



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**ÁLVARO DANIEL TELES PINHEIRO**

**FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.): INFLUÊNCIA DE CONDIÇÕES OPERACIONAIS**

**FORTALEZA-CE  
2011**



**ÁLVARO DANIEL TELES PINHEIRO**

**FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.): INFLUÊNCIA DE CONDIÇÕES OPERACIONAIS**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Rocha Barros Gonçalves

**FORTALEZA-CE  
2011**

P718f Pinheiro, Álvaro Daniel Teles  
Fermentação alcoólica do suco de caju (*anacardium occidentale* L.):  
influencia de condições operacionais / Álvaro Daniel Teles Pinheiro.  
107 f: il. color. enc.

Orientadora: Profa. Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves  
Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro  
de Tecnologia. Depto. de Engenharia Química, Fortaleza, 2011.

1.Etanol 2. Suco de caju I. Goncalves, Luciana Rocha Barros  
(orient.) II. Universidade Federal do Ceará – Programa de Pós-Graduação  
em Engenharia Química

CDD 660

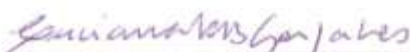
ÁLVARO DANIEL TELES PINHEIRO

FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA DO SUCO DE CAJU (*Anacardium occidentale* L.);  
INFLUÊNCIA DE CONDIÇÕES OPERACIONAIS

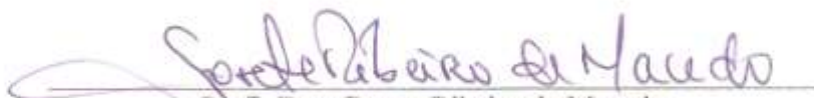
Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química,  
da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre  
em Engenharia Química.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA



Prof.<sup>a</sup> Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará - UFC



Prof.<sup>a</sup> Dra. Gorete Ribeiro de Macedo  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN



Prof. Dr. Fabiano André Narciso Fernandes  
Universidade Federal do Ceará - UFC

*Á Deus por sempre estar ao meu lado, aos meus amados pais Nazareno e Zoraide, aos meus irmãos Neto e Patrícia, às minhas tias Jô e Ana e aos amigos.*

## **AGRADECIMENTOS**

O mais importante agradecimento que tenho a fazer é a Deus, por tudo que ele fez e continua fazendo na minha vida, muito obrigado Senhor.

A Nossa Senhora, pela luz e proteção que ela sempre me proporcionou, resolvendo problemas que pareciam sem solução na minha vida. A ela agradeço, além de tudo, a minha confiança que na vida tudo vai dar certo.

Ao meu pai, Nazareno, pelo amor, educação, carinho e atenção dada, contribuindo de forma fundamental para a formação do meu caráter. Principalmente pelo olhar crítico antes de aprovar as decisões que tomei na vida.

A minha mãe, Zoraide, por sempre pedir a Nossa Senhora que iluminasse minha vida, me protegesse e me guiasse. Pela educação passada, pelo amor, companheirismo, por sempre acreditar em mim, sempre estar ao meu lado e pelo modo o qual ela me ensinou a ver a vida.

Aos meus irmãos Neto e Patrícia pelo companheirismo que cultivamos desde criança, por saber que sempre posso contar com eles, por apesar da distância sempre estarem ao meu lado, por sempre torcerem pelo meu sucesso e pela importância que eles tiveram para que eu conseguisse obter meus objetivos.

Agradeço de todo coração às minhas tias Jô e Ana por terem sido uma segunda mãe para mim, por terem me acolhido na casa delas como um filho e por até hoje me aturarem. Com elas tenho um agradecimento eterno.

A professora Dra. Luciana Rocha Barros Gonçalves por ter me aberto uma porta fundamental para que eu chegasse até aqui. Meu carinho e homenagem por ter acreditado em mim e ter me aceitado em seu laboratório quando eu me achava perdido e desestimulado com o curso. Muito obrigado pela paciência e compreensão com os trabalhos entregues em cima da hora e pelo tempo dedicado a tirar minhas dúvidas. Não poderia deixar de agradecer também

pela oportunidade a mim dada de lecionar em outra instituição, sendo esta de grande importância para o meu engrandecimento acadêmico. Enfim, por tudo que representou e representa para mim nesses cinco anos que tive o prazer de trabalhar ao lado dela. Meu carinho, respeito e agradecimento.

Aos meus amigos do GPBIO: Ariosvana, Cristiane, Cleiton, Darlane, Emanuel, Elizabete, Jocélia, Juliana, Kamilly, Karine, Leonardo, Marylane e Tigressa. Em especial ao Márcio pela amizade que construímos ao longo de todos esses anos e a Ana Iraidy pelos ensinamentos a mim passados logo quando comecei na pesquisa.

Em especial a Valderez por sempre ter sido além de uma grande amiga, um porto para me acalmar com problemas da vida acadêmica. Pelos primeiros ensinamentos por ela passados sobre o mundo da fermentação e pela ajuda que vem me dando na UFERSA, certamente ela foi uma peça fundamental para o meu sucesso, valeu Val.

Aos amigos da UFC Diego, Rafael, Tiago e Wilton, pessoas que sei que posso contar e que tornam o trabalho diário mais agradável.

Aos meus grandes amigos Fernando Oyama (japa), Kennedy (pim) e Wagner, pessoas a quem tenho um apreço enorme e considero como irmãos, a vocês muito obrigado por entenderem minhas ausências durante os momentos de dedicação acadêmica e por estarem sempre ao meu lado. Não poderia deixar de agradecer a Flávia, pessoa que conquistou o meu respeito e carinho, muito obrigado por sempre me ajudar na vida acadêmica, sempre me estimulando a dar o melhor de mim e a me superar a cada dia.

*“No fim tudo dá certo, se não deu certo é  
porque ainda não chegou ao fim.”  
(Fernando Sabino)*



## RESUMO

Devido à sua vasta biodiversidade, o Brasil dispõe de uma grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais, cujo bioprocessamento é de grande interesse econômico e social. Entre os biocombustíveis produzidos em todo o mundo, o etanol produzido no Brasil a partir da cana de açúcar possui lugar de destaque, apresentando notável evolução durante as últimas décadas, alcançando assim maturidade e consistência. Contudo, estima-se que a produção de etanol através dessa matéria-prima não seja suficiente para atender a demanda mundial. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de etanol a partir do suco de caju. Para tal fim, inicialmente, avaliou-se a necessidade de suplementação do suco de caju com nutrientes para a sua posterior fermentação. Nesta etapa, foi observado que não se faz necessária a suplementação do suco de caju, pois o mesmo *in natura* já apresenta todos os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo. Posteriormente, estudou-se o efeito da temperatura na produção de etanol, avaliando a fermentação na faixa de 26 a 42°C. Os melhores resultados de rendimento (0,5 g.g<sup>-1</sup>), produtividade (4,9 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), eficiência (92,8%) e produção máxima de etanol (49,3 g.L<sup>-1</sup>), foram obtidos quando se conduziu a fermentação na faixa de 30 a 38°C. Os modelos de Monod e Arrhenius foram utilizados para descrever a dependência dos parâmetros cinéticos com a temperatura, sendo os resultados obtidos satisfatórios. O potencial do suco de caju como fonte de açúcares para a produção de etanol foi avaliado por diferentes cepas de leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*. Os resultados mostraram que as cepas de *Saccharomyces* foram superiores quando comparadas às *Kluyveromyces* quanto à produção máxima de etanol. A levedura que apresentou melhores resultados para os parâmetros cinéticos avaliados foi a *Saccharomyces cerevisiae* CCA008. Por último, para determinar o efeito da concentração inicial de substrato na produção de etanol, estudou-se as concentrações de 70, 90, 110, 130 e 170 g.L<sup>-1</sup> de substrato inicial. A concentração que apresentou melhores resultados para os parâmetros estudados foi 90 g.L<sup>-1</sup>. O modelo cinético que conseguiu chegar mais próximos dos dados experimentais e assim descrever o processo mais fielmente foi o modelo proposto por Ghose & Thyagi. Com estes resultados, conclui-se que o suco de caju mostrou-se apto a ser utilizado como substrato para a produção de etanol. A utilização do mesmo não só trará benefícios econômicos ao processo, por se tratar de um substrato de baixo custo, como também trará benefícios ambientais, já que o mesmo é um resíduo agroindustrial proveniente da produção de castanha de caju.

**Palavras chave:** Etanol, Suco de caju, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, Modelo cinético.

## ABSTRACT

Despite its big biodiversity, Brazil has a great variety of agriculturists and agroindustrials which its bioprocess has a lot of economic and social interest. Among all the ethanol produced all over the world, the ethanol produced in Brazil made of cane of sugar has great distinction. Its evolution on the last decade is remarkable reaching its maturity and consistency. Within all it is estimated that the ethanol produced with that material is not enough to be spread and supply worldwide. The object of this article is to evaluate the production of the ethanol made with cashew apple juice. In this stage, it was observed that it is not necessary to supplement the cashew apple juice to posterior fermentation because the juice already shows all the nutrients necessary for the growth of the microorganism. Later there was a study showing that the temperature in the production of ethanol evaluating its fermentation between 26 and 42°C. The best results of revenue (0,5 g.g<sup>-1</sup>), productivity (4,9 g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), efficiency (92,8%) and the maximum production of ethanol (49,3 g.L<sup>-1</sup>), It was gained when the fermentation was conducted between 30 to 38°C. The models of Monod and Arrhenius were used to describe the dependence of the kinetic parameter with the temperature, showing the results to be satisfactory. The potential of the cashew apple juice being a source of sugar for the production of ethanol was evaluated by different sources of the genders *Saccharomyces* and *Kluyveromyces*. The results showed that the strains of *Saccharomyces* were higher when compared to the *Kluyveromyces* to the maximum production of ethanol. The strain that showed the best results for the kinetic parameter that was evaluated was *Saccharomyces cerevisiae* CCA008. At last, to determine the effect of the initial concentrate substratum in the production of ethanol, it was studied the range of 70, 90, 110, 130 and 170 g.L<sup>-1</sup> of initial substratum. The one that showed the best results for the parameters studied was 90 g.L<sup>-1</sup>. The kinetic model that came closer to the ones experimented and could explain the process best was the model proposed by Ghose & Thyagi. In conclusion, with those results shows that the cashew apple juice used in the production of ethanol will bring great economic benefits because it is a product of low cost and economic as well as to the environment being a agroindustrials product deriving from the production of the cashew nut.

**KEY WORDS:** Ethanol, cashew apple juice, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, Kinetic model.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 02

Figura 2.1	Diferentes tipos de complexidade do modelo.....	36
------------	---	----

### Capítulo 03

Figura 3.1	Efeito da suplementação de nutrientes no suco de caju para a produção de etanol por <i>S.cerevisiae</i> no consumo de substrato, formação de célula e produção de etanol.....	46
------------	---	----

### Capítulo 04

Figura 4.1	Representação esquemática do Biorreator Tec-Bio 1,5 utilizado neste trabalho.....	51
Figura 4.2	Fermentação de suco de caju por <i>S. cerevisiae</i> a 150 rpm variando a temperatura (26, 30, 34, 38 e 42°C): (■) concentração de substrato (glicose + frutose); (●) concentração de etanol (g.L <sup>-1</sup> ); (▲) biomassa (peso seco - g.L <sup>-1</sup> ). Os pontos experimentais representam à média e as barras verticais o desvio padrão de pelo menos dois experimentos.....	55
Figura 4.3	Velocidade específica de crescimento celular, formação de etanol e consumo de substrato para a produção de etanol a partir do suco de caju a 34°C. (■) $\mu_x$ (h <sup>-1</sup> ), (●) $\mu_s$ (h <sup>-1</sup> ) (▲) $\mu_p$ (h <sup>-1</sup> ).....	56
Figura 4.4	Dados experimentais e simulados pela equação de Monod para a fermentação em batelada. Os dados experimentais são: (■) concentração de substrato (glicose + frutose) (g.L <sup>-1</sup> ); (●) concentração de etanol (g.L <sup>-1</sup> ); (▲) concentração celular (g.L <sup>-1</sup> ). Os resultados da simulação foram representados por linhas sólidas.....	58
Figura 4.5	Gráficos de Arrhenius ilustrando o efeito da temperatura nos parâmetros de: máxima taxa específica de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ), crescimento de célula baseado no consumo de substrato ( $Y_{x/s}$ ), produção de etanol baseada no crescimento celular ( $Y_{p/x}$ ). Os dados obtidos por simulação são apresentados por pontos e a equação de Arrhenius representada pela linha sólida.....	60
Figura 4.6	Gráficos de dispersão: resultados esperados (experimental) e resultados da simulação (Equação de Arrhenius) para a taxa máxima de crescimento específico. As linhas tracejadas representam o desvio padrão experimental ( $\sigma = 0,05$ ).....	62

## Capítulo 05

Figura 5.1	Perfil de produção de etanol por <i>Saccharomyces</i> e <i>Kluyveromyces</i> a 30°C e 150 rpm cultivadas em suco de caju. <i>Saccharomyces</i> : (●) 01; (▼) 02; (◀) 03, (▲) 04, (■) 05; (▶) 06. <i>Kluyveromyces</i> : (◆) 07; (■) 08; (●) 09.....	69
Figura 5.2	Perfil do crescimento celular das cepas de <i>Saccharomyces</i> a 30°C e 150 rpm cultivadas em suco de caju. (●) 01; (▼) 02; (◀) 03, (▲) 04, (■) 05; (▶) 06.....	70

## Capítulo 06

Figura 6.1	Dados experimentais e simulados da fermentação do suco de caju utilizando <i>S. cerevisiae</i> a 30°C e 150 rpm: (■) Concentração de açúcares redutores totais (g.L <sup>-1</sup> ); (●) Concentração de etanol (g.L <sup>-1</sup> ); (▲) Biomassa ( g.L <sup>-1</sup> ); (—) Modelo de Monod para as fermentações conduzidas com concentração inicial de açúcares (glicose + frutose) a 70, 90, 110, 130 e 170 g.L <sup>-1</sup> .....	82
Figura 6.2	Dados experimentais e simulados da fermentação do suco de caju utilizando <i>S. cerevisiae</i> a 30°C e 150 rpm: (■) Concentração de açúcares redutores totais (g.L <sup>-1</sup> ); (●) Concentração de etanol (g.L <sup>-1</sup> ); (▲) Biomassa ( g.L <sup>-1</sup> ); (—) Modelo de Andrews para as fermentações conduzidas com concentração inicial de açúcares (glicose + frutose) a 70, 90, 110, 130 e 170 g.L <sup>-1</sup> .....	84
Figura 6.3	Dados experimentais e simulados da fermentação do suco de caju utilizando <i>S. cerevisiae</i> a 30°C e 150 rpm: (■) Concentração de açúcares redutores totais (g.L <sup>-1</sup> ); (●) Concentração de etanol (g.L <sup>-1</sup> ); (▲) Biomassa ( g.L <sup>-1</sup> ); (—) Modelo de Levenspiel para as fermentações conduzidas com concentração inicial de açúcares (glicose + frutose) a 70, 90, 110, 130 e 170 g.L <sup>-1</sup> .....	86
Figura 6.4	Dados experimentais e simulados da fermentação do suco de caju utilizando <i>S. cerevisiae</i> a 30°C e 150 rpm: (■) Concentração de açúcares redutores totais (g.L <sup>-1</sup> ); (●) Concentração de etanol (g.L <sup>-1</sup> ); (▲) Biomassa ( g.L <sup>-1</sup> ); (—) Modelo de Ghose e Thyagi para as fermentações conduzidas com concentração inicial de açúcares (glicose + frutose) a 70, 90, 110, 130 e 170 g.L <sup>-1</sup> .....	88
Figura 6.5	Dados experimentais e simulados da fermentação do suco de caju utilizando <i>S. cerevisiae</i> a 30°C e 150 rpm: (■) Concentração de açúcares redutores totais (g.L <sup>-1</sup> ); (●) Concentração de etanol (g.L <sup>-1</sup> ); (▲) Biomassa ( g.L <sup>-1</sup> ); (—) Modelo de Tosetto para as fermentações conduzidas com concentração inicial de açúcares (glicose + frutose) a 70, 90, 110, 130 e 170 g.L <sup>-1</sup> .....	90

Figura 6.6	Validação do modelo cinético de Levenspiel aplicado à produção de etanol a partir do suco de caju.....	94
Figura 6.7	Validação do modelo cinético de Ghose e Thyagi aplicado à produção de etanol a partir do suco de caju.....	95
Figura 6.8	Validação do modelo cinético de Tosetto aplicado à produção de etanol a partir do suco de caju.....	95

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 03

Tabela 3.1	Parâmetros cinéticos calculados para avaliação da suplementação do suco de caju na produção de etanol.....	47
------------	--	----

### Capítulo 04

Tabela 4.1	Máxima velocidade específica de crescimento, conversão de substrato em célula e de célula em produto rendimento, produtividade, eficiência e produção máxima de etanol para a faixa de temperatura estudada.....	57
Tabela 4.2	Desvio padrão residual (RSD) escrito como o percentual da media dos valores experimentais, utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Monod.....	59
Tabela 4.3	Valores das constantes para a equação de Arrhenius.....	61

### Capítulo 05

Tabela 5.1	Microrganismos utilizados nos ensaios fermentativos.....	65
Tabela 5.2	Parâmetros cinéticos para a fermentação alcoólica do suco de caju utilizando cepas de <i>Saccharomyces</i> em reator batelada a 30°C e 150 rpm de agitação.....	70

### Capítulo 06

Tabela 6.1	Modelos cinéticos estudados no presente trabalho para descrever a produção de etanol a partir do suco de caju.....	75
Tabela 6.2	Parâmetros obtidos para as diferentes concentrações iniciais de substrato presente no suco de caju (70, 90, 110, 130 e 170 g.L <sup>-1</sup> ).....	81
Tabela 6.3	Valores dos parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Monod.....	83
Tabela 6.4	Valores dos parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Andrews.....	85
Tabela 6.5	Valores dos parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Levenspiel.....	87
Tabela 6.6	Valores dos parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Ghose e Thyagi.....	89
Tabela 6.7	Valores dos parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Tosetto.....	91

Tabela 6.8	Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Monod.....	92
Tabela 6.9	Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Andrews.....	92
Tabela 6.10	Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Levenspiel.....	92
Tabela 6.11	Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Ghose & Thyagi.....	93
Tabela 6.12	Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Tosetto.....	93
Tabela 6.13	Teste de Bartlett.....	94

## LISTA DE SÍMBOLOS

<b>X</b>	Concentração de biomassa (g.L <sup>-1</sup> )
<b>S</b>	Concentração de substrato (g.L <sup>-1</sup> )
<b>P</b>	Concentração de produto (g.L <sup>-1</sup> )
<b>t</b>	Tempo da fermentação (h)
<b>T</b>	Temperatura (°C)
<b>X<sub>máx</sub></b>	Máxima concentração de biomassa (g.L <sup>-1</sup> )
<b>P<sub>máx</sub></b>	Máxima concentração de produto (g.L <sup>-1</sup> )
<b>K<sub>s</sub></b>	Constante de saturação para o crescimento celular (g.L <sup>-1</sup> )
<b>K<sub>i</sub></b>	Constante de inibição do crescimento celular pelo substrato (g.L <sup>-1</sup> )
<b>Y<sub>X/S</sub></b>	Conversão de substrato em célula (g.g <sup>-1</sup> )
<b>Y<sub>P/S</sub></b>	Conversão de substrato em produto (g.g <sup>-1</sup> )
<b>Y<sub>P/X</sub></b>	Conversão de célula em produto (g.g <sup>-1</sup> )
<b>y<sub>i</sub></b>	Dados experimentais
<b>y<sup>(k)</sup></b>	Dados experimentais
<b>y<sub>i</sub><sup>(k)</sup></b>	Valor calculado pelo modelo “i”
<b>y<sub>pi</sub></b>	Valor predito pelo modelo
<b>n</b>	Número de pontos experimentais
<b><math>\bar{y}</math></b>	Média dos valores experimentais
<b>S<sup>2</sup></b>	Estimativa combinada da variância
<b>S<sub>i</sub><sup>2</sup></b>	Estimativa da variância do modelo
<b>m</b>	Número de modelos ajustados
<b>(d.f.)<sub>i</sub></b>	Grau de liberdade do modelo i
<b>p<sub>i</sub></b>	Número de parâmetros do modelo i
<b>α</b>	Nível de significância

### *Letras gregas*

<b>μ<sub>max</sub></b>	Máxima velocidade específica de crescimento (h <sup>-1</sup> )
<b>μ<sub>X</sub></b>	Velocidade específica de crescimento (h <sup>-1</sup> )
<b>μ<sub>S</sub></b>	Velocidade específica de consumo de substrato (h <sup>-1</sup> )
<b>μ<sub>P</sub></b>	Velocidade específica de formação de produto (h <sup>-1</sup> )



## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1	Bioenergia.....	22
2.2	Fermentação alcoólica.....	22
2.2.1	Fatores que afetam a fermentação alcoólica.....	26
2.2.1.1	pH.....	26
2.2.1.2	Temperatura.....	26
2.2.1.3	Concentração de substrato.....	27
2.2.1.4	Concentração de inóculo.....	28
2.2	Bioquímica da fermentação alcoólica.....	28
2.3	História do etanol no Brasil.....	29
2.4	Microrganismo.....	31
2.5	Caju.....	32
2.6	Cinética dos processos fermentativos.....	33
2.7	Discriminação entre modelos.....	39
3	AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE ETANOL POR <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> .....	41
3.1	Introdução.....	41
3.2	Material e Métodos.....	42
3.2.1	Microrganismo.....	42
3.2.2	Preparação do suco de caju.....	42
3.2.3	Meios de cultura.....	42
3.2.4	Influência da suplementação do suco de caju na produção de etanol através de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	43
3.2.5	Métodos analíticos.....	44
3.2.5.1	Concentração celular.....	44
3.2.5.2	Concentração de substrato e produto.....	44
3.2.6	Cálculo dos rendimentos e parâmetros cinéticos.....	45
3.3	Resultados e Discussão.....	46
3.4	Conclusão.....	47
4	EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE ETANOL POR FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO SUCO DE CAJU.....	49
4.1	Introdução.....	49
4.2	Material e Métodos.....	50
4.2.1	Microrganismo.....	50
4.2.2	Preparação do suco de caju.....	50
4.2.3	Meios de cultura.....	50
4.2.4	Influência da temperatura na produção de etanol utilizando o suco de caju.....	51
4.2.5	Métodos analíticos.....	53

4.2.5.1	Concentração celular.....	53
4.2.5.2	Concentração de substrato e produto.....	53
4.2.6	Cálculo dos rendimentos e parâmetros cinéticos.....	53
4.3	Resultados e Discussão.....	54
4.4	Conclusão.....	63
5	SCREENING E SELEÇÃO LEVEDURAS PRODUTORAS DE ETANOL A PARTIR DE SUCO DE CAJU.....	64
5.1	Introdução.....	64
5.2	Material e Métodos.....	65
5.2.1	Microrganismo.....	65
5.2.2	Preparação do suco de caju.....	66
5.2.3	Meios de cultura.....	66
5.2.4	Screening e seleção de cepas de levedura.....	66
5.2.5	Métodos analíticos.....	67
5.2.5.1	Concentração celular.....	67
5.2.5.2	Concentração de substrato e produto.....	67
5.2.6	Cálculo dos rendimentos e parâmetros cinéticos.....	68
5.3	Resultados e Discussão.....	69
5.4	Conclusão.....	72
6	CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ETANOL POR <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CCA008) A PARTIR DE SUCO DE CAJU: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE AÇÚCARES.....	73
6.1	Introdução.....	73
6.2	Material e Métodos.....	74
6.2.1	Microrganismo.....	74
6.2.2	Preparação do suco de caju.....	74
6.2.3	Meios de cultura.....	76
6.2.4	Avaliação da concentração inicial de açúcares redutores totais (ART).....	76
6.2.5	Métodos analíticos.....	77
6.2.5.1	Concentração celular.....	77
6.2.5.2	Concentração de substrato e produto.....	77
6.2.6	Cálculo dos rendimentos e parâmetros cinéticos.....	77
6.2.7	Modelagem matemática.....	78
6.3	Resultados e Discussão.....	80
6.4	Conclusão.....	96
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	97
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

## 1. INTRODUÇÃO

Durante a década de 60 e 70, o consumo de petróleo cresceu rapidamente devido principalmente a ampliação da indústria petroquímica, a substituição do carvão mineral e vegetal por combustíveis líquidos e ao desenvolvimento dos parques industriais dos países em desenvolvimento (ATALA, 2000). Este aumento no consumo resultou em preços bastante elevados nos barris de petróleo. Há quarenta anos, o barril do petróleo era vendido a pouco mais de 10 dólares. Nos anos seguintes, uma conjunção de fatores, entre eles fatores econômicos, devido à prosperidade dos países em desenvolvimento, e fatores geopolíticos, como a instabilidade em regiões produtoras, elevou gradativamente a cotação internacional. Em 2008, o barril atingiu o seu ápice histórico ao ser negociado, pela primeira vez, acima da barreira de 100 dólares. Estudos mostram que o consumo de petróleo tem crescido a taxas elevadas nos países emergentes, principalmente na China e na Índia (GUANDALINI, 2008). Projeções indicam que o consumo planetário avançará 50% até 2030, e metade desse incremento virá de chineses e indianos. Em um cenário de manutenção do crescimento econômico acelerado na China e na Índia, o preço do barril pode atingir 150 dólares, afirmou o diretor executivo da Agência Internacional de Energia Nobuo Tanaka (GUANDALINI, 2008).

Devido à crise energética mundial, acarretada pelos preços recordes de petróleo e pela crescente preocupação global com o meio ambiente, o uso de fontes de energia renováveis que sejam menos poluentes e mais baratas vem ganhando cada vez mais espaço no mercado de combustíveis (MIRAGAYA, 2005). Prova disso é que mesmo com a descoberta, no Brasil, do pré-sal, os biocombustíveis continuam a ter o seu espaço no mercado Nacional e a receber investimentos do governo brasileiro. O presidente da Petrobras Biocombustível, Miguel Rossetto, afirmou em entrevista que o programa de biocombustíveis brasileiro é um sucesso. O mesmo relatou que apesar da crise e os investimentos para exploração do pré-sal, não houve redução financeira no plano de expansão de biocombustíveis brasileiro (RAMON, 2009). Segundo o diretor executivo da União da Indústria de cana-de-açúcar (Unica), Eduardo Leão de Sousa, o crescimento da frota de veículos bicomcombustível no Brasil e as perspectivas de maior acesso aos mercados mundiais deverão ser o impulso de um novo ciclo de investimentos para expandir a produção de biocombustíveis no País (BIOCOMBUSTÍVEIS, 2010).

Cabe ressaltar que o Brasil é o maior exportador e o segundo maior produtor de biocombustível, atrás somente dos Estados Unidos (MATRIZ, 2010) sendo também, o país com o maior potencial de expansão da produção. Isso se dá devido às suas condições privilegiadas de solo e clima para a produção em larga escala da matéria-prima utilizada na produção desses biocombustíveis (FURTADO; SCANDIFFIO, 2006; CABRINI; MARJOTTA-MAISTRO, 2007). Merece destaque o etanol produzido no Brasil, apresentando notável evolução durante as últimas décadas, alcançando assim maturidade e consistência. O etanol produzido no Brasil a partir da cana-de-açúcar reduz a emissão de gases de efeito estufa em pelo menos 50% quando comparado a combustíveis fósseis tradicionais. Várias são as vantagens do uso de etanol como combustível, seja na forma hidratada em substituição a gasolina ou misturado à gasolina como etanol anidro. Entre elas estão o aumento na octanagem, a redução da poluição em centros urbanos, a eliminação total dos aditivos a base de chumbo, redução de SO<sub>x</sub> e particulados e redução de 40 a 70% na emissão de monóxido de carbono (RIVERA, 2006).

Atualmente a principal matéria-prima para obtenção do etanol é a cana-de-açúcar, sendo a mesma a segunda mais importante fonte primária e a principal fonte de energia renovável na matriz energética brasileira. Contudo, estima-se que a produção de etanol através dessa matéria-prima não seja suficiente para atender a essa nova demanda mundial. A produção de etanol com base nos açúcares da cana já é uma tecnologia madura, e não há muito espaço para grandes aumentos de rendimento, em particular na fase industrial (BNDES, 2008). Um fator que viria a baratear o preço do etanol e aumentaria a sua produção seria a utilização de diferentes matérias-primas. Um fator importante na escolha de novas matérias-primas seria a busca por alternativas de baixo custo, pois, a mesma é responsável por 60 a 70% do custo final do etanol (MACHADO, 2010). Como matéria-prima alternativa e de baixo custo, pode-se citar o suco extraído a partir do pedúnculo de caju.

Vale salientar que a produção de etanol a partir do caju não pode ser considerada substituta da produção agrícola atual (cana-de-açúcar), mas uma nova atividade, destinada a utilizar terras marginais em um processo de expansão e diversificação das práticas agrícolas. A cultura do caju é de fundamental importância para a economia do Nordeste brasileiro, com destaque para o Estado do Ceará tendo a castanha de caju como primeiro produto da pauta de exportação. A atividade da cajucultura gera empregos para mais de 130.000 trabalhadores rurais no estado do Ceará e mais de 200 mil em todo o Nordeste (SÍNTESE, 2010). Estudo feito por Oliveira e Rocha (2009), mostra que a oferta mundial de castanha de caju *in natura*

tem crescido aceleradamente nos últimos anos, sendo a produção elevada em 59% no período de 2000 a 2006. Em consequência, a produtividade média saltou de 681,7 kg/ha em 2000 para 916,2 kg/ha em 2006. Segundo Costa (2009), os Estados do Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte respondem por mais de 80% da produção nacional de castanha de caju *in natura*, sendo mais de 80% dessa produção exportada para os mercados europeu, americano e asiático, sob forma de amêndoas.

O Brasil é o principal país no aproveitamento de pedúnculo do caju, contudo, estima-se que industrialmente sua utilização esteja em torno de apenas 20% ao ano (MORTON; DOWLING; 1987; AZEVEDO; RODRIGUES, 2000; CAMPOS *et al.*, 2002; ASSUNÇÃO; MERCADANTE, 2003; COSTA; LIMA; LIMA, 2003). Estima-se que 80% do pedúnculo seja desperdiçado, valores esses que chegam a quase 1,5 milhões de toneladas (MUNICÍPIOS DO CEARÁ, 2007). A elaboração de produtos tradicionais derivados do pedúnculo do caju ainda é uma área pouco explorada. Para utilizar o potencial do fruto ao máximo, é necessário oferecer formas alternativas de consumo (BARROSO; MOURA, 2007). Assim, a utilização deste co-produto para a produção de etanol não só trará benefícios econômicos ao processo, por se tratar de um substrato de baixo custo, mas também resolverá um problema de descarte, agregando valor à cadeia produtiva da castanha e do caju. Esses fatos, somados à sua composição rica (açúcares redutores, fibras, vitaminas e sais minerais), fazem do suco de caju, um substrato de baixo custo (R\$ 1,00/Kg) para utilização como meio de cultura na produção de etanol (ROCHA, 2010).

Nesse contexto, esse trabalho objetiva estudar a produção de etanol a partir do suco extraído do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale L.*). Para tal fim, inicialmente, estudou-se a influência da temperatura na cinética de produção de etanol. Em seguida, avaliou-se a produção de etanol por diferentes microrganismos e por último a influência da concentração inicial dos carboidratos (glicose e frutose) presentes no suco de caju. Foram avaliados vários modelos que descrevessem a cinética de produção de etanol utilizando o suco de caju como substrato. Para os modelos escolhidos, determinaram-se os parâmetros cinéticos do mesmo por modelagem matemática utilizando o método dos mínimos quadrados de Levenberg-Marquardt.

A presente dissertação foi organizada em capítulos para melhor entendimento dos resultados nos quais foram avaliados diferentes parâmetros que influenciam na fermentação. No primeiro capítulo foi abordada a necessidade da suplementação do suco de caju. Posteriormente, estudou-se o efeito da temperatura (26 a 42°C) na produção de etanol por

*Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura comercial da marca Fleischmann. Após esse estudo, avaliou-se o potencial do suco de caju como fonte de açúcares para a produção de etanol por diferentes cepas de leveduras dos gêneros *Saccharomyces* e *Kluyveromyces*. Por último, determinou-se o efeito da concentração inicial de substrato (70, 90, 110, 130 e 170 g.L<sup>-1</sup>) na produção de etanol utilizando a levedura que apresentou melhores rendimentos na etapa anterior.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Bioenergia

Por definição temos que energia química é a forma de energia fornecida mediante reações químicas, em que acontece uma mudança de composição, por meio da qual reagentes se convertem em produtos, geralmente com liberação de calor. Um caso particular de energia química é a bioenergia, que pode ser definida como toda e qualquer forma de energia associada a formas de energia química acumulada mediante processos fotossintéticos recentes. Em geral, denomina-se biomassa os recursos naturais que dispõem de bioenergia e que podem ser processados para fornecer formas bioenergéticas mais elaboradas e adequadas para o uso final (BNDES, 2008).

A biomassa que é produzida a partir da reação de fotossíntese depende essencialmente da energia solar e da presença de água e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Na formação da biomassa, água e gás carbônico se combinam para a formação de uma molécula de glicose, que é um açúcar simples, e oxigênio como mostrado na equação 1. A bioenergia é acumulada em diferentes partes das plantas, geralmente como açúcares, amido ou celulose.



Nessa reação, para se obter 1 Kg de açúcar, se faz necessário cerca de 17,6 MJ (megajoules) de energia solar, equivalente a cerca de meio litro de gasolina. (BNDES, 2008).

### 2.2. Fermentação alcoólica

A fermentação é definida como um fenômeno natural, durante o qual certas matérias-primas orgânicas complexas são transformadas em substâncias mais simples. Ela se deve à ação de leveduras, bactérias e fungos. Tais microrganismos secretam enzimas, indispensáveis para a degradação dessas matérias, que serão utilizadas por eles para a

fermentação e para seu desenvolvimento (LEÃO; AMORIM, 2005). Tradicionalmente os processos fermentativos, importantes fontes de produtos biológicos, empregados nas indústrias farmacêutica, química de alimentos, são também conhecidos como bioprocessos (OLIVEIRA, 2006). Esses processos, conduzidos por microrganismos, compreendem um conjunto de operações que incluem a caracterização e o tratamento da matéria-prima, o preparo do meio de propagação e produção, a esterilização, a transformação do substrato em produto, bem como, a separação e purificação do produto obtido (KOSARIC, 1996).

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, a 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 (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Segundo Lima *et al.* (2001), a fermentação alcoólica possui três fases principais: fase preliminar, tumultuosa e fase final ou complementar. Estas três fases são observadas especialmente se a fermentação ocorre em batelada clássica. Ao se misturar o inóculo ao mosto, inicia-se o processo de fermentação alcoólica dos açúcares, iniciando-se a fase preliminar. Nesta fase, ocorre multiplicação intensa das células, e o açúcar consumido é usado na reprodução. Há uma pequena elevação da temperatura e baixo desprendimento de dióxido de carbono. A fase tumultuosa é caracterizada pela grande quantidade de liberação de dióxido de carbono. É a fase de maior duração, onde há conversão intensa dos açúcares fermentescíveis. A densidade do mosto diminui e eleva o teor de álcool e a acidez. A temperatura se eleva rapidamente, sendo fundamental o controle da temperatura nesta fase, não devendo ultrapassar os 35°C. Nesta fase há a formação de espumas. Na fase complementar há diminuição da fermentação devido à redução dos açúcares. Esta fase é notável pela redução da temperatura e da liberação de CO<sub>2</sub>.

Muitos autores consideram que se extraiu o álcool, pela primeira vez, por meio do vinho, como, por exemplo, Dujardin (1900). Frederinand Hoefer concorda com ele, lembrando do que Marcus Graecus, no manuscrito *Liber ignium*, do século VIII, referia-se ao álcool como o “fogo líquido”, a ser extraído dos “vinhos velhos” por um alambique (GUICHARD, 1897). Outros pesquisadores, por sua vez, acreditam que se obteve o álcool, inicialmente, de outras bebidas, como por exemplo, a cerveja.



A destilação de meios fermentados tornou-se importante no fim do século XV quando o Dr. Heironimus Bruswick, um então conhecido autor de trabalhos médicos imprimiu um livro em Strassburg no ano de 1500, intitulado “Líber de Arte Distillandi”, uma edição mais detalhada e compreensiva, publicada em 1507 e outra em 1512 (SIQUEIRA, 1997).

O álcool era utilizado inicialmente com fins medicinais, pela suas excelentes propriedades desinfetantes, anestésiantes, conservantes e curativas. É creditado ao médico suíço Theophrast Bombast Von Hohenheim, conhecido como Paracelso (1493-1541), o fato de ter usado pela primeira vez o nome álcool em seus escritos, em que descrevia com detalhes sua própria concepção de como deveria ser realizada a destilação. Aos poucos os aparelhos de destilação foram se aperfeiçoando e, em 1796, Lowitz conseguiu obter álcool a 100%, partindo de um líquido com alta concentração alcoólica, misturado a um desidratante (LEÃO; AMORIM, 2005).

Embora o homem usasse o fermento completamente invisível e desconhecido, não podia explicar as causas de fenômeno, pela falta de instrumentos capazes de detectar os minúsculos seres responsáveis pelo fenômeno. Isso só seria possível em 1680, quando Antonie van Leeuwenhoek conseguiu, pela primeira vez, enxergar, em microscópios que construía, os “fermentos”, distinguindo diferentes formas, sem compreender, no entanto, que eles eram compostos por celular vivas. Aos poucos, novos conhecimentos foram sendo incorporados. Foi o caso, por exemplo, de Jean Baptiste Van Helmont (1577-1664), médico, químico e filósofo flamengo. Em 1652, percebeu durante a fermentação a produção de um gás especial (gaz vinorum), diferente do “espírito do vinho”, ou seja, do álcool, com o qual era confundido. Logo, a seguir, em 1659, Sylvius de lê Boe distinguiu o processo de outras reações químicas, não só pelos gases de liberava, mas também pela ação de determinados ácidos. Pouco mais tarde, o alquimista alemão Johann Joachim Becher (1635-1682) ressaltou que somente líquidos açucarados podiam entrar em fermentação (LEÃO; AMORIM, 2005).

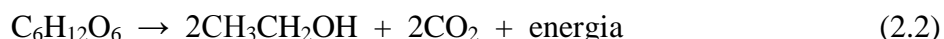
A composição dos compostos orgânicos, no entanto, não era, ainda, bem compreendida, até a realização das análises sistemáticas de Lavoisier sobre as substâncias referentes à fermentação. Em suas investigações sobre fermentação alcoólica, Lavoisier formulou a lei considerada alicerce da química experimental, estabelecendo que “na natureza ocorrem somente mudanças ou modificações: nada se cria, nada se perde”.

Para determinar o que acontecia durante a produção de vinho, Lavoisier conseguiu estabelecer, em *Traité Élémentaire de Chimie* (1789), as relações ponderais que ligam uma

substância fermentescível – o açúcar- aos produtos da fermentação: o álcool e o dióxido de carbono. Determinou, também, as proporções centesimais de carbono, de hidrogênio e de oxigênio das substâncias, cuja presença constatara no líquido fermentado: álcool, ácido carbônico e ácido acético (GARNIER, 1888). Lavoisier relatou sua experiência dessa forma: “quando a fermentação se completa, o suco de uvas deixa de ser doce e pleno de açúcar para tornar-se licor ‘vinoso’, que não contém mais açúcar e do qual se pode tirar, por destilação, um licor inflamável, para o qual adotamos a palavra árabe *alkohol* (BARNETT, 1998).

Vários foram os autores que tentaram estruturar uma equação que descrevesse o que ocorria durante a fermentação alcoólica. Admitindo que se poderia negligenciar os outros produtos da fermentação, além do álcool e do dióxido de carbono, que, na opinião de Lavoisier, eram os únicos resultados sensíveis, o químico e físico francês Joseph Gay-Lussac (1778-1850), colega de Thénard na Politécnica de Paris, ofereceu, em 1810, outra contribuição para esse estudo. Após aperfeiçoar os métodos analíticos, em conjunto com Thénard, Gay-Lussac revisou os números de Lavoisier, estimando em 1815, que, durante a fermentação de cem partes de açúcar, 51,34 eram convertidas em álcool, e 48,66 em dióxido de carbono (GARNIER, 1888). Estava reservado, no entanto, a Paster resolver, mais tarde, completa e definidamente, o processo da fermentação.

Atualmente, a equação que representar a fermentação alcoólica é a proposta por Gay-Lussac e seus colaboradores. Na qual se observa 1 mol de glicose produzindo 2 moles de etanol e 2 moles de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e 57 Kcal de energia (LEHNINGER *et al.*, 1995; KOLB, 2002).



O glicerol, também conhecido como glicerina, um dos produtos secundários mais importantes da fermentação alcoólica, desempenha uma importante função fisiológica, pois é um protetor osmótico. Durante a fermentação alcoólica o principal papel do glicerol é equilibrar o potencial de oxidação e redução endocelular da levedura e ainda, atua como osmoregulador em resposta a altas pressões osmóticas da solução de açúcar na fermentação (BALLI, 2003). De uma maneira geral, a produção de glicerol a partir da glicose é um neutralizante redox natural do processo. Entretanto, o glicerol pode ser formado em decorrência de estresses físico (pressão osmótica), químico (presença de sulfito no mosto), e microbiológico (contaminação bacteriana) (BASSO, 2004).

### 2.2.1. Fatores que afetam a fermentação alcoólica

Existem inúmeros fatores que afetam a fermentação, dentre os quais podemos citar: pH, temperatura, concentração inicial de substrato (açúcar) e concentração de microrganismo no meio (LIMA *et al*, 2001). Todos estes fatores podem afetar o rendimento, ou seja, a eficiência de conversão de substrato em produto.

#### 2.2.1.1. pH

O pH é um fator importante para se determinar no meio de fermentação, pois pode inibir o crescimento celular e a formação do produto. Ward e Owen (1991) mencionam que valores na faixa de pH entre 3 e 6 são na maioria das vezes favoráveis não só ao crescimento celular e atividade fermentativa como na formação de subprodutos, como glicerol. Nos mostos industriais, os valores de pH geralmente se encontram na faixa de 4,5 a 5,5 (LIMA *et al.*, 2001). No estudo de fatores sinérgicos entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica da levedura, Dorta (2006) verificou que o pH 3,6 foi o que mais interferiu no metabolismo das linhagens estudadas. O mesmo concluiu também que o pH 4,5, mostrou ser suficiente para minimizar os efeitos danosos do sulfito e etanol sobre a célula. Vale salientar que fermentações conduzidas em meios mais ácidos resultam em maiores rendimentos de etanol, devido à baixa produção de glicerol. Esta condição também auxilia no controle da infecção, pois reduz o crescimento de bactérias contaminantes (MARTINS, 2009).

#### 2.2.1.2. Temperatura

A temperatura pode ser considerada outro parâmetro de alta relevância, pois influência na eficiência e desenvolvimento do processo fermentativo (OLIVEIRA, 2006). Para microrganismo produtores de etanol a temperatura ideal é considerada a ambiente, em torno de 30°C. As temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam-se na faixa

de 26 a 35°C, mas, não raramente, a temperatura nas destilarias alcança 38°C (LIMA *et al.*, 2001).

Para Torija *et al.*, (2003) quando o biorreator opera à temperaturas amenas (15 a 20°C) temos um maior rendimento alcoólico, contudo, a obtenção da produção máxima de etanol torna-se mais demorada. Quando a fermentação ocorre entre 25 e 31°C a taxa inicial de fermentação é maior, e em temperaturas maiores que 35°C observa-se um decréscimo na viabilidade celular e uma maior evaporação do álcool. Em seu estudo, Atala *et al.* (2001) observou um decréscimo significativo nos parâmetros de produtividade, conversão e concentração final de biomassa para a fermentação a 40°C. Os danos térmicos para as células de leveduras resultam do rompimento das ligações de hidrogênio e das interações hidrofóbicas, promovendo desnaturação das proteínas e ácidos nucleicos (WALKER, 1994). O aumento da temperatura no meio fermentativo favorece a contaminação bacteriana, além de favorecer a toxicidade da levedura pelo etanol e ocasionar uma maior formação de espuma no processo (LEÃO; AMORIM, 2005).

Para descrever essa dependência dos parâmetros da fermentação com a temperatura, Rivera (2006) utilizou a equação de Arrhenius modificada definida como:

$$\text{Parâmetro} = A \times \exp\left(\frac{B}{T}\right) + C \times \exp\left(\frac{D}{T}\right) \quad (2.3)$$

onde A e C são constantes, B e D são as energias de ativação divididas pela constante da lei dos gases (R).

#### 2.2.1.3. Concentração de substrato

O crescimento celular exibe uma cinética do tipo saturação quando a concentração do substrato aumenta, conforme modelo de Monod. Em muitas situações, quando a concentração de açúcar aumenta, extrapola essa região de saturação, passando então a ocorrer inibição pelo substrato. Da mesma forma, quando a concentração de produto atinge altos valores, é muito comum a existência da inibição pelos produtos. A inibição pelo substrato desativa importantes enzimas, além de modificar o caminho metabólico que é vital para a sobrevivência da levedura. O efeito inibidor provocado pelo substrato na fermentação

alcoólica ocorre quando a concentração supera  $150 \text{ g.L}^{-1}$  (THATIPAMALA *et al.*, 1992). Segundo Pinheiro *et al.* (2008), para a fermentação do suco de caju, o máximo rendimento de etanol e a máxima produtividade são obtidos quando utiliza-se  $90 \text{ g.L}^{-1}$  de substrato inicial.

#### 2.2.1.4. Concentração do Inóculo

Experimentalmente constata-se que maiores concentrações de leveduras no biorreator permitem fermentações mais rápidas, com maior produtividade e controle contra contaminantes, além de restringir o crescimento do próprio microrganismo. Deve-se ressaltar que para altas concentrações celulares é necessário elevadas concentrações de substrato para suportar tal concentração celular. (OLIVEIRA, 2006). O gênero *Saccharomyces* constitui o grupo de leveduras de maior importância industrial sendo *S. cerevisiae* a mais utilizada na indústria de alimentos. E no Brasil, são comumente utilizadas como agentes de bioprocessos na panificação, na elaboração de bebidas, como cerveja, vinho, cachaça e na produção de álcool (MACEDO, 1993; OGAWA *et al.*, 2000; PACHECO; SGARBIERI, 2002).

#### 2.2.2. Bioquímica da fermentação alcoólica

A conversão de açúcar em moléculas mais simples pode ocorrer a partir de dois ciclos diferentes. Inicialmente a glicose é convertida a ácido pirúvico através de uma série de reações catalisadas por enzimas específicas, etapa essa denominada glicólise. Caso a reação se processe na ausência de oxigênio, o ácido pirúvico é descarboxilado gerando acetaldeído. O mesmo é reduzido a etanol e água (ROCHA, 2010). Esse processo pode ser descrito a partir da Equação de Gay-lussac mostrada a seguir.



Contudo, na presença de oxigênio o ácido pirúvico é oxidado a dióxido de carbono e água, seguindo assim o ciclo de Krebs mostrado abaixo. A oxigenação em

processos de fermentação alcoólica ocorre quando se deseja multiplicar as células de microrganismo presente no meio ao invés de produzir etanol.



A partir da equação de Gay-Lussac, observa-se que 1 mol de glicose (180g) produz 2 moles de etanol (92g), 2 moles de dióxido de carbono (88g) e 57 Kcal de energia. Assim, o rendimento teórico ( $Y_{p/s}$ ) para a produção de etanol é de 0,511  $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$  (TOSETTO, 2002).

### 2.3. Histórico do etanol no Brasil

O mundo viveu, nos últimos trinta anos do século passado, dois choques no preço do petróleo: O primeiro em 1973, desencadeado pela Guerra do Yom Kippur quando os produtores árabes resolveram suspender as exportações aos EUA como punição pelo apoio do Ocidente a Israel naquela guerra (VARGAS; ALVIM, 2004). No Brasil, durante o governo Ernesto Geisel, no período imediato após o primeiro choque do petróleo, a principal iniciativa coordenada de política energética adotada, além do estabelecimento de contratos de risco para prospecção de petróleo sob solo nacional, abertos ao capital internacional, foi a criação do Pró-Álcool, em 1975, que objetivava o desenvolvimento de tecnologia para a fabricação de álcool anidro para ser misturado à gasolina e do álcool hidratado como combustível alternativo (TEIXEIRA, 2005).

O Brasil já contava com uma matéria prima adequada para esse fim, a cana-de-açúcar. O aumento de área de plantio e incentivos para instalações de destilarias autônomas foram fortemente estimulados, na forma de financiamento, pelo programas de governo. O Brasil passou a contar com inúmeras novas destilarias produtoras do etanol. A frota de veículos leves passa a ser quase que exclusivamente movida a etanol (ANDRIETTA, M.; STECKELBERG; ANDRIETTA, S., 2006).

O segundo choque (1979) foi resultado de uma ação, liderada pela Arábia Saudita, visando elevar o preço alvo do petróleo que se somou ao agravamento da conjuntura internacional pela ocorrência concomitante da revolução fundamentalista no Iran naquele ano.

Como em 1973, atribui-se a elevação brusca do preço nos últimos anos às motivações políticas vinculadas à prevalência de crises como a guerra no Iraque, as tensões em relação ao Irã e as incertezas na Venezuela e Rússia. (VARGAS; ALVIM, 2004). Segundo Furtado (1992), a alta do preço do petróleo deu um novo ânimo para as destilarias, que depois de uma queda brutal de preços começaram a recuperar o valor do álcool, tendo como efeito imediato a retomada da produção de carros a álcool pelas indústrias nacionais.

Em 1986, o governo federal reviu as políticas de fomento para o setor sucroalcooleiro, estendendo a este as normas válidas para o conjunto da agricultura brasileira do começo dos anos 1980, o que resultou na redução da rentabilidade média da agroindústria canavieira. Essa situação desestimulou a expansão e a renovação dos canaviais. Deste modo, o período compreendido entre 1986 e 1990 é chamado por muitos autores (FURTADO, 1992; PIACENTE, 2006) como de desaceleração e crise do programa, devido a brusca redução dos recursos públicos investidos na expansão do Proálcool. Em adição, houve oferta abundante de petróleo a partir do final da década de 1980, resultando na queda dos preços do petróleo no mercado internacional e, por fim, começaram a ser sentidos os primeiros resultados dos investimentos feitos pela Petrobrás na produção nacional de petróleo (ROCHA, 2010).

Outro motivo que aumentou a busca por novas fontes de produção de etanol ocorreu em 2003, com o advento dos veículos bicomcombustíveis e com a grande aceitação desses por parte dos consumidores, houve um reaquecimento no consumo de etanol hidratado no mercado interno, o que abre um novo horizonte para a expansão da agroindústria da cana no Brasil (ROCHA, 2010). Outro fato que fez a produção de álcool aumentar consideravelmente foi a crescente conscientização ambiental sobre impactos negativos resultantes da utilização de combustíveis fósseis e a busca por fontes renováveis de energia (RODRIGUES et al., 2008). De acordo com o protocolo de Kyoto, os países industrializados devem reduzir em 5,2% a emissão de gases que agravam o efeito estufa. Para diminuir a emissão desses gases, os EUA concordaram em adicionar 20% de etanol a gasolina nos próximos 10 anos e a União Européia adicionará 10% até 2020. Além desses, China, Japão, Itália, Noruega, Venezuela e México já importam etanol do Brasil (FELISMINO, 2009). Só o programa americano prevê o consumo de 135 bilhões de litros de etanol por ano. A União Européia definiu outro programa que representa mais 15 bilhões de litros por ano. Só aí já reside uma enorme oportunidade para o Brasil exportar o biocombustíveis (RAMON, 2009).

## 2.4. Microrganismo

As leveduras são os microrganismos mais importantes na obtenção do álcool por via fermentativa. Dentre as leveduras, o gênero *Saccharomyces* é um dos grupos mais estudados pela comunidade científica (PACHECO, 2010). Trata-se de um organismo vivo, com múltiplas habilidades metabólicas, podendo alterar a estequiometria da fermentação em resposta a alterações no meio, com grande impacto no rendimento do processo (LIMA; BASSO; AMORIM; 2001). A levedura é um microrganismo facultativo, em aerobiose transforma parte do açúcar em biomassa, CO<sub>2</sub> e água. Já em anaerobiose, converte os açúcares em etanol e CO<sub>2</sub> (LIMA *et al.*, 2001). A reprodução desse microrganismo se dá basicamente por gemação (brotamento), em que a célula mãe, após um período de união entre os citoplasmas, dá origem a uma nova célula (STECKELBERG, 2001).

Entre as espécies de microrganismos utilizadas na fabricação de álcool, devem-se utilizar linhagens que apresentem certos requisitos para a boa eficiência da fermentação, dentre eles (LIMA; BASSO; AMORIM; 2001):

- ✓ Velocidade de fermentação: deve apresentar uma boa conversão de açúcar em álcool por unidade de tempo;
- ✓ Resistência ao álcool: leveduras que podem resistir a concentrações elevadas de etanol são interessantes do ponto de vista industrial, pois possibilita a obtenção de fermentado com maior teor alcoólico reduzindo os custos com a destilação;
- ✓ Eficiência de conversão: representa a capacidade da levedura de converter o açúcar em álcool. Leveduras que não utilizam ou utilizam pouco substrato para transformá-lo em etanol não se prestam à fermentação alcoólica;
- ✓ Resistência ao pH e antissépticos: além da resistência ao álcool, a levedura precisa tolerar o baixo pH do meio e antissépticos, uma vez que um dos recursos usados para combater as infecções do mosto é baixar o pH ou adicionar antisséptico;



## 2.5. Caju

A história do caju no Brasil inicia-se com publicações de um monge naturalista francês chamado, André Thevet, em 1558. Ele relatou fatos no seu livro “Singularidades da França Antártica” sobre a primeira dominação francesa no Brasil. Outro monge gaulês esteve no Brasil em 1557, Jean de Léry, referindo-se também ao caju em seu livro “Viagem a terra do Brasil “. O primeiro escritor português a descrever o cajueiro foi Pedro Magalhães Gandavo em 1576, comparou a castanha do caju com a mais saborosa das amêndoas. Outro pesquisador, Fernão Cardim, em 1548, descreveu que as castanhas podem ser comidas assadas, cruas e deitadas em água como amêndoas piladas, podendo-se ainda fazer doces (FROTA, 1998). Presume-se que o cajueiro chegou em Goa, principal colônia de Portugal nas Índias Orientais, entre 1560 e 1565. Os portugueses levaram a planta para a Índia, entre 1563 e 1578. Depois da Índia foi introduzida no sudeste asiático, chegando à África durante a segunda metade do século XVI, primeiro na costa leste e depois na oeste e por último nas ilhas. As primeiras importações de amêndoas de castanha de caju da Índia foram feitas em 1905 pelos Estados Unidos. Em 1941 as exportações indianas de amêndoas de castanha de caju já alcançavam quase 20 mil toneladas. Hoje a castanha é um importante item no comércio mundial. O valor total de vendas, após agregação de valor, supera a soma de US\$ 2 bilhões (CAJUCULTURA, 2011).

O cajueiro é uma planta rústica, originária do Brasil, sendo típica de regiões de clima tropical. Nos estados do nordeste brasileiro, a principal espécie de ocorrência é o *Anacardium occidentale* L., cujas árvores apresentam pequeno e médio porte, sendo a única espécie do gênero que é cultivada com finalidade comercial (SANCHO, 2006).

A produção mundial de castanha é de cerca de 3,1 milhões de toneladas por ano. Os principais países produtores são o Vietnã (941.600 t), Nigéria (636.000 t), Índia (573.000 t), Brasil (236.140 t) e Indonésia (122.000 t) (CAJUCULTURA, 2011). No Brasil, o litoral nordestino, apresenta as melhores condições ecológicas para o seu cultivo (Pereira, 2005).

Segundo Mazza (2010), o Ceará é hoje o maior produtor de castanha de caju do País, com uma produção de 39.596 toneladas (CAJUCULTURA, 2011), mas a cajucultura pode desaparecer em um prazo médio de cinco anos, caso não haja uma mudança radical nos tratamentos com a produção, destacando a valorização do pedúnculo e um maior interesse pela atividade por parte dos governos federal, estadual e municipal. A última previsão da safra

brasileira de castanha de caju para 2010, tendo como referência o mês de dezembro de 2010, apresentou, em relação a 2009, uma variação de - 51,22% na produção, passando de 217.072 toneladas em 2009 para 105.885 toneladas em 2010, e -51,39% no rendimento (kg de castanha por hectare), diminuindo o rendimento de 288kg/ha em 2009 para 140kg/ha em 2010 (CAJUCULTURA, 2011). Atualmente, a maior parte dos cajucultores comercializa apenas a castanha, gerando um desperdício de 90% do pedúnculo. Segundo o presidente do Sincaju, valorizar o pedúnculo é uma das principais formas para salvar a atividade, mas, para isso, precisa de políticas públicas fortes para a atividade. “Temos tecnologia para valorizar o pedúnculo, só falta vontade política”, afirma (Mazza, 2010).

Na literatura já são citados vários estudos que utilizam o pedúnculo de caju como substrato para a fermentação. Rocha *et al.*, (2006) utilizaram no seu estudo o suco obtido do pedúnculo do caju como substrato para a produção de biosurfactate e obteve resultados satisfatórios. Já Talasila *et al.* (2011) e Pinheiro *et al.* (2008) utilizaram o suco de caju para a obtenção de etanol, mostrando os resultados dos mesmos que o suco pode ser utilizado, também como fonte de substrato para a produção de etanol. Rocha *et al.* (2009), hidrolisaram o bagaço de caju para obtenção de frações fermentáveis utilizadas como meio fermentativo para produção de etanol.

## 2.6. Cinética dos processos fermentativos

O estudo da cinética dos processos fermentativos se faz necessário para o entendimento das transformações que ocorrem durante a fermentação, possibilitando assim quantificar a taxa de crescimento celular, de consumo de substrato e formação de produtos, além de avaliar a influência de fatores externos como pH, temperatura, inibidores, etc. e correlacioná-los por meio de equações matemáticas. No caso da fermentação alcoólica, estes valores são essenciais para se projetar adequadamente uma unidade industrial de produção de etanol (VIEGAS, 2003).

A relação cinética entre crescimento e formação de produto depende do papel do produto no metabolismo celular. Os dois exemplos mais comuns de cinética são aqueles que descrevem a síntese do produto durante o crescimento (metabólito primário) e após o crescimento ter cessado (metabólito secundário). A base deste entendimento foi proposta por

Gaden (BAILEY; OLLIS, 1986) e baseia-se nos comportamentos relativos das curvas de taxa específica de crescimento, formação de produto e de consumo de substrato.

Segundo Tosetto (2002), o estudo da cinética de processos fermentativos tem como propósitos:

- Medir a velocidade de transformação que ocorre durante uma fermentação;
- Estudar a influência dos fatores nestas velocidades (pH, temperatura, agitação, composição do meio, etc.);
- Correlacionar por meio de equações empíricas, ou de módulos matemáticos, as velocidades com os fatores que nelas influem;
- Aplicar as equações na otimização e controle de processo.

O objetivo da modelagem matemática de um processo fermentativo é, portanto, organizar informações desconexas sobre os eventos em um conjunto coerente, identificar quais sistemas e interações são relevantes em um sistema, descobrir novas estratégias que permitam descrever o comportamento do processo em determinadas condições e entender as características qualitativamente importantes para o processo (BAILEY, 1998).

Os modelos matemáticos de processos fermentativos podem ser definidos em três grupos: modelos fenomenológicos, entrada-saída (caixa-preta) e híbridos (caixa-cinza). Na abordagem fenomenológica, o desenvolvimento do modelo é conduzido pelos aspectos relevantes do processo e pelos chamados princípios fundamentais (conservação de massa, energia ou quantidade de momento). Na abordagem caixa-preta, o desenvolvimento do modelo está relacionado com observações do comportamento dos dados medidos do sistema a ser modelado. Tal abordagem geralmente faz uso de redes neurais artificiais (RNA). Nos modelos híbridos há a combinação das equações dos princípios fundamentais com uma ou mais redes neurais artificiais (LOPES, 2007).

Modelos fenomenológicos para processos fermentativos são constituídos por equações de balanço ou de conservação (de massa, de energia ou de quantidade de movimento – princípios fundamentais), equações de velocidade (expressões cinéticas que descrevem o consumo de substrato, geração de células e produtos, etc.) e equações termodinâmicas, que relacionam as propriedades termodinâmicas do sistema (pressão, temperatura, concentração, etc.).

As equações cinéticas (de velocidade), também denominadas modelos cinéticos, utilizadas nos processos fermentativos podem ser classificadas quanto ao número de componentes usados na representação celular de dois tipos (BONOMI; SCHMIDELL, 2001):

- **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 (BONOMI; SCHMIDELL, 2001):

- **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.

Combinando estrutura a nível populacional e celular, são obtidos modelos:

- Não estruturados e não segregados, nos quais a célula de microrganismo é considerada como soluto;

- Estruturados e não segregados, onde as células são tratadas como indivíduos de múltiplos componentes, porém com composição média semelhante;

- Não estruturados e segregados, onde as células são tratadas como seres individuais distintos, porém descrito como único componente;

- Estruturado e segregado, onde as células são consideradas como indivíduos distintos e formados por múltiplos componentes.

A seleção do tipo de modelo e sua complexidade podem ser observadas na Figura 2.1. A complexidade aumenta do canto superior esquerdo para o canto inferior direito.



Figura 2.1. Diferentes tipos de complexidade do modelo.

A cinética de fermentação alcoólica é complexa, pois a taxa de fermentação muda continuamente conforme o substrato é consumido e o produto é formado. Para descrever esse processo fermentativo, o tipo de modelo mais encontrado na literatura é o do tipo não estruturado e não segregado (MOULIN; BOZE; GALZY, 1980). Devido a esta complexidade, é pouco aconselhável a utilização de modelos que consideram as células como indivíduos distintos constituídos de vários componentes. Assim, utilizando modelos mais simples, a imprecisão que possa ocorrer é compensada pela facilidade de obtenção e diminuição do número de parâmetros cinéticos necessários (ANDRIETTA, 1994).

Modelos fenomenológicos baseados nas equações de balanço de massa com crescimento microbiano, consumo de substrato e formação de etanol para reator batelada podem ser usados para descrever a cinética fermentativa pelo conjunto de equações diferenciais a seguir:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x \times X \quad (2.6)$$

$$\frac{dS}{dt} = -\mu_s \times X \quad (2.7)$$

$$\frac{dP}{dt} = \mu_p \times X \quad (2.8)$$

onde  $\mu_x$  é a velocidade específica de crescimento,  $\mu_s$  a velocidade específica de consumo de substrato e  $\mu_p$  é a geração de produto.

O modelo cinético mais frequentemente utilizado para descrever a relação entre a velocidade específica de crescimento com a concentração de substrato limitante foi proposta por Monod:

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_s + S} \quad (2.9)$$

onde:  $\mu_{\text{máx}}$  é a máxima velocidade específica de crescimento celular,  $S$  é a concentração de substrato limitante e  $K_s$  a constante de Monod, que representa o valor de  $S$  no qual a velocidade específica de crescimento celular é a metade do seu valor máximo.

Apesar da equação de Monod ser a mais largamente aceita como uma aproximação para descrever a cinética de crescimento microbiano, ela apresenta certas deficiências teóricas. Estas existem quando a expressão é usada para descrever processos onde existam múltiplas condições limitantes de substrato (FERREIRA, 2000). Outra limitação do modelo de Monod é que o mesmo somente se aplica para casos em que não há presença de inibidores de crescimento no meio de cultura (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG, 2008).

Para representar processos fermentativos em que ocorre inibição pelo substrato, Andrews propôs um modelo que além de considerar o efeito do substrato limitante (Monod), também descrevesse a ocorrência de inibição pelo substrato ( $K_i$ ), descrito pela Equação 2.10.

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \quad (2.10)$$

Ghose e Thyagi (1979) e Bazua e Wilke (1977) em seus estudos, verificaram que a inibição pelo etanol afetava apenas  $\mu_{\text{máx}}$ , não tendo nenhum efeito sobre  $K_s$ . Em seu estudo, Levenspiel (1980) revisou e generalizou uma equação matemática para descrever o crescimento celular contendo um termo de inibição pelo produto, além de levar em consideração o efeito do substrato limitante ( $K_s$ ), dada pela Equação 2.11.

$$\mu = \left( \frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_s + S} \right) \times \left( 1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}} \right)^n \quad (2.11)$$

sendo  $P_{\text{máx}}$  a concentração de produto onde cessa o crescimento microbiano. O crescimento celular se torna inviável para concentrações de etanol superiores à obtida para esse parâmetro. Para concentrações de  $P$  bem menores que o valor de  $P_{\text{máx}}$ , a Equação 11 se reduz à Equação 09, que é equivalente à cinética de Monod (LEVENSPIEL; 1980).

Ghose e Thyagi (1979) propuseram um modelo que descrevesse ao mesmo tempo a inibição causada pela concentração de substrato, como a causada pelo produto gerado do consumo desse substrato (Equação 2.12).

$$\mu = \left( \frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \right) \times \left( 1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}} \right) \quad (2.12)$$

No seu estudo, Vasconcelos, Pinto e Silva. (1992) testaram dez modelos cinéticos aplicados ao processo de fermentação alcoólica em batelada alimentada e concluíram que o modelo de Ghose e Thyagi (1979) foi o que apresentou melhores ajustes aos dados experimentais. Tosetto (2002) utilizou seis modelos estruturados para avaliar a cinética fermentativa, sendo o modelo de Ghose e Thyagi (1979), representado pela Equação 2.12, um dos que mais se adequaram aos dados experimentais.

Tosetto e Andrietta (2002) propuseram um modelo semelhante ao de Ghose e Thyagi (1979), diferindo apenas pela adição de um expoente no termo de inibição pelo produto, onde os valores desse parâmetro assumem valores diferentes de 1 (Equação 2.13).

$$\mu = \left( \frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_i}} \right) \times \left( 1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}} \right)^n \quad (2.13)$$

O uso de modelos matemáticos que descrevam a cinética do processo fermentativo possibilita o projeto de uma planta de fermentação a partir da obtenção de condições ótimas de operação. Para a manutenção destas condições se faz necessária a escolha de uma estratégia de controle adequada. Isto pode ser adequadamente realizado pelo estudo prévio de modelagem da planta e simulação em computadores (ANDRIETTA, 1994).

## 2.7. Discriminação entre modelos

Um dos testes bastante encontrado na literatura para avaliar a qualidade de predição de um modelo é o teste do desvio padrão residual (Residual Standard Deviation – RSD) sugerido por Cleran *et al* (1991):

$$RSD = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{pi})^2}{n} \quad (2.14)$$

onde  $y_i$  é o valor da variável encontrado experimentalmente,  $y_{pi}$  é o valor predito pelo modelo matemático e  $n$  é o número de pontos experimentais. Os valores de RSD são mais comumente encontrados na literatura como uma porcentagem da média dos valores experimentais ( $\bar{y}$ ). Para engenharia de bioprocessos, valores de RSD (%) abaixo de 10% podem ser considerados aceitáveis. Logo, o modelo pode ser utilizado para prever a cinética fermentativa do processo.

$$RSD(\%) = \frac{\sqrt{RSD}}{\bar{y}} \times 100 \quad (2.15)$$

Outro teste bastante difundido e utilizado para a seleção dos melhores modelos é o teste do  $X^2$  de Bartlett. Esse teste indica se algum dos modelos estudados não apresenta um ajuste tão satisfatório quanto o apresentado pelos demais a partir de um teste de homogeneidade dos erros experimentais estimados para cada modelo. O mesmo avalia se o valor da variância de cada modelo é estaticamente diferente dos outros. O resultado é obtido utilizando o teste do  $X^2$ , calculando o  $X_{calc}^2$  pela fórmula de Bartlett:

$$X_{calc}^2 = \frac{\ln(S^2) \times \sum_{i=1}^m (d.f.)_i - \sum_{i=1}^m (d.f.)_i \times \ln(S_i^2)}{1 + \frac{1}{3(m-1)} \left[ \sum_{i=1}^m \frac{1}{(d.f.)_i} - \frac{1}{\sum_{i=1}^m (d.f.)_i} \right]} \quad (2.16)$$

onde

$$S_i^2 = \sum_{k=1}^n \frac{(y^{(k)} - y_i^{(k)})^2}{n - p_i} \quad (2.17)$$



$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^m (d.f.)_i \times S_i^2}{\sum_{i=1}^m (d.f.)_i} \quad (2.18)$$

Caso  $X_{\text{calc}2} > X_{\text{tab}2}(\alpha, m-1)$ , o modelo que apresenta o maior valor de  $S_i^2$  será descartado. O valor de  $X_{\text{tab}2}(\alpha, m-1)$  é obtido a partir de tabelas estatísticas, onde  $\alpha$  é o nível de significância utilizado (geralmente 5%).

### 3. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA NA PRODUÇÃO DE ETANOL POR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

#### 3.1. Introdução

Os nutrientes têm um importante papel na obtenção de um bom rendimento industrial para a fermentação alcoólica. Segundo Leão e Amorim (2005), durante o processo de fermentação alcoólica, as células de leveduras apresentam necessidades nutricionais e os nutrientes influenciam diretamente na multiplicação e no crescimento celular e também na eficiência da transformação de açúcar em álcool. O meio de cultura deve conter carbono, nitrogênio e fósforo, fontes imprescindíveis à fermentação (MENEZES, 1980). O fósforo é um suplemento essencial, pois favorece a ação das leveduras e aumenta a eficiência e produtividade do processo fermentativo. Outro elemento importante no metabolismo da levedura é o nitrogênio. A forma com que esse nutriente se encontra influencia na melhor absorção do mesmo pela levedura, sendo a forma amoniacal a mais favorável ao seu aproveitamento (VASCONCELOS, 1987). Na ausência desta forma, a levedura procura outras fontes como aminoácidos, que influenciam na formação de subprodutos. O meio além de conter carbono, hidrogênio e oxigênio (presentes na estrutura dos açúcares) deve, igualmente, fornecer nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo, dentre outros elementos (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Muito se discute em relação à necessidade ou não de suplementação de nutrientes. Alguns autores consideram necessária a suplementação do meio de cultura utilizado na fermentação. Em seu estudo, Vasconcelos (1987) suplementou o mosto com sulfatos de zinco, sulfato de magnésio, sulfato de manganês e difosfato de amônio. Pinheiro *et al.* (2008) suplementaram o suco de caju com sulfato de magnésio, fosfato de sódio monobásico, sulfato de amônia e sulfato de zinco e utilizaram o mesmo como meio para produção de etanol. Rocha *et al.*, (2006) caracterizaram o suco do pedúnculo de caju, em termos de parâmetros físico- químicos e os resultados mostraram que o mesmo era rico em glicose, frutose e vários aminoácidos. Porém, alguns macro e micronutrientes não estavam presentes em quantidade desejada para produção de biosurfactante, sendo necessário suplementá-lo (Rocha, 2010).

Desta forma, neste capítulo avaliou-se a necessidade de suplementação do suco de caju para a produção de etanol utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A necessidade da adição de nutrientes foi avaliada a partir dos parâmetros cinéticos de velocidade específica de crescimento celular, conversão de célula em produto, de substrato em célula e substrato em produto, rendimento, eficiência e produtividade obtidos para a produção de etanol utilizando o suco de caju como substrato.

### 3.2. Material e Métodos

#### 3.2.1. Microrganismo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada nos ensaios fermentativos foi obtida a partir de uma levedura comercial (FLEISCHMANN - AB BRASIL INDUSTRIAL E COMÉRCIO DE ALIMENTOS LTDA) no Laboratório de Bioengenharia situado no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará.

#### 3.2.2. Preparação do suco de caju

O suco de caju foi obtido a partir da prensagem do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.). Após a obtenção, o suco foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos e o seu pH foi ajustado para 4,5 utilizando HCl 6 N. A esterilização se deu em autoclave a 110°C por 10 minutos.

#### 3.2.3. Meios de cultura

Para a manutenção das leveduras utilizou-se o meio complexo YEPD (Yeast Extract-Peptide-Dextrose) constituído por: Extrato de levedura 10 g.L<sup>-1</sup>, Peptona 20 g.L<sup>-1</sup>,

Glicose 20 g.L<sup>-1</sup> e Ágar Sabouraud 20 g.L<sup>-1</sup>. O pH do meio foi ajustado para 4,5 utilizando HCl 6 N e a esterilização se deu em autoclave (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) a 110°C por 10 minutos. A cultura foi mantida em ambiente refrigerado a 4°C em placas de petri Para a propagação e obtenção do inóculo preparou-se meio complexo YEPD (Yeast Extract-Peptide-Dextrose) constituído por: Extrato de levedura 10 g.L<sup>-1</sup>, Peptona 20 g.L<sup>-1</sup> e Glicose 20 g.L<sup>-1</sup>. O mesmo foi esterilizado em autoclave a 110°C por 10 minutos.

A inoculação se deu em câmara de fluxo laminar (ambiente estéril) e a incubação em Erlenmeyers, sendo o mesmo colocado em *shaker* (Tecnal - TE 420) a 30 °C e 150 rpm por 24 horas. O inóculo começou a ser preparado com 72 horas de antecedência do início da fermentação, onde uma placa de petri contendo o microrganismo foi repicada e ficou à temperatura ambiente crescendo por 48 horas. Passado esse período, foram coletadas cinco colônias de leveduras (utilizando uma alça de inoculação) sendo a mesma transferida para Erlenmeyers contendo o meio de propagação. Os Erlenmeyers foram incubados em *shaker* com agitação de 150 rpm a 30°C por 24 horas. Posteriormente, centrifugou-se o inóculo a 10000 rpm por 10 min para se obter a concentração celular desejada para o ensaio fermentativo.

#### 3.2.4. Influência da suplementação do suco de caju na produção de etanol através de *Saccharomyces cerevisiae*

A fim de avaliar a influência da composição do meio de cultura na produção de etanol a partir do suco de caju utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, estudou-se a necessidade da suplementação do suco de caju para sua posterior fermentação. Foram feitos ensaios fermentativos utilizando o suco de caju suplementado com os seguintes nutrientes: MgSO<sub>4</sub> (0,65 g.L<sup>-1</sup>), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,50 g.L<sup>-1</sup>), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,50 g.L<sup>-1</sup>) e ZnSO<sub>4</sub> (0,65 g.L<sup>-1</sup>). Em seguida, realizaram-se outros ensaios utilizando apenas o suco de caju como meio fermentativo. O meio foi esterilizado em autoclave (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) a 110°C por 10 min e seu pH inicial foi ajustado a 4,50 utilizando HCl 6N. A fermentação ocorreu em frascos de Erlenmeyer de 500 mL, utilizando 250 mL de suco de caju como meio de cultura. Os Erlenmeyers foram colocados em agitador rotatório TE240 (Tecnal, São Paulo, Brasil) a 30°C e 150 rpm. A concentração inicial de substrato (glicose + frutose) utilizada na

fermentação foi a do suco de caju *in natura* ( $105 \text{ g.L}^{-1}$ ), sendo a concentração de levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ . A escolha por esse microrganismo se deu pela praticidade da sua utilização, sendo o mesmo um microrganismo industrial obtido na forma liofilizada. Amostras foram coletadas em intervalos de tempo pré-definidos e submetidas à análise. A necessidade de suplementação do suco de caju foi avaliada a partir de análise de parâmetros cinéticos obtidos para o processo.

### 3.2.5. Métodos analíticos

#### 3.2.5.1. Concentração celular

A concentração celular foi determinada através do método de massa seca proposto por Atala (ATALA; COSTA & MACIEL, 2001). As amostras coletadas foram centrifugadas por 10 minutos a 6.000 rpm em frascos previamente pesados. A massa centrifugada foi ressuspensa por água destilada e centrifugada novamente nas mesmas condições. Em seguida a massa foi colocada em estufa modelo Tecnal TE-397/4 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) por 12 horas a  $60^{\circ}\text{C}$ .

#### 3.2.5.2. Concentração de substrato e produto

As concentrações de açúcares (glicose e frutose) e etanol foram medidas através de análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector de índice de refração Waters 2414 e com uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Ácido Sulfúrico,  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $5 \text{ mmol.L}^{-1}$  foi usado como fase móvel (eluente) na vazão de  $0,5 \text{ mL.min}^{-1}$  a  $65^{\circ}\text{C}$ . O volume de injeção das amostras foi de  $20 \mu\text{L}$ . As amostras foram identificadas comparando os tempos de retenção com o tempo de retenção das amostras padrão.

### 3.2.6. Cálculo dos Rendimentos e parâmetros cinéticos

Os dados obtidos experimentalmente (concentração de biomassa, substrato e produto) foram utilizados na determinação dos parâmetros cinéticos da fermentação. A produtividade volumétrica de etanol ( $Q_p$ ,  $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) foi calculada como a razão da concentração máxima de etanol obtida ( $P_{\text{máx}}$ ,  $\text{g L}^{-1}$ ) e o tempo de fermentação no qual  $P_{\text{máx}}$  foi alcançado ( $t$ , h).

$$Q_p = \frac{P_{\text{máx}}}{t} \quad (3.1)$$

A conversão do açúcar consumido em etanol ( $Y_{P/S}$ ,  $\text{g g}^{-1}$ ) foi definida como:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f}{(S_0 - S_f)} \quad (3.2)$$

onde  $S_0$  ( $\text{g L}^{-1}$ ) e  $S_f$  ( $\text{g L}^{-1}$ ) são as concentrações de açúcar no início e no final da fermentação, respectivamente.

A conversão de açúcar foi calculada usando a equação 3.3:

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{(S_0 - S_f)}{S_0} \times 100 \quad (3.3)$$

A eficiência da conversão de açúcar em etanol ( $\eta$ , %) foi estimada pela relação:

$$\eta = \frac{Y_{P/S}}{Y_t} \times 100 \quad (3.4)$$

onde  $Y_t$  é o valor teórico de  $Y_{P/S}$  ( $0,511 \text{ g g}^{-1}$ ).

A conversão de substrato consumido em biomassa ( $Y_{X/S}$ ,  $\text{g g}^{-1}$ ), foi definida como:

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (3.5)$$

### 3.3. Resultados e Discussão

A influência da suplementação no suco de caju para a produção de etanol foi avaliada a partir da suplementação do suco com sulfatos e fosfato. Os resultados são mostrados na Figura 3.1. Observam-se comportamentos bastante similares para a formação de célula, consumo de substrato e produção de etanol com ou sem a adição de nutrientes ao suco. Logo, constata-se que a adição de sulfatos, fosfato e alguns metais como magnésio, zinco e potássio ao suco de caju para a sua posterior fermentação não se faz necessária, pois, o suco *in natura* já apresenta todos os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo. Esse fato é de suma importância quando analisado do ponto de vista industrial, diminuindo o custo para a obtenção de etanol a partir do suco do caju.

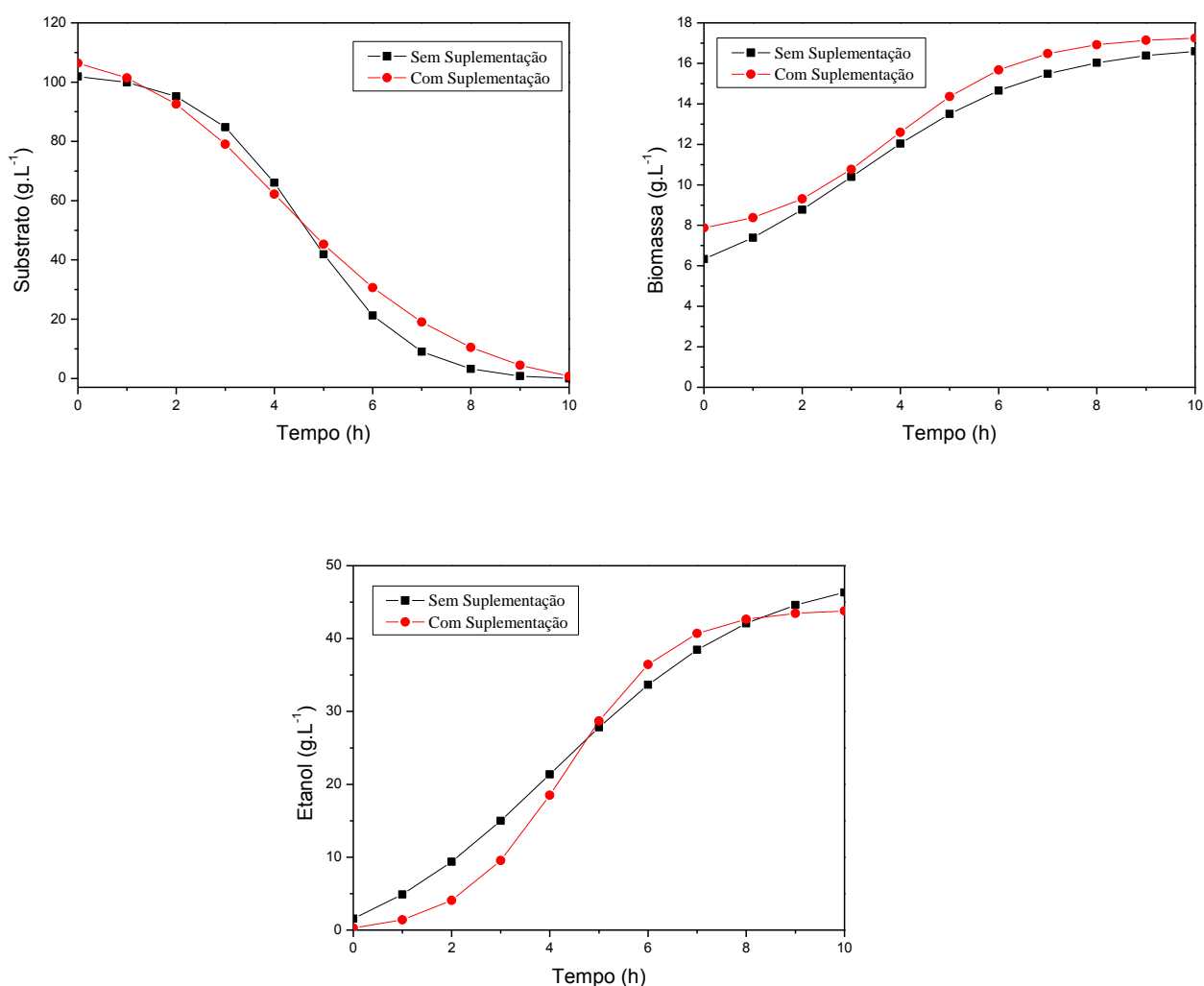


Figura 3.1. Efeito da suplementação de nutrientes no suco de caju para a produção de etanol por *S. cerevisiae* no consumo de substrato, formação de célula e produção de etanol.

Além da análise gráfica do perfil do processo fermentativo, avaliou-se a influência da suplementação nos seguintes parâmetros cinéticos: máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), conversão de célula em produto ( $Y_{p/x}$ ), conversão de substrato em célula ( $Y_{x/s}$ ), conversão, eficiência e produtividade. Os valores obtidos para os parâmetros citados anteriormente encontram-se na Tabela 3.1, para o suco de caju suplementado ou não.

Tabela 3.1. Parâmetros cinéticos calculados para avaliação da suplementação do suco de caju na produção de etanol.

Parâmetros	Meio suplementado	Meio não suplementado
$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	0,12	0,14
$Y_{p/x} (\text{g.g}^{-1})$	4,67	4,52
$Y_{x/s} (\text{g.g}^{-1})$	0,09	0,10
$Y_{p/s} (\text{g.g}^{-1})$	0,43	0,44
Conversão (%)	100	100
Eficiência (%)	84,15	86,10
Produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	4,38	4,63

Recorrendo à Tabela 3.1, observa-se que os valores calculados para os parâmetros cinéticos demonstram que a suplementação não influenciou significativamente em nenhum dos parâmetros avaliados. Observado o parâmetro da conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ ), percebe-se que o valor obtido para o meio suplementado (0,43  $\text{g.g}^{-1}$ ) é praticamente o mesmo calculado para o meio não suplementado (0,44  $\text{g.g}^{-1}$ ), assim, a suplementação do suco de caju, para sua posterior fermentação, não se faz necessária. Logo, conclui-se que o suco de caju *in natura* já possui todos os nutrientes necessários para o crescimento celular durante a fermentação.

### 3.4. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos na avaliação da composição do meio de cultura, observou-se que não se faz necessária a suplementação do suco de caju com sulfatos e fosfatos para a sua posterior fermentação. Os resultados mostraram cinéticas bastante similares para a fermentação do suco de caju com ou sem a adição desses nutrientes. A



influência da suplementação também foi avaliada calculando-se os parâmetros de máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), conversão de célula em produto ( $Y_{p/x}$ ), conversão de substrato em célula ( $Y_{x/s}$ ), conversão de substrato em produto ( $Y_{p/s}$ ), conversão, eficiência e produtividade. Nesta parte do estudo observou-se também que a suplementação não foi necessária, já que os valores dos parâmetros cinéticos de fermentação, com e sem a adição de nutrientes, não foram muito distantes. Logo, constata-se que o suco de caju *in natura* já apresenta todos os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo.

## 4. EFEITO DA TEMPERATURA NA PRODUÇÃO DE ETANOL POR FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DO SUCO DE CAJU

### 4.1. Introdução

A temperatura é um dos parâmetros mais importantes para o desempenho das leveduras durante o processo fermentativo (FLEET; HEARD, 1993), influenciando no crescimento celular (TORIJA *et al.*, 2003), tempo de fermentação (TORIJA *et al.*, 2001) e no metabolismo das leveduras (LAFON-LAFOURCADE, 1983). Para microrganismo produtores de etanol a temperatura ideal é considerada a ambiente, em torno de 30°C. As temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam-se na faixa de 26 a 35°C, mas, não raramente, a temperatura nas destilarias alcança 38°C (LIMA *et al.*, 2001).

A maioria dos estudos encontrados na literatura (Rivera, 2006) tem como base processos fermentativos isotérmicos, entretanto, em condições reais de operação encontradas nas usinas, isso nem sempre é observado. O estudo do efeito da temperatura nos parâmetros cinéticos que quantificam a reprodução e morte celular, consumo de substrato e produção de etanol são informações importantes para a elaboração de estratégias de controle mais eficientes nas indústrias de produção de etanol (ATALA, 2001). No seu estudo, Rivera (2007) afirma que para que um modelo apresente resultados precisos, o mesmo tem que considerar a influência da temperatura sobre a cinética do processo. Os resultados obtidos pelo mesmo mostram que as mudanças na temperatura têm grande influência sobre o comportamento cinético do processo.

Neste capítulo estudou-se a influência da temperatura no processo de fermentação alcoólica utilizando os açúcares presentes no suco de caju como substrato. Estudou-se como a temperatura influencia nos parâmetros de rendimento, produtividade, eficiência, produção máxima de etanol, velocidade específica de crescimento celular e conversão de substrato em célula e de célula em produto. Utilizou-se o modelo de Monod para descrever a cinética do processo fermentativo. A equação de Arrhenius modificada (Equação 4.2) foi utilizada para descrever o comportamento dos parâmetros cinéticos da equação de Monod com a variação da temperatura.

## 4.2. Material e Métodos

### 4.2.1. Microrganismo

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada nos ensaios fermentativos foi isolada de uma levedura comercial (AB BRASIL INDUSTRIAL E COMÉRCIO DE ALIMENTOS LTDA) no Laboratório de Bioengenharia situado no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará.

### 4.2.2. Preparação do suco de caju

O suco de caju foi obtido a partir da prensagem do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.). Após a obtenção, o suco foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos e o seu pH foi ajustado para 4,5 utilizando HCl 6 N. A esterilização se deu em autoclave a 110°C por 10 minutos.

### 4.2.3. Meios de cultura

Para a manutenção das leveduras utilizou-se o meio complexo YEPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) constituído por: Extrato de levedura 10 g.L<sup>-1</sup>, Peptona 20 g.L<sup>-1</sup>, Glicose 20 g.L<sup>-1</sup> e Ágar Sabouraud 20 g.L<sup>-1</sup>. O pH do meio foi ajustado para 4,5 utilizando HCl 6 N e a esterilização se deu em autoclave (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) a 110°C por 10 minutos. A cultura foi mantida em ambiente refrigerado a 4°C em placas de petri. Para a propagação e obtenção do inóculo preparou-se meio complexo YEPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) constituído por: Extrato de levedura 10 g.L<sup>-1</sup>, Peptona 20 g.L<sup>-1</sup> e Glicose 20 g.L<sup>-1</sup>. O mesmo foi esterilizado em autoclave a 110°C por 10 minutos.

#### 4.2.4. Influência da temperatura na produção de etanol utilizando o suco de caju

A fim de determinar como a temperatura influencia na produção de etanol, estudou-se a cinética fermentativa, utilizando a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, conduzindo o ensaio nas temperaturas de 26, 30, 34, 38 e 42°C. O processo fermentativo foi conduzido em biorreator batelada de 1 L (Tec-Bio, Modelo 1,5, Tecnal, SP, Brasil), ver Figura 4.1, utilizando 750 mL de suco de caju. Este biorreator consiste em um vaso de aproximadamente um litro de volume útil, que contém uma base de controle que possibilita controlar algumas variáveis do processo como temperatura, pH, agitação, aeração, vazão de nutrientes e adição de antiespumantes. A fermentação se deu com agitação de 150 rpm e sem aeração. A concentração inicial de substrato utilizada (glicose + frutose) foi de aproximadamente 102 g.L<sup>-1</sup>, que corresponde à concentração inicial de açúcares presente no suco de caju *in natura*. A concentração inicial de células foi de 10 g.L<sup>-1</sup> e seu crescimento foi acompanhado pelo método da massa seca. Amostras foram retiradas em intervalos de tempo predefinidos para posterior análise.

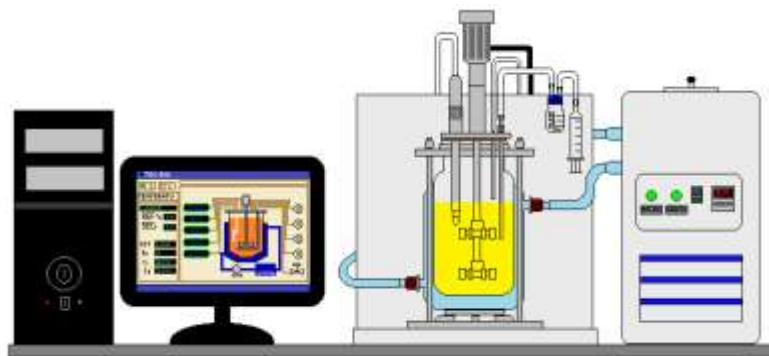


Figura 4.1. Representação esquemática do Biorreator Tec-Bio 1,5 utilizado neste trabalho.

Para descrever a cinética do processo fermentativo, utilizou-se o modelo proposto por Monod (Equação 4.1).

$$\mu = \frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S} \quad (4.1)$$

O modelo de Monod é o mais frequentemente utilizado para descrever a relação entre a velocidade específica de crescimento com a concentração de substrato limitante,

contudo, o mesmo só pode ser utilizado para casos em que não há presença de inibidores de no meio de cultura. Esse modelo consegue descrever satisfatoriamente a cinética de crescimento celular quando temos ausência de fase *lag* durante a fermentação.

Aplicando o modelo de Monod ao balanço de massa do biorreator obtemos o seguinte sistema de equações diferenciais:

$$\frac{dX}{dt} = \left( \frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_s + S} \right) \times X \quad (4.2)$$

$$\frac{dS}{dt} = - \left( \frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_s + S} \right) \times \frac{X}{Y_{X/S}} \quad (4.3)$$

$$\frac{dP}{dt} = \left( \frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_s + S} \right) \times X \times Y_{P/X} \quad (4.4)$$

onde  $\mu_{\text{máx}}$  e  $K_s$  são parâmetros obtidos a partir do modelo de Monod e  $Y_{x/s}$  e  $Y_{p/x}$  são definidos como fatores de conversão. Os fatores de conversão são definidos como uma relação entre a velocidade específica de crescimento celular, a velocidade específica de produção de etanol e a velocidade específica de consumo de substrato.

Primeiramente, os parâmetros cinéticos, para cada temperatura avaliada, foram estimados pelo método não-linear de mínimos quadrados de Marquardt a partir de uma rotina de ajuste desenvolvida em FORTRAN versão 6.1. Para resolver o sistema de equações diferenciais (Equações 4.2, 4.3 e 4.4) utilizou-se o método de Runge-Kutta-Gill de 4ª ordem. Posteriormente, para descrever a relação entre a temperatura e os parâmetros cinéticos do modelo, utilizou-se a equação de Arrhenius modificada (Equação 4.5).

$$\left( \mu_{\text{máx}}, Y_{x/s}, Y_{p/x} \right) = A \times \exp \left( \frac{B}{T} \right) + C \times \exp \left( \frac{D}{T} \right) \quad (4.5)$$

Os parâmetros da equação de Arrhenius, A, B, C e D, foram determinados utilizando o método dos mínimos quadrados a partir do software Origin Pro 8.

#### 4.2.5. Métodos analíticos

##### 4.2.5.1. Concentração celular

A concentração celular foi determinada através do método de massa seca proposto por Atala (ATALA; COSTA & MACIEL, 2001). As amostras coletadas foram centrifugadas por 10 minutos a 6.000 rpm em frascos previamente pesados. A massa centrifugada foi ressuspensa por água destilada e centrifugada novamente nas mesmas condições. Em seguida a massa foi colocada em estufa modelo Tecnal TE-397/4 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) por 12 horas a 60°C.

##### 4.2.5.2. Concentração de substrato e produto

As concentrações de açúcares (glicose e frutose) e etanol foram medidas através de análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector de índice de refração Waters 2414 e com uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Ácido Sulfúrico,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mmol.L<sup>-1</sup> foi usado como fase móvel (eluente) na vazão de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> a 65°C. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL.

#### 4.2.6. Cálculo dos Rendimentos e parâmetros cinéticos

Os dados obtidos experimentalmente (concentração de biomassa, substrato e produto) foram utilizados na determinação dos parâmetros cinéticos da fermentação. A produtividade volumétrica de etanol ( $Q_p$ , g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) foi calculada como a razão da concentração máxima de etanol obtida ( $P_{máx}$ , g.L<sup>-1</sup>) e o tempo de fermentação no qual  $P_{máx}$  foi alcançado ( $t$ , h).

$$Q_p = \frac{P_{máx}}{t} \quad (4.6)$$

A conversão do açúcar consumido em etanol ( $Y_{P/S}$ , g·g<sup>-1</sup>) foi definida como:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f}{(S_0 - S_f)} \quad (4.7)$$

onde  $S_0$  (g·L<sup>-1</sup>) e  $S_f$  (g·L<sup>-1</sup>) são as concentrações de açúcar no início e no final da fermentação, respectivamente.

A conversão de açúcar foi calculada usando a equação 4.8:

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{(S_0 - S_f)}{S_0} \times 100 \quad (4.8)$$

A eficiência da conversão de açúcar em etanol ( $\eta$ , %) foi estimada pela relação:

$$\eta = \frac{Y_{P/S}}{Y_t} \times 100 \quad (4.9)$$

onde  $Y_t$  é o valor teórico de  $Y_{P/S}$  (0,511 g·g<sup>-1</sup>).

A conversão de substrato consumido em biomassa ( $Y_{X/S}$ , g·g<sup>-1</sup>), foi definida como:

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (4.10)$$

### 4.3. Resultados e Discussão

A Figura 4.2 mostra os resultados experimentais obtidos para o consumo de substrato, crescimento celular e produção de etanol durante o tempo de fermentação para cada temperatura estudada.

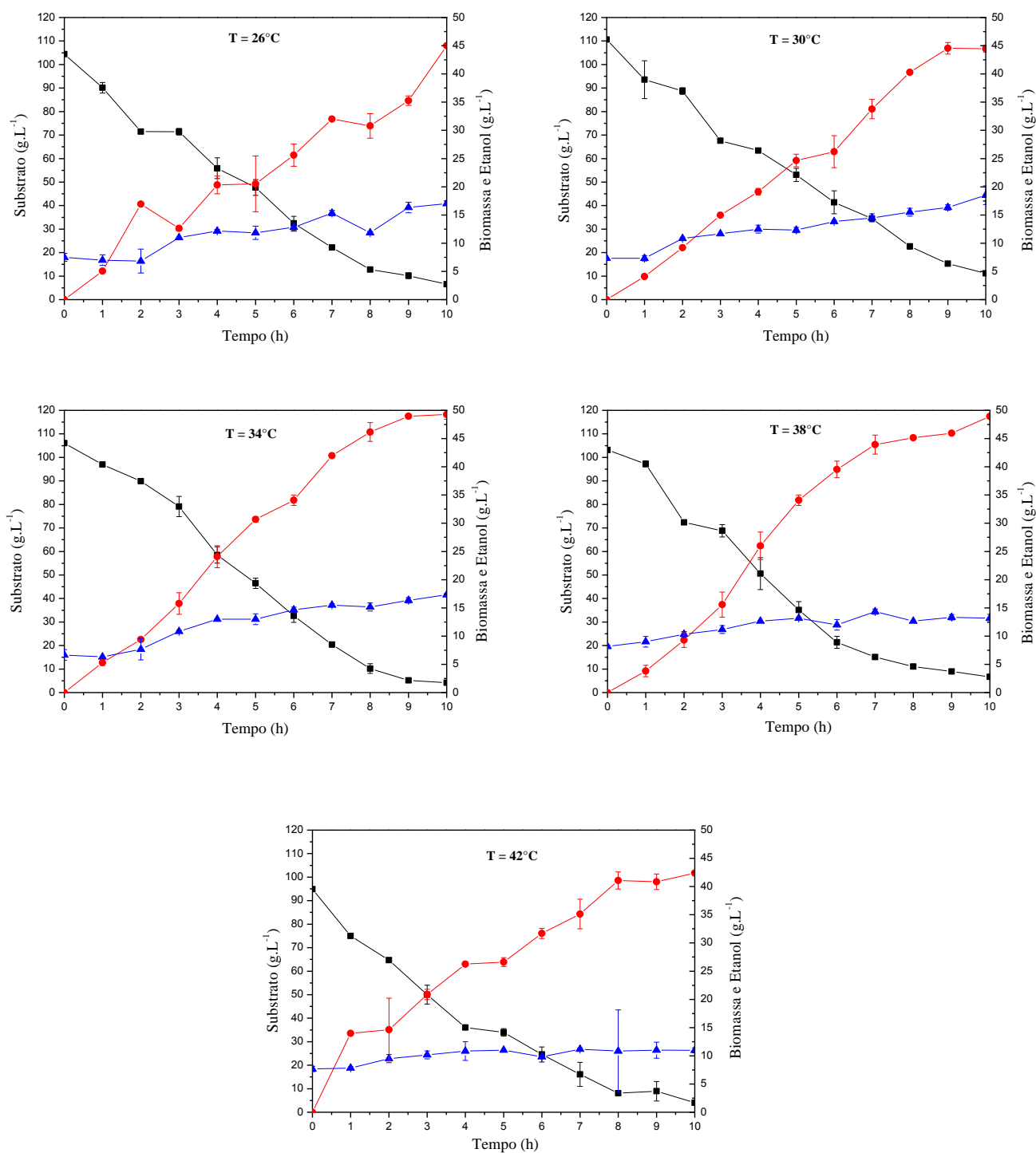


Figura 4.2. Fermentação de suco de caju por *S. cerevisiae* a 150 rpm variando a temperatura (26, 30, 34, 38 e 42°C): (■) concentração de substrato (glicose + frutose); (●) concentração de etanol (g.L<sup>-1</sup>); (▲) biomassa (peso seco - g.L<sup>-1</sup>). Os pontos experimentais representam à média e as barras verticais o desvio padrão de pelo menos dois experimentos.



Observa-se que a produção máxima de etanol se mantém próxima para as temperaturas no intervalo de 26 a 38°C. Para a temperatura de 42°C, observa-se uma menor concentração celular final e consequentemente uma menor concentração máxima de etanol, pois a cinética de fermentação para produção de etanol apresenta o comportamento de um metabólito primário, ou seja, a produção de etanol está associada ao crescimento celular, como pode ser observado na Figura 4.3.

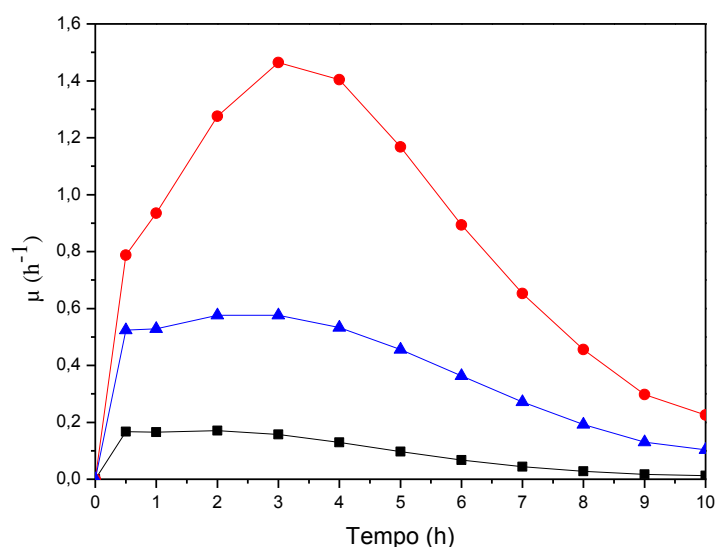


Figura 4.3. Velocidade específica de crescimento celular, formação de etanol e consumo de substrato para a produção de etanol a partir do suco de caju a 34°C. (■)  $\mu_x$  ( $h^{-1}$ ), (●)  $\mu_s$  ( $h^{-1}$ ) (▲)  $\mu_p$  ( $h^{-1}$ ).

Observa-se na Figura 4.3 que a velocidade específica de crescimento celular ( $\mu_x$ ), produção de etanol ( $\mu_p$ ) e consumo de substrato ( $\mu_s$ ) ocorrem simultaneamente ao longo da fermentação, logo, podemos afirmar que o microrganismo segue a cinética fermentativa de um metabólito primário.

Estudos realizados (SHERMAN, 1959; CHANG; MATSON, 1972) revelam que a *Saccharomyces cerevisiae* que é uma levedura mesófila, consegue crescer bem, sob determinadas condições, até aproximadamente 40°C. Para temperaturas superiores pode-se evidenciar um decréscimo no crescimento celular, ocorrendo assim a morte da mesma.

Avaliou-se também o efeito da temperatura na máxima velocidade específica de crescimento, conversão de substrato em célula, de célula em produto e de substrato em produto, nos parâmetros de conversão, produtividade, eficiência e produção máxima de etanol, sendo os resultados apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Máxima velocidade específica de crescimento, conversão de substrato em célula, de célula em produto e de substrato em produto, conversão, produtividade, eficiência e produção máxima de etanol para a faixa de temperatura estudada

Parâmetros	Temperatura				
	26°C	30°C	34°C	38°C	42°C
$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	0,12	0,14	0,17	0,11	0,087
$Y_{x/s}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	0,10	0,09	0,10	0,05	0,04
$Y_{p/x}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	3,6	4,5	4,4	8,4	10,9
$Y_{p/s}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	0,4	0,4	0,5	0,5	0,4
Conversão (%)	94,0	90,0	96,0	94,0	96,0
Produtividade ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	4,5	4,9	4,9	4,9	4,2
Eficiência (%)	84,4	86,4	90,9	92,8	87,4
$P_{\text{máx}}$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	45,0	45,6	49,3	48,9	42,4

Conforme visto na Tabela 4.1, a máxima velocidade específica de crescimento aumenta de 26 a 34°C, obtendo o seu valor máximo ( $0,17 \text{ h}^{-1}$ ) para a temperatura de 34°C. Para temperaturas superiores, a mesma apresenta um decréscimo, chegando ao valor mais baixo ( $0,087 \text{ h}^{-1}$ ) em 42°C. As conversões de substrato em célula e de célula em produto tem comportamentos distintos, enquanto que o primeiro decresce com o aumento da temperatura, o segundo aumenta. Este comportamento se dá pela ocorrência de morte celular com o aumento da temperatura. Para a conversão de substrato em célula, observa-se que o mesmo se mostrara praticamente inalterado. A partir do teste de ANOVA comprovou-se que a diferença entre esses valores é insignificante logo, a temperatura não influencia nesse parâmetro. Observando a conversão, nota-se que o valor praticamente não se altera para a faixa de temperatura estudada, exceto para a temperatura de 30°C, onde é alcançado o menor valor (90%). Para a produtividade, observa-se que ocorreu pouca variação com a temperatura, sendo os valores máximos obtidos a 30, 34 e 38°C. A eficiência foi o parâmetro que mais se alterou, e através de um teste de variância (ANOVA) comprovou-se que eles são significativamente diferentes com nível de confiança de 95%, sendo os maiores valores obtidos a 34 e 38°C. As concentrações máximas de etanol obtidas foram 49,3 e 48,9  $\text{g.L}^{-1}$ , nas temperaturas de 34 e 38°C, respectivamente. Aplicou-se o teste de ANOVA para os valores de concentração máxima de etanol ( $P_{\text{máx}}$ ) obtidos na faixa de temperatura de 30 a 38°C, sendo esta a faixa que apresentou melhores valores para esse parâmetro. Verificou-se que não houve diferença significativa para os parâmetros estudados. Logo, constata-se que a melhor

faixa de temperatura para se obter melhores valores para os parâmetros da fermentação do suco de caju por *Saccharomyces cerevisiae* para produzir etanol é de 30 a 38°C.

A Figura 4.4 apresenta os resultados para a modelagem matemática, utilizando o modelo de Monod. Pode-se observar que o modelo utilizado, Monod, se adequou bem aos valores experimentais de crescimento celular, consumo de substrato e produção de etanol.

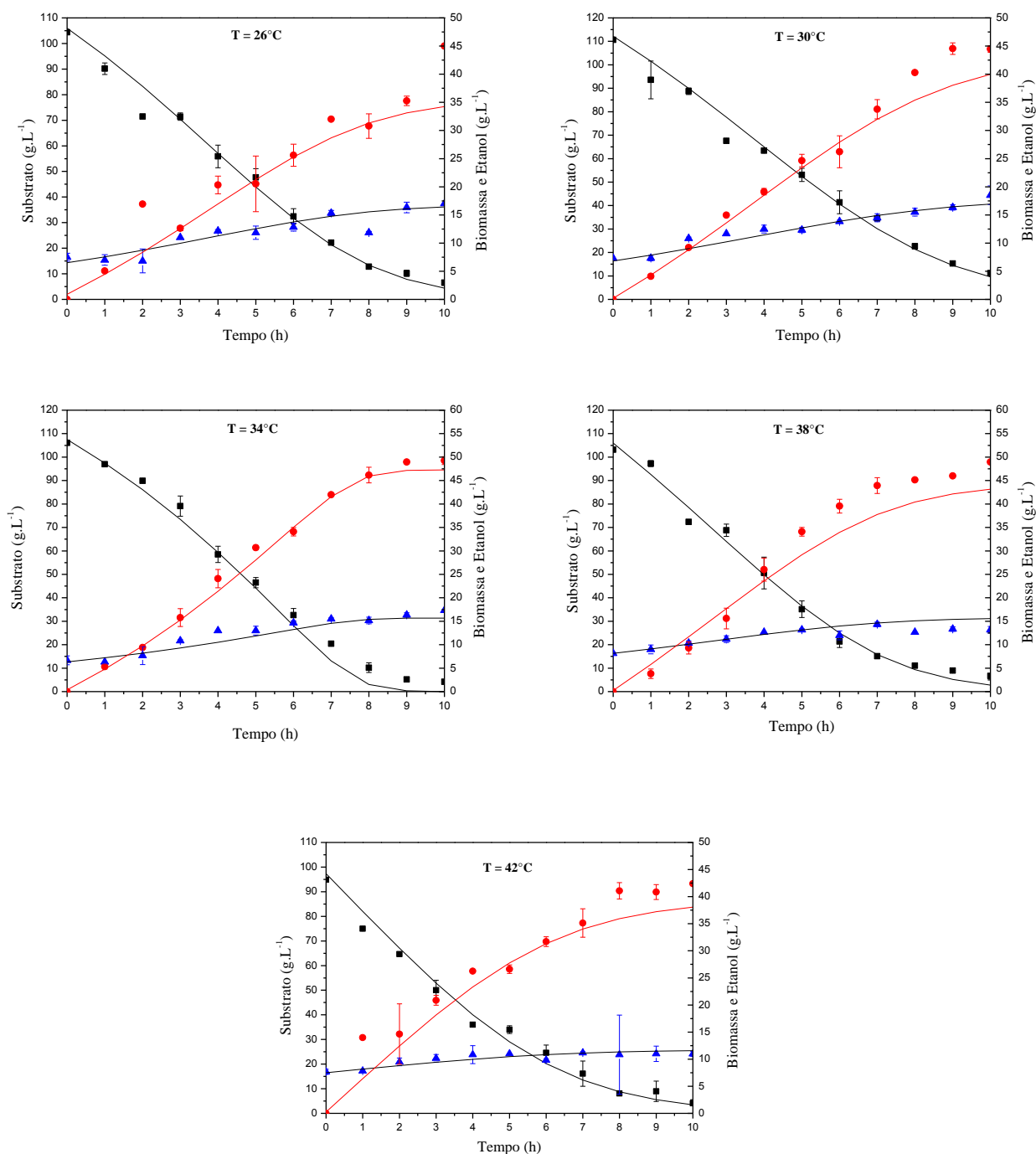


Figura 4.4. Dados experimentais e simulados pela equação de Monod para a fermentação em batelada. Os dados experimentais são: (■) concentração de substrato (glicose + frutose) (g.L<sup>-1</sup>); (●) concentração de etanol (g.L<sup>-1</sup>); (▲) concentração celular (g.L<sup>-1</sup>). Os resultados da simulação foram representados por linhas sólidas.

Na Figura 4.4 observa-se que o modelo de Monod descreveu satisfatoriamente o crescimento celular para todas as temperaturas estudadas. Esse resultado era esperado já que a equação de Monod consegue descrever muito bem o crescimento celular quando temos ausência de fase *lag* na fermentação.

Para caracterização da qualidade do modelo foi utilizado o teste do desvio padrão residual (Residual Standard Deviation – RSD) o qual fornece uma indicação da precisão do modelo utilizado, como sugerido por Cleran *et al* (1991). A Tabela 4.2 mostra os valores de RSD determinados para as temperaturas estudadas.

Tabela 4.2. Desvio padrão residual (RSD) escrito como o percentual da média dos valores experimentais, utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Monod.

Variável de saída	RSD (%)				
	T=26 °C	T=30 °C	T=34 °C	T=38 °C	T=42 °C
X	1,3	1,7	2,2	0,5	0,8
S	3,1	6,6	2,5	6,4	7,0
P	3,6	3,2	1,9	2,8	3,1

Podem-se observar na Tabela 4.2 valores de RSD entre 0,5 e 7,0%. Cleran *et al.* (1991), padronizaram em seu estudo que para a engenharia de bioprocessos, valores de RSD (%) abaixo de 10% podem ser considerados aceitáveis. Logo, o modelo de Monod pode ser utilizado para prever a cinética fermentativa desse trabalho, nas diferentes temperaturas estudadas.

A Figura 4.5 descreve os parâmetros ( $\mu_{\text{máx}}$ ,  $Y_{\text{x/s}}$  e  $Y_{\text{p/x}}$ ) estimados pelo algoritmo de Levenberg-Marquardt para a faixa de temperatura estudada. Pode-se observar na Figura 4.5 que a taxa máxima de crescimento específico ( $\mu_{\text{máx}}$ ) aumenta ligeiramente quando a temperatura é aumentada de 26 a 30°C e sofre uma ligeira diminuição quando a fermentação é conduzida a 34°C. Entretanto, valores maiores de temperatura, 38 e 42°C, promovem uma queda expressiva no valor de  $\mu_{\text{máx}}$ . Um comportamento semelhante é observado para a conversão de substrato em célula ( $Y_{\text{x/s}}$ ) que permanece quase constante quando a temperatura é aumentada de 26 para 30°C, mas diminui quando a fermentação é realizada a 38 e 42°C. A conversão de célula em produto segue um comportamento diferente, aumentando sempre com o aumento da temperatura. A tendência das constantes cinéticas da equação de Monod ( $\mu_{\text{máx}}$ ,  $Y_{\text{x/s}}$  e  $Y_{\text{p/x}}$ ) segue o que foi observado para os parâmetros calculados experimentalmente (Tabela 4.1).

Para descrever a relação entre a temperatura e esses parâmetros, utilizou-se a equação de Arrhenius modificada (Eq. 4.5). Os valores obtidos para as constantes da equação (A, B, C e D) são mostrados na Tabela 4.3 e o ajuste aos parâmetros da equação de Monod são mostrados na Figura 4.5.

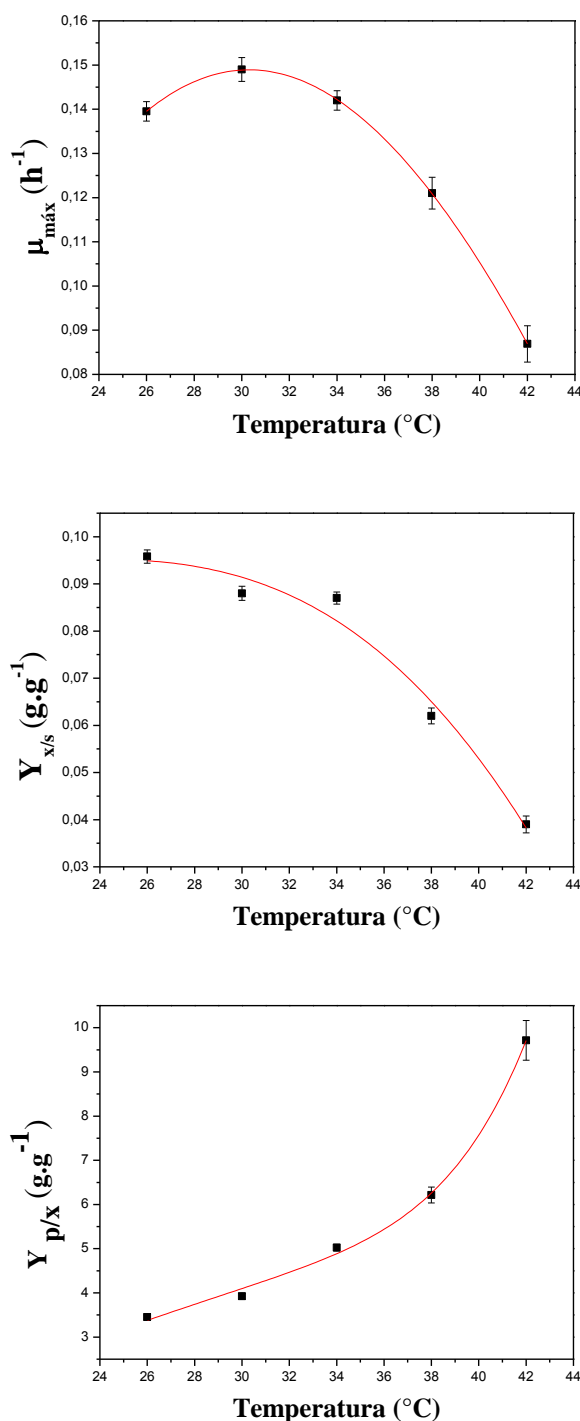


Figura 4.5. Gráficos de Arrhenius ilustrando o efeito da temperatura nos parâmetros de: máxima taxa específica de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), crescimento de célula baseado no consumo de substrato ( $Y_{x/s}$ ), produção de etanol baseada no crescimento celular ( $Y_{p/x}$ ). Os dados obtidos por simulação são apresentados por pontos e a equação de Arrhenius representada pela linha sólida.

Os perfis dos parâmetros cinéticos, mostrados na Figura 4.5, obtidos pela equação de Monod nesse estudo foram semelhantes aos resultados obtidos por Rivera *et al.* (2006). Vale salientar que o autor citado anteriormente também utilizou o modelo de Monod, contudo, levando em conta a presença de inibição pelo substrato, produto e célula. Entretanto, a equação de Arrhenius modificada ajustou-se bem nesse trabalho e no de Riviera *et al.* (2006). A Tabela 4.3 mostra os dados para as constantes da equação de Arrhenius obtidas utilizando o algoritmo de Levenberg-Marquardt.

Tabela 4.3. Valores das constantes para a equação de Arrhenius.

Parâmetros	r <sup>2</sup>	A	B	C	D
$\mu_{\text{máx}}$	0,9999	-5,245	-123,996	1,0774	-45,945
$Y_{x/s}$	0,9175	-14,697	-229,051	0,108	-2,813
$Y_{p/x}$	0,9910	13,860	-36,711	1,9905E6	-551,738

As funções que representam a variação dos parâmetros de  $\mu_{\text{máx}}$ ,  $Y_{x/s}$  e  $Y_{p/x}$  em relação à temperatura são apresentadas pelas equações 4.11 4.12 e 4.13 respectivamente.

$$\mu_{\text{máx}} = -5,245 \times \exp\left(\frac{-123,996}{T}\right) + 1,0774 \times \exp\left(\frac{-45,945}{T}\right) \quad (4.11)$$

$$Y_{x/s} = -14,697 \times \exp\left(\frac{-229,051}{T}\right) + 0,108 \times \exp\left(\frac{-2,813}{T}\right) \quad (4.12)$$

$$Y_{p/x} = 13,86 \times \exp\left(\frac{-36,711}{T}\right) + 1,9905E6 \times \exp\left(\frac{-551,738}{T}\right) \quad (4.13)$$

A Figura 4.6 apresenta gráficos de dispersão onde são plotados os resultados esperados (experimentais) versus os resultados da simulação (Equação de Arrhenius) a fim de ilustrar a qualidade do ajuste aos experimentos. Nota-se que o modelo apresentou um bom desempenho para a máxima velocidade de crescimento específico ( $\mu_{\text{máx}}$ ) e para a conversão de célula em produto ( $Y_{p/x}$ ). A representação da conversão de substrato em célula ( $Y_{x/s}$ ) apresentou alguns desvios, mas também pode ser considerada boa, já que não está fora do valor real quando se considera o erro experimental.

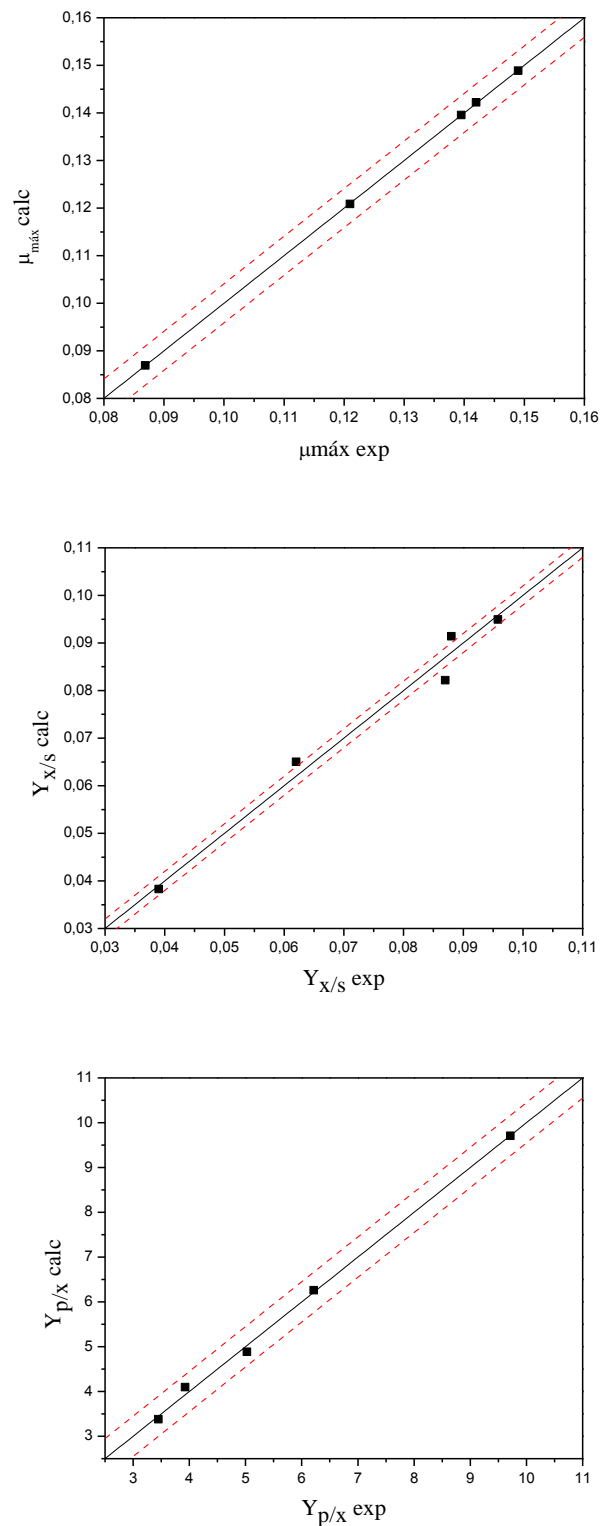


Figura 4.6. Gráficos de dispersão: resultados esperados (experimental) e resultados da simulação (Equação de Arrhenius) para a taxa máxima de crescimento específico. As linhas tracejadas representam o desvio padrão experimental ( $\sigma = 0,05$ ).

#### 4.4. Conclusão

A temperatura exerceu influência na produção de etanol a partir da fermentação do suco de caju por *Saccharomyces cerevisiae*. Melhores resultados foram obtidos quando se conduziu a fermentação na faixa de 30 a 38°C. Como esperado, para as temperaturas de 38 e 42°C, observou-se uma diminuição na concentração celular, contudo, apenas a 42°C, observou-se um decréscimo nos valores dos parâmetros cinéticos. O modelo de Monod, conjuntamente com a equação de Arrhenius, foi capaz de descrever, satisfatoriamente, a cinética fermentativa em função da temperatura de operação.



## 5. SCREENING E SELEÇÃO DE LEVEDURAS PRODUTORAS DE ETANOL A PARTIR DE SUCO DE CAJU

### 5.1. Introdução

Nas últimas duas décadas, várias leveduras foram isolados para estudos do seu comportamento na produção de etanol. Bactérias do gênero *Zymomonas*, são capazes de produzir etanol, contudo, do ponto de vista econômico do processo, as leveduras são mais viáveis (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001). Como exemplo de leveduras capazes de sintetizar etanol por via fermentativa temos a *Kluyveromyces fragiles* e a *Candida sp.* (SHULER; KARGI, 2002), sendo as leveduras do gênero *Saccharomyces* as mais empregadas na produção de etanol (ANDRIETTA; STECKELBERG; ANDRIETTA, 2006). Leveduras do gênero *Saccharomyces* são microrganismos facultativos, ou seja, crescem na presença de oxigênio assim como na ausência, nesse caso, o processo é denominado fermentação. A levedura realiza a fermentação de açúcares com o objetivo de obter energia química para a sua sobrevivência, sendo o etanol apenas um subproduto do processo (LEÃO; AMORIM, 2005).

Os principais microrganismos utilizados na produção de etanol são as leveduras, sendo as do gênero *Saccharomyces* as mais utilizadas. Linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae*, não são capazes de produzir etanol em elevadas concentrações de substrato ou produto, ocorrendo assim o processo de inibição. Cepas de *Kluyveromyces marxianus* utilizam uma ampla gama de substratos e apresentam maiores termotolerância do que a *Saccharomyces cerevisiae*.

Neste contexto, visando aumentar a produção de etanol a partir de suco de caju, avaliaram-se diferentes cepas produtoras de etanol, a saber: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces sp.* e *Kluyveromyces marxianus*. Para tal fim, estudou-se a cinética de consumo de substrato (glicose + frutose), formação de biomassa e produto e calcularam-se alguns parâmetros cinéticos para cada microrganismo estudado.

## 5.2. Material e Métodos

### 5.2.1. Microrganismo

Neste trabalho, avaliaram-se nove cepas de leveduras, três de *Saccharomyces cerevisiae* (CCA008, CCA015 e Fleischmann), três de *Saccharomyces sp.* (1238, GPBIO01 e GPBIO02) e três de *Kluyveromyces marxianus* (ATCC36907, CCA510 e CE025). Mais detalhes das cepas avaliadas são mostrados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Microrganismos utilizados nos ensaios fermentativos.

Gênero	Espécie	Nomenclatura		Origem
		Usual	Adotada	
<i>Saccharomyces</i>	<i>cerevisiae</i>	CCA008	01	Banco de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular – LACAM – UFSCar.
		CCA015	02	Banco de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular – LACAM – UFSCar.
		Fleischmann	03	Isolada de uma levedura comercial (AB BRASIL INDUSTRIAL E COMÉRCIO DE ALIMENTOS LTDA) no Laboratório de Bioengenharia situado no Departamento de Engenharia Química da UFC.
	<i>sp.</i>	1238	04	Doação do Laboratório de Antibióticos da UFPE.
		GPBIO01	05	Isolada do fermentado da Usina Brigadeiro localizada na cidade do Crato – Ceará.
		GPBIO02	06	Isolada do suco de caju no Laboratório de Bioengenharia situado no Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará.
<i>Kluyveromyces</i>	<i>marxianus</i>	ATCC36907	07	Coleção de culturas norte-americana.
		CCA510	08	Banco de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular – LACAM – UFSCar.
		CE025	09	Doação do Laboratório de Microbiologia Ecologia e Biotecnologia (LEMBiotech) do departamento de Biologia da UFC.

### 5.2.2. Preparação do suco de caju

O suco de caju foi obtido a partir da prensagem do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.). Após a obtenção, o suco foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos e o seu pH foi ajustado para 4,5 utilizando HCl 6 N. A esterilização se deu em autoclave a 110°C por 10 minutos.

### 5.2.3. Meios de cultura

Para a manutenção das leveduras estudadas, tanto as do gênero *Saccharomyces* como para as *Kluyveromyces*, utilizou-se o meio complexo YEPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) constituído por: Extrato de levedura 10 g.L<sup>-1</sup>, Peptona 20 g.L<sup>-1</sup>, Glicose 20 g.L<sup>-1</sup> e Ágar Sabouraud 20 g.L<sup>-1</sup>. O pH do meio foi ajustado para 4,5 utilizando HCl 6 N e a esterilização se deu em autoclave (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) a 110°C por 10 minutos. A cultura foi mantida em ambiente refrigerado a 4°C em placas de petri. Para a propagação e obtenção do inóculo preparou-se meio complexo YEPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) constituído por: Extrato de levedura 10 g.L<sup>-1</sup>, Peptona 20 g.L<sup>-1</sup> e Glicose 20 g.L<sup>-1</sup>. O mesmo foi esterilizado em autoclave a 110°C por 10 minutos.

### 5.2.4. Screening e seleção de cepas de levedura

Foram testadas nove cepas de leveduras, descritas anteriormente na Tabela 5.1. As cepas foram avaliadas quanto à capacidade de produzir etanol a partir do suco de caju. A escolha do melhor microrganismo foi feita avaliando a máxima produção de etanol, produtividade, rendimento e conversão encontrada para cada microrganismo. O processo fermentativo ocorreu em biorreator batelada de 1 L (Tec-Bio, Modelo 1,5, Tecnal, SP, Brasil), como mostrado na Figura 4.1 do capítulo 4, utilizando 750 mL de suco de caju. Este biorreator consiste em um vaso de aproximadamente um litro de volume útil, que contém uma base de controle que possibilita controlar algumas variáveis do processo como temperatura,

pH, agitação, aeração, vazão de nutrientes e adição de antiespumantes. A fermentação se deu com agitação de 150 rpm e sem aeração. A concentração inicial de substrato utilizada (glicose + frutose) foi de aproximadamente 102 g.L<sup>-1</sup>, concentração inicial de açúcares presentes no suco de caju *in natura*. A concentração inicial de células foi de 5 g.L<sup>-1</sup> e seu crescimento foi acompanhado pelo método da massa seca. Amostras foram retiradas em intervalos de tempo predefinidos para posterior análise.

#### 5.2.5. Métodos analíticos

##### 5.2.5.1. Concentração celular

A concentração de biomassa foi realizada pela determinação da densidade óptica (D.O) a 600 nm, em espectrofotômetro Spectronic® 20 Genesys. O método baseia-se na medida da turvação do meio em função da quantidade de células em suspensão, possuindo vantagens como rápida execução e utilização de equipamentos relativamente simples (Rocha, 2007). A concentração (g.L<sup>-1</sup>) foi calculada a partir de curva de calibração feita para cada microrganismo separadamente.

##### 5.2.5.2. Concentração de substrato e produto

As concentrações de açúcares (glicose e frutos) e etanol foram medidas através de análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector de índice de refração Waters 2414 e com uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Ácido Sulfúrico, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mmol.L<sup>-1</sup> foi usado como fase móvel (eluente) na vazão de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> a 65°C. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL. As amostras foram identificadas comparando os tempos de retenção com o tempo de retenção das amostras padrão.

## 5.2.6. Cálculo dos Rendimentos e parâmetros cinéticos

Os dados obtidos experimentalmente (concentração de biomassa, substrato e produto) foram utilizados na determinação dos parâmetros cinéticos da fermentação. A produtividade volumétrica de etanol ( $Q_p$ ,  $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) foi calculada como a razão da concentração máxima de etanol obtida ( $P_{\text{máx}}$ ,  $\text{g L}^{-1}$ ) e o tempo de fermentação no qual  $P_{\text{máx}}$  foi alcançado ( $t$ , h).

$$Q_p = \frac{P_{\text{máx}}}{t} \quad (5.1)$$

A conversão do açúcar consumido em etanol ( $Y_{P/S}$ ,  $\text{g g}^{-1}$ ) foi definida como:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f}{(S_0 - S_f)} \quad (5.2)$$

onde  $S_0$  ( $\text{g L}^{-1}$ ) e  $S_f$  ( $\text{g L}^{-1}$ ) são as concentrações de açúcar no início e no final da fermentação, respectivamente.

A conversão de açúcar foi calculada usando a equação 4.8:

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{(S_0 - S_f)}{S_0} \times 100 \quad (5.3)$$

A eficiência da conversão de açúcar em etanol ( $\eta$ , %) foi estimada pela relação:

$$\eta = \frac{Y_{P/S}}{Y_t} \times 100 \quad (5.4)$$

onde  $Y_t$  é o valor teórico de  $Y_{P/S}$  ( $0,511 \text{ g g}^{-1}$ ).

A conversão de substrato consumido em biomassa ( $Y_{X/S}$ ,  $\text{g g}^{-1}$ ), foi definida como:

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (5.5)$$

### 5.3. Resultados e Discussão

Neste estudo, nove cepas de leveduras obtidas junto a bancos de cultura ou isoladas a partir de destilarias brasileiras foram avaliadas quanto à capacidade de utilizar o suco de caju como substrato para a produção de etanol. Inicialmente avaliou-se a produção máxima de etanol para cada microrganismo. O resultado pode ser observado na Figura 5.1. Entre as *Saccharomyces*, as cepas 01, 03, 04 e 06 foram as que apresentaram maior concentração de etanol 55,73; 51,93; 50,59 e 51,51 g.L<sup>-1</sup> respectivamente.

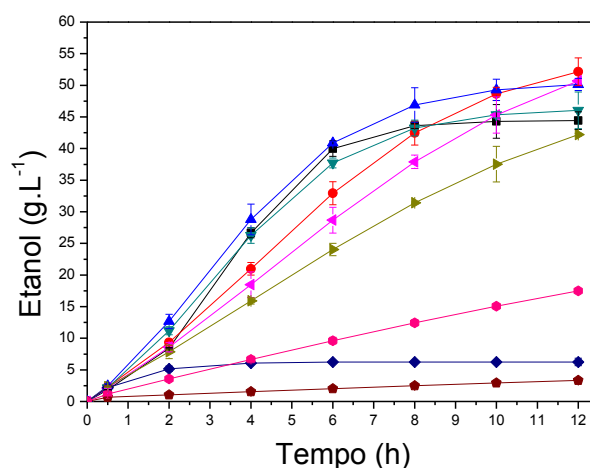


Figura 5.1. Perfil de produção de etanol por *Saccharomyces* e *Kluyveromyces* a 30°C e 150 rpm cultivadas em suco de caju. *Saccharomyces*: (●) 01; (▼) 02; (◄) 03, (▲) 04, (■) 05; (►) 06. *Kluyveromyces*: (◆) 07; (■) 08; (●) 09.

As concentrações máximas de etanol obtidas foram 6,25 e 5,52 g.L<sup>-1</sup>, para as leveduras do gênero *Kluyveromyces* 07 e 08, respectivamente. A cepa 09 que também é uma *Kluyveromyces* apresentou a maior produção máxima de etanol 27,67 g.L<sup>-1</sup> obtida para as cepas desse gênero. Contudo, a mesma apresenta desempenho bastante inferior na produção máxima de etanol quando comparada às *Saccharomyces*. Logo, as leveduras do gênero *Kluyveromyces marxianus* foram descartadas do *Screening*.

A Figura 5.2 mostra o crescimento celular para as cepas de *Saccharomyces*. Observa-se que o microrganismo 01 não apresentou um bom crescimento celular, contudo, a mesma apresentou a maior produção de etanol, obtendo assim a melhor conversão de célula em produto dentre as cepas estudadas. A cepa que apresentou maior crescimento celular foi a 05, contudo, a produção de etanol foi a segunda menor entre as *Saccharomyces*.

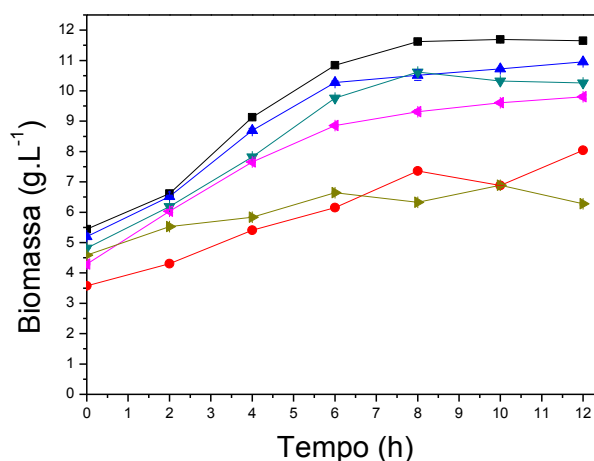


Figura 5.2. Perfil do crescimento celular das cepas de *Saccharomyces* a 30°C e 150 rpm cultivadas em suco de caju. (●) 01; (▼) 02; (◄) 03, (▲) 04, (■) 05; (►) 06.

Em seguida calculou-se a produção máxima de célula e produto, conversão de célula em produto, conversão de substrato em célula, conversão de substrato em produto, Conversão, eficiência e produtividade para as cepas de *Saccharomyces*, já que as mesmas apresentaram melhores resultados na produção de etanol. Os parâmetros cinéticos calculados são mostrados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Parâmetros cinéticos para a fermentação alcoólica do suco de caju utilizando cepas de *Saccharomyces* em reator batelada a 30°C e 150 rpm de agitação.

Parâmetros	Levedura					
	01	02	03	04	05	06
$X_{\text{máx}}$ (g.L <sup>-1</sup> )	6,54	10,48	9,76	10,84	11,71	7,70
$P_{\text{máx}}$ (g.L <sup>-1</sup> )	55,73	46,38	51,93	50,59	44,44	51,51
$Y_{P/X}$ (g.g <sup>-1</sup> )	20,02	8,34	9,51	8,54	7,08	17,25
$Y_{X/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )	0,026	0,056	0,054	0,055	0,063	0,029
$Y_{P/S}$ (g.g <sup>-1</sup> )	0,49	0,45	0,48	0,46	0,43	0,38
Conversão (%)	99,3	97,7	100,0	98,0	96,3	93,6
Eficiência (%)	95,00	88,22	94,40	89,84	84,08	75,04
Produtividade (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	4,35	3,84	4,05	4,18	3,70	3,52

Ressalta-se que a produção de etanol pela levedura 03, uma levedura comercial, já foi bastante estudada pelo grupo (PINHEIRO *et al.*, 2008; PACHECO, 2010) e, portanto, ela

foi utilizada com a finalidade de servir de referência para as cepas selvagens utilizadas nesse estudo.

Observa-se, na Tabela 5.2, que a cepa que apresenta maior produção máxima de etanol (55,73 g.L<sup>-1</sup>), maior conversão de célula em produto (20,02 g.g<sup>-1</sup>), menor conversão de substrato em célula (0,026 g.g<sup>-1</sup>), maior conversão de substrato em produto (0,49 g.g<sup>-1</sup>), maior eficiência (95%) e produtividade (4,35) foi a 01. Esta é uma levedura floculante portadora do gene *FLO5α*.

Leveduras floculantes crescem de forma consolidada formando flocos ou aglomerados de tamanho variável apresentando assim como vantagem, sobre os microrganismos tradicionalmente utilizados nos processos de fermentação em destilarias industriais, a não exigência da centrifugação do mosto fermentado após a fermentação. Após transformar os açúcares em álcool, as leveduras se agregam em forma de flocos e concentram-se no fundo do reator. Dessa forma, o combustível pode ser extraído sem a necessidade da centrifugação (PARAZZI, 2007; XU; ZHAO; BAI; 2005).

A cepa 06 também apresentou resultados superiores quando comparada com os outros microrganismos, alcançando praticamente o mesmo valor (51,51 g.L<sup>-1</sup>) da produção máxima de etanol apresentada pela 03 (51,93 g.L<sup>-1</sup>), cepa utilizada como padrão. Quanto à conversão de célula em produto, a mesma apresentou valor superior (17,25 g.g<sup>-1</sup>) ao apresentado pela 03 (9,51 g.g<sup>-1</sup>) e próximo ao encontrado pela 01 (20,02 g.g<sup>-1</sup>). Para a conversão de substrato em célula, quanto menor o valor obtido, menor a quantidade de substrato que estará sendo utilizada para a manutenção da célula e maior a quantidade de açúcares disponíveis para a produção de etanol. A cepa 06 apresentou valor (0,029 g.g<sup>-1</sup>) próximo ao encontrado para a 01 (0,026 g.g<sup>-1</sup>), sendo ambos os valores bastante inferiores aos apresentados para as outras cepas. Além dos bons resultados apresentados, a utilização da cepa 06 torna-se interessante, pois a mesma foi isolada do próprio suco de caju fermentado naturalmente.

Para o presente trabalho, optou-se em continuar os experimentos utilizando o microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* 01, já que o mesmo apresentou parâmetros com valores superiores aos apresentados pelos outros microrganismos. Estudos posteriores visam um estudo mais detalhado da cinética fermentativa da *Saccharomyces sp.* 06.



## 5.4. Conclusão

Dentre os microrganismos estudados, observou-se que as cepas de *Saccharomyces* foram bastante superiores quando comparadas às *Kluyveromyces* quanto à produção máxima de etanol. Quanto às cepas de *Saccharomyces*, a que apresentou maior produção máxima de etanol, maior conversão de célula em produto, menor conversão de substrato em célula, maior conversão, eficiência e produtividade foi a levedura 01. A cepa de *Saccharomyces* 06 também apresentou bons resultados para os parâmetros calculados. Além de apresentar bons resultados, a utilização dessa cepa torna-se interessante, pois a mesma foi isolada do próprio suco de caju fermentado naturalmente.

## 6. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE ETANOL POR *Saccharomyces cerevisiae* (CCA008) A PARTIR DE SUCO DE CAJU: INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE AÇÚCARES

### 6.1. Introdução

Vários são os estudos sobre a influência da concentração inicial de substrato encontrados na literatura. Segundo Pinheiro *et al.* (2008), para a fermentação do suco de caju, o máximo rendimento de etanol e a máxima produtividade são obtidos quando utiliza-se 90 g.L<sup>-1</sup> de substrato inicial. Em seu estudo, Thatipamala *et al.* (1992) observaram que o efeito inibidor provocado pelo substrato na fermentação alcoólica ocorre quando a concentração supera 150 g.L<sup>-1</sup>.

O crescimento celular exibe uma cinética tipo saturação quando a concentração do substrato aumenta, conforme modelo de Monod. Em muitas situações, quando a concentração de açúcar aumenta, extrapola essa região de saturação, passando então a ocorrer inibição pelo substrato. Da mesma forma, quando a concentração de produto atinge altos valores, é muito comum a existência da inibição pelos produtos. A inibição pelo substrato desativa importantes enzimas, além de modificar o caminho metabólico que é vital para a sobrevivência da levedura.

Para descrever a cinética fermentativa, vários modelos podem ser encontrados na literatura (Ghose e Thyagi citado por VASCONCELOS *et al.* em 1992; Andrews e Noack, Webb, Yano *et al.*, Wayman e Tseng, Bazua e Wilke citados em HAN e LEVENSPIEL, 1988; Sevely *et al.*, 1980 e Jin *et al.*, 1981 por DOURADO *et al.*, 1987). O mais conhecido é o modelo de Monod que considera apenas o efeito de substrato limitante. Andrews propôs um modelo que além de representar o efeito do substrato limitante, também descreve a ocorrência de inibição pelo substrato. Inibições pelo produto podem ser representadas pelo Modelo de Levenspiel. Ghose e Thyagi propuseram um modelo que descrevesse em uma única equação tanto a inibição causada por concentrações elevadas de substrato como a por concentrações elevadas de produto. Tosetto acrescentou um expoente ao termo de inibição pelo produto da equação proposta por Ghose e Thyagi, onde os valores deste parâmetro assumem valores diferentes de 1.

A presença de inibição seja ela pelo produto, célula ou substrato, tem uma influência muito forte na velocidade específica de crescimento celular. As equações cinéticas que descrevem a velocidade específica de crescimento celular que foram estudadas no presente trabalho são mostradas na Tabela 6.1 já aplicadas ao balanço de massa do fermentador.

Desta forma, neste capítulo avaliou-se o efeito da concentração inicial de açúcares, presentes no suco de caju, na cinética de produção de etanol. Para tanto, foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* CCA008. Para representar a cinética fermentativa, foram utilizados vários modelos encontrados na literatura, entre eles, modelo que considera apenas a presença de substrato limitante e outros que levam em conta também a presença de algum tipo de inibição. Testes estatísticos foram aplicados aos modelos com o intuito de avaliar a consistência dos mesmos.

## **6.2. Material e Métodos**

### **6.2.1. Microrganismo**

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CCA008) utilizada nos ensaios fermentativos foi obtida a partir do Banco de culturas do Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular – LACAM –UFSCar.

### **6.2.2. Preparação do suco de caju**

O suco de caju foi obtido a partir da prensagem do pedúnculo de caju (*Anacardium occidentale* L.). Após a obtenção, o suco foi centrifugado a 6000 rpm por 10 minutos e o seu pH foi ajustado para 4,5 utilizando HCl 6 N. A esterilização se deu em autoclave a 110°C por 10 minutos.

Tabela 6.1. Modelos cinéticos estudados no presente trabalho para descrever a produção de etanol a partir do suco de caju.

Nº	$\frac{dX}{dt}$	$\frac{dS}{dt}$	$\frac{dP}{dt}$	Modelo
6.1	$\left(\frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S}\right) \times X$	$-\left(\frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S}\right) \times \frac{X}{Y_{X/S}}$	$\left(\frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S}\right) \times X \times Y_{P/X}$	Monod
6.2	$\left(\frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}\right) \times X$	$-\left(\frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}\right) \times \frac{X}{Y_{X/S}}$	$\left(\frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}\right) \times X \times Y_{P/X}$	Andrews
6.3	$\left(\frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S}\right) \times \left(1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}}\right)^n \times X$	$-\left(\frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S}\right) \times \left(1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}}\right)^n \times \frac{X}{Y_{X/S}}$	$\left(\frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S}\right) \times \left(1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}}\right)^n \times X \times Y_{P/X}$	Levenspiel
6.4	$\left(\frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}\right) \times \left(1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}}\right) \times X$	$-\left(\frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}\right) \times \left(1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}}\right) \times \frac{X}{Y_{X/S}}$	$\left(\frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}\right) \times \left(1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}}\right) \times X \times Y_{P/X}$	Ghose e Thyagi
6.5	$\left(\frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}\right) \times \left(1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}}\right)^n \times X$	$-\left(\frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}\right) \times \left(1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}}\right)^n \times \frac{X}{Y_{X/S}}$	$\left(\frac{\mu_{\text{máx}} \times S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}}\right) \times \left(1 - \frac{P}{P_{\text{máx}}}\right)^n \times X \times Y_{P/X}$	Tosetto

### 6.2.3. Meios de cultura

Para a manutenção das leveduras utilizou-se o meio complexo YEPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) constituído por: Extrato de levedura 10 g.L<sup>-1</sup>, Peptona 20 g.L<sup>-1</sup>, Glicose 20 g.L<sup>-1</sup> e Ágar Sabouraud 20 g.L<sup>-1</sup>. O pH do meio foi ajustado para 4,5 utilizando HCl 6 N e a esterilização se deu em autoclave (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) a 110°C por 10 minutos. A cultura foi mantida em ambiente refrigerado a 4°C em placas de petri. Para a propagação e obtenção do inóculo preparou-se meio complexo YEPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose) constituído por: Extrato de levedura 10 g.L<sup>-1</sup>, Peptona 20 g.L<sup>-1</sup> e Glicose 20 g.L<sup>-1</sup>, sendo o mesmo esterilizado em autoclave a 110°C por 10 minutos.

### 6.2.4. Avaliação da concentração inicial de açúcares redutores totais (ART)

Nesta seção, avaliou-se a influência da concentração inicial de substrato (glicose e frutose) na fermentação alcoólica do suco de caju. Diferentes concentrações iniciais de açúcares redutores totais foram avaliadas, 70, 90, 110, 130 e 170 g.L<sup>-1</sup>. Essas concentrações foram obtidas por diluição ou concentração (utilizando rotaevaporador) do suco de caju, que tem uma concentração natural de cerca de 100 g.L<sup>-1</sup> de açúcares (glicose + frutose). Foram calculados os parâmetros de rendimento, produtividade e eficiência para todas as concentrações a fim de se encontrar a melhor concentração a ser utilizada. O microrganismo utilizado para a conversão de açúcares em etanol foi a *Saccharomyces cerevisiae* (CCA 008), sendo a concentração inicial do mesmo igual a 5 g.L<sup>-1</sup>. O processo fermentativo foi conduzido em biorreator batelada de 1 L (Tec-Bio, Modelo 1,5, Tecnal, SP, Brasil), conforme mostrado na Figura 4.1 do capítulo 4, utilizando 750 mL de suco de caju. Este biorreator consiste em um vaso de aproximadamente um litro de volume útil, que contém uma base de controle que possibilita controlar algumas variáveis do processo como temperatura, pH, agitação, aeração, vazão de nutrientes e adição de antiespumantes. A fermentação se deu com agitação de 150 rpm e sem aeração. Amostras foram retiradas em intervalos de tempo predefinidos para posterior análise.

## 6.2.5. Métodos analíticos

### 6.2.5.1. Concentração celular

A concentração de biomassa foi realizada pela determinação da densidade óptica (D.O) a 600 nm, em espectrofotômetro Spectronic® 20 Genesys. O método baseia-se na medida da turvação do meio em função da quantidade de células em suspensão, possuindo vantagens como rápida execução e utilização de equipamentos relativamente simples (Rocha, 2007).

### 6.2.5.2. Concentração de substrato e produto

As concentrações de açúcares (glicose e frutose) e etanol foram medidas através de análise em cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE (Waters, Milford, MA, EUA) equipado com um detector de índice de refração Waters 2414 e com uma coluna Aminex HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). Ácido Sulfúrico,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 mmol.L<sup>-1</sup> foi usado como fase móvel (eluente) na vazão de 0,5 mL.min<sup>-1</sup> a 65°C. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL. As amostras foram identificadas comparando os tempos de retenção com o tempo de retenção das amostras padrão.

### 6.2.6. Cálculo dos Rendimentos e parâmetros cinéticos

Os dados obtidos experimentalmente (concentração de biomassa, substrato e produto) foram utilizados na determinação dos parâmetros cinéticos da fermentação. A produtividade volumétrica de etanol ( $Q_p$ , g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) foi calculada como a razão da concentração máxima de etanol obtida ( $P_{máx}$ , g.L<sup>-1</sup>) e o tempo de fermentação no qual  $P_{máx}$  foi alcançado ( $t$ , h).

$$Q_P = \frac{P_{m\acute{a}x}}{t} \quad (6.6)$$

A conversão do açúcar consumido em etanol ( $Y_{P/S}$ , g g<sup>-1</sup>) foi definida como:

$$Y_{P/S} = \frac{P_f}{(S_0 - S_f)} \quad (6.7)$$

onde  $S_0$  (g L<sup>-1</sup>) e  $S_f$  (g L<sup>-1</sup>) são as concentrações de açúcar no início e no final da fermentação, respectivamente.

A conversão de açúcar foi calculada usando a equação 4.8:

$$Convers\tilde{a}o\ (\%) = \frac{(S_0 - S_f)}{S_0} \times 100 \quad (6.8)$$

A eficiência da conversão de açúcar em etanol ( $\eta$ , %) foi estimada pela relação:

$$\eta = \frac{Y_{P/S}}{Y_t} \times 100 \quad (6.9)$$

onde  $Y_t$  é o valor teórico de  $Y_{P/S}$  (0,511 g g<sup>-1</sup>).

A conversão de substrato consumido em biomassa ( $Y_{X/S}$ , g g<sup>-1</sup>), foi definida como:

$$Y_{X/S} = \frac{(X_f - X_0)}{(S_0 - S_f)} \quad (6.10)$$

#### 6.2.7. Modelagem matemática

No intuito de analisar qual o modelo que melhor descreve a influência da concentração inicial de substrato na produção de etanol, avaliaram-se modelos propostos por vários autores, dentre eles, modelos que descrevem o processo fermentativo sem nenhum tipo de inibição e outros que consideram a presença de inibição, seja ela pela concentração de

substrato como pela concentração de produto ou célula, ver Tabela 6.1. Os parâmetros cinéticos foram estimados pelo método não-linear de mínimos quadrados de Marquardt a partir de uma rotina de ajuste desenvolvida em FORTRAN versão 6.1. Para resolver o sistema de equações diferenciais utilizou-se o método de Runge-Kutta-Gill de 4ª ordem. Os gráficos foram gerados a partir do software Origin Pro 8.

Inicialmente avaliou-se a capacidade dos modelos se ajustarem aos dados experimentais, através de análise gráfica, e a consistência física dos parâmetros obtidos. Os modelos que apresentaram bons resultados foram avaliados pelo teste do desvio padrão residual – RSD (%) e pelo teste do  $X^2$  de Bartlett.

Para a avaliação da qualidade de predição dos modelos, inicialmente utilizou-se o teste do desvio padrão residual (Residual Standard Deviation – RSD) sugerido por Cleran *et al.* (1991), dado pela Equação 6.11.

$$RSD = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{pi})^2}}{n} \quad (6.11)$$

Os valores de RSD são mais comumente encontrados na literatura como uma porcentagem da média dos valores experimentais ( $\bar{y}$ ), Equação 6.12. Para engenharia de bioprocessos, valores de RSD (%) abaixo de 10% podem ser considerados aceitáveis (Cleran *et al.*, 1991).

$$RSD(\%) = \frac{RSD}{\bar{y}} \times 100 \quad (6.12)$$

Caso mais de um modelo apresente bons valores para o teste de RSD (%) descrito anteriormente, o teste do  $X^2$  de Bartlett pode ser utilizado para indicar se algum desses modelos não apresenta um ajuste tão satisfatório quanto o apresentado pelos demais, a partir de um teste de homogeneidade dos erros experimentais estimados para cada modelo. O mesmo avalia se o valor da variância de cada modelo é estaticamente diferente dos outros. O resultado é obtido utilizando o teste do  $X^2$ , calculando o  $X_{calc}^2$  pela fórmula de Bartlett (Equação 6.13):



$$X_{calc}^2 = \frac{\ln(S^2) \times \sum_{i=1}^m (d.f.)_i - \sum_{i=1}^m (d.f.)_i \times \ln(S_i^2)}{1 + \frac{1}{3(m-1)} \left[ \sum_{i=1}^m \frac{1}{(d.f.)_i} - \frac{1}{\sum_{i=1}^m (d.f.)_i} \right]} \quad (6.13)$$

onde

$$S_i^2 = \sum_{k=1}^n \frac{(y^{(k)} - y_i^{(k)})^2}{n - p_i} \quad (6.14)$$

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^m (d.f.)_i \times S_i^2}{\sum_{i=1}^m (d.f.)_i} \quad (6.15)$$

Caso  $X_{calc}^2 > X_{tab}^2 (\alpha, m-1)$ , o modelo que apresenta o maior valor de  $S_i^2$  será descartado. O valor de  $X_{tab}^2 (\alpha, m-1)$  é obtido a partir de tabelas estatísticas, onde  $\alpha$  é o nível de significância utilizado (geralmente 5%).

### 6.3. Resultados e Discussão

A Tabela 6.2 mostra o efeito da concentração inicial de açúcar (glicose + frutose) na conversão, na eficiência, produtividade, concentração máxima de etanol ( $P_{máx}$ ), máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{máx}$ ), conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ), conversão de célula em produto ( $Y_{P/X}$ ) e substrato em célula ( $Y_{X/S}$ ). A maior conversão (97%), a maior eficiência (92,02%) e a maior conversão de substrato em produto (0,48 g/g) foram obtidas quando 90 g.L<sup>-1</sup> de substrato foram utilizadas. Já a maior produtividade (5,76 g/L.h) foi obtida em meio contendo 130 g.L<sup>-1</sup> de concentração inicial de açúcar. A faixa de concentração de 90 a 130 g.L<sup>-1</sup>, apresentaram valores superiores às demais concentrações estudadas para os parâmetros de rendimento, eficiência e produtividade. Contudo, não é possível determinar qual dentre as duas é a melhor a ser utilizada sem um estudo econômico do processo. Deste ponto de vista, a concentração de 90 g.L<sup>-1</sup> apresenta a vantagem de não ter custo adicional com a operação unitária de concentração do suco, que *in natura* tem concentração de açúcares redutores totais de aproximadamente 100 g.L<sup>-1</sup>. Já a concentração

de 130 g.L<sup>-1</sup> torna-se mais viável devido à sua produtividade, tornando menor o custo com a destilação. Logo, a partir dos dados obtidos no presente estudo, pode-se afirmar que a faixa de concentração que apresenta melhores resultados é a de 90 a 130 g.L<sup>-1</sup> de substrato inicial.

Tabela 6.2. Parâmetros obtidos para as diferentes concentrações iniciais de substrato presente no suco de caju (70, 90, 110, 130 e 170 g.L<sup>-1</sup>).

Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	Conversão (%)	Eficiência (%)	Produtividade (g/L.h)	P <sub>máx</sub> (g/L)	μ <sub>máx</sub> (h <sup>-1</sup> )	Y p/s (g/g)	Y p/x (g/g)	Y x/s (g/g)
70	94,7	84,34	2,60	31,20	0,10	0,46	16,77	0,03
90	97,0	92,02	3,68	44,13	0,087	0,48	11,65	0,03
110	94,9	85,90	4,22	50,70	0,074	0,46	21,17	0,02
130	94,7	85,37	5,76	57,58	0,064	0,45	19,27	0,02
170	85,6	73,22	5,26	63,08	0,059	0,44	13,75	0,03

Em estudo feito anteriormente pelo grupo, Pinheiro (2008) estudou o efeito da concentração inicial de ART no suco de caju. As condições utilizadas no estudo foram bastante similares à utilizada no presente trabalho, sendo que o processo fermentativo utilizado por Pinheiro (2008) ocorreu em frascos de Erlenmeyers. As concentrações iniciais de substrato variam entre 20 e 100 g.L<sup>-1</sup>. O autor mostra que a concentração que apresentou melhor eficiência, máximo crescimento celular específico, maior conversão de substrato em produto e menor conversão de substrato em célula foi a de 90 g.L<sup>-1</sup>.

No intuito de analisar qual o modelo que melhor descreve a influência da variação na concentração inicial de substrato, avaliaram-se modelos propostos por vários autores apresentados na Tabela 6.1. O primeiro modelo avaliado foi o de Monod (Equação 6.1), modelo este que descreve a concentração de substrato limitante presente no meio fermentativo. Os resultados para a modelagem são apresentados na Figura 6.2.

Pela figura 6.1 observa-se que o modelo de Monod não se adequou bem aos dados experimentais para altas concentrações, 130 e 170 g.L<sup>-1</sup>. Os resultados da modelagem podem ser atribuídos ao fato de que o modelo de Monod somente se aplica para casos em que não há presença de inibidores de crescimento no meio de cultura. Contudo, observa-se que o modelo conseguiu representar satisfatoriamente o crescimento celular em todas as concentrações estudadas. Esse resultado pode ser atribuído ao fato de o modelo de Monod conseguir representar bem a cinética de crescimento celular quando não existe fase *lag* no início do processo.

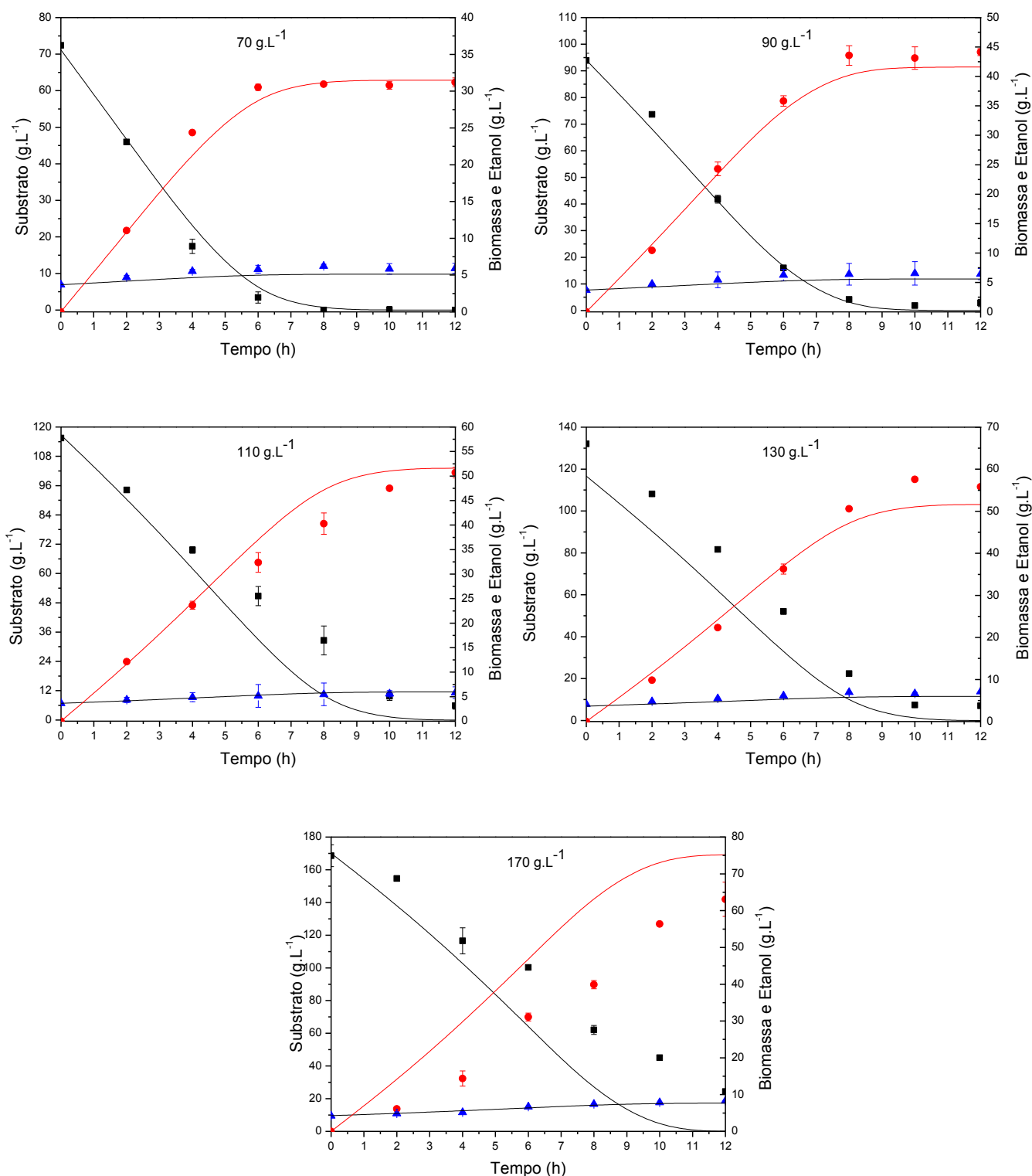


Figura 6.1. Dados experimentais e simulados da fermentação do suco de caju utilizando *S. cerevisiae* a 30°C e 150 rpm: (▲) Biomassa (Massa seca - g.L<sup>-1</sup>); (■) Concentração de açúcares redutores totais (g.L<sup>-1</sup>); (●) Concentração de etanol (g.L<sup>-1</sup>); (—) Modelo de Monod para as fermentações conduzidas com concentração inicial de açúcares (glicose + frutose) a 70, 90, 110, 130 e 170 g.L<sup>-1</sup>.

Os parâmetros obtidos para o modelo de Monod estão apresentados na Tabela 6.3. Observa-se que os valores de velocidade específica de crescimento celular, constante de saturação, conversão de substrato em célula e de célula em produto apresentam bons intervalos de confiança. Os valores estão de acordo com os encontrados na literatura (PINHEIRO *et al.*, 2008; BORGES, 2008). Quando comparado aos valores teóricos (Tabela 6.2), os valores apresentados na Tabela 6.3 são bastante próximos aos encontrados para a concentração de 110 g.L<sup>-1</sup>. Recorrendo à Figura 6.2, nota-se que o ajuste do modelo aos dados experimentais mostra-se aceitável até a concentração de 110 g.L<sup>-1</sup>. Estas observações levam a supor que até 110 g.L<sup>-1</sup> de substrato inicial, a fermentação não sofra influência de nenhum tipo de inibição.

Tabela 6.3. Valores dos parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Monod.

Parâmetros	Valor
$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	0,0728 ± 0,001
$K_s$ (g.L <sup>-1</sup> )	10,084 ± 0,2
$Y_{x/s}$ (g.g <sup>-1</sup> )	0,0200 ± 0,0003
$Y_{p/x}$ (g.g <sup>-1</sup> )	22,125 ± 0,4

Dos resultados obtidos para a equação de Monod, estima-se que o sistema apresente algum tipo de inibição, já que uma das limitações do modelo de Monod é justamente descrever esse tipo de processo.

Para avaliar se a inibição está sendo causada pelo substrato, utilizou-se a equação de Andrews (Equação 6.2) que além de considerar o efeito do substrato limitante, também descrevesse a ocorrência de inibição pelo substrato. Os resultados são mostrados na Figura 6.2. Observa-se que o modelo ajustou-se bem aos perfis de consumo de substrato e produção de etanol para quase todas as concentrações estudadas, ficando um pouco distante dos pontos experimentais apenas para a concentração de 170 g.L<sup>-1</sup> de substrato inicial. Observa-se que o modelo não conseguiu representar os perfis de crescimento celular para nenhuma concentração. Os parâmetros cinéticos do modelo de Andrews estão apresentados na Tabela 6.4. Observa-se que o valor obtido para o parâmetro de inibição pelo substrato do modelo de Andrews é significativo, o que leva a confirmar a presença de inibição pelo substrato.

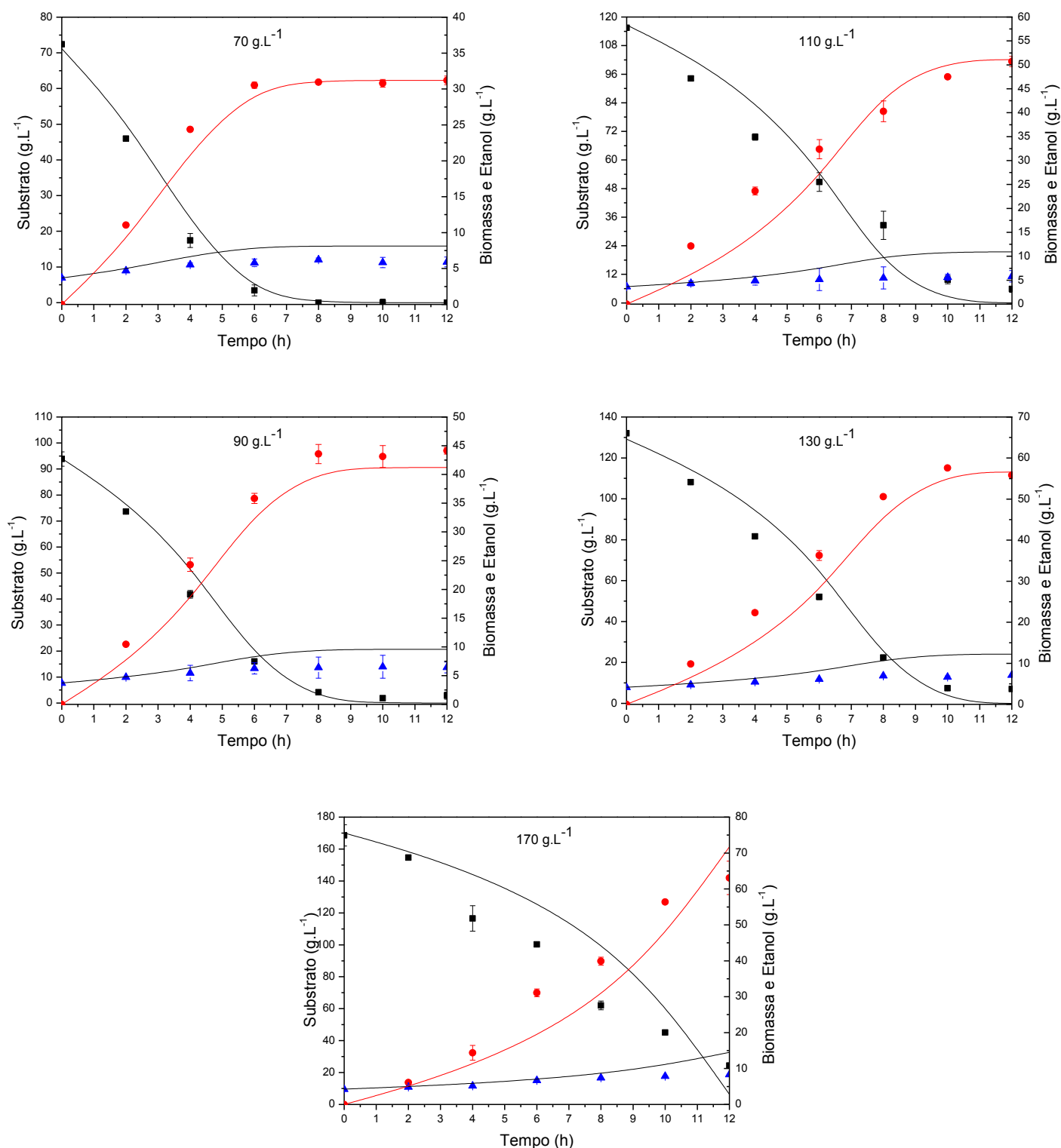


Figura 6.2. Dados experimentais e simulados da fermentação do suco de caju utilizando *S. cerevisiae* a 30°C e 150 rpm: (▲) Biomassa (Massa seca - g.L<sup>-1</sup>); (■) Concentração de açúcares redutores totais (g.L<sup>-1</sup>); (●) Concentração de etanol (g.L<sup>-1</sup>); (—) Modelo de Andrews para as fermentações conduzidas com concentração inicial de açúcares (glicose + frutose) a 70, 90, 110, 130 e 170 g.L<sup>-1</sup>.

Tabela 6.4. Valores dos parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Andrews.

Parâmetros	Valor
$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$0,828 \pm 0,04$
$K_s$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$74,014 \pm 5,5$
$K_i$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$17,417 \pm 1,0$
$Y_{x/s}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$0,0624 \pm 0,0005$
$Y_{p/x}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$7,014 \pm 0,1$

Analisando a Tabela 6.4, nota-se que o valor obtido para o parâmetro de  $K_s$  é maior que o de  $K_i$ . Resultados similares foram encontrados por Borges (2008). Por definição, o valor de  $K_s$  corresponde à concentração de substrato limitante quando a velocidade de crescimento específica é igual à metade do seu valor e o parâmetro de  $K_i$  corresponde à concentração de substrato em que se inicia a inibição pelo mesmo (Borges, 2008). Neste caso, não faz sentido que o valor de  $K_i$  seja menor que  $K_s$ . Logo, estes parâmetros não tem significado físico, consequentemente, o modelo não é capaz de representar a cinética fermentativa do processo.

Segundo Thatipamala *et al.* (1992), o efeito inibidor provocado pelo substrato na fermentação alcoólica ocorre quando a concentração supera  $150 \text{ g.L}^{-1}$ . Neste trabalho, pode-se supor que a falta de ajuste do modelo para a concentração de  $170 \text{ g.L}^{-1}$  foi consequência da inibição causada pelo substrato, além de algum outro tipo de inibição. A hipótese de inibição pela concentração celular pode ser descartada já que a concentração inicial de inóculo utilizada é baixa. Pela Figura 6.1 observa-se que a concentração célula não aumenta muito durante a fermentação, o que também não viria a causar inibição pela célula.

Para avaliar a presença de inibição pelo produto, utilizou-se a equação proposta por Levenspiel. Em seu estudo, Levenspiel (1980) revisou e generalizou uma equação matemática para descrever o crescimento celular contendo um termo de inibição pelo produto, além de levar em consideração o efeito do substrato limitante ( $K_s$ ), apresentado pela equação de Monod.

A Figura 6.3 apresenta o ajuste do modelo de Levenspiel aos dados experimentais obtidos para a gama de concentração estudada. De todos os modelos testados até o presente momento, o de Levenspiel foi o que representou mais fielmente os dados experimentais, a partir de análise gráfica. Pode-se afirmar então que a concentração de etanol presente durante a fermentação está afetando a velocidade específica de crescimento celular.

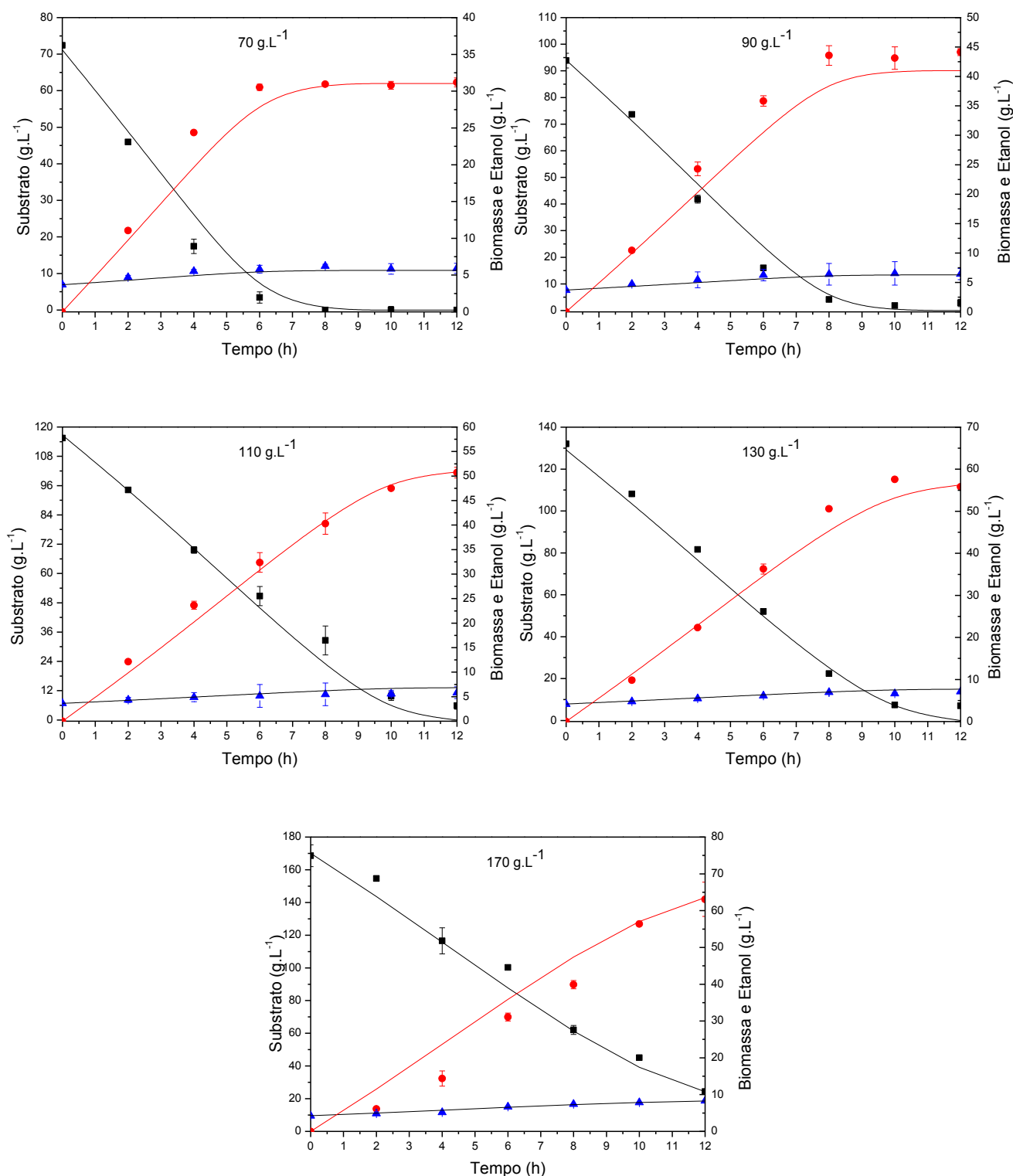


Figura 6.3. Dados experimentais e simulados da fermentação do suco de caju utilizando *S. cerevisiae* a 30°C e 150 rpm: (▲) Biomassa (Massa seca - g.L<sup>-1</sup>); (■) Concentração de açúcares redutores totais (g.L<sup>-1</sup>); (●) Concentração de etanol (g.L<sup>-1</sup>); (—) Modelo de Levenspiel para as fermentações conduzidas com concentração inicial de açúcares (glicose + frutose) a 70, 90, 110, 130 e 170 g.L<sup>-1</sup>.

Para se obter uma noção da dimensão da inibição causada pelo produto durante o processo fermentativo, se faz necessária a estimativa dos parâmetros do modelo cinético em estudo. Os valores podem ser observados na Tabela 6.5.

Tabela 6.5. Valores dos parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Levenspiel.

Parâmetros	Valor
$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	$0,0825 \pm 0,01$
$K_s (\text{g.L}^{-1})$	$2,837 \pm 0,1$
$P_{\text{máx}} (\text{g.L}^{-1})$	$65,300 \pm 0,5$
n	$0,406 \pm 0,01$
$Y_{x/s} (\text{g.g}^{-1})$	$0,0274 \pm 0,0005$
$Y_{p/x} (\text{g.g}^{-1})$	$15,888 \pm 0,3$

Observa-se que a produção máxima de etanol a qual o microrganismo consegue suportar é de aproximadamente  $65 \text{ g.L}^{-1}$ . Valores acima desse tornam inviável a reprodução celular, propiciando assim uma diminuição nas células viáveis. Observa-se que os valores da máxima velocidade específica de crescimento e de conversões obtidos pelo modelo aproximam-se dos calculados teoricamente (Tabela 6.2). Os parâmetros apresentam também um bom intervalo de confiança.

A partir de uma análise preliminar, o modelo de Levenspiel mostra-se satisfatório para representar a cinética de produção de etanol a partir do suco de caju. Contudo, o modelo de Andrews, que considera a presença de inibição pelo produto, também apresentou um bom ajuste aos dados experimentais e valores satisfatórios para os parâmetros. Logo, para termos uma representação mais fiel do processo, faz-se necessário o estudo cinético aplicando um modelo que represente a inibição causada por concentrações elevadas de substrato e de produto simultaneamente.

Ghose e Thyagi (1979) propuseram um modelo que descrevesse ao mesmo tempo a inibição causada pela concentração de substrato e a causada pelo produto gerado do consumo desse substrato. Vários autores (VASCONCELO; PINTO; SILVA 1992, TOSETTO 2002) estudaram diversos modelos matemáticos que descrevessem o processo fermentativo e concluíram que o modelo de Ghose e Thyagi foi o mais indicado.

Nesse intuito, avaliou-se também o modelo de Ghose e Thyagi na produção de etanol a partir do suco de caju. O ajuste do modelo aos dados experimentais é mostrado na



Figura 6.4. O ajuste se fez tão satisfatório como o apresentado para o modelo de Levenspiel. Os parâmetros cinéticos obtidos da modelagem são mostrados na Tabela 6.6.

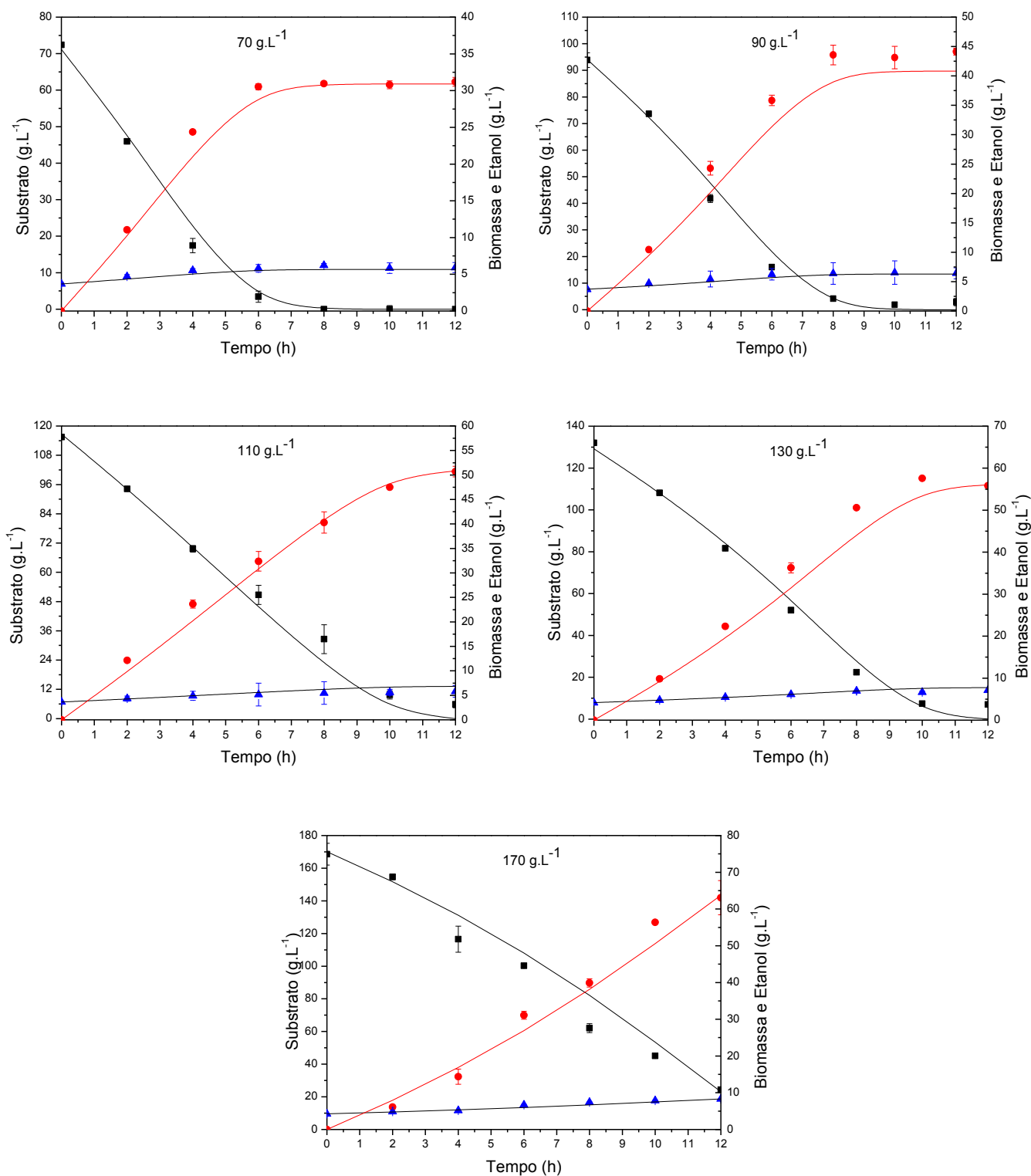


Figura 6.4. Dados experimentais e simulados da fermentação do suco de caju utilizando *S. cerevisiae* a 30°C e 150 rpm: (▲) Biomassa (Massa seca - g.L<sup>-1</sup>); (■) Concentração de açúcares redutores totais (g.L<sup>-1</sup>); (●) Concentração de etanol (g.L<sup>-1</sup>); (—) Modelo de Ghose e Thyagi para as fermentações conduzidas com concentração inicial de açúcares (glicose + frutose) a 70, 90, 110, 130 e 170 g.L<sup>-1</sup>.

Tabela 6.6. Valores dos parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Ghose e Thyago.

Parâmetros	Valor
$\mu_{\text{máx}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$0,133 \pm 0,002$
$K_s$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$8,526 \pm 0,4$
$K_i$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$126,43 \pm 3,0$
$P_{\text{máx}}$ ( $\text{g.L}^{-1}$ )	$146,38 \pm 2,1$
$Y_{x/s}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$0,0275 \pm 0,0004$
$Y_{p/x}$ ( $\text{g.g}^{-1}$ )	$15,748 \pm 0,3$

Os parâmetros mostrados na Tabela 6.5 mostram-se confiáveis, pois apresentam baixo valor de desvio padrão e estão próximos aos observados por outros autores na literatura (VASCONCELO; PINTO; SILVA 1992, TOSETTO 2002). A partir dos valores encontrados para os parâmetros do modelo, pode-se observar que a inibição pelo substrato inicia-se a partir da concentração de  $126 \text{ g.L}^{-1}$  (valor encontrado para o parâmetro de  $K_i$ , o qual representa a concentração onde tem início à inibição pelo substrato. Para valores relativamente altos de  $K_i$ , a inibição pelo substrato poderá ser pouco pronunciada, pois valores altos dessa constante requerem igualmente valores muito altos de substrato para que o efeito inibidor se manifeste (BONOMI; SCHMIDELL, 2001). Logo, pode-se concluir que apesar da ocorrência da inibição pelo substrato durante a fermentação estudada, a mesma não se apresenta tão expressiva, já que o valor obtido para  $K_i$  é relativamente alto ( $126 \text{ g.L}^{-1}$ ). Prova disso é que o modelo de Levenspiel, que considera apenas a inibição pelo produto, conseguiu representar satisfatoriamente a fermentação.

Tosetto e Andrietta (2002) propuseram um modelo semelhante ao de Ghose e Thyagi (1979), diferindo apenas pela adição de um expoente no termo de inibição pelo produto, onde os valores desse parâmetro assumem valores diferentes de 1. No seu estudo, Tosetto (2002), apresentou um bom ajuste deste modelo aos dados experimentais. Para finalizar a busca por um modelo de descreva satisfatoriamente a produção de etanol a partir do suco de caju, estudou-se o efeito desta cinética aos dados experimentais obtidos em laboratório.

Os resultados para a modelagem da equação de Tosetto podem ser observados na Figura 6.5. Quando comparado aos modelos de Levenspiel e Ghose e Thyagi, observa-se uma pequena melhora, no ajuste do modelo aos dados experimentais, para o modelo de Tosetto.

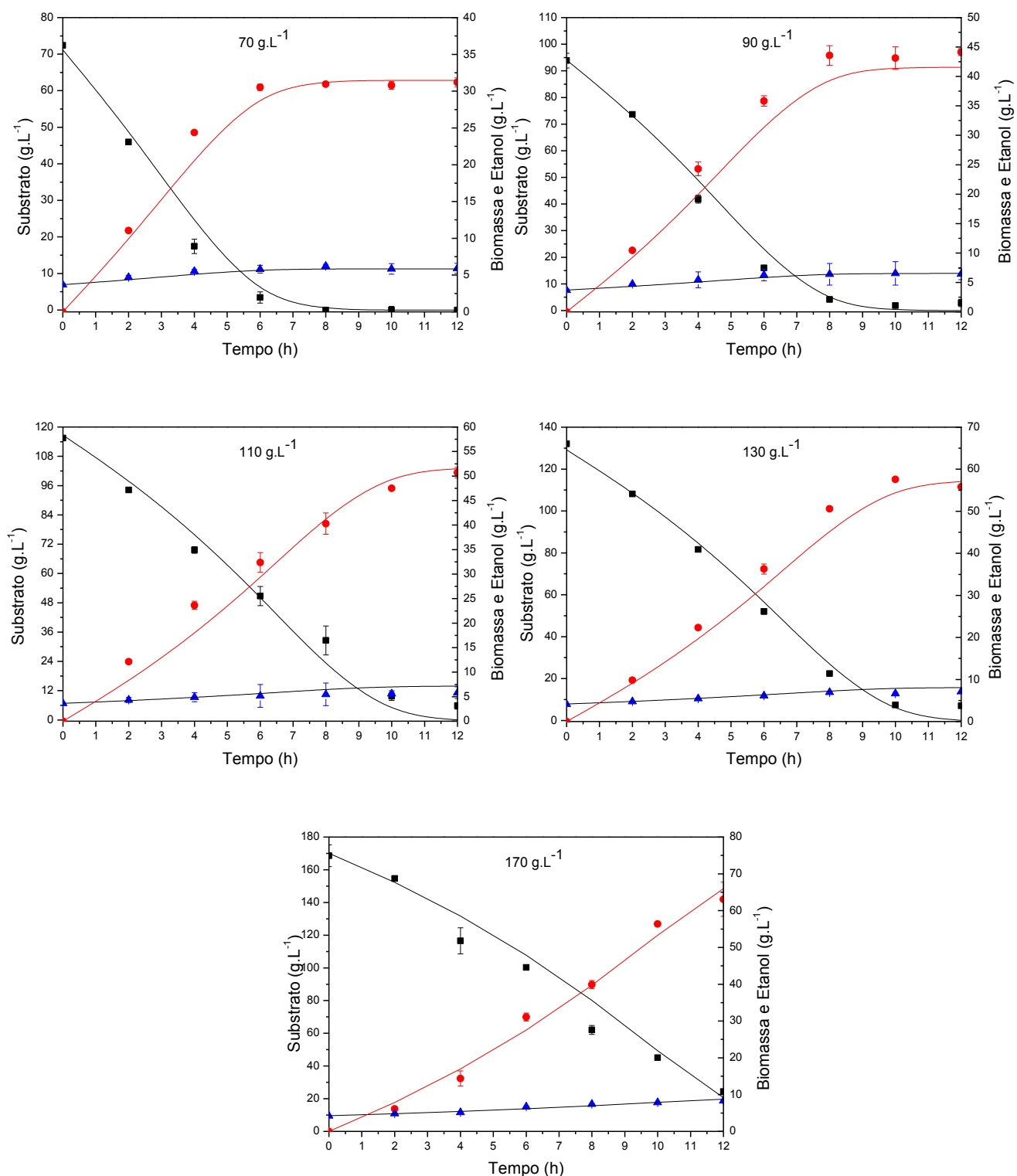


Figura 6.5. Dados experimentais e simulados da fermentação do suco de caju utilizando *S. cerevisiae* a 30°C e 150 rpm: (▲) Biomassa (Massa seca - g.L<sup>-1</sup>); (■) Concentração de açúcares redutores totais (g.L<sup>-1</sup>); (●) Concentração de etanol (g.L<sup>-1</sup>); (—) Modelo de Tosetto para as fermentações conduzidas com concentração inicial de açúcares (glicose + frutose) a 70, 90, 110, 130 e 170 g.L<sup>-1</sup>.

Quanto aos valores numéricos dos parâmetros, apresentados na Tabela 6.7, tem-se um leve aumento no parâmetro de inibição pelo substrato ( $129, 65 \text{ g.L}^{-1}$ ) e uma queda de quase metade do valor para o parâmetro de inibição pelo produto ( $70, 46 \text{ g.L}^{-1}$ ) quando os mesmos são comparados aos obtidos para o modelo de Ghose e Thyagi.

Tabela 6.7. Valores dos parâmetros cinéticos obtidos para o modelo de Tosetto.

Parâmetros	Valor
$\mu_{\text{máx}} (\text{h}^{-1})$	$0,138 \pm 0,004$
$K_s (\text{g.L}^{-1})$	$11,271 \pm 0,8$
$K_i (\text{g.L}^{-1})$	$129,65 \pm 5,0$
$P_{\text{máx}} (\text{g.L}^{-1})$	$70,463 \pm 2,4$
$Y_{x/s} (\text{g.g}^{-1})$	$0,0300 \pm 0,0008$
$Y_{p/x} (\text{g.g}^{-1})$	$14,701 \pm 0,4$
n	$0,258 \pm 0,026$

A relação entre os parâmetros de  $K_s$  e  $K_i$  seguiu a tendência relatada na literatura (Borges, 2008; Tosetto, 2002), onde o valor de  $K_i$  é maior que  $K_s$ . Caso essa relação fosse invertida, os parâmetros não teriam sentido físico, pois estaria ocorrendo inibição pelo substrato antes mesmo da máxima velocidade específica de crescimento ser alcançada. O valor obtido para o parâmetro de  $P_{\text{máx}}$ , que representa a concentração de produto onde cessa o crescimento microbiano, foi próximo ao obtido para o modelo de Levenspiel. Os valores de máxima velocidade específica de crescimento e conversão observados na Tabela 6.7, aproximam-se dos calculados experimentalmente (Tabela 6.2).

Todos os modelos estudados anteriormente podem ser utilizados para descrever a cinética fermentativa do processo, contudo, alguns modelos mostraram-se mais adequados que outros. Para fazer uma discriminação entre os modelos cinéticos estudados, faz-se necessária a aplicação de um estudo estatístico aplicado a cada modelo em particular.

O desempenho dos modelos foi observado utilizando-se o teste do desvio residual padrão (Residual standard deviation – RSD). Segundo Cleran *et al.* (1991), para que o modelo apresente consistência, os valores de RSD (%) calculados para cada variável do processo tem que apresentar valores abaixo de 10%. As Tabelas 6.8, 6.9, 6.10, 6.11 e 6.12 mostram os valores de RSD (%) obtidos para os modelos de Monod, Andrews, Levenspiel, Ghose e Thyagi e Tosetto, respectivamente.

Tabela 6.8. Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Monod.

Variáveis de saída	RSD (%)				
	S= 70 g/L	S= 90 g/L	S= 110 g/L	S= 130 g/L	S= 170 g/L
X	3,9	3,7	1,3	0,6	1,2
S	2,8	2,3	6,7	6,4	8,4
P	1,3	1,5	3,8	3,5	14,4

Da Tabela 6.8, observa-se que o modelo de Monod não apresenta bom resultado de RSD (%) para o produto quando se utilizou 170 g.L<sup>-1</sup> de concentração inicial de substrato. Logo, o modelo de Monod foi descartado do estudo.

Tabela 6.9. Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Andrews.

Variáveis de saída	RSD (%)				
	S= 70 g/L	S= 90 g/L	S= 110 g/L	S= 130 g/L	S= 170 g/L
X	8,7	10,9	18,6	15,4	1,2
S	4,7	4,4	5,2	4,7	8,4
P	1,9	3,3	5,2	4,6	14,4

O modelo de Andrews (Tabela 6.9) apresentou valores acima do permitido, que segundo Cleran *et al.* (1991) pode ser no máximo 10%, para a concentração celular quando se utilizou 90 e 110 g.L<sup>-1</sup> de substrato inicial. A concentração de produto também apresentou valor acima do permitido para a concentração de substrato inicial de 170 g.L<sup>-1</sup>. Sendo assim, o modelo de Andrews também foi excluído do estudo.

Tabela 6.10. Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Levenspiel.

Variáveis de saída	RSD (%)				
	S= 70 g/L	S= 90 g/L	S= 110 g/L	S= 130 g/L	S= 170 g/L
X	1,9	1,8	3,6	1,8	0,9
S	5,3	3,7	2,4	1,7	1,5
P	2,4	3,2	1,8	1,9	4,8

A equação de Levenspiel apresentou valores aceitáveis para as variáveis para todas as concentrações de substrato estudadas. Os valores de RSD (%) variaram entre 1,9 e 5,3%.

Tabela 6.11. Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Ghose & Thyagi.

Variáveis de saída	RSD (%)				
	S= 70 g/L	S= 90 g/L	S= 110 g/L	S= 130 g/L	S= 170 g/L
X	1,7	1,7	3,7	1,9	1,8
S	3,1	3,0	2,8	1,8	2,8
P	1,5	3,0	3,0	2,9	2,4

A equação de Ghose e Thyagi também apresentou valores aceitáveis de RSD (%) para as variáveis do processo em todas as concentrações de substrato estudadas, sendo a faixa de variação do parâmetro de RSD (%) ainda mais estreita que a apresentada pelo modelo de Levenspiel, variando entre 1,7 e 3,7%.

Tabela 6.12. Desvio padrão residual (RSD) utilizado para caracterizar a qualidade da predição do modelo de Tosetto.

Variáveis de saída	RSD (%)				
	S= 70 g/L	S= 90 g/L	S= 110 g/L	S= 130 g/L	S= 170 g/L
X	1,2	1,3	4,7	2,8	1,3
S	4,3	3,6	2,8	1,8	2,5
P	1,9	2,8	3,2	2,5	1,6

Tosetto também seguiu a tendência dos dois últimos modelos, apresentando assim valores baixos para RSD (%). Sendo assim, restaram apenas 3 (três) modelos a serem discriminados: Levenspiel, Ghose & Thyagi e Tosetto.

Para saber se há modelos não adequados, entre o conjunto de modelos ajustados, testou-se a homogeneidade das estimativas do erro experimental, ou seja, testou-se se o valor da variância de algum modelo é estatisticamente diferente dos demais utilizando o teste do  $X^2$ , calculando o  $X_{calc}^2$  através da fórmula de Bartlett (Equação 6.8).

A tabela 6.13 apresenta os resultados para o teste de Bartlett para os modelos avaliados.

Tabela 6.13. Teste de Bartlett

Test do $X^2$ de Bartlett	
$S^2$	9,93
$S_i^2$ Levenspiel	13,39
$S_i^2$ Ghose e Thyagi	12,52
$S_i^2$ Tosetto	11,94
$X_{\text{calc}}^2 (\alpha, m-1)$	4,52
$X_{\text{tab}}^2 (\alpha, m-1)$	5,99

Da tabela 6.13 observa-se que o valor do  $X_{\text{calc}}^2$  (4,52) foi menor que o  $X_{\text{tab}}^2$  (5,99). Logo, nenhum dos modelos deve ser descartado. Dentre o conjunto de modelos aqui testados, Levenspiel, Ghose & Thyagi e Tosetto, todos se mostram aptos a representar a cinética fermentativa de produção de etanol a partir do suco de caju. Como estes 3 (três) modelos passaram nos testes estatísticos realizados, resta a validação dos mesmos através de um novo experimento. Para esse novo experimento, todas as condições de fermentação foram mantidas iguais às estudadas anteriormente, só a concentração inicial de substrato foi modificada, assumindo o valor de 80 g.L<sup>-1</sup>, concentração essa ainda não estudada, mas que contempla a faixa para a qual o modelo foi testado (70 a 170 g.L<sup>-1</sup>).

A Figura 6.6 mostra o resultado da validação para o modelo de Levenspiel. O consumo de substrato, crescimento celular e a produção de etanol foram representados adequadamente pelo modelo de Levenspiel, estando este validado.

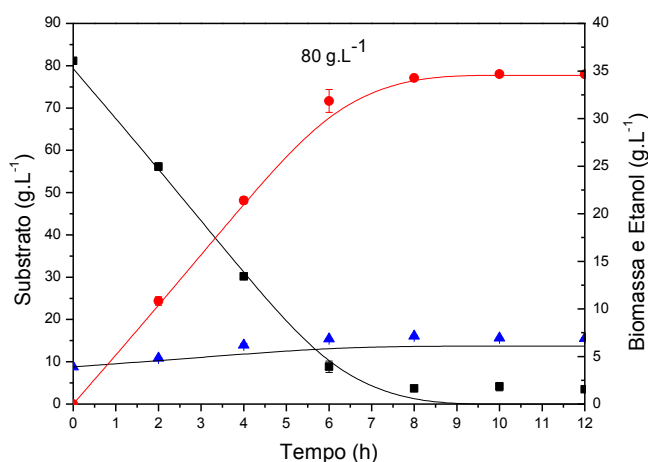


Figura 6.6. Validação do modelo cinético de Levenspiel aplicado à produção de etanol a partir do suco de caju: (▲) Biomassa (g.L<sup>-1</sup>); (■) Concentração de açúcares redutores totais (g.L<sup>-1</sup>); (●) Concentração de etanol (g.L<sup>-1</sup>); (—) Modelo de Levenspiel

Em seguida, foi validado o modelo de Ghose e Thyagi (Figura 6.7). Assim como no modelo de Levenspiel, o modelo se adequou bem aos dados experimentais obtidos durante a fermentação, ficando o mesmo apto a ser utilizado em posteriores estudos cinéticos de produção de etanol a partir do suco de caju, portanto que a concentração de substratos não seja inferior a  $70 \text{ g.L}^{-1}$  e não exceder  $170 \text{ g.L}^{-1}$ .

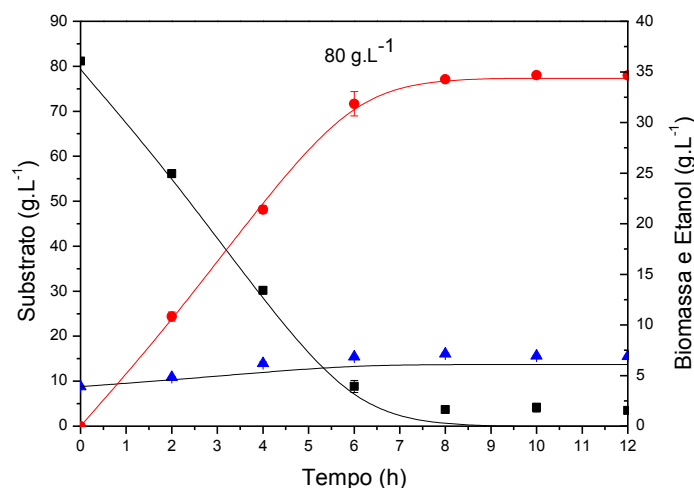


Figura 6.7. Validação do modelo cinético de Ghose e Thyagi aplicado à produção de etanol a partir do suco de caju: (▲) Biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ); (■) Concentração de açúcares redutores totais ( $\text{g.L}^{-1}$ ); (●) Concentração de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ); (—) Modelo de Ghose e Thyagi.

Por ultimo, observa-se na Figura 6.8 o modelo de Tosetto representando a fermentação do suco de caju contendo  $80 \text{ g.L}^{-1}$  de açúcares. O modelo apresentou uma validação tão boa quanto à dos outros dois modelos mostrados anteriormente.

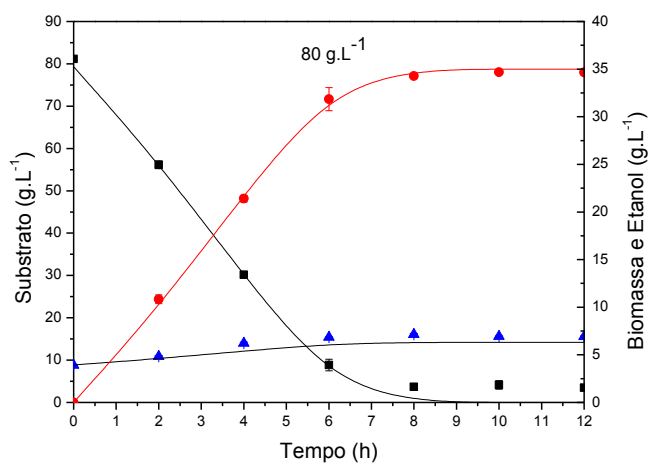


Figura 6.8. Validação do modelo cinético de Tosetto aplicado à produção de etanol a partir do suco de caju: (▲) Biomassa ( $\text{g.L}^{-1}$ ); (■) Concentração de açúcares redutores totais ( $\text{g.L}^{-1}$ ); (●) Concentração de etanol ( $\text{g.L}^{-1}$ ); (—) Modelo de Tosetto.



Diante dos testes feitos anteriormente, é possível afirmar que os modelos de Levenspiel, Ghose & Thyagi e Tosetto podem ser utilizados para representar a produção de etanol a partir do suco de caju contendo de 70 a 170 g.L<sup>-1</sup> de açúcares redutores iniciais. Contudo, não podemos afirmar que um modelo venha a representar melhor o processo que o outro, apenas que qualquer dos 3 (três) estão aptos a representar o processo e a apresentar resultados satisfatórios. O único fator, que se tem disponível, que nos permita discriminar esses modelos é o valor do resíduo gerado durante a simulação. O modelo de Levenspiel apresentou valor de resíduo igual a 18,25, enquanto que o modelo de Ghose & Thyagi apresentou 14,64 e Tosetto 44,53. Baseado nos resíduos gerados, o modelo que conseguiu chegar mais próximos dos dados experimentais e assim descrever o processo mais fielmente foi o modelo de Ghose & Thyagi.

#### **6.4. Conclusão**

A fim de se determinar o efeito da concentração inicial de substrato na produção de etanol, estudou-se a faixa de 70, 90, 110, 130 e 170 g.L<sup>-1</sup> de substrato. Ambas as concentrações de substrato, 90 e 130 g.L<sup>-1</sup>, apresentaram valores superiores para os parâmetros cinéticos estudados quando comparados às demais concentrações estudadas, sendo essa a melhor faixa da concentração inicial de substrato para se trabalhar. Dentre os modelos avaliados, Levenspiel, Ghose & Thyagi e Tosetto estão aptos a ser utilizados para representar a produção de etanol a partir do suco de caju contendo de 70 a 170 g.L<sup>-1</sup> de açúcares redutores iniciais. Contudo, o modelo que conseguiu chegar mais próximos dos dados experimentais e assim descrever o processo mais fielmente foi o modelo de Ghose & Thyagi. Este modelo representa satisfatoriamente a cinética do processo fermentativo quando se tem inibição pelo produto e inibição pelo substrato. Sendo assim, pode-se afirmar que quando a concentração de açúcares presentes no suco se encontra entre 70 e 170 g.L<sup>-1</sup> tem-se a presença de inibição. Uma solução para o controle da inibição pelo produto seria proceder a fermentação em regime de batelada alimentada.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos na etapa da avaliação da composição do meio de cultura, concluiu-se que não se faz necessária a suplementação do suco de caju para a sua posterior fermentação, pois o suco de caju *in natura* já apresenta todos os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo.

Pode-se afirmar também que a temperatura exerceu influência na produção de etanol a partir da fermentação do suco de caju por *Saccharomyces cerevisiae*, sendo os melhores resultados os obtidos quando se conduziu a fermentação na faixa de 30 a 38°C. Concluiu-se também que o modelo de Monod, conjuntamente com a equação de Arrhenius, foram capazes de descrever, satisfatoriamente, a cinética fermentativa em função da temperatura de operação.

Dentre os microrganismos estudados, a cepa que apresentou melhores resultados para os parâmetros calculados foi a *Saccharomyces cerevisiae* 01, sendo que a cepa 06, microrganismo do gênero *Saccharomyces*, também apresentou bons resultados quando comparada com as demais cepas.

A partir dos resultados obtidos no estudo da influência da concentração inicial de substrato, observou-se que quando a concentração de açúcares presentes no suco se encontra entre 70 e 170 g.L<sup>-1</sup> tem-se a presença de inibição tanto pelo substrato como pelo produto. Na avaliação feita entre os 5 (cinco) modelos mostrados na Tabela 6.1, o que apresentou resultados mais satisfatórios foi o modelo de Ghose e Thyagi.

Através dos resultados obtidos nesta dissertação, verificou-se que o suco de caju é um substrato satisfatório para produção de etanol. Além disso, a exploração do suco de caju como meio de cultura não só acarretará redução no custo da produção de etanol, como também trará um propósito a um material que geralmente é desperdiçado, contribuindo assim para a redução da poluição ambiental e se apresenta como uma alternativa ao uso de cana-de-açúcar como matéria-prima na produção de etanol. Vale salientar que a produção de etanol a partir do caju não pode ser considerada substituta da produção agrícola atual (cana-de-açúcar), mas uma nova atividade, destinada a utilizar terras marginais em um processo de expansão e diversificação das práticas agrícolas.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIETTA, S. R. Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1994. 178p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos).

ANDRIETTA, M. G. S.; STECKELBERG, C.; ANDRIETTA, S. R. Bioetanol 1996. Brasil, 30 anos na vanguard. Campinas- SP., 2006. Divisão de biotecnologia e processos. Universidade de Campinas.

ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Anacardium occidentale* L.). *J. Food Composition Anal.*, v.16, p.647–657, 2003.

ATALA D.I.P.; COSTA A. C. e MACIEL R. Kinetics of ethanol fermentation with high biomass concentration considering the effect of temperature. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v. 91, n. 3, p. 353-365, 2001.

ATALA, D. I. P. Fermentação alcoólica com alta densidade celular: Modelagem cinética, convalidação de parâmetros e otimização do processo. Campinas – SP., 2000. 135 p. Dissertação (Mestre em engenharia de alimentos) – Faculdade de engenharia de alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

AZEVEDO, D. C. S.; RODRIGUES, A. S. M. B. Chromatography applied to the separation/purification of fructose from cashew apple juice. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.17, n.4-7, p.507-516, 2000.

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

BAILEY, J. E. Mathematical modeling and analysis in biochemical engineering: past accomplishments and future opportunities. *Biotechnology Progress*, v. 14, p. 8-20, 1998.

BAILEY & OLLIS, *Biochemical Engineering Fundamentals*. Mc.Graw-Hill, 1986.

BALLI, D., FLARI, V., SAKELLARAKI, E., SCHOINA, V., ICONOMOPOULOU, M., BEKATOROU, A. e KANELLAKE, M. Effect of yeast cell immobilization and temperature

on glycerol content in alcoholic fermentation with respect to wine making. Elsevier Science Ltd. Process Biochemistry. v. 39, p. 499-506, (2003).

BARNETT, J. A history of research on yeasts. I: Work by chemists and biologists (1789-1850). New York: John Wiley & Sons, 1998, v.14, pp. 1439-1451.

BARROSO, T.; MOURA, R. Tecnologia do caju vai contribuir com educação alimentar. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/embrapa/imprensa/noticias/2007/maio/5a-semana/noticia.2007-05-29.1767494733>>. Acesso em: 13 de dez. 2010.

BASSO, L. C. 1991. In: ALVES, D. M. G. Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica. (Tese de Doutorado). ASALQ. Piracicaba, p. 199, 1994.

BAZUA, C. D., WILKE, C. R. Ethanol effects on the kinetics of a continuous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering Symposium, New York, v.7, p.105-118, 1997.

BIOCOMBUSTÍVEIS deverão ter novo ciclo de investimentos. Diário comércio indústria e serviços - DCI. Rio de Janeiro, 07 de dez. 2010. Disponível em: <[http://www.dci.com.br/noticia.asp?id\\_editoria=10&id\\_noticia=353269](http://www.dci.com.br/noticia.asp?id_editoria=10&id_noticia=353269)>. Acesso em: 12 de dez. 2010.

BIROL,G., DORUKER,P., KARDAR,B. et al. “Mathematical description of ethanol fermentation by immobilised *Saccharomyces cerevisiae*.” Process Biochemistry, v. 33,nº. 7, p. 763-771,1998.

BNDES. Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável – Rio de Janeiro. 2008. 1ª Ed. 316 p.

BONOMI, A.; SCHMIDELL, W. Modelagem matemática e simulação de processos fermentativos. In: Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. (coord). Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blucher, 2001, v. 2. p. 123-178.

BORGES, P. C. S. Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada. Dissertação de Mestrado. Uberlândia-MG. Universidade Federal de Uberlândia, 141p, 2008.

CABRINI, M.F., MARJOTTA-MAISTRO, M. C. (2007). Mercado internacional de álcool: Os recentes programas de uso do produto como combustível. Revista Agroanalysis, São Paulo, p. 36, fev. 2007.

CAJUCULTURA, Previsão de safra de caju no Brasil. 06 jan. 2011. Disponível em: <[http://www.cajucultura.com/p\\_brasil.html](http://www.cajucultura.com/p_brasil.html)>. Acesso em: 03 fev. 2011.

CAMPOS, D. C.; SANTOS, A. S.; WOLKOFF, D. B.; MATTA, V. M.; CABRAL, L. M. C.; COURI, S. Cashew apple juice stabilization by microfiltration. *Desalination.*, v.148, p.61–65, 2002.

CASON, D. T.; REID, G. C.; GATNER, E. M. S. On the differing rates of fructose and glucose utilization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Inst. Brew.*, v.93, p.23-25, 1987.

CHANG, S. B.; MATSON, R. S. (1972) - *Membrane stability (thermal) and nature of fatty acids in yeast cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 46: 1529-1535.

CLERAN, Y.; THIBAUT, J.; CHÉRUY, A.;CORRIEU, G. (1991), J. Ferment. Bioeng. 71, 356–362.

COSTA, T. S. A.; LIMA, A.; LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. Química Nova, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 763-765, set/out. 2003

COSTA, LUIZ GONZAGA ARAÚJO. Dados Conjunturais da Castanha-de-Caju, Safra 2009/2010.CONAB/RN, Natal, 2009.

DORTA, C. Synergism among lactic acid, sulfite, pH and ethanol in alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* (PE-2 and M-26). Tese de Doutorado. Rio Claro-SP. Universidade Estadual Paulista, 144p, 2006.

DOURADO, A., GOMA, G., ALBUQUERQUE, U., SEVELY, Y. Modeling and statistic optimization of the ethanol production in a cascade reactor I. Modeling. Biotechnology and Bioengineering, 29, n.2, 187-194, 1987.

DUJARDIN, J. L'art de la distillation. Paris: Ed. Chez l'Auteur en l'hostel de président de Lamoignon, 1900.

FELISMINO, R. Matrizes Energéticas: Petróleo e Biocombustível. 28 de fev. 2009. Disponível em: < <http://boletiminternacional.wordpress.com/2009/02/28/matrizes-energeticas-petroleo-e-biocombustivel/> >. Acesso em: 31 de jan. 2011.

FERREIRA, E. S. Cinética química e fundamentos dos processos de nitrificação e denitrificação biológica. XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Porto Alegre, RS, 2000.

FLEET, G. H; HEARD, G. M. (1993) - *Yeasts: growth during fermentation*. In: Fleet, G. M. (Ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland, 27-54.

FOGLER, H. S. Elementos de engenharia das reações químicas. 3 ed. Rio de Janeiro: LTC, 1999. 892p.

FROTA, P. C. E. Clima e fenologia. In: LIMA, V. P. M. S. (Org.) *A cultura do cajueiro no Nordeste do Brasil*. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, ETENE, 1988. p. 63-79. (BNB. Estudos Econômicos e Sociais, 35).

FURTADO, C. Brasil a construção interrompida. São Paulo: Paz e Terra, 1992.

FURTADO, T. A., SCANDIFFIO, M. G. (2006). Álcool no Brasil – Uma longa história. *Scientific American Brasil*, 66-71, Outubro, 2006.

GARNIER, L. *Ferments et fermentations*. Paris: Librairie J. Baillière et fils, 1888.

GHOSE, T. K., TYAGI, R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v.21, n.8, p.1401-1420, aug., 1979.

GUANDALINI, G. O barril a 100 dólares. *Revista Veja*, São Paulo, p. 44, 9 jan. 2008.

GUICHARD, M. P. *Industrie de La distillation*. London, 1898. In: *Summer and Somer, chemistry and method of enzymes*, New York, 1943. Disponível em: <[www.navit.net](http://www.navit.net)>. Acesso em: Nov. 2003.

HAN, K., LEVENSPIEL, O. Extended Monod kinetics for substrate, product, and cell inhibition. *Biotechnology and Bioengineering* 32, pp. 430-437, 1988.

KOLB, E. Vinos de frutas – Elaboración artesanal e industrial. Zaragoza – Espanha. Ed. Acirbia, p. 232, (2002).

KOSARIC, N. J., REED, G., PÜHLER, A. e STADLER, P. Products Etanol – Potential source of energy and chemical products. In: Rehm, H. of primary metabolism – Botechnology. 2 ed., Vch, p.121-203, (1996).

LAFON-LAFOURCADE, S. (1983) - *Wine and brandy*. In: Rehm, H. J., Reed, G. (Eds.), *Food and Feed Production with Microorganisms*. Biotechnology, vol. 5. Verlag Chemie, Weinheim, 81-163.

LEÃO, R. M., AMORIM, H. V. Fermentação alcoólica, ciência e tecnologia. Piracicaba, Fermentec, 2005, 448 p.

LEHNINGER, A. L., NELSON, D. L. e COX, M. M. Princípio de bioquímica. Traduzido por SIMÕES, A. A.; LODE, W. R. N. São Paulo: Ed. Sarvier, 2ªed., p. 839 tradução de: *Principles of biochemistry*, (1995).

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

LIMA, U. A., BASSO, L. C. e AMORIM, H. V. Fadiga. In: *Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo-SP. Edgard Blucher, 2001. v.3, p. 1-43.

LOPES, J. S., Modelagem matemática do processo fermentativo de produção de retamicina por microrganismo filamentosos *Streptomyces olindensis*. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MACEDO, L. C. H. Alcool Etílico. São Paulo. Ed. ICONI, p.157, (1993).

MACHADO, C. M. M. Produção de biocombustíveis por microrganismos, 2010. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2009/producao-de-biocombustiveis-por-microrganismos>>. Acesso em: 20 de jan. 2011.

MARTINS, C. A. P. Avaliação do efeito do inóculo e do perfil de alimentação do mosto na produção em escala piloto e industrial de etanol. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química)- Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MATRIZ ENERGÉTICA - Biocombustível. Portal Brasil. 14 de out. 2010. Disponível em:<<http://www.brasil.gov.br/sobre/economia/matriz-energetica/biocombustivel>>. Acesso em: 12 de dez. 2010.

MAZZA, D. Cajucultura no CE pode sumir em cinco anos. Jornal O Estado. Fortaleza, 26 agosto 2010. Disponível em: <[http://www.oestadoce.com.br/?acao=noticias&subacao=ler\\_noticia&cadernoID=8&noticiaID=32882](http://www.oestadoce.com.br/?acao=noticias&subacao=ler_noticia&cadernoID=8&noticiaID=32882)>. Acesso em: 02 de fev. 2011.

MIRAGAYA, J. C. G. Biodiesel: tendências no mundo e no Brasil. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 7-13, 2005.

MORTON, J. F.; DOWLING, C. F. Fruits of warm climates. Creative Resources Systems, p. 239-240, 1987.

MOULING, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. *Biotechnonology and Bioengineerin*, New York, v.22, p.235-2381.

MUENDUEN, P.; NUTTAPAN, S.; WIWUT, T. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 28 (2006) 36–43

MUNICÍPIOS DO CEARÁ. Fortaleza: n.74, 2007.

OGAWA, Y., NITTA,A., UCHIYMA, H., IMAMURA,T., SHIMOI, H., Ito, K. Tolerance mechanism of the ethanol-tholerant mutant of sake yeast.*Journal of Bioscience and Bioengineering*. V. 90, n.3, p. 313-320, (2000).

OLIVEIRA, L. P. Seleção e aproveitamento Biotecnológico de frutos encontrados na Amazônia para elaboração de bebida alcoólica fermentada utilizando levedura imobilizada. Tese de doutorado UFAM Manaus-amazonas (2006).

OLIVEIRA, ANA GEORGINA P. ROCHA. Diagnóstico da Cadeia Produtiva do Caju na Bahia-Potencial Territorial de Identidade Semiárido Nordeste II. 10. ed. Rev. Desenbahia, 2009.

PACHECO, M.T. B., SGARBIERI, V. C. Diferentes métodos de concentração de proteína de levedura e suas implicações nas propriedades funcionais. *Bol. SBCTA*, v. 36, n.2, p. 83-94,(2002).



PACHECO, T. F. Fermentação alcoólica com leveduras de característica flocculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais.

PARAZZI, C. Flocculação da levedura na fermentação etanólica. Universidade Federal de São Carlos – Centro de Ciências Agrárias, 2007.

PEREIRA, M. C. T.; CORREA, H. C. T.; NIETSCH, S.; MOTA, W. F.; MARQUES, S. V. Caracterização físico-química de pedúnculo e castanha de clones de cajueiro-anão precoce nas condições do norte de Minas Gerais. *Bragantia*, v. 64, n. 2, 2005.

PIACENTE, E. A. Perspectivas do Brasil no mercado internacional de etanol. 2006. 189f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Faculdade de Engenharia Mecânica, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PINHEIRO, A. D. T.; ROCHA, M. V. P.; MACEDO, G. R.; GONÇALVES, L. R. B. Evaluation of cashew apple juice for the production of fuel ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 148, p. 227-234, 2008.

RAMON, J. Energia: Projeção indica aumento do consumo de etanol no mercado interno e chances de inserção global. 06 de nov. 2009. Disponível em: <<http://www.fatorambiental.com.br/portal/index.php/2010/02/09/biocombustiveis-avancam-na-matriz/>>. Acesso em: 31 de jan. 2011.

RIVERA, E. A. C. Otimização de bioprocessos: avaliação de desempenho das abordagens determinística e por algoritmos genéticos. 2006. C319o. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

ROCHA, M. V. P.; OLIVEIRA, A. H. S.; SOUZA, M. C. M.; GONÇALVES, L. R.B. Natural cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. *World Journal Microbiology Biotechnology*, v.22, p.1295-1299, 2006.

ROCHA, M. V. P. Produção de biossurfactantes por fermentação submersa usando substrato não convencional. 2007. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza – Ceará, 124 f., 2007.

ROCHA, M. V. P., RODRIGUES, T., H. S., MACEDO, G. R., GONÇALVES, L. R. B. Enzymatic Hydrolysis and Fermentation of Pretreated Cashew Apple Bagasse with Alkali and

Diluted Sulfuric Acid for Bioethanol Production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v.155, p.407–417, 2009.

ROCHA, M. V. P. Produção de bioetanol a partir de pedúnculo de caju (*anacardium occidentale* L.) por fermentação submersa. 2010. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

SANCHO, S. O. Efeito do processamento sobre características de qualidade do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). 2006. 137 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

SHERMAN, F. (1959), *The effects of elevated temperatures on yeast. II. Induction of respiratorydeficient mutants*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, 54: 37-52.

SÍNTESE conjuntural da safra de castanha-de-caju 2010/2011. Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB. Rio Grande do Norte. 21 de set. 2010. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/10\\_10\\_25\\_12\\_32\\_12\\_dados\\_conjunturais\\_setembro\\_2010.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/10_10_25_12_32_12_dados_conjunturais_setembro_2010.pdf)>. Acesso em: 13 de dez. 2010.

SIQUEIRA, E. P. F. *Efeito da temperatura na cinética da fermentação alcoólica contínua com alta densidade celular*. 1997. 98f. Dissertação (Dissertação na Universidade Estadual de Campina – UNICAMP) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas.

SOUSA, E. L. Tendências da Produção de Etanol: mercado e aspectos institucionais. III Workshop INFOSUCRO, 2010, Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticias/show.asp?nwsCode=5158AE9C-BD67-4504-9160-D50CC1E20429>>. Acesso em: 12 de dez. 2010.

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

TALASIL, U., VECHALAPU, R. R., BEEBI, S. K. Optimization of Fermentation Conditions for the Production of Ethanol From Cashew Apple Juice using Doehlert Experimental Design. 2011. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*

TEIXEIRA, F.C. A geopolítica mundial do petróleo. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: [http://www.fup.org.br/plebiscito/geopolitica\\_mundial%20.htm](http://www.fup.org.br/plebiscito/geopolitica_mundial%20.htm). Acesso em 03 dez. 2009.

THATIPAMALA, R., ROHAI, S., HILL, G. A. Effects of high product and substrate inhibition on the kinetics in biomass and products yields during ethanol batch fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*; v.40, n.2, p.289-297, 1992.

TORIJA, M. J., ROZÈS, N., POBLET, M., GUILLAMÓN, J. M., MAS, A. (2001) - Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie van Leeuwenhoek*, 79: 345-352.

TORIJA, M. J., ROZÈS, N., POBLET, M., GUILLAMÓN, J. M., MAS, A. (2001) – Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 80, p.47-53, 2003.

TOSETTO, G. M. (2002), Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil.

TOSETTO, G. M.; ANDRIETTA, S. R. Influência da matéria prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol. Apresentado no VII Seminário on Enzymatic Hidrolysis of Biomass – SHEB, Maringá, 2002.

VARGAS, J. I. e ALVIM, C. F. Preço do petróleo: o terceiro choque?. *Economia e Energia* No. 47, Dezembro 2004. Disponível em: [http://ecen.com/eee47/eee47p/precos\\_petroleo\\_3choq.htm](http://ecen.com/eee47/eee47p/precos_petroleo_3choq.htm). Acesso em 02 dez. 2009.

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. 150p., 2003.

WALKER, G. M. The roles of magnesium in biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, Boca Raton, v. 14, n. 4, p. 311-354, 1994.

WARD, OWEN. P. *Biotecnogía de La fermentación: principios, procesos y productos*. Zaragoza (Espanã). Ed.Acribia, (S. A), p. 155, (1991).

XU, T. J.; ZHAO, X. Q.; BAI, F. W. Continuous ethanol production using self-flocculating yeast in a cascade of fermentors. *Enzyme and Microbial Technology*, v.37, p.634-640, 2005.