o tipo de concentração do substrato. Dessa forma, esta variável foi avaliada numa faixa que compreende um valor de 1,0 g/L, buscando uma fase de adaptação menor a 10 g/L, para obtenção de um intervalo mais amplo, com o cuidado de não utilizar um levedado teor de levedura, pois esta exigiria energia de manutenção maior, isto é, maior consumo de açúcar para manter as células vivas e assim redução na viabilidade do fermento.

Cada ensaio de fermentação foi acompanhado durante 10 horas. A concentração final de etanol, em °GL foi tomada como a variável resposta do planejamento experimental.

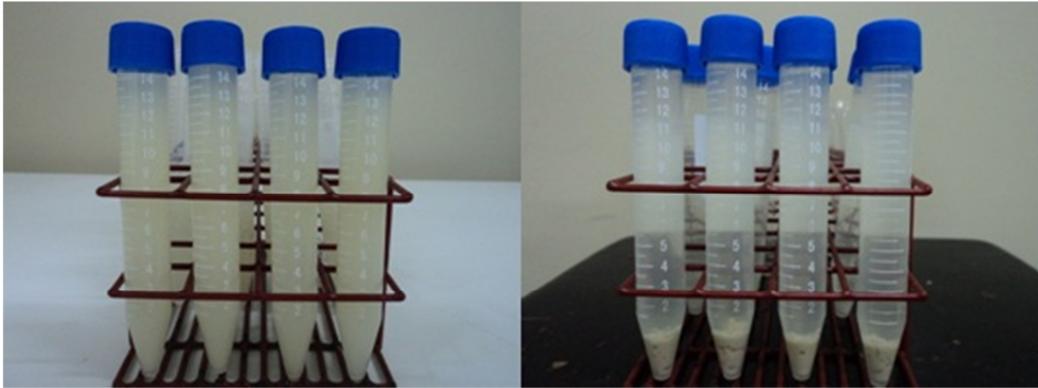
Para avaliar a influência das variáveis independentes – concentração do inoculo, temperatura e pH - sobre a variável dependente teor alcoólico foi utilizado o software Statistica® 7.0.

Para estudar os efeitos individuais e combinados desses fatores, os experimentos foram realizados em diferentes combinações desses parâmetros utilizando experimentos estatisticamente planejados.

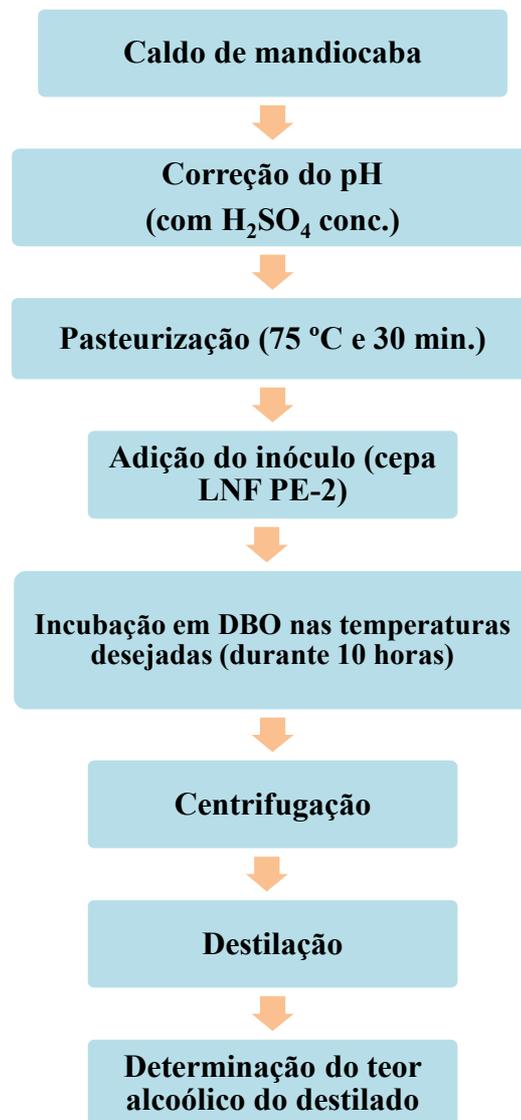
Os experimentos foram conduzidos em batelada num fermentor com volume de 250 mL em estufa incubadora DBO (Quimis, Q315 A13). O volume de cada fermentação foi de 100 mL, sem suplementação de fontes minerais e com ajuste de pH feito com ácido sulfúrico concentrado, de acordo com o planejamento apréssentado. O pH inicial do caldo era de 6,7 e após a correção do pH para o valor pré-determinado, a matéria-prima foi pasteurizada em béquer de 500 mL aberto a 75°C durante 30 minutos, com o objetivo de eliminar a microbiota indesejável. Em seguida, o caldo seguiu para a incubadora, nas condições pré-estabelecidas para a fermentação.

Com a finalidade de acompanhar o desenvolvimento do processo de fermentação buscou-se levantar a curva da cinética de produção de  $\text{CO}_2$ , e para isto, foram retirados os fermentos que correspondiam a ensaios distintos, em intervalos de uma hora e foram retirados e pesados; este procedimento foi realizado até o tempo de 10 horas, ou seja, foram realizadas 10 psagens para cada ensaio. Cada amostra era levada a centrífuga durante 15 minutos a 3000 rpm (Sigma, 6-15 H), para retirar as células em suspensão (Fotografia 4), evitando a continuidade do processo fermentativo, e em seguida congelada para a realização das determinações analíticas (Fluxograma 3).

Fotografia 4: Mosto antes e depois da retirada das células da levedura



Fluxograma 3: Procedimento para produção de etanol



Para a realização da fermentação foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, adquirida através de doação da empresa LNF Latino Americana, situada em Bento Gonçalves (RS). Segundo a LNF (2012), a cepa LNF PE-2, como é denominada, apresenta-se sob a forma seca, estável e altamente concentrada. Esta cepa foi selecionada para o uso na fermentação do mosto de cana (que apresenta característica semelhante à matéria-prima em estudo) em processos com ciclo total de células totais alcoólicas de até 15% (v/v). Suas principais características são a alta resistência aos choques de pH, a longas paradas na fermentação ao processo de ciclo. Também apresenta baixa formação de espuma, alta capacidade de implantação e predominância elevado rendimento fermentativo (LNF, 2012). Esta amostra apresenta um mínimo de células vivas de  $10.10^9$  UFC/g e 65% de células viáveis.

### 3.5.2 Análise estatística dos dados

Segundo Montgomery (1991), através de experimentos estatisticamente planejados pode-se determinar - variáveis, ou fatores, do processo que são mais influentes no(s) parâmetro(s) de resposta de interesse - níveis de ajustadas variáveis do processo influentes na resposta, de modo que a variabilidade do parâmetro de resposta seja mínima; - níveis de ajustadas variáveis influentes do processo, de modo que o valor do resultado seja próximo do valor nominal; - níveis de ajustadas variáveis influentes na resposta, de modo que o efeito das variáveis não controláveis seja reduzido.

Para facilitar a compreensão dos resultados encontrados nos experimentos determinados na matriz de planejamento, foi realizada análise de variância (ANOVA) com  $p > 0,05$ , e também a construção de um modelo polinomial, que será avaliado através de ferramentas como o gráfico de distribuição de probabilidade normal, que permite ao modelo proposto é apropriado ou não.

Será utilizado o recurso da construção de uma superfície de resposta, sendo esta metodologia uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas que são úteis para a modelagem e análise nas aplicações em que a resposta de interesse seja influenciada por muitas variáveis e o objetivo seja otimizar essa resposta (MONTGOMERY, 2004). O processo de otimização contará com a ferramenta de globalidade.

### 3.5.3 Cinética de fermentação

Após a determinação das melhores condições para o desenvolvimento do processo fermentativo (item 3.5.1), um ensaio foi realizado com o objetivo de levantar a curva cinética de produção de etanol, consumo dos açúcares e crescimento celular.

Visando um menor nível de contaminação microbiana esta corrida foi realizada num conjunto de 11 erlenmeyers de 250 ml, sendo que cada recipiente correspondia a um ponto da cinética de desenvolvimento do microrganismo. O tempo de fermentação foi controlado a partir da construção da curva de  $\text{CO}_2$ .

Assim, após as correções feitas para atender a otimização experimental (quanto ao pH e concentração de inóculo), todos os erlenmeyers seguiram para estufa incubadora DBO (Quimis, Q315 A13) na temperatura ótima determinada. Nos intervalos preestabelecidos um frasco saía da estufa incubadora, e de st uma alíquota de 10 ml era retirado para análise de massa seca, a seguir o restante do mosto fermentado passava pela tampa de centrifugação (conforme descrito no item 3.5.1), visando à retirada das células de lvedura; após este tratamento foram realizadas as determinações de açúcares e teor alcoólico. A análise de açúcares (método DNS) foi realizada imediatamente após a centrifugação, para cada ponto, visando o acompanhamento do final do processo fermentativo (conforme descrito no item 3.6).

## 3.6 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

### Produção do gás carbônico

A produção de  $\text{CO}_2$  foi medida através de pesagens dos frascos de fermentação em intervalos de tempo de uma hora com o intuito de monitorar a cinética da fermentação. A diferença de peso correspond à massa de  $\text{CO}_2$  desprendido.

### Determinação do Teor Alcoólico

Para a determinação do teor alcoólico, 25 mL do mosto fermentado foram destilados junto com 50 ml de água destilada utilizando rota vaporador (Fotografia 5), (LABOROTA, 4000), desta mistura foram coletados aproximadamente 50 ml de destilado.

Fotografia 5: Destilação do mosto fermentado



As amostras foram congeladas e levadas para o Laboratório de Bebidas e Vinagrão (LANAGRO) onde foi realizada a determinação do teor de etanol, utilizando densímetro digital Anton Paar modelo DMA4500 (Fotografia 6).

Fotografia 6: Densímetro digital de bancada



### Determinação da massa seca

A determinação da massa celular produzida na fermentação foi realizada através da sagem do material produzido. Primeiramente pesou-se em placas de Petri préviamente secas ( $P_1$ ), com auxílio de uma pipeta volumétrica, transferiu-se 10 ml de amostra de caldo fermentado para um tubo de centrífuga. Centrifugou-se a mesma a 3000 rpm por quinze minutos. Lavou-se o precipitado transferindo-o então, para a placa. As placas foram para uma estufa a 80°C até atingir um peso constante. O valor da massa seca foi calculado pela diferença ( $P_1 - P_2$ ) sobre o volume de amostra centrifugada, obtendo assim o valor final expresso em gramas por litro de vinho fermentado.

## Determinação dos açúcares redutores

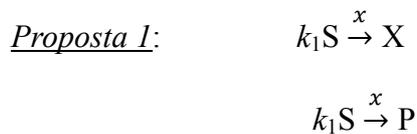
Foi utilizado o método do ácido dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959).

## Identificação do sistema de reações metabólicas

A identificação dos sistemas de reações metabólicas é fundamental para a construção de equações de balanço e elaboração das equações cinéticas. Por sistema de reações metabólicas entende-se o conjunto simplificado de reações que permitem correlacionar os substratos consumidos aos produtos gerados (entre as quais está incluída a população microbiana) (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

Nesse processo foram identificadas 3 variáveis de estado: a concentração de leveduras (X), a concentração de etanol (P) e a concentração de substrato limitante, a glicose presente no caldo de mandioca doce (S).

Considerando-se duas propostas de modelo de reações metabólicas para representar o processo em estudo:



Nessa primeira proposta, considera-se que a glicose é consumida pela levedura para crescer e produzir etanol.



Nessa segunda proposta, as leveduras não consomem glicose para o seu crescimento (crescem a partir de outra fonte de carbono não limitante no processo e, portanto não incluída como variável de estado).

Elaborando os balanços de massa do substrato S para as duas propostas de modelo matemático, obtém-se:

$$\textit{Proposta 1: } \Delta S = -a\Delta X - b\Delta P$$

$$\textit{Proposta 2: } \Delta S = -c\Delta P$$

Para a determinação dos coeficientes  $a$  e  $b$  foi realizada regressão multilinear para o balanço de massa da proposta 1, e para encontrar o coeficiente  $c$ , foi aplicada regressão linear para a proposta 2. Essas regressões foram realizadas considerando, em cada instante de tempo “ $t$ ”, o substrato consumido e as células e produtos produzidos desde o instante “0” até o instante “ $t$ ” (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

### **Definição da fase exponencial**

Para a definição da fase exponencial foi realizada regressão linear para os dados ( $\ln X$  (g/L)) versus ( $t$  (h)). A fase lag foi considerada desprezível.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA RAIZ

A Tabela 4 apresenta as principais características físico-química encontradas na raiz da mandioca doce, é importante observar o teor de açúcares redutores, pois é um fator importante para a caracterização de uma matéria-prima para a produção de etanol.

É comumente aceito que a primeira etapa de utilização da sacarose por *Saccharomyces cerevisiae* é a completa hidrólise deste, pela enzima extracelular invertase em glicose e frutose os quais são posteriormente transportados para o interior da célula e metabolizados (BARNETT, 1981). De acordo com Oliveira *et al.*, (2007), o caldo de cana apresenta 0,49% em açúcares redutores, este representado em sua maior parte pela sacarose, neste caso para iniciar a fermentação alcoólica é necessário a transformação da sacarose em glicose aumentando o tempo de fermentação e tornando-o mais custoso. Para a mandioca doce o teor de açúcares redutores encontrado foi de 6,22% representado quase na sua totalidade pela glicose, ou seja, o açúcar encontrado já esta disponível para ser utilizado no processo de fermentação pela levedura, este é o grande diferencial quando comparado a outras matérias-primas (cana-de-açúcar, mandioca, batata, etc.) para a produção de álcool.

Tabela 4: Características físico-químicas da raiz

	<b>Umidade (%)</b>	<b>Cinzas (%)</b>	<b>Proteínas (%)</b>	<b>Fibras Totais (%)</b>	<b>Açúcares Totais (%)</b>	<b>Açúcares Redutores (%)</b>	<b>Lipídeos (%)</b>
Média	81,885	0,1761	0,16	1,72	6,52	6,22	0,06
D.P.(±)	0,0671	0,0165	0,01	0,13	0,08	0,08	0,01

### 4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO CALDO

Na Tabela 5, as características físico-químicas do caldo da mandioca doce são apresentadas. O valor de pH é um dos parâmetros importantes a ser conhecido antes da etapa de fermentação e observa-se que o valor original encontrado foi de 6,7, havendo a necessidade da correção deste para promover um bom desenvolvimento do processo fermentativo, pois nesta faixa de pH as chances do desenvolvimento de possíveis microrganismos competitivos são maiores.

Tabela 5: Características físico-químicas do caldo

Análise	pH (adm.)	Acidez Titulável (meq.NaOH.100g <sup>-1</sup> )	Sólidos Solúveis Totais (°BRIX)	Densidade (g/cm <sup>3</sup> )
<b>Média±D.P.</b>	6,70 ± 0,01	2,17 ± 0,05	6,46 ± 0,91	2,82 ± 0,10

#### 4.3 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DOS ENSAIOS DE FERMENTAÇÃO

A matriz de experimentos com as variáveis de entrada originais e os resultados da variável de resposta referente aos ensaios de fermentação, é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6: Matriz de experimentos de Box-Behnken

Corridas	Variáveis Originais			Variável de Resposta
	X1	X2	X3	Etanol (°Gl)
1	25	3,5	5,5	0,12
2	35	3,5	5,5	0,12
3	25	5,5	5,5	0,32
4	35	5,5	5,5	0,28
5	25	5,5	1	0,01
6	35	4,5	1	0,01
7	25	4,5	10	0,56
8	35	4,5	10	0,42
9	30	3,5	1	0,12
10	30	3,5	1	0,14
11	30	5,5	10	0,46
12	30	5,5	10	0,78
13	30	4,5	5,5	0,60
14	30	4,5	5,5	0,42
15	30	4,5	5,5	0,45

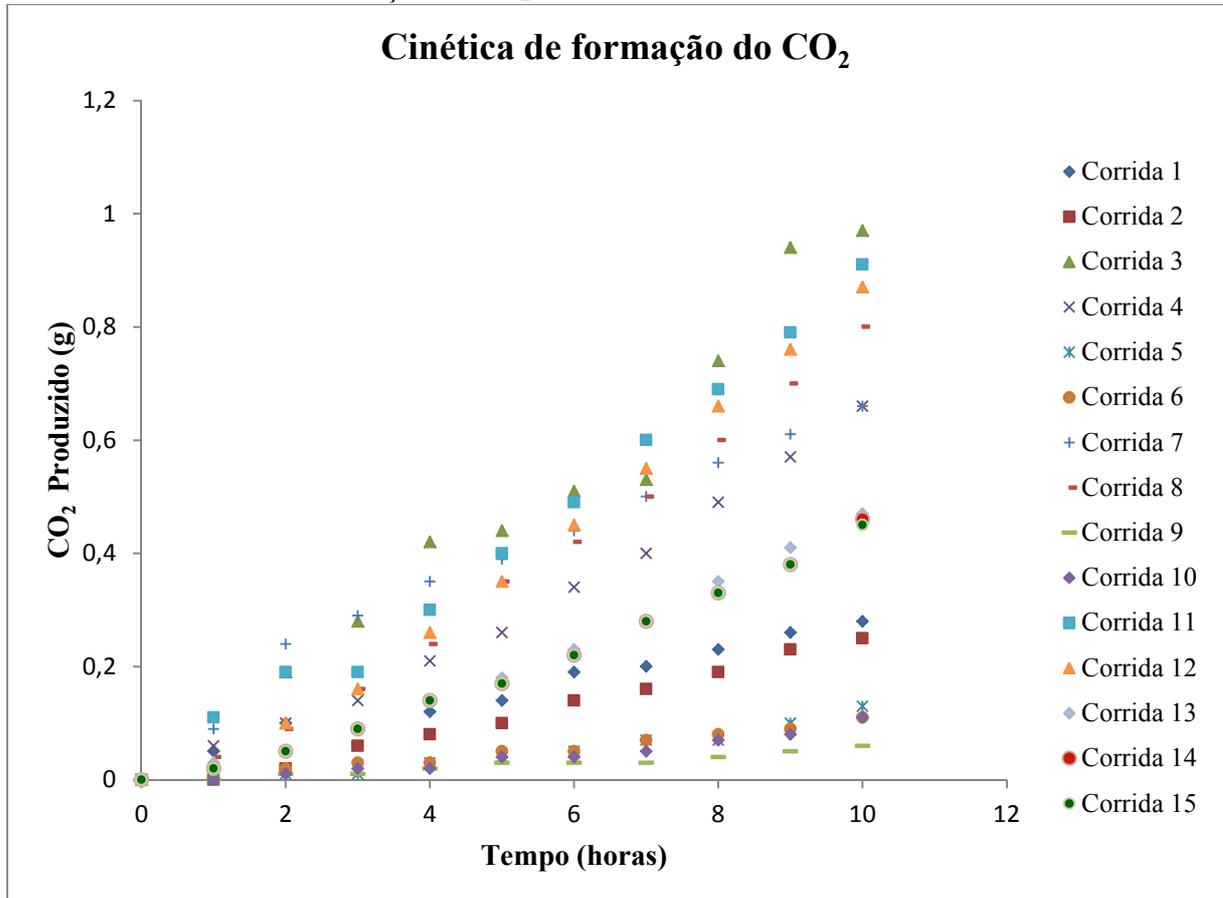
X1: Temperatura (°C); X2: pH (adm.); X3: concentração de inóculo (g/L).

De acordo com a Tabela 6, três experimentos (corridas 13 a 15) foram realizados nas condições do ponto central, para verificar qualquer alteração no procedimento de estimativa, ou seja, uma forma de medir a precisão método.

#### 4.4 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE CO<sub>2</sub>

O Gráfico 2, apresenta as curvas cinéticas dos 15 experimentos determinados no planejamento experimental. O objetivo do levantamento destas foi o de acompanhar as etapas do desenvolvimento do microrganismo (como o fim da fase lag), no intuito de proporcionar maior tempo para a fase logarítmica, e também observar o comportamento de crescimento no microrganismo no caldo.

Gráfico 2: Cinética de formação de CO<sub>2</sub>

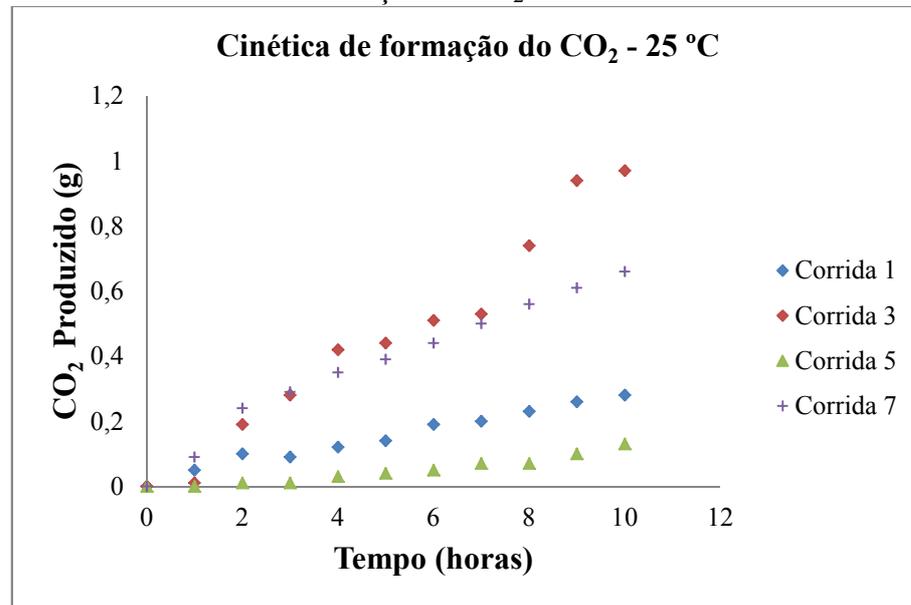


Segundo a estequiometria da fermentação alcoólica, as leveduras consomem o substrato e produzem etanol e CO<sub>2</sub> (que possuem mesmos coeficientes estequiométricos), assim o dióxido de carbono produzido indicou a ocorrência da produção de etanol, assim como o desenvolvimento da *S. cerevisiae* PE-2.

Analisando o gráfico em questão e perfeitamente visível que a corrida 3 apresentou a maior produção de etanol, sendo esta desenvolvida na temperatura de 25°C, concentração de inóculo de 5,5 g/L e pH 5,5.

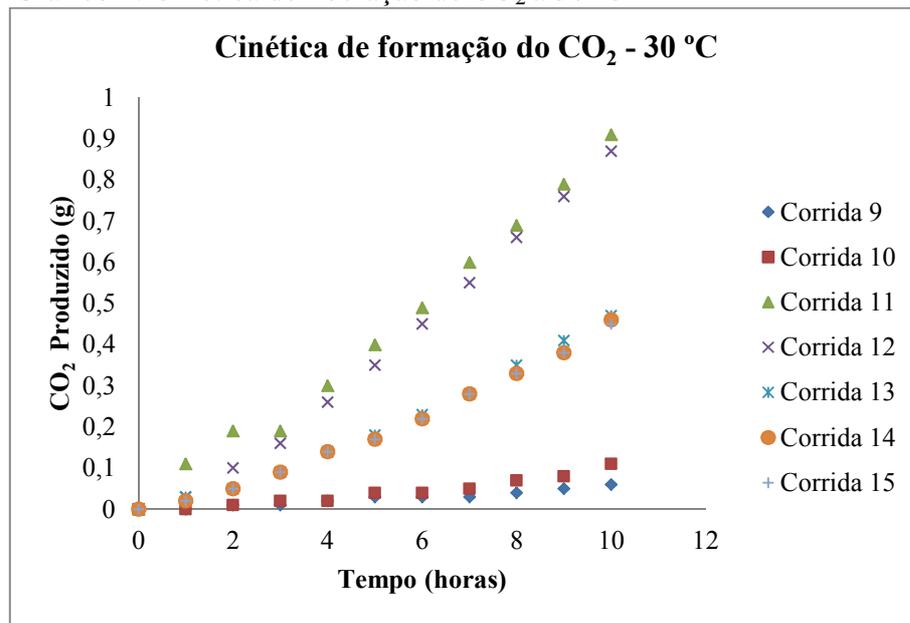
No Gráfico 3 são apresentadas as curvas cinéticas a 25 °C, observa-se que a corrida 3, apesar de possuir menor quantidade de inóculo que a corrida 7, produziu maior quantidade de etanol neste intervalo de tempo estudado.

Gráfico 3: Cinética de liberação de CO<sub>2</sub> à 25°C



**Corrida 1** – pH inicial 3,5 e concentração de inóculo 5,5 g/L; **Corrida 3** - pH inicial 5,5 e concentração de inóculo 5,5 g/L; **Corrida 5** - pH inicial 5,5 e concentração de inóculo 1 g/L; **Corrida 7** - pH inicial 4,5 e concentração de inóculo 10 g/L.

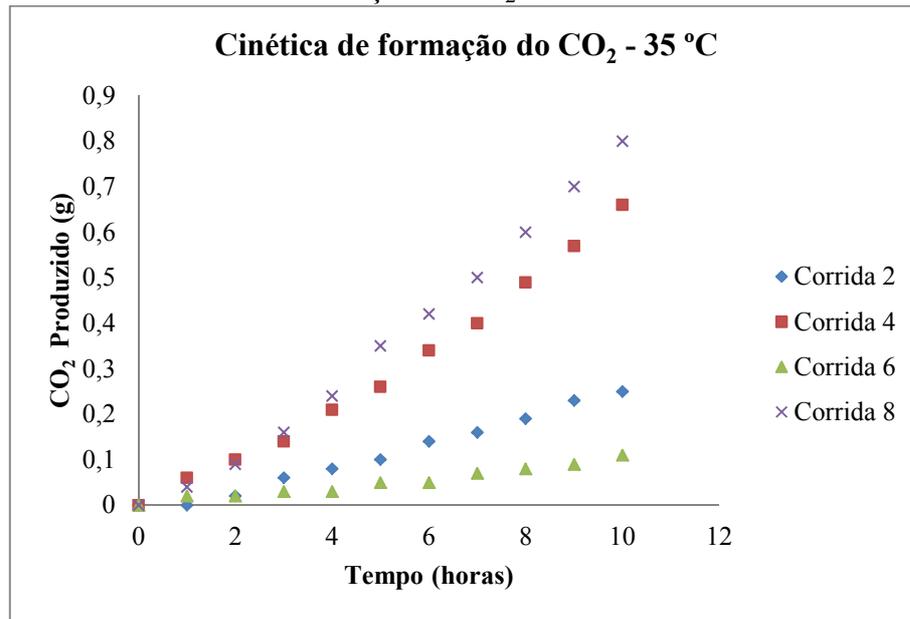
No gráfico 2, pode ser observado que as corridas 5, 6, 9 e 10 apresentaram menor desenvolvimento durante o levantamento da cinética da fermentação alcoólica através da produção de CO<sub>2</sub>. A corrida 5 foi realizada a 25°C, com concentração de inóculo de 1 g/L e pH 5,5. A concentração de inóculo nesta corrida e nas demais, que apresentaram pior desempenho, foi a mesma, 1 g/L, o que permitiu a conclusão da forte influência da quantidade de microrganismo no desenvolvimento do processo fermentativo. No entanto este parâmetro isolado, não é suficiente para determinar o melhor desempenho do processo, isto pode ser comprovado através da corrida 11 (Tabela 6), na qual a maior concentração de inóculo (10 g/L) não garantiu o melhor desempenho em relação a produtividade de etanol, pois apesar do mesmo pH (5,5), possui quantidade de inóculo maior que a corrida 3, e temperatura diferente, 30 °C (Corrida 3 e 25°C).

Gráfico 4: Cinética de liberação de CO<sub>2</sub> à 30 °C

**Corrida 9** – pH inicial 3,5 e concentração de inoculo 1 g/L; **Corrida 10** - pH inicial 3,5 e concentração de inoculo 1 g/L; **Corrida 11** - pH inicial 5,5 e concentração de inoculo 10 g/L; **Corrida 12** - pH inicial 5,5 e concentração de inoculo 10 g/L; **Corrida 13** - pH inicial 4,5 e concentração de inoculo 5,5 g/L; **Corrida 14** - pH inicial 4,5 e concentração de inoculo 5,5 g/L; **Corrida 15** - pH inicial 4,5 e concentração de inoculo 5,5 g/L.

Entre as três corridas que apresentaram maior produtividade, as temperaturas de trabalho não ultrapassaram 30°C, os ensaios realizados a 35°C (Gráfico 5) só mostraram melhor produtividade quando eram associados com concentrações de inóculo maiores que 5,5 g.

Valores de pH em torno de 3,5 estavam frequentemente associados a baixos valores de teor alcoólico, o que pode ser comprovado pela cinética das corridas 1, 2, 9 e 10.

Gráfico 5: Cinética de liberação de CO<sub>2</sub> a 35°C

**Corrida 2** – pH inicial 3,5 e concentração de inoculo 5,5 g/L; **Corrida 4** - pH inicial 5,5 e concentração de inoculo 5,5 g/L; **Corrida 6** - pH inicial 4,5 e concentração de inoculo 1 g/L; **Corrida 8** - pH inicial 4,5 e concentração de inoculo 10 g/L.

#### 4.5 OTIMIZAÇÃO EXPERIMENTAL DA FERMENTAÇÃO

Para otimizar o processo de produção de etanol, foi utilizado o método de superfície resposta, e análises e interpretações de dados obtidos da variável resposta, conforme as saídas do Statistica® 7.0, considerando o nível de significância  $\alpha = 0,05$  (confiança 95%). Os experimentos foram projetados seguindo a matriz de Box-Benhken, e foi considerado o erro puro. Foi proposto um modelo polinomial completo de segunda ordem para ajuste dos dados.

Esta ferramenta foi utilizada com o intuito de definir as faixas ótimas de operação do processo, ou seja, faixas que maximizem as respostas.

##### 4.5.1 Efeitos das variáveis de entrada

###### *Efeitos principais e das interações*

Os efeitos das variáveis isoladas e combinadas estão apresentados na Tabela 7. Em primeira análise, observa-se que as variáveis individuais **X<sub>1</sub>(Q)**, e **X<sub>3</sub>(L)** têm significância estatística (são apresentadas em negrito).

Tabela 7: Estimativa dos efeitos

	<b>Coefficiente</b>	<b>Efeito</b>	<b>Erro</b>	<b>t(4)</b>	<b>p</b>
Média	0,506667	0,293333	0,037546	7,812583	0,001449
X1 (L)	-0,022500	-0,045000	0,091969	-0,489294	0,650252
<b>X1 (Q)</b>	<b>-0,188333</b>	<b>0,188333</b>	<b>0,067687</b>	<b>2,782395</b>	<b>0,049697</b>
X2 (L)	0,076667	0,153333	0,106197	1,443859	0,222271
X2 (Q)	-0,108333	0,108333	0,067687	1,600493	0,184742
<b>X3 (L)</b>	<b>0,181667</b>	<b>0,363333</b>	<b>0,106197</b>	<b>3,421318</b>	<b>0,026748</b>
X3 (Q)	-0,023333	0,023333	0,067687	0,344721	0,747666
X1X2 (L)	-0,010000	-0,020000	0,130064	-0,153770	0,885237
X1X3 (L)	-0,035000	-0,070000	0,130064	-0,538196	0,618992

X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> e X<sub>3</sub>: temperatura (°C), pH e concentração (g/L), respectivamente; (L): linear; (Q): quadrático.

A Tabela 7 apresenta a análise de variância (ANOVA), que consiste de uma análise com mais propriedade do efeito das variáveis de entrada sobre a resposta *ETANOL*. Na ANOVA a variável estatística **p** indica a probabilidade que cada variável possui de não ser considerada estatisticamente significativa para a variável resposta, ou seja, de estar dentro da região de aceitação de hipótese nula, situação na qual os efeitos são considerados apenas ruído ou erros aleatórios, ou seja, estatisticamente não significativos. O que confirma que as variáveis operacionais: temperatura e concentração do inóculo têm influencia significativa no processo de produção de etanol, pois os valores de **p** para a temperatura e concentração de inóculo, que são, respectivamente, 0,0497 e 0,0267, estão abaixo do nível de significância, que é de 0,05.

De acordo com dados encontrados na literatura, a variável temperatura exerce influencia sobre a quantidade de etanol produzida, segundo Le Man, Behera e Park (2010), em seu estudo sobre a otimização de parâmetros operacionais para a produção de etanol a partir de resíduos alimentares, o aumento da temperatura é observado quando a fermentação é desenvolvida em temperaturas maiores, mais especificamente, a 38°C e em um pH de 5,45. No entanto um aumento conjunto destes parâmetros leva a um declínio na produção de etanol.

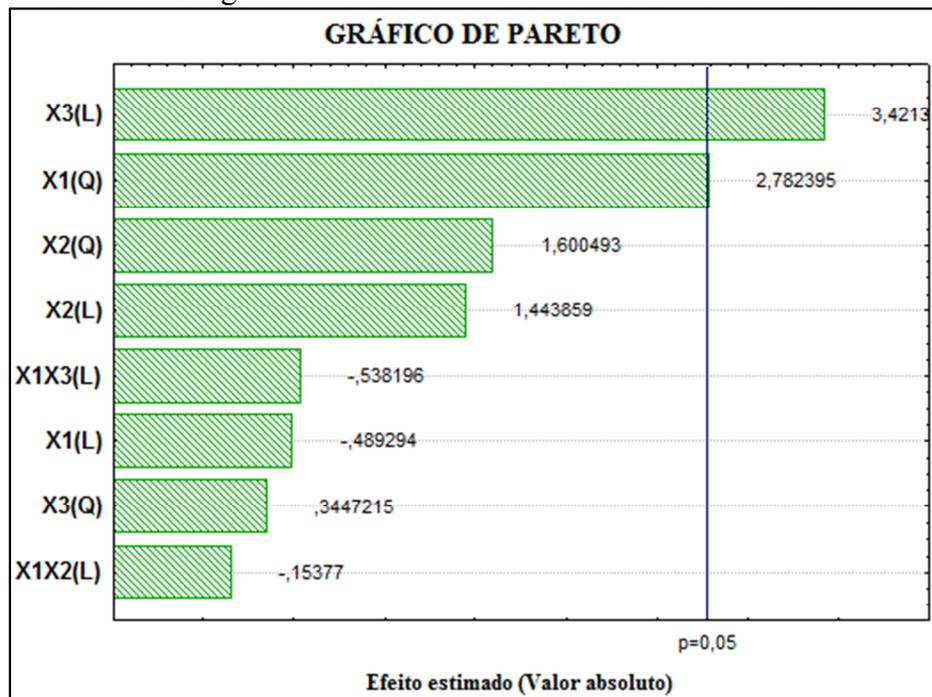
Em relação aos efeitos das variáveis significativamente estatísticas, a variável X1(Q) com sinal (-) influi da seguinte maneira, quanto maior o valor da temperatura, menor a quantidade de etanol produzido; em relação à concentração de inóculo (X3(L)), que possui sinal (+), quanto maior o valor desta, maior a concentração de etanol.

#### 4.5.2 Gráfico de pareto

O gráfico de pareto é uma ferramenta que permite a comparação visual entre os efeitos gerados pelas variáveis independentes. As variáveis com significância estatística são apresentadas como aquelas que chegam ao lado direito do gráfico. As colunas representam a magnitude dos efeitos.

O Gráfico 6 apresenta as variáveis X1(Q) (temperatura) e X3(L) (Conc. de inóculo) como influentes no processos fermentativo; quanto a temperatura, a literatura cita diversos efeitos que esta pode provocar na produção de etanol pela via fermentativa, sendo que a temperatura interfere diretamente no desenvolvimento das leveduras (agentes da fermentação), segundo McMeekin *et al.*, (2002), o efeito deletério de temperaturas mais elevadas na produção de etanol podem ser atribuídos à desnaturação de ribossomas e enzimas e os problemas associados com a fluidez das membranas.

Gráfico 6: Diagrama de Pareto dos efeitos individuais e combinados



Segundo Martins (2009), que avaliou o efeito do inóculo e do perfil de alimentação do mosto na produção em escala piloto e industrial de etanol, foi possível observar um aumento da produtividade específica de etanol em função da concentração de inóculo, em ensaios para escala piloto.

### 4.5.3 Proposta de um modelo polinomial de segundo grau

Na Tabela 8 é proposto um modelo polinomial de segundo grau completo, que melhor expressou à influência dos fatores estatisticamente significativos (teor alcoólico).

O valor de  $R^2$  foi de aproximadamente 89% (ou seja, explica 89% da variação total em torno da média), o que indica que o modelo quadrático representa bem a relação entre os efeitos e a resposta.

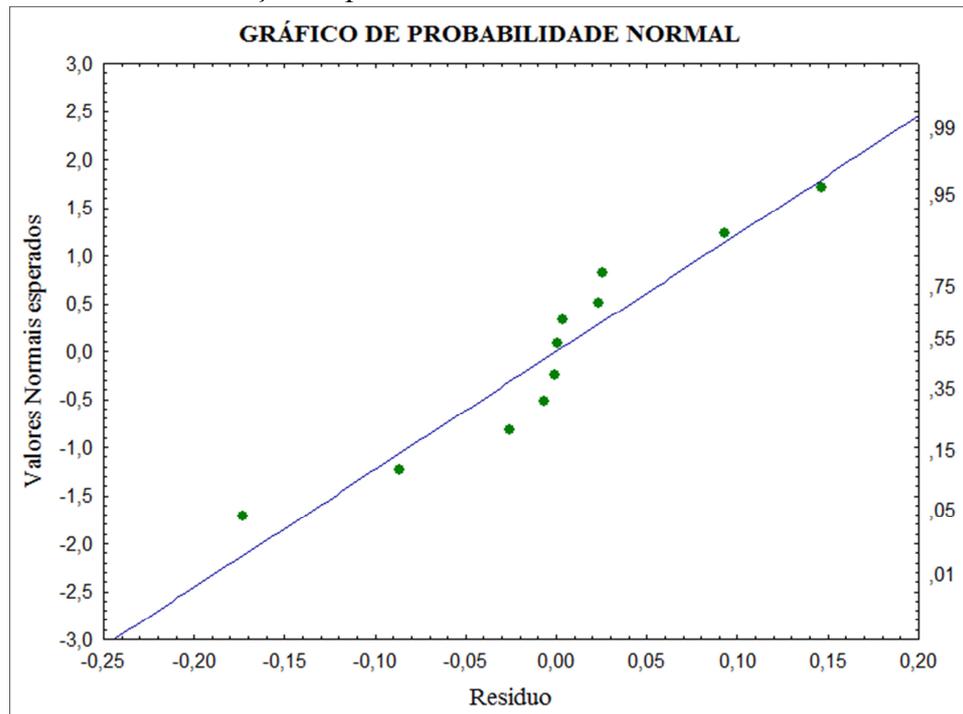
Tabela 8: Proposta de um modelo polinomial

VR	$R^2$ (%)	Equação
ETANOL	89,00	$\begin{aligned} \text{Etanol} = & 0,506667 - 0,0225X_1 - 0,188333X_1^2 \\ & + 0,076667X_2 - 0,108333X_2^2 + 0,181667X_3 \\ & - 0,023333X_3^2 - 0,01X_1X_2 - 0,035X_1X_3 \end{aligned}$

Esta equação pode ser utilizada para prever o teor alcoólico. Além de explicar os efeitos lineares da temperatura, pH e concentração de inóculo sobre a produção de etanol, a análise descreveu os efeitos quadráticos e de interação dos parâmetros também.

O Gráfico 7 apresenta a distribuição normal dos resíduos; é possível observar que os erros estão distribuídos em torno da reta, o que comprova a normalidade para a resposta *ETANOL*.

Gráfico 7: Distribuição de probabilidade normal do modelo

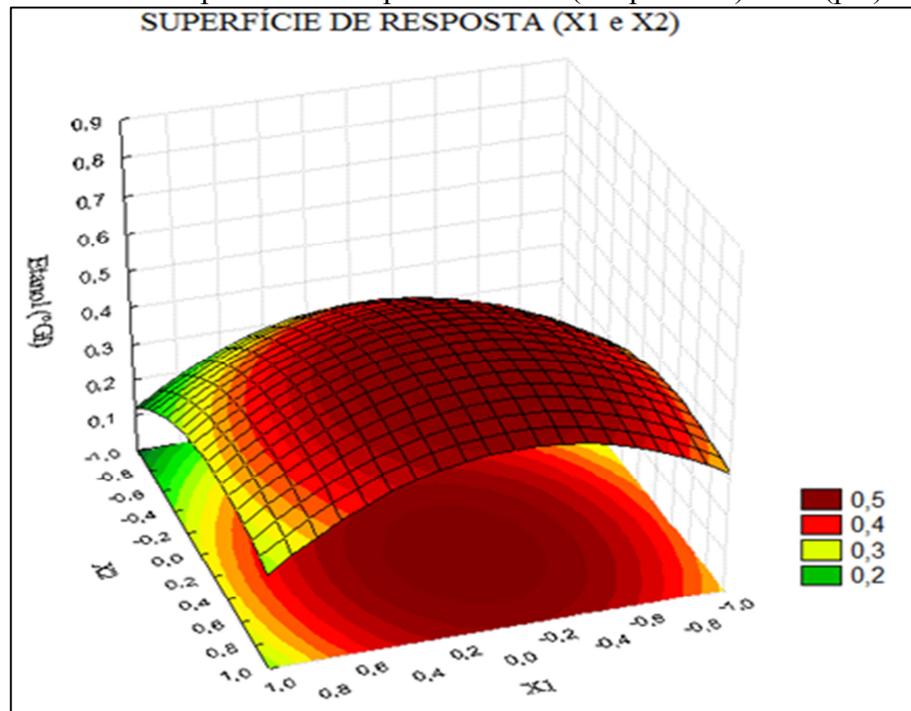


#### 4.5.4 Análise da superfície resposta e contornos

Nos Gráficos 8 e 9, são apresentadas a superfície resposta e as correspondentes curvas de níveis ou contornos em função das variáveis codificadas, respectivamente, que foram geradas a partir do modelo de segunda ordem proposto, sendo que estes gráficos correspondem à superfície formada pela interação das variáveis X1 e X2 com a variável X3 = 0.

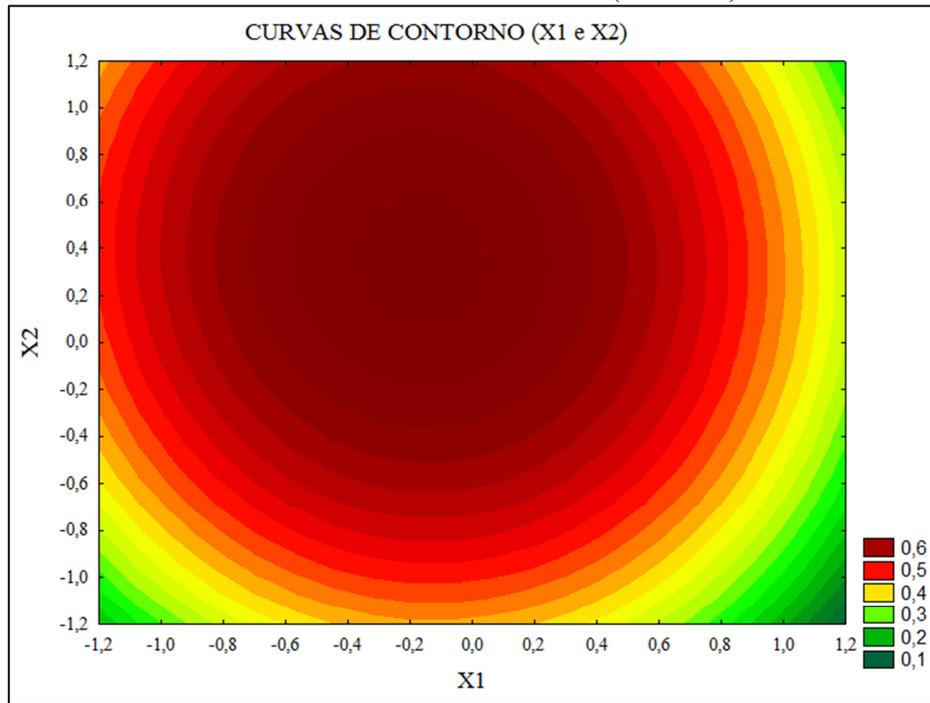
O Gráfico 8 mostra que valores maiores de pH (acima de 3,5) associados com temperaturas próximas ao ponto central (30°C) levam a uma maior produtividade em etanol. Segundo Shafaghat *et al.*, (2009), que avaliaram as condições de crescimento ótimo para levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PTCC 24860), a produção máxima de etanol foi conseguida no valor de pH de 5,6. Apesar dos bons resultados em valores de pH maiores, estas faixas não são indicados por favorecer o desenvolvimento de outros microrganismos, que podem competir com os agentes fermentativos (leveduras) pelos nutrientes disponíveis no mosto.

Gráfico 8: Superfície de resposta com X1 (temperatura) e X2 (pH)



Segundo Lin *et al.*, (2012), em uma análise sobre os fatores que afetam a fermentação alcoólica usando *Saccharomyces cerevisiae* BY4742, trabalhando com o sistema em batelada, concluíram que a competição durante o processo de fermentação realizada em temperaturas diferentes, podem ser um meio de testar a capacidade de resistência da estirpe utilizada no sistema. Isto pode então ser utilizado como um método para determinar a condição ótima para a fermentação alcoólica e também um critério para a seleção de uma das várias estirpes, enquanto, ao mesmo tempo, é possível estudar a resistência à temperatura numa situação controlada, ou seja, sob condições de laboratório. As taxas máximas de produção específica de etanol foram observadas entre 30 e 45°C, com concentrações iniciais de glicose diferentes.

Gráfico 9: Curvas de contorno (X1 e X2)

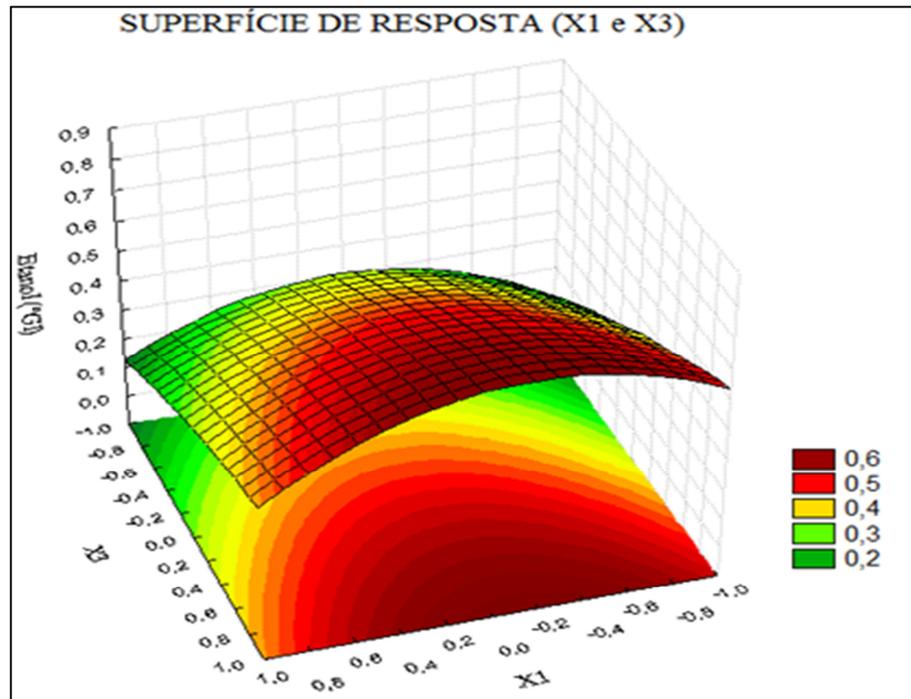


Os Gráficos 10 e 11, apresentam a relação entre a temperatura e a concentração de etanol no processo fermentativo em questão. O aumento da produção de etanol é acompanhado do aumento da concentração de inóculo utilizada no processo. Neste caso, este aumento de produção foi desenvolvido em valores de temperatura de aproximadamente 30°C. Um aumento da temperatura a partir desse ponto é acompanhado de uma redução do teor alcoólico obtido, assim como uma diminuição na concentração de inóculo.

Segundo Canbaş, Ünal e Sener (2007) o efeito da temperatura de fermentação sobre a cinética de crescimento das leveduras *S. cerevisiae* (Zymaflore VL1) e *S. cerevisiae* (Uvaferm CM), para a espécie Uvaferm a taxa de crescimento específico a 25°C foi muito maior do que a 18°C.

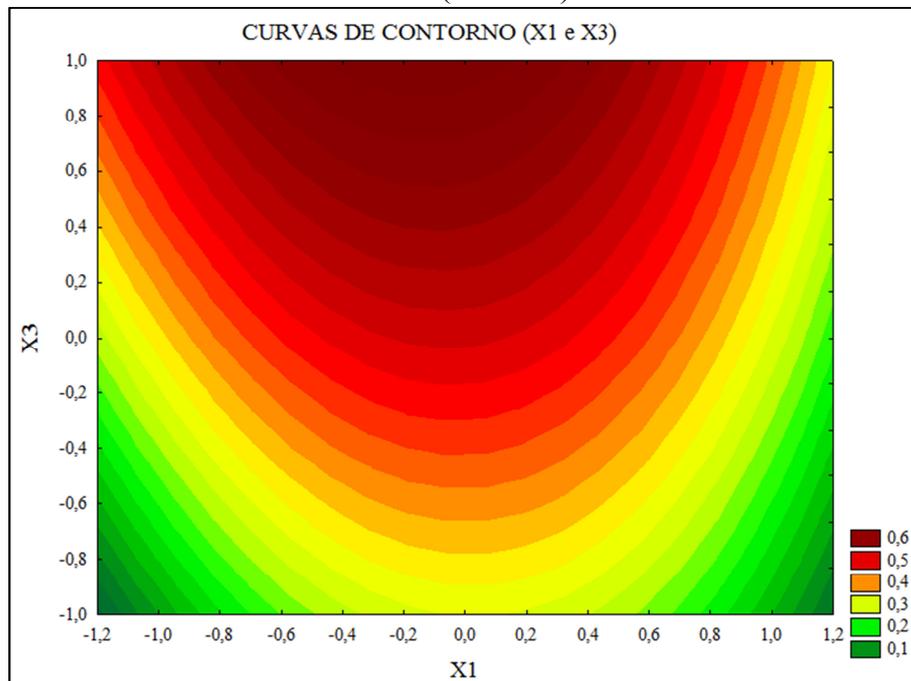
De acordo com Arroyo-López *et al.*, (2009), foram obtidos resultados que mostraram que as mudanças nos valores de temperatura de fermentação, pH e concentração de açúcares pode afetar o crescimento de leveduras no vinho, sendo que neste estudo sobre os parâmetros de crescimento foram utilizadas as espécies *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* e seu híbrido interespecífico. Para *S. cerevisiae* VL3c a temperatura e pH ótimos foram, respectivamente, 35°C e 5,0.

Gráfico10: Superfície de resposta com X1 (temperatura) e X3 (concentração de inóculo)



$X_2 = 0$  (4,5)

Gráfico 11: Curvas de contorno (X1 e X3)



Torija *et al.*, (2003) em seu estudo sobre os efeitos da temperatura sobre a fermentação da estirpe *Saccharomyces cerevisiae*, avaliaram os efeitos da temperatura (15 a 35°C) sobre o crescimento destes microrganismos em mostos. Como esperado, o crescimento das leveduras

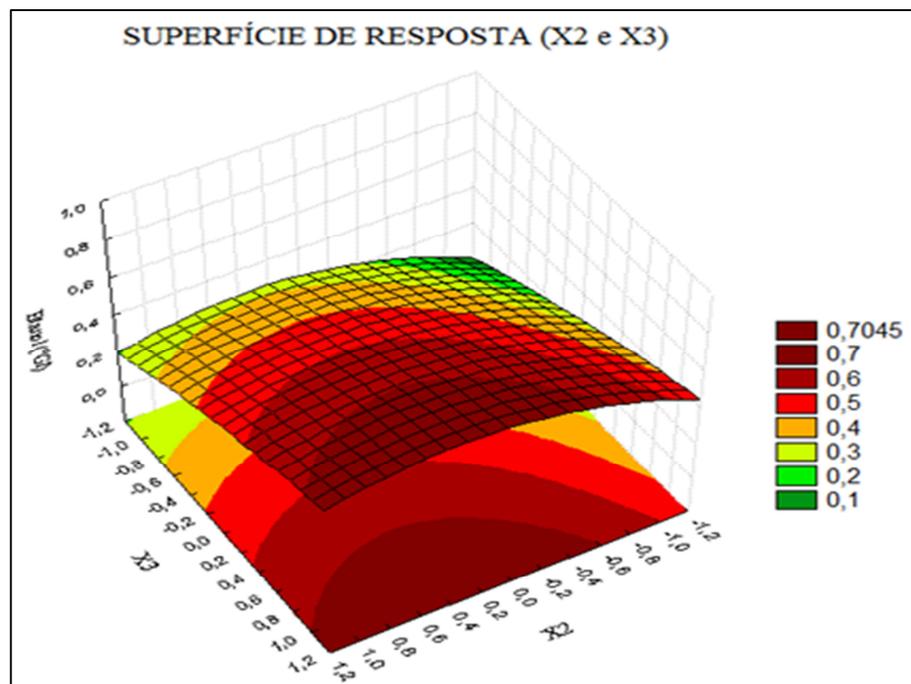
variou de acordo com a temperatura, em geral, a fermentação foi mais rápida a temperaturas elevadas (30 a 35°C).

Yan *et al.*, (2012), tiveram uma maior produção de etanol no nível médio de temperatura. Quantidades maiores de inóculo, produziram mais etanol, junto com os parâmetros temperatura e pH, em seus níveis ótimos. As condições de fermentação otimizadas obtidas com MSR foram, 22,65°C (temperatura), 3,54 (pH) e 7,37% (quantidade de inóculo), e a produção de etanol com a fermentação sob as condições ótimas foi de 7,63%.

Os Gráficos 12 e 13 ilustram a região ótima de trabalho, que neste caso relacionam o pH e a concentração de inóculo, esse ponto é observado em concentrações maiores de levedura e valores de pH acima do ponto central determinado.

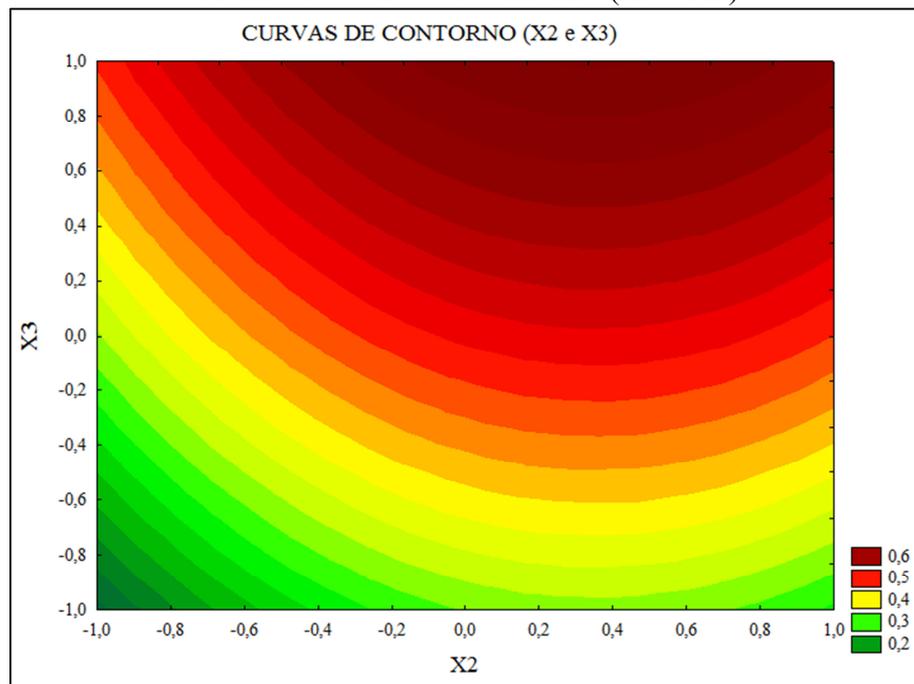
Segundo Pacheco (2010), em seu estudo sobre a fermentação alcoólica com leveduras floculante, a concentração celular no inóculo contribui consideravelmente para o aumento da resposta rendimento e produtividade.

Gráfico12: Superfície de resposta com X2 (pH) e X3 (concentração de inóculo)



X1 = 0 (30 °C)

Gráfico 13: Curvas de contorno (X3 e X2)



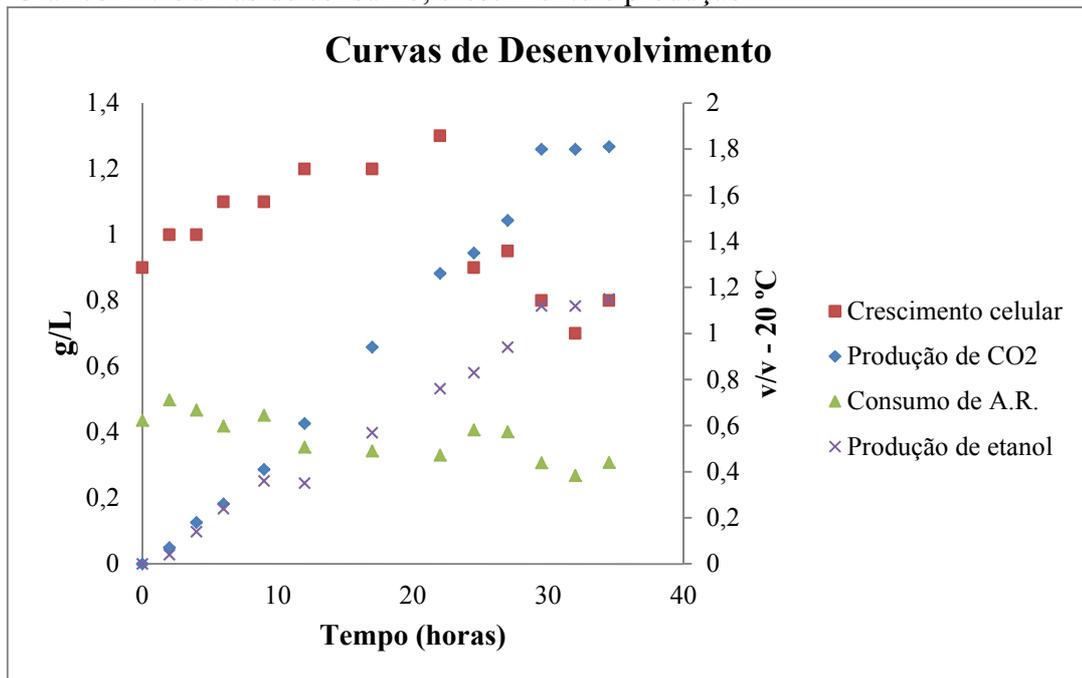
Em relação à influência de pH, Lin *et al.*, (2012), avaliaram este parâmetro na faixa de pH de 3,0 a 6,0, e concluíram que quando o pH estava menor que 4,0, o tempo de incubação para atingir a máxima produção de etanol foi prolongado, mas esta não foi baixa; e quando o valor do pH estava acima de 5,0, a quantidade de etanol produzida diminuía substancialmente. Assim, um intervalo de pH de 4,0 a 5,0 pode ser considerado como o limite operacional para a produção de etanol.

As melhores condições para a realização da fermentação do caldo de mandioca doce pela ação da levedura *S. Cerevisiae* PE-2 encontrados pela metodologia de superfície de resposta foram: 4,88 (pH), 28°C (temperatura) e 10 g/L (concentração de inóculo).

#### 4.6 PARÂMETROS CINÉTICOS

O Gráfico 14 contém os dados da cinética de fermentação do caldo de mandioca doce realizada nas condições ótimas encontradas na metodologia de superfície de resposta. A fermentação foi conduzida até o decréscimo da concentração celular e consequente redução na produção de etanol e CO<sub>2</sub>.

Gráfico 14: Curvas de consumo, crescimento e produção



Segundo Ferreira (2002), o CO<sub>2</sub> produzido na fermentação pode ser usado para estimar o etanol produzido e açúcares redutores consumidos, no entanto o etanol calculado via CO<sub>2</sub> liberado apresenta-se um pouco maior que o etanol real determinado devido à existência de outras vias consideradas desvios da fermentação, como a produção de glicerol e de ácidos orgânicos. Ao contrário, o açúcar calculado via CO<sub>2</sub> é ligeiramente menor do real, pelas razões consideradas anteriormente. Esta consideração explica o fato da curva de dióxido de carbono (que apresenta o mesmo coeficiente estequiométrico do etanol) representar maior produção do que a curva de álcool produzido.

##### 4.6.1 Sistema de reações metabólicas

A proposta 1, que considera que a glicose é consumida pela levedura para crescer e produzir etanol é a mais indicada, devido a regressão multilinear apresentar melhor

coeficiente de correlação (0,999) (Tabela 9). Este fato é comprovado pelo fato da matéria-prima em questão (caldo de mandioca doce), apresenta basicamente a glicose como fonte de carbono disponível para a levedura.

Tabela 9: Resultados das regressões multilinear e linear

<b>Proposta 1</b>	<b>Proposta 2</b>
$\Delta S = -a\Delta X - b\Delta P$	$\Delta S = -c\Delta P$
a = 0,02 b=1,39	c =0,40
R = 0,999	R = 0,907

#### 4.6.2 Fase exponencial

A Tabela 10 apresenta os dados obtidos através da regressão linear, o valor do coeficiente de correlação permite determinar a existência da fase de crescimento. De acordo com os valores de R encontrados para diferentes intervalos de tempo, observa-se que durante seu desenvolvimento a levedura (*Saccharomyces cerevisiae* PE-2) apresenta fases de crescimento seguidas por posteriores declínios durante aproximadamente 22 horas, após este tempo a levedura entrou na fase de declínio, na qual ocorre uma “lise” celular, autólise ou rompimento dos microrganismos, provocada pela ação de enzimas intracelulares (LIMA, BASSO e AMORIM, 2001).

O uso da levedura seca garantiu a inexistência da fase de adaptação (lag), após o período de 2 horas o crescimento microbiano já se encontrava na fase exponencial.

Tabela 10: Resultados da determinação da fase exponencial de crescimento

<b>Duração da fase exponencial (h)</b>	<b><math>\mu_m</math> (h<sup>-1</sup>)</b>	<b>R</b>
2	0,05	1
4	0,025	0,75
6	0,03	0,9
9	0,0221	0,85
12	0,0226	0,9251
17	0,0175	0,8792
22	0,0165	0,9214
24,5	0,0064	0,1614
27	0,0024	0,0294

Segundo Nadir *et al.*, (2009), em estudo sobre a comparação de sorgo sacarino e mandioca para a produção de etanol usando *Saccharomyces cerevisiae*, o valor de  $\mu_m$  encontrado para a mandioca é maior do que o do sorgo sacarino, estes valores são respectivamente, 0,0333 h<sup>-1</sup> e 0,0506 h<sup>-1</sup>, o que determina que a levedura leva mais tempo para aumentar sua população no sorgo sacarino do que na mandioca. O valor de  $\mu_m$  encontrado para a mandioca doce, neste trabalho foi de 0,05 h<sup>-1</sup>.

## 5 CONCLUSÃO

A mandioca doce apresenta grande quantidade de açúcares redutores em sua composição de carboidratos, 6,22 % dos 6,52 de açúcares totais, característica que favorece o processo fermentativo.

Através da análise estatística foi possível concluir como as variáveis independentes: temperatura (°C), pH e concentração de inóculo (g/L) influem na produção de etanol, nas condições deste estudo. Utilizando a análise dos efeitos principais contidos na tabela ANOVA, conclui-se que a temperatura e a quantidade de inóculo são estatisticamente significativas neste processo. A temperatura possui efeito acompanhado de sinal negativo (-), o que significa que o aumento desta causa decréscimo na produção de etanol, enquanto a concentração de inóculo, com sinal (+), tem seu aumento associado a uma maior produtividade.

O modelo polinomial proposto apresenta um  $R^2$  igual a 0,89, o que sugere que o modelo é preditivo. A metodologia de superfície de resposta determinou as seguintes condições como ótimas: 28 °C (temperatura), 4,88 (pH) e 10 g/L (concentração de inóculo). Como o caldo de mandioca doce foi fermentado em suas condições originais de nutrientes e substrato, o teor alcoólico máximo produzido foi baixo (0,8 °GL).

O acompanhamento das curvas de crescimento, consumo e produção, foi importante para a determinação da redução do crescimento microbiano e consequente final do processo fermentativo (realizado na condição ótima determinada).

O sistema das reações metabólicas, neste processo, foi avaliado através de regressão linear e multilinear, e concluiu-se, através da interpretação dos resultados das regressões, que a glicose é consumida pela levedura para crescer e produzir etanol. A máxima velocidade específica de crescimento microbiano ( $\mu_m$ ) ocorre no tempo de 2 horas, sendo que este parâmetro apresenta períodos de crescimento seguidos por declínios, a partir de 22 horas de fermentação, o valor de  $\mu_m$  decresce significativamente, o que indicou o fim do processo fermentativo, sem o consumo total dos açúcares contidos no caldo da mandioca doce.

Este estudo pode ser utilizado como base para melhorias no processo de fermentação do caldo de mandioca doce, sendo o álcool produzido utilizado nas mais diversas aplicações (produtos farmacêuticos, bebidas, combustível e entre outras).

## REFERÊNCIAS

A.O.A.C INTERNATIONAL. **Official methods of analysis**. 16<sup>a</sup> ed., 3<sup>a</sup> rev. Gaithersburg: Published by AOAC International, v.2.1997.

**AGRIANUAL 99**: Anu. Agric. Brás., p. 352-358, 1999.

ALVES, J. G. L. F. **Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae***. 69 p. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 1996.

AMORIM, H. V. de (Org.); LEÃO, R. M. (Org.). **Fermentação Alcoólica: Ciência e Tecnologia**. 1<sup>a</sup>. ed. Piracicaba: Fermentec Publicações Editora e Comercio de Livros Ltda., 2005.

ANDRADE, R. R. **Procedimento para o desenvolvimento de um modelo matemático robusto para o processo de fermentação alcoólica**. 99 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2007.

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol – Brasil 30 anos na vanguarda. **Multi-Ciência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da UNICAMP**, v. 7, p. 1-16, Out. 2006.

ARROYO-LÓPEZ, F. N.; ORLIC, S.; QUEROL, A.; BARRIO, E. Effects of temperature, pH and sugar concentration on the growth parameters of *Saccharomyces cerevisiae*, *S. kudriavzevii* and their interspecific hybrid. **Int. J. Food Microbiol.**131:120-127. 2009.

BADHAN, A. K.; CHADHA, B. S.; KAUR, J.; SAINI, H. S.; BHAT, M. K. Production of multiple xylanolytic and cellulolytic enzymes by thermophilic fungus *Myceliophthora* sp. IMI 387099. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 504-510, 2007.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 89-105, 2008.

BAILEY, J. A. Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. **Biotechnol. Prog.**, v. 14 (1), p. 8 – 20, 1998.

BARNETT, J. A. **Imobilização da invertase em quitina de Krill (*Euphasiasuperbal*)**. 121p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1990.

BASTOS, V. D. Etanol, alcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES Setorial**, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5 – 38, mar. 2007.

BELY, M.; SABLAYROLLES, J. M.; BARRE, P. Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 41, n. 4, 1990.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOX, G. E. P.; BEHNKEN, D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables. **Technometrics: A journal of Washington**. v. 2, p. 455-475, 1960.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building**. New York: Wiley, 1978.

BRINGHENTI, L.; CABELLO, C. Qualidade do álcool produzido a partir de resíduos amiláceos da agroindustrialização da mandioca. **Energia e Agricultura**. Botucatu, São Paulo, v. 20, n. 4, 2005.

BRYAN, W. L.; SILMAN, R. W. Viability and initial kinetic parameters for dry yeast inocula in batch fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n.1, p. 2 – 8, 1991.

CAMPAÑA, A. M. G.; RODRÍGUEZ, L. C.; GONZÁLEZ, A. L.; BARRERO, F. A.; CEBA, M. R. Sequential response surface methodology for multioptimization in analytical chemistry with three-variable Doehlert designs. **Analytica Chimica Acta**. v. 348, p. 237-246. 1997.

CAMPOS, M. P. Produção de etanol a partir de matérias-primas sacarinas. In: Furtado, J. S. Fermentações Industriais & Transformações Microbianas. **Sociedade Brasileira de Microbiologia**. São Paulo. p. 92 – 98, 1980.

CANBAŞ A.; ŞENER A.; ÜNAL M. U. The effect of fermentation temperature on the growth kinetics of wine yeast species, **Turk J Agric For**. v. 31, p. 349 – 354, 2007.

CARVALHO, G. B. M.; ROSSI A. A., ALMEIDA e SILVA, J. B. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 2º parte – A fermentação. **Revista Analytica**, n. 26, p. 46-54, 2007.

CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Fermentação Descontínua; In: SCHMIDELL, W; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. *et al.*; **Biotecnologia Industrial**, vol. 2, Engenharia Bioquímica; 1ed; cap. 9; São Paulo, SP; Editora Edgard Blücher Ltda. 2001.

CARVALHO, L. J. C. B.; CABRAL, G. B.; CAMPOS, L. Raiz de reserva de mandioca: um sistema biológico de múltipla utilidade. Brasília: **CENARGEN**, 16p. 2000.

CARVALHO, L.J.C.B.; SOUZA, C.R.B.; CASCARDO, J.C.M.; CAMPOS, L. Identification and characterization of novel cassava (*Manihot esculenta* Crantz) clone with high free sugar content and novel starch. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 56, n.4, p. 643 – 659, 2004.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 1 ed., Editora UNICAMP, Campinas – SP, 1999.

CHANDEL, A. K.; Es, C.; RUDRAVARAM, R.; NARASU, M. L.; RAO, L. V.; RAVINDRA, P. Economics and environmental impact of bioethanol production Technologies: na appraisal. **Biotechnology and Molecular Biology**. v. 2, p. 14 – 32, 2007.

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. E. S.; GÓMEZ, E. O. **Biomassa para energia**. Editora da UNICAMP, Campinas, SP, 2008.

DE OLIVEIRA, A. C. G.; SPOTO, M. H. F.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; DE SOUSA, C. P.; GALLO, C. R. Efeitos do processamento térmico e da radiação gama na conservação de caldo de cana puro e adicionado de suco de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 863 – 873, 2007.

DIAS, J. M. C. S. **Aplicação do método dinâmico de medida da velocidade específica máxima de crescimento celular**. Dissertação de mestrado, USP, São Paulo. 1982.

DOURADO, A.; GOMA, G.; ALBUQUERQUE, U.; SEVELY, Y.; Modeling and Statistic Optimization of the Ethanol Production in a Cascade Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 29, n. 2, p. 187-194, 1987.

EL HALOUI, N. E.; CORRIEU, G.; CLERAN, Y.; CHERUY, A. Method for on-line prediction of kinetics of alcoholic fermentation in wine marking. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 68, n. 2, p. 131-135, 1989.

ENGASSER, J. M. Bioreactor engineering: the design and optimization of reactors with living cells. **Chemical Engineering Science**, v. 43 (8), p. 1739 – 1748, 1988.

EUROTHERM, Life Sciences Solutions. **O processo de fermentação**, Disponível em: [http://www.eurothermltda.com.br/lifesciences/aplicacoes\\_ferment.htm](http://www.eurothermltda.com.br/lifesciences/aplicacoes_ferment.htm). Acesso em: 02 de agosto de 2012.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), **FAOSTAT**. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>, Acesso em: 04 nov. 2012.

FERREIRA, A. A. **Simulação da fermentação alcoólica de meios à base de glicose por *Saccharomyces cerevisiae***. 98p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 1998.

FERREIRA, L. V. **Estudo da fermentação alcoólica em frascos agitados**. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 2002.

FERREIRA, S. L.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; DA SILVA, E. G.; PORTUGAL, L. A.; DOS REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; DOS SANTOS, W. N. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**. v. 2, p. 179-186, 2007.

GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica**. Campinas. 388p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. 1990.

GHOSE, T. K.; THYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate I. Batch versus continuous systems. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 21, n. 8, p. 1387-1400, 1979.

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

HAN, K., LEVENSPIEL, O. Extended Monod Kinetics for Substrate, Product, and Cell Inhibition. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 32, p. 430-437, 1988.

JIN, C. K.; CHIANG, H. L.; WANG, S. S. Steady-state of the enhancement in ethanol productivity of a continuous fermentation process employing a protein-phospholipid complex as a protecting agent. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 3, p. 249 – 257, 1981.

KLOCK, U.; MUNIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. **Química da madeira.** 2005.

KOLB, E. **Vinos de Frutas – Elaboración Artesanal e industrial.** Zaragoza – Espanha, Ed. Acríbia, 232p. 2002.

LE MAN H., BEHERA S., PARK H. Optimization of operational parameters for ethanol production from Korean food waste leachate. **Int. J. Environ. Sci. Technol.**v.7, p. 157–164, 2010.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica.** 2. ed. São Paulo: Sarvier, 839 p. 1995.

LEVENSPIEL, O. Monod equation: a revised and a generalization to product inhibition situations. **Biotechnol. Bioeng.**,v. 22, n. 8, p. 1671-1687, 1980.

LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). **Biociências Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v. 3, cap. 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

LIN Y., ZHANG W., LI C., SAKAKIBARA K., TANAKA S., KONG H. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. **Biomass and Bioenergy**. v. 47, p. 395 – 401, 2012.

LNF Latino Americana. **Desenvolvido pela LNF Latino Americana**, 2012. Apresenta textos sobre Leveduras selecionadas. Disponível em: <<http://www.lnf.com.br/leveduras.html>> Acesso em: 15 mar. 2012.

LUONG, J. H. T. Kinetics of Ethanol inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnol.bioeng.**, v. 27, p. 280-285, 1985.

LYONS, T. P. Gasohol, a step to energy independence. Alltech Technical Publications. **Technology & Engineering**, 346 p. 1981.

MARABEZZI, K. **Estudo Sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de Bagaço e Palha de Cana-de-açúcar.** 158 p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Química de São Carlos- Universidade de São Paulo (USP). São Carlos, 2009.

MARTINS, C. A. P. M. **Avaliação do efeito do inoculo e do perfil de alimentação do mosto na produção em escala piloto e industrial de etanol.** 86 p. Dissertação (Mestre em Engenharia Química). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 2009.

MASON, R. L.; GUNST, R. G.; HESS, J. L. **Statistical design and analysis of experiments.** New York: Wiley, 1989.

McMECKIN, T. A.; OLLEY, J.; RATKWSKY, D. A.; ROSS, T. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. **International Journal of Food Microbiology.** v. 73 (2-3), p. 395-407. 2002.

McNEIL, B.; HARVEY, L. M. **Fermentation – a practical approach.** 1 ed. Oxford University Press, 1990.

MENEZES, T. J. B. **Etanol, o combustível do Brasil.** São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda., p.141 – 178. 1980.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Anal.Chem.,** v. 31, p. 426-428, 1959.

MONTGOMERY, Douglas C. **Design and analysis of experiments.**3. ed. New York: J. Wiley, 649 p. 1991.

MONTGOMERY, Douglas C.; RUNGER, George C.; HUBELE, Norma Faris. **Estatística aplicada à engenharia.** 2. ed. [Rio de Janeiro]: Livros Técnicos e Científicos, [c 2004]. xiii, 335 p.

MOREIRA, A. L.; ALMEIDA, R. J. A.; SCABBIA, R. J. A.; TEIXEIRA, R. R. P. Dosagem de ácido láctico na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. **Biológico,** São Paulo, v.70, n.1, p. 35 - 42, Jan./Jun., 2008.

MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. **Biotechnol.Bioeng.,** v. 22, n. 11, p. 2375-2381, 1980.

NADIR, N., MEL, M., KARIM, M.I.A., YUNUS R.M. Comparison of sweet sorghum and cassava for ethanol production by using *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Applied Sciences.** v. 9, p. 3068 – 3073, 2009.

NAKANO, V. M. **Teoria da fermentação e maturação.** In: WORKSHOP ADEGAS, Brasília. Anais. Brasília: AMBEV, 96 p. 2000.

NEVES, L. C. M. **Emprego de reator com membrana na obtenção da frutose e ácido glicônico a partir da sacarose.** Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica). Universidade de São Paulo, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo. 2006.

NILSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDÉN, G.; **Bioreaction engineering principles,** 2ª ed, Kluwer Academic / Plenum Publishers: New York, 2003.

NOBRE, T. de P.; HORI, J.; ALCARDE, A. R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v. 27, p. 20-25, 2007.

NOGUEIRA, L. A. H.; SEABRA, J. E. A.; BEST, G.; LEAL, M. R. L. V.; POPPE, M. K. **Bioetanol de cana de açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável**. 1. ed. Rio de Janeiro: BNDES, 2008. v. 1. 316p.

OSTERGAARD, S.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, p. 34-50, 2000.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. 107 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2010.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. v.1, São Paulo, McGraw, 1980.

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

REED, G.; PEPPER, H. J. **Yeast Technology**. AVI Publishing Co., Westport, Connecticut, 1973.

SABLAYROLLES, J. M.; BARRE, P. Kinetics of alcoholic fermentation under anisothermal enological conditions. II. Prediction from the kinetics under isothermal conditions. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 44, n. 2, p. 134-138, 1993.

SALVATO, F. **Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobre expressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa**. 94 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2010.

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C.; **Análise de Dados Experimentais I: Fundamentos de Estatística e Estimação de Parâmetros**, E-papers Serviços Editoriais: Rio de Janeiro, Brasil, 2007.

SEABRA, J. E. A. **Análise de opções tecnológicas para uso integral da biomassa no setor de cana-de-açúcar e suas implicações**. (Tese de Doutorado). Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, 2008.

SHAFAGHAT, H.; NAJAFPOUR, G. D.; REZAEI, P. S.; SHARIFZADEH, M. Growth Kinetics and Ethanol Productivity of *Saccharomyces cerevisiae* PTCC 24860 on Various Carbon Sources. **World Applied Sciences Journal** v. 7, n. 2, p. 140-144. 2009.

SILVA FILHO, E. A.; SANTOS, S. K. B.; RESENTE, A. M.; MORAIS, J. O. F.; MORAIS JR, M. A.; SIMÕES D. A. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie van Leeuwenhoek**. v. 88, n. 1, p. 13 – 23, 2005.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3.ed. Viçosa, MG: Editora UFV, 235 p. 2002.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP), Instituto Butantan (IPT), São Paulo, SP, Brasil, 2009.

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae***. 48 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP), Instituto Butantan (IPT), São Paulo, SP, Brasil, 2009.

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**. Pergamon. UK, 1995.

STREHAIANO, P.; MOTA, M.; GOMA, G. Effects of inoculum level on kinetics of alcoholic fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 2, 1983.

STREMEL, D. P. **Desenvolvimento de Modelos Estruturados Alternativos para o Processo de Produção de Etanol**. 283 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2001.

THATIPALAMA, R.; ROHANI, S.; HILL, G. A. Effects of high product and substrate inhibitions on de kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 289-297, 1992.

TORIJA, M. J., ROZES, N., POBLET, M., GUILLAMON, J. M., MAS, A. Effects of Fermentation Temperature on the Strain Population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 80, p. 47-53, 2003.

TOSETTO, G. M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol**. 147 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, UNICAMP, Campinas 2002.

VASCONCELOS, J. N.; PINTO, V. C.; SILVA, R. A. **Fermentação Alcoólica Industrial: Modelagem e simulação do processo descontínuo alimentado**. Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 1992, Salvador-BA. Anais do IX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. São Paulo: ABEQ, 2, p. 403-410, 1992.

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

VIEIRA, E. A.; FIALHO, J. F.; FALEIRO, F. G.; BELLON, G.; FONSECA, K. G.; CARVALHO, L. J. C. B. Caracterização molecular de acessos de mandioca açucarados e não açucarados. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 455-461, maio/jun., 2011.

WALKER, G. M. **Yeast Metabolism. In: Yeast Physiology and Biotechnology**. Ed. John Wiley & Sons, p. 203-264, 2000.

WENDHAUSEN, R., **Estudo sobre utilização de crisotila como suporte de células de *saccharomyces cerevisiae* para uso em processo contínuo de fermentação alcoólica e biorreduções**. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, UNICAMP, 1998.

YAN, H. G.; ZHANG, W. H.; CHEN, J. H.; DING, Z. E. Optimization of the alcoholic fermentation of blueberry juice by AS 2.316 *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. **African Journal of Biotechnology**. v. 11, p. 3623-3630, 2012.