



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE TECNOLOGIA - CTEC
ENGENHARIA QUÍMICA



**ESTUDO DA MODELAGEM CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM
BATELADA DE POLPA DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum Mill*)**

Rosana Correia Vieira

MACEIÓ
2020

Rosana Correia Vieira

**ESTUDO DA MODELAGEM CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA EM
BATELADA DE POLPA DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum Mill*)**

Dissertação de Curso apresentado ao curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas, como requisito à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientação: Profa. Dra. Renata Maria Rosas Garcia Almeida

Co-Orientação: Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva

MACEIÓ

2020

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária: Shirlen Maria Santos Bezerra

V665 e Vieira, Rosana Correia
Estudo da modelagem cinética da fermentação alcoólica em batelada de polpa de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill)/ Rosana Correia Vieira. – 2020.
82 f. : il. figs.; grafs.; tabs.

Orientadora: Renata Maria Rosas Garcia Almeida
Co-orientador: Carlos Eduardo de Farias Silva
Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia – CTEC. Maceió, 2020.

Bibliografia: 69-82

1. Modelagem cinética. 2. Fermentação alcoólica -Tomate. 3. Microbiologia industrial e química. I. Título.

CDU: 663.51

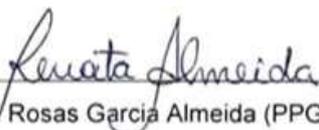
Rosana Correia Vieira

**ESTUDO DA MODELAGEM CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO
ALCOÓLICA EM BATELADA DE POLPA DE TOMATE
(*Lycopersicon esculentum Mill*)**

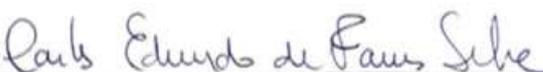
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química.

Aprovada em: Maceió, 21 de Fevereiro de 2020.

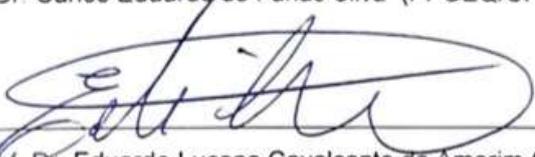
BANCA EXAMINADORA



Prof.^ª Dr.^ª Renata Maria Rosas Garcia Almeida (PPGEQ/UFAL – Orientadora)



Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva (PPGEQ/UFAL - Coorientador)



Prof. Dr. Eduardo Lucena Cavalcante de Amorim (PPGEQ/UFAL)



Prof.^ª Dr.^ª Martha Suzana Rodrigues dos Santos Rocha (IFAL Penedo)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram no caminhar de mais uma etapa da minha vida, especialmente:

Agradeço a Deus, a virgem santa e àqueles que me ajudaram a vencer esta etapa, comuns a muitos, mas única na forma de encarar desafios, decepções e superações.

Agradeço à minha Mãe, por ser sempre um exemplo de profissional, seus conselhos e suas palavras incitam-me a buscar sempre mais.

Ao meu Pai, por acreditar e incentivar os meus sonhos.

A minha irmã que vibrou a cada conquista, onde carrego a certeza de que nunca estarei só.

Aos meus avós, guerreiros e amáveis, por serem meus referenciais de força e fé.

Aos meus primos e tios, por serem fundamentais na minha formação.

Ao meu amor Douglas, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus queridos amigos de infância, por poder sempre contar com vocês em todas as horas.

Aos meus amigos da vida, pela troca de ensinamentos.

À toda minha família, peça chave que representa equilíbrio e exemplo.

Ao meu Co-orientador Prof^o. Dr Carlos Eduardo de Farias Silva por todo seu apoio, paciência, compreensão, ensinamentos e também puxões de orelha, sem você nada disso seria possível, Muito OBRIGADA.

A minha orientadora Prof^a. Dra. Renata Almeida, a mestre e queria amiga Margarete Cabral dos Santos Silva, a Prof^a. Dra. Martha Suzana Rodrigues dos Santos, e todos os amigos do LTBA, que tiveram papel fundamental no desenvolvimento profissional, no qual resultou este trabalho.

Por fim, a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para esta conquista e que por distração não foram citados, o meu OBRIGADA!

“A verdadeira motivação vem de realização, desenvolvimento pessoal, satisfação no trabalho e reconhecimento.”

Frederick Herzberg

RESUMO

A utilização de polpa de frutas, verduras e hortaliças na formulação de vários produtos representa alternativa de aproveitamento dos mesmos, evitando desperdícios e agregando valor, principalmente a produção de fermentados alcoólicos das polpas e seus resíduos. A fermentação alcoólica compreende um conjunto de reações enzimáticas controladas, ocorre a oxidação anaeróbica parcial dos açúcares, produzindo etanol, como principal produto, gás carbônico (CO₂) e liberando energia, através da ação do microrganismo comumente usado, a levedura *Sacharomyces cerevisiae*. O tomate é uma das hortaliças mais produzidas e consumidas no Brasil e no mundo, sendo consumido *in natura* ou processado, por conter substâncias antioxidantes como ácido ascórbico, licopeno e compostos fenólicos, que exercem papel preventivo, especialmente contra doenças crônicas não transmissíveis. O objetivo desse trabalho foi a produção de bebida alcoólica fermentada utilizando polpa do tomate e caracterizar a cinética de fermentação através da modelagem da fermentação, estudando-se as variáveis de processo como concentração de inóculo, de sacarose inicial e produção de etanol. Inicialmente foi feita a caracterização físico-química das polpas de tomate, assim como a quantificação dos antioxidantes presentes, valores semelhantes aos encontrados em literatura. Em seguida, foram realizados testes de fermentações em batelada, para avaliar a concentração de inóculo, variando em 1, 3 e 5 g/L, variando também as concentrações de açúcares em 55, 110, 230 g/L e fixando as condições de fermentação em pH de 5,5, 20 g/L de concentração de polpa à temperatura de 30°C. Foram assim identificadas as melhores condições do processo, em torno de 230 g/L de açúcar e 5 g/L de inóculo, produzindo-se um vinho dentro das normas brasileiras, com 101,5 g/L de concentração de etanol e 99,5% de eficiência de fermentação. Em relação a modelagem cinética, os resultados mostraram que as constantes cinéticas obtidas ($\mu_{\text{máx}}$) situam-se entre 0,2-0,5 dia⁻¹ e valor da constante de semi-saturação (K_s) teve um valor médio 7,47 ± 0,18 g/L, mostrando que a fermentação ocorreu de forma lenta, com, em torno de 4 dias quando alcança a fase estacionária, possibilitando o fornecimento de parâmetros que auxiliam no estudo de um modelo representativo do uso dessa biomassa na obtenção de sua bebida fermentada o qual foi descrito com eficiência pelo modelo de Monod. As taxas de consumo de substrato e a produtividade de etanol obtiveram valores máximo com 5 g/L inicial de inóculo e com 230 g/L inicial de açúcar de 4,545 g/(L h) e produto 1,39 g/(L h), respectivamente. Em relação a inibição por substrato, testando-se o modelo de Andrews, foi obtido uma pequena interferência por substrato, resultando em um K_I elevado (508,16 ± 5,16 g/L), sendo assim o modelo de Monod o mais indicado para esse tipo de fermentação.

Palavras-chave: Hortaliça, Condições de fermentação, Bebida alcoólica fermentada.

ABSTRACT

The use of fruit, vegetable and vegetable pulp in the formulation of various products represents an valuable alternative, avoiding wastes and adding value, especially in the production of alcoholic fermented. Alcoholic fermentation comprises a set of controlled enzymatic reactions, partial anaerobic conditions and presence of high sugars concentration, producing ethanol, as the main product, carbon dioxide (CO₂) and releasing energy, through the action of microorganisms, such as, *Sacharomyces cerevisiae*, main industrial ferment. Tomatoes are one of the most produced and consumed vegetables in Brazil and in the World, being eaten fresh or processed and possesses an important antioxidant content such as ascorbic acid, lycopene and phenolic compounds, which plays a preventive role, especially against chronic non-communicable diseases. The objective of this work was the production of a alcoholic fermented (beverage) using tomato pulp and to characterize the fermentation kinetics through process modeling, studying some process conditions such as inoculum concentration and initial sucrose concentration. Initially, the physical-chemical characterization of tomato pulps was made, as well as the quantification of antioxidants presents in the pulp, similar values were found in literature. After that, a set of batch fermentations were carried out to evaluate the inoculum concentration (1, 3 and 5 g/L) and initial sucrose concentrations (55, 110, 230 g/L) at a pH of 5.5, 20 g/L of pulp concentration and 30 °C. The best process condition was 230 g/L of sugar and 5 g/L of inoculum, producing a wine within Brazilian legislation standards, with 101.5 g/L of ethanol and 99, 5% fermentation efficiency. Regarding the kinetic modeling, the results showed that the obtained kinetic constants (μ_{\max}) were between 0.2-0.5 day⁻¹ and the value of the semi-saturation constant (K_s) had an average value of 7.47 ± 0.18 g/L, showing that the fermentation occurred slowly, around 4 days when it reaches the stationary phase and this process was described with efficiency by Monod model. The rates of substrate consumption and ethanol productivity reached maximum values when 5 g/L initial inoculum and with 230 g/L initial sucrose concentration were used, of 4.545 g / (L h) and 1.39 g / (L h), respectively.. In relation to substrate inhibition, when Andrews model was used, a small interference by substrate was verified, resulting in a high K_I (508.16 ± 5.16 g/L), thus the Monod model was the most suitable for this type of fermentation.

Keywords: Vegetable, Fermentation conditions, Fermented alcoholic beverage.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação do processo em batelada.....	24
Figura 2 - Perfis de substrato, produto e inóculo.....	25
Figura 3 - Esquema simplificado do processo de fermentação em batelada alimentada....	26
Figura 4 - Esquema simplificado do processo contínuo de fermentação	27
Figura 5 - Via glicolítica da produção de etanol e de glicerol a partir de glicose	29
Figura 6 - Rendimento fermentativo versus alimentação do biorreator.	30
Figura 7 - Dependência da velocidade específica de crescimento limitante da <i>E-coli</i> (a) meio com glicose e (b) Meio com tryptofano.....	34
Figura 8 - Fluxograma das Etapas desenvolvidas no trabalho.....	37
Figura 9 - Perfis cinéticos de crescimento celular em função da concentração inicial de inóculo (X_0) e concentração inicial de substrato (S_0): A – 55, B – 110 e C – 230 g/L de substrato. Os símbolos representam: (■) 1, (▲) 3 e (●) 5 g/L de inóculo. As linhas que contornam os pontos representam as modelagens obtidas.....	53
Figura 10 - Perfis cinéticos de crescimento celular em função da concentração inicial de substrato (S_0) e concentração inicial de inoculo (X_0): A – 1, B – 3 e C – 5 g/L de levedura. Os símbolos representam: (■) 55, (▲) 110 e (●) 230 g/L de substrato. As linhas que contornam os pontos representam as modelagens obtidas.....	56
Figura 11 - Perfis cinéticos de crescimento celular em função da concentração inicial de inóculo (X_0) e concentração inicial de substrato (S_0): A – 1, B – 3 e C – 5 g/L de levedura. Os símbolos representam a quantidade de etanol obtido a partir das concentrações iniciais de açúcares para: (■) 55, (▲) 110 e (●) 230 g/L de substrato. As linhas que contornam os pontos representam as modelagens obtidas.....	59
Figura 12 - Fatores de conversão em função da concentração de inóculo e de substrato. Os símbolos (●)1, (●)3 e (●)5 g/L representam a concentração inicial de inóculo.....	62
Figura 13 - Eficiências Bioquímicas e Rendimentos de processo em função da concentração de inóculo e de substrato. Os símbolos (●) 1, (●) 3 e (●) 5 g/L representam a concentração inicial de inóculo.....	64
Figura 14 - Modelos Monod e Andrews em função da concentração inicial de substrato (S_0) e da concentração inicial de inóculo (X_0) com as taxas máximas de crescimento para cada fermentação ($\mu_{máx}$): A – Modelo de Monod, B – Modelo de Andrews e C – taxas máximas	

de crescimento de cada fermentação. Os símbolos representam em A e B, a taxa de crescimento máxima obtida a partir das concentrações iniciais de açúcares para: (■) 1, (▲) 3 e (●) 5 g/L de inóculo. As linhas que contornam os pontos representam as simulações obtidas. Os símbolos representam em C, a taxa de crescimento obtido a partir das concentrações iniciais de inóculo para: (■) 55, (□) 82,5, (●)110, (○)170 e (▲) 230 g/L de açúcares. As linhas que contornam os pontos representam as simulações obtidas.....66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química do tomate tipo italiano (<i>Lycopersicon esculentum Mill</i>).....	19
Tabela 2 - Número de artigos recuperados a partir das palavras-chave por base de periódicos.....	21
Tabela 3 - Número de documentos recuperados a partir das palavras-chave por base de patentes.....	23
Tabela 4 - Caracterização físico-química das polpas de tomate (com casca e com semente).....	50
Tabela 5 - Caracterização de antioxidantes das polpas de tomate (com casca e com semente).....	51
Tabela 6 - Constantes cinéticas do modelo de Monod para crescimento celular.....	54
Tabela 7 - Taxa de consumo (g/(L.h)) com consumo de substrato para crescimento celular.....	57
Tabela 8 - Produtividade de fermentação (g/(L.h)) com produção de etanol para crescimento celular.....	60
Tabela 9 - Erros preditivos (%) do modelo de Monod para o consumo de substrato e formação do produto das fermentações realizadas.....	63
Tabela 10 - Constantes associadas ao modelo de Monod e Andrews considerando as taxas máximas de crescimento de cada fermentação, permitindo encontrar a taxa de crescimento máxima global ($\mu_{\max, \text{global}}$) e a constante de inibição (K_I).....	67

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo Geral	16
2.2	Objetivos Específicos	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	Fermentado Alcolico	17
3.2	Tomates e seus Residuos	18
3.3	Prospecção Tecnológica sobre Modelagem cinética do Fermentado Alcolico de Tomate	21
3.4	Formas de Condução dos Processos Fermentativos Para Produção de Etanol	23
3.4.1	Fermentação em batelada.....	24
3.4.2	Fermentação em batelada alimentada.....	26
3.4.3	Fermentação com Processo Contínuo.....	27
3.5	Bioquimica da Fermentação Alcolica	28
3.6	Cinética de Fermentação	31
3.7	Modelos de cinéticos de crescimento celular	33
3.7.1	Modelos cinéticos sem inibição.....	35
3.7.2	Modelos cinéticos com inibição.....	36
4	METODOLOGIA	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
6	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

Uma das maiores preocupações nos tempos atuais é o desperdício de alimentos, principalmente de frutas, frutos, verduras e hortaliças, segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – FAO (2019), estimou-se que são perdidos e desperdiçados todos os anos 33% de todos os alimentos que são produzidos, cerca de 1,3 bilhão de toneladas de alimentos, perdidos por exemplo, quando o alimento não é colhido ou é danificado durante o processamento, o armazenamento ou o transporte, por não possuírem mais a qualidade exigida pelo consumidor, apresentando pequenos defeitos na coloração, na firmeza, nas cascas, entre outros. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2018), o Brasil infelizmente tem elevados índices de desperdícios, mesmo ocupando o 14º lugar entre os maiores produtores mundiais de frutas e hortaliças, cerca de 26 milhões de toneladas de alimentos se tornam resíduo alimentar.

Devido à grande quantidade de tipos de frutas, frutos, verduras e hortaliças, com safra praticamente em todo o ano, uma parte da safra é praticamente perdida ou desperdiçada (SANTOS et al., 2005). Nesse sentido, o processo fermentativo tem sido muito utilizado como uma das alternativas para o aproveitamento, sendo uma tecnologia eficiente e de baixo custo, apresentando novos caminhos para as indústrias de alimentos e para produção de novas bebidas fermentadas mistas (SILVA et al., 2007). Praticamente todas as frutas ou materiais açucarados podem ser utilizados na produção de bebidas fermentadas, desde que adequadamente corrigidos os teores de umidade e seus nutrientes para o crescimento do fermento.

A nomenclatura utiliza das bebidas fermentadas mistas é dada a partir de bebidas produzidas de outras matérias-primas, como as frutas, frutos e hortaliças, já as bebidas elaboradas a partir de uvas frescas e sãs, é dada a nomenclatura de vinho, de acordo com a Lei 7.678 de 8 de novembro de 1988 que regulamenta a produção, comercialização e circulação de vinho e derivados de uva (BRASIL, 1988a).

O grau alcoólico de bebidas fermentadas deve estar entre 9 e 14 % em volume, a 20°C, e esta deve ser obtida a partir da fermentação alcoólica do mosto de frutas, frutos e hortaliças sãs, frescas e maduras, de acordo de acordo com o Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994. Pode-se classificar as bebidas fermentadas em três categorias de acordo com a quantidade de açúcar residual, sendo os fermentados classificados como tipo seco, tendo até 5 g/L de açúcar residual, do tipo meio

seco, tendo entre 5 e 20 g/L de açúcar residual, e como tipo suave, tendo mais de 20 g/L (COSTA *et al.*, 2017).

Uma matéria-prima que pode ser utilizado para a produção de bebida fermentada é o tomate, uma hortaliça bastante comercializada e consumida no Brasil, devido as suas características importantes para o processo fermentativo, tais como umidade e nutrientes. Seu nome científico é *Lycopersicon esculentum*, sendo uma hortaliça que tem em sua composição compostos antioxidantes, como fenólicos e carotenóides, tendo principalmente o licopeno, no qual confere a sua coloração avermelhada, assim na forma *in natura* ou processada considera-se que são alimentos funcionais, podendo reduzir o risco de desenvolver doenças crônicas não transmissíveis, como as cardiovasculares e alguns tipos de cânceres, principalmente de próstata, como alguns estudos comprovam (HEREDIA *et al.*, 2010; BENASSI e ANTUNES, 1988; BUETTNER e SCHAFER, 2004; CHANG e LIU, 2007).

A produção do tomate foi de 10,3 bilhões de toneladas em 2019, com aumento de 1,2% em relação a 2018. A área plantada, de 64,6 mil hectares em 2018, não apresenta mudança para 2019, enquanto o rendimento médio apresenta crescimento de 4,2%, apesar das quedas do preço, sendo os Estados de São Paulo e Goiás os maiores produtores dessa hortaliça. Na região do nordeste, a maior microrregião, sendo maior produtor do nordeste é estado de Pernambuco na terceira colocação, com produção em 2019 de 2,99 milhões de toneladas, tendo uma pequena retração em relação a 2018, que teve uma produção de 3,1 milhões de toneladas (CONAB, 2019).

Em muitos estudos é colocado que a fermentação alcoólica acontece na alimentação da levedura consumindo os açúcares presentes no mosto, como a sacarose, sendo estes já contidos no alimento ou artificialmente adicionados, e na produção, ou seja, obtendo como produtos finais o gás carbônico, etanol e outros compostos. Assim, é importante o estudo da fermentação para produção de bebida fermentada de frutas, frutos e hortaliças para se obter uma bebida de qualidade e aceitável no mercado, através da observação das inúmeras variáveis presentes, principalmente através da cinética de fermentação, a qual permite a observação do tempo necessário a obtenção do produto com a qualidade desejável, eliminando custos desnecessários a produção (DALSENTER *et al.*, 2015).

A fermentação é comumente estudada utilizando modelos cinéticos e inicialmente simples e não estruturados. Para indústrias é vantajoso obter um modelo totalmente adaptado a direta aplicação em situação real. Vários modelos são estudados para suprir o crescimento do interesse na produção de bebidas pela fermentação alcoólica em batelada, como observação

do crescimento microbiano, formação de produto e consumo de substrato associado ao produto (VUČUROVIĆ *et al.*, 2012). De acordo com Phisalaphong, Srirattana e Tnathapanichakoon (2006), o modelo matemático do tipo Monod (1942) modificado é o mais utilizado, por representar a inibição do crescimento da levedura por consumo do substrato e produção do produto, sendo as leveduras as linhagens mais utilizadas em processos industriais fermentativos. A modelagem matemática estabelece uma relação entre parâmetros cinéticos e ambientais.

O presente trabalho teve como objetivo principal estudar a produção de fermentado alcoólico de tomate e caracterizar sua modelagem cinética em relação a consumo de substrato, crescimento celular e produção de etanol, caracterizando as constantes cinéticas associadas, assim como também caracterizar a polpa do tomate (suas propriedades físico-químicas e de compostos antioxidantes), avaliando a melhor concentração de levedura no mosto e mais adequada concentração de sacarose adicionada ao mosto de forma a obter a bebida fermentada.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

A presente dissertação tem como objetivo geral estudar a produção de fermentado alcoólico de tomate e caracterizar sua modelagem cinética em relação a consumo de substrato, crescimento celular e produção de etanol.

2.2 Objetivos Específicos:

- Caracterizar a polpa do tomate, por meio de análises físico-químicas e de antioxidantes;
- Promover fermentações em batelada para avaliar a melhor concentração de levedura no mosto;
- Otimizar a chaptalização do mosto, ou seja, o ajuste da melhor concentração de sacarose adicionada ao mosto de forma a obter a bebida fermentada desejada;
- Realizar a modelagem cinética das fermentações em batelada caracterizando as constantes cinéticas associadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fermentado alcóolico:

Na produção brasileira, no setor de bebidas fermentadas destaca-se a comercialização de vinhos e cervejas, representando uma alternativa para os consumidores que procuram novos produtos e uma grande variedade de sabores. Fermentado alcóolico é nomenclatura dada às bebidas fermentadas com qualquer matéria-prima que não seja uva, em tese qualquer fruto, fruta ou vegetal comestível sãs, frescas e maduras, com umidade suficiente, açúcares (monômeros de açúcares e sacarose) e outros nutrientes importantes para o crescimento da levedura, podem ser utilizados para produção dessa bebida. A nomenclatura das bebidas fermentadas provindas da fermentação da uva (*Vitis vinífera*) são exclusivamente chamadas de “vinho” (OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Com a grande produção no setor de agronegócio, devido ao melhoramento das produções dos alimentos, no aumento das atividades agroindustriais, tem gerado uma grande quantidade de resíduos provenientes dessas atividades (BRASIL, 2000), estes representam grandes perdas de matérias-primas e energia, causando problemas ambientais severos e consequente perda de dinheiro, exigindo assim investimentos no tratamento da poluição gerada (NETO *et al.*, 2012). Um problema recorrente em relação ao descarte irregular do resíduo é o depósito de lixo alimentar no solo, causando produção de odores pelo apodrecimento da matéria orgânica, formação de chorume e liberação de gases tóxicos, podendo até contaminar os rios e lençóis freáticos próximos (SANTOS, 2008).

A agregação de valor das matérias-primas e aos seus resíduos está intimamente ligada a obtenção de uma renda qualificada advinda de particularidades sociais e ambientais para famílias no ambiente rural e agroindustrial, podendo expandir e alcançar novos mercados (ANDRADE *et al.*, 2012). Agregar valor é considerado com muita frequência um fator que proporciona elevação do desenvolvimento econômico, pela busca da diferenciação e qualidade, sendo um fator importante para quem maneja (DE PAULA *et al.*, 2012).

Os vinhos (bebida fermentada a partir da uva) podem ser divididos em quatro categorias, de acordo com o Decreto nº 6.871, de 04 de Junho de 2009, classificados a partir do teor alcóolico, onde tem-se o vinho de mesa com faixa de teor alcóolico entre 10 a 13°GL, o espumante, com teor alcóolico entre 7 e 10 °GL, espumante gaseificado, com teor alcóolico entre 10 e 12,5 °GL e licoroso, com teor alcóolico entre 14 e 18 °GL, podendo ainda ter um subdivisão das clássicas já citadas, que podem ser tintos, rosados, ou brancos em cada caso.

De acordo com a mesma lei, por outro lado, as bebidas fermentadas tem grau alcoólico de bebidas fermentadas entre 9 e 14 °GL, a 20°C (DE PAULA *et. al.*, 2012).

Segundo Melo (2019), a produção de vinhos, sucos e derivados, foi de 542,15 milhões de litros em 2018, sendo produzidos 218,37 milhões de litros de vinhos de mesa e 38,71 milhões de vinhos finos apresentando cerca de 10-15% de redução em relação a 2017. Mesmo com a produção de uvas menor em 2018, a safra foi considerada normal, pois em 2017 a produção superou todas as expectativas.

As bebidas fermentadas derivadas das matérias-primas açucaradas são produzidas através do processo bioquímico, a fermentação alcoólica, apesar de terem propriedades físico-químicas diferentes, como tipo de matéria-prima utilizada, teor alcoólico, entre outros. A fermentação alcoólica ocorre quando um microrganismo, como por exemplo a levedura mais comumente usados, se alimenta dos açúcares presentes no mosto, produzindo etanol e gás carbônico (ANDRADE *et. al.*, 2012).

Segundo Valim *et. al.* (2016), as melhores condições de produção do fermentado de alcoólico da Carambola (*Averrhoa carambola*) foi encontrada com maior quantidade de sólidos solúveis iniciais entre 23,8 e 25°Brix (100g.g⁻¹), com pH inicial entre 4,8 e 5,0 e concentração inicial de levedura entre 1,6 e 2,5 g/L, esse estudo foi feito com planejamento experimental 2³. Também segundo Almeida *et. al.* (2014), a otimização feita na produção de fermentado alcoólico da acerola obtivendo-se as melhores condições com maiores concentrações de inóculo, com a razão de massa entre 1 e 2,5 g/L e quantidade de sólidos solúveis também maior entre 28,6 e 29°Brix.

3.2 Tomate e seus resíduos:

O tomate faz parte do cenário do agronegócio, sendo colocado como a principal fonte de renda para muitos produtores, consumido tanto na forma in natura quanto processado, além movimentar os outros setores envolvidos com a produção ajudando no melhoramento econômico regional e nacional, como consumo de insumos, embalagens, máquinas agrícolas, equipamentos (MELO, VILELA, 2005).

Se por um outro lado a produção de tomate é a principal fonte de muitos produtores e o crescente aumento na produção dessa hortaliça, por outro lado, como consequência, tem-se aumento na geração de resíduos nas agroindústrias e também pela forma inadequada no manejo, tendo como resíduos da indústria processada as cascas, sementes, caroços e centro de frutas, onde nesses encontramos açúcares, fibras, vitaminas e sais minerais (LIMA, 2001).

Para diminuir as perdas pós-colheitas, que representa uma parte significativa dessa produção, muitas técnicas têm sido estudadas, desenvolvidas e utilizadas afim de usar os alimentos de formas completa, sem desperdícios. A fermentação alcoólica é a principal técnica estudada e utilizada para elaboração de produtos com alto valor agregado, sendo uma técnica fácil e de baixo investimento, podendo ser usada como matéria-prima frutas, hortaliça e apresentando um ramo novo para a indústria fruticultura (SILVA *et. al.*, 2007).

Em 2019, a produção de tomate tem ótimas expectativas econômicas e aumento da área cultivadas a cada dia, por ser uma cultura de ciclo curto e de altos rendimentos. Como o tomate é um produto de elevada variação de preços, em termos de sazonalidade, para 2019 estima-se ter uma produção de 10,3 bilhões de toneladas, 1,2% maior em relação a 2018. Espera-se também um aumento no rendimento médio, cerca de 4,2% maior que em 2018, mesmo ocorrendo queda nos preços, e a área plantada seja cerca de 64,6 mil hectares, mesmo ocorrendo queda nos preços. Os estados de São Paulo e Goiás os maiores produtores dessa hortaliça em Janeiro e Fevereiro de 2019, já na região do nordeste, maior microrregião, o maior produtor é estado de Pernambuco, com produção em 2019 de 2,99 milhões de toneladas, quase a mesma produção que em 2018, com 3,1 milhões de toneladas (CONAB, 2019).

O tomate tipo italiano (*Lycopersicon esculentum Mill*) é o mais utilizado na indústria de alimentos, destacando-se pelo sabor suave, devido a interação entre açúcar e ácido. Segundo Monteiro *et. al.*, (2008), foram observadas diferenças nos teores analisadas deste tipo de tomate sem semente e sem casca e o tomate com semente e com casca, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1 – Composição química do tomate tipo italiano (*Lycopersicon esculentum Mill*).

Frutas (%)	Tomate sem semente	Tomate com semente
	sem casca	e casca
Umidade	95,88 ($\pm 0,05$)	85,09 ($\pm 0,018$)
Proteína	0,66 ($\pm 0,04$)	2,06 ($\pm 0,018$)
Lipídeo	0,12 ($\pm 0,06$)	0,26 ($\pm 0,01$)
Fibra Alimentar	0,26 ($\pm 0,01$)	0,28 ($\pm 0,06$)
Cinzas	0,41 ($\pm 0,03$)	1,89 ($\pm 0,06$)
Carboidratos	2,67($\pm 0,02$)	10,42 ($\pm 0,0$)

Fonte: MONTEIRO *et. al.*, 2008.

O teor de sólidos solúveis (SS) é o principal parâmetro que altera o sabor e a doçura das frutas, frutos e hortaliças, sendo SS do tomate tem valor de 4 e 6°Brix, com maior quantidade constituído com açúcar (CHITARRA *et al.*, 2005). Os sólidos solúveis (SS) estão dissolvidos nos alimentos e o teor aumenta quanto maior a maturação, por causa da degradação e/ou biossíntese de polissacarídeos (SHEN, CHEN, WANG, 2014).

Por outro lado, o pH do tomate varia numa faixa entre 4,0 e 4,5, diminuindo com a desidratação, ajudando na conservação (BORGUINI, 2006). Os teores de açúcares e ácidos orgânicos, onde os ácidos correspondem 1/10 dos sólidos totais, onde junto com o pH constituem os fatores que determina a aceitação do tomate, com a influência no sabor e no aroma dos alimentos (SOUZA, 2018).

Com estudos que vem sendo realizados nas últimas décadas, descobriu-se que o tomate e seus derivados é alimento funcional com efeitos benéficos á saúde, demonstrando os efeitos positivos na redução de risco de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), por ter substâncias antioxidantes, como a vitamina C, compostos fenólicos (quercetina, kaenferol, naringenina, rutina e ácido clorogênico) e os carotenoides β -caroteno e, principalmente, o licopeno (HEREDIA *et al.*, 2010). Segundo Raffo *et. al.* (2006), o processamento térmico interfere de forma significativa a composição do tomate, principalmente os compostos antioxidantes, reduzindo os efeitos benéficos à saúde (RAFFO *et. al.*, 2006).

O composto antioxidante mais importante presente no tomate, é o licopeno presente cerca de 80% dos carotenoides nos tomates vermelhos maduro, este possui sem atividade de vitamina e alto poder antioxidante. Entre os carotenoides, o licopeno é colocado o que tem maior capacidade sequestrante do oxigênio *singlete*, este é muito mais oxidante que o oxigênio molecular no seu estado fundamental, oxida muitas funções orgânicas ricas em elétrons, como sulfetos, aminas e fenóis (SHEN, CHEN, WANG, 2014).

O licopeno é o pigmento responsável pela coloração vermelha típica do tomate, quanto mais amadurecido maior a quantidade do licopeno, pela degradação da clorofila e a síntese de carotenoides. O aspecto avermelhado vivo é o principal fator de decisão no momento da compra, sendo sua preservação essencial durante o processamento. (TOOR, SAVAGE, HEEB, 2013).

3.3 Prospecção Tecnológica sobre Modelagem Cinética do Fermentado Alcoólico de Tomate

Analisando a busca por novas tecnologias, realizou-se uma prospecção tecnológica em base de patentes e de artigos científicos buscando se confirmar a baixa disponibilidade de literatura, como aforementioned. A prospecção foi baseada no levantamento de artigos científicos, utilizando as bases SCIENCE DIRECT (SCIENCE DIRECT, 2018), PERIÓDICOS CAPES (CAPES, 2018) E SCIELO (SCIELO, 2018). Na prospecção das patentes, foram utilizadas as bases: Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI, 2018), World Intellectual Property Organization (WIPO, 2018), versão *free* do Patent inspiration (PI, 2018), EspaceNet Patent search (EspaceNet, 2018), Derwent World Patents Index (DWPI, 2018) e Scopus (2018), sendo que a pesquisa de patentes ficou entre os anos de 1997 a 2018, com algumas patentes protegidas pelo período de sigilo, mas incluídas na investigação (VIEIRA et al., 2018).

Considerando a investigação referente às pesquisas científicas em artigos publicados em periódicos especializados, foram obtidos os resultados que estão colocados na Tabela 2, quanto ao número de artigos encontrados (VIEIRA et al., 2018).

Tabela 2 - Número de artigos recuperados a partir das palavras-chave por base de periódicos.

PALAVRAS CHAVES	BANCOS DE DADOS			
	Periódicos Capes	Science Direct	Scopus	Scielo
“wine”	839.849	12.934	48339	49
“wine” and “Kinetics of fermentation”	4.516	3320	504	33
“wine” and “Kinetics of fermentation” and “alcoholic fermented”	969	1007	19	0
“wine” and “Kinetics of fermentation” and “alcoholic fermented” and “modelling”	176	684	0	0
“wine” and “Kinetics of fermentation” and “alcoholic fermented” and “modelling” and “tomato”	27	157	0	0
TOTAL	845.537	18.102	48862	82

Fonte: VIEIRA et al., 2018.

Analisando a Tabela 1 pode-se observar que uma grande parte dos artigos sobre o tema são relacionados a produção de vinho e cinética de fermentação, com 70% artigos encontrados continham as palavras-chave “*Wine*” e “*Kinetics of fermentation*”, sendo encontrados apenas 20 artigos significativos que tinham relação com tema abordado (fermentado alcoólico de tomate e cinética de fermentação). A maioria dos artigos são referentes a caracterização físico-química e de antioxidantes do tomate e seus resíduos (CHITARRA *et al.*, 2005; SHEN, CHEN, WANG, 2014; BORGUINI, 2006; SOUZA, 2018; HEREDIA *et al.*, 2010), a produção de fermentado alcoólico do tomate (JANG *et al.*, 2010; MANY *et al.*, 2014; LEE, 2013) (únicos realmente ligados ao tema e como mencionados não havia modelagem cinética do processo fermentativo), a cinética de fermentação de mosto açucarado (VALIM *et. al.*, 2016; ALMEIDA *et. al.*, 2014; DANTAS e SILVA, 2017, ALMEIDA *et. al.*, 2011; SOUSA, BAPTISTA E ZAN, 2018;), caracterização de tomates orgânicos (LACERDA *et al.*, 2016; ROSA *et al.*, 2011; ARAUJO e TELHADO, 2015), e outros temas menos expressivos (VIEIRA *et al.*, 2018).

Por outro lado, no levantamento de informações referentes as patentes disponíveis nas bases de pesquisa, foram obtidos os resultados que estão dispostos na Tabela 3 (VIEIRA *et al.*, 2018).

Observando os resultados dispostos na Tabela 3, foi possível verificar que a quantidade de patentes encontradas, utilizando as palavras chaves “*wine*”, “*Kinetics of fermentation*”, “*alcoholic fermented*” e “*tomato*” é inferior àqueles recuperados nas bases de artigos científicos, sendo encontrados 5 patentes significativas, mas não ligadas diretamente ao estudo proposto nesse trabalho, referentes a produção e desenvolvimento de fermentado alcoólico de xarope açucarado (IZUMI *et al.*, 2018), de fermentado de maçã (NOGUEIRA *et al.*, 2013), fermentado de Baru (FERREIRA, ASQUIERI E DAMIANI, 2015), fermentado de yacon (BRANDÃO, DIMIANI e ASQUIERI, 2017) e estudo sobre cepas de leveduras (DORIGNAC, QUIPORT e TBAIKHI, 2016). Logo percebe-se que há uma potencialidade para o desenvolvimento dessa tecnologia enquanto produto (VIEIRA *et al.*, 2018).

Observou-se ainda a quantidade de patentes depositadas teve um crescimento significativo entre o ano de 2014 a 2018, o que demonstrou um aumento na busca pelo desenvolvimento de tecnologias para melhoramento das etapas da fermentação etanólica e consequente obtenção de um fermentado (“vinho”) de qualidade, porém mesmo os efeitos benéficos desse produto terem sido estudados, não se encontrou informações de seu processo

em larga escala, nem da cinética de fermentação e sua estabilidade durante a estocagem (LEE *et al.*, 2013).

Tabela 3 - Número de documentos recuperados a partir das palavras-chave por base de patentes.

PALAVRAS CHAVES	BANCOS DE DADOS				
	INPI	WIPO	Derwent	EspaceNet	Patent Inspiration
“wine”	195	43.040	90.427	4509	70448
“wine” and “Kinetics of fermentation”	5	1877	16.573	500	6287
“wine” and “Kinetics of fermentation” and “alcoholic fermented”	3	396	18	12	66
“wine” and “Kinetics of fermentation” and “alcoholic fermented” and “tomato”	0	86	2	0	16
“wine” and “Kinetics of fermentation” and “alcoholic fermented” and “tomato” and “modelling”	0	5	0	0	0
TOTAL	203	45.404	107.020	5021	76817

Fonte: VIEIRA *et al.*, 2018.

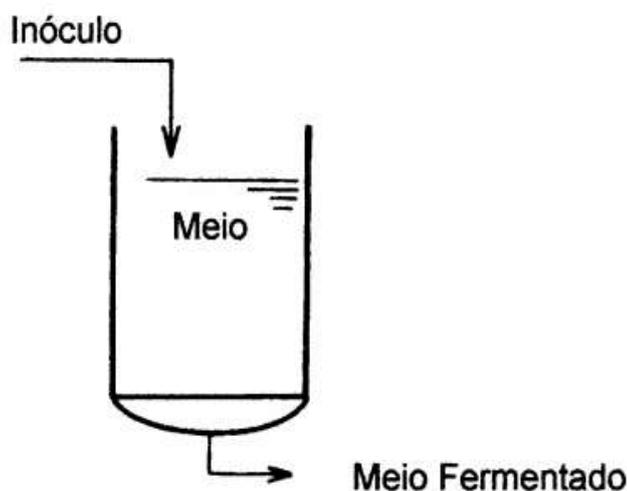
3.4. Formas de condução dos processos fermentativos para produção de etanol:

Na elaboração de alimentos e bebidas alcoólicas no mundo inteiro e na geração de combustíveis renováveis no Brasil, notou-se a relevância biotecnológica da levedura *S. cerevisiae* e desta forma, este microrganismo passou a ser o mais estudado, possuindo assim o metabolismo mais conhecido e sendo o mais utilizado na fermentação alcoólica. De acordo com a forma que o substrato é disposto e o produto retirado, pode-se classificar as formas de condução, existindo, portanto, três tipos básicos de formas para a obtenção de etanol: batelada (descontínua), batelada alimentada (semicontínuo) e contínuo (TORRES, 2012). Na fermentação de alimentos e bebidas, costumam-se ser utilizados as modalidades batelada e batelada alimentada, por garantirem maior segurança quanto à assepsia e estabilidade microbiana, necessitar menor investimento devido à maior simplicidade.

3.4.1. Fermentação em batelada:

Desde os primórdios processos fermentativos, as fermentações descontínuas vêm sendo aplicadas em várias produções. Denominada como fermentação descontínua são feitas de um reator, na maioria das vezes referida como dorna, sendo inoculada com o microrganismo e incubada, como mostrado na Figura 1. Durante a fermentação penas oxigênio (processos aeróbicos), antiespumante e ácidos ou bases são acrescentados, quando necessários. Uma das particularidades básicas dessa forma é a constância volumétrica, pois não há evaporação e nem perda de líquido, ou quando ocorre, pode ser desprezada, do mesmo modo que não há adições de soluções no processo. O microrganismo a ser inoculado é preparado e propagado em volumes maiores em uma relação de 1-20x a depender da produção até que a quantidade de inóculo necessária seja adequada na última dorna (DE PAULA *et. al.*, 2012).

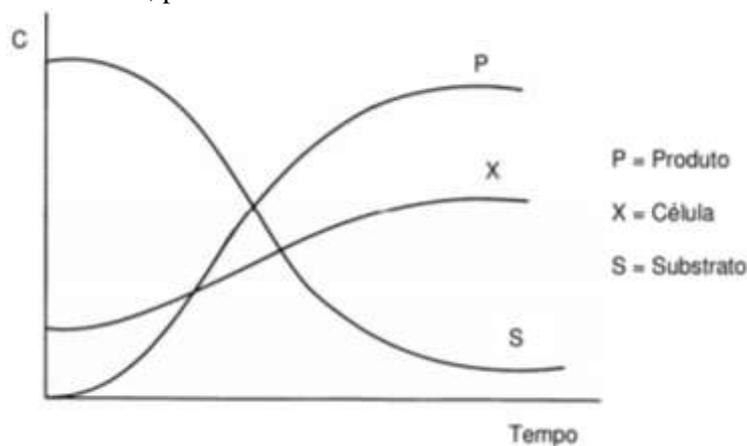
Figura 1 - Representação do processo em batelada.



Fonte: MENDES *et. al.*, 2013.

O estudo cinético da fermentação consiste na análise da evolução dos valores de concentração de inóculo, substrato e produto, em função do tempo de fermentação, que permitirão os traçados dos perfis cinéticos, como mostra a Figura 2. Cada condição de trabalho, pode levar a diferentes perfis de concentração de substrato, células e produtos, portanto diferentes perfis cinéticos podem ser obtidos e a partir disso pode-se dizer que a modelagem e acompanhamento. (DE PAULA *et. al.*, 2012).

Figura 2 - Perfis de substrato, produto e inóculo.



Fonte: MENDES *et. al.*, 2013.

O método de elaboração é compreendido em duas fases diferentes: a de laboratório e industrial. É no laboratório que é realizada a inoculação de um pequeno volume de nutriente, e que em condições favoráveis são incubados, sendo desta forma transferindo para um volume maior e assim sucessivamente. A situação é aplicada até a fase industrial onde é alcançado o volume preciso. De acordo com o objetivo da produção os cuidados são modificados, sendo visto que as transferências devem ser feitas na fase logarítmica ou exponencial (SILVA *et. al.*, 2007).

Os processos fermentativos descontínuos costumam ser divididos em três grupos grandes: 1. Um inóculo é recebido por cada dorna; 2. Recirculação do microrganismo; 3. Método por meio de cortes (SILVA *et. al.*, 2007).

Quando um substrato é adicionada de uma só vez logo no começo da fermentação, pode trazer baixos rendimentos e/ou produtividade a esta fermentação descontínua, podendo desempenhar efeitos de inibição, repressão catabólica ou até mesmo desviando o metabolismo celular a produtos que não são de importância e que podem inibir ou diminuir o metabolismo microbiano. Tempos mortos também são mostrados, períodos que o fermentador não está sendo empregado, nem como carga nem como descarga. Contudo possui algumas vantagens que apresentam grande importância, sendo menor o risco de contaminação, possuindo grande flexibilidade de operação, podendo ocorrer sucessivas fases no mesmo fermentador, quando está sendo gerado um determinado lote de produto possui a capacidade de detectar todos os materiais relacionados. Possui uma grande aplicação na indústria alimentar, tendo itens de diversas produções: chucrute, cerveja, iogurte, vinho entre outros. Podendo ser também utilizado na indústria farmacêutica (VENTURUNI, 2010).

A partir do período ou tempo de duplicação celular (t_d), pode-se também calcular a velocidade específica de crescimento na fase exponencial, por meio da equação obtida substituindo-se a concentração final pelo dobro da inicial, na Equação 1: (LEE & ROBINSON & WANG, 1981)

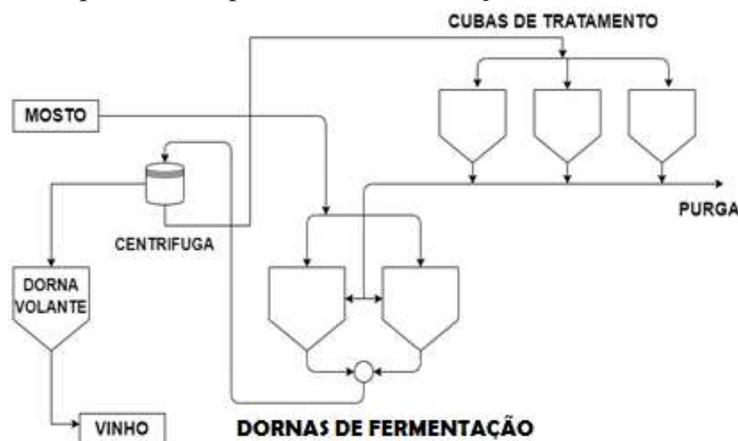
$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu_x} = \frac{0,693}{\mu_x} \quad (1)$$

onde μ_x é a taxa de crescimento celular, dada em unidade de tempo⁻¹ (como h⁻¹ ou dia⁻¹).

3.4.2. Fermentação em batelada alimentada:

Pode ser definido como uma técnica em que um ou mais nutrientes são adicionados ao fermentador durante o cultivo e em que os produtos permanecem aí até o final da fermentação. Algumas características importantes podem ser denotadas: A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo. A adição do mosto pode ser de forma contínua ou intermitente. Pode haver ou não mudança de volume, pois depende da concentração de substrato e da taxa de evaporação (TESSARO *et. al.*, 2010). O modo de operação estar ilustrado na Figura 3 (PHISALAPHONG, SRIRATTANA e TNATHAPANICHAKOON, 2006).

Figura 3 - Esquema simplificado do processo de fermentação em batelada alimentada.



Fonte: REIS, 2011.

De acordo com Tosetto (2002), há alguns benefícios, como: economia de açúcar devido à baixa reprodução celular; alta produtividade em etanol; retirada de contaminadores pela centrifugação do vinho; fermentação mais pura, devido ao tratamento ácido do creme de leveduras; destruição do emprego de cultura pura na preparação do pé-de-cuba, restringindo a complexidade da fermentação.

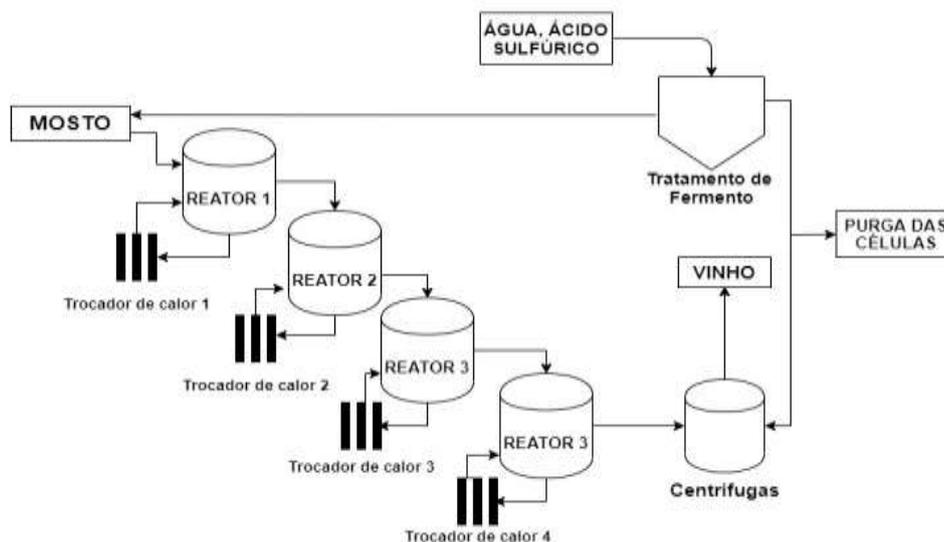
3.4.3. Fermentação com Processo contínuo:

O processo de fermentação contínuo tem como característica uma alimentação ininterrupta de meio de cultura (mosto) a uma vazão constante definida, possuindo o volume de reação constante por meio da remoção contínua do caldo fermentado (FACCIOTTI, 2001). Quanto as suas possibilidades de ações, a forma contínua é profundamente versátil. Este pode ser de forma contínuo em uma só etapa (um único reator), sem ou com reaproveitamento de células ou pode ser contínuo inúmeros estágios (n reatores em série), com uma só alimentação (com ou sem reutilização de células) ou com várias alimentações (com ou sem reutilização de células) (DALSENTER *et. al.*, 2015).

O volume de meio no fermentador deve permanecer constante, para que sistema alcance o requisito de estado estacionário, requisito no qual as variáveis (concentração de células, de substrato limitante e de produto) continuam constantes com o passar do tempo de operação do sistema (FACCIOTTI, 2001).

O trabalho com a forma contínua possui vantagens e estas estão na diminuição de tempos mortos, dispondo de um aumento na produtividade, no alcance de um meio fermentado mais homogêneo e na maior capacidade de aproveitamento de controladores (DALSENTER *et. al.*, 2015). Na Figura 4 é apresentado o esquema do processo fermentativo em modo contínuo.

Figura 4 - Esquema simplificado do processo contínuo de fermentação.



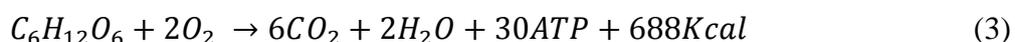
Fonte: REIS, 2011.

3.5. Bioquímica da fermentação alcoólica:

A fermentação é conjunto de 12 reações que acontecem em sequência ordenada, sendo essas são catalisadas por enzimas específicas que estão confinadas dentro do citoplasma celular, onde é nessa área que reações da fermentação alcoólica ocorrem. A fermentação alcoólica é um processo biológico em que a energia obtida pelas reações de oxidação parcial é utilizada para o crescimento das leveduras usadas e a oxidação parcial anaeróbica dos açúcares na produção do álcool e gás carbônico (CO₂) (BERG & TYMOCZKO & STRYER, 2008).

Existem dois tipos de carboidratos que podem ser utilizados pelas leveduras na fermentação, os chamados exógenos, que são fornecidos à levedura, temos como exemplo a sacarose, glicose, frutose, entre outros e os chamados de endógenos, que são os constituintes da levedura, como o glicogênio e a trealose (PARENTE *et. al.*, 2014).

As reações da fermentação que fazem o processo de quebrar os açúcares maiores solúveis em moléculas menores pela ação da levedura, sendo as mesmas ocorrendo em dois ciclos deferentes. A glicólise (especialmente a rota de EMP; Embden-Meyerhof-Parnas) é um desses ciclos, que faz a quebra da molécula de glicose até ácido pirúvico, auxiliados por enzimas catalisadas presentes no interior da célula. Quando não se tem presença de oxigênio, as enzimas piruvato-descarboxilase e enzimas álcool-desidrogenase tendem a trabalhar no ácido pirúvico para que ocorra na produção de etanol e água, sendo usado a Equação de Gay-Lussac para se faz o balaço do ciclo. Na presença de oxigênio, ocorre um favorecimento da cadeia respiratória (oxigênio é o aceptor final de elétrons) ocorre uma parte do ácido pirúvico é levado para o ciclo de Krebs, formando mais ATP, NADH e FADH₂, esses duas últimas coenzimas, irão a cadeia transportadora de elétrons nas cristas mitocondriais para produzir ATP, através da cadeia transportadora de elétrons e da enzima ATP-sintase por meio da passagem de prótons. Essa oxidação, produzirá gás carbônico proveniente do ciclo de Krebs e água a partir da acepção de elétrons pelo oxigênio e combinando-se com os prótons presentes na matriz mitocondrial. As Equações de Gay-Lussac (2) e Equação do ciclo de Krebs (3) representam de forma resumida o balanço global dos dois ciclos: (TEXEIRA *et. al.*, 2014)



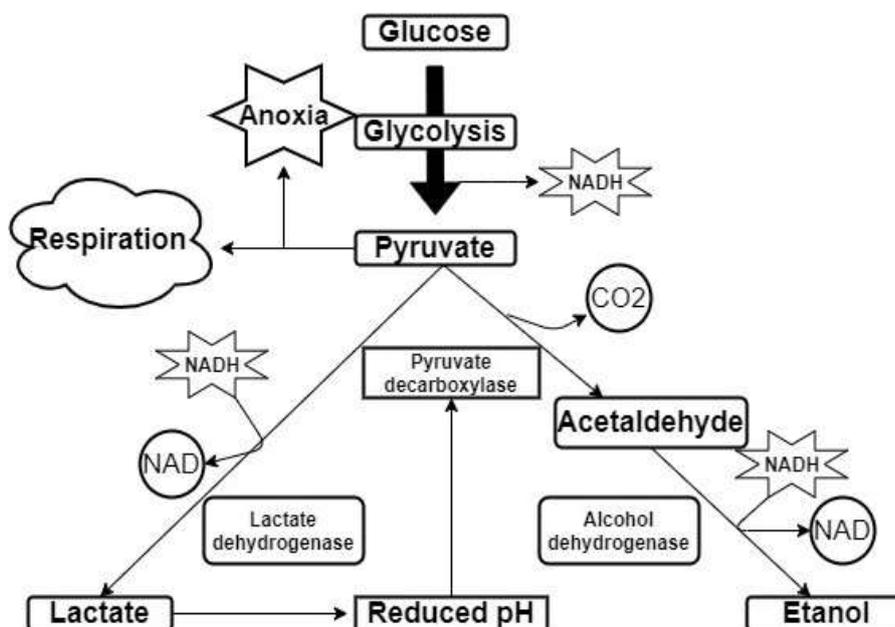
Ao metabolizar de forma anaeróbica a levedura busca produzir energia em forma de ATP, adenosina trifosfato, que é utilizada na realização das funções fisiológicas, como

excreção absorção, entre outras e também as funções de biossínteses que fazem a manutenção da vida, crescimento e multiplicação (TEXEIRA *et. al.*, 2014).

Pela via glicolítica ou via Emden-Mayerhof-Parnas (EMP) ocorre a produção do etanol pela atuação da *Saccharomyces cerevisiae* e outras leveduras, onde a glicose (hexose) sofre oxidação a gliceraldeído-3-fosfato e a dihidroxicetona fosfato. Na sequência o gliceraldeído-3-fosfato é convertido em piruvato, sendo então descarboxilado, obtendo acetaldeído. Após isto, o acetaldeído produzido sofre redução a etanol, pela atuação da enzima álcool-desidrogenase usando NADH. A dihidroxicetona fosfato pode retornar o ciclo, convertendo-se em gliceraldeído-3-fosfato, e depois em etanol, ou, alternativamente reduzindo em glicerol. As duas moléculas de NAD⁺ que são formadas são utilizadas na oxidação de outra molécula de glicose, mantendo o equilíbrio interior na célula. A Figura 5 apresenta resumidamente a via glicolítica (SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

Existem fatores que afetam de forma negativa as reações da fermentação para produção de etanol, como altas concentração de etanol, temperatura, concentração de substrato, pH, concentração de inoculo, contaminação bacteriana, tempo de alimentação, entre outros (BERG & TYMOCZKO & STRYER, 2008).

Figura 5 – Via glicolítica da produção de etanol e de glicerol a partir de glicose.



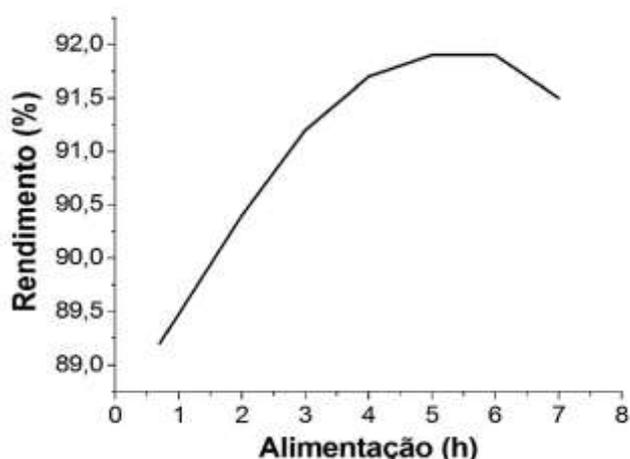
Fonte: MELO, 2006.

A faixa ótima de temperatura para uma ótima atuação da levedura estar entre 25°C e 30°C, mesmo sabendo que as linhagens industriais da levedura *S. cerevisiae* são resistentes

a altas de temperatura, um aumento afeta a viabilidade celular quando em sinergia com a produção de etanol ou em maio com pH baixo. Com aumento da temperatura, acima de 30°C, ocorre perdas maiores de etanol devido a evaporação, assim como o enfraquecimento das leveduras, tornando-a mais sensível a toxidez do etanol produzido e favorece o crescimento de outros microrganismo, tendo maior chance de contaminação bacteriana, por outro lado a diminuição da temperatura, abaixo de 25°C, deixa a levedura com atividade bastante reduzida (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

Para processos em que adotam regime de batelada e batelada alimentada, o tempo de alimentação do biorreator influencia diretamente o rendimento fermentativo, através da velocidade de alimentação, onde quando se tem altas velocidades ocorre aumento na produção de ácido succínico e glicerol, provado pelo estresse da levedura provocando perda no rendimento de etanol (SHULLER & KARGIL, 2011), como colocado na Figura 6:

Figura 6 – Rendimento fermentativo versus alimentação do biorreator.



Fonte: MARTINEZ, 2007.

Ainda com altas velocidade de alimentação, temos tempos de enchimento reduzidos, provando produção de excesso de espuma, causando perda do meio que estar sendo fermentado, também ocorre acúmulo de substrato, inibindo a atuação da levedura, diminuindo assim a produtividade (SHULLER & KARGIL, 2011).

Outro fator que interfere no rendimento da produção de etanol é a concentração de inoculo, que estar diretamente ligada a concentração de açúcares do mostro no início da fermentação, que deve ser adequada com a composição da matéria-prima, com a linhagem de levedura utilizada e qual o tipo de processo será empregado, para que não ocorra falta de leveduras para consumir o substrato. Aumento da concentração de açúcares, aumenta a

produção de etanol, interferindo a viabilidade das células, tornando a fermentação lenta e incompleta, já se tivermos reduzida concentração de açúcares, teremos baixos rendimentos na produção do álcool, também reduzida viabilidade celular (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

Como colocado o etanol é um produto que em concentrações altas inibe a atuação da levedura, afetando o crescimento da célula e por consequência a velocidade de produção de etanol é reduzido, sendo assim quando se tem uma concentração de etanol no mosto fermentado acima de 8% v/v, ou seja cerca de 63 g/L, causa danos as organelas, principalmente aos lipídeos da membrana. O crescimento das leveduras é completamente inibido quando se tem concentração acima de 95 g/L (AQUARONE *et. al.*, 2011).

O pH é outro fator de importância que afeta o controle do crescimento bacteriano, afetando assim o crescimento celular, velocidade de fermentação e produção de subprodutos. Normalmente, o pH ótimo dos mostos industriais é mantida entre 4,5 e 5,0, controlando a contaminação bacteriana e o crescimento das leveduras, onde, quando recirculadas, recebem um tratamento com ácido sulfúrico por uma ou duas horas para redução da contaminação microbiana e retirada de células mortas para serem reutilizadas (COSTA *et. al.*, 2017).

A contaminação por outros microrganismo pode afetar o rendimento, pois competem com as leveduras pelo mesmos substratos, produzindo subprodutos que inibem o crescimento da levedura, como por exemplo as bactérias lácticas produzindo ácido láctico e acético que transformando o meio estressante para as células das leveduras que passam a produzir menos etanol e mais biomassa. O crescimento das bactérias principalmente é aumentado pelas alterações na temperatura, acidez, assepsia, preparação do inoculo e outros. De forma geral os outros microrganismos podem causar a inversão da sacarose, o aumento da acidez, a produção de biopolímeros, a floculação de leveduras e a formação de espumas, o consumir os açúcares das leveduras (ALMEIDA *et. al.*, 2011).

3.6. Cinética de fermentação:

A velocidade de absorção de substrato e de surgimento de produto específico de fermentação empregando leveduras está associado a cinética de biotransformação e correlacionado também com a velocidade de crescimento celular, e o resultado que estas sofrem por indução das condições do meio (COSTA *et. al.*, 2017).

Definimos a velocidade específica de crescimento (μ_x) como sendo a multiplicação do inverso da concentração celular (X) mantida no meio, com a taxa de crescimento da

variação de concentração celular (X) no tempo (t) (PHISALAPHONG, SRIRATTANA e TNATHAPANICHAKOON, 2006).

$$\mu_X = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \frac{1}{X} \cdot r_X \quad (4)$$

Pela equação 4, pode-se relacionar a taxa de crescimento microbiano (r_X) dividido com a velocidade específica de crescimento pela equação 5, exibindo uma relação de primeira ordem (PHISALAPHONG, SRIRATTANA e TNATHAPANICHAKOON, 2006).

$$r_X = \mu_X X \quad (5)$$

Para que haja relação entre a velocidade específica de crescimento e as taxas de consumo de substrato e do surgimento de produto, as relações são complicadas e carecem de indicadores ou fatores de rendimento de reação denominados Y (PHISALAPHONG, SRIRATTANA e TNATHAPANICHAKOON, 2006).

O rendimento ou fator de rendimento em massa celular ($Y_{X/S}$) possui relação com a quantidade de massa celular gerada em base seca com o valor de substrato consumido. Este fundamento é definido matematicamente pela equação 6 (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

$$Y_{X/S} = \frac{\frac{dX}{dt}}{-\frac{dS}{dt}} = \frac{r_X}{r_S} \quad (6)$$

onde a unidade dada por [g X (concentração celular, geralmente em massa) / g substrato (açúcar)].

Rearranjando a Equação 6, tem-se a Equação 7:

$$r_S = \frac{r_X}{Y_{X/S}} \quad (7)$$

Substituindo a Equação (5) na equação (7), temos a Equação 8:

$$r_S = \frac{dS}{dt} = \frac{\mu_X \cdot X}{Y_{X/S}} \quad (8)$$

A Equação 8 relaciona a velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ) com a taxa de consumo de substrato (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

O rendimento do produto ($Y_{P/S}$) tem relação com a massa de produto adquirido com a massa de substrato consumida, sendo sua unidade dada por [g produto (etanol) / g substrato (açúcar)]. Este princípio é estabelecido matematicamente pela equação (9) (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

$$Y_{P/S} = \frac{\frac{dP}{dt}}{-\frac{dS}{dt}} = \frac{r_P}{r_S} \quad (9)$$

Rearranjando a equação (9), temos a Equação (10):

$$r_P = \frac{Y_X}{r_S} \quad (10)$$

Substituindo a equação (8) na equação (10), temos a Equação 11:

$$r_P = \frac{dP}{dt} = \frac{Y_P}{Y_X} \mu_X \cdot X \quad (11)$$

A taxa de formação de produto com a velocidade de crescimento microbiano (μ_X) está correlacionada com a equação (11). Esta equação é incontestável em situações onde o crescimento celular está associado com o aparecimento de produto. Os rendimentos em biomassa ($Y_{X/S}$) e em etanol ($Y_{P/S}$) podem divergir entre autores (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

3.7. Modelos cinéticos de crescimento celular:

Existem 4 modelos cinéticos de fermentação que podem ser utilizados para descrever a atividade microbiana, são eles: 1) Não-estruturados e não-segregados, nos quais a célula de microrganismos é considerada como soluto; 2) Estruturados e não-segregados, onde as células são tratadas como indivíduos de múltiplos componentes, porém com composição média semelhante; 3) Não-estruturados e segregados, onde as células são tratadas como seres individuais distintos, porém descritos por um único componente; 4) Estruturados e segregados, onde as células de microrganismos são consideradas como indivíduos distintos e formados por múltiplos componentes (SHULLER & KARGIL, 2011).

O tipo de modelo mais encontrado na literatura para descrever a fermentação alcoólica é o tipo **não-estruturado** e **não-segregado**. Sabe-se que devido a esta complexidade, é pouco aconselhável a utilização de modelos que consideram as células como indivíduos distintos constituídos de vários componentes e que utilizando modelos mais simples, a imprecisão que possa ocorrer é compensada pela facilidade de obtenção e diminuição do número de parâmetros cinéticos necessários. O modelo deve ser formulado a partir de algumas aproximações (SCHMIDELL & FACCIOTTI, 2001).

Os modelos não-estruturados e não-segregados, em sua maioria, baseiam-se na determinação da velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ) ou da produção de etanol pelo decréscimo da velocidade específica máxima através de alguns termos de inibição e limitação. A equação mais simples para explicar e descrever o crescimento microbiano é a equação de Monod, que expressa a velocidade específica de crescimento do

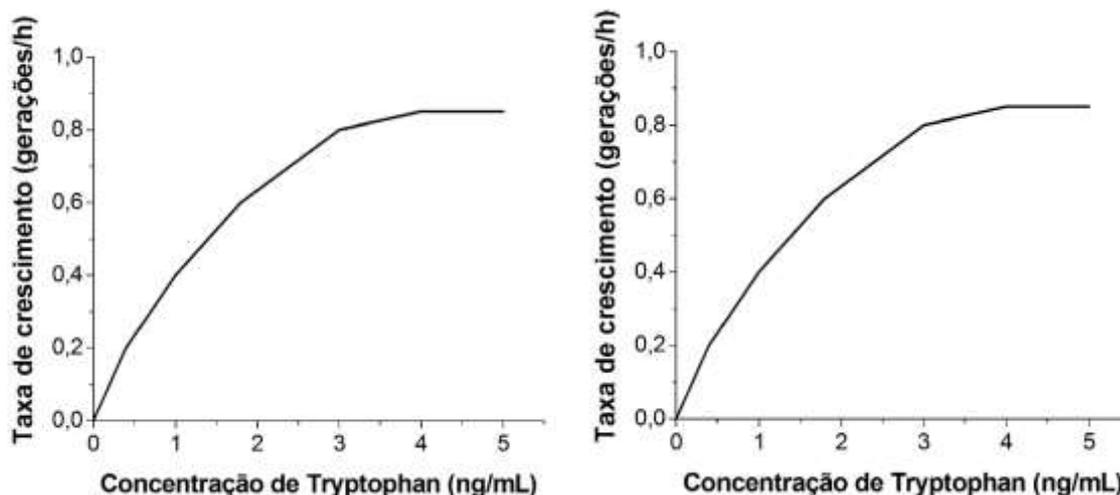
microrganismo (μ), como uma função da concentração de substrato limitante (S). Esta equação é válida para sistemas onde não há interferências significativas de inibidores, como baixas concentrações de etanol no meio de fermentação e estar colocada na Equação 12: (BERG & TYMOCZKO & STRYER, 2008)

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \cdot \frac{S}{(K_S + S)} \quad (12)$$

onde, $\mu_{m\acute{a}x}$ e K_S são, respectivamente, a velocidade específica máxima de crescimento e a constante de Monod.

Relacionada a bioquímica celular, sabe-se que a equação de Monod é uma grande simplificação, assim como em outras áreas da Engenharia, há equações simples que expressam inter-relações embora os significados físicos dos parâmetros sejam desconhecidos ou mesmo não existam. Observando a Equação de Monod, $\mu_{m\acute{a}x}$ é a taxa máxima de crescimento alcançável quando $S \gg K_S$ e as concentrações de todos os componentes são inalteradas. K_S é a concentração de nutriente limitante na qual a velocidade específica de crescimento é metade do seu valor máximo, falando superficialmente, é a divisão entre o intervalo baixo de concentração, onde μ se torna fortemente dependente (linear) de S e intervalo alto de concentração onde μ se torna independente de S. Como mostrado na Figura 7, os valores de K_S para o crescimento da *E-coli* em meios de glicose e tryptophan são $0,22 \cdot 10^{-4}$ M e 1,1 ng/mL respectivamente, mostrando a velocidade específica de crescimento (BERG & TYMOCZKO & STRYER, 2008).

Figura 7 - Dependência da velocidade específica de crescimento limitante da *E-coli* (a) meio com glicose e (b) Meio com triptofano.



Onde: os valores de K_S para o crescimento da *E-coli* em meios de glicose e tryptophan são $0,22 \cdot 10^{-4}$ M e 1,1 ng/mL respectivamente. Fonte: MARTINEZ, 2007.

Em relação a essas constantes, μ_{\max} e K_s , voltados para a fermentação etanólica utilizando a equação de Monod; Ponce *et al.* (2016) na fermentação de melação de cana-de-açúcar com decapagem de gás *in situ*, com 5 g/L inicial de inóculo, 200 g/L inicial de sacarose em tempo de fermentação de 35 horas, obteve 85 g/L de etanol, uma taxa máxima de crescimento (μ_{\max}) de 0,244 h⁻¹ e uma constante de semi-saturação (K_s) de 8,1 g/L. Por outro lado, Veloso *et al.* (2018) que fez uma modelagem e otimização da fermentação de etanol para obter vinhos alcoólicos altamente concentrados, utilizando a levedura *Saccharomices cerevisiae*, com 8,0 g/L inicial de inóculo, 180 g/L inicial de sacarose 30°C, obtendo-se 80,2 g/L de etanol, uma taxa máxima de crescimento (μ_{\max}) de 0,177 h⁻¹ e constante de semi-saturação (K_s) de 21,72 g/L.

Na literatura estão disponíveis vários modelos cinéticos de crescimento celular não estruturados e não segregados. Esses modelos podem ser divididos em dois grupos: os livres de inibição; e os que consideram a parcela de inibição pelo substrato (S), produto (P) ou mesmo pelas próprias células (X). Na sequência são apresentados alguns desses modelos (BERG & TYMOCZKO & STRYER, 2008).

3.7.1. Modelos cinéticos sem inibição: (BERG & TYMOCZKO & STRYER, 2008)

- Modelo de Monod (1942), apresentado pela Equação 12, citada anteriormente.
- Modelo de Moser (1958), representado pela Equação 13:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{c_s^u}{K_s + c_s^u} \quad (13)$$

onde: μ_{\max} é a velocidade específica máxima de crescimento celular (h⁻¹); C_s é concentração de substrato limitante (g.L⁻¹); K_s é a constante de semi-saturação (g.L⁻¹); u é uma constante cinética do modelo (BERG & TYMOCZKO & STRYER, 2008).

- Modelo de Contois (1959), representada pela Equação 14:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{C_s}{K_s \cdot C_x + C_s} \quad (14)$$

onde: C_s é a concentração de substrato limitante (g.L⁻¹); C_x é a concentração celular (g.L⁻¹); K_s é a constante de saturação (g.L⁻¹) (BERG & TYMOCZKO & STRYER, 2008).

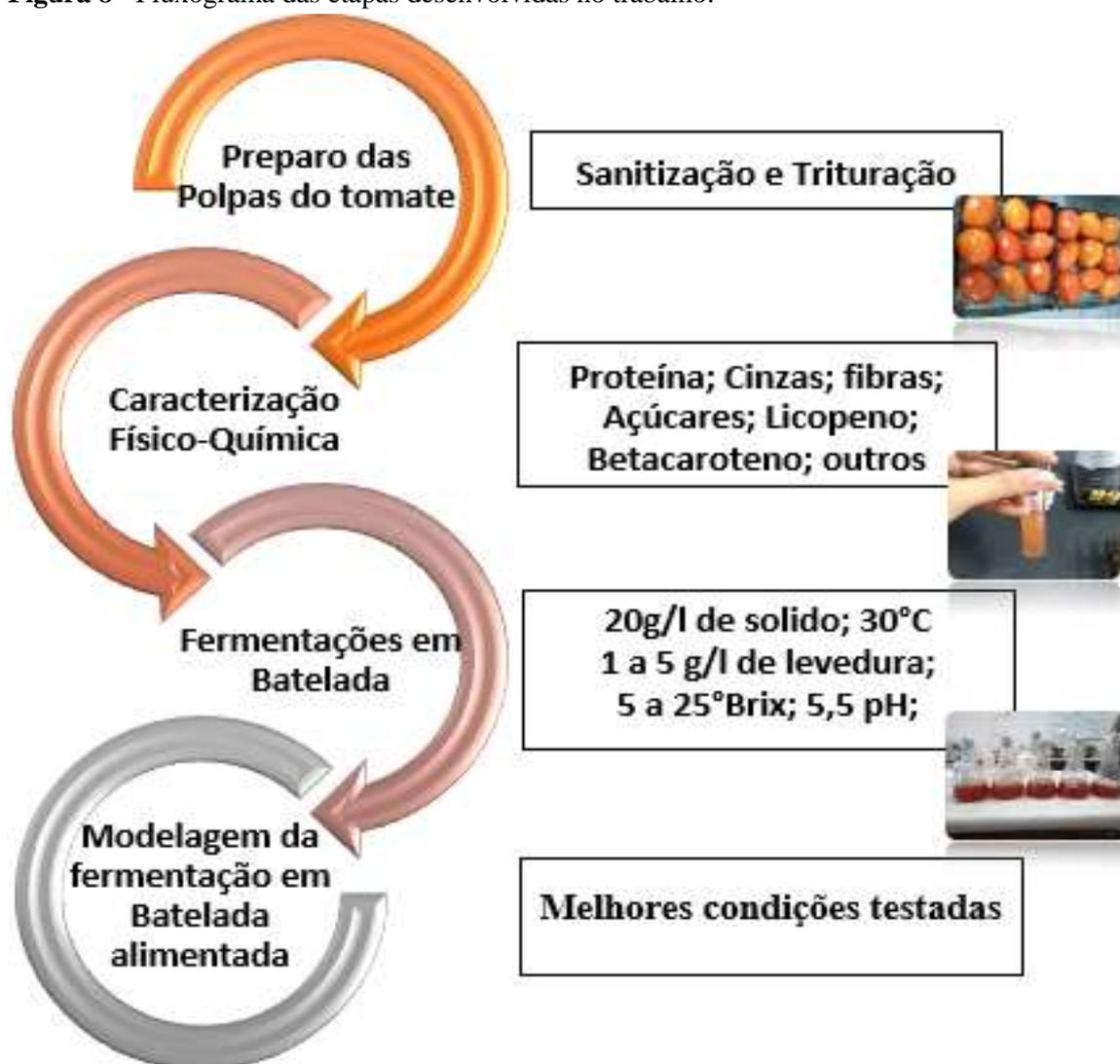
3.7.2. Modelos cinéticos com inibição

A presença de um inibidor no meio reacional diminui a velocidade específica de crescimento celular (μ). O inibidor pode ser o próprio substrato limitante (S), um produto gerado pelas células ou até a presença das células em alta concentração no meio fermentativo. Os modelos que inibição pelo substrato são modelo de Andrews (1968) e modelo de Wu (1988), para os modelos de inibição pelo produto temos o modelo de Aiba (1968), modelo de Levenspiel (1980) e modelo de Hoppe e Hansford (1982), por fim temos o modelo por inibição por células, o modelo de Lee (1981) (BERG & TYMOCZKO & STRYER, 2008).

4. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado no Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas e contou com a colaboração da infraestrutura do Laboratório de Tecnologia de Bebidas e Alimentos – LTBA, e do laboratório de Ensino em Engenharia Química - LEEQ. O fluxograma da Figura 8 apresenta sequência das etapas desenvolvidas no trabalho.

Figura 8 - Fluxograma das etapas desenvolvidas no trabalho.



Fonte: Autor (2020).

4.1. Coleta, preparo e trituração do tomate:

A escolha dessa matéria-prima se deu, avaliando-se a ação benéfica atribuída ao alto potencial antioxidante do fruto, que é resultado da presença de compostos fenólicos, vitamina C e carotenoides, sendo o tomate considerado alimento funcional por muitos

autores, a citar: Heredia *et al.* (2010); Raffo *et al.* (2006); Shen, Chen, Wang (2014) e Toor, Savage, Heeb (2013), devido ao seu alto teor de licopeno, proporcionando efeito positivo do seu consumo na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis. Devido ao seu baixo custo e à disponibilidade durante todo ano, seu consumo é observado em todas as classes socioeconômicas, atingindo considerável parcela da população brasileira, sendo também amplamente cultivado no Brasil.

Os tomates foram selecionados de um único lote de 20 kg provindo da feira livre da cidade de Maceió, sendo considerado o aspecto, aparência, maturação e sua origem, da cidade de Petrolina-PE. Inicialmente, foi feita a sanitização de todo o lote, com hipoclorito de sódio, com 100 ppm de água sanitária durante 15 minutos, logo após foi feita a trituração, em liquidificador industrial para alimentos SIEMENS SLP4, e foram armazenados em congelador FRICON HCED-503, à 10°C.

4.2. Métodos analíticos da caracterização físico-química:

Foram feitas as seguintes análises para a caracterização da polpa do tomate: umidade, açúcares totais, proteína, fibras alimentares, lipídios, resíduo mineral fixo (cinzas), pH e sólidos solúveis totais (°Brix). Todas essas análises serão sequencialmente descritas abaixo.

4.2.1 Determinação de umidade:

Seguindo-se as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005) e AOAC (2002). A umidade das amostras foi determinada empregando determinador de umidade modelo ID50 (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda) a 100 °C em modo automático. Para cada amostra, a determinação da umidade foi feita sempre em duplicata, usando-se o valor médio seguidas de desvio padrão.

4.2.2. Determinação de açúcares totais:

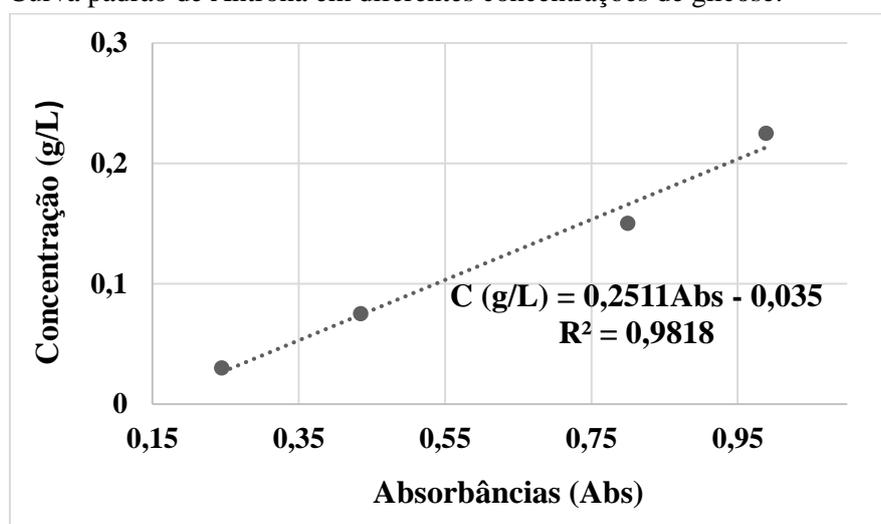
A determinação dos açúcares totais foi feita pelo método espectrofotométrico, adaptada a partir de Trevelyan e Hanrison (1952), que utiliza o reagente de antrona e com medição da absorbância realizada a 625nm. A composição do reagente de antrona é feito com mistura de 36 mL de Ácido sulfúrico (H₂SO₄), 14 mL água destilada e utilizando 0,1 g de antrona, completando um volume final de reagente para 50 mL, ou seja, uma solução sulfúrica a 71% com 1g/L de antrona. Com a solução faz-se a reação das amostras com o

reagente antrona, misturando inicialmente em tubos de ensaio 0,2 ml da amostra, diluídas adequadamente quando necessárias com 1,8 ml do reagente de antrona, em seguida os tubos são levados à banho fervente por 10 min.

Para tal leitura, é necessário o preparo de uma curva padrão de glicose. Foi preparada uma solução de glicose 0,3 g/L (solução mãe), a partir da qual se formulou as diferentes concentrações presente na curva padrão (0,03-0,3 g/L), por diluição.

No **Gráfico 1** é apresentada a curva padrão para a reação de antrona, e utilizada no estudo.

Gráfico 1 - Curva padrão de Antrona em diferentes concentrações de glicose.



Fonte: Autor, 2020.

4.2.3. Determinação de lipídios - extração direta em Soxhlet:

Seguindo-se as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005), 032/IV. Colocou-se em estufa a 105°C por no mínimo 1 hora os copos do equipamento previamente identificados. Transferiu-se para o dessecador por no mínimo 15 min e pesou-se em balança analítica. Pesou-se 1 a 2 g de amostra em cartucho de Soxhlet ou feito com papel de filtro qualitativo fechado com algodão e devidamente grampeado. Adicionou-se sobre os cartuchos, já dentro dos copos, 100 mL de hexano. Acoplou-se os copos do equipamento previamente tarados em conjunto de Soxhlet e o equipamento já aquecido e assim procedeu-se a extração contínua por 1 hora e meia à 105 °C. Após este tempo retirou-se os cartuchos dos copos, e continuou-se o procedimento para a recuperação do hexano (recuperou-se uma boa quantidade usada), até que não restou mais solvente nos copos à 130°C. Assim retirou-se os copos do equipamento contendo os resíduos e transferiu-se para uma estufa por cerca de 1 hora a 105 °C e após este tempo colocou-se os copos no dessecador por no mínimo 15

mim. Por fim, pesou-os, observando a diferença de peso, calculando-se a porcentagem de lipídeos com a Equação 15.

$$Lipídeos (\%) = \frac{100 \cdot N}{P} \quad (15)$$

onde: N = massa de lipídeos (massa final do balão menos a tara do balão); P = massa tomada da amostra. (OBS: guarda-se a amostra seca e desengordurada contida no cartucho ou papel de filtro para a análise de fibras).

4.2.4. Determinação de fibra bruta:

O teor de fibra bruta foi determinado pelo método proposto por Hennemberg (1864) citado por Giger-Reverdin (1995). Fibra é o resíduo orgânico obtido em certas condições de extração e além da celulose, lignina e hemicelulose, areia e outras substâncias minerais presas aos tecidos celulares. O teor de fibras em alimentos varia de acordo com a sua origem. As frutas e seus produtos podem apresentar de 0,1 a 6,8 %; leguminosas, de 2 a 4 %; cereais e seus produtos de 0 a 2,2 %. O método abordado simula *in vitro* a digestão *in vivo*, constando fundamentalmente de uma digestão em meio ácido, seguida por uma digestão em meio alcalino. O resíduo destas digestões representa a “fibra bruta” e o resíduo da incineração desse material a “fração de fibra” do produto analisado.

Caso não se tenha a amostra desengordurada da análise de lipídeos. Pesou-se cerca de 5 g de amostra seca e adicionou-se 10 mL de solução álcool: éter (1:1). Agitou-se em vortex por 1 min. Filtrou-se em papel de filtro qualitativo. Repetiu-se o procedimento por no mínimo 3 vezes. Manteu-se o resíduo exposto ao ar por um certo período de tempo para que se evaporem os solventes orgânicos residuais.

Pesou-se em um becker de 200 mL cerca de 1 g de amostra desengordurada e adicionou-se 50 mL de H₂SO₄ 1,25 %. Deixou-se em ebulição por 30 min, completando com água destilada o volume do becker perdido por evaporação. Filtrou-se em papel de filtro, lavando o material com 25 mL de água destilada quente. Transferiu-se o material retido no papel de filtro para um becker de 200 mL com a ajuda de 50 mL de NaOH 1,25 %. Deixou-se em ebulição por 30 min, completando com água destilada o volume do becker perdido por evaporação. Filtrou-se em papel de filtro quantitativo previamente tarado, lavou-se com 100 ml de água quente e secou-se em estufa a 100 °C por aproximadamente 2 horas. Pesou-se o papel com resíduo e anotou-se o peso, calculando a porcentagem de fibras bruta com a Equação 16.

$$Fibra Bruta (\%) = \left(\frac{\text{papel com resíduo seco} - \text{papel inicial}}{\text{massa da amostra}} \right) * 100 \quad (16)$$

4.2.5 Determinação de resíduo mineral fixo (cinzas):

A determinação foi feita seguindo-se as normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005). As cinzas de um alimento correspondem ao resíduo obtido por incineração em temperaturas de 550 a 570 °C, não podem conter pontos de carvão e são geralmente brancas ou acinzentadas.

O procedimento consistiu em colocar em mufla a 550 °C por no mínimo 1 hora o cadinho de porcelana previamente identificado. Transferiu-se para o dessecador por no mínimo 30 min (ou até temperatura ambiente) e pesou-se em balança analítica. Pesou-se 2 a 10 g de amostra neste recipiente previamente tarado. Incinerou-se em mufla a 550 °C por 3 a 4 horas ou até que fiquem brancas ou ligeiramente acinzentadas. Esfriou-se em dessecador por no mínimo 30 min e pesar. O percentual de cinzas é calculado pela Equação 17:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{100 \cdot N}{P} \quad (17)$$

onde: N = massa de cinzas (massa final da amostra menos a tara do cadinho) e P = massa tomada da amostra.

4.2.6 Determinação de acidez titulável:

Para a determinação de acidez, foram pesados 5g ou pipetados 5 mL da amostra a ser analisada, e passados para um erlenmeyer contendo 50 mL de água destilada. Foram adicionadas 3 gotas de fenolftaleína a 1% como indicador e titulado com a solução de hidróxido de sódio 0.1N até o aparecimento da coloração rósea (IAL, 2005).

Titulou-se com NaOH até o aparecimento da coloração rósea. Terminada a titulação anotou-se o volume de hidróxido gasto. Para determinar a acidez total, utiliza-se a Equação 18:

$$\text{Acidez (\%)} = \frac{V \cdot N \cdot f \cdot Eq}{P \cdot 10} \quad (18)$$

onde: V = volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação, em ml; N = normalidade da solução de hidróxido de sódio (0,1n); f = fator da solução de hidróxido de sódio; p = peso da amostra em gramas; eq = equivalente grama expresso em ácido.

4.2.7 Determinação de sólidos solúveis totais (°Brix) – Método Refratométrico:

Consiste na medida do índice de refração das soluções, e sua conversão a sólidos solúveis totais (°Brix). Como padrão é adotado o índice de refração a 20°C, e utilizou-se um refratômetro digital Hanna Instruments HI96801.

4.2.8. Determinação do pH:

Utilizou-se um pHgâmetro digital TCNAL TEC-5 previamente aferido com soluções tampão a pH 4,0 e 7,0.

4.2.9. Determinação de proteínas:

O método foi realizado pelo método de Kjeldahl. O nitrogênio presente nos alimentos pode ser protéico, como também proceder de sais de amônia, de bases nitrogenadas, etc. No doseamento de proteínas pelo método de Kjeldahl, determina-se o nitrogênio total da amostra, que através de cálculo é transformado em nitrogênio protéico (proteína na amostra). Para tanto, considera-se que cada 100 g de proteína contêm, em média, 16 g de nitrogênio, obtendo-se desse modo o fator 6,25 (100/16), que multiplicado pelo percentual de nitrogênio total da amostra dará o percentual da fração protéica na mesma.

O método se baseia-se na combustão úmida através de aquecimento com ácido sulfúrico concentrado na presença de catalisadores, resultando na redução do nitrogênio orgânico da amostra a amônia, que é capturado em solução alcalina formando sulfato de amônia. A amônia é, então, destilada em ignição com uma solução padrão de ácido diluído (ácido bórico) e finalmente titulada com solução padrão de um álcali (ácido clorídrico), dando o conteúdo de nitrogênio orgânico da amostra.

Etapas do procedimento:

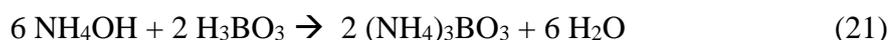
- Digestão da matéria orgânica, na Equação 19:



- Destilação do nitrogênio, na Equação 20:



- Titulação do nitrogênio, nas Equações 21 e 22:



O procedimento foi realizado em três etapas:

Etapa 1: digestão da matéria orgânica: transferiu-se 0,5 g da amostra para um tubo de Kjeldahl e adicionar 2 g de mistura catalítica (sulfato de sódio, sulfato de cobre e dióxido

de selênio na proporção 100:1:0,8 misturados e triturados em almofariz e pistilo). Na capela de exaustão de gases, adicionou-se ao tubo cerca de 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Deve-se tentar fazer com que a amostra e os reagentes caiam no fundo do tubo sem tocar as paredes. Acoplou-se o tubo ao digestor de Kjeldahl, ajustando o aquecedor inicialmente numa posição de aquecimento baixo para evitar a digestão violenta e conseqüente perda do material. A cada 15 min elevou-se a temperatura suavemente (50°C por vez) até que a mesma chegasse a 350°C. O tempo de digestão variou de 1 a 4 horas. A amostra estava digerida quando apresentou coloração incolor ou levemente esverdeada. Desligou-se o aquecedor e deixou-se 15 a 30 min para esfriar, colocando-se na boca do tubo um tampão de algodão.

Etapa 2: destilação do nitrogênio: transferiu-se para um erlenmeyer de 250 mL, 25 mL de ácido bórico a 4% e adicionou-se 2 gotas de indicador vermelho de metila 0,25 e 2 gotas de indicador verde de bromocresol 0,2%. Preparou-se o destilador de kjeldahl, mergulhando-se a saída do condensador no erlenmeyer, tendo o cuidado de observar se a extremidade final deste estava completamente mergulhada na solução de ácido bórico. Adicionou-se ao tubo contendo a amostra digerida água destilada até um pouco menos da metade do tubo e 3 a 5 gotas de fenolftaleína 1%. Em seguida, acoplou-se o tubo ao destilador de Buchi. Após a solução estar aquecida, desligou-se o aquecimento e adicionou-se, lentamente, NaOH 40% até conseguir pH alcalino (mudança para coloração rosa). Fez-se a destilação até recolher um volume de destilado de aproximadamente 100 mL.

Etapa 3: titulação do nitrogênio: titulou-se a solução do erlenmeyer com ácido clorídrico 0,1 N padronizado até o aparecimento da coloração avermelhada. Foi calculada pela Equação 23:

$$Proteína\ Total\ \left(\frac{g}{100g}\right) = \frac{V \cdot f \cdot N \cdot F \cdot 1,4}{P} \quad (23)$$

onde: V = volume gasto na titulação com ácido clorídrico 0,1 N; f = fator de correção da solução de ácido clorídrico 0,1 N; F = fator de correspondência nitrogênio – proteína e P = massa tomada de amostra. O valor de F para alimentos em geral é 6,25.

4.3 Compostos Antioxidantes:

4.3.1. Teor e retenção do licopeno e betacaroteno:

O teor de licopeno e betacaroteno foram determinados segundo o método proposto por Nagata e Yamashita (1992). O licopeno foi extraído utilizando-se uma mistura de

acetona e hexano (4:6). Os extratos foram submetidos à leitura em espectrofotômetro em diferentes comprimentos de onda (453, 505, 645 e 663 nm)

A concentração de licopeno foi calculada de acordo com a Equação 24:

$$\text{Licopeno} \left(\frac{\text{mg}}{100\text{mL}} \right) = 0,0458.A663 + 0,204.A645 + 0,372.A505 - 0,0806.A453 \quad (24)$$

Os resultados foram transformados para serem expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$. O percentual de retenção de licopeno foi calculado de acordo com a equação 25:

$$\%R = \text{licopeno do tomate seco} \left(\mu\text{g} \cdot 100 \frac{\text{g}}{\text{MS}} \right) \times \frac{100}{\text{licopeno do tomate in natura} \left(\mu\text{g} \cdot 100 \frac{\text{g}}{\text{MS}} \right)} \quad (25)$$

Onde: MS = matéria seca.

4.3.2. Teor de ácido ascórbico:

O teor de ácido ascórbico foi determinado por análises titulométricas de acordo com o procedimento descrito por AOAC (1995), modificado por Benassi *et al.*, (1988), que substituiu o ácido meta fosfórico por ácido oxálico.

- Preparo do extrato:

A polpa do fruto foi extraída deste manualmente, pesou-se 1,0 g da polpa e adicionou-se cerca de 30 ml de ácido oxálico 0,5% (refrigerado), a homogeneização dos tecidos realizou-se no homogeneizador politron Omni 17105. A casca foi também extraída manualmente, macerou-se em um cadinho com ácido oxálico gelado, logo foi passada por politron para homogeneização dos tecidos. Após a extração e homogeneização da amostra, transferiu-se para um balão volumétrico de 100 ml e completou-se o volume com ácido oxálico 0,5% gelado. A solução foi armazenada em vidro escuro. Nos casos em que a análise não foi imediata, armazenou-se em geladeira ou freezer esta solução por até um dia sem alterações significativas nos teores de ácido ascórbico.

- Padronização da solução de Tillman 0,02% com ácido ascórbico:

A solução de Tillman, titulante, foi padronizada: 5 ml da solução estoque de ácido ascórbico (50 $\mu\text{g/ml}$) foram transferidos para um erlenmeyer de 125 ml, é ajustado para 50 ml com água destilada. A titulação foi realizada com solução de Tillman até o ponto de virarem, róseo claro persistente por 15 segundos. O reagente foi reduzido de azul a incolor e em meio ácido, tornou-se róseo.

- Determinação de ácido ascórbico no extrato:

Tomou-se 1ml do extrato em um erlenmeyer de 125 ml, ajustado a 50 ml com água destilada, em seguida foi titulado com a solução de Tillman, até o ponto de virarem róseo claro persistente por 15 segundos. Realizou-se como mínimo quatro repetições por amostra.

4.3.3. Teor dos compostos fenólicos:

Para a extração dos compostos fenólicos, foram pesados 5 g de amostra, aos quais foram adicionados 40 mL de álcool metílico 50%. Essa mistura foi homogeneizada por 2 minutos e deixada em repouso por 1 hora à temperatura ambiente, protegida da luz. Após esse período, a mistura foi centrifugada por 17 minutos. O sobrenadante foi coletado e foram adicionados 40 mL de acetona 70% ao resíduo. Este foi homogeneizado por 2 minutos e deixado em repouso por 1 hora. Em seguida, centrifugou-se novamente, por 17 minutos. O sobrenadante foi coletado, adicionado ao primeiro sobrenadante e o volume foi completado para 100 mL com água destilada.

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método proposto por Waterhouse (2002), empregando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Em resumo, 0,5 mL de extrato de cada amostra foram adicionados aos tubos contendo 2,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu 10% (v/v). Em seguida, foram adicionados 2 mL de solução de carbonato de sódio 4% (v/v). Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 120 minutos, ao abrigo da luz. A cor azul produzida pela redução do reagente Folin-Ciocalteu pelos fenólicos foi medida espectrofotometricamente, na faixa de absorção de 750nm. O cálculo do teor de fenólicos foi realizado a partir da equação da reta obtida da curva padrão do ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido gálico por 100 g da amostra (mg EAG.100g⁻¹).

4.4. Fermentações alcoólicas

O Microrganismo utilizado para a fermentação alcoólica foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, na forma de fermento biológico seco instantâneo Fermix®. Os ensaios foram baseados no trabalho de Silva et al. (2018).

4.4.1. Planejamento experimental – Fermentações em batelada:

Para se obter as melhores condições da concentração de levedura e de sacarose foram realizados 9 experimentos, ocorrendo variação primeiramente a concentração inicial de inóculo (1, 3 e 5 g/L), onde geralmente se utilizam concentrações de inóculo entre 2-5 g/L na

elaboração de bebida fermentada/etanol, como por exemplo, 2 g/L e 14 h de fermentação (água residual da produção de refrigerantes) (COMELLI, SULEY e ISLA, 2016); 2,5 g/L e 72 h de fermentação (xarope de sacarose, glicose e frutose) (PUTRA e ABASAEED, 2018); 5,4 g/L e 11 h de tempo de fermentação (caldo de cana-de-açúcar) (RIVERA *et. al.*, 2017); 5 g/L e 35 h de fermentação (fermentação do melaço da cana) (PONCE *et. al.*, 2016). Por essa razão resolveu-se estudar as concentrações de inóculo de 1, 3 e 5 g/L.

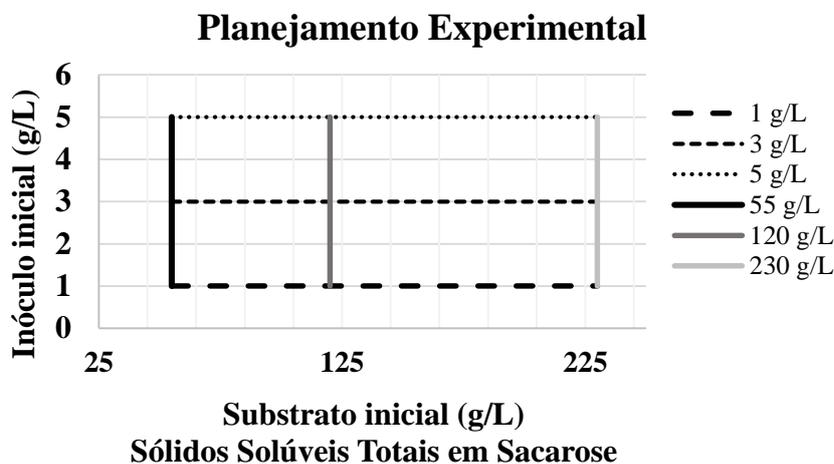
Ocorreu também a variação da quantidade de sólidos solúveis (55, 110 e 230 g/L), sendo a concentração de substrato um fator importante, pois determina a quantidade de produto que poderá ser formado assim como manter a viabilidade do inóculo (COMELLI, SULEY e ISLA, 2016). Por outro lado, o substrato, que nesse caso são açúcares, em específico, a sacarose, adicionada na etapa de chaptalização, pode exercer papel de inibição do crescimento microbiano. Isto é um resultado, em especial, do estresse osmótico que ocorre quando a quantidade de soluto é grande o suficiente para interferir pressão osmótica da membrana celular (PUTRA e ABASAEED, 2018).

Foi fixado-se a concentração de sólidos da polpa do tomate em 20 g/L de sólidos, como disposto no Gráfico 2, pois concentrações mais altas podem interferir no crescimento microbiano. Para um volume útil de mosto de 600 mL, foram colocados em Erlenmeyer de 1 L, 12 g da polpa do tomate e diluído com 488 mL com água destilada, em seguida é feita a aferição do teor de sólidos totais com sacarose comercial (Crystal ®) e aferido o pH para 5,5 com bicarbonato de sódio em pó (Synth) e ácido sulfúrico (10%) (Dinâmica Química Original) utilizando pHgâmetro digital TCNAL TEC-5. Com pH aferido, foram adicionados os nutrientes, em g/L: 0,7 g de sulfato de magnésio, 2,66 g de ureia, 2,8 g fosfato de potássio, 3,4 g de extrato de levedura (SONEGO *et al.*, 2016). Os Erlenmeyers foram pasteurizados em banho maria por 30 min à 60°C, conforme procedimento realizado por Costa *et al.* (2017). Por fim, o inóculo, as leveduras, foram previamente aclimatadas por 24 h a temperatura ambiente com o mosto sendo composto por 20 g/L de tomate e com 5,5 °Brix (55 g/L de sacarose) sendo adicionados ao mosto de fermentação em uma proporção massa/volume de 10%, mas contendo a quantidade de sólidos totais (massa seca) indicada no planejamento experimental de 1, 3 e 5 g/L.

A solução de dicromato foi preparada utilizando-se 500 mL de água destilada, 325 mL de ácido sulfúrico concentrado e 33,678g de dicromato de potássio padrão. Foi transferido a solução de dicromato para um erlenmeyer de 2L como 200 mL de água em banho maria, sem aquecimento e vai transferindo o ácido aos poucos, agitando

constantemente. Deixando esfriar e completar o volume para 1 litro, armazenando-se a solução em vidro âmbar.

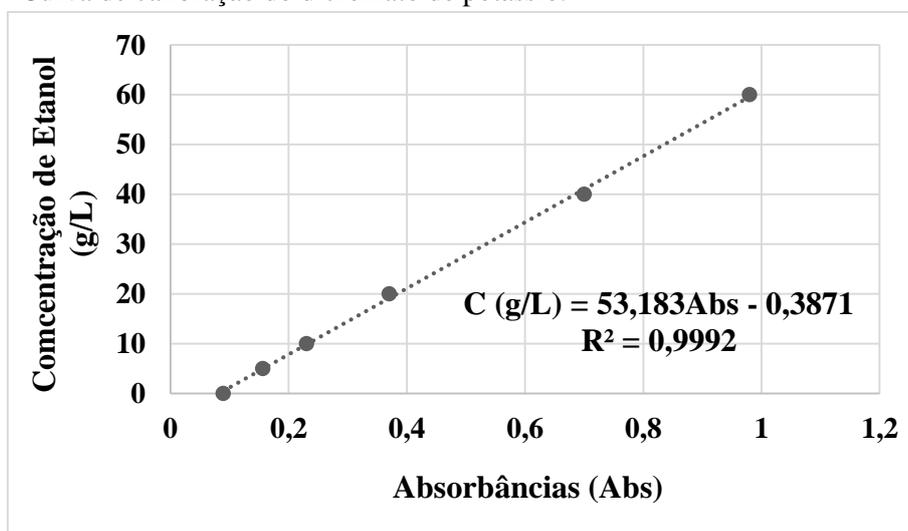
Gráfico 2 - Planejamento experimental.



Fonte: Autor, 2019.

A destilação foi realizada conforme Abud (1997). Destilou-se cada amostra por 3 minutos, contados após o início da fervura, completando o volume para um balão de 50 mL com água destilada. Foi transferido 2 mL deste destilado, o qual foi submetido a uma reação a 60 °C por 30 minutos com 2 mL de solução de dicromato de potássio e leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro a 600 nm. A concentração de etanol foi determinada a partir de uma curva de calibração de etanol em concentrações conhecidas, submetidas à mesma destilação e reação, como mostra o Gráfico 3.

Gráfico 3 - Curva de calibração do dicromato de potássio.



Fonte: Autor, 2019.

4.4.2. Crescimento Celular:

Embora a polpa de tomate contenha uma certa quantidade de sólidos insolúveis, foi feita a realização da contagem celular em câmara de Neubauer em microscópio óptico, conforme Antonini (2004). A concentração celular da levedura *S. cerevisiae* foi calculada de acordo com a Equação 26, e após isso convertida por uma curva padrão de peso seco celular (g/L) por concentração de células (células/mL):

$$C_x \left(\frac{\text{Células}}{\text{mL}} \right) = \left(\left(\text{células totais nos 5 campos de contagem} \right) / 5 \right) \cdot 10^4 \cdot D \quad (26)$$

onde: Cx – concentração celular e D - diluição adotada para a amostra.

4.4.3. Rendimento e eficiência de Fermentação:

O rendimento do processo (R_p) foi calculado pela relação entre a quantidade de etanol produzido (g/L) e a quantidade de A.R.T. inicial do processo (g/L), através da Equação 27. Por outro lado, a Eficiência bioquímica da fermentação (E_f) foi calculado utilizando a quantidade de açúcares totais iniciais e finais além do fator de conversão bioquímica de monossacarídeo (hexose) em etanol, através da Equação 28, são descritos como segue:

$$R_p = \frac{\text{Etanol obtido } \left(\frac{g}{L} \right)}{\left(\text{Açúcares Totais iniciais} \right)} * 100 \quad (27)$$

$$E_f = \frac{\text{Etanol obtido } \left(\frac{g}{L} \right)}{0,511 \cdot (\text{Açúcares Totais}_{\text{Início}} - \text{Açúcares Totais}_{\text{Final}})} * 100 \quad (28)$$

onde: 0,511 é a relação estequiométrica de conversão da glicose em etanol, fator de Gay-Lussac.

4.4.4 Equações cinéticas aplicadas:

Partindo das equações de r_x , r_s e r_p , (Equações 5, 8 e 11); correspondentes velocidades instantâneas de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto, (dX/dt , dS/dt e dP/dt), e resolvendo-se as integrais considerando-se a cinética de Monod e os fatores de conversão ($Y_{x/s}$ e $Y_{p/s}$) obtém-se as seguintes Equações 29, 30 e 31, para crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto:

$$X = X_0 e^{\left(\frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_s + S} \right) \cdot t} \quad (29)$$

onde: X_0 é a quantidade de inóculo inicial; μ_{\max} é taxa de crescimento máximo; S é concentração de substrato; K_s é a constante de semi-saturação do modelo de Monod; t é tempo de fermentação.

$$S = S_0 - \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S} \cdot t \quad (30)$$

onde: $Y_{x/s}$ é consumo de substrato.

$$P = \frac{Y_{p/s}}{Y_{x/s}} \cdot \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S} \cdot X \cdot t \quad (31)$$

onde: P é concentração de etanol; $Y_{p/s}$ é taxa de produção de produto.

4.4.5. Regressão não-linear e cálculo do erro

As constantes cinéticas para os componentes de cada modelo foram estimadas usando o Solver® ME, através do método Generalized Reduced Gradient (GRG). O erro preditivo do modelo (MPE) entre a curva teórica e os pontos experimentais foi calculado usando a Equação 32 para validar os modelos testados:

$$MPE (\%) = \frac{100}{n} \cdot \sum_{i=1}^n \left| \frac{x_{exp} - x_{calc}}{x_{calc}} \right| \quad (32)$$

onde: x_{exp} representa os dados experimentais, x_{calc} representa os dados calculados e n o número de pontos experimentais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste tópico foram abordados todos os resultados obtidos nesse trabalho bem como sua discussão.

5.1. Caracterização físico-química da matéria-prima:

Na Tabela 4 está disposta a caracterização físico-química da polpa de tomate (com casca e com semente).

Tabela 4 - Caracterização físico-química das polpas de tomate (com casca e com semente).

Análises	Médias	Desvios (%)
Umidade (%)	94,08	0,036
Brix (°Brix)	4,50	---
pH	4,25	---
Acidez Total (meq/g)	4,43	0,20
Proteína (g/100g)	1,05	0,17
Cinzas (g/100g)	0,11	0,08
Açúcares totais (g/L)	29,14	0,02
Lipídeos (g/100g)	0,18	0,02
Fibras Alimentares (g/100g)	1,04	0,21
Carboidratos (g/L)	38	---

Fonte: Autor, 2019.

Em relação a pH e acidez total obtidos, o valor de pH ficou bem próximo ao esperado, segundo Guilherme *et al.* (2008), com valores dentro da faixa de variação de tomates considerados ideais para tomates de qualidade cujo pH desejável é inferior a 4,5 e superior a 3,7 para não ter acidez elevada, pois um pH inferior a 4,5 é desejável para impedir a proliferação de microrganismos e valor de acidez total ficou acima do esperado. Segundo Monteiro *et al.* (2008), valores superiores de acidez total acima 4,5 meq/g, requerem períodos mais longos de esterilização da matéria prima em um processamento térmico, ocasionando maior consumo de energia e maior custo de processamento.

Para os valores de SST (°Brix) o tomate apresentou valor muito próximo ao esperado. Para Nascimento *et al.* (2013) no tomate convencional espera-se um teor de sólidos solúveis (°Brix) de 4,75. Essa variação pode ser atribuída às características genéticas da própria

hortaliça, que é influenciada significativamente pela adubação, temperatura e irrigação. Em geral, o teor de SST de tomates varia entre 4° e 6°Brix, sendo, na sua maior parte, constituído de açúcares.

Para os valores de açúcares totais, há uma tendência de aumento do teor de sólidos solúveis com a evolução da maturação, devido a degradação e/ou biossíntese de polissacarídeos. Segundo Chitarra e Chitarra (2005), o teor de sólidos solúveis constitui importante parâmetro sobre o grau de doçura dos frutos. O alto teor de açúcares e ácidos tem sido indicado como maior atributo da qualidade sensorial do tomate, além de intensificar seu sabor característico (SOUZA, 2018).

Em relação aos teores de lipídeos, proteínas, fibras alimentares e de cinzas ficaram bem próximas aos esperados de acordo com TACO (2011), com valor de 0,2 g/100g de tomate de proteína, 1,1 g/100g de tomate de lipídeos, 1,2 g/100g de tomate de fibras alimentares e 0,5 g/100g de tomate de cinzas, devido ao fato de que o tomate possui baixos valores calóricos, proteicos e fibrosos por ser uma hortaliça.

Na Tabela 5 está disposto a caracterização de antioxidantes da polpa de tomate (com casca e com semente).

Tabela 5 - Caracterização de antioxidantes das polpas de tomate (com casca e com semente).

Análises	Médias	Desvios (%)
Compostos Fenólicos (mg/100g)	117,6	0,04
Licopeno (mg/100g)	12,70	0,01
Vitamina C (mg/100mL)	2,90	0,01

Fonte: Autor, 2019.

O conteúdo de fenólicos totais do tomate fica um pouco abaixo do esperando sendo esperado uma variação de 143,17 e 163,79 mg de ácido ferúlico por 100g de tomate (base úmida) (BORGUINI *et al.*, 2006). Entretanto, estes valores são apenas um indicativo da concentração de polifenóis em tomates, uma vez que não há um único método analítico que seja capaz preciso na quantificação do conteúdo total de polifenol de um alimento, por causa da ampla variedade da estrutural encontrada entre os compostos fenólicos e a ampla variação no conteúdo, dependendo da natureza do alimento e da parte da planta que o contém. Os compostos fenólicos são um dos maiores grupos de componentes dietéticos não-essenciais que estão associados à inibição da aterosclerose e do câncer. A bioatividade dos fenólicos pode ser atribuída à sua habilidade de quelar metais, inibir a peroxidação lipídica e sequestrar

radicais livres. As propriedades antioxidantes dos fenólicos ocorrem, principalmente, devido à seu potencial de oxirredução, que os permitem atuar como agentes redutores, doando hidrogênio e neutralizando radicais livres (CHEUNG *et al.*, 2003).

O teor de licopeno do tomate obtido estar dentro do esperado sendo esperado, segundo Shami e Moreira (2004), licopeno tem uma varia de 6 e 19 mg por 100g de tomate (base úmida), isso devido a trituração sofrida pelos tomates e também ao fato do estar bastante maduro correlacionado com vários parâmetros decorrentes do estágio de maturação. Correlações positivas entre o conteúdo de licopeno e teor de sólidos insolúveis, pH, teor de sólidos solúveis totais e ângulo de cor dos tomates. Sugere-se que o modo de ação do licopeno na prevenção de doenças cardiovasculares relacione-se às suas propriedades antioxidantes, levando à proteção das lipoproteínas contra a oxidação (SHAMI e MOREIRA, 2004).

Já o teor de ácido ascórbico do tomate ficou abaixo do esperado sendo esperado uma varia de 10 e 12 mg por 100g de tomate (base úmida). Segundo Sahlin, Savage e Lister (2004), valores menores de ácido ascórbico podem ser atribuídos ao armazenamento incorreto, pois pode ocasionar perdas expressivas do nutriente e os níveis de ácido sofrem variações de acordo com a maturação. Em geral, a contribuição da vitamina C para a capacidade antioxidante total dos extratos de alimentos de origem vegetal varia de acordo com o tipo de alimento. De acordo com Leong e Shui (2002), o ácido ascórbico possui a habilidade de neutralizar a ação de radicais livres no sistema biológico, tendo um papel importante na prevenção de doenças, como câncer.

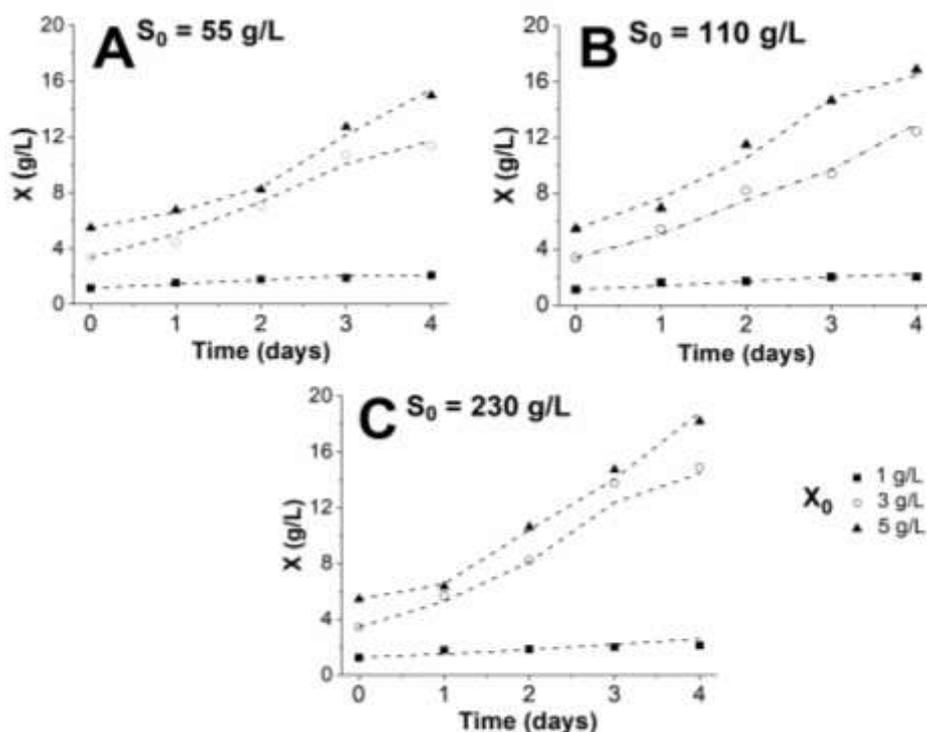
5.2 Avaliação da concentração de inóculo:

A concentração de inóculo é uma etapa fundamental para a otimização da fermentação, uma vez, que é o biocatalisador que nos fornecerá o produto desejado, nesse caso o etanol (COMELLI, SULEY e ISLA, 2016; PUTRA e ABASAEED, 2018; RIVERA *et al.*, 2017). Esse parâmetro atua diretamente na velocidade de reação, e consequentemente, no tempo de processo.

Os perfis cinéticos foram similares nas diversas concentrações de substrato iniciais alcançando a fase estacionária a partir do quarto dia, encerrando a fase exponencial de crescimento; e obtendo-se concentrações iniciais e finais de levedura de 1 para 2, 3 para 12-14 e 5 para 14-16 g/L (Figura 9A-C). As fermentações ocorreram até o oitavo dia de modo a garantir que a fase estacionária tivesse sido alcançada. Como o modelo de Monod prevê

apenas o comportamento da fase exponencial, utilizou-se apenas os pontos experimentais até o quarto dia de fermentação. Na Figura 9, também possível observar que houve um ajuste satisfatório na modelagem cinética utilizando Monod dos dados experimentais, representada pelas linhas cheias, para 55 g/L de sacarose inicial tem MPE de 2- 5% para 1, 3 e 5 g/L de concentração de levedura, respectivamente. Para 110 g/L de sacarose tem MPE 4-9% e para 230 g/L sacarose tem MPE 4-9%.

Figura 9 - Perfis cinéticos de crescimento celular em função da concentração inicial de inóculo (X_0) e concentração inicial de substrato (S_0): A – 55, B – 110 e C – 230 g/L de substrato. Os símbolos representam: (■) 1, (○) 3 e (▲) 5 g/L de inóculo. As linhas que contornam os pontos representam as modelagens obtidas.



Fonte: Autor, 2020.

Foi verificada também a viabilidade celular das leveduras ao longo das fermentações e em todas, não apresentou um percentual de células mortas maior que 5%, e por isso a cinética não englobou a taxa específica de morte celular (SILVA e BERTUCCO, 2018).

Jang *et al.* (2010) produziram um fermentado de tomate, utilizando tomate maduro, com concentração inicial de açúcar de 240 g/L e com concentração de inóculo de 5% (v/v), sendo esse inóculo preparado mantendo-o em meio batata dextrose (YPD) por 30 horas à 30°C. A fermentação foi feita sem agitação durante 7 dias, mantida a 30°C, obtendo-se 61 g/L de concentração final de açúcar e um teor alcoólico de 80 g/L, tendo-se assim um

rendimento de 87,46%, próximo ao encontrado nesse trabalho, confirmando que o mosto contendo tomate e chaptalizado pode ser usado como matéria-prima e com reprodutibilidade para fermentação etanólica. No entanto, esse trabalho, não avaliou nenhuma variação das condições de fermentação, como por exemplo, concentração de inóculo.

A fermentação do mosto com polpa de tomate se desenvolveu de forma lenta, com taxa de crescimento máxima (μ_{\max}) situando-se entre 0,2-0,5 dia⁻¹ e com cerca de 4 dias de fase estacionária (Tabela 6). No entanto, esse tempo de fermentação é compatível com as que foram obtidas nos fermentados de polpas de frutas/verduras, embora dados cinéticos como o μ_{\max} não tenham sido facilmente encontrados, a citar: para otimização da produção do fermentado de acerola foram 14 dias de fermentação com 86,8 g/L de etanol produzido, com 3 g/L de concentração de inóculo inicial (ALMEIDA *et. al.*, 2014), para produção de fermentado de umbu foram 11 dias de fermentação obtendo-se 102,6 g/L de concentração de etanol, com 5 g/L de levedura inicial (DANTAS e SILVA, 2017), assim como também para produção de fermentado de laranja foram 7 dias obtendo-se 94,7 g/L de concentração de etanol, com 5 g/L de concentração de inóculo inicial (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Jang *et al.* (2010) e Many *et al.* (2014) utilizaram entre **7-8 dias** de fermentação para obter a bebida fermentada de tomate com 80 e 68 g/L de concentração de etanol, respectivamente, ambos utilizando a concentração inicial de inóculo de 5% (v/v).

Tabela 6 - Constantes cinéticas do modelo de Monod para crescimento celular.

S ₀ (g/L)	X ₀ (g/L)								
	1			3			5		
	μ_{\max} (dia ⁻¹)	K _S (g/L)	MPE (%)	μ_{\max} (dia ⁻¹)	K _S (g/L)	MPE (%)	μ_{\max} (dia ⁻¹)	K _S (g/L)	MPE (%)
55	0,250	7,63	3,27	0,480	7,20	5,04	0,390	7,60	2,26
110	0,226	7,50	9,47	0,450	7,20	4,43	0,373	7,70	2,60
230	0,199	7,40	9,32	0,450	7,60	4,50	0,340	7,40	2,50
						K _S médio	7,47 ± 0,18		

Fonte: Autor, 2020.

Em comparação com alguns trabalhos cinéticos envolvendo fermentações etanólicas a partir de xaropes de sacarose, glicose e frutose, esses valores de μ_{\max} encontrados são considerados baixos. Alguns exemplos são: fermentação de xarope açucarada com duração de 72 h obteve-se um μ_{\max} de 7,01 dia⁻¹ (PUTRA e ABASAEED, 2018), fermentação de melaço da cana-de-açúcar durante 72 h e obtendo-se μ_{\max} de 12,72 dia⁻¹ (PHISALAPHONG, SRIRATTANA e TNATHAPANICHAKOON, 2006), fermentação do suco da palma com

duração de 96 h e com valor de μ_{\max} de $6,96 \text{ dia}^{-1}$ (SRIMACHAI *et. al.*, 2015) e na fermentação utilizando melão de cana-de-açúcar com duração de 35 h, onde foi obtido uma constante cinética (μ_{\max}) de $8,33 \text{ dia}^{-1}$ (PONCE *et. al.*, 2016). No entanto, se observado, as fermentações supracitadas não ultrapassam, em sua maioria, 2 dias (48 horas) de fermentação, constituindo-se de fermentações rápidas e geralmente preocupados com a obtenção de etanol combustível.

Por outro lado, o objetivo do presente trabalho é a produção de uma bebida fermentada (“vinho”), ou seja, uma bebida alimentícia. Como discutido, na preparação de bebidas fermentadas/vinhos, geralmente são obtidas fermentações lentas (ALMEIDA *et. al.*, 2014; DANTAS e SILVA, 2017). Por exemplo, na produção da cerveja com 9% de substrato, se utilizou 6 dias de fermentação obtendo-se uma constante cinética (μ_{\max}) de $0,424 \text{ dia}^{-1}$ (PARCUNEV *et. al.*, 2005), próximo desse trabalho.

Em relação a constante de semi-saturação do modelo de Monod (K_s), que em teoria deve ser a mesma nas variadas concentrações iniciais de substratos se mostrou adequada com uma variação menor que 3% e de valor médio $7,47 \pm 0,18 \text{ g/L}$. Esse valor está de acordo (próximo) com diversos autores que realizaram fermentação etanólica utilizando a espécie *S. cerevisiae* em condições similares ao desse trabalho como: $14,16 \text{ g/L}$ obtida na fermentação etanólica utilizando glicose (ESFAHANIAN *et. al.*, 2016); $6,88 \text{ g/L}$ obtido na fermentação de xarope açucarado (PUTRA e ABASAEED, 2018); $15,68 \text{ g/L}$ na fermentação da cana-de-açúcar para obter etanol (RIVERA *et. al.*, 2017); $5,55 \text{ g/L}$ obtido na fermentação em batelada de xarope açucarado (SCHEIBLAUER *et. al.*, 2018); e $21,72 \text{ g/L}$ na fermentação do caldo da cana-de-açúcar (VELOSO *et. al.*, 2018).

5.3 Fermentações em batelada – Avaliação da concentração de substrato:

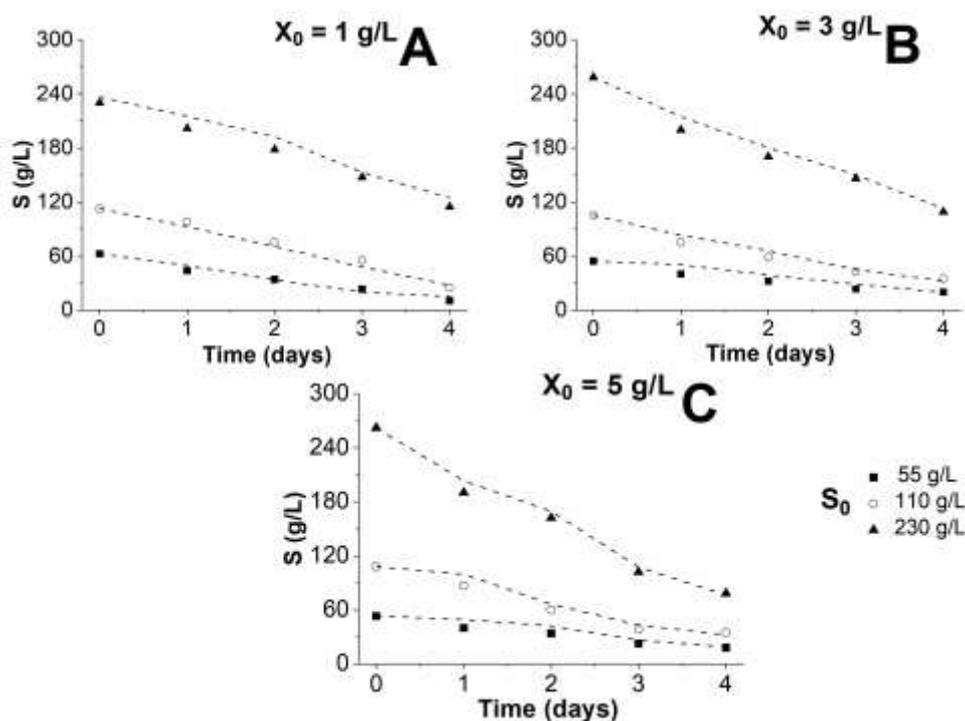
Como já falado a concentração de substrato inicial determina a quantidade de produto que poderá ser produzido (COMELLI, SULEY e ISLA, 2016), assim como também pode exercer papel de inibição no crescimento microbiano. (PUTRA e ABASAEED, 2018).

Os perfis cinéticos foram similares nas diversas concentrações de substrato iniciados alcançando a fase estacionária a partir do quarto dia (as fermentações ocorreram até o oitavo), encerrando a fase exponencial de crescimento obtendo-se concentrações iniciais e finais de substrato de 55 para 7-16; 110 para 14-23 e 230 para 60-80 g/L de açúcares (Figura 10A-C). De forma similar, como o modelo de Monod prevê apenas o comportamento da fase exponencial, utilizou-se apenas os pontos experimentais até o quarto dia de fermentação. Na

Figura 10, também possível observar que houve um suficiente ajuste na modelagem cinética utilizando Monod dos dados experimentais, para 1 g/L de concentração de inóculo inicial tem MPE de 11-12% para 55, 110 e 230 g/L de concentração de sacarose, respectivamente. Para 3 g/L de inóculo tem MPE entre 7,94 -11,79% para 55, 110 e 230 g/L de concentração de sacarose, respectivamente e para 5 g/L de inóculo tem MPE entre 3,27 -5,64% para 55, 110 e 230 g/L de concentração de sacarose, respectivamente.

Segundo os estudos de Many *et al.* (2014), que fez uma otimização das condições de fermentação do fermentado do tomate, variando período de incubação (1 a 8 dias), ajuste de Brix (20, 22, 24 e 26°Brix) e temperaturas de incubação (20, 25 e 30°C), com concentração de inóculo de 5% (v/v) (mas não estudou a cinética, fez apenas o planejamento experimental analisando as concentrações inicial e final). Obtendo-se assim que quanto maior o tempo de incubação, maior o conteúdo de etanol resultante. O mais alto nível de etanol foi produzido no quarto dia com teor de etanol de 68,04 g/L, tendo concentração inicial e final de açúcares de 220 e 48 g/L.

Figura 10 - Perfis cinéticos de crescimento celular em função da concentração inicial de substrato (S_0) e concentração inicial de inóculo (X_0): A – 1, B – 3 e C – 5 g/L de levedura. Os símbolos representam: (■) 55, (○) 110 e (▲) 230 g/L de substrato. As linhas que contornam os pontos representam as modelagens obtidas.



Como observado na Figura 10, na fermentação do mosto chaptalizado com sacarose e com polpa de tomate, quanto maior a concentração de inóculo, maior foi o consumo de açúcares, tendo uma taxa de consumo máxima em torno de 4,545 g/(L.h) na maior concentração inicial de inóculo de 5 g/L e maior concentração inicial de substrato 230 g/L, como disposto na Tabela 7.

Tabela 7 – Taxa de consumo (g/(L.h)) com consumo de substrato para crescimento celular.

Tempo de Fermentação (Dias)			1	2	3	4
1 g/L de inóculo	Conc. de substrato (g/L)	55	0,773 ± 0,114	0,254 ± 0,097	0,222 ± 0,019	0,134 ± 0,056
		110	0,587 ± 0,114	0,197 ± 0,024	0,112 ± 0,019	0,089 ± 0,056
		230	2,284 ± 0,169	0,488 ± 0,029	0,430 ± 0,021	0,314 ± 0,010
3 g/L de inóculo	Conc. de substrato (g/L)	55	1,038 ± 0,151	0,106 ± 0,012	0,047 ± 0,011	0,035 ± 0,008
		110	1,602 ± 0,036	0,204 ± 0,033	0,178 ± 0,017	0,081 ± 0,011
		230	3,796 ± 0,029	0,242 ± 0,010	0,132 ± 0,006	0,088 ± 0,013
5 g/L de inóculo	Conc. de substrato (g/L)	55	1,111 ± 0,065	0,075 ± 0,002	0,045 ± 0,003	0,036 ± 0,002
		110	1,742 ± 0,002	0,466 ± 0,027	0,178 ± 0,009	0,078 ± 0,002
		230	4,545 ± 0,043	0,420 ± 0,014	0,329 ± 0,006	0,246 ± 0,005

Fonte: Autor, 2020.

Da mesma forma que o tempo de fermentação foi longo e a taxa de crescimento celular máxima também foi menor (μ_{max}), houve também uma menor taxa de consumo de substrato em relação à valores encontrados na literatura para mostos apenas açucarados, apresentando uma taxa de consumo entre 9,0 – 11,0 g/(L.h) para fermentação de águas residuais açucaradas (COMELLI, SULEY e ISLA, 2016) e na fermentação de xarope açucarado foi obtido uma taxa de consumo de substrato de 5,5 g/(L.h) (RIVERA *et. al.*, 2017).

No entanto para a produção dos fermentados alcóolicos de frutas, a taxa máxima de consumo ficou bem próximo ao encontrado: na otimização para produção de um fermentado de acerola obteve-se uma taxa de consumo de 6,64 g/(L.h) para 14 dias de fermentação (ALMEIDA *et. al.*, 2014), na produção de fermentado de laranja obtive-se um valor de 6,736

g/(L.h) para 7 dias de fermentação (OLIVEIRA et al., 2015), na produção de fermentado de umbu a taxa máxima de consumo foi de 5,283 g/(L.h) para 11 dias de fermentação (DANTAS e SILVA, 2017), assim como também na produção de fermentado de tomate; pois, Jang et al. (2010), obtiveram uma taxa máxima de consumo de 3,283 g/(L.h) para 3 dias de fermentação e Many et al. (2014), obteve-se uma taxa de consumo de 4,065 g/(L.h) para 4 dias de fermentação.

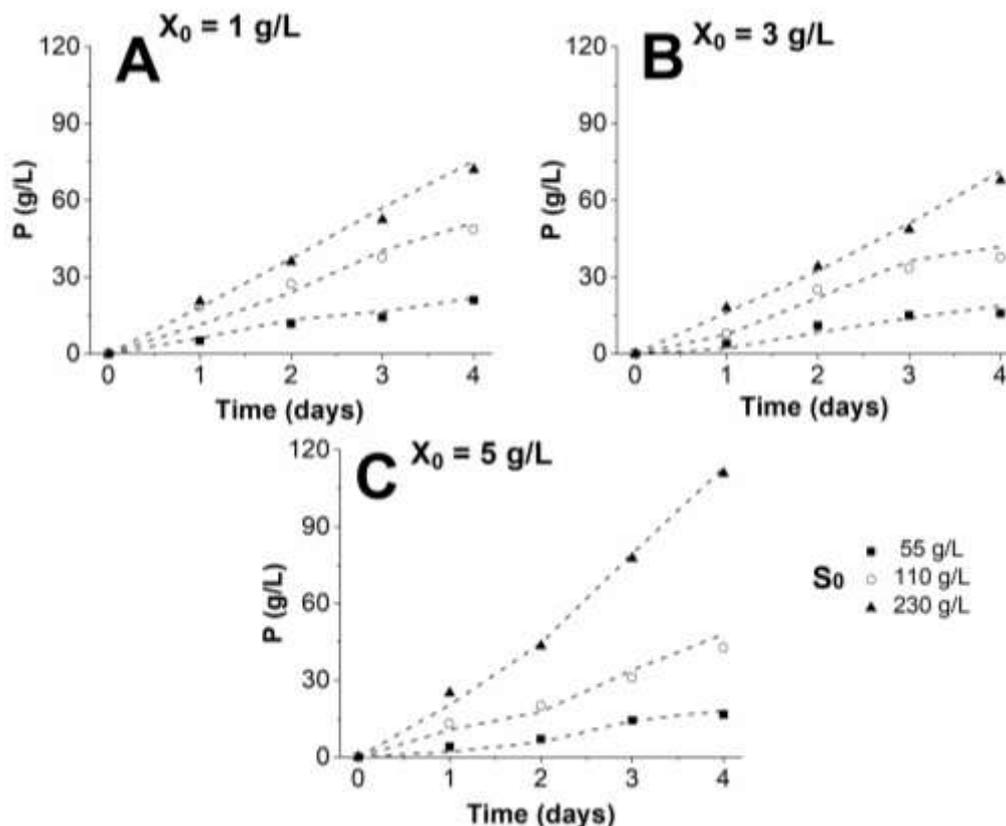
5.4 Fermentações em batelada – Avaliação da concentração de produto:

Em relação ao produto, a maior importância se dar a respeito à concentração mínima de etanol para ser considerado como vinho/bebida fermentada, que segundo De Paula *et. al.* (2012) deve situar-se entre 9 – 14 °GL ($\rho = 0,789 \text{ g/cm}^3$) se localizando entre 71 – 110,5 g/L de teor de etanol.

De forma similar ao crescimento celular e consumo de substratos, os perfis cinéticos alcançaram a fase estacionária a partir do quarto dia (as fermentações ocorreram até o oitavo), encerrando a fase exponencial de crescimento obtendo-se concentrações finais de etanol de 18-24; 40-46 e 81-102 g/L de etanol para 55, 110 e 230 g/L de açúcares (Figura 11A-C). As modelagens utilizando 1 g/L de concentração de inóculo inicial tiveram MPE entre 9-19%, para 3 g/L entre 6,6-17,3% e 5 g/L entre 2-5,8%.

Os resultados encontrados para o etanol formado estão de acordo com trabalhos da literatura, a citar: Ponce et. al. (2016) encontrou um teor alcoólico de 82 g/L para fermentação de melão de cana-de-açúcar, com 5 g/L de levedura inicial, 200 g/L de concentração de açúcar e 35 h de fermentação. Por outro lado, Phisalaphong, Srirattana e Tnathapanichakoon (2006), encontrou um teor alcoólico de 90 g/L para fermentação também de melão de cana-de-açúcar, com 2,0 g/L de levedura inicial, 230 g/L de concentração de açúcar e 72 h de fermentação. Rivera et. al. (2017), encontrou um teor alcoólico de 81 g/L para fermentação de caldo de cana-de-açúcar, com 5,4 g/L de levedura inicial, 171 g/L de concentração de açúcar e 11 h de fermentação. Por fim, Many *et al.* (2014), utilizando uma concentração inicial de açúcares de 240 g/L, obteve 64,8 g/L de etanol e teor de açúcares final de 58 g/L, mostrando que a partir da otimização das condições que o tomate pode ser convertido em produto com maior valor agregado produzindo um fermentado com qualidade aceitável.

Figura 11 - Perfis cinéticos de crescimento celular em função da concentração inicial de inóculo (X_0) e concentração inicial de substrato (S_0): A – 1, B – 3 e C – 5 g/L de levedura. Os símbolos representam a quantidade de etanol obtido a partir das concentrações iniciais de açúcares para: (■) 55, (○) 110 e (▲) 230 g/L de substrato. As linhas que contornam os pontos representam as modelagens obtidas.



Fonte: Autor, 2020.

De forma similar a taxa de consumo de substrato, uma vez que a produção de etanol é associada a ela, obteve-se um valor máximo de 1,39 g/(L.h) quando se usou 5 g/L de inóculo e 230 g/L de substrato inicial, como disposto na Tabela 8. Os valores de produtividade obtidos também foram abaixo daqueles obtidos para mostos apenas açucarados, a citar: Comelli, Suley e Isla (2016) encontraram uma produtividade de 5,5 g/(L.h) para fermentação de águas residuais açucaradas, Putra *et al.*, (2018) encontraram a produtividade entre 4,0 - 7,0 g/(L.h) para fermentação de meloço de cana-de-açúcar e para Rivera *et al.* (2017) na fermentação também de meloço de cana encontraram uma produtividade de 2,57 g/(L.h).

Na produção de fermentados alcóolicos de frutas, a produtividade máxima encontrada ficou próxima aos obtidos para esses fermentados, na otimização para produção

de um fermentado de acerola obtiveram uma produtividade de 0,258 g/(L.h) para 14 dias de fermentação (ALMEIDA *et. al.*, 2014), na produção de fermentado de laranja obtiveram uma produtividade de 0,399 g/(L.h) para 7 dias de fermentação (OLIVEIRA *et al.*, 2015), na produção de fermentado de umbu obtiveram uma produtividade de 0,328 g/(L.h) para 11 dias de fermentação (DANTAS e SILVA, 2017), assim como também na produção de fermentado de tomate; Jang *et al.* (2010), obtiveram uma produtividade de 1,238 g/(L.h) para 3 dias de fermentação e segundo Many *et al.* (2014), obtiveram uma produtividade de 0,476 g/(L.h) para 4 dias de fermentação.

Tabela 8 – Produtividade de fermentação (g/(L.h)) com produção de etanol para crescimento celular.

Tempo de Fermentação (Dias)			1	2	3	4
1 g/L de inóculo	Conc. de substrato (g/L)	55	0,278 ± 0,005	0,151 ± 0,002	0,094 ± 0,005	0,013 ± 0,001
		110	0,489 ± 0,025	0,058 ± 0,006	0,082 ± 0,001	0,016 ± 0,004
		230	0,510 ± 0,002	0,309 ± 0,018	0,272 ± 0,005	0,090 ± 0,002
3 g/L de inóculo	Conc. de substrato (g/L)	55	0,070 ± 0,006	0,011 ± 0,006	0,011 ± 0,002	0,007 ± 0,002
		110	0,147 ± 0,003	0,054 ± 0,002	0,038 ± 0,004	0,011 ± 0,003
		230	0,384 ± 0,010	0,148 ± 0,009	0,111 ± 0,017	0,046 ± 0,009
5 g/L de inóculo	Conc. de substrato (g/L)	55	0,119 ± 0,001	0,020 ± 0,002	0,012 ± 0,006	0,005 ± 0,001
		110	0,137 ± 0,002	0,110 ± 0,001	0,082 ± 0,003	0,017 ± 0,004
		230	1,396 ± 0,015	1,128 ± 0,001	0,033 ± 0,003	0,009 ± 0,012

Fonte: Autor, 2020.

5.5 Fatores de Conversão

Foram avaliados a dependência dos fatores de conversão diretamente relacionados com o substrato, como, o fator de conversão de células por substrato ($Y_{x/s}$) e produto ($Y_{p/s}$) por substrato. A Figura 12 mostra valores de $Y_{x/s}$ e $Y_{p/s}$ obtidos, assim como seu comportamento. Percebe-se que esses fatores de conversão são função da concentração de açúcares que da quantidade de inóculo.

Existe uma relação entre oxigênio disponível, concentração de açúcares e produção de etanol com *Saccharomyces cerevisiae*. Quando oxigênio está presente e há baixa concentração de açúcar (até 9 g/L) há um favorecimento pela cadeia respiratória em

Saccharomyces cerevisiae (ciclo de Krebs e fosforilação oxidativa), a qual é capaz de produzir mais energia celular através da síntese de ATP, que pode ser usada para outras finalidades dentro da célula, como por exemplo, crescimento celular (AGGELIS e SHIOTANE, 2007).

No entanto, a fermentação desse trabalho foi realizada em condição quase anaeróbica. Baixa concentração de oxigênio resulta em repressão catabólica das primeiras enzimas do ciclo de Krebs e com aumento simultâneo das enzimas da glicólise EMP (Embden-Meyerhoff-Parnas), por exemplo, a fosfofrutoquinase; resultando em um direcionamento do metabolismo celular para produção de etanol, efeito conhecido como “*Paster Effect*” (SARRIS e PAPANIKOLAOU, 2016).

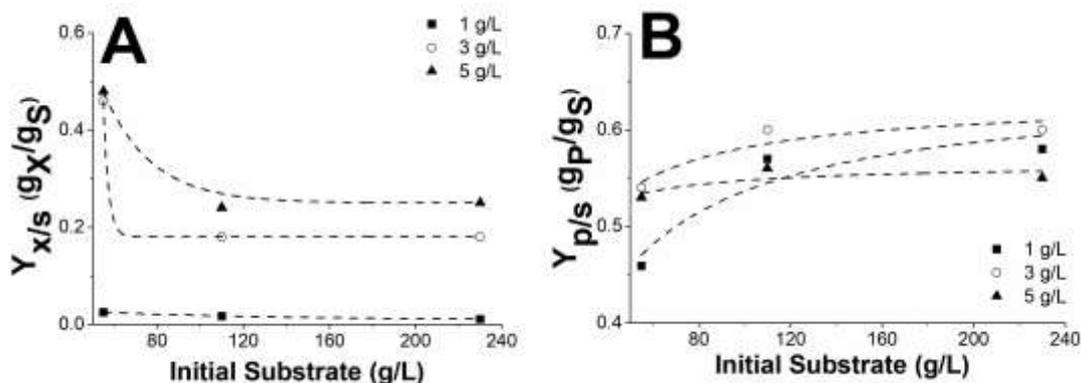
Mesmo que exista uma pequena quantidade de oxigênio dissolvido no meio não aerado no início da fermentação, ele rapidamente é consumido com produção de gás carbônico e condição semi-anaeróbica favorece a fermentação em etanol.

Por outro lado, a concentração de açúcar também pode favorecer a fermentação etanólica. Alta concentração de açúcares, mesmo em aerobiose, causam a degeneração da mitocôndria, diminuição de ácidos graxos e esteróis (necessárias a síntese da membrana plasmática, por exemplo, durante o crescimento celular), assim como de enzimas do metabolismo oxidativo (ciclo de Krebs e cadeia respiratória) levando à repressão catabólica e estímulo da fermentação etanólica (PRONK, STEENSMA e DIJKEN, 1996; AGGELIS e SHIOTANE, 2007; SARRIS e PAPANIKOLAOU, 2016).

Diante no exposto, é possível verificar a coerência com os resultados expressos na Figura 12, onde mostram que o aumento da concentração de açúcares resultam em menores conversões em células e maiores conversões em etanol.

O segundo fator é a dependência da concentração inicial de inóculo, que se percebe uma correlação. Por exemplo, uma maior concentração de inóculo aumenta o fator de conversão $Y_{X/S}$ embora que em concentrações elevada de inóculo (3-5 g/L) esses valores se mantêm muito próximos. Por outro lado, em relação a produção de etanol, há um aumento do fator $Y_{P/S}$ até 3 g/L de inóculo, decaindo em 5 g/L.

Figura 12 – Fatores de conversão em função da concentração de inóculo e de substrato. Os símbolos (■) 1, (○) 3 e (▲) 5 g/L representam a concentração inicial de inóculo.



Fonte: Autor, 2020.

Esses resultados estão de acordo com autores que realizam fermentação etanólica a partir de *S. cerevisiae*. Putra e Abaseed (2018) encontraram $Y_{X/S}$ de 0,22 para 0,25 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ quando a concentração de inóculo foi de 2,5 para 9 g/L, e de 48 para 78 g/L de açúcar inicial (ou seja, muito próximos). Rivera et al. (2017) encontrou $Y_{X/S}$ entre 0,455-0,446 quando a concentração de inóculo se alterou de 12 para 20 g/L (com concentração inicial de açúcar em sacarose entre 180-207 g/L). Por fim, Ponce et al. (2016) considerando uma concentração de inóculo inicial de 2,5 g/L encontraram $Y_{X/S}$ de 0,03 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para ambas as fermentações com 170-250 g/L de açúcar.

Em relação aos valores de $Y_{P/S}$, diminuiu quando a concentração de inóculo aumenta. Putra e Abaseed (2018) encontraram $Y_{P/S}$ de 0,043 para 0,0024 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ quando a concentração de inóculo foi de 2,5 para 9 g/L. Rivera et al. (2017) encontraram $Y_{P/S}$ entre 0,06-0,036 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ quando a concentração de inóculo se alterou de 12 para 20 g/L. Srimachai et al. (2015) encontraram $Y_{P/S}$ entre 0,47-0,37 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ quando se aumentou a concentração entre 23-33 g/L. Por fim, Ponce et al. (2016) encontraram $Y_{P/S}$ entre 0,33-0,29 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para ambas as fermentações com 170-250 g/L de açúcar inicial, com uma concentração de inóculo inicial de 2,5 g/L.

Provavelmente ao se aumentar a concentração de inóculo para valores elevados, geralmente maiores a relação substrato para células diminui e conseqüentemente há mais células para converter o substrato em produto (açúcar em etanol) diminuindo o fator de conversão $Y_{P/S}$.

Os erros preditivos do modelo são encontrados na Tabela 9. É possível observar que a maioria das modelagens não obtiveram desvios em relação aos dados experimentais maior que 10% para a fermentação etanólica, representando bons ajustes.

Tabela 9 – Erros preditivos (%) do modelo de Monod para o consumo de substrato e formação do produto das fermentações realizadas.

Concentração de Açúcar (g/L)	Concentração de inóculo (g/L)		
	1	3	5
Modelagem da curva de consumo de S (sacarose) e determinação de Y_{x/s}			
55	12,01	11,79	11,65
110	7,94	5,06	8,27
230	5,64	3,67	3,65
Modelagem da curva de formação de P (etanol) e determinação de Y_{p/s}			
55	8,68	19,06	14,53
110	17,30	7,93	6,61
230	5,82	5,19	1,29

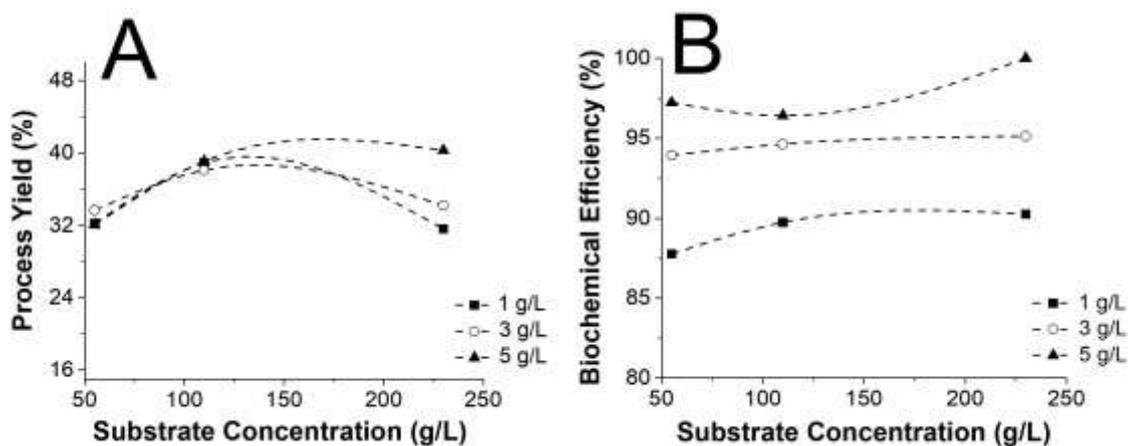
Fonte: Autor, 2020.

5.6 Eficiência das fermentações:

Percebe-se avaliando-se os perfis cinéticos das Figuras 9-11 que a fermentação etanólica é do tipo associada ao crescimento celular (GADEN, 1959) e simples conversão majoritária de um substrato em produto (DEINDOERFER e WEST, 1960), assim o rendimento de processo é expressa em valores quantitativos a eficácia com que as leveduras transformam o açúcar disponível em etanol, enquanto que a eficiência de fermentação leva em consideração a quantidade efetiva do açúcar consumido e sua conversão bioquímica (JANG *et al.*, 2010). Como pode ser observado, através da Figura 13.

A eficiência de fermentação varia entre 0-100% pois leva em conta o rendimento bioquímico. O valor de eficiência de fermentação foi próxima aos encontrados na literatura, como na fermentação com caldo de cana-de-açúcar obteve-se uma eficiência de 92,2%, com teor alcoólico de 81 g/L e 171 g/L de concentração inicial de sacarose (RIVERA *et al.*, 2017), na fermentação do suco da palma utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, obtiveram-se uma eficiência de 77,31%, com 11,50 g/L de etanol e 31,26 g/L inicial de sacarose e 2,0 g/L de sacarose final (SRIMACHAI *et al.*, 2015).

Figura 13 – Eficiências Bioquímicas e Rendimentos de processo em função da concentração de inóculo e de substrato. Os símbolos (■) 1, (○) 3 e (▲) 5 g/L representam a concentração inicial de inóculo.



Fonte: Autor, 2020.

Jang *et al.* (2010), que fez um estudo das características da qualidade do fermentado do tomate, utilizando tomate maduro, com concentração inicial de sacarose de 240 g/L, obtiveram-se 61 g/L de concentração final de açúcar e um teor alcoólico de 80 g/L, tendo-se assim uma eficiência de 87,46%, bem próximo ao encontrado nesse trabalho. O mesmo ocorreu segundo os estudos de Many *et al.* (2014) obteve um fermentado do tomate com um teor de etanol de 68,04 g/L, concentração inicial de açúcar de 220 g/L e 48 g/L de concentração de final açúcar, encontrando uma eficiência de fermentação de 78,93%, confirmando que o mosto contendo tomate e chaptalizado pode ser usado como matéria-prima para fermentação, e obter eficiências elevadas.

O rendimento de processo varia de 0-51,1% e reflete a utilização dos açúcares iniciais para o etanol produzido. Ele é importante em relação açúcar residual do fermentado e atua na classificação do vinho. Segundo De paula *et al.* (2012), o vinho pode ser classificado de acordo com açúcar residual em vinho seco é aquele que possui até 5 g/L de açúcar residual, o vinho meio Doce (demi-sec) é aquele que possui de 2-5 g/L açúcar e vinho suave é aquele que possui mais de 20 g/L de açúcar. Em comparação com os fermentados produzidos nesse trabalho, percebe-se que para alcançar o teor alcoólico desejado, entre 9-14 °GL (71-110 g/L) de etanol, apenas as fermentações com concentração inicial de 230 g/L de sacarose, em torno de 25 °Brix de sólidos solúveis totais, e possuíam um teor de açúcar residual maior que 20 g/L, portanto sendo considerado um vinho doce.

5.7 Inibição por substrato e por produto

Muitos autores mencionam considerar a inibição por substrato quando se utiliza elevadas concentrações de açúcar (PUTRA e ABASAEED, 2018; RIVERA et al., 2017). O modelo mais comum associado a modelagem desse tipo de efeito tem sido o modelo de Andrews, utilizando a Equação 33:

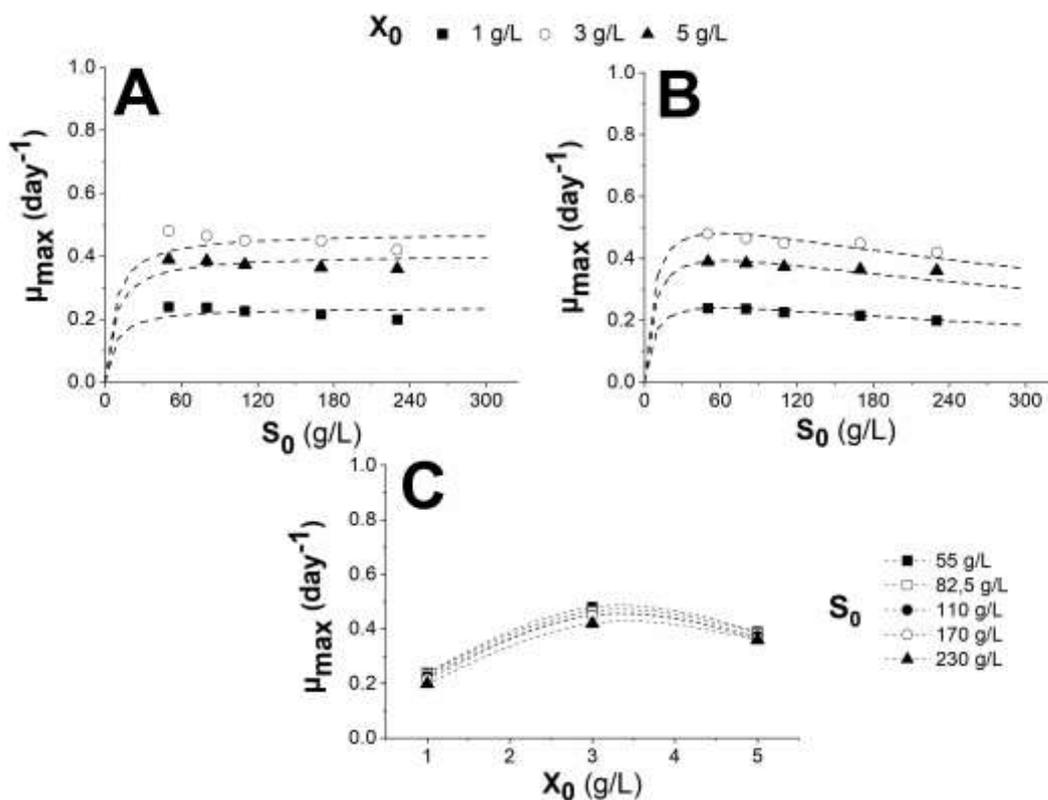
$$\mu = \frac{\mu_{max} \cdot S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_I}} \quad (33)$$

Para fermentado alcoólico a partir do mosto açucarado, geralmente essa inibição passa a ocorrer a partir de 100 g/L e vai aumentando gradativamente de acordo com o aumento da quantidade de substrato (PUTRA e ABASAEED, 2018; SRIMACHAI *et. al.*, 2015; RIVERA et al., 2017). Nesse sentido, realizou-se uma modelagem utilizando-se os valores das taxas de crescimento máximas obtidas nas fermentações, uma vez que, observou-se uma diminuição dessas taxas com o aumento da concentração de açúcar (Tabela 6).

No entanto, foram utilizadas apenas 3 concentrações de açúcar inicial (55,110 e 230), sendo 3 pontos ineficientes na modelagem de uma equação não-linear como a de Andrews. Nesse sentido, realizou-se duas adicionais fermentações com 82,5 e 170 g/L de açúcar inicial.

Como se pode verificar na Figura 14, houve uma leve inibição com o aumento da concentração de substrato simulada com um menor MPE em comparação com a o modelo de Monod (Fig. 14A), pelo modelo de Andrews (Fig. 14B), apresentando um MPE médio de 7,5 e 3%, respectivamente (Tabela 10). No entanto, com MPEs baixos e próximos, usar o modelo de Monod se torna mais conveniente por resultar em equações de trabalho mais simples (Equações 29, 30 e 31). Em relação a dependência da taxa máxima de crescimento (μ_{max}) com a concentração de inóculo (Fig. 14C), se verificou que ao aumentar a concentração de inóculo, há um aumento de μ_{max} até 3g/L de inóculo inicial, decrescendo a partir disso. Esse comportamento foi verificado por Silva, Meneghello e Bertucco (2018), que utilizaram concentrações de inóculo entre 0,2-12,5 g/L.

Figura 14 – Modelos Monod e Andrews em função da concentração inicial de substrato (S_0) e da concentração inicial de inóculo (X_0) com as taxas máximas de crescimento para cada fermentação ($\mu_{\text{máx}}$): A – Modelo de Monod, B – Modelo de Andrews e C – taxas máximas de crescimento de cada fermentação. Os símbolos representam em A e B, a taxa de crescimento máxima obtida a partir das concentrações iniciais de açúcares para: (■) 1, (○) 3 e (▲) 5 g/L de inóculo. As linhas que contornam os pontos representam as simulações obtidas. Os símbolos representam em C, a taxa de crescimento obtido a partir das concentrações iniciais de inóculo para: (■) 55, (□) 82,5, (●) 110, (○) 170 e (▲) 230 g/L de açúcares. As linhas que contornam os pontos representam as simulações obtidas.



Fonte: Autor, 2020.

A constante de inibição encontrada foi em torno de $508,16 \pm 5,16$ g/L (Tabela 10). O valor dessa constante é bastante controversa em literatura quando se trata de fermentações etanólicas, se situando em alguns casos entre 25-50 g/L, como delimitados pelos trabalhos de Putra e Abasaeed et al. (2018) (fermentação de xarope de sacarose, 2,5 g/L inicial de inóculo e 78 g/L inicial de substrato) Comelli, Suley e Isla (2016) (fermentação de água residual da produção de refrigerantes, 2 g/L inicial de inóculo e 100 g/L inicial de substrato); Esfahanian et al. (2016) (fermentação de mosto glicosado, 15 g/L inicial de inóculo e 100 g/L inicial de substrato) e Scheiblauer et al. (2018) (fermentação em batelada de xarope açucarado, 6,0 g/L inicial de inóculo e 22,50 g/L inicial de substrato).

No entanto Veloso et al. (2018) (fermentação do caldo da cana-de-açúcar, 8,0 g/L inicial de inóculo, 180 g/L inicial de substrato) encontraram um valor de K_I de 170 g/L e Ponce et al. (2016) (Fermentação de melaço de cana-de-açúcar com decapagem de gás *in situ*, 5 g/L inicial de inoculo, 200 g/L inicial de substrato) em torno de 250 g/L, mostrando assim ordens no mínimo 5-10 vezes maiores que as anteriormente citadas, corroborando assim, o significado físico do K_I encontrado nesse trabalho, uma vez que o Modelo de Monod ajustou com boa acuracidade os dados experimentais e a redução da taxa de crescimento microbiana diminuiu levemente, mostrando que nesse tipo de mosto, a inibição pelo substrato se mostrou menos acentuada refletindo-se em um K_I elevado.

Tabela 10 – Constantes associadas ao modelo de Monod e Andrews considerando as taxas máximas de crescimento de cada fermentação, permitindo encontrar a taxa de crescimento máxima global ($\mu_{\max,global}$) e a constante de inibição (K_I).

Constante	Concentração de Inóculo (g/L)		
	1	3	5
Modelo de Monod			
$\mu_{\max,global}$ (dia ⁻¹)	0,2376	0,4746	0,4050
MPE (%)	9,26	6,84	6,00
Modelo de Andrews			
$\mu_{\max,global}$ (dia ⁻¹)	0,2966	0,5970	0,4880
K_I (g/L)	515,47	501,13	510,00
	K_I médio (g/L)		508,16 ± 5,16
MPE (%)	1,21	3,61	3,87

Fonte: Autor, 2020.

Outro tipo de inibição que pode ser significativa, é a por produto, no caso, concentração de etanol. No caso de fermentações etanólicas, geralmente, uma concentração a partir de 80 g/L de etanol influencia na atividade microbiana (VELOSO et al., 2018; DIAS et al., 2018). Dentre as fermentações observadas nesse trabalho apenas a fermentação com 5 g/L de inóculo e 230 g/L de açúcar inicial obteve um valor maior que esse, no entanto, próximo, em torno de 100 g/L, restando-se constante do quarto ao oitavo dia de fermentação. Outros trabalhos também relatam que a partir de 100 g/L de etanol não há incremento significativo na produção de etanol por *S. cerevisiae* (VELOSO et al., 2018; PHISALAPHONG, SRIRATTANA e TNATHAPANICHAKOON, 2006). Por essas razões, a cinética de inibição por produto, não foi considerada nesse trabalho.

6. CONCLUSÕES:

Foi possível obter uma bebida fermentada da polpa do tomate chaptalizada, com 110 g/L de concentração de etanol, estando de acordo com legislação brasileira, que exige que o teor de etanol fique entre 71 – 110,5 g/L, obtendo-se também uma eficiência máxima de fermentação de 99,5 % e um rendimento de processo máximo de 40,29%.

Os parâmetros cinéticos do modelo de Monod obtidos a partir das 9 fermentações em batelada, foram capazes de prever satisfatoriamente o comportamento das fermentações. A fermentação se desenvolveu de forma lenta, com taxa de crescimento máxima (μ_{\max}) situando-se entre 0,2-0,5 dia⁻¹ e com cerca de 4 dias de fase estacionária, estando de acordo com estudos de fermentados de polpas de frutas/verduras, assim como também a constante de semi-saturação do modelo de Monod (K_s), com valor médio $7,47 \pm 0,18$ g/L, se mostrou adequada com uma variação menor que 3%.

Em relação as taxas de consumo de substrato e a produtividade de etanol, foram obtidos valores máximos de 4,545 g/(L.h) e 1,39 g/(L.h), respectivamente, quando se utilizou a maior concentração inicial de inóculo de 5 g/L e maior concentração inicial de substrato 230 g/L, sendo os valores encontrados, próximos aos da literatura de fermentados de frutas e verduras, mostrando que quanto maior a concentração de inóculo, maior foi o consumo de açúcares, para tempos de fermentações maiores.

Foi possível avaliar que o fator de conversão de células por substrato ($Y_{x/s}$) e produto ($Y_{p/s}$) por substrato estão diretamente relacionados com o substrato, do que com a quantidade de inóculo, o fator de conversão $Y_{x/s}$ aumentou com uma maior concentração de inóculo e de substrato, embora que em concentrações elevada de inóculo (3-5 g/L) esses valores se mantêm muito próximos, já o fator de conversão $Y_{p/s}$ aumentou até 3 g/L de inóculo e decaiu em 5 g/L, aumentando-se com aumento do substrato. Esse comportamento se dá pelo fato de que é um processo quase que anaeróbico e em altas concentrações de açúcares ocorre o favorecimento metabolismo celular para produção de etanol, ao invés do crescimento celular.

Na análise da inibição por substrato, utilizando o modelo de Andrews, obtendo-se um K_I médio de $508,16 \pm 5,16$ g/L, próximo aos estudos de fermentados alcoólicos de frutas/verduras, observando-se que a redução leve da taxa de crescimento microbiana, ressaltando que para este tipo de mosto a inibição pelo substrato é pequena,

consequentemente obtendo um K_I elevado, e portanto; sendo possível utilizar apenas o modelo de Monod e os fatores de conversão para prever as fermentações. Já a inibição por produção não foi avaliada, por ter obtido um teor alcoólico de 101 g/L praticamente constante do quarto ao oitavo dia de fermentação, não interferindo na fase exponencial da crescimento.

Como sugestão de estudo para trabalhos futuros, pretende-se realizar a análise sensorial do fermentado obtido dentro da legislação brasileira, também verificar a estabilidade do produto e sua capacidade antioxidante, produzir o vinagre de tomate e caracterizar sua modelagem cinética em relação a produção de ácido acético, crescimento celular e produção de etanol.

REFERÊNCIAS:

ABUD, A.K.S. **Estudo do comportamento cinético e da estabilidade de uma linhagem recombinante de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de fermentação alcoólica de amiláceos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, 1997;

AIBA, S.; SHODA, M., NAGATANI, M. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 845–864, nov. 1968;

AGGELIS, C. D., SHIOTANE, T. Repair evaluation of concrete cracks using surface and through-transmission wave measurements. **Cement and Concrete Composites**, V. 29, n. 9, p. 700-711, 2007;

ALMEIDA, S. D. S.; ALVES, W. A. L.; ARAÚJO, S. A. de.; SANTANA, J. C. C.; NARAIN, N.; SOUZA, R. R. de. Use of simulated annealing in standardization and optimization of the acerola wine production. **Food Science and Technology**, Campinas, 34(2):292-297. Apr-june, 2014;

ALMEIDA, M. M., SILVA, F.L. H., CONRADO, L. S., MOTA, J. C., FREITAS, R. M. M. Estudo cinético e caracterização da bebida fermentada do *Cereus jamacaru* P. DC. **Revista Verde**, Mossoró, v. 6, n. 2, p. 176 – 183, 2011;

ANDRADE, M. B. de, PERIM, G. A., SANTOS, T. R. T. dos, MARQUES, R. G. Fermentação alcoólica e caracterização de fermentado de morango. **BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 265-268, 2013;

ANDREWS, J. F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 10, n. 6, p. 707–723, nov. 1968;

ANDRIETTA, S.R. **Modelagem, simulação e controle de fermentação alcoólica contínua em escala industrial**. 1994. 178 f. Tese de doutorado - Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1994;

AMORIM, H. V., LOPES, M. L., de CASTRO, J. V. O.; Buckeridge, M. S.; Goldman, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91, 1267–1275, 2011;

AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemistry**. 17th ed. Gaithersburg: Ed. William Horwitz, 2002;

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed., Arlington: AOAC International. Method 967.22, 1995;

AQUARONE, E., LIMA, U. A., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. *Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. Vol. 03. **Edgard Blucher Ltda**. São Paulo- SP, Brasil, 2001.595p, 2011;

ARAÚJO, J. C., TELHADO, S. F. P. Organic Food: A Comparative Study of the Effect of Tomato Cultivars and Cultivation Conditions on the Physico-Chemical Properties. *Foods*, n. 4, p. 263-270, 2015;

ARGAWAL, S., RAO, A. V. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *Canadian Medical Association Journal*, Ottawa, v. 163, n. 6, p. 739-744, Dec. 2000;

BENASSI, M. T., ANTUNES, A. J. A comparison of meta-phosphoric and oxalic acids as extractant solutions for the determination of vitamin C in selected vegetables. *Arquivos de Biologia e Tecnologia*. v 31. Pp: 507-513. 1988;

BERG JMT, TYMOCZKO JL, STRYER L. *Bioquímica*. 6 ed. Guanabara Koogan, 2008;

BORGUINI, R.G., MATTOS, F. L. Análise do Consumo de Alimentos Orgânicos no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECONOMIA E SOCIOLOGIA RURAL, 40, Passo Fundo, 2002. *Anais*. Brasília: SOBER, p.38, 2006;

Brasil. Lei nº 7.678 de 8 de novembro de 1988. Dispõe sobre a produção, circulação e comercialização do vinho e derivados da uva e do vinho, e dá outras providências. **Diário Oficial da União (DOU)**, Brasília, DF, 1988b;

BRANDÃO, C. C., DAMIANI, C., ASQUIERI, E. R. Fermentado Alcoólico De Yacon (*Smallanthus Sonchifolia*): Processo De Obtenção E Suas Aplicações. Depositante:

Universidade Federal De Goiás (Br/Go). BR 10 2012 005273 3. Depósito: 09/03/2012. Concessão: 28/03/2017;

BUETTNER, G.R., SCHAFER, F.Q. Ascorbate as an antioxidant. In. **Vitamin C: functions and biochemistry in animals and plants**. ASARD, H., MAY, J.M.;SMIRNOFF, N., Eds. BIOS Scientific Publishers: London, UK, p.173, 2004;

CARVALHO, P. G. B., MACHADO, C. M. M., MORETTI, C. L., FONSECA, M. E. N. Hortaliças como alimentos funcionais. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 147-152, 2006;

CHANG, C. H., LIU, Y. C. Study on lycopene and antioxidant content variations in tomatoes under air-drying process. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 9, p. 532-540, Sept. 2007;

CHEUNG, L.M., CHEUNG, P. C.K., OOI, V. E. C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chem.** 80(2): 249-255, 2003;

CHITARRA, M. I. F., CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 785 p., 2005;

COMELLI, R. N., SELUY, L. G., ISLA, M. A. Performance of several *Saccharomyces* strains for the alcoholic fermentation of sugar-sweetened high-strength wastewaters: Comparative analysis and kinetic modelling. **New Biotechnology**, n. 33, p. 874-882, 2016;

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira: Tomate, safra 2018/2019**, 2019;

COSTA, R. T. R. V., SILVA, J. L., NASCIMENTO, A. M., SOUTO, M. V. Kinetics of mixed beverage production of honey from bees and strawberries. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. V.12, Nº 1, p. 90-94, Pombal, PB, 2017;

DALSENTER, F.D.H., VICCINI, G., BARGA, M.C., MITCHELL, D.A., KRIEGER, N.A. A mathematical model describing the effect of temperature variations on the kinetics of microbial growth in solid-state culture. **Process Biochem**, 40. 801-807, 2015;

DANTAS, C. E. A., SILVA, J. L. A. Fermentado alcoólico de umbu: Produção, cinética de fermentação e caracterização físico-química. **Holos**, v. 2, p. 108-121, 2017;

DANTAS, M. L., RODRIGUES, D. G., NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. **Química Nova**, v. 24, n. 4, p. 449-452, 2001;

DEINDOERFER, F. H., WEST, J. M. Rheological examination of some fermentation broths. **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**, V. 2, N. 2, 1960;

DE PAULA, B.; CARVALHO FILHO, C. D.; MATTA, V. M.; MENEZES, J. S.; LIMA, P. C.; PINTO, C. O.; CONCEIÇÃO, L. E. M. G. Produção e caracterização físicoquímica de fermentado de umbu. **Ciência Rural**, v.42, n.9. 2012;

DIAS, M. O. S., FILHO, R. M., MANTELATTO, P. E., CAVALETT, O., ROSSELL C. E. V., BONOMI, A., LEAL, M. R. L. V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, n. 15, p. 35-51, 2018;

DORIGNAC, E., QUIPORT, A. D., TBAIKHI, A. Cepas De Levedura Para Bebidas Fermentadas E Particularmente Para Vinho. Depositante: LESAFFRE ET COMPAGNIE (FR). BR 11 2018 005586 7. Depósito: 20/09/2016. Concessão: 02/10/2018;

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2018. Disponível em:< <https://www.embrapa.br/tema-perdas-e-desperdicio-de-alimentos>>. Acesso em: 07 de fev. 2020;

ESFAHANIAN, M., RAD, A. S., KHOSHHAL, S., NAJAFPOUR, G., ASGHARI, B. Mathematical modeling of continuous ethanol fermentation in a membrane bioreactor by pervaporation compared to conventional system: Genetic algorithm. **Bioresource Technology**, n. 212, p. 62-71, 2016;

FACCIOTTI, M. C. R. Fermentação Contínua. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Vol. 2. Editora Edgard Blucher. São Paulo, p. 223- 246, 2001;

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo – Fomentando la resiliencia climática en aras de la seguridad alimentaria y la nutrición. Roma, 2019;

FERREIRA, N. B. S., ASQUIERI, E. R., DAMIANI, C. Processo Para Elaboração De Um Fermentado Alcoólico De Polpa De Baru (*Dipteryx Alata* Vog.). Depositante: Universidade

Federal De Goiás (Br/Go). BR 10 2013 008434 4. Depósito: 08/04/2013; Concessão: 23/06/2015;

GADEN. E. L. Jr. Fermentation process kinetics. **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**, n. 4, p. 413 – 429, 1959;

GIGER-REVERDIN, S. Review of the main methods of cell wall estimation: interest and limits for ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v.55, n.4, p.295-334, 1995;

GUILHERME, D. O., PINHO, L., COSTA, C. A., ALMEIDA, A. C., PAES, M. C. D., RODRIGUES, R. J. A., CAVALCANTI, T. F. M., FILHO, S. C. T., MENEZES, J. B. C., SALES, S. S. Análise sensorial e físico-química em frutos de tomate cereja orgânicos. **Horticultura brasileira**, v. 26, n. 2, 2008;

HEREDIA, A., PEINADO, I., ROSA, E., ANDRÉS, A. Effect of osmotic pré-treatment and microwave heating on lycopene degradation and isomerization in cherry tomato. **Food Chemistry**, London, v. 123, n. 1, p. 92-98, 2010;

HOMEM, C. L. G., COSTA, J. R. C., PINHEIRO, I. R. Estudo da Fermentação Alcoólica do Hidrolisado de Bagaço de Laranja por *Saccharomyces cerevisiae*, p. 64-67. In.: São Paulo: **Blucher**, 2017;

IAL – Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1018p, 2005;

IZUMI, T., KOKUBO, S., TAKAOKA, N., KAKUDO, Y. Method For Producing Fermented Alcoholic Beverage Having Excellent Chromaticity And Flavor. Depositante: Takaaki Izumi. JP6139883B2. Depósito: 09/11/2016. Concessão: 17/05/2018;

JANG, S. Y., WOO, S. M., JO, Y. J., KIM, O. M., KIM, I. H., JEONG, Y. J. Quality Characteristics of Tomato Wine on Fermentation Conditions. **J Korean Soc Food Sci Nutr**, 39(3), 443-448, 2010;

LACERDA, M. N., VALE, B. L. S., ALMEIDA, A. S., TEODORO, M. S., SANTOS, V. B. Caracterização física e físico-química de tomates orgânicos utilizando diferentes compostos. **Enciclopédia biosfera**, v.13 n.24; p. 240, 2016;

LEE, J. H., CHO, H. D., JEONG, J. H., LEE, M. K., JEONG, Y. K., SHIM, K. H., SEO, K. I. New vinegar produced by tomato suppresses adipocyte differentiation and fat accumulation in 3T3-L1 cells and obese rat model. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3241-3249, 2013;

LEE, S. S., ROBINSON, F. M., WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, v. 11, p. 641–649, 1981;

LEONG, L. P., SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chem**; 76: 69-75, 2002;

LEVENSPIEL, O. The monod equation: A revisit and a generalization to product inhibition situations. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 22, n. 8, p. 1671–1687, ago. 1980;

LIMA, U. A. Aguardentes. In: AQUARONE, E. *et al.* (Coord.) **Biotecnologia Industrial: alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. São Paulo, ed. Edgard Blücher, v. 4, p. 145 – 182, 2001;

LOBATO, F. S. Controle Ótimo da Fermentação Alcoólica em Reator Batelada Alimentada usando Computação Bio-Inspirada. **Tema**, v. 16, n. 1, p. 45-54, 2015;

MANY, J. N., RADHIKA, B., GANESAN, T. Study on Tomato Wine Production and Optimization. **Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology (IOSR-JESTFT)**, 2319-2399. Volume 8, Issue 1 Ver. IV, PP 97-100, 2014;

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

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura Brasileira: panorama 2018. Bento Gonçalves: **Embrapa Uva e Vinho**, 2019;

MELO, H.F. **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Pernambuco, Recife, p.118, 2006;

MELO, P. C. T., VILELA, N. J. Desafios e perspectivas para a cadeia brasileira do tomate para o processamento industrial. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n.1, p. 154-157, jan/mar, 2005;

MENDES, T. A. O., PINTO, L. M., MENDES, D. S. O., MALTA, H. L., OLIVEIRA, E. S. Increase in yeast biomass production in batch and semi-continuous aerated propagators in the production of sugarcane spirit. **Food Technology Journal**, v. 16, n. 2, p. 81-89, 2013;

MONOD, J. Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes. **Hermann & Cie**.Paris, 1942;

MONTEIRO, C. S., BALBI, M. E., MIGUEL, O. G., PENTEADO, P. T. P. S., HARACEMIV, S. M. C. Qualidade nutricional e antioxidante do tomate “tipo italiano. **Alim. Nutr.**, v.19, n.1, p. 25-31, Araraquara, PR, jan./mar. 2008;

MURATORE, G., RIZZO, V., MACCARONE, E., LICCIARDELLO, F. Partial dehydration of cherry tomato at diferente temperature and nutritional quality of the products. **Food Chemistry**, London, v. 111, n. 4, p. 887-891, Dec. 2008;

NAGATA, M., YAMASHITA, I. Simple method for simultaneous etermination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, Tokyo, v. 39, n. 10, p. 925-928, Oct. 1992;

NASCIMENTO, A. R., SOARES JÚNIOR, M. S., CALIARI, M., FERNANDES, P. M., RODRIGUES, J. P. M., CARVALHO, W. T. Qualidade de tomates de mesa cultivados em sistema orgânico e convencional no estado de Goiás. **Horticultura Brasileira** 31: 628-635, 2016;

NELLIS, S. C., CORREIA, A. F. K., SPOTO, M. H. F. Extraction and quantification of carotenoids from dehydrated mini-tomatoes (Sweet Grape) by applying different solventes. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 20, e2016156, 2017;

NOGUEIRA, A., WOSIACKI, G., ALBERTI, A., CARVALHO, J. R. F. Desenvolvimento De Fermentado Frisante De Maçã Usando Tecnologia Européia De Processamento E Atributos De Aceitação Do Consumidor Brasileiro. Depositante: Universidade Estadual De Ponta Grossa (Br/Pr). BR 10 2013 017034 8. Depósito: 02/07/2013; Concessão: 04/08/2015;

ODRIOZOLA, I. S., SOLIVA, R. F., HERNÁNDEZ, T. J., MARTÍN, O. B. Carotenoid and phenolic profile of tomato juices processed by high intensity pulsed electric fields compared with conventional thermal treatments. **Food Chemistry**, London, v. 112, n. 1, p. 258- 266, Jan. 2009;

OLIVEIRA, E. N. A., FERNANDES, A. V., ROCHA, E. M. F. F., FEITOSA, B. F., FREITAS, P. V. C. Cinética de fermentação de fermentado alcoólico misto de água de coco e tamarindo. **Congresso Técnico Científico da Engenharia e da Agronomia**, Foz de Iguaçu, PR, 2016;

OLIVEIRA, J. P. M., NETO, J. C. S., LVA, S. S., SANTOS, A. S. Production of alcoholic fermented Orange. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 3, p. 35-41, 2015;

OLIVEIRA, L. A., LORDELO, F. dos S., TAVARES, J. T. Q., CAZETTA, M. L. Preparation of fermented beverage using residual syrup of osmotic dehydration of pineapple (*Ananas comosus* L.). **Revista brasileira de tecnologia agroindustrial**, Ponta Grossa (PR), v. 6, n. 1, p. 702-712, 2012;

PARCUNEV, I., NAYDENOVA, V., KOSTOV, G., YANAKIEV, Y., POPOVA, Z., KANEVA, M., IGNATOV, I. Modeling Of Alcohol Fermentation In Brewing – Some Practical Approaches. **Proceedings 26th European Conference on Modelling and Simulation**, n. 4, p. 2002-2023. 2005;

PARENTE, G. D. L., ALMEIDA, M. M., SILVA, J. L., SSILVA, C. G., ALVES, M. F. Cinética da produção do fermentado alcoólico de abacaxi ‘pérola’ e caracterização da bebida. **Revista Verde**, Mossoró, v. 9, n. 2, p. 230 - 247, 2014;

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

PONCE, G. H. S. F., NETO, J. M., JESUS, S. S., MIRANDA, J. C. C., FILHO, R.M., ANDRADE, R. R., MACIEL, M. R. W. Sugarcane molasses fermentation with in situ gas stripping using low and moderate sugar concentrations for ethanol production: Experimental data and modeling. **Biochemical Engineering Journal**, n. 110, p.: 152–161, 2016;

PRONK, J. T., STEENSMA, H. Y., DIJKEN J. P. V. Pyruvate Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 12, n. 16, 1996;

PUTRA, M. D., ABASAEED, A. E. A more generalized kinetic model for binary substrates fermentations. **Process Biochemistry**, n. 75, p. 31-38, 2018;

PUTRA, M. D., ABASAEED, A. E., AL-ZAHRANI, S. M., GAILY, M. H., SULIEMAN, A. K., ZEINELABDEEN, A., ATIYEH, H. K. Production of fructose from highly concentrated date extracts using *Saccharomyces cerevisiae*, **Biotechnol. Lett.** n. 36, p. 531–536, 2013;

REIS, V. R. Caracterização de linhagens selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas de processos fermentativos para a produção de etanol. Dissertação (Mestrado), **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Piracicaba, 2011;

REN, H., ENDO, H., HAYASHI, T. Antioxidative and antimutagenic activities and polyphenol content of pesticide-free and organically cultivated Green vegetables using water-soluble chitosan as a soil modifier and leaf surface spray. **Journal of Science and Food Agricultural**, Easton, v. 81, n. 15, p. 1426-1432, Dec. 2001;

RIVERA, E. C., YAMAKAWA, C. K., SAAD, M. B. W., ATALA, D. I. P., AMBROSIO, W. B., BONOMI, A., JUNIOR, J. N., ROSSELL, C. E. V. Effect of temperature on sugarcane ethanol fermentation: Kinetic modeling and validation under very-high-gravity fermentation conditions. **Biochemical Engineering Journal**, n. 119, p. 42-51, 2017;

ROJAS, B. D., NARVÁEZ, C. E. Determinación de vitamina C, compuestos fenólicos totales y actividad antioxidante de frutas de guayaba cultivadas en Colombia. **Quím Nova**, 32(9):2336-40, 2009;

ROSA, C. L. S., SOARES, A. G., FREITAS, D. De G. C., ROCHA, M. C., FERREIRA, J. C. S., GODOY, R. L. O. Caracterização Físico- Química, Nutricional E Instrumental De Quatro Acessos De Tomate Italiano (*Lycopersicum Esculentum* Mill) Do Tipo ‘Heirloom’ Produzido Sob Manejo Orgânico Para Elaboração De Polpa Concentrada. **Alim. Nutr.**, v. 22, n. 4, p. 649-656, 2011;

RUFINO, M. do S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S. de; MORAIS, S. M. de, SAMPAIO, C. de G., PÉREZ - JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D.. Metodologia científica:

determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **EMBRAPA**, 12 p. (Comunicado Técnico, 127), 2007;

SAHLIN, E., SAVAGE, G. P., LISTER, C. E. Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 5, p. 635-647, 2004;

SANTOS, S. C., ALMEIDA, S. S., TOLEDO, A. L., SANTANA, J. C. C., SOUZA, R. R. Elaboração e análise sensorial do fermentado de acerola (*Malpighia puniceifolia* L.). **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 10, p. 47-50, 2005;

SANTOS, M. H. O. Desperdício de alimentos e sua interferência no meio ambiente. **Instituto Construir e Conhecer**. Goiânia, n.5, 2005;

SAHLIN, E., SAVAGE, G. P., LISTER, C. E. Investigation of the antioxidant properties of tomatoes after processing. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 15, n. 5, p. 635-647, 2004;

SARRIS, D., PAPANIKOLAOU, S. Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and Technologies. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 4, 2015;

SCHEIBLAUER, J., SCHEINER, S., JOKSCH, M., KAVSEK, B. Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* – Combining kinetic modeling and optimization techniques points out avenues to effective process design. **Journal of Theoretical Biology**, n. 453, p. 125-135, 2018;

SCHMIDELL, W., FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e Processos Fermentativos. In: Schmidell, W. et al. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. Edgar Blücher, São Paulo, p. 179-192, 2001;

SHAMI, N. J. I. E., MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Ver Nutr Campinas**. 17(2): 227-236, 2004;

SHEN, Y. C.; CHEN, S. L.; WANG, C. K. Contribution of tomato phenolics to antioxidation and down-regulation of blood lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 16, p. 6475-6480, Aug. 2014;

SHULLER, M.L.; KARGIL, F. Bioprocess Engineering – Basic Concepts, Anaerobic Process – **Ethanol Production**, v.17, p.515-518, 2011;

SILVA, C. E. F.; MENEGHELLO, D.; BERTUCCO, A. A systematic study regarding hydrolysis and ethanol fermentation from microalgal biomass. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** 14 (2018) 172–182, Padova, Italy, 2018;

SILVA, C. E. F., BERTUCCO, A. A Two-Stage System for the Large-Scale Cultivation of Biomass: a Design and Operation Analysis Based on a Simple Steady-State Model Tuned on Laboratory Measurements. **BioEnergy Research**, v. 11, p. 398-413, 2018;

SILVA, C. L., SANTANA, C. F., SILVA, C. F., PAGANO, R. L. Modelagem e estimação de parâmetros do processo de produção de etanol em reator batelada por *Saccharomyces cerevisiae*. VOL. 12, NUM. 05 **Scientia Plena** 12, 054216, 2016;

SILVA, M. L. C., COSTA, R. S., SANTANA, A. S., KOBLITZ, M. G. B. Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010;

SILVA, M. E., NETO, A. B. T., SILVA, W. B., SILVA, F. L. H., SWARNAKAR, R. . Cashew wine vinegar production: alcoholic and acetic fermentation. **Brazilian Journal Of Chemical Engineering**, v. 24, n. 2, p.163-169, abr. 2007;

SONEGO, J. L. S., LEMOS, D. A., PINTO, C. E. M., CRUZ, A. J. G., BADINO, A. C. Extractive Fed-Batch Ethanol Fermentation with CO₂ Stripping in a Bubble Column Bioreactor: Experiment and Modeling. **Energy Fuels** 2016, 30, 748–757, São Carlos- SP, 2016;

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, jan./abr. 2002;

SOUZA, D. S., BAPTISTA, J. A. A., ZAN, R. A. Produção e avaliação físico-química dos vinhos (fermentados) seco e suave a partir do araçá-boi (*Eugenia stipitata mcvaugh*). **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 13, 27-29, 2018;

SOUSA, A. A., GRIGIO, M. L., NASCIMENTO, C. R., SILVA, A. C. D., REGO, E. R., REGO, M. M. Chemical and physical characterization of fruits of different tomato

accessions in the greenhouse. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 5, n. 2, p.113-118, maio-agosto, 2011;

SONEGO, J. L. S., LEMOS, D. A., PINTO, C. E. M., CRUZ, A. J. G., BADINO, A. C. Extractive Fed-Batch Ethanol Fermentation with CO₂ Stripping in a Bubble Column Bioreactor: Experiment and Modeling. **Energy Fuels** 2016, 30, 748–757, São Carlos- SP, 2016;

SPNEGO, J. L. S.; LEMOS, D. A.; RODRIGUESZ, G. Y.; CRUZ, A. J. G.; BADINO, A. C. Optimization of Fed-Batch Fermentation with in Situ Ethanol Removal by CO₂ Stripping. **Energy Fuels**, 28, 7552–7559, 2014;

SQUIERI, E. R., RABÊLO, A. M. S., SILVA, A. G. M. Fermentado de jaca: estudo das características físico-químicas e sensoriais. **Ciênc. Technol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 881-7, 2008;

SRIMACHAI, T., NUTHITIKUL, K., O-THING, S., KONGJAN, P., PANPONG, K. Optimization and Kinetic Modeling of Ethanol Production from Oil Palm Frond Juice in Batch Fermentation. **Energy procedia**, n. 79, p. 111-118, 2015;

SUCUPIRA, N. R., SILVA, A. B., PEREIRA, G. P., COSTA, J. N. **Methods for Measuring Antioxidant Activity of Fruits**. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde, 14(4):263-9, 2012;

TACO - **Tabela brasileira de composição de alimentos**. NEPA (Núcleo de Estudos e pesquisas em Alimentação), UNICAMP.- 4. ed. rev. e ampl., BookEditora, Campinas-SP, 161 p., 2011;

TEIXEIRA, A. S., ANDRADE, R. O., LIMA, G. S., SILVA, J. G., CARDOSO, R. L. **Elaboração e avaliação da estabilidade de fermentado alcoólico de maracujá**. Caderno Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável – Dezembro, 2014. VOL. 4. No.1, Campina Grande, 2014;

TEIXEIRA, L. V. Análise Sensorial na Indústria de Alimentos. **Revista Inst. Latic**. “Cândido Tostes”, v. 366, p. 12-21, 2009;

TESSARO, D., LARSEN, A. C., DALLAGO, R. C., DAMASCENO, S. G., SENE, L., COELHO, S. R. M.. Avaliação das fermentações alcoólica e acética para produção de

vinagre a partir de suco de laranja. *Acta Scientiarum. Technology.*, Maringá, v. 32, n. 2 p. 201-205, 2010;

TORRES, A. B. N., SILVA, M. E., SILVA, W. B., SWARNAKAR, R., SILVA, F. L. H. Cinética e Caracterização Físico-Química do Fermentado do Pseudofruto do Caju (*Anacardium occidentale* L.). *Química Nova*, Vol. 29, No. 3, p. 489-492. 2012;

TORRES, B.B., MARZZOCO, A. **Bioquímica básica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 360 p., 1999;

TOOR, R. K., SAVAGE, G. P., HEEB, A. Influence of different types of fertilisers on the major antioxidant components of tomatoes. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, n. 1, p. 20-27, Feb. 2013;

VALIM, F. de P., OLIVEIRA, E. A., KAMIMURA, E. S., ALVES, V. D., MALDONADO, R. R. Produção de Star Fruit alcoólica fermentada bebidas. **Indian J. Microbiol**, 56 (4): 476-481, out-Dez 2016;

VELOSO, I. I. K., RODRIGUES, K. C. S., SONEGO, J. C. S., CRUZ, A. J. G., BADINO, A. C. Fed-batch ethanol fermentation at low temperature as a way to obtain highly concentrated alcoholic wines: Modeling and optimization. **Biochemical Engineering Journal**, n. 141, p.:60–70, 2018;

VENTURINI, W.G.F. *Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia*. 1.ed. São Paulo: **Editora Blucher**, 85p., 2010;

VIEIRA, R. C., BRAINER, N. dos S., HOLANDA, R. da S. O., VIEIRA, W. T., ALMEIDA, R. M. R. G., SOLLETI, J. I., BALLIANO, T. L. Mapeamento prospectivo das tecnologias envolvidas na modelagem do fermentado alcoólico do Tomate e seus resíduos. **Caderno de Prospecção** – Salvador, v. 11, n. 5 –Ed. VIII ProspeCT&I, p. 1712-1725, dezembro, 2018;

VUCUROVIC, D. G., DODIC, S.N., GRAHOVAC, J. A., POPOV, S. D., NEDELJKOVIC, N. M. Kinetic modelling of batch ethanol production from Sugar beet raw juice. **Appl Energy**. 2012;

WATERHOUSE, A. L. PoMANYlyphenolics: determination of total phenolics. In: WROLSTAD, R. E. **Current protocols in food analytical chemistry**. New York: J. Wiley. p. 11-18, 2002;

WOLF, L. D. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana-deaçúcar para a produção de etanol e obtenção de xilooligômeros**. 148 p. Dissertação de mestrado – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011;

XUE, C., ZHAO, J., LIU, F., LU, C., YANG, S.-T., BAI, F. W. Two-stage in situ gas stripping for enhanced butanol fermentation and energy-saving product recovery. **Bioresource technology**, v. 135, p. 396–402, 2013.