

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GESTÃO DO SETOR SUCROENERGÉTICO – MTA

**ESTUDO DE CASO DA SUBSTITUIÇÃO DO ÁCIDO SULFÚRICO PELO ÁCIDO
NÍTRICO NO TRATAMENTO ÁCIDO DA LEVEDURA *SACCHAROMYCES*
CEREVISIAE NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA DE BANCADA**

SUELLEN CAFFER

CATANDUVA - SP

2015

**ESTUDO DE CASO DA SUBSTITUIÇÃO DO ÁCIDO SULFÚRICO PELO ÁCIDO
NÍTRICO NO TRATAMENTO ÁCIDO DA LEVEDURA *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE* NO PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ETANÓLICA DE BANCADA**

SUELLEN CAFFER

Monografia apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Gestão do Setor
Sucroenergético – MTA.

Aluno: Suellen Caffer

Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Bastos

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Sandra Regina
Ceccato Antonini

CATANDUVA - SP

2015

Dedico este trabalho à minha família, que sempre me apoiou e incentivou a estudar e buscar o crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ter me concedido tão belo e árduo caminho para a formação, por estar sempre ao meu lado, e todas as vezes que minhas forças se esgotavam e pensava em desistir, o Senhor me levantou e me deu forças para continuar. Agradeço ao Senhor pela sabedoria e discernimento, para a conclusão desse trabalho ou dessa etapa da minha vida que se encerra, onde sei que Ele me capacitou e irá continuar me capacitando para prosseguir em meus sonhos e ensinamentos.

Agradeço, também, a todos os professores que tive ao longo do curso e da vida, pois sem eles seria impossível redigir estas linhas e ser a mulher que sou.

Por fim, agradeço aos colegas do curso, pela oportunidade de interação e participação em mais uma etapa da minha vida profissional.

“[...] Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito [...] não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

Com a alta demanda de etanol no mercado, é preciso buscar aumentar o rendimento fermentativo dentro das usinas, melhorando o processo já existente. Entre os processos, há o tratamento com ácido sulfúrico do fermento, que visa eliminar contaminações provenientes do processo e que causa a diminuição da produtividade da usina, além de também auxiliar na revigoração das leveduras, agentes fermentativos e importantes para a produção do etanol. Devido à esse cenário, o presente trabalho buscou, através de um estudo prático e comparativo, propor um tratamento do fermento com a utilização do ácido nítrico em substituição do ácido sulfúrico. Realizou-se simultaneamente e em escala laboratorial, o tratamento do fermento com ácido sulfúrico a 10% e com ácido nítrico na mesma concentração e posteriormente, os fermentos tratados foram submetidos à fermentação do mosto. Com os resultados, de ambos os processos, de pH e Brix do mosto e do vinho delevedurado e da viabilidade celular do fermento antes e após o tratamento e a fermentação, foi possível comparar e analisar as diferenças que ocorreram com a substituição do ácido no tratamento do fermento. Entre as diferenças analisadas destacou-se que com o ácido nítrico, o fermento apresentou uma maior viabilidade celular, ocasionando uma maior produtividade de etanol e uma menor perda de açúcares do vinho. Porém ao realizar uma análise de custo-benefício de forma empírica e projetando o resultado obtido em escala industrial, o gasto com ácido nítrico gera um custo muito alto para a usina, o que tornou o tratamento com este ácido, mesmo com vantagens tecnológicas, inviável economicamente. Concluiu-se, portanto, que ao substituir o ácido sulfúrico pelo ácido nítrico no tratamento do fermento, há diferenças significativas no processo, porém seriam necessárias mais análises, inclusive de identificação do tipo de fermento predominantes durante a fermentação, para realmente se comprovar as vantagens apresentadas no trabalho e para viabilizar industrialmente essa possível melhoria na fabricação do etanol.

Palavras-chave: Viabilidade celular, Produtividade, Dosagem, Fatores da Fermentação

ABSTRACT

With the high demand for ethanol in the market, we must seek to increase the fermentation yield in the plants, improving the existing process. Among the processes, there is treatment with yeast sulfuric acid, which aims to eliminate contamination from the process that causes the decrease in plant productivity, and also assist in reinvigoration of yeast, fermentation agents and important for the production of ethanol. Due to this scenario, the present study aimed, through a practical and comparative study, propose a yeast treatment with the use of nitric acid in place of sulfuric acid. It carried out simultaneously and in laboratory scale, the baking treatment with 10% sulfuric acid and nitric acid at the same concentration and subsequently treated yeasts were subjected to fermentation of the must. The results of both processes, the pH and Brix of the wort and wine delevedurado and cell viability of the yeast before and after treatment and the fermentation was possible to compare and analyze the differences occurring with the substitution of the acid treatment yeast. Among the differences analyzed we were highlighted that with nitric acid, the yeast had a higher cell viability, leading to greater productivity of ethanol and less of a wine sugars. But when performing a cost-benefit empirically and projecting the result obtained on an industrial scale, nitric acid spending generates a very high cost for the plant, which made the acid treatment, even with numerous advantages, economically unviable. It is concluded, therefore, that by replacing sulfuric acid with nitric acid in the treatment of yeast, there are significant differences in the process, but further analysis would be required, including identifying the type of predominant yeast during fermentation, to actually prove the advantages presented in the paper and industrially feasible this possible improvement in the production of ethanol.

Keywords: Cell viability, productivity, Dosage, fermentation Factors

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Equações químicas da fermentação alcoólica e respiração aeróbia.....	16
Figura 2: Formato da célula da levedura <i>S. cerevisiae</i>	17
Figura 3: Citologia das células de levedura.....	18
Figura 4: (a) Brotamento de células de leveduras <i>S. cerevisiae</i> e (b) Formação da cicatriz na célula-mãe.....	18
Figura 5: Processo Industrial de Fermentação em: (a) batelada-alimentada e (b) contínua.....	20
Figura 6: Processo Industrial de Fermentação e Dornas.	20
Figura 7: Processo Industrial de Tratamento ácido da Levedura.	21
Figura 8: Efeito do pH na atividade da enzima invertase.	23
Figura 9: Efeitos da temperatura na taxa de crescimento de micro-organismos.....	24
Figura 10: Temperatura de propagação das leveduras alcoólicas.	25
Figura 11: Efeitos da temperatura na: (a) viabilidade celular e (b) contaminação microbiana.....	25
Figura 12: Formatos de bactérias: (a) cocos, (b) bacilos, (c) espirilos e vibriões	27
Figura 13: Ilustração das leveduras em processo de floculação por bactéria.	28
Figura 14: (a) Colônias de leveduras selvagens e (b) Células alongadas e esferoidais de <i>Dekkera bruxellensis</i>	29
Figura 15: Efeito da concentração de oxigênio sobre o comportamento metabólico em <i>S. cerevisiae</i>	33
Figura 16: Influência do etanol na fermentação.	34
Figura 17: Preparo do ácido sulfúrico.....	37
Figura 18: Preparo do ácido nítrico.	38
Figura 19: Creme de levedura da Usina X a 30%.	41
Figura 20: Soluções, de creme de levedura tratado, diluídas a 10^{-1} e 10^{-2}	41
Figura 21: Câmara de Neubauer; Materiais e Equipamento utilizados para visualização das amostras diluídas a 10^{-1} e 10^{-2}	42
Figura 22: Creme de levedura tratado com ácido sulfúrico e ácido nítrico.	43
Figura 23: Processo de separação do vinho levedurado por centrifugação.	46
Figura 24: Visualização por microscopia do fermento corado com eritrosina e diluído a: (a) 10^{-1} e (b) 10^{-2} , ambos sem tratamento.....	49

Figura 25: Visualização do fermento tratado após 8 horas de fermentação com ácido nítrico (à esquerda) e ácido sulfúrico (à direita).53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição Molecular de Levedura Comercial <i>S. cerevisiae</i>	30
Tabela 2: Resultados da contagem de leveduras coradas e não coradas da amostra diluída a 10^{-2} , para determinação da viabilidade celular do fermento não tratado da Usina X.....	50
Tabela 3: Resultados das dosagens dos ácidos sulfúrico e nítrico e dos pHs do tratamento ácido.....	50
Tabela 4: Resultados dos preços por quilo dos ácidos concentrados: sulfúrico e nítrico.	52
Tabela 5: Custos dos tratamentos de bancada com ácido sulfúrico e ácido nítrico..	52
Tabela 6: Custos dos tratamentos industriais com ácido sulfúrico e ácido nítrico. ...	53
Tabela 7: Resultados das pesagens realizadas no início e final do processo fermentativo.....	54
Tabela 8: Massas do mosto com fermento tratado e do vinho levedurado.....	54
Tabela 9: Perda de Massa dos Processos Fermentativos.....	55
Tabela 10: Produção de Etanol nos Processos Fermentativos	56
Tabela 11: Produção de Etanol nos Processos Fermentativos de Bancada e Receita obtida	57
Tabela 12: Produção de Etanol nos Processos Fermentativos Industrial e Receita obtida	58
Tabela 13: Projeção do Custo, Receita e Lucro Industrial dos Tratamentos Ácidos	58
Tabela 14: Resultado de pH do mosto.	59
Tabela 15: Resultados de Brix do mosto e do vinho delevedurado.....	60
Tabela 16: Resultados da contagem do fermento tratado	61
Tabela 17: Resultados da viabilidade celular dos fermentos tratados e não tratados	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVOS GERAIS	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> : MORFOLOGIA E METABOLISMO	16
3.2 PROCESSO FERMENTATIVO COM RECICLO DE LEVEDURAS	19
3.2.1 Fermentação	19
3.2.2 Tratamento Ácido da Levedura	21
3.3 FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	22
3.3.1 Influência do pH	22
3.3.2 Influência da Temperatura	23
3.3.3 Influência da Contaminação	26
3.3.3.1 Bactérias	26
3.3.3.2 Leveduras Selvagens	28
3.3.4 Influência dos Nutrientes	29
3.3.4.1 Fonte de Carbono	30
3.3.4.2 Fonte de Nitrogênio	31
3.3.5 Influência da Agitação e Aeração	32
3.3.6 Influência do Teor Alcoólico	34
3.3.7 Influência do Sulfito	34
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 PREPARO DOS REAGENTES	36
4.1.1 Ácido sulfúrico 10%	36
4.1.2 Ácido nítrico 10%	37
4.1.3 Solução de Eritrosina	38
4.2 ANÁLISES DAS AMOSTRAS DA USINA X	38
4.2.1 Mosto	39
4.2.1.1 Brix	39
4.2.1.2 pH	39
4.2.2 Fermento Turbinado	40
4.2.2.1 Diluição do Fermento a 30%	40
4.2.2.2 Diluição do Creme de Levedura a 30% sem Tratamento a 10^{-1} e 10^{-2}	41

4.2.2.3 Viabilidade Celular	42
4.3 TRATAMENTO ÁCIDO DO CREME DE LEVEDURA	43
4.4 FERMENTAÇÃO DE BANCADA.....	44
4.5 CENTRIFUGAÇÃO	45
4.6 ANÁLISES DOS FERMENTOS TRATADOS PÓS-FERMENTAÇÃO	46
4.6.1 Diluição do Creme de Levedura a 10^{-1} e 10^{-2}	46
4.6.2 Viabilidade Celular	47
4.7 ANÁLISES DOS VINHOS DELEVEDURADOS	47
4.7.1 Brix	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1 FERMENTO TURBINADO FORNECIDO PELA USINA X	49
5.1.1 Análise de Viabilidade Celular do Fermento antes do Tratamento.....	49
5.2 TRATAMENTO ÁCIDO DO FERMENTO A 30%	50
5.2.1 Quantificação do Custo do Tratamento Ácido de Bancada	51
5.2.2 Quantificação do Custo do Tratamento Ácido em escala Industrial	52
5.3 FERMENTAÇÃO DE BANCADA.....	53
5.3.1 Análise da Viabilidade Econômica (custo-benefício) do Tratamento Ácido	56
5.4 ANÁLISE DO MOSTO, VINHO DELEVEDURADO	59
5.4.1 pH do Mosto.....	59
5.4.2 Brix do Mosto e Vinho Delevedurado	60
5.5 ANÁLISE DO FERMENTO TRATADO APÓS FERMENTAÇÃO	61
6. CONCLUSÃO	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, os dados mostram que a produção de cana-de-açúcar aumentou mais de 150% entre 1990 e 2009 e que a produção de etanol ultrapassou os 27 bilhões de litros em 2009 (aumento de mais de 138% em relação a 1990). Esse cenário se deve ao crescente interesse internacional sobre o desenvolvimento e a utilização dos biocombustíveis, como o etanol, em substituição aos combustíveis fósseis, dada a pressão da sociedade por combustíveis renováveis e menos poluentes (CARLESSO NETO; VERÍSSIMO, 2011).

Segundo o médico patologista Paulo Saldiva, da Universidade de São Paulo, mostra que a substituição em larga escala dos derivados de petróleo pelo etanol seria significativamente positiva para a saúde pública. Num cenário que prevê a substituição total da gasolina e do diesel na frota cativa de ônibus por etanol na cidade de São Paulo, mais de 12 mil internações e 875 mortes seriam evitadas em um ano, de acordo com o trabalho. Além disso, a redução de gastos públicos e familiares com a saúde seria da ordem de US\$ 190 milhões (UNICA, 2013).

Atualmente, o etanol é comercializado no Brasil como álcool etílico anidro carburante (Aeac), ou como álcool etílico hidratado carburante (Aehc) contendo de 5 a 6% em volume de água. O Aeac é misturado à gasolina A, em um teor que pode variar de 20% a 25% \pm 1% em volume, para formar a gasolina C que é comercializada nos postos. O uso do etanol como fonte de energia vem da necessidade de substituir uma parcela do petróleo utilizado e de reduzir as emissões de gases de efeito estufa. O etanol tem o importante papel na solução do problema da octanagem da gasolina, substituindo o chumbo altamente tóxico e prejudicial à saúde humana, na mistura de gasolina – etanol, hoje aceita e usada por todo mundo (UNICA, 2010; NETO MESSEN et al., 1993).

De acordo com o Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Energético – NIPE (2009), da Unicamp, seria necessária a produção anual de 200 bilhões de litros de etanol de maneira a substituir 10% da gasolina no mundo em 2025. A grande maioria dos países já prevê uma substituição em torno de 10% para datas anteriores a 2025, devido à convicção crescente de que anomalias climáticas deverão aumentar em intensidade e em frequência exercerá pressões incontornáveis para a substituição de combustíveis fósseis por renováveis. Ademais, há o fato

inquestionável de que as produções de petróleo e de gás natural estarão ultrapassando seu momento de apogeu e iniciando o de declínio (LEITE; CORTEZ, 2008).

Porém desde 2008, o mercado brasileiro de etanol vem apresentando um crescente descompasso entre a oferta efetiva e a demanda potencial por esse produto. Pelo lado da demanda, as vendas de automóveis flex, segundo dados da Associação Nacional dos Fabricantes de Veículos Automotores (Anfavea), aumentaram cerca de 11% ao ano entre 2008 e 2010. Tais vendas registraram a marca histórica de aproximadamente 2,9 milhões de unidades em 2010. Como resultado, a frota de veículos flex em circulação já ultrapassa 12 milhões de unidades, com participação estimada de 43% na frota total de veículos leves (BRASIL, 2011). Já a oferta de etanol ficou praticamente estagnada no mesmo período. Enquanto em 2008 foram produzidos 27,1 bilhões de litros do produto, em 2010 foram produzidos 27,9 bilhões de litros, o que representa um crescimento de apenas 1,5% a.a (EPE, 2011).

Para superar os problemas associados à oferta de etanol e torná-lo um biocombustível competitivo no mercado nacional e internacional, é necessário reverter o atual cenário, no qual se observa que além da escassez de investimentos do setor sucroenergético na expansão de sua capacidade produtiva, há a falta de controle de perdas industriais o que gera um baixo rendimento na produção do etanol.

A produção do etanol é por via fermentativa e muitos são os fatores que afetam o rendimento industrial. Para Godoy (2002), um rendimento considerado ideal para o processo fermentativo seria em torno de 91 a 92% ou maior, e a contaminação bacteriana na fermentação ainda é o principal problema, portanto o controle da contaminação eleva o rendimento fermentativo, diminui perdas e gastos levando a uma maior produção de etanol. Segundo Amorim (2013) quando há contaminação elevada no mosto há uma perda de 1,16% do açúcar, o que equivale um prejuízo de aproximadamente 2 milhões de reais devido ao etanol não produzido.

Para o controle microbiano da fermentação e aumento do rendimento fermentativo e da produção de etanol é necessário o uso de antissépticos, sendo que o ácido sulfúrico tem se mostrado, atualmente, o melhor controlador das contaminações, porém induz um constante estresse ácido nas células das

leveduras, que pode levar a diminuição da viabilidade celular no processo e afetar no rendimento industrial (MELO, 2006). Além disso, de acordo com o autor Paraizo (2013) a alta dosagem de ácido sulfúrico 98%, gera um resíduo, denominada vinhaça, no final da produção do etanol, com alto valor de íons sulfatos que ao ser aplicada no solo, pode gerar riscos de poluição, o que torna o uso do ácido sulfúrico no processo inviável e não sustentável.

Para que a produção de etanol supra a alta demanda do mercado e seja sustentável, é necessário manter o rendimento industrial adequado e buscar alternativas que melhorem a viabilidade celular das leveduras e não gerem resíduos com alta carga poluente. Portanto o presente trabalho busca propor a substituição do ácido sulfúrico pelo ácido nítrico, e verificar quais as mudanças ocasionadas no processo fermentativo sem alterar na produtividade e dessa forma diminuir os resíduos na vinhaça e até podendo aumentar o teor de nitrogênio e consequentemente o seu potencial fertilizante.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho tem como objetivo comparar, através de estudo prático, o tratamento feito atualmente com o ácido sulfúrico e com a substituição pelo ácido nítrico, e demonstrar as principais vantagens e desvantagens de cada tratamento ácido com relação à viabilidade das leveduras, produtividade, custo-benefício e rendimento fermentativo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 SACCHAROMYCES CEREVISIAE: MORFOLOGIA E METABOLISMO

Conhecido como levedura, levedo de cerveja ou fermento biológico, o fungo *Saccharomyces cerevisiae* é utilizado na preparação de alimentos (pão, biscoitos, fermento de padaria) e de bebidas (cerveja, vinho e destilados), assim como na produção de outras substâncias de importância industrial (etanol, vitaminas e outros metabólitos) (MALAJOVICH, 2009).

De acordo com Coelho (2013) a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microorganismo aeróbio facultativo, isto é, que tem a habilidade de se ajustar metabolicamente, tanto em condições de aerobiose como de anaerobiose. Na presença de oxigênio (aerobiose), as leveduras respiram, degradando a glicose ($C_6H_{12}O_6$) em água (H_2O), dióxido de carbono (CO_2) e biomassa. Na ausência de oxigênio (anaerobiose), as leveduras fermentam, degradando parcialmente a glicose ($C_6H_{12}O_6$) em etanol (C_2H_6O) e dióxido de carbono (CO_2). Do ponto de vista energético, a respiração é mais eficiente que a fermentação.

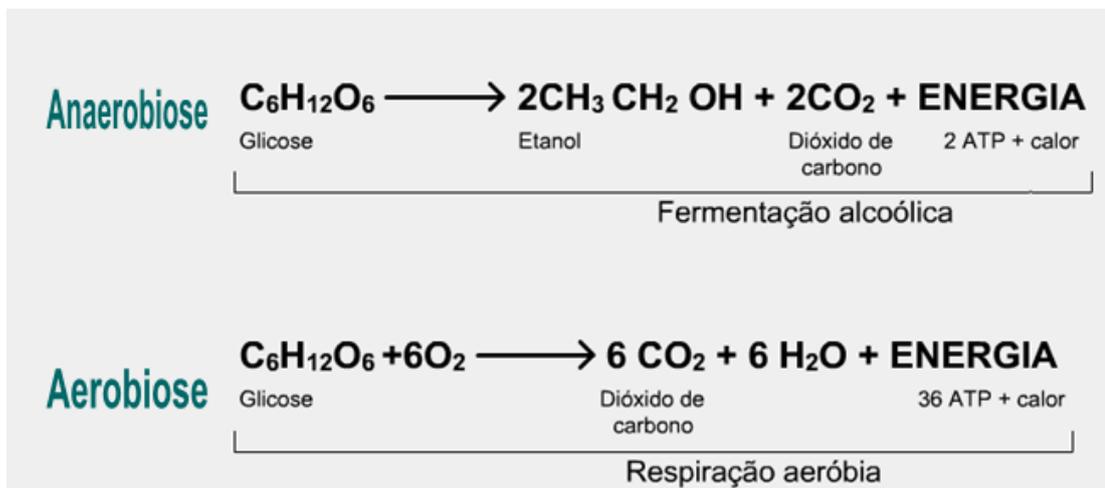


Figura 1: Diagrama estequiométrico da fermentação alcoólica e respiração aeróbia
 FONTE: BIOGEO, 2009

As leveduras podem utilizar outros açúcares, tais como a sacarose ou a frutose, mas não fermentam nem a lactose nem o amido. Tanto as matérias-primas

amiláceas como as celulósicas devem ser degradadas, química ou enzimaticamente, até a obtenção de um açúcar fermentável (MALAJOVICH, 2009).

São unicelulares, formados por apenas uma célula, pertencentes ao reino dos fungos, não filamentosos e não são visíveis a olho nu, ou seja, somente podem ser vistas com o auxílio de microscópio. A célula da levedura *S. cerevisiae* são ovais, redondas ou elípticas, medindo cerca de 5 a 30 micrometros (μm) de comprimento por 1 a 5 micrometros (μm) de largura, são bem maiores do que a maioria das bactérias (PELCZAR et al., 1997).

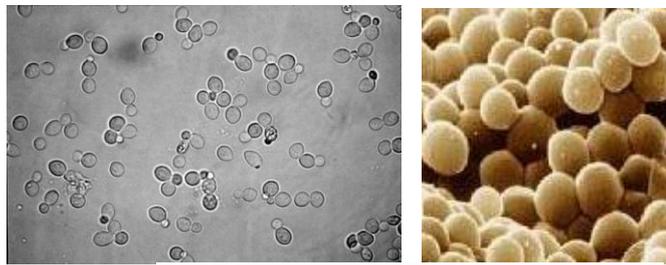


Figura 2: Formato da célula da levedura *S. cerevisiae*
FONTE: HYPE SCIENCE, 2011.

As principais microestruturas da célula de levedura são: a parede celular, a membrana citoplasmática, o citoplasma, o núcleo, os vacúolos e as mitocôndrias. A parede celular é uma estrutura constituída de polissacarídeos, proteínas e lipídios com a função de proteger a célula de alterações na pressão osmótica do meio. A membrana plasmática é uma bicamada lipoproteica, com permeabilidade seletiva, para selecionar o que entra ou sai do interior da célula. O citoplasma é o local em que ocorrem as diversas reações importantes, como a fermentação alcoólica e o armazenamento de glicogênio. O núcleo abriga o DNA e controla todo o metabolismo da levedura e armazena todas as informações genéticas da levedura. Os vacúolos têm a função de armazenar nutrientes e quebrar proteínas. As mitocôndrias é uma organela celular responsável pela respiração (PELCZAR et al., 1997).

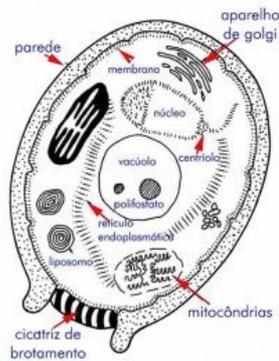


Figura 3: Citologia das células de levedura.
 FONTE: PIMARTINS, s/d.

A forma mais comum de reprodução da levedura *S. cerevisiae* é a assexuada, realizada por gemulação ou brotamento. Esse tipo de reprodução ocorre com o surgimento de uma protuberância na parede da célula-mãe que aumenta de tamanho com o decorrer do tempo, até atingir o tamanho semelhante à célula original. Em seguida, a parede de ambas as células (mãe e filha) se fecham, formando uma dupla camada, completando assim, o brotamento. Neste caso, surgirá uma cicatriz permanente na célula mãe (figura 4) e neste local não haverá mais brotamento (TORTORA, et al., 2008).

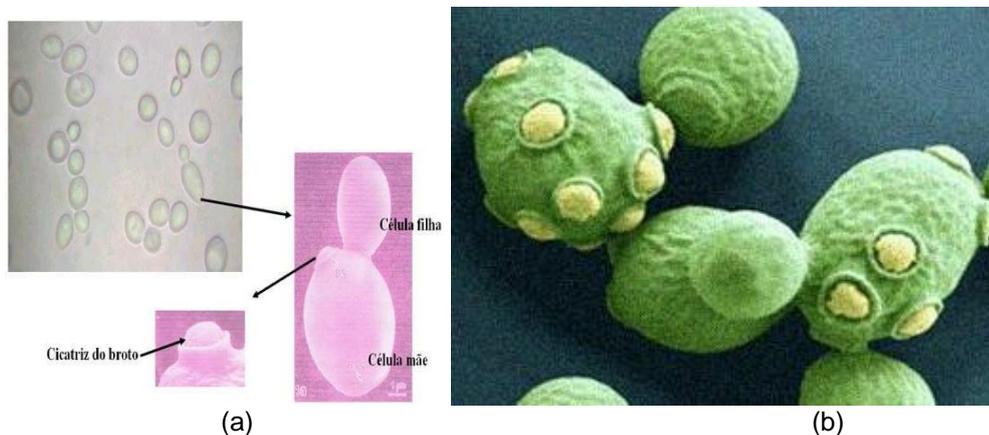


Figura 4: (a) Brotamento de células de leveduras *S. cerevisiae* e (b) Formação da cicatriz na célula-mãe.

FONTE: CENTRO DE TECNOLOGIA CANAVIEIRA, 2007.

A célula de levedura pode produzir mais de 24 brotos ao longo do seu ciclo de vida e o tempo de geração, ou seja, o tempo que a levedura demora a realizar a reprodução é de 2 horas (TORTORA, et al., 2008).

De acordo com Guimarães (2005), alguns elementos são basicamente necessários para o crescimento e reprodução das leveduras *S. cerevisiae* como:

água, fontes de carbono (açúcares, sais de ácidos orgânicos, glicerina ou etanol), nitrogênio, oxigênio e minerais (fósforo, enxofre cálcio, magnésio, cobre, potássio e zinco).

3.2 PROCESSO FERMENTATIVO COM RECICLO DE LEVEDURAS

3.2.1 Fermentação

A fermentação pode ser definida como processo metabólico anaeróbico de produção de energia no qual os micro-organismos, nesse caso as leveduras, oxidam parcialmente o substrato, atuando sobre um ou mais componentes, gerando produtos modificados e obtendo características desejáveis (SANTOS, 2008).

A fermentação alcoólica é realizada principalmente pela *Saccharomyces cerevisiae*, onde em condições anaeróbicas os açúcares como a glicose e frutose (provenientes do caldo de cana) são convertidos em energia celular produzindo ao mesmo tempo etanol e dióxido de carbono (MADIGAN et al., 2004).

Tosetto (2008) explica que, a levedura tem capacidade de utilizar duas vias distintas de transformação de açúcar durante a fermentação devido à sua característica facultativa. Uma delas é a Glicólise, onde a sacarose é degradada até ácido pirúvico, por uma sequência ordenada de reações catalisadas por enzimas específicas. Na ausência de oxigênio, há uma tendência para atuação das enzimas piruvato-descarboxilase e álcool-desidrogenase, produzindo etanol e água a partir do ácido pirúvico. Em aerobiose, a levedura tem a capacidade de transformar parte do açúcar em dióxido de carbono, biomassa e água. Esta reação ocorre devido ao deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krebs, onde será oxidado por meio de enzimas.

O processo de fermentação, em escala industrial, utiliza a suspensão de leveduras e um substrato a ser fermentado, denominado de mosto, que é o caldo de cana e melaço, resíduo da fabricação do açúcar, misturados em diferentes proporções até se obter 18 a 22% de açúcares redutores totais (ART). É realizado em biorreatores normalmente fechados, denominados dornas, em processo batelada-alimentada (mais utilizado) ou contínuo (figura 5), ambos os processos com reutilização das células de levedura (BASSO et al., 2008; DUARTE et al., 2006).

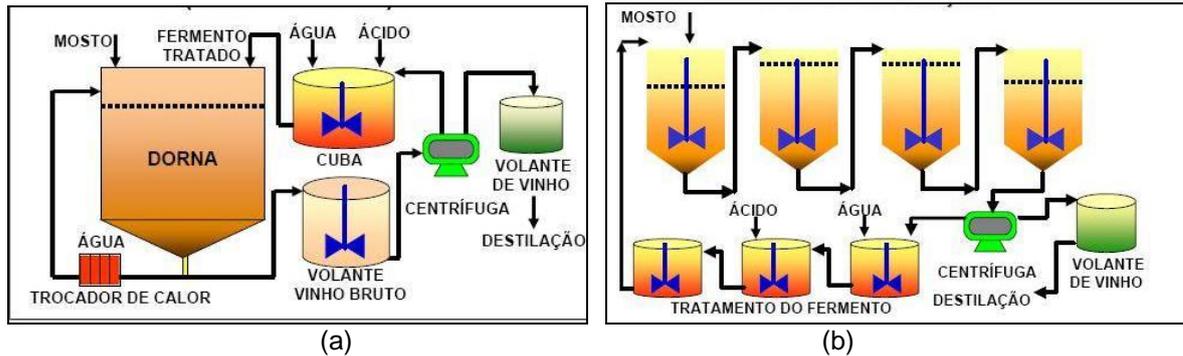


Figura 5: Processo Industrial de Fermentação em: (a) batelada-alimentada e (b) contínua.
 FONTE: MAGALHÃES, s/d.

Depois de 6 a 10 horas o vinho fermentado atinge um teor alcoólico de 8 a 12°GL (Gay-Lussac), quando se dá o término da fermentação, em que a levedura é separada do vinho delevedurado por centrifugação.

O vinho delevedurado é encaminhado para o processo de destilação, retificação e desidratação para obtenção do etanol hidratado e anidro e o fermento é encaminhado para tratamento com ácido sulfúrico (LALUCE, 1991).



Figura 6: Processo Industrial de Fermentação e Dornas.
 FONTE: SERMATEC, s/d.

Durante a fermentação, a levedura pode estar exposta a vários fatores estressantes como: altos teores alcoólicos, temperatura elevada, acidez do meio (inclusive no tratamento ácido), teor de sulfito, a contaminação bacteriana e de leveduras selvagens. Esses fatores podem afetar o rendimento da fermentação, ou seja, a eficiência da conversão do açúcar em álcool. Geralmente as quedas na eficiência fermentativa decorrem de uma alteração na estequiometria do processo, levando à maior formação de produtos secundários e de biomassa (BASSO, 2004).

3.2.2 Tratamento Ácido da Levedura

O tratamento ácido do levedo é realizado após o término da fermentação e centrifugação do vinho bruto com a finalidade de reduzir até 44,3% da contaminação bacteriana, desflocular o levedo, potencializar a ação de antibióticos e remover impurezas da parede celular da levedura, preparando-a para o próximo ciclo fermentativo. Em contrapartida, esse procedimento pode interferir negativamente no metabolismo e fisiologia da levedura. (BOSCO, 2010).

Após o término da fermentação alcoólica em um processo industrial, as leveduras devem ser separadas do produto ou do resíduo produzido. Estas são novamente utilizadas no processo, garantindo menor custo para a reposição do fermento e melhores condições de operação, pois os micro-organismos reciclados não necessitam consumir substrato para fase de crescimento e já estão adaptados ao meio (LIMA et al., 2001). Gallo (1989) observou uma redução de 44,5% da flora bacteriana quando o fermento recebeu tratamento com ácido sulfúrico por duas horas a um pH igual a 2,0.

Nos processos convencionais usados por praticamente todas as usinas brasileiras, o processo de separação do mosto fermentado é a centrífuga, onde ocorre a separação das leveduras e do vinho delevedurado. O fermento é diluído, em um cuba, com água tratada e clorada a uma concentração de 30 a 40% (massa/volume) e tratada com ácido sulfúrico (H_2SO_4) até pH em torno de 2,5 dependendo do nível da contaminação bacteriana. Esta suspensão de fermento diluído e acidificado é conhecida na prática como pé-de-cuba (figura 7), permanecendo em agitação de uma a três horas, esperando o retorno para o próximo ciclo fermentativo (FURTADO; SCANDIFFIO, 2006; LALUCE, 1991).



Figura 7: Processo Industrial de Tratamento ácido da Levedura.
FONTE: PRÓPRIO AUTOR – USINA MANDU, 2009.

De acordo com os autores Bovi e Marques, apesar de ser uma do tratamento economicamente mais viável do que com antibióticos, possui suas limitações quanto ao efeito bactericida, pois quando em estoque avançado de infecção somente o tratamento de choque não elimina por completo os microorganismos prejudiciais à fermentação.

Outra limitação conhecida do tratamento com ácido é o fato de que se usado em demasia afeta a viabilidade do fermento baixando o percentual de células vivas também por esse motivo nunca se deve aplicar o ácido diretamente no leite de levedura, deve-se sempre diluí-lo para que o seu efeito sobre a célula seja o menor possível (BOVI; MARQUES, 1983).

3.3 FATORES QUE AFETAM A FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

3.3.1 Influência do pH

O pH é um dos parâmetros a ser considerado, pois cada microorganismo tem um pH ótimo para se desenvolver. Bactérias usualmente crescem no intervalo de pH de 4,0 a 8,0; leveduras de 3,0 a 5,0, mofos de 3,0 a 7,0 e células superiores na faixa de 6,5 a 7,5. Dessa forma as leveduras por apresentarem um crescimento ótimo em pH ácido, são classificadas como acidófilas (RIBEIRO, 2010).

De acordo com Amorim et al. (1996), o pH é um fator significativo no processo de fermentação industrial devido à sua importância tanto no controle de contaminação microbiana quanto ao seu efeito sobre o desenvolvimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos.

No caso da fermentação, o pH ótimo fica na faixa de 4,0 a 5,0 (MENEZES, 1980). Esse intervalo se deve, conforme a figura 8, à atividade da enzima invertase, responsável pela quebra da molécula de sacarose (açúcar não fermentescível) em glicose e frutose (açúcares fermentescíveis), que é máxima nesse intervalo (BIANCONI, 2006).

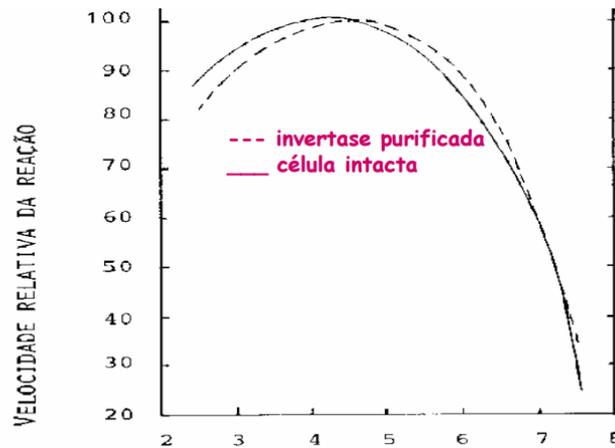


Figura 8: Efeito do pH na atividade da enzima invertase.
 FONTE: BIANCONI, 2006.

Portanto, abaixo ou acima desse pH, o processo de inversão da sacarose para a formação dos açúcares fermentescíveis é prejudicada e conseqüentemente, ocorrerá a diminuição na produção do etanol (BIANCONI, 2006). Além disso, em valores de pH abaixo de 4, aumenta muito a produção de alcoóis superiores e em valores de pH acima de 5, aumenta a contaminação bacteriana e a produção de ácido acético e de furfural (RIBEIRO, 2010).

Segundo Cardoso (2006), como o pH do caldo de cana é normalmente em torno de 5,5, a acidificação realizada antes da inoculação favorece a fermentação alcoólica e também previne o crescimento das bactérias contaminantes.

O pH do meio externo também afeta a velocidade de crescimento das leveduras, a qual atinge um máximo quando o pH está compreendido entre 5,0 e 6,0 (MAIA, 1989).

3.3.2 Influência da Temperatura

A temperatura é uma das condições ambientais que mais afetam a atividade de micro-organismos. A temperatura afeta diretamente a ecologia microbiana e as reações bioquímicas da levedura (TORIJA, et al., 2003).

Cada tipo de microorganismo apresenta uma temperatura ótima de crescimento, em que em torno desta temperatura observa-se um intervalo dentro do qual o desenvolvimento também ocorre, porém sem atingir seu máximo. Ultrapassado o limite superior, rapidamente ocorre a desnaturação do material celular e, conseqüentemente, a morte da célula e abaixo do limite inferior, há uma

desaceleração das reações metabólicas, com baixa velocidade de multiplicação celular (figura 9) (LALUCE et al., 1991).

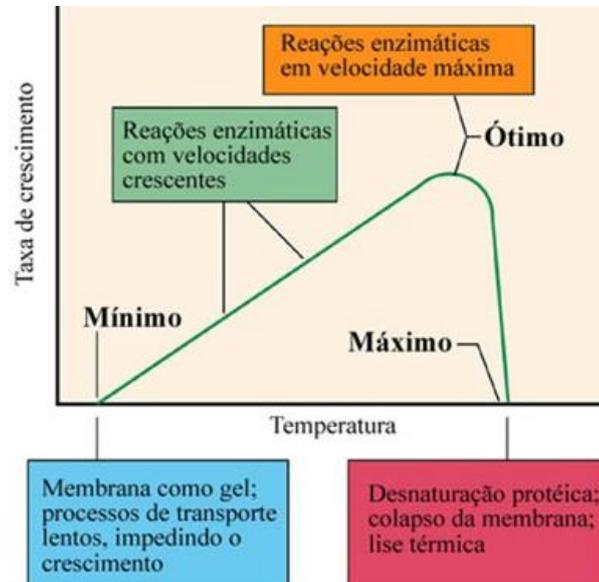


Figura 9: Efeitos da temperatura na taxa de crescimento de micro-organismos.
 FONTE: LALUCE et al., 1991.

As leveduras *S. cerevisiae* sendo micro-organismos mesófilos, a temperatura ótima para o seu crescimento e desenvolvimento irá se situar na faixa entre 25° e 35°C, um intervalo bem amplo que é possível concluir que nessa faixa ótima de temperatura, pode-se realizar o processo sem que a modificação no valor de temperatura dentro dessa faixa cause grandes perdas de produtividade (MENEZES, 1980).

Para Moraes (2001), o controle da temperatura é um fator de grande importância durante o processo de fermentação, pois a levedura trabalha bem entre temperaturas de 25°C e 30°C. Segundo Cabral et.al,(2006), para se obter uma boa fermentação (Fig.1.) a temperatura do mosto deve ser a 30°C (figura 10).

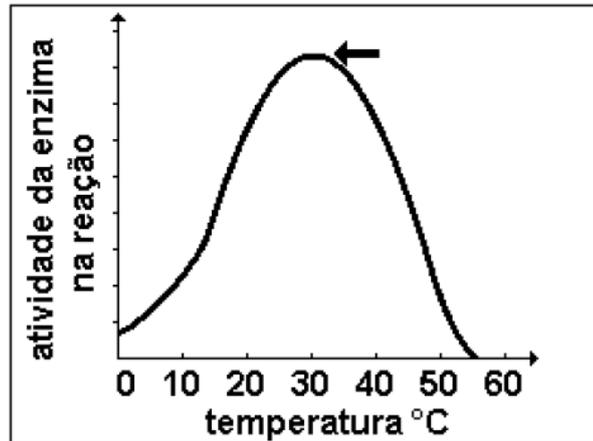


Figura 10: Temperatura de propagação das leveduras alcoólicas.
 FONTE: CABRAL, 2006.

Para manter essa faixa de temperatura, a indústria deve aquecer o mosto em épocas frias e possuir um sistema de resfriamento quando a temperatura estiver elevada, em épocas quentes (MORAES, 2001).

Valores de temperatura acima do limite podem gerar enfraquecimento da levedura, diminuindo a sua viabilidade celular (figura 11a), criar boas condições para o aparecimento de outros micro-organismos (figura 11b) e proporcionar a evaporação do etanol (CARDOSO, 2006). E em temperaturas inferiores ao limite há a diminuição dos processos de transporte nas células e da cinética das reações enzimáticas nas células da levedura o que retarda a fermentação e a atividade da levedura (SILVA FILHO et al., 2005).

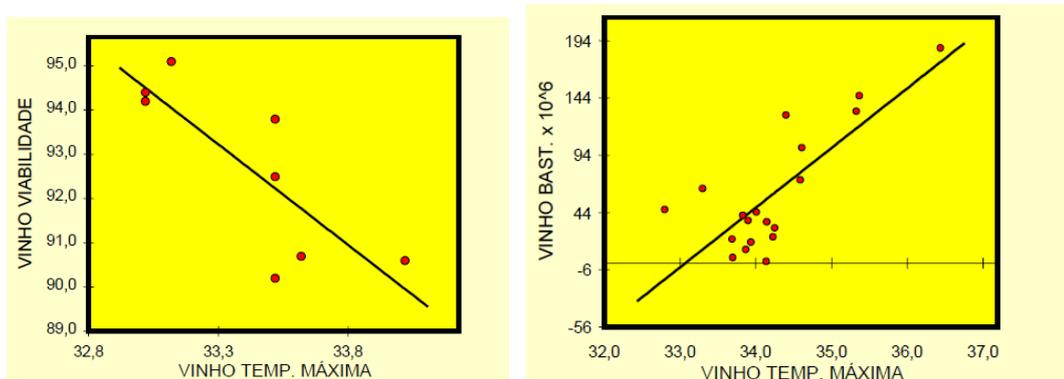


Figura 11: Efeitos da temperatura na: (a) viabilidade celular e (b) contaminação microbiana.
 FONTE: FERMENTEC, 2002.

No caso de temperaturas superiores há o favorecimento da perda de etanol por evaporação, o que torna a levedura mais sensível à toxidez do etanol.

Segundo Sá-Correia e Van Uden (1983), a levedura apresenta a melhor resistência ao etanol na faixa de 13°C a 27°C a 11% (v/v) de etanol no mosto, diminuindo essa tolerância em temperaturas mais baixas que 13°C ou maiores que 27°C.

Além disso, altas temperaturas favorece a multiplicação de bactérias, já que algumas bactérias podem tolerar temperaturas mais elevadas do que as leveduras, como na faixa de 55°C a 58°C, o que causa o aumento da competição das células de bactérias e de leveduras pela fonte de carbono quando a temperatura se eleva (EPSTEIN, GROSSOWICZ, 1969).

3.3.3 Influência da Contaminação

A contaminação por micro-organismos é um fato comprovado na maioria das usinas produtoras de etanol do país, nas quais o problema pode ser agravado em razão do processo utilizado, que fornece as condições ideais de desenvolvimento da população desses micro-organismos (ALTHERUM et al., 1984).

Grande parte da contaminação tem origem no campo, com micro-organismos adentrando nos colmos da cana-de-açúcar através da ocorrência de infestação de pragas ou por danos provocados pelas operações de corte/carregamento/transporte, facilitando assim a infecção. A presença de micro-organismos no processamento de cana-de-açúcar ocorre desde a lavoura até o setor de fermentação. Alguns micro-organismos podem adentrar na indústria pela água utilizada em alguns processos, como na lavagem da cana, no preparo do pé-de-cuba e na limpeza dos equipamentos (BOVI; MAQUES, 1983).

A contaminação presente no caldo de cana e no mosto pode refletir a qualidade da matéria-prima utilizada, pois, tanto o caldo de cana quanto o mosto são ótimos substratos para o crescimento de micro-organismos devido aos teores de nutrientes orgânicos e inorgânicos, alta atividade de água, pH, além da temperatura que ocorrem nos processos industriais de fermentação. As canas saudáveis podem conter de 10^1 a 10^8 bactérias/g e 10^1 a 10^3 bolores e leveduras/g (GALLO, 1989).

3.3.3.1 Bactérias

O principal inimigo da fermentação é a bactéria, que pertence ao gênero morena. São organismos procariontes, unicelulares, aclorofilados e

microscópio. Com relação a suas células, elas são classificadas em cocos, bacilos ou bastonetes, espirilos e vibriões (figura 12). Um processo de fermentação considerado sadio trabalha com níveis de bactérias nunca maiores de 10^5 células/mL (ANDRIETTA et al., 2007).

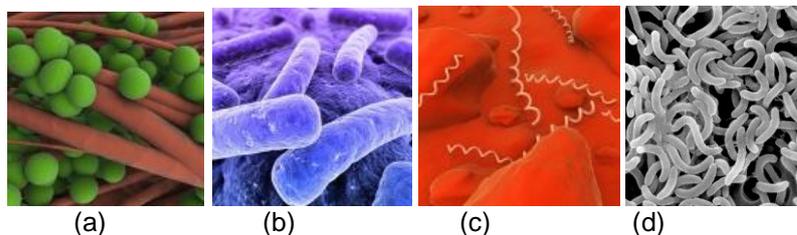


Figura 12: Formatos de bactérias: (a) cocos, (b) bacilos, (c) espirilos e vibriões
FONTE: PINO, 2013.

Dentre os vários gêneros de bactérias que são prejudiciais à produção alcoólica, estes são os gêneros mais encontrados: *Acetobacter*, *Lactobacill*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Aerobacter*, *Streptococcus*, *Leuconostoc mesenteroides* (FERMENTEC, 2002).

O número total de bactérias presentes no caldo bruto de cana-de-açúcar pode ser aumentado sensivelmente tanto por períodos prolongados entre o corte e a moagem da planta como pela falta de assepsia na moenda, filtros, bombas e tubulações que entram em contato direto com o referido material. Além da falta de limpeza dos equipamentos e de cuidados com os processos de corte e transporte da cana-de-açúcar, segundo Lima et al. (2001), a alta temperatura favorece o aumento da contaminação bacteriana principalmente de *Lactobacillus* e *Bacillus*.

Os contaminantes bacterianos presentes no caldo causam perdas de sacarose que variam de 1 kg/ton de cana, quando as condições são satisfatórias até 2,5Kg/ton de cana, quando não são adequadas (LOPES, 2007).

As bactérias competem nas dornas com a levedura para consumir os açúcares existentes no mosto, portanto os contaminantes bacterianos provocam uma diminuição no rendimento industrial, pois quando uma molécula de glicose é convertida em duas de ácido láctico resulta em duas moléculas de etanol que deixaram de serem produzidas pela levedura. Além de causar até a morte das leveduras, já que muitos nutrientes são desviados para a multiplicação bacteriana e deixam de ser aproveitados pela levedura (NARENDRANATH, 1994).

De acordo com Lopes (2007), dentre os inconvenientes causados pelos contaminantes destaca-se o consumo de açúcar, a inversão, o aumento da acidez, a produção de gomas, que obstruem trocadores de calor, canalizações e centrífugas ocasionando ainda a formação de espumas como consequência da viscosidade do caldo, ocasionado pela presença de dextrana e levana principalmente.

Outro problema causado pela presença de bactérias contaminantes em processos de fermentação alcoólica é a floculação (figura 13), que ocasiona redução na velocidade de fermentação. Além disso, constata-se que a floculação também dificulta o tratamento ácido de creme de levedura, reduz a eficiência das centrífugas e dos antibióticos comumente utilizados (ANDRIETTA et al, 2007).

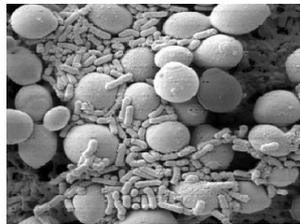


Figura 13: Ilustração das leveduras em processo de floculação por bactéria.
FONTE: ALCOOLBRAS, 2008.

3.3.3.2 Leveduras Selvagens

As leveduras constituem indubitavelmente o grupo mais importante de micro-organismos comercialmente explorados, especialmente em função de sua capacidade fermentativa. Segundo Adrietta et al. (2007), hoje se tem conhecimento que a levedura propagada no início da safra é rapidamente substituída por uma levedura nativa, isto é, que habita o ambiente da cana-de-açúcar e é introduzida no processo, denominada de levedura selvagem.

Como os substratos adicionados as dornas de fermentação (melaço e/ou caldo de cana) não são esterilizados, a fermentação etanólica é considerada um processo complexo com sucessões intensas de linhagem de leveduras. Isto favorece o desenvolvimento de linhagens de leveduras selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* e não *Saccharomyces*, que passam a predominar na população de células presentes. Mais recentemente a presença do gênero *Dekkera* (figura 14) e *Brettanomyces* tem causado problemas fermentativos no Brasil (GUERRA, 1998).

Muitas vezes essas leveduras selvagens apresentam fenótipos como floculação, formação de espuma, pseudohifas, biofilme e crescimento invasivo, as quais são características indesejáveis para a indústria (FIGUEIREDO, 2008).



Figura 14: (a) Colônias de leveduras selvagens e (b) Células alongadas e esferoidais de *Dekkera bruxellensis*.

FONTE: GUERRA, 1998; BARNETT et al., 2000.

Entre os problemas gerados, há a lentidão do processo industrial, que se torna mais lento e a destilaria acaba por produzir menor quantidade de etanol por dia em comparação com os dias em que não há esse tipo de contaminação, como consequência, diminui a moagem da cana, causando outros problemas operacionais como atrasos no cronograma de colheita (AMORIM et al., 2005).

3.3.4 Influência dos Nutrientes

Segundo Amorim et al. (2005), as células de leveduras, no processo de fermentação alcoólica, apresentam necessidades nutricionais que influenciam diretamente no brotamento, na geração de novas células, no crescimento celular e também na eficiência da transformação do açúcar em álcool. Para Kotarska (2005), os nutrientes participam do metabolismo do fermento como ativadores das enzimas.

Na produção etanol, os principais alimentos das leveduras são os açúcares: fonte de carbono, oxigênio e hidrogênio, além de outros elementos necessários para sua sobrevivência que devem estar presentes, normalmente na forma de sais, tais como: nitrogênio, fósforo, potássio, cobre, enxofre, magnésio e zinco que participam dos processos vitais da célula (NOGUEIRA et al., 2005).

Segundo Camili et.al. (2008), a concentração adequada de nutrientes é de suma importância, pois se presentes em quantidades insuficientes ou exageradas, podem refletir de forma negativa sobre o processo fermentativo. A falta de nutrientes pode acarretar consideravelmente o rendimento alcoólico e a

viabilidade celular da levedura. No caso quando uma quantidade de nutrientes é insuficiente, o fermento reproduz e conduz a fermentação lentamente ou mesmo sua reprodução é impossível.

Para todos os processos industriais em que participa a *Saccharomyces cerevisiae*, os meios de cultura devem conter necessariamente uma fonte de nitrogênio, além de uma fonte de carbono, sais e vitaminas. Segundo Harrison (1971), as principais fontes de nutrientes são para manutenção de suas estruturas celulares e de acordo com a tabela 1, os elementos principais que compõe as substâncias das células de leveduras, e que são imprescindíveis à fermentação, são: o carbono e oxigênio (açúcar) e o nitrogênio.

Tabela 1: Composição Molecular de Levedura Comercial *S. cerevisiae*

Constituinte	Levedura (g/100g substância seca)
Carbono	45,00 – 47,00
Hidrogênio	6,00 – 6,50
Oxigênio	31,00 – 32,00
Nitrogênio	7,50 – 9,00
Potássio	0,90 – 3,50
Fósforo	1,10 – 2,00
Enxofre	0,30 – 0,50
Magnésio	0,15 – 0,50
Cálcio	0,04 – 0,90
Sódio	0,02 – 0,20
Outros	Teores menores que 0,10

FONTE: HARRISON, 1971.

O efeito da interação das diferentes fontes de carbono e nitrogênio na eficiência fermentativa das leveduras industriais pode ser um fator importante para promover melhoria na eficiência fermentativa das leveduras industriais e melhorar a produção de etanol (COOPER, 1982; HORÁK, 1997).

3.3.4.1 Fonte de Carbono

As leveduras, por serem considerados organismos saprófitos, exigem

uma fonte de carbono elaborada que fornece a energia química e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares, constituídas principalmente de carbono, oxigênio e hidrogênio (HARRISON, 1971).

Os principais compostos utilizados como fonte de carbono pela levedura são os monossacarídeos (frutose, glicose e galactose) e os dissacarídeos (maltose e sacarose) (FLORES et al., 2000).

Segundo Amorim (2005), a *S. cerevisiae* utiliza preferencialmente açúcares em relação a qualquer outra fonte de carbono e a glicose é um dos importantes “primeiros mensageiros”, que age como um regulador global do mecanismo de crescimento celular.

As leveduras apresentam uma osmotolerância limitada, por esta razão, as fermentações alcoólicas são conduzidas com mostos apresentando concentrações de açúcares usualmente menores ou iguais a 20% (m/v). Concentrações acima desse valor acarretam em uma elevada pressão osmótica, que resultam em perdas de atividade de transporte de açúcar, diminuindo a produtividade de etanol, além de causar a redução em crescimento e perda da viabilidade das células de leveduras (SALMON; MURICO, 1994).

3.3.4.2 Fonte de Nitrogênio

A levedura *S. cerevisiae* utiliza o nitrogênio nas formas amoniacal (NH_4^+), amídica (ureia) ou amínica (na forma de aminoácidos), não tendo habilidade metabólica para aproveitar o nitrato e com pouquíssima ou nenhuma capacidade de utilizar as proteínas do meio. As células de leveduras podem utilizar uma ampla variedade de compostos nitrogenados como fontes de nitrogênio, inclusive amônio, aminoácidos e peptídeos (AMORIM, 2005; COOPER, 1992)

Nem todas as fontes de nitrogênio propiciam crescimento igualmente eficiente: a glutamina juntamente com o glutamato, o amônio e asparagina são considerados fontes primárias de nitrogênio, e por isso utilizados preferencialmente nas reações de biossíntese (IRAQUI et al., 1999). Quando estas fontes primárias estão limitadas ou próximas da exaustão, o organismo pode utilizar outras fontes de nitrogênio secundárias, incluindo outros aminoácidos, peptídeos (HORÁK, 1997).

A utilização de aminoácidos como fonte de nitrogênio envolve inicialmente seu transporte para interior da célula, onde pode ser utilizado

diretamente na síntese de proteínas ou para outros processos metabólicos (MAGASANIK,1992). O glutamato, glutamina e amônio desempenham funções essenciais no metabolismo central de nitrogênio (TER SCHURE et al., 1995).

Alguns compostos nitrogenados como nitratos, nitritos, lisina, creatina, aminas alifáticas e alguns aminoácidos são seletivamente utilizados por diferentes leveduras (BARNETT et al., 2000).

A presença de nitratos (NO_3^-), como fonte de nitrogênio, é um nutriente utilizado pelas leveduras do gênero *Dekkera* e não assimilado por *Saccharomyces cerevisiae*. A disponibilidade e sua utilização pelas células de *D. bruxellensis* pode conferir a esta levedura uma vantagem adaptativa em relação à *S. cerevisiae*, já que ambas podem consumir amônia, e o nitrogênio orgânico (os aminoácidos) do substrato industrial, mas apenas a primeira pode se beneficiar do nitrato presente como provável fonte de nitrogênio remanescente (PITA et al., 2011).

A ausência ou limitação de fontes de nitrogênio é o principal fator de influência na inativação dos transportadores de açúcares. O nitrogênio desempenha função essencial na fisiologia da levedura como pode aumentar a produção de enzimas como a Hexoquinase e a Glicose-6-fosfato Desidrogenase, e em fermentação com alta concentração de açúcares propicia maior rendimentos, eficiência e produtividade, além de proteger as células de levedura contra o estresse osmótico e etanólico (ALCARDE, 2012).

3.3.5 Influência da Agitação e Aeração

Para Chaves (2006), a aeração na fermentação é uma prática que consiste em introduzir ar no mosto no início da fermentação, a fim de favorecer o desenvolvimento de leveduras e, conseqüentemente, favorecer a transformação completa dos açúcares fermentáveis.

O oxigênio é necessário ao desenvolvimento das leveduras em seu processo de multiplicação, principalmente na fase inicial da fermentação sendo que as condições de anaerobiose induzem a formação de etanol e de gás carbônico. Em condições de aeração ocorre o processo respiratório, que possibilita a reprodução das leveduras, conseqüentemente a obtenção de maior massa celular viável (RODRIGUES FILHO et.al., 1999).

Segundo Muller et.al. (2007), a injeção do ar serve para agitar e aerar, eliminando o gasto de energia para agitação, e promovendo um aumento na capacidade de transferência de massa e calor.

Porém a fermentação alcoólica é inibida na presença de grandes concentrações de oxigênio, fenômeno denominado de “Efeito Pauster”, sendo mais notório esse efeito quando a levedura está na fase de crescimento (fase estacionária) (SOUZA, 2009).

Para Espinoza (2006), a aeração é necessária na fase de propagação, para ocorrer o metabolismo oxidativo com a presença de oxigênio, em que a levedura oxida os carboidratos por respiração e estimula a multiplicação intensa e formação de biomassa (figura 15). Já para Cardoso, et.al., (2006), deve-se evitar, durante a fermentação, a aeração do mosto, pois na ausência de oxigênio o metabolismo passa a ser fermentativo, em que ocorre a produção de etanol e gás carbônico.

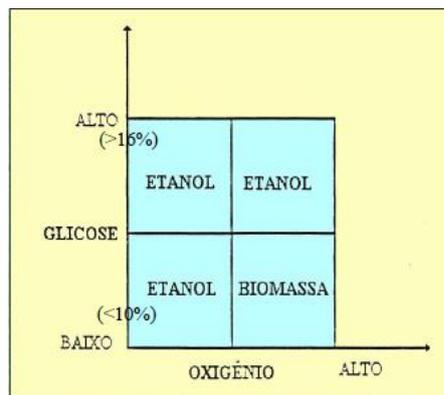


Figura 15: Efeito da concentração de oxigênio sobre o comportamento metabólico em *S. cerevisiae*.
 FONTE: LALUCE, 1991.

Mas, segundo Maia (1989), é utilizada nas dornas de fermentação condições microaeróbicas (0,5% de saturação), a qual permite a utilização do substrato, com o aumento da tolerância da levedura ao etanol, sem haver decréscimo no rendimento em etanol por unidade de substrato consumido. Tal fato se deve à síntese de ácido graxos insaturados constituintes da membrana celular, que depende da disponibilidade de oxigênio, e que aumentam a permeabilidade da membrana ao etanol.

3.3.6 Influência do Teor Alcoólico

Segundo Silva et.al. (2008), durante o processo da fermentação alcoólica origina-se uma série de compostos que podem atuar como inibidores potenciais, entre eles o etanol produzido no processo, o metabólito produzido em maior quantidade em uma fermentação alcoólica, podendo ser tóxico em uma determinada concentração, exercendo um efeito estressante na levedura.

De acordo com o mesmo autor, ao causar um forte estresse químico às células de levedura, ocorre uma inibição na multiplicação e conseqüentemente uma redução na viabilidade celular.

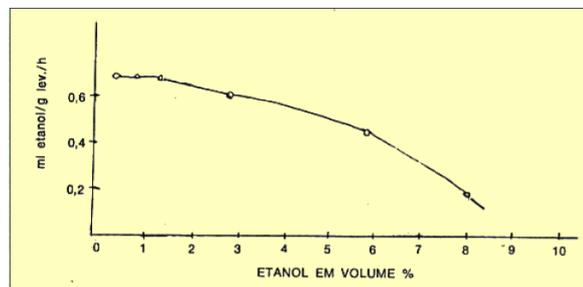


Figura 16: Influência do etanol na fermentação.
FONTE: LALUCE, 1991.

O mecanismo de inibição é complexo, entre eles temos a desnaturação e inibição de enzimas, e danos na membrana plasmática alterando sua permeabilidade (D'AMORE; STEWART, 1987). Pode-se considerar que, acima de 8°GL, o etanol já começa a dissolver a membrana da célula, efeito que aumenta com o aumento da temperatura (CRUZ et.al., 2001).

3.3.7 Influência do Sulfito

O sulfito (SO_2) é utilizado no processo de clarificação do caldo para produção de açúcar branco, e um dos componentes do melaço, resíduo da fabricação de açúcar, que pode afetar o desenvolvimento da fermentação alcoólica (AMORIM, 2005). Desde 1990, o uso de melaço na formulação dos mostos para a fermentação etanólica tem crescido bastante e com isso a concentração de sulfito no mesmo (DORTA, 2006).

Segundo Amorim e Basso (1996), o teor de sulfito no melão pode alcançar níveis de 700ppm, o que poderia resultar em mostos com cerca de 175ppm de SO₂.

Alves (1994) e Basso (2004) concluíram que até 100ppm, a presença do sulfito traz mais benefícios do que efeitos tóxicos à levedura, atuando como um bactericida, para a redução da contaminação bacteriana, que causa maiores danos ao processo que a diminuição do rendimento causado pelo sulfito. Porém acima do nível ideal, o enxofre, na forma de sulfito, aumenta a produção de glicerol e inibe o desenvolvimento das leveduras, o que contribui para a diminuição do rendimento alcoólico e viabilidade das células das leveduras (AMORIM, 2005; DORTA, 2006).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório da Escola Estadual Técnica Coronel Raphael Brandão, em Barretos, onde foram fornecidas amostras de fermento turbinado sem tratamento e mosto de fermentação por uma usina da região, que será denominada de Usina X para facilitar o entendimento do trabalho.

Primeiramente prepararam-se os reagentes necessários para as análises como: os ácidos sulfúrico e nítrico a 10% e o corante de coloração de leveduras, a eritrosina.

Após o preparo dos reagentes e ao receber o fermento turbinado da Usina X, foi realizada a análise de viabilidade celular, e feito o processo de tratamento ácido com os ácidos: sulfúrico e nítrico.

Após 30 minutos, fez-se a fermentação por 9 horas, utilizando um mosto fornecido pela Usina X e analisado previamente o pH e Brix. Depois das 9 horas, centrifugou-se o fermento e foi realizada novamente a análise de viabilidade celular do fermento tratado com ácido sulfúrico comparando com o fermento tratado com ácido nítrico, e o vinho de levedurado foi analisado o pH e Brix para qualificar a eficiência fermentativa, além das pesagens antes e depois do processo fermentativo.

Os procedimentos utilizados e metodologias utilizadas de cada análise realizada estão descritas a seguir.

4.1 PREPARO DOS REAGENTES

Para o procedimento experimental, inicialmente foram preparados alguns reagentes como: os ácidos diluídos de nítrico e sulfúrico para a realização do tratamento do fermento e a solução de eritrosina para a análise de viabilidade celular.

4.1.1 Ácido sulfúrico 10%

(a) Reagentes e Materiais utilizados:

- Ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentrado (98%);
- 1 Balão volumétrico de 100mL;

- Pisseta de 500mL com água destilada;
- Pêra;
- Pipeta graduada de 5mL.

(b) Instruções:

- Pipetou-se 10,2mL de ácido sulfúrico concentrado e transferiu para um balão volumétrico de 100mL contendo uma porção de água destilada.
- Completou-se até o menisco com água destilada.

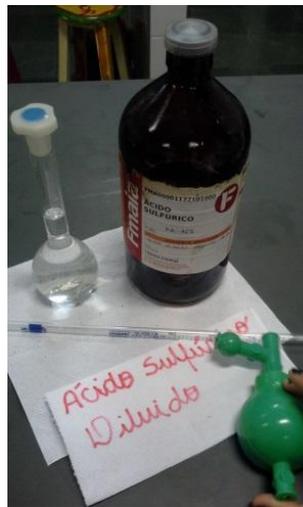


Figura 17: Preparo do ácido sulfúrico.
FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

4.1.2 Ácido nítrico 10%

(a) Reagentes e Materiais utilizados:

- Ácido nítrico (HNO_3) concentrado;
- Balão volumétrico graduado de 100mL;
- Pisseta de 500mL com água destilada;
- Pêra;
- Pipeta graduado de 5mL.

(b) Instruções:

- Pipetou-se 15,4mL de ácido nítrico concentrado e transferiu para um balão volumétrico de 100mL contendo uma porção de água destilada.
- Completou-se até o menisco com água destilada.

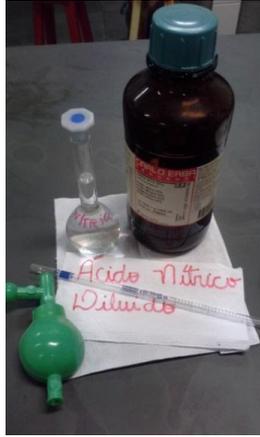


Figura 18: Preparo do ácido nítrico.
 FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

4.1.3 Solução de Eritrosina

(a) Reagentes e Materiais utilizados:

- Eritrosina;
- Solução de Na_2HPO_4 0,2 mol/L;
- Solução de NH_2PO_4 0,2 mol/L
- Pisseta de 500mL com água destilada;
- Balança analítica;
- Proveta de 100mL;
- Pipeta graduada de 1mL;
- Pêra;

(b) Instruções:

- Diluiu-se 1 grama de eritrosina em 100mL de água destilada.
- Pipetou-se 1mL desta solução em 50mL de solução tampão (partes iguais de 0,2mol/L de Na_2HPO_4 e de 0,2mol/L de NH_2PO_4).
- Guardou-se a solução pronta em refrigerador.

4.2 ANÁLISES DAS AMOSTRAS DA USINA X

A usina X forneceu para o trabalho o mosto, que foi analisado o pH e Brix e também o fermento turbinado, que foi determinado sua viabilidade celular e pH, descritas a seguir.

4.2.1 Mosto

As análises realizadas com o mosto obtido da Usina X foram baseadas na metodologia do Conselho dos Produtores de Cana-de-Açúcar (CONSECANA) do Estado de São Paulo, no Manual de Instruções, a 5ª edição do ano de 2006.

4.2.1.1 Brix

(a) Amostras e Materiais utilizados:

- Mosto;
- Papel absorvente;
- Pisseta de 500mL com álcool etílico a 95%;
- Pisseta de 500mL com água destilada;
- Conta gotas;
- Refratômetro da marca Nova.

(b) Instruções:

- Realizou-se a limpeza do refratômetro com papel absorvente e álcool etílico 95%. Calibrou-se o equipamento com a água destilada.
- Inseriu-se de 3 a 4 gotas da amostra do mosto no prisma do equipamento, e realizou-se a leitura de Brix.

4.2.1.2 pH

(a) Amostras e Materiais utilizados:

- Mosto;
- pHmetro digital PG1800 da marca GEHAKA;
- Pisseta de 500mL com água destilada;
- Papel absorvente;
- 2 Béqueres de 250mL.

(b) Instruções:

- Realizou-se a limpeza do equipamento com o auxílio de um béquer e a pisseta de água destilada, onde o mesmo foi lavado e secado posteriormente com o papel absorvente antes de se realizar a análise.

- Após a limpeza do equipamento mensurou-se aproximadamente 250mL do mosto, onde o eletrodo foi submergido sob a amostra e realizando-se a leitura digitalmente.

4.2.2 Fermento Turbinado

As análises realizadas com o fermento foram baseadas na metodologia do II Curso de Monitoramento Teórico e Prático da Fermentação Etanólica, dos coordenadores Dr^a Dejanira Franceschi de Angelis e Dr. Otávio Antonio Valsechi, do ano de 2008.

4.2.2.1 Diluição do Fermento a 30%

(a) Amostras e Materiais utilizados:

- Fermento turbinado da Usina X;
- Proveta de vidro de 100mL;
- Béqueres de 1000mL;
- Agitador mecânico da marca NOVA;

(b) Instruções:

- Diluiu-se, em béquer de 1000mL, o fermento a 30%, adicionando 700mL de água da torneira e 300mL de fermento turbinado.

- Misturou-se bem com o auxílio do agitador mecânico, obtendo um creme de levedura.



Figura 19: Creme de levedura da Usina X a 30%.
FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

4.2.2.2 Diluição do Creme de Levedura a 30% sem Tratamento a 10^{-1} e 10^{-2}

(a) Amostras e Materiais utilizados:

- Creme de levedura a 30% sem tratamento;
- Pipeta graduada de 10mL;
- Pipeta graduada de 1mL;
- Pêra;
- Tubo de ensaio;
- Pisseta de 500mL com água destilada.

(b) Instruções:

- Mediu-se 1mL do creme de levedura sem tratamento e acrescentou-se mais 9mL de água destilada e o mesmo foi colocado no tubo de ensaio, obtendo a solução com diluição 10^{-1} .

- Pipetou-se 1mL da solução 10^{-1} e adicionou-se 9mL de água destilada, obtendo a solução com diluição 10^{-2} .

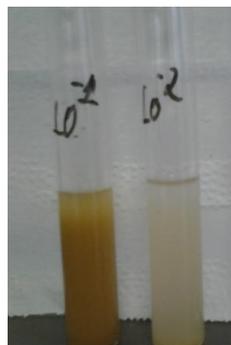


Figura 20: Soluções, de creme de levedura tratado, diluídas a 10^{-1} e 10^{-2} .
FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

4.2.2.3 Viabilidade Celular

(a) Amostras, Reagentes e Materiais utilizados:

- Amostra diluída a 10^{-1} , do creme de levedura a 30% sem tratamento;
- Amostra diluída a 10^{-2} , do creme de levedura a 30% sem tratamento;
- Solução eritrosina;
- Lamínula;
- Conta gota;
- Óleo de imersão;
- Microscópio da marca NOVA;
- Câmara de Neubauer.

(b) Instruções

- Mensurou-se 1mL do creme de levedura, sem tratamento, diluído a 10^{-1} e adicionou 1mL da solução eritrosina no tubo de ensaio, logo em seguida colocou-se uma gota da solução corada na câmara de Neubauer e a lamínula em cima da solução corada.

- Após isso, com o auxílio de um conta-gotas, adicionou-se uma gota do óleo de imersão em cima da lamínula, e visualizou-se no microscópio óptico na objetiva de 100x e realizou-se a contagem das células coradas e não coradas.

- Realizou-se o mesmo procedimento para a amostra de creme de levedura, sem tratamento, diluído a 10^{-2} .



Figura 21: Câmara de Neubauer; Materiais e Equipamento utilizados para visualização das amostras diluídas a 10^{-1} e 10^{-2} .

FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

4.3 TRATAMENTO ÁCIDO DO CREME DE LEVEDURA

(a) Amostras, Reagentes e Materiais utilizados:

- Creme de levedura sem tratamento diluído a 30%;
- Pisseta de 500mL com água destilada;
- Proveta de vidro de 100mL;
- Ácido nítrico a 10%;
- Ácido sulfúrico a 10%;
- Béqueres de 250mL;
- Agitador mecânico da marca NOVA;
- pHmetro digital PG1800 da marca GEHAKA;
- Balança semi-analítica da marca SHIMADZU;
- Pipetas graduada de 5mL;
- Pêra.

(b) Instruções:

- Mediu-se 150mL do creme de levedura e o transferiu para um béquer de 250mL. Realizou-se o mesmo procedimento em outro béquer de 250mL.
- No primeiro béquer, adicionou-se ácido nítrico 10% até pH de 2,0 a 2,3 e o mesmo foi realizado com segundo béquer, adicionando no lugar do ácido nítrico 10%, o ácido sulfúrico 10%.
- Mantiveram-se os dois béqueres em repouso com agitação constante por 2 horas.



Figura 22: Creme de levedura tratado com ácido sulfúrico e ácido nítrico.
FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

4.4 FERMENTAÇÃO DE BANCADA

Procedimento experimental baseado no procedimento descrito por Silvio Andrietta, no site da empresa de consultoria Biocontal (2012).

(a) Amostras e Materiais utilizados:

- Creme de Levedura tratado com ácido nítrico 10% (HNO_3).
- Creme de levedura tratado com ácido sulfúrico 10% (H_2SO_4).
- Mosto;
- Algodão;
- 2 Béqueres de vidro de 250mL;
- Balança semi-analítica da marca SHIMADZU;
- Proveta graduada de 100mL e 50mL;
- Banho-Maria da marca BIOPAR.

(b) Instruções:

- Adicionou-se 140mL de mosto em um béquer de 250mL previamente pesado, e realizou-se a pesagem do mesmo. Em seguida foi adicionado 60mL do creme de levedura tratado com ácido nítrico 10%, previamente pesado. Tampou-se com algodão e realizou-se a pesagem novamente.

- Após este procedimento manteve-se o Erlenmeyer em banho-maria por 8 horas a 30°C, e a cada 1 hora, agitava-o para total eliminação do gás carbônico. Ao término das 8 horas da fermentação, pesou-se o béquer novamente.

- Realizou-se o mesmo procedimento, substituindo o creme de levedura tratado com ácido nítrico 10%, pelo creme de levedura tratado com ácido sulfúrico 10%.

4.5 CENTRIFUGAÇÃO

(a) Amostras e Materiais utilizados:

- Vinho levedurado com ácido nítrico 10%;
- Vinho levedurado com ácido sulfúrico 10%;
- Proveta graduada de plástico de 10mL;
- Béquer de 250ml;
- Pipeta graduada de 5mL;
- Pêra;
- Centrífuga da marca SPENCER;
- Balança semi-analítica da marca SHIMADZU;
- Pisseta de 500mL com água destilada.

(b) Instruções:

- Mediu-se 20mL, em uma proveta, do vinho levedurado com ácido nítrico e o transferiu para o tubo da centrífuga. Fez-se o mesmo procedimento com os 11 tubos restantes da centrífuga.

- Centrifugaram-se os 12 tubos contendo a amostra, a 3500 rotações por minuto (rpm) por 5 minutos.

- Com o auxílio de uma pipeta, retirou-se o vinho e coletou-se o fermento no fundo dos tubos de ensaio, armazenando-o em um recipiente.

- Realizou-se esse procedimento até finalizar a separação do fermento de toda a amostra de vinho levedurado com ácido nítrico., obtendo o fermento e o vinho de levedurado.

- Realizou-se o mesmo procedimento para separar o fermento do vinho na amostra de vinho levedurado com ácido sulfúrico.



Figura 23: Processo de separação do vinho levedurado por centrifugação.
 FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

4.6 ANÁLISES DOS FERMENTOS TRATADOS PÓS-FERMENTAÇÃO

As análises realizadas com o fermento foram baseadas na metodologia do II Curso de Monitoramento Teórico e Prático da Fermentação Etanólica, dos coordenadores Dr^a Dejanira Franceschi de Angelis e Dr. Otávio Antonio Valsechi, do ano de 2008. Para as análises dos fermentos tratados, após a fermentação de 8 horas, realizou-se uma diluição de 30% tanto no fermento tratado com ácido nítrico quanto no fermento tratado com ácido sulfúrico, obtendo dessa forma o creme de levedura tratado com ácido nítrico e o creme de levedura tratado com ácido sulfúrico.

4.6.1 Diluição do Creme de Levedura a 10^{-1} e 10^{-2}

(a) Amostras e Materiais utilizados

- Pipeta graduada de 10mL;
- Pêra;
- Tubo de ensaio;
- Creme de levedura tratado com ácido nítrico 10%;
- Creme de levedura tratado com ácido sulfúrico 10%;
- Pisseta de 500mL com água destilada.

(b) Instruções

- Após a centrifugação do fermento, mediu-se 1mL do creme de levedura tratado com ácido nítrico e acrescentou-se mais 9mL de água destilada e o mesmo foi colocado no tubo de ensaio, obtendo a solução com diluição 10^{-1} .

- Pipetou-se 1mL da solução 10^{-1} e adicionou-se 9mL de água destilada, obtendo a solução com diluição 10^{-2} .

- O mesmo procedimento foi realizado com o cremes de levedura tratado com ácido sulfúrico.

4.6.2 Viabilidade Celular

(a) Amostras e Materiais utilizados

- Amostra diluída a 10^{-1} , do fermento tratado com nítrico;
- Amostra diluída a 10^{-1} , do fermento tratado com sulfúrico;
- Solução eritrosina;
- Lamínula;
- Conta gota;
- Óleo de imersão;
- Microscópio da marca NOVA;
- Câmara de Neubauer.

(b) Instruções

- Mensurou-se 1mL do creme de levedura tratado com ácido nítrico, diluído a 10^{-1} e adicionou 1mL da solução eritrosina no tubo de ensaio, logo em seguida colocou-se uma gota da solução corada na câmara de Neubauer e a lamínula em cima da solução corada.

- Após isso, com o auxílio de um conta-gotas, adicionou-se uma gota do óleo de imersão em cima da lamínula, e visualizou-se no microscópio óptico na objetiva de 100x e realizou-se a contagem das células coradas e não coradas.

- Realizou-se o mesmo procedimento para a amostra de creme de levedura tratado com ácido sulfúrico, diluído a 10^{-1} .

4.7 ANÁLISES DOS VINHOS DELEVEDURADOS

As análises realizadas com os vinhos delevedurados foram baseadas na metodologia do Conselho dos Produtores de Cana-de-Açúcar (CONSECANA) do Estado de São Paulo, no Manual de Instruções, a 5ª edição do ano de 2006.

4.7.1 Brix

(a) Amostras e Materiais utilizados:

- Vinho delevedurado com ácido nítrico 10%;
- Vinho delevedurado com ácido sulfúrico 10%;
- Papel absorvente;
- Pisseta de 500mL com álcool etílico a 95%;
- Pisseta de 500mL com água destilada;
- Conta gotas;
- Refratômetro da marca Nova.

(b) Instruções:

- Realizou-se a limpeza do refratômetro com papel absorvente e álcool etílico 95%. Calibrou-se o equipamento com a água destilada.

- Inseriu-se de 3 a 4 gotas da amostra do vinho delevedurado com ácido nítrico a 10% no prisma do equipamento, e realizou-se a leitura de Brix.

- Realizou-se o mesmo procedimento com o vinho delevedurado com ácido sulfúrico 10%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FERMENTO TURBINADO FORNECIDO PELA USINA X

Como exposto na metodologia do trabalho, após receber o fermento turbinado da Usina X, foi feita uma diluição com água destilada a 30% e com uma alíquota do creme de levedura a 30%, foi feita as diluições de 10^{-1} e 10^{-2} para análise de viabilidade celular, ou seja, para determinar a condição do fermento antes de passar por um tratamento ácido e um processo fermentativo de bancada.

5.1.1 Análise de Viabilidade Celular do Fermento antes do Tratamento

Ao visualizar as amostras diluídas de 10^{-1} e 10^{-2} do fermento a 30% e coradas com eritrosina, observou-se que para contagem das leveduras coradas e não coradas para a determinação da viabilidade celular do fermento, a amostra diluída a 10^{-2} apresentou-se melhor, devido as células das leveduras estarem mais espalhadas em comparação com a amostra diluída a 10^{-1} , conforme figura 24.

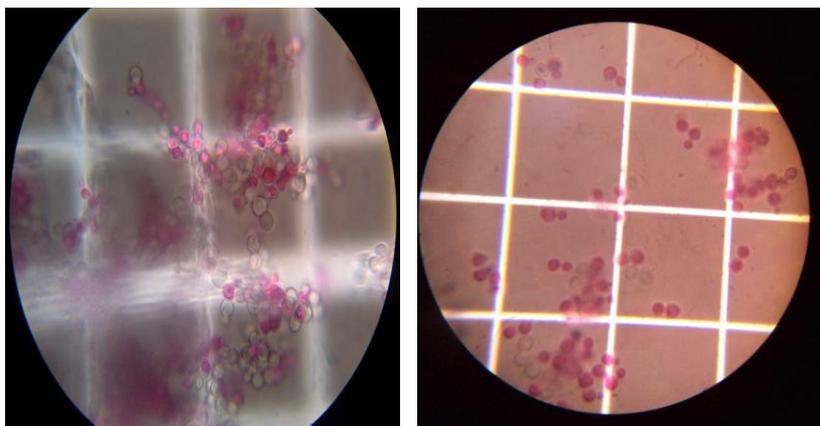


Figura 24: Visualização por microscopia do fermento corado com eritrosina e diluído a: (a) 10^{-1} e (b) 10^{-2} , ambos sem tratamento.

FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Em ambas as amostras analisadas, pode-se observar previamente uma grande quantidade de leveduras coradas e poucas células não coradas, ou seja, o fermento apresentou uma maior quantidade de leveduras mortas do que vivas. E ao se realizar a contagem (dos quadrantes centrais) das leveduras coradas

(mortas) e não coradas (vivas), na câmara de Neubauer, da amostra diluída a 10^{-2} , e realizar o cálculo de viabilidade de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{viabilidade celular} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células vivas}}{\text{n}^\circ \text{ de células totais}} \times 100$$

Obteve-se o seguinte resultado conforme tabela 2

Tabela 2: Resultados da contagem de leveduras coradas e não coradas da amostra diluída a 10^{-2} , para determinação da viabilidade celular do fermento não tratado da Usina X.

n° de células vivas	n° de células mortas	n° de células totais (vivas + mortas)	Viabilidade celular (%)
128	172	300	42,7

FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Através do resultado obtido da viabilidade celular muito abaixo do valor ideal (de 92%), pode-se concluir que o fermento analisado estava com mais células mortas do que vivas, ocorrendo à necessidade urgente de um tratamento nesse fermento, para a sua revigoração, ficando impossibilitado de ser reutilizado em um processo fermentativo nessas condições.

5.2 TRATAMENTO ÁCIDO DO FERMENTO A 30%

Ao realizar dois tratamentos ácidos simultâneos, de 150mL de fermento diluído a 30%, um com ácido sulfúrico 10% e outro com ácido nítrico a 10%, mediu-se a quantidade gasta dos ácidos que foram adicionados ao fermento, em constante agitação, até o pH de 2,30, conforme tabela a seguir.

Tabela 3: Resultados das dosagens dos ácidos sulfúrico e nítrico e dos pHs do tratamento ácido

	pH inicial do fermento a 30%	pH final do fermento tratado a 30%	Dosagem de ácido (mL)
Tratamento com Ácido sulfúrico 10%	4,35	2,30	0,43
Tratamento com Ácido nítrico 10%	4,35	2,30	0,84

FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Com os resultados, de acordo com a tabela 3, notou-se que houve quase o dobro da dosagem de ácido no tratamento com ácido nítrico comparado com o tratamento com o ácido sulfúrico. Lembrando que ambos são ácidos fortes e que foi utilizado com a mesma concentração de 10%, o que se esperava utilizar a mesma quantidade, o que pode ser somente devido um erro na medida. O ideal seria usar um volume maior que o 150 mL de solução utilizado na prática contendo o fermento para então se ter uma quantidade maior de ácido para ajustar do pH e poder verificar se esta diferença na dosagem continuaria para ser considerada considerável ou não.

Foi preparado 100mL de solução 10% de cada um dos ácido utilizados, ao analisar a dosagem de cada um deles e considerando que fosse realizado o tratamento ácido de 150mL do fermento nas mesmas condições que o analisado, seria possível tratar 232 vezes o fermento com ácido sulfúrico a 10%, já no caso do ácido nítrico a 10% seria possível tratá-lo 119 vezes, o que mostrou uma desvantagem inicial do tratamento ácido com ácido nítrico devido ao seu alto consumo diante do ácido sulfúrico.

Devido a essa diferença (que pode ou não ser da medida ou do processo) na dosagem dos ácidos no tratamento da levedura, realizou-se um estudo caso de cada um dos tratamentos realizados para quantificar os custos e verificar a viabilidade econômica do tratamento ácido de bancada e industrial.

5.2.1 Quantificação do Custo do Tratamento Ácido de Bancada

Como discutido anteriormente, o ácido sulfúrico a 10% trataria o fermento mais vezes do que o ácido nítrico. Ao igualar a quantidade de tratamentos dos ácidos, considerando em 119 vezes, seria necessário utilizar 5,23mL de ácido sulfúrico concentrado e 15,4mL de ácido nítrico para prepará-los a 10%, concentração utilizada na prática.

Para quantificar os custos desses tratamentos ácidos realizados, buscaram-se: os preços do ácido sulfúrico a 98% e do ácido nítrico a 65%, site da empresa Quimibras. Através desses dados, obtiveram-se os seguintes dados conforme tabela 4.

Tabela 4: Resultados dos preços por quilo dos ácidos concentrados: sulfúrico e nítrico.

	Ácido Sulfúrico	Ácido Nítrico
	98%	65%
Preço (R\$ / L)	10,60	11,70
Consumo para 119 tratamentos ácidos (L)	0,00523	0,0154

FONTE: EMPRESA QUIMIBRAS; PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Portanto para se determinar o custo que seria para tratar 119 vezes, 150mL de fermento nas mesmas condições, principalmente de pH, foi feito a multiplicação do preço do ácido por litro e seu consumo em litros, o que resultou em um custo de R\$0,0554 para o tratamento com ácido sulfúrico e de R\$0,180 para o tratamento com ácido nítrico.

Tabela 5: Custos dos tratamentos de bancada com ácido sulfúrico e ácido nítrico.

	Tratamento com ácido sulfúrico	Tratamento com ácido nítrico
Custo (R\$)	0,055	0,180

FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Concluindo que o gasto do tratamento de bancada realizado com ácido nítrico seria de aproximadamente 3 vezes mais caro do que o com ácido sulfúrico.

5.2.2 Quantificação do Custo do Tratamento Ácido em escala Industrial

Para calcular o custo dos tratamentos em escala industrial, buscou-se, primeiro, a quantidade utilizada de ácido sulfúrico concentrado por dia, na Usina X que forneceu o fermento. A partir dos dados do preço dos ácidos na mesma concentração, e do gasto de ácido sulfúrico, fornecidos pela Usina X, calculou-se o gasto que a usina teria ao usar os dois ácidos considerando que o ácido nítrico é utilizado o dobro que o ácido sulfúrico, nas mesmas concentrações, de acordo com os resultados obtidos na prática.

Tabela 6: Custos dos tratamentos industriais com ácido sulfúrico e ácido nítrico.

	Tratamento Industrial com Ácido sulfúrico	Tratamento Industrial com Ácido nítrico
Consumo por dia (kg)	10.350*	20.700**
Preço (R\$/kg)	1,60	2,49
Gasto por dia (R\$)	16.560	51.543

* Baseado na Usina X; ** Baseado na prática que o consumo é o dobro.

FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Portanto, de acordo com a tabela 6, uma usina de grande porte gastaria em torno de R\$ 16.560,00 por dia com o tratamento utilizando o ácido sulfúrico e gastaria em torno de R\$ 51.5543,00 por dia com o tratamento utilizando o ácido nítrico, um valor muito alto, três vezes mais caro, que poderia ser uma desvantagem desse tratamento em comparação com do ácido sulfúrico.

Porém se considerasse o mesmo gasto para ambos os ácidos, o que era o esperado, o gasto com o ácido nítrico sairia em torno de R\$25.771,50, mesmo assim um gasto maior do que com o ácido sulfúrico.

5.3 FERMENTAÇÃO DE BANCADA

Após o tratamento do fermento tanto com ácido sulfúrico quanto com o ácido nítrico, ambos foram utilizados para a realização do processo fermentativo do mosto, fornecido pela Usina X, por 8 horas (figura 25).

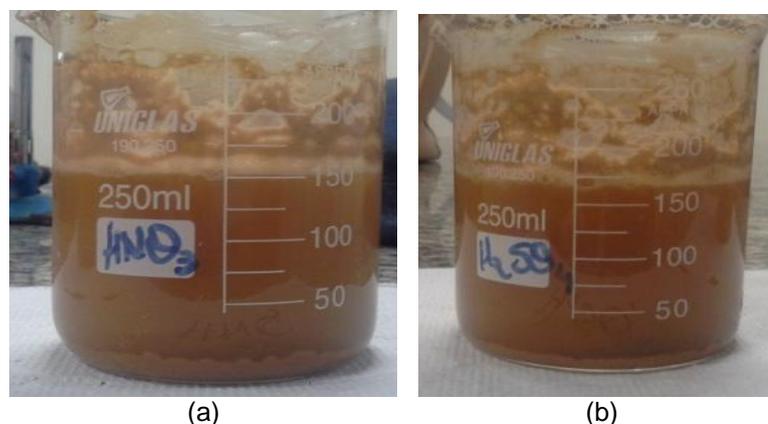


Figura 25: Aspecto visual do fermento tratado após 8 horas de fermentação com ácido nítrico (a) e ácido sulfúrico (b)

FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Através das pesagens realizadas antes e após a fermentação, obtiveram-se os resultados expostos na tabela 7.

Tabela 7: Resultados das pesagens realizadas no início e final do processo fermentativo.

	Fermentação com fermento tratado com ácido sulfúrico	Fermentação com fermento tratado com ácido nítrico
Béquer de 250mL vazio	102,10g	102,10g
Béquer de 250mL com mosto	249,20g	251,62g
Béquer de 250mL com mosto e o fermento tratado	303,40g	302,50g
Béquer de 250mL com vinho levedurado	269,36g	262,12g

FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Com as pesagens realizadas, foi possível determinar as massas do mosto utilizado com o fermento tratado e do vinho levedurado obtido, em cada fermentação, através da subtração da massa do béquer vazio nas massas das amostras, conforme tabela 8.

Tabela 8: Massas do mosto com fermento tratado e do vinho levedurado.

	Fermentação com fermento tratado com ácido sulfúrico	Fermentação com fermento tratado com ácido nítrico
Mosto	147,10g	149,52g
Mosto com fermento tratado	201,30g	200,40g
Fermento Tratado	54,20g	50,88g
Vinho levedurado	167,26g	160,02g

FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

No caso da fermentação com o fermento tratado com ácido sulfúrico utilizou-se mais fermento e menos mosto comparado a fermentação com o fermento

tratado com ácido nítrico. Porém essa diferença de massas entre os dois processos fermentativos é desprezível, já que a concentração de fermento nas duas soluções foi semelhante, de 27% do fermento tratado com ácido sulfúrico e 25% do fermento tratado com ácido nítrico.

Ao comparar as massas do mosto com o fermento tratado e do vinho levedurado, observou-se uma perda de massa durante os dois processos fermentativos, como se pode observar na tabela 9.

Tabela 9: Perda de Massa dos Processos Fermentativos

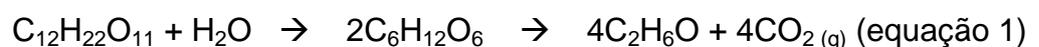
	Fermentação com fermento tratado com ácido sulfúrico	Fermentação com fermento tratado com ácido nítrico
Perda de Massa	34,04g	40,36g

FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

O processo fermentativo ocorre quando a levedura consome o açúcar, liberando etanol e gás carbônico, conforme reação a partir da glicose: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_6O + 2CO_2$. E como o processo realizado na prática foi feito em béqueres abertos, o gás carbônico produzido foi liberado para a atmosfera, portanto a massa perdida no processo se refere a massa de gás carbônico produzido, e quanto mais gás carbônico foi liberado, mais etanol foi produzido.

Portanto através dos resultados da tabela 9, se pode concluir que mesmo com uma quantidade próxima de amostras no início da fermentação a que foi realizada com o fermento tratado com ácido nítrico obteve maior produtividade mesmo utilizando menos fermento tratado, pois ao perder mais massa durante a fermentação, produziu mais gás carbônico e conseqüentemente produziu mais etanol se comparado com os resultados da fermentação com o fermento tratado com ácido sulfúrico, demonstrando um ponto favorável para a utilização do ácido nítrico.

Através da produção de CO_2 é possível se obter pela estequiometria da reação de fermentação a partir de sacarose o quanto se produziu de etanol também.



De acordo com a equação 1, 342g de sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) produzem 360g de açúcares redutores totais ($C_6H_{12}O_6$) que por sua vez produzem 184g de etanol (C_2H_6O) e 176g (CO_2), ou seja, cada quilograma de gás carbônico produzido

correspondem a 1,04g de etanol. Portanto, no caso da fermentação com o fermento tratado com ácido sulfúrico ao formar 34,04g de gás carbônico, produziu 35,40g de etanol e no caso da fermentação com fermento tratado com ácido nítrico ao formar 40,36g, produziu 41,97g de etanol.

Tabela 10: Produção de Etanol nos Processos Fermentativos

	Fermentação com fermento tratado com ácido sulfúrico	Fermentação com fermento tratado com ácido nítrico
Etanol Produzido	35,40g	41,97g

FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Mesmo com uma concentração menor de fermento na fermentação com o fermento tratado com ácido nítrico, o mesmo apresentou uma produção maior (de 6,57g) de etanol, comparado com a fermentação com o fermento tratado com ácido sulfúrico, um valor significativo de uma produção de 1,20 vezes maior.

E para verificar se o tratamento com ácido nítrico compensaria, foi feita uma análise de custo benefício, considerando o quanto a usina ganharia com a produção de álcool e o quanto gastaria com a dosagem dos ácidos no tratamento da levedura.

5.3.1 Análise da Viabilidade Econômica do Tratamento Ácido

Para a determinação do custo benefício de cada tratamento ácido realizado, obtiveram-se dados de densidade do etanol e o preço de venda do etanol no mercado. Com esses dados, foi possível calcular a receita que seria obtida com a venda do etanol produzido, considerando perda de 0% na fabricação do etanol hidratado em ambos os processos. Primeiro transformaram-se os valores de massa de etanol produzido em volume, e com o preço de venda por litro foi possível calcular a receita que cada fermentação realizada teria, conforme tabela 11.

Tabela 11: Produção de Etanol nos Processos Fermentativos de Bancada e Receita obtida

	Fermentação com fermento tratado com ácido sulfúrico	Fermentação com fermento tratado com ácido nítrico
Massa de etanol Produzido	35,40g	41,97g
Densidade do Etanol a 25°C (g/L)*	805	
Volume de etanol produzido	0,0440L	0,0521L
Preço de Mercado (R\$/L)**	1,143	
Receita (R\$)	0,0503	0,0596

* Dado obtido do Site Sindipetroleo; ** Dado obtido do Site UDOP, referente ao dia 28/05.

FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Como os cálculos foram realizados baseados em volumes obtidos nas fermentações de bancada, a diferença de receita de cada processo deu um valor muito pequeno de R\$0,01. Porém ao projetar para a escala industrial, pesquisou a produção de etanol hidratado por dia em uma usina de grande porte e com tratamento ácido com ácido sulfúrico e considerou uma produção de 150.000 L/dia, baseado em dados do BNDES. De acordo com a prática, a produção com tratamento ácido com ácido nítrico é 1,2 vezes maior do que com o ácido sulfúrico, considerando as mesmas condições de produção, portanto a produção, nesse caso, seria de 180.000 L/dia.

Com base nos dados de produção industrial e considerando o mesmo preço de venda do etanol hidratado, calculou-se a receita em escala industrial de ambos os processos, conforme tabela 12.

Tabela 12: Produção de Etanol nos Processos Fermentativos Industrial e Receita obtida

	Fermentação com fermento tratado com ácido sulfúrico	Fermentação com fermento tratado com ácido nítrico
Volume de etanol Produzido	150.000 L/dia	180.000L/dia
Preço de Mercado (R\$/L)**	1,143	
Receita (R\$)	171.450	205.740

* Dado obtido do Site BNDES; ** Dado obtido do Site UDOP, referente ao dia 28/05.
 FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Ao analisar os resultados dos cálculos, notou-se que em escala industrial a diferença entre as receitas de cada processo fermentativo foi de R\$34.290,00, um aumento de receita de 20% com a utilização do tratamento ácido com ácido nítrico.

Para projetar o custo-benefício dos tratamentos ácidos realizados, calculou-se, portanto, o lucro diário que a usina teria com cada tratamento ao considerar a receita e o gasto com o ácido em escala industrial, conforme tabela 13.

Tabela 13: Projeção do Custo, Receita e Lucro Industrial dos Tratamentos Ácidos

	Fermentação com fermento tratado com ácido sulfúrico	Fermentação com fermento tratado com ácido nítrico
Receita da produção de etanol hidratado (R\$/dia)	171.450	205.740
Custo com ácido (R\$/dia)	16.560	51.543
Lucro (R\$/dia)¹⁵⁴	154.890	154.197

* Dado obtido do Site BNDES; ** Dado obtido do Site UDOP, referente ao dia 28/05.
 FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Portanto, devido a uma diferença de dosagem em mililitros dos ácidos, não se pode afirmar certamente qual dos ácidos traria mais vantagens econômicas, sabendo somente que com o ácido nítrico houve uma maior produção de etanol, e, portanto geraria maior receita para a Usina, e mesmo com o seu custo maior do que do ácido sulfúrico. Ao considerar a diferença de dosagem da prática, o dobro do ácido nítrico, que poderia ser um erro de medida, os lucros dos dois tipos de tratamentos com a produção do etanol seriam bem semelhantes, em torno de 155 a 154 mil reais, com pouca diferença entre os valores. Porém se fosse considerado a mesma dosagem de ambos os ácidos, o ácido nítrico apresentaria um lucro muito maior do que o ácido sulfúrico, em torno de aproximadamente 180 mil reais de lucro comparado com 155 mil reais de lucro com o uso do ácido sulfúrico, um aumento de 16% na lucratividade do processo.

Portanto para maiores confirmações desses benefícios econômicos, seria necessária a aplicação desta prática em escala semi-industrial ou industrial, com volumes maiores, para melhor quantificação do processo.

5.4 ANÁLISE DO MOSTO, VINHO DELEVEDURADO

Através das análises antes e após a fermentação, tanto do fermento quanto do mosto e vinho delevedurado, foi possível determinar e comparar a eficiência fermentativa dos dois processos fermentativos realizados com fermentos tratados de forma diferente, a ser discutido a seguir.

5.4.1 pH do Mosto

Antes de se iniciar o processo fermentativo foi realizado a análise de pH do mosto para verificar se estava dentro dos parâmetros ideais de 4,0 a 5,0.

Tabela 14: Resultado de pH do mosto.

Mosto	
pH	4,15

FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Através do resultado obtido, o mosto encontrava-se dentro dos valores ideais, que permitiria uma boa atividade da enzima invertase, responsável pela

quebra da molécula de sacarose em glicose e frutose favorecendo o processo fermentativo.

5.4.2 Brix do Mosto e Vinho Delevedurado

Foram também realizadas as análises de Brix do mosto utilizado na fermentação e do vinho delevedurado obtido após a centrifugação do caldo fermentado para verificar o consumo de açúcares no processo fermentativo, que está indiretamente relacionado às perdas e à produção de etanol.

Tabela 15: Resultados de Brix do mosto e do vinho delevedurado.

	Brix (%)
Mosto	19,3
Vinho delevedurado (ácido sulfúrico)	6,8
Vinho delevedurado (ácido nítrico)	6,2

FORNE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Pelos valores obtidos de Brix, o mosto encontrou-se com o Brix dentro dos valores ideais de 16 a 22°Brix, evitando o estresse das leveduras e consequentemente possíveis perdas do processo fermentativo.

No caso dos Brix dos vinhos delevedurados, notou-se uma queda significativa de 12,5 a 13,4° Brix, confirmando que houve o consumo dos açúcares no processo e consequentemente a produção de etanol e gás carbônico, porém em ambos os casos haveria perdas no processo fermentativo, devido a sobra de açúcares do vinho. Ao comparar os vinhos delevedurados, no caso da fermentação com o fermento tratado com ácido nítrico houve uma queda maior do Brix, e, portanto um consumo maior de açúcar do que com o ácido sulfúrico, e quanto maior o consumo de açúcar, maior será a produção de etanol.

Portanto através da análise de Brix dos vinhos delevedurados, pode-se qualificar que o fermento tratado com ácido nítrico teve uma maior eficiência fermentativa, com consumo discretamente superior quando comparado com o fermento tratado com ácido sulfúrico.

5.5 ANÁLISE DO FERMENTO TRATADO APÓS FERMENTAÇÃO

Ao centrifugar o vinho levedurado, obteve-se o fermento em ambos os processos fermentativos e após a realização das diluições de 30% e 10^{-2} , foram feitas as visualizações na câmara de Neubauer das amostras coradas com eritrosina para contagem das leveduras vivas e mortas, conforme tabela 16.

Tabela 16: Resultados da contagem do fermento tratado

	Fermento tratado com ácido sulfúrico	Fermento tratado com ácido nítrico
Números de células vivas	120	144
Números de células mortas	86	88
Números de células totais	206	232

FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

Após a contagem, realizou-se o cálculo para determinar a viabilidade dos fermentos e compará-los com a viabilidade do fermento antes de passar pelo processo de tratamento ácido e fermentação.

Tabela 17: Resultados da viabilidade celular dos fermentos tratados e não tratados

	Fermento não tratado	Fermento tratado com ácido sulfúrico	Fermento tratado com ácido nítrico
Viabilidade Celular	42,7%	62%	58%

FONTE: PRÓPRIO AUTOR, 2015.

E ao comparar os valores, conforme tabela 17, notou-se um aumento da viabilidade celular em ambos os tratamentos ácidos realizados se comparado com o fermento não tratado que já veio da Usina X bem debilitado. Observou-se também que as leveduras vivas do tratamento com ácido nítrico estão em maior quantidade do que as do ácido sulfúrico, o que demonstra que o ácido nítrico foi mais benéfico do que o ácido sulfúrico favorecendo o desempenho das leveduras.

6. CONCLUSÕES

Nas condições experimentais conduzidas no presente trabalho, podemos concluir que o tratamento ácido com a utilização do ácido nítrico no lugar do ácido sulfúrico apresentou como vantagens produtivas:

- o aumento da viabilidade celular do fermento;
- o aumento da produtividade de etanol;
- o aumento da receita com a produção do etanol;
- o aumento do consumo de açúcares do mosto pelas leveduras;
- a diminuição das perdas de açúcares no vinho de levedurado durante o processo fermentativo;

Porém ao se projetar os valores de receita, custo e lucro em escala industrial, baseado em dados empíricos e de usinas de grande porte, com a substituição do ácido utilizado no processo de tratamento do fermento, o ácido nítrico, baseado na prática com uma dosagem a mais de apenas 0,4mL, um volume que pode ser considerado um erro de medida, mostrou uma lucratividade muito semelhante do tratamento ácido convencional com ácido sulfúrico, mas se não ocorresse essa diferença, considerando uma mesma dosagem de ambos os ácidos, a lucratividade na escala industrial com a utilização do ácido nítrico seria de 16% a mais comparada com o uso do ácido sulfúrico, se tornando viável economicamente, mesmo sendo um ácido mais caro no mercado, sendo necessário um estudo melhor com utilização de volumes maiores na próxima pesquisa para confirmação da análise de custo benefício.

Além disso, o trabalho foi feito em escala laboratorial, portanto para ser aplicado a uma escala industrial seria preciso mais estudos e análises mais específicas para realmente comprovar as vantagens e desvantagens do uso do ácido nítrico, já que o controle em escala de bancada é muito mais fácil do que em escala industrial. E também como foi mencionado na revisão de literatura, seria preciso identificar o tipo de levedura durante as realizações dos tratamentos, ou seja, seria necessário a realização de inúmeras repetições da metodologia adotada no trabalho, pois o nitrato liberado pelo ácido nítrico não é muito assimilado pela levedura utilizada na prática, a *Saccharomyces cerevisiae*, mas é assimilada por leveduras selvagens, como a *Dekkera bruxellensis*, o que seria uma grande

desvantagem caso com a utilização do ácido nítrico, ocorresse uma proliferação de leveduras selvagens com baixo rendimento fermentativo.

Portanto o trabalho necessitaria de mais tempo para realmente chegar a uma conclusão se o tratamento do fermento com ácido nítrico poderia estar substituindo o ácido sulfúrico. Podendo somente concluir que com a mudança do ácido utilizado no tratamento do fermento, houve mudanças significativas no processo fermentativo e de produção do etanol, que deveriam ser refeitas para melhor verificação e comprovação dos resultados obtidos aqui.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCARDE, A. R. **Produção de etanol combustível: efeitos do nitrogênio livre na fermentação de mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcares.** ESALQ/USP. Piracicaba-São Paulo, 2012.

- ALTHERUM, F.; CRUZ, M. R. M.; VAIRO, M. L. R.; GAMBASSI, P. M. **Efeito dos micro-organismos contaminantes da fermentação alcoólica nas microdestilarias.** STAB Açúcar Álcool e Subprodutos. Piracicaba, v. 3, n.1, p-42-45, 1984.

- ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a formação de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica.** (Tese de Doutorado). ESALQ. Piracicaba, 199p. 1994.

- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool – controle e monitoramento.** Piracicaba: FERMENTEC/ESALQ-USP, 1996.

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

- AMORIM, H. V. **Usina da Superação.** 14° SBA. Seminário. STAB. 30 e 31 de outubro de 2013.

- ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. **Bioethanol – 30 years of Proálcool.** International Sugar Journal. Campinas, v 109, n1299, p.195-200, 2007.

- ANGELIS, D. F. de; VALSECHI, O. A. **II Curso de Monitoramento Teórico e Prático da Fermentação Etanólica**. Rio Claro, 2008. Disponível em: http://www.cca.ufscar.br/~vico/2%20monitoramento/apostila_1.pdf. Acesso em 19/04/2015.
- ANTONINI, S. R. C. **Microbiologia da Fermentação Alcoólica, A Importância do Monitoramento Microbiológico em Destilarias**, São Carlos, EdUFSCar, 2010, 106 p., il.
- BARNETT, J. A. et al. **Yeast, characteristics and identification**. 4th ed. Cambridge University Press, 2000, 811 p.
- BASSO, L. C. **Fisiologia e ecologia microbiana**. I Workshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas. ESALQ/USP, 2004.
- BASSO, L. C.; AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; LOPES, M. L. **Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil**. FEMS Yeast Research, Amsterdam, v.8, p. 1155-1163, 2008.
- BIANCONI, M. L. **Efeito do pH na Atividade Enzimática**. IBqM / UFRJ. Rio de Janeiro, 2006.
- BIOGEO. **Fermentação e Respiração Aeróbia**. Abril de 2009. Disponível em: <https://biogeo10.wordpress.com/2009/04/29/fermentacao-respiracao-aerobia/>. Acesso em 02/04/15.
- BOSCO, F. **Fermentando rendimento**. Revista Alcoolbras, edição 127. 2010.
- BOVI, R.; MARQUES, M. O. **O tratamento ácido na fermentação alcoólica**. STAB Álcool & Açúcar. Piracicaba, v.3, n.9, p.10-13, 1983.

- BRASIL. Ministério de Minas e Energia (MME) e Empresa de Pesquisa Energética (EPE). Secretaria de Petróleo, Gás Natural e Combustíveis Renováveis. **Boletim Mensal dos Combustíveis Renováveis**. nº 38, fev. 2011. Disponível em: <http://www.ubrabilio.com.br/sites/1700/1729/00000276.pdf>. Acesso em 16/12/14.
- CABRAL, G. J. et.al. **Cachaça**. UFSC Florianópolis. 2006. Disponível em: www.enq.ufsc.br/labs/probio/disc_eng1/cachaca.doc. Acesso 04/04/15
- CAMILI, E. A.; CABELLO, C. **Produção de Etanol de Tratada com Processo de Flotação**. 2006
- CARDOSO, M. das G.; CAMPOS, G. A. et al. **Cachaça: Qualidade e Produção**. 2006.
- CARLESSO NETO, O.; VERÍSSIMO, M. P. **Expansão da Agricultura Canavieira e a Geração de Energia Alternativa no Brasil**. Vol. 5. Nº 1. Julho, 2011.
- CHAVES, J. B. **Cachaça: Capixaba - Um pouco de História: Informações Técnicas Básicas para a Produção de Cachaça Artesanal de Qualidade**. 2006.
- COELHO, P. **SACCHAROMYCES CEREVISIAE**. Setembro de 2013. Disponível em: <http://www.engquimicasantosp.com.br/2013/09/saccharomyces-cerevisiae.html>. Acesso em 02/04/15.
- CONSECAN. **Manual de Instruções**. 5ª edição. Piracicaba-SP. 2006. Disponível em: http://www.orplana.com.br/manual_2006.pdf. Acesso em 19/04/2015.

- COOPER, T. G. **Nitrogen metabolism in Saccharomyces cerevisiae**. In: Strathern J N, Jones E W, Broach J B, editors; Strathern J N, Jones E W, Broach J B, editors. The molecular biology of the yeast Saccharomyces. Metabolism and gene expression. New York, v. 1, p.39-99, 1982.

- CRUZ, S. H. da et.al. **Por uma Fermentação Mais Saudável**. 2001.

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

- 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.

- DUARTE, J. C.; LOURENÇO, V.; RIVEIRO, B. **Continuous culture of flocculent yeast for ethanol production**. Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Biotechnology Department, Portugal, 2006.

- EPE – EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA. **Análise de Conjuntura dos Biocombustíveis**. Janeiro 2010 – Dezembro 2010. Mai. de 2011.

- EPSTEIN, I.; GROSSOWICZ, N. **Prototrophic thermophilic Bacillus – Isolation properties, and kinetics of growth**. J. Bacteriol., v. 99, n°2, p.414, 1969.

- ESPINOZA, L. J. S. **Tecnologia de Produção de Cachaça: Princípios do Processo de Produção de Cachaça de Qualidade**. UFLA- MG, 2006.

- FERMENTEC S/C LTDA. **Processo de Fabricação de álcool**. Piracicaba, SP, 2002. 108 p.

- FIGUEIREDO, C. M. **Análise molecular da flocculação e formação de espuma por leveduras utilizadas na produção industrial de álcool combustível no Brasil.** 2008. 71p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

- FLORES, C. L.; RODRIGUEZ, C.; PETIT, T.; GANCEDO, C. **Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non- conventional yeasts.** FEMS Microbiology Reviews, Madrid, v. 24, p. 507-529, 2000.

- FURTADO, T. A.; SCANDIFFIO, M. G. **Álcool no Brasil - Uma longa história.** Scientific American Brasil, p.66-71, Out. 2006.

- GALLO, C. R. **Determinação da microbiota bacteriana de mosto e de dornas de fermentação alcoólica.** Campinas. 1989, 388p. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, 1989.

- GODOY, A. **Contaminação bacteriana: efeitos na fermentação.** STAB. Açúcar, Álcool e Subprodutos, Campinas, v. 5, nº1, p. 35-40, 2002.

- GUERRA, E. **Mecanismo de infecção da fermentação alcoólica industrial por *Brettanomyces bruxellensis*: impacto no processo e medidas operacionais do agente infeccioso.** 71p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filhos”, Rio Claro, 1998.

- GUIMARÃES, T. M. **Identificação e seleção de cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para elaboração de vinho.** 101 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

- HARRISON, J. S. **Yeast production. Progress in industrial microbiology.** Londres, Capítulo 4. p. 129-178, 1971.

- HORÁK, J. **Yeast nutrient transporters.** Biochimica et Biophysica Acta, Czech Republic, v. 1331, n. 2, p. 41-79, 1997.

- HYPE SCIENCE (SITE). **Levedura Manipulada pode aumentar produção de bioetanol.** 2011. Disponível em: <http://hypescience.com/levedura-manipulada-pode-aumentar-producao-de-bioetanol/>. Acesso em 02/04/15.

- IRAQUI, I.; VISSERS, S.; BERNARD, F.; CRAENE, J. O.; BOLES, E.; URRESTARAZU, A.; ANDRÉ, B. **Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acid and F-Box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the *AGP1* gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease.** Molecular and Cellular Biology, v. 19, n. 2, p. 989-1001, Feb. 1999.

- KOTARSKA, K., CZUPRYNSKI, B., KLOSOWSKI, G. **Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation.** Journal of Food Engineering. Outubro/2005.

- LALULE, C. **Current aspects of fuel ethanol production in Brazil.** Critical Reviews in Biotechnology, Boca Raton, v. 11, p.149-161, 1991.

- LEITE, R. C. de C.; CORTEZ, L. A. B. **Biocombustíveis no Brasil: Realidades de Perspectivas.** Ministério das Relações Exteriores. p.60-75. 2008.

- LIMA, U. A.; BASSO, L. C; AMORIM, H. V. In: LIMA, U. A. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos.** São Paulo: Edgard Blücher, 2001. P. 1-43. (Biotecnologia Industrial; v. 3).

- LOPES, C. H, apresentação XII COREEQ, 07/2006.

- MADIGAN, M. T.; MARTINHO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. São Paulo: Prentice-Hall, 2004. 624p.

- MAGALHÃES, A. C. M. **Fermentação Alcoólica – Parte II**. Unidade VII. Curso de Engenharia Química. Universidade Federal de Uberlândia. Disponível em: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAApoUAG/unidade-vii-fermentacao-alcoolica-parte-ii>. Acesso em 02/04/15.

- MAIA, A. B. R. A. **Fundamentos de fermentação alcoólica**. Belo Horizonte: UFMG, 1989. (Apostila do curso de Engenharia Química).

- MALAJOVICH, M. A. **Biotecnologia. 1. Fundamentos**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, 2009. Disponível em: <http://www.bteduc.bio.br>. Acesso em 02/04/15.

- MAGASANIK, B. Regulation of nitrogen utilization. In: BROACH, J. R.; STRATHERN, J. N.; JONES, E. W. **The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: gene expression**. New York: Cold Spring Harbor, 1992. v. 2, cap. 6, p. 283-317.

- MELO, H. F. **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial**. Recife. 2006. Disponível em: http://repositorio.ufpe.br/bitstream/handle/123456789/650/arquivo4595_1.pdf?sequence=1. Acesso em 16/12/2014.

- MENEZES, T. J. B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo. Editora Agronômica Ceres Ltda. p. 141-178, 1990.

- MORAES, F.V, **Como controlar a qualidade da cachaça.** Engarrafador moderno, São Paulo, Vol.10, LK editora, Maio, 2001.

- MULLER, J. L. et.al. **Comparação do crescimento de Saccharomyces boulardii em fermentador batelada tipo air lift e shaker.** 2007. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n4/03.pdf>. Acesso em 10/04/2015

- NARENDRANATH. N.V.; HYNWA, S.H.; THOMAS, K.C.; INGLEDEW, W.M.. **Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentation.** Applied and Environmental Microbiology, v.63, n.11, p.4158-4163, Nov. 1997.

- NETO MESSEN, A. T. et al. **Miscibilidade de Álcool Etílico, Gasolina e Água.** Anais do VII SIMEA – Associação Brasileira de Engenharia Automotiva (AEA). São Paulo, 1993.

- NIPE (Núcleo Interdisciplinar de Planejamento Estratégico). **Bioetanol combustível: uma oportunidade para o Brasil** - Brasília, DF: Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2009.

- NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G. **Aguardente de Cana.Botucatu.** 2005.

- PARAIZO, D. **Uso da vinhaça na cultura da cana-de-açúcar.** Nova Cana. Fev. de 2013. Disponível em: <http://www.novacana.com/cana/uso-vinhaca-cultura/>. Acesso em 16/12/2014.

- PELCZAR, J. R.; CHAN, M. J.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** 2ª edição. São Paulo: Makron Books, 1997. Volume 1.

- PIMARTINS. **PROCESSO INDUSTRIAL NO SETOR SUCROALCOOLEIRO: Fermentação Batelada ou Contínua.** Disponível em: <http://pimartins.weebly.com/fermentaccedilatildeo.html>. Acesso em 02/04/15.

- PINO, F. **Clasificación de las bacterias según su forma.** Abril, 2013. Disponível em: <http://curiosidades.batanga.com/2011/06/30/clasificacion-de-las-bacterias-segun-su-forma>. Acesso em 11/04/15.

- PITA, W. B; LEITE, F. C. B; SOUZA-LIBERAL, A. T.; SIMÕES, D. A.; MORAIS-JUNIOR, M. A. **The ability to use nitrate confers advantage do *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptations to industrial fermentation processes.** Amsterdam, v.100n.1, p.99-107, 2011.

- RIBEIRO, F. A. M. **Fermentação Alcoólica.** Uberaba, 2010. Apostila do Módulo II. Processamento na Indústria Sucroalcooleira.

- RODRIGUES FILHO, A.; OLIVEIRA, R. N. de. **Tecnologia de Produção de cana-de-açúcar e cachaça de Minas de Qualidade.** EMATER. Belo Horizonte.1999.

- SÁ-CORREIA, I.; VAN UDEN, N. **Temperature profiles of ethanol tolerance: Effects on ethanol on the minimum and maximum temperatures growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis*.** Biotechnol. Bioeng., v. 25, p.1665, 1983.

- SALMON, J. M.; MURICO, J. C. **Relationship between sugar uptake kinetics and total consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcoholic fermentation.** Biotechnol. Lett., v. 16, n.1, p. 89-94, 1994

- SILVA FILHO, E. A.; SANTOS, S. K. B.; RESENTE, A. M.; MORAIS, J. O. F.; MORAIR JR, M. A.; SIMÕES, D. A. **Yeast populations dynamics of industrial fuel-ethanol fermentations process assesed by PCR-fingerprinting.** p.13-23, 2005.
- SILVA, J. A. et.al. **Aplicação da Metodologia de Planejamento Fatorial e Análise de Superfícies de Resposta para Otimização da Fermentação Alcoólica.** Universidade Estadual da Paraíba. Química Nova. 2008. Vol. 31.
- SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S. cerevisiae*.** 2009. 155 p. Tese 9Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo, 2009.
- TER SCHURE, E. G.; SILLJÉ, H. H. W.; RAEVEN, L. J. R. M.; BOONSTRA, J.; VERKLEIJ, A. J.; VERRIPS, C. T. **Nitrogen-regulated transcription and enzyme activities in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*.** Microbiology, v. 141, p. 1101-1108, 1995.
- TORIJA, M. J.; ROZES, N.; POBLET, M.; GUILLON, J. M.; MAS, A. **Effects of fermentations temperature on the strain population Fo *Saccharomyces cerevisiae*.** Int. J. Food Microbiol., v. 80, p.47-53, 2003.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology.** 8th edition. Berkeley: Artmed, 2008. 920 p.
- TOSETTO, G. M. **Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol.** 2008, 258f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2008.

- UNICA. **Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética** / [coordenação e organização Eduardo L. Leão de Souza e Isaias de Carvalho Macedo]. São Paulo: Luc Projetos de Comunicação, 2010. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/livro-etanol-bioeletricidade_000ggzjl27502wx5ok05vadr1kq9plvc.pdf. Acesso em 16/212/2014.

- UNICA. **Etanol e bioeletricidade: a cana-de-açúcar no futuro da matriz energética** / [coordenação e organização Eduardo L. Leão de Souza e Isaias de Carvalho Macedo]. São Paulo: Luc Projetos de Comunicação, 2013. Disponível em: <http://www.sifaeg.com.br/wp-content/uploads/2013/07/Etanol-e-Bioeletricidade.pdf>. Acesso em: 16 /12/2014.