

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE TECNOLOGIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM LEVEDURA IMOBILIZADA EM COLMOS DE
BAMBU E EM FIBRA DE COCO**

por

ADEILTON MALAFAIA DOS SANTOS

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas para
obtenção do grau de mestre

Maceió/Alagoas

Dezembro, 2008

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM LEVEDURA IMOBILIZADA EM COLMOS DE BAMBU E EM FIBRA DE COCO

ADEILTON MALAFAIA DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química

Área de Concentração: Processos Bioquímicos

Orientador: Prof.º D. Sc. João Nunes de Vasconcelos

**Maceió/AL
2008**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

S237f	<p>Santos, Adeilton Malafaia dos. Fermentação alcoólica com levedura imobilizada em colmos de bambu e em fibra de coco / Adeilton Malafaia dos Santos, 2008. 69 f. : il., tabs., grafs.</p> <p>Orientador: João Nunes de Vasconcelos. Dissertação (mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Tecnologia. Maceió, 2008.</p> <p>Bibliografia: f. 66-69.</p> <p>1. Fermentação alcoólica. 2. Células imobilizadas. 3. Bambu. 4. Coco. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 663.1</p>
-------	---

**FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM LEVEDURA IMOBILIZADA
EM COLMOS DE BAMBU E FIBRA DE COCO**

por

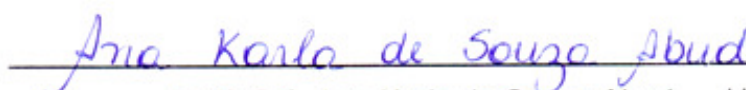
ADEILTON MALAFAIA DOS SANTOS

Dissertação defendida e julgada em sua forma final em 02 de dezembro de 2008, pela comissão examinadora, para obtenção de título de Mestre em Engenharia Química.



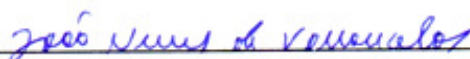
Prof.ª. Dr.ª. Luciana Cristina Lins de Aquino – UFS

CPF: 911.675.314-34



Prof.ª. Dr.ª. Ana Karla de Souza Abud — UFAL

CPF: 532.813.575-04



Prof. Dr. João Nunes de Vasconcelos – UFAL (Orientador)

CPF: 068.576.635-72

À minha amada esposa Eronilde Silva de Oliveira
Malafaia.

Aos meus pais Ataide Joventino dos Santos e Laenice
Malafaia dos Santos.

AGRADECIMENTOS

Ao professor João Nunes de Vasconcelos, pela oportunidade, confiança e amizade.

Aos laboratoristas Daniel Fernandes Costa e Amaury Calheiros da Silveira Neto, pela amizade e imprescindível suporte na fase experimental deste trabalho.

Ao Grupo Carlos Lyra, através do Engenheiro Aldevan Henrique da Silva Júnior, pela disponibilidade na execução das análises de nossas amostras.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo comparar qualitativa e quantitativamente fermentações alcoólicas promovidas por células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em três suportes inertes: fibra de coco anão (*Cocos nucifera*) e duas variedades de bambu (*Phyllostachys caníço* e *Guadua angustifolia*). Os três materiais também foram avaliados quanto a seu uso como suportes. O processo de imobilização consistiu da imersão de volumes iguais dos materiais (dois litros) em suspensão de células de leveduras (da ordem de 10^9 células/mL) seguida de drenagem e conseqüente alimentação com volumes iguais de mosto de melação. O mosto teve o pH corrigido com ácido sulfúrico comercial para cerca de 4,20 e recebeu adição de 3 ppm de bactericida para controle da contaminação bacteriana. Também houve adição de 10 ppm de nutriente para fermentação em todos os ciclos de fermentação. Ao final de noventa e um ciclos fermentativos, o processo foi interrompido, sendo observado que os três materiais mostraram-se resistentes fisicamente e que a eficiência do processo e a eficiência da fermentação do sistema *levedura-coco* apresentaram valores superiores aos dos sistemas *levedura-bambu* desde os primeiros ciclos, mostrando ser a fibra de coco um suporte de imobilização de células mais eficaz. Contudo, por volta do ciclo de número setenta e quatro, os três sistemas começaram a apresentar eficiências similares, o que sugere que houve um gradativo incremento do número de células imobilizadas nos sistemas *leveduras-bambu* no decorrer dos ciclos. As contagens de células livres nos meios fermentados demonstraram que houve desprendimento celular satisfatório com relação a valores já citados na literatura.

Palavras-chave: Células imobilizadas. Coco. Bambu. Fermentação alcoólica.

ABSTRACT

This paper aims to compare qualitatively and quantitatively alcoholic fermentation promoted by yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in three inert supports: fiber of dwarf coconut (*Cocos nucifera*) and two varieties of bamboo (*Phyllostachys caniço* and *Guadua angustifolia*). The three materials were also evaluated on their use as supports. The process of immobilization was dumping of equal volumes of materials (two liters) into a suspension of yeast cells (in order of 10^9 cells / mL) followed by drainage and consequent food with equal volumes of must of molasses. The pH must was adjusted with commercial sulfuric acid to around 4.20 and received addition of 3 ppm of bactericidal for control of bacterial contamination. There was also addition of 10 ppm of nutrient for fermentation in all fermentative cycles. At the end of ninety-one fermentative cycles the process was interrupted, and observed that the three materials have proved physical resistance and that the efficiency of the process and efficiency of fermentation of *yeast-coconut* system had values above those of yeast-bamboo systems since initial stages, showing to be the fiber of coconut support for the immobilization of cells more efficient. However, around the cycle of number seventy-four, the three systems began to provide similar efficiencies, which suggests that there has been a gradual increase in the number of yeast cells immobilized in systems yeast-bamboo during the cycles. The counting of cells in free media fermented showed that there was satisfactory cell detachment related with the figures already cited in the literature.

Keywords: Immobilized cells. Coconut. Bamboo. Alcoholic fermentation.

Índice de Figuras

Figura 2.1 – Morfologia das leveduras.....	4
Figura 2.2 – Multiplicação de leveduras, com formação de brotos ou gemas.	5
Figura 2.3 – Formação de pseudomicélio.	5
Figura 2.4 – Processo ou batelada de cortes.....	9
Figura 2.5 – Sistema de reaproveitamento de inóculo.	11
Figura 2.6 – Processo com recirculação de células ou processo Melle-Boinot.....	11
Figura 2.7 - Processo contínuo com n dornas em série e com reciclo de células.....	13
Figura 2.8 – Adsorção de células a uma superfície.....	17
Figura 2.9 – Células imobilizadas nas cavidades do suporte.	17
Figura 2.10 – Células floculadas no interior de um suporte.....	18
Figura 2.11 – Esfera de vidro (suporte) após tratamento com APTS (γ -aminopropil-trietoxissilano).	19
Figura 2.12 – Esfera de vidro (suporte) previamente tratada com APTS, seguida de tratamento com glutaraldeído. O grupo carbonila formado (-HC=O) deve formar ligação com aminas da membrana das células.....	20
Figura 2.13 – Células imobilizadas em matriz polimérica porosa.	20
Figura 2.14 – Técnica de imobilização de células por envolvimento.	21
Figura 2.15 – Exemplo simplificado da técnica de contenção em uma barreira.	22
Figura 2.16 – Esquema da produção de etanol com leveduras imobilizadas em alginato de cálcio em regime contínuo.	24
Figura 2.17 – Biocápsulas de leveduras. A porção superior da figura exhibe uma biocápsula à direita de uma moeda (diâmetro aproximado de 2 cm). A porção inferior da figura exhibe uma biocápsula aberta, evidenciando sua estrutura oca.	25
Figura 4.1 – Variedades de bambu utilizadas para imobilização de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : (A) <i>Guadua angustifolia</i> , (B) <i>Phyllostachys caniço</i>	29
Figura 4.2 – Fibra de coco anão (<i>Cocos nucifera</i>) fatiada para imobilização de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
Figura 4.3 – Reatores com os suportes utilizados nos experimentos (A: <i>coco</i> , B: <i>caniço</i> , C: <i>guadua</i>).	31
Figura 4.4 – Vista superior de reator contendo suporte com um disco de plástico perfurado.	31
Figura 4.5 – Reator utilizado nos experimentos, com disco plástico perfurado e frasco de vidro para manutenção dos suportes submersos.....	33
Figura 4.6 – Fluxograma representativo do processo de imobilização de células nos suportes.....	34

Figura 4.7 – Câmara de Neubauer visualizada ao microscópio óptico. Os campos em laranja sinalizam a configuração utilizada para contagem de células de leveduras em todas as determinações: 16 campos ao total, sempre na direção diagonal.	39
Figura 5.1 – Eficiências dos processos fermentativos (médias) com células imobilizadas em fibra de coco e bambus (caniço e guadua) a vários valores de Brix do mosto.	46
Figura 5.2 – Correlação entre ART e Brix do mosto. Foram utilizados os dados da Tabela 5.2.	47
Figura 5.3 – Concentração de leveduras vivas livres nos meios fermentados nos primeiros sete ciclos.	48
Figura 5.4 – Concentração de células totais (leveduras/mL) nos meios fermentados em todos os ciclos de fermentação.	50
Figura 5.5 – Percentual de brotamento de células de leveduras livres nos meios fermentados.	50
Figura 5.6 – Amostras dos suportes após os 91 ciclos fermentativos.	52
Figura 5.7 – Eficiência do processo fermentativo nos reatores com leitos de fibra de coco e bambus nos primeiros ciclos.	53
Figura 5.8 – Teor alcoólico dos meios fermentados nos reatores com leitos de fibra de coco e bambus nos primeiros ciclos.	54
Figura 5.9 – Eficiências do processo fermentativo, nos reatores com leitos de fibra de coco e bambus em todos os ciclos de fermentação.	55
Figura 5.10 – pH do mosto e dos meios fermentados dos sistemas leveduras-coco, leveduras-caniço e leveduras-gadua entre os ciclos 29 e 91.	56
Figura 5.11 – Acidez sulfúrica do mosto e dos meios fermentados dos sistemas leveduras-coco, leveduras-caniço e leveduras-gadua entre os ciclos 29 e 91.	56
Figura 5.12 – Eficiência do processo fermentativo (η_P) dos sistemas leveduras-coco, leveduras-caniço e leveduras-gadua entre os ciclos 28 e 91.	58
Figura 5.13 – Eficiência da fermentação (η_F) dos sistemas leveduras-coco, leveduras-caniço e leveduras-gadua entre os ciclos 28 e 91.	58
Figura 5.14 – Rendimento em etanol dos sistemas leveduras-coco, leveduras-caniço e leveduras-gadua entre os ciclos 29 e 91.	59
Figura 5.15 – Fator de rendimento em produção de etanol de alguns sistemas com células imobilizadas:	62
Figura 5.16 – ART dos meios fermentados provenientes dos sistemas leveduras-suporte para os ciclos de fermentação 29 a 91.	63

Índice de Tabelas

Tabela 2.1 – Exemplos de suportes comerciais utilizados na técnica de adsorção.....	19
Tabela 4.1 – Brix e ART médios do mosto e o número correspondente de ciclos de fermentação utilizados para avaliar a melhor concentração de açúcares para realização dos experimentos.	35
Tabela 5.1 – Características microbiológicas do fermento seco utilizado nos experimentos.....	45
Tabela 5.2 - Brix e ART do mosto e os respectivos valores de eficiência do processo fermentativo (η_P) durante a determinação do Brix do mosto mais adequado. Os valores da última linha (ciclos 28 - 91) referem-se aos ciclos de fermentação após a definição do Brix mais adequado.	46
Tabela 5.3 – Características dos leitos confeccionados com os suportes.....	48
Tabela 5.4 – Concentração de células totais (CLT), concentração de células vivas (CLV) e concentração de células mortas (CLM) em leveduras / mL nos suportes e nos meios fermentados do último ciclo fermentativo.	51
Tabela 5.5 – Viabilidade celular em % (VC) e porcentagem de brotamento de células (BT) nos suportes e nos meios fermentados do último ciclo fermentativo.....	51
Tabela 5.6 – Eficiência do processo fermentativo (η_P), eficiência da fermentação alcoólica (η_B) e fator de rendimento em produção de etanol ($Y_{P/S}$) nos sistemas com fibra de coco e bambus entre os ciclos 28 a 91.	52
Tabela 5.7 - pH e acidez sulfúrica do mosto no início dos ciclos de fermentação e pH e acidez sulfúrica dos meios fermentados dos sistemas levedura-suporte ao final de todos os ciclos de fermentação.....	57
Tabela 5.8 - Eficiência do processo, eficiência de fermentação e rendimento em etanol dos sistemas leveduras-suporte do ciclo 28 ao 91	59
Tabela 5.9 – Eficiências do processo (η_P), de fermentação (η_B) e respectivos coeficientes de variação (CV) dos sistemas leveduras-suporte entre os ciclos 28 e 91 ($M \pm DP$: média \pm desvio-padrão).....	61

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Morfologia, citologia e características fisiológicas de leveduras	4
2.2 Bioquímica da fermentação alcoólica.....	6
2.3 Formas de condução da fermentação alcoólica	7
2.3.1 Processos descontínuos	8
2.3.1.1 Processo ou batelada de cortes	9
2.3.1.2 Sistema de cultura pura.....	10
2.3.1.3 Sistema de reaproveitamento de inóculo.....	10
2.3.1.4 Processo Melle-Boinot.....	11
2.3.2 Processos contínuos	13
2.4 Técnicas de imobilização de células	15
2.4.1 Adsorção.....	16
2.4.2 Ligação covalente	19
2.4.3 Envolvimento.....	20
2.4.4 Contenção em uma barreira.....	22
2.5 Suportes utilizados para a produção de etanol.....	22
3 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 Materiais	28
4.1.1 Microrganismo utilizado.....	28
4.1.2 Melaço	28
4.1.3 Suportes para imobilização	28
4.2 Caracterização dos suportes.....	29
4.2.1 Umidade dos suportes	29
4.2.2 Porosidade, absorção de umidade e densidade dos leitos confeccionados com os suportes	30
4.3 Técnica de imobilização	33
4.4 Fermentação.....	34
4.5 Determinações quantitativas	36
4.5.1 Brix.....	36
4.5.2 Açúcares Redutores Totais (ART).....	36

4.5.3 Acidez sulfúrica	37
4.5.4 Teor alcoólico	38
4.5.5 Contagem de células vivas, mortas e brotos, percentual de brotamento e viabilidade celular	38
4.6 Parâmetros de fermentação	42
4.6.1 Eficiência do processo fermentativo (η_P)	42
4.6.2 Eficiência da fermentação (η_B)	43
4.6.3 Rendimento em produção de etanol ($Y_{P/S}$)	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1 Microrganismo utilizado	45
5.2 Mosto	45
5.3 Suportes	47
5.4 Fermentação	53
6 CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, as leveduras são os principais microrganismos responsáveis pela conversão em nível industrial de açúcares em etanol. As células de leveduras fazem uso desta conversão para obterem energia necessária à manutenção de suas atividades vitais, sendo o álcool etílico um produto de excreta de seu metabolismo.

As leveduras são microrganismos anaeróbios facultativos, ou seja, adaptam-se em condições tanto de aerobiose como de anaerobiose. Na presença de oxigênio livre como na sua escassez, uma série de reações ordenadas ocorre no interior das leveduras, reações estas catalisadas por enzimas da própria célula e que têm como meta a obtenção de energia química através da degradação de açúcares. Industrialmente, condições são criadas para que a levedura possa se desenvolver e, paralelamente, produzir etanol em quantidade economicamente viável.

O processo fermentativo industrial para a produção de etanol pode ser conduzido basicamente de duas maneiras distintas: processo descontínuo (ou em batelada) e processo contínuo. No processo descontínuo, após a conversão do substrato em etanol, o microrganismo é reutilizado, após tratamento adequado em pré-fermentador, em um novo ciclo de fermentação. No processo contínuo, o substrato e o microrganismo agente fluem por reatores em série, ocorrendo a conversão gradativa dos açúcares em álcool através dos citados reatores. O processo contínuo oferece importantes vantagens econômicas frente ao processo descontínuo, especialmente quando combinado com técnicas de imobilização de células (VERBELEN *et al.*, 2006).

A imobilização de células de levedura consiste na fixação destas em materiais usados como suportes, tais como, por exemplo, colmos de cana-de-açúcar (VASCONCELOS, 2004), vidro sinterizado e cerâmicas (VERBELEN *et al.*, 2006), sabugos de milho (SÁ, 2003), etc. De acordo com Verbelen *et al.* (2006), a imobilização de células em diversos tipos de suporte pode promover altas densidades de células nos reatores, o que em combinação com vazões maiores de alimentação de mosto, resultam em menores tempos de residência; contudo, custos indeterminados, vários problemas de engenharia e alterações de propriedades metabólicas e fisiológicas das células de leveduras são os

principais fatores que influenciam a não utilização em escala industrial de processos com células imobilizadas, ao contrário dos processos convencionais, conduzidos com células livres. Estes últimos, em grande parte do Brasil, são processos descontínuos.

A maior parte do etanol produzido no Brasil é obtido pelo processo descontínuo *Melle-Boinot*, o qual apresenta inúmeras vantagens frente aos processos contínuos, tais como menor risco de contaminação, maior flexibilidade de operação, domínio da tecnologia atual, etc. (VASCONCELOS, 1998). Contudo, apresenta desvantagens bastante significativas como ocorrência de etapas improdutivas (carga de mosto e descarga de material fermentado dos reatores), necessidade de centrifugação para promover a reciclagem das células no processo, etc. (CARVALHO NETO *et al.*, 1990). Processos contínuos com células imobilizadas eliminam a necessidade de centrifugação para reciclagem de células, cuja instalação e manutenção são muito onerosas; além disso, favorecem maiores produtividades e menor tempo de fermentação, menores capacidades volumétricas de fermentadores, etc. (VASCONCELOS *et al.*, 2004). Frente à elevada produção de etanol no Brasil, a busca por processos que aumentem os rendimentos fermentativos revela-se importante.

Ao longo dos anos, a produção de etanol tem crescido substancialmente. Wheals *et al.* (1999) citam que a ênfase na redução da poluição ambiental em consonância com o protocolo de Kyoto, apresenta um estímulo ao crescimento da produção de etanol.

A melhoria dos rendimentos fermentativos dos processos utilizados foi decorrente das inovações e desenvolvimentos tecnológicos obtidos com o Proálcool (RAMALHO FILHO e VASCONCELOS, 1991). Ainda de acordo com Ramalho e Vasconcelos (1992) o Proálcool, criado no Brasil em 1975 como resposta brasileira ao primeiro choque do petróleo, foi o mais importante programa de combustíveis líquidos de biomassa do mundo. Após uma fase de estagnação, ressurgiu recentemente com toda a força, com aumento substancial de produção: de 12.485.426 m³ na safra 2002/2003 para 22.238.669 m³ na safra 2006/2007 (fonte: DCAA/SPAE/MAPA). O início da produção dos veículos bicombustíveis contribuiu de forma decisiva para este grande aumento de produção.

De acordo com Vasconcelos (1998), as eficiências fermentativas em escala industrial no Brasil já se encontram em patamares difíceis de serem suplantados sem inovações

tecnológicas. Logo, devido às vantagens dos processos com células imobilizadas sobre os processos convencionais, o estudo com imobilização de células que busque maiores rendimentos revela-se importante. Este estudo tem como alvo a tentativa de otimização do processo de fermentação alcoólica fazendo uso de células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em suportes inertes, efetuando avaliações comparativas das fermentações realizadas com três suportes inertes diferentes: duas variedades de bambu (*Phyllostachys caníço* e *Guadua angustifolia*) e fibra de coco (*cocos nucífera*).

Segundo Marinho *et al.* (2006), o cultivo de coco encontra-se em franca expansão no Brasil, com os plantios se intensificando da região Norte até a Sudeste. O rendimento da cultura na região Nordeste é menor que em outras regiões, decorrente, principalmente, da baixa fertilidade natural dos solos, de falha nos tratos culturais, incidência de pragas e doenças e de déficit hídrico, ocasionado, geralmente, pelo manejo inadequado da irrigação (FERREIRA *et al.*, 1997). Salazar e Leão (2000) citam que do coco são extraídas fibras de diferentes comprimentos que servem para fabricação de tapetes, colchões, acolchoados para automóveis, escovas, pincéis, capachos, cordas marítimas e cama de animais.

Existem mais de 1.300 variedades de bambu, espalhadas nas regiões tropicais e sub-tropicais do Planeta, sendo que o Brasil conta com a maior diversidade e mais alto índice de florestas endêmicas de bambu em toda a América Latina (LONDOÑO, 1999). Entre as qualidades do bambu que têm atraído a atenção de pesquisadores e empresários, está a rápida propagação e o crescimento acelerado da planta. O bambu cresce 30% mais rápido do que as espécies de árvores consideradas como de rápido crescimento, e graças a esse crescimento vigoroso, seu rendimento em peso por hectare ao ano é 25 vezes maior que o da madeira (VELEZ, 2001). Isto significa que o bambu é um recurso altamente renovável, o que não ocorre com outros materiais, que estão se tornando escassos e já ameaçam inviabilizar alguns sistemas de produção, por falta de matéria-prima.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfologia, citologia e características fisiológicas de leveduras

São denominadas leveduras, os fungos unicelulares, também conhecidos como fermentos. São também amplamente distribuídas na natureza na água, solo, plantas, ar e animais. De modo geral, são encontradas em maior número nas frutas e nos vegetais. São utilizadas para a fabricação de bebidas, pães e outros produtos fermentados, já que, na ausência do ar, realizam a fermentação alcoólica. Podem provocar, também, deterioração de alimentos e bebidas. Algumas espécies são patogênicas, causando doenças ao homem, mas que não são transmitidas por alimentos (SANTOS, 1999).

SENAI/DN (2000) cita como principais características morfológicas, citológicas e fisiológicas de células de leveduras:

- Variam de 2 a 20 micra, podendo medir 100 micra de comprimento. A largura varia geralmente de 1 a 9 micra. São encontradas sob diferentes formas (Figura 2.1). A oval é a mais freqüente.

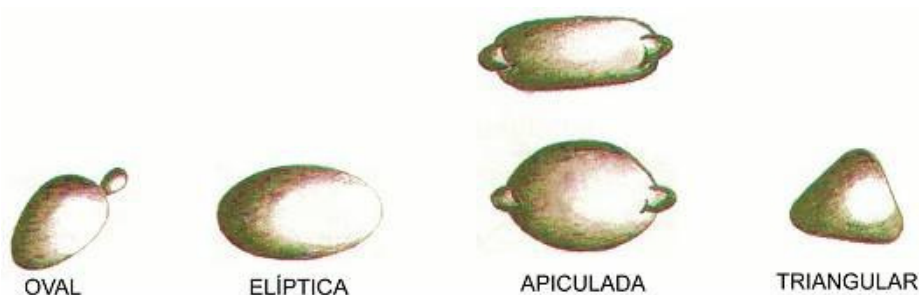


Figura 2.1 – Morfologia das leveduras.

- As células de leveduras são eucarióticas. Podem apresentar cápsulas, como as bactérias. A parede celular contém glucana, manana, lipídios e fosfatos. A quitina pode estar presente.

- As leveduras se multiplicam assexuadamente, através da formação de brotos ou gemas (Figura 2.2). A célula mãe pode dar origem a até 20-25 células-filhas.

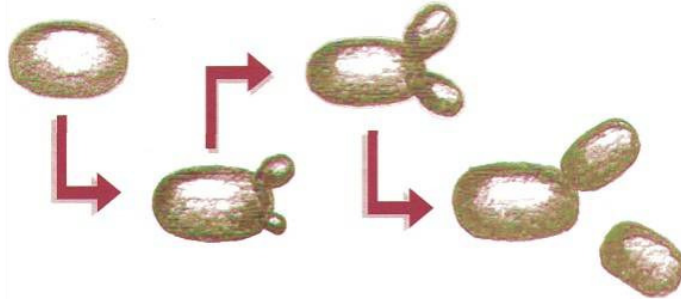


Figura 2.2 – Multiplicação de leveduras, com formação de brotos ou gemas.

- Em muitas espécies de leveduras ocorrem sucessivas gemulações, e quando há mais de sete células juntas, denomina-se pseudomicélio (Figura 2.3), pela semelhança aos micélios dos bolores. As leveduras que formam películas sobre a superfície de líquidos, produzem o pseudomicélio.



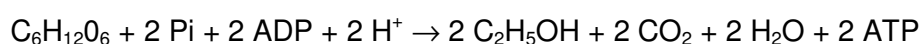
Figura 2.3 – Formação de pseudomicélio.

- As leveduras também produzem esporos de origem assexuada (artrosporos, balistosporos e outros) e de origem sexuada (ascosporos e basidiosporos). São mais lentas que as bactérias e mais rápidas que os bolores para se reproduzirem. Assim, para dobrarem a massa celular através da formação de brotos, levam geralmente de 30 minutos a três horas.

▪ As leveduras podem ser aeróbias ou facultivas (chamadas de fermentativas). As facultativas fazem a fermentação alcoólica, produzindo etanol e gás carbônico. Adaptam-se muito bem (e são muito encontradas) em ambientes ácidos, embora, como os bolores, possam crescer em diversos tipos de ambiente com relação à acidez. Como os bolores, preferem temperaturas na faixa de 20°C a 30°C. Existem, entretanto, muitas espécies que crescem sob refrigeração. São raras as que se desenvolvem em temperaturas acima de 45°C. Necessitam de menos água disponível que as bactérias e mais do que os bolores.

2.2 Bioquímica da fermentação alcoólica

Segundo Santos (1999), as leveduras podem fazer uso tanto da fermentação (em condições de anaerobiose) como da respiração (em condições de aerobiose) para obtenção de energia química através da degradação de açúcares. O termo energia química refere-se a moléculas de adenosina trifosfato, ou simplesmente ATP. A perda de um de seus grupos fosfatos libera grande quantidade de energia útil, sendo por essa razão o ATP denominado de composto de transferência de energia de alto valor energético. A hidrólise do ATP leva à formação de moléculas de adenosina difosfato, ou ADP, as quais podem ser fosforiladas transformando-se assim em novas moléculas de ATP (VASCONCELOS, 1998):



$$(\Delta G^0 = -56 \text{ kcal/mol})$$

Em condições de anaerobiose a levedura desvia seu metabolismo para a fermentação alcoólica, sendo o etanol apenas um dos excretas de todo o processo. Já em condições de aerobiose, a levedura realiza respiração. A respiração leva à formação de uma quantidade de ATP dezenove vezes maior que a obtida na fermentação alcoólica (VASCONCELOS, 1998):



$$(\Delta G^0 = -686 \text{ kcal/mol})$$

As células de leveduras apresentam necessidades nutricionais durante o processo de fermentação alcoólica, as quais influenciam diretamente na multiplicação e no crescimento celular e também na eficiência da transformação de açúcar em álcool (RIBEIRO *et al.*, 1987). Belluco (2001) cita a importância de nitrogênio para a célula como elemento essencial para o crescimento e multiplicação de leveduras, e a importância da utilização de açúcar na geração de biomassa e produção de carboidratos de reserva (trealose e glicogênio). Amorim *et al.* (1996) cita a importância do fósforo, tanto por integrar as moléculas de ácidos nucleicos como na formação de ATP; a importância do enxofre como constituinte de aminoácidos; e a influência de íons minerais (Zn, Co, Mn, Cu, etc.) na atividade enzimática das células.

Alguns fatores físico-químicos também são de vital importância na fermentação alcoólica. As leveduras usadas nas destilarias desenvolvem-se bem entre 30 e 33°C ou até em temperaturas superiores (AMORIM *et al.*, 1996). No entanto, a elevação da temperatura do meio em fermentação causa queda nos rendimentos e eficiências do processo fermentativo, pois em altas temperaturas, a toxidez do etanol sobre o fermento é intensificada, causando perda de viabilidade celular (AMORIM *et al.*, 1996). O pH do meio em fermentação também é importante. COPERSUCAR (1987) cita que a adição de 0,35g de H₂SO₄ por litro de mosto supre as necessidades de enxofre bem como serve para manter o pH na faixa 3,5 a 4,5, o que inibe o desenvolvimento de diversas bactérias.

2.3 Formas de condução da fermentação alcoólica

De maneira geral, o processo de fermentação alcoólica consiste das seguintes etapas: a) preparar um meio de cultura adequado à nutrição e desenvolvimento do microrganismo agente, bem como do acúmulo do produto desejado (etanol) e b) transferir este meio de cultura para um biorreator, adicionar o microrganismo responsável pela fermentação e aguardar que o processo ocorra (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

Contudo, este processo pode ser conduzido de diversas formas: variando-se a disposição e volume dos biorreatores (dornas ou fermentadores), alterando-se os perfis de alimentação do meio de cultura, reutilizando-se ou não o microrganismo em um novo ciclo

de fermentação, etc. Pode-se assim denominar as diversas formas de se conduzir um processo de fermentação alcoólica como *formas de condução* ou *sistemas de fermentação* (LIMA, 1992).

De maneira geral, as formas de condução da fermentação alcoólica são classificadas em descontínua e contínua (SCHIMIDELL e FACCIOTTI, 2001) e serão detalhadas nos itens 2.3.1 2.3.2.

2.3.1 Processos descontínuos

Os processos descontínuos são também conhecidos como processos em batelada. De maneira geral, o modo de operação de um processo descontínuo pode ser descrito da seguinte forma (CARVALHO e SATO, 2001):

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

Carvalho e Sato (2001) destacam as seguintes vantagens dos processos descontínuos em relação aos contínuos: menores riscos de contaminação e grande flexibilidade de operação. Destacam as seguintes desvantagens: a fermentação descontínua pode levar a baixos rendimentos e/ou produtividades e apresenta vários “tempos mortos”, ou

seja, tempos em que o fermentador não está sendo usado para o processo fermentativo, tais como tempo de carga e descarga de dorna, lavagem, etc.

Variações da descrição acima estão detalhadas na classificação dos processos descontínuos.

2.3.1.1 Processo ou batelada de cortes

O processo de cortes tem início com uma batelada. Quando a concentração de açúcares (medida pelo Brix) no meio em fermentação se reduzir à metade da concentração do mosto de alimentação, transfere-se metade do conteúdo para uma segunda dorna, completando-se ambas com novo mosto e deixando as fermentações prosseguirem. A divisão da primeira dorna em duas chama-se *corte* (CARVALHO e SATO, 2001). Araújo (1982) afirma que o corte deve ocorrer quando 50% dos açúcares do mosto são consumidos. A sucessão de cortes pode ocorrer até se alcançar o número de dornas desejado em operação. Por outro lado, o sistema de cortes pode ser usado na fase inicial de propagação do fermento no processo de fermentação alcoólica industrial. A Figura 2.4 exibe um diagrama simplificado do sistema de cortes.

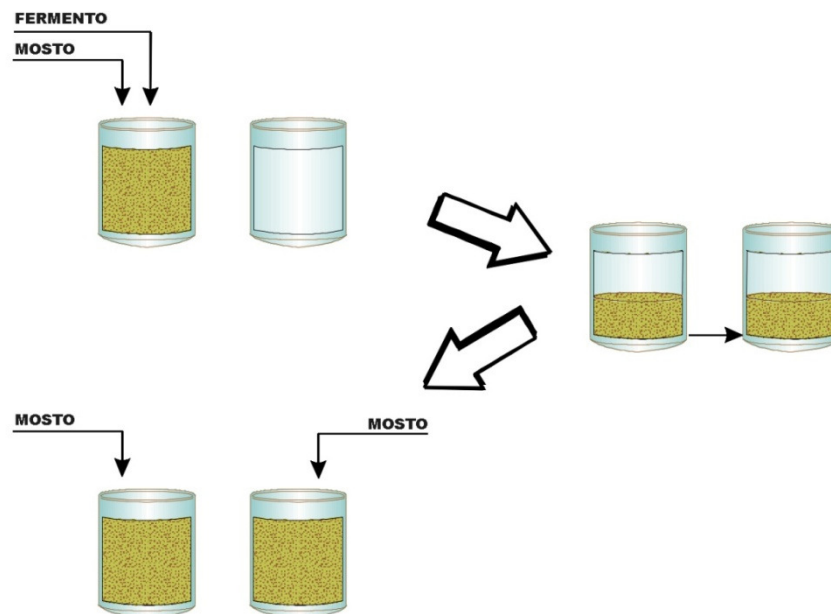


Figura 2.4 – Processo ou batelada de cortes.

De acordo com Carvalho e Sato (2001), produzir etanol por sucessão de cortes pode acarretar em sérias quedas de rendimento, sendo o monitoramento deste parâmetro a única maneira de se prever o número máximo de cortes por inóculo.

2.3.1.2 Sistema de cultura pura

Consiste na inoculação de uma dorna com uma cultura pura (CARVALHO e SATO, 2001). Neste caso não há reutilização do inóculo, sendo, portanto, todo o meio fermentado enviado para a seção de separação. Cada dorna deve receber um novo inóculo, preparado a partir de uma cultura nova, que deve corresponder de 20 a 25% do volume útil da dorna.

Uma quantidade considerável de açúcares é desviada para multiplicação das células, o que reduz grandemente os rendimentos e eficiências da fermentação. Esta forma de condução é usada em fermentação de matérias-primas cuja natureza dificulta ou não permite a recuperação do inóculo, que é o caso da fermentação do milho. Também é usada na produção de bebidas fermentadas cujo fabricante deseja manter um padrão sempre constante de qualidade do produto.

Carvalho e Sato (2001) afirmam que este processo oferece poucos riscos de contaminação se a propagação do inóculo for feita em boas condições de assepsia, sendo assim altamente indicado em fermentações com microrganismos altamente suscetíveis a contaminações.

2.3.1.3 Sistema de reaproveitamento de inóculo

Nesta forma de condução, deixa-se decantar as leveduras após o término da fermentação. O vinho sobrenadante é enviado para destilação e o fundo de dorna (pé-de-cuba) é tratado com água e ácido (até pH 2,5 – 3,0) e realimentado com novo mosto (CARVALHO e SATO, 2001).

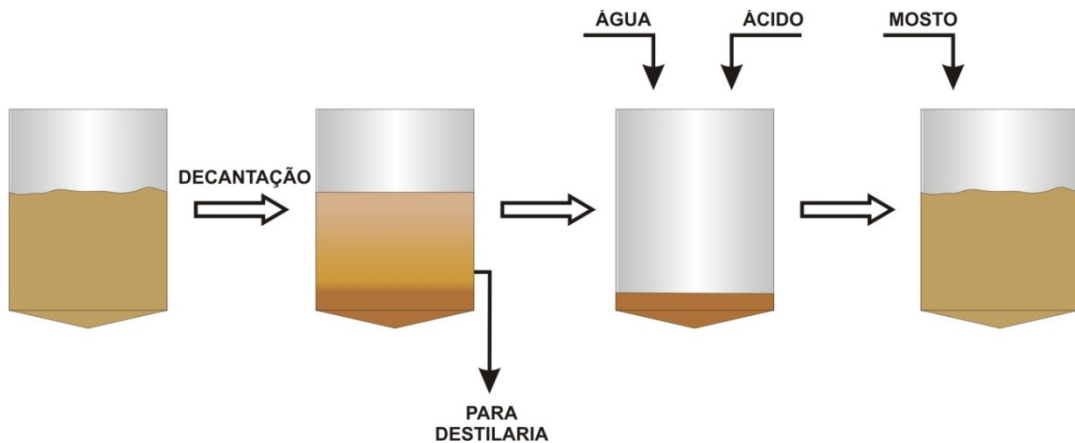


Figura 2.5 – Sistema de reaproveitamento de inóculo.

2.3.1.4 Processo Melle-Boinot

Refere-se ao processo que reaproveita inóculos de bateladas anteriores. É a forma de condução de fermentação alcoólica mais usada atualmente no Brasil, tendo sido posto em prática em meados da década de 1930 (LIMA *et al.*, 2001). Baseia-se na recuperação do fermento de uma dorna, após concluída a fermentação e conseqüente reutilização do mesmo em um novo ciclo de fermentação (Figura 2.6).

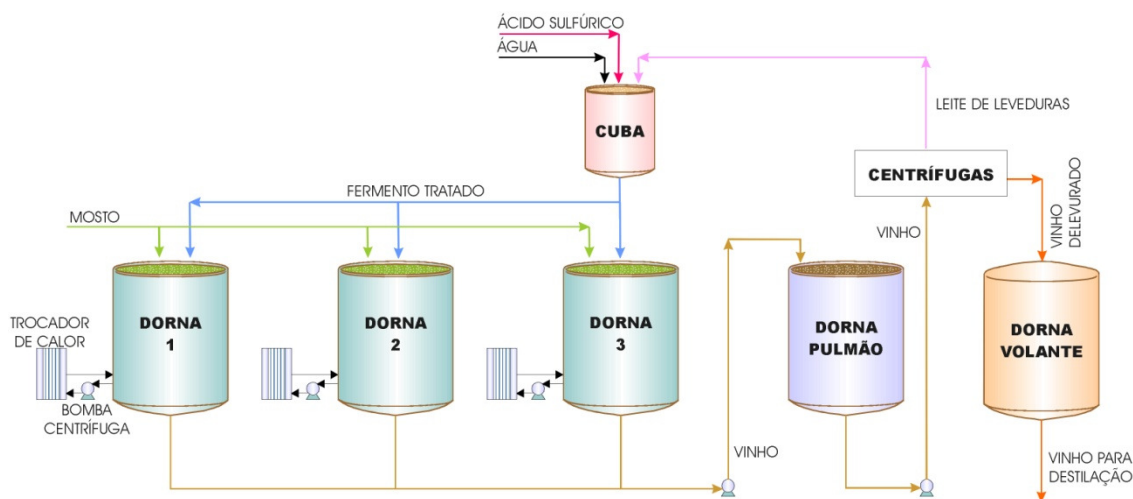


Figura 2.6 – Processo com recirculação de células ou processo Melle-Boinot.

Após a conclusão da fermentação, o vinho levedurado (meio fermentado que ainda contém as leveduras em suspensão) é enviado diretamente para as centrífugas ou para a dorna pulmão (tanque que alimenta continuamente as centrífugas). As centrífugas separam o vinho levedurado em duas frações: a primeira corresponde a uma suspensão concentrada de leveduras (creme de leveduras) e a segunda ao vinho delevedurado (meio fermentado com teor reduzido de leveduras), que é enviado para uma dorna volante, que alimenta a destilaria. Já o leite de leveduras, que corresponde de 10 a 20% do volume da dorna, é enviado para pré-fermentadores onde é diluído com água e tem o pH controlado em 2,2 – 3,2 com ácido sulfúrico comercial (LIMA *et al.*, 2001). Lima (1992) cita que o tratamento do fermento pode ter duração de até 4 horas. Depois do tratamento envia-se o fermento tratado para outra dorna, na qual se reinicia nova fermentação, após alimentação com mosto.

Nesta forma de condução, é comum o uso de altas concentrações de células (3×10^9 células/mL ou mais), que permite que se entre rapidamente na fase tumultuosa do processo fermentativo, com vantagens econômicas (LIMA *et al.*, 2001).

Almeida (1960) descreve as seguintes vantagens do processo Melle-Boinot:

- Economia de açúcar devido à menor reprodução celular, elevando o rendimento em etanol;
- Eliminação de contaminantes pela centrifugação do vinho (separação de células de levedura);
- Fermentação mais pura devido ao tratamento de leite de levedura (tratamento ácido);
- Eliminação da necessidade de cultura pura no preparo do pé-de-cuba, prática exigida no processo clássico, diminuindo, portanto a complexidade das operações da planta.

2.3.2 Processos contínuos

Em sua forma mais simples, a fermentação contínua faz-se alimentando uma dorna com fluxo contínuo de substrato, em concentração adequada ao microrganismo agente, retirando-se dela, de forma contínua e na mesma vazão, o meio fermentado que, após centrifugação, é encaminhado para a destilação (LIMA, 1992). A Figura 2.7 exhibe, de forma simplificada, o processo contínuo com n dornas em série e com reciclo de células.

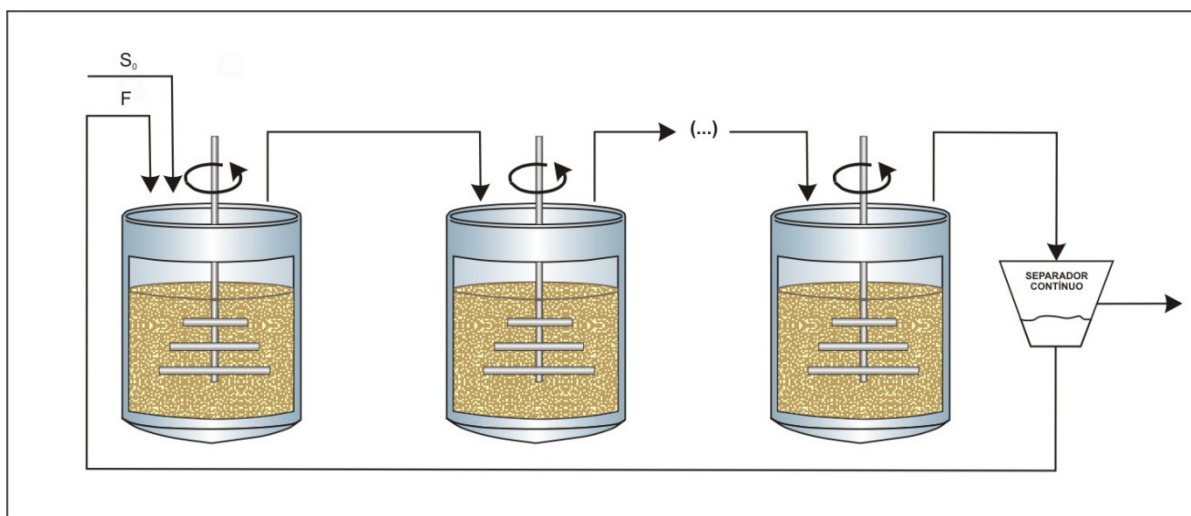


Figura 2.7 - Processo contínuo com n dornas em série e com reciclo de células.

Segundo Rodrigues *et al.* (1992), este processo apresenta maior produtividade, com aumento que pode atingir 100% em relação ao processo Melle-Boinot. Com isto obtém-se processos que:

- Reduzem gastos com mão-de-obra;
- Aumentam a produtividade;
- Reduzem o tempo não produtivo (carga, descarga, limpeza);
- Trabalham em condições ótimas de operação no estado estacionário;

- Reduzem a utilização de insumos, entre outros.

Facciotti (2001) também cita as seguintes vantagens:

- Obtenção de vinho uniforme, o que facilita o projeto das operações de recuperação do produto de interesse (“downstream”);
- Possibilidade de associação com outras operações contínuas na linha de produção;
- Maior facilidade no emprego de controles avançados.

Por outro lado, os processos contínuos apresentam algumas desvantagens com relação aos processos descontínuos, que podem limitar o emprego deste tipo de sistema. Facciotti (2001, p.224) destaca as seguintes desvantagens:

- possibilidade de ocorrência de mutações genéticas espontâneas, resultando na seleção de mutantes menos produtivos;
- maior possibilidade de ocorrência de contaminações, por se tratar de um sistema essencialmente aberto, necessitando de manutenção de condições de assepsia nos sistemas de alimentação e retirada de meio, desde que o processo assim o exija;
- dificuldades de manutenção de homogeneidade no reator, quando se trabalha com vazões baixas; dificuldades de operação em estado estacionário em situações como: formação de espuma, crescimento do microrganismo nas paredes do reator ou nos sistemas de entrada e saída do produto.

Apesar dos problemas citados, a utilização do processo contínuo de fermentação encontra grande aplicação prática na fermentação alcoólica (FACCIOTTI, 2001).

Facciotti (2001) afirma que uma fermentação contínua normalmente tem início em um processo descontínuo, ou seja, carrega-se inicialmente o reator com mosto, procede-se à inoculação com o pé-de-cuba sendo que, após um período de operação descontínua, inicia-se a alimentação de mosto e retirada de vinho, dando-se início efetivamente ao

processo contínuo. Após algum tempo, o processo deve convergir para um estado estacionário. Sendo assim, a alimentação deve ser iniciada com o cultivo na fase exponencial e concentração celular a mais elevada possível.

De acordo com COPERSUCAR (1987), os processos contínuos só começaram a ser operados em escala industrial no Brasil no início da década de 1980, mesmo havendo sido descritas instalações industriais operando com fermentação contínua por volta da década de 1940. Isto foi justificado em virtude da ausência de experimentação da época, da resistência natural à introdução de novas tecnologias, falta de otimização do processo contínuo no final da década de 1980 e pelo fato de existirem poucas instalações que, inclusive, não tinham a flexibilidade necessária para uma boa operação (COPERSUCAR, 1987).

2.4 Técnicas de imobilização de células

De acordo com Cheetham *et al.* (1979) imobilização é qualquer técnica que limite severamente a livre circulação de células. Tal limitação pode ser realizada por meio de agregação das células ou por sua retenção dentro ou sobre um suporte inerte.

Pradella (1982) cita como características de suportes de imobilização:

- Não toxidez às células;
- Alta capacidade de retenção de células no reator;
- Inércia química e bioquímica;
- Baixa sensibilidade a possíveis solicitações mecânicas, seja de compressão por peso, de tensões de cisalhamento pelo fluido ou eventuais pressões internas de gases;
- Alta difusividade de nutrientes e produtos formados.

Cheetham *et al.* (1979) cita que os processos fermentativos conduzidos com células imobilizadas, quando comparados com o processo convencional com células livres, apresentam várias vantagens, destacando-se:

- Fácil separação do meio fermentado dos biocatalisadores, eliminando-se o uso de centrífugas;
- Possibilidade do uso repetido do biocatalisador (processo em batelada) ou continuamente, em função da maior estabilidade das células imobilizadas;
- Aumento do rendimento em produto, visto que a reprodução celular está limitada, com conseqüente redução do consumo de substrato para crescimento celular;
- Eliminação do reciclo externo de células;
- Como o sistema pode operar com altas taxas de diluição sem grandes arrastes de células do reator, principalmente quando o método de imobilização é por envolvimento, permite alcançar elevadas produtividades;
- Permite trabalhar com alta densidade celular no fermentador, independentemente da taxa de diluição, resultando em aumento na produtividade, para uma mesma capacidade volumétrica do reator.

De acordo com Verbelen *et al.* (2006), o procedimento de imobilização de células em suportes pode ser realizado de quatro maneiras, descritas logo abaixo.

2.4.1 Adsorção

Pradella (2001) descreve esta técnica como a adesão de células em suportes que não foram especialmente preparados para a ocorrência de forças de interação célula-suporte. A Figura 2.8 exibe um esquema simplificado da adesão de células à superfície do suporte.

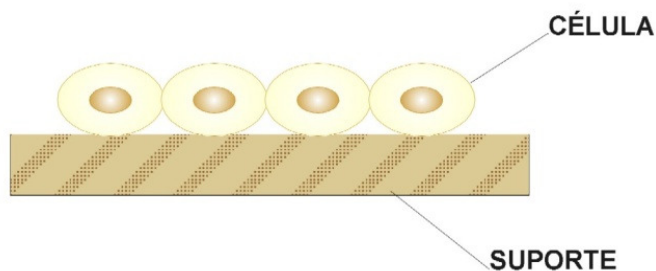


Figura 2.8 – Adsorção de células a uma superfície.

As forças de interação entre a superfície celular e a superfície do suporte são complexas e envolvem diversos tipos de ligações, destacando-se interações eletrostáticas entre cargas opostas de parede celular e superfície do suporte, ligações iônicas entre grupos amílicos e carboxílicos da parede celular e um grupo reativo da superfície do suporte e ligações covalentes parciais entre grupos amínicos da parede celular e grupo hidroxila ou silano (SiO^-) da superfície do suporte.

Verbelen *et al.* (2006) citam a ocorrência de adsorção pela simples retenção de células nas cavidades dos suportes bem como na floculação de células no interior dos mesmos. As Figuras 2.9 e 2.10 representam, esquematicamente, a retenção em determinado suporte, de células não floculadas e floculadas, respectivamente.

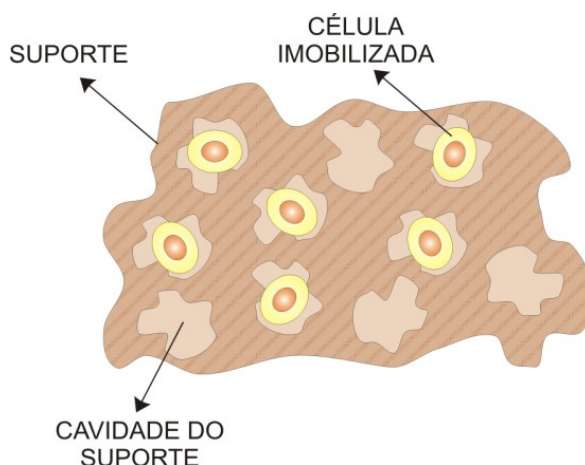


Figura 2.9 – Células immobilizadas nas cavidades do suporte.

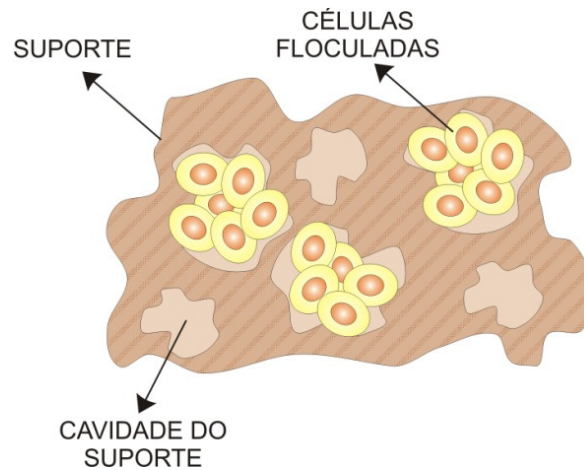


Figura 2.10 – Células floculadas no interior de um suporte.

Verbelen *et al.* (2006) citam uma variante deste método, que consiste no uso de agentes ligantes que induzem a imobilização, tais como óxidos metálicos, glutaraldeído ou aminosilanos. Contudo, para o uso na produção de bebidas e de etanol, a adsorção natural tem sido preferida.

Verbelen *et al.* (2006) também afirmam que no uso da técnica de adsorção natural a superfícies, é possível ocorrer o desprendimento celular por não haver barreiras físicas entre as células e a solução, havendo uma reposição de celular em seguida.

A principal limitação desta técnica é que as condições ambientais do meio de cultivo (concentração iônica, pH, etc.) influenciam acentuadamente a capacidade de retenção das células no suporte, bem como a idade da população celular (PRADELLA, 2001).

De acordo com Pradela (2001) os materiais mais utilizados como suportes em imobilização por adsorção são os materiais inorgânicos e os polímeros sintéticos. Contudo, a literatura cita materiais alternativos utilizados nesta técnica, como são os casos já citados do colmo de cana-de-açúcar (VASCONCELOS, 1998) e do sabugo de milho (SÁ, 2003). Pradella (2001) cita alguns suportes comerciais utilizados na técnica de adsorção (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Exemplos de suportes comerciais utilizados na técnica de adsorção.

Nome comercial	Material	Diâmetro (mm)	Densidade (g/mL)	Célula
Cytodex	Dextrana	0,20	1,04	Mamífero
Cytopore	Celulose	0,23	1,03	Mamífero Microrganismo
Cytoline	Polietileno e sílica	2,0 a 2,5	1,03 a 1,3	Mamífero Microrganismo
Siran	Vidro poroso	1,02 a 2,0	1,6	Microrganismo

2.4.2 Ligação covalente

Nesta técnica, segundo Pradella (2001), os suportes são tratados de modo a conterem um grupamento químico responsável pela imobilização da célula ao suporte. Um exemplo desta técnica é a silanização de esferas de vidro seguida de reação com glutaraldeído. Inicialmente as esferas de vidro são tratadas com APTS (γ -aminopropil-trietoxissilano). Após este tratamento, as esferas ficam com um grupamento amina ($-\text{NH}_2$), conforme diagrama simplificado da Figura 2.11.

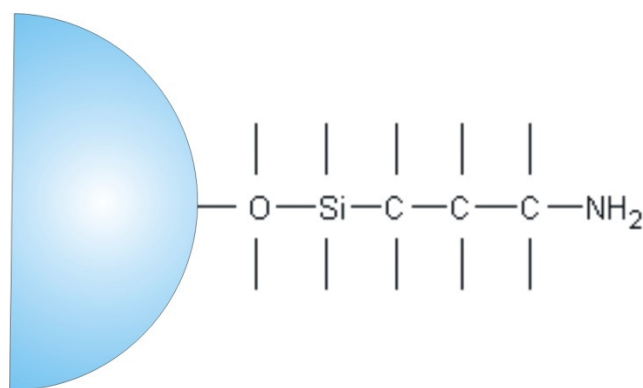


Figura 2.11 – Esfera de vidro (suporte) após tratamento com APTS (γ -aminopropil-trietoxissilano).

Em seguida, as esferas são tratadas com glutaraldeído, sendo adicionado ao grupo amina, uma estrutura com agrupamento carbonila ($-\text{HC}=\text{O}$), a qual deve formar uma ligação com aminas da membrana das células (Figura 2.12).

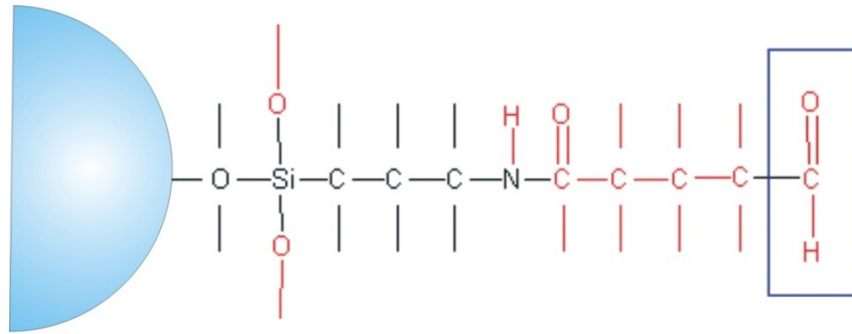


Figura 2.12 – Esfera de vidro (suporte) previamente tratada com APTS, seguida de tratamento com glutaraldeído. O grupo carbonila formado (-HC=O) deve formar ligação com aminas da membrana das células.

2.4.3 Envolvimento

É a técnica mais utilizada devido sua facilidade operacional, baixíssima toxidez e elevada capacidade de retenção celular (PRADELLA, 2001). Consiste no confinamento físico de células em uma matriz polimérica formadora de um gel hidrofílico, com poros menores que as células em seu interior. Neste método, ocorrem fluxos de substratos para dentro das partículas de gel, consumidos pelas células, e fluxos de produtos formados no interior da matriz difundindo-se para fora (Figura 2.13).

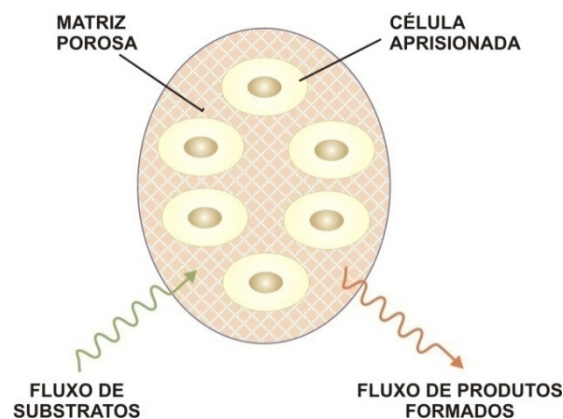


Figura 2.13 – Células immobilizadas em matriz polimérica porosa.

De acordo com Verbelen *et al.* (2006) esta técnica pode ser aplicada de duas maneiras. A primeira consiste em promover um fluxo de suspensão de células por uma matriz porosa já formada (esponja, vidro sinterizado, cerâmica, poliuretano, etc.). Após o crescimento celular, o movimento das células fica limitado, sendo assim efetivado o confinamento na matriz. A segunda maneira é sintetizar a matriz porosa ao redor das células. Para tal são utilizados polímeros naturais como agar, k-carragena, alginato e pectina.

Um exemplo da técnica de sintetizar a matriz ao redor das células é descrito por Pradella (2001). Consiste no preparo de uma solução aquosa de um dos polímeros naturais citados (1 a 4%) e suspender nesta solução as células. Em seguida a suspensão é gotejada em uma solução aquosa de CaCl_2 ou KCl 0,05 a 0,5M, sob agitação branda. Formam-se partículas com diâmetro que variam de 0,5 a 5mm e densidade populacional até cerca de 250mg de biomassa seca por grama de matriz. A Figura 2.14 ilustra todo o procedimento descrito.

A principal desvantagem desta técnica é a limitação devido à difusividade através da matriz polimérica, o que deve ser contornado pela otimização da difusividade da matriz e da concentração de células. Verbelen *et al.* (2006) alerta que a ocorrência da limitação citada acima, acrescida da instabilidade química e física do gel e da impossibilidade de regeneração, tem elevado o custo desta técnica.

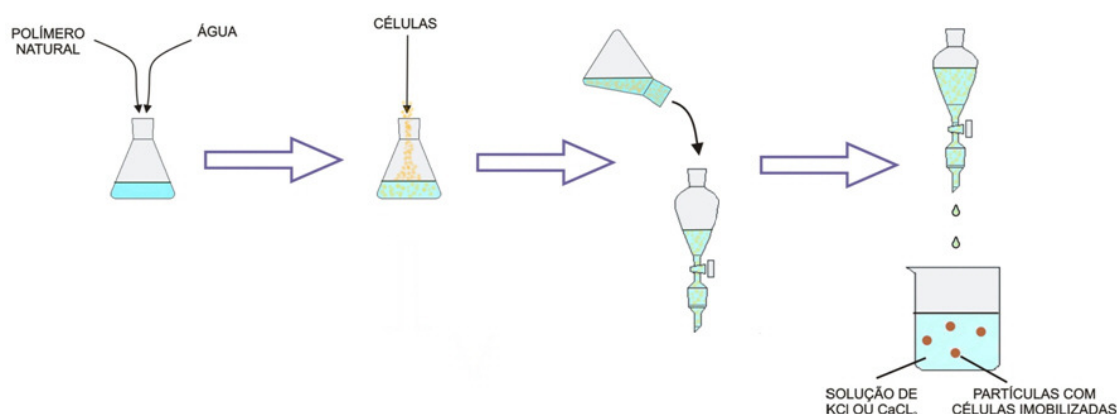


Figura 2.14 – Técnica de imobilização de células por envolvimento.

2.4.4 Contenção em uma barreira

De acordo com Verbelen *et al.* (2006), consiste na contenção de células em filtros de membrana microporosa ou em microcápsulas. Esta técnica mostra-se mais adequada quando o produto necessita estar totalmente isento de células. Contudo, o fato de impedir o desprendimento de células confere a esta técnica problemas como limitações de transferência de massa e possibilidade de rompimento do suporte causado por crescimento celular. O alto custo de membranas de alta performance contribui para relações custo-benefício desfavoráveis. A Figura 2.15 exibe um diagrama simplificado da técnica.

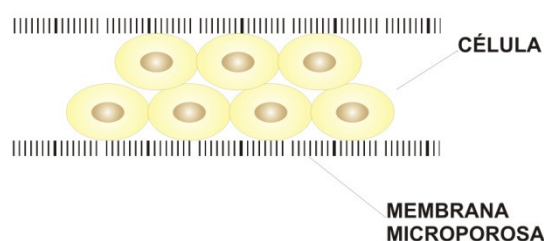


Figura 2.15 – Exemplo simplificado da técnica de contenção em uma barreira.

2.5 SUPORTES UTILIZADOS PARA A PRODUÇÃO DE ETANOL

Vasconcelos (1998) fez uso de colmos de cana-de-açúcar como suporte de células de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), sendo realizados ensaios com fermentação em batelada e com fermentação contínua. As células de levedura foram imobilizadas, pela técnica da adsorção, por imersão do suporte em suspensão de células com concentração de cerca de 2×10^8 leveduras/mL. O sistema colmo-levedura manteve atividade metabólica e rigidez por um período superior a uma safra sucroalcooleira. A eficiência de fermentação no processo contínuo, em torno de 85%, permaneceu constante até taxas de diluição da ordem de $0,83 \text{ h}^{-1}$. Com esta taxa de diluição foi constatada produtividade de $29,64 \text{ g etanol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, maior que a obtida industrialmente no Brasil.

Nigam *et al* (1998) fizeram uso de agar como suporte de imobilização para leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, os quais afirmam que o citado gel polímero, usado no preparo de meios de cultura, apresenta resistência satisfatória à degradação microbiana. A imobilização do microrganismo foi efetuada preparando-se uma suspensão de células em uma solução de agar 3% (p/v) e mantida a 45 – 48 °C sob agitação vigorosa. Partículas de 2 mm de diâmetro foram obtidas inserindo-se a suspensão de leveduras em agar, com auxílio de seringa, sobre óleo vegetal frio. Foi observada eficiência do processo fermentativo de aproximadamente 79% e produtividade de 44 g de etanol L⁻¹ h⁻¹. Após um período de 100 dias, houve declínio na produtividade devido a queda na viabilidade celular, restabelecida com injeções intermitentes de ar.

Sá (2003) fez uso de sabugo de milho para imobilização de leveduras e seu uso na fermentação alcoólica em batelada. Os sabugos utilizados foram cortados com cerca de 2 cm de comprimento e diâmetro de aproximadamente 2,90 cm. O processo de imobilização consistiu na imersão dos sabugos em suspensão de leveduras com concentração de 10⁹ células/mL por uma hora. Ao longo de 94 ciclos, a fermentação com leveduras imobilizadas em sabugo de milho apresentou eficiência de processo fermentativo de 71,35 ± 4,26%. Este valor, baixo em relação aos processos com células livres, foi explicado por Sá (2003) pelo comportamento decrescente da concentração celular nos sabugos ao longo dos últimos ciclos.

Pradella (2001) cita um processo contínuo de produção de etanol demonstrado em escala piloto pela Kyowa Kogyo Co. do Japão. Células foram imobilizadas pelo gotejamento de uma suspensão de leveduras em solução de alginato de sódio, dentro do primeiro reator do sistema, previamente preenchido com solução de cloreto de cálcio (técnica do envolvimento). O esquema deste processo fermentativo pode ser observado na Figura 2.16, onde se observa a alimentação contínua na base do primeiro reator, com mosto de melão, o qual apresentava concentração de 150g/L de carboidratos. A fluidização dos leitos foi alcançada devido à grande quantidade de CO₂ formado.

Figura 2.16 – Esquema da produção de etanol com leveduras imobilizadas em alginato de cálcio em regime contínuo.

A produtividade em etanol foi de $20\text{g L}^{-1}\text{ h}^{-1}$, com concentração de etanol no mosto fermentado de 68g/L e rendimento da fermentação de 95% do valor teórico. A produção da planta piloto foi de 12 m^3 de etanol por dia, durante seis meses, sem perda da estabilidade. Pradella (2001) afirmou que tanto o rendimento quanto a produtividade da citada planta piloto são superiores às do processo Melle-Boinot, respectivamente 86% e $6\text{g de etanol L}^{-1}\text{ h}^{-1}$.

Segundo Alegre *et al* (2003), a crisotila (mineral constituído de silicato de magnésio, bastante abundante no Brasil) pode ser usada como suporte mineral para células de levedura em fermentação alcoólica, devido a uma série de vantagens quando comparada a vários suportes citados na literatura: excelente estabilidade para uso em longos períodos, resistência a tratamentos térmicos, baixo custo e estimula a produção de etanol pela levedura, aumentando a produtividade específica do processo, sendo esta a principal vantagem. Foi constatada evolução de gás carbônico 27% maior em fermentações com crisotila do que em fermentações sem crisotila, sendo este o único parâmetro de comparação utilizado.

Peinado *et al.* (2005) desenvolveram uma técnica de imobilização que consiste na simbiose de uma levedura *Saccharomyces* (*Saccharomyces cerevisiae* var. *capensis* G1) e um fungo filamentosos (*Penicillium*). Esta simbiose leva à formação de pequenas cápsulas,

as quais os autores chamaram de biocápsulas de leveduras (Figura 2.17). O sistema consiste de cápsulas ocas, com diâmetros que variam de poucos milímetros a alguns centímetros, a depender das condições como são produzidas. Também são macias, elásticas e muito estáveis mesmo em situações drásticas. Para sua formação, não há adição de nenhum agente químico ligante nem de nenhum tipo de suporte inerte. Foi preparado um meio com uma fonte de carbono, ácido glucônico, que só pode ser usado pelo fungo filamentososo *Penicillium*. O meio também é tamponado para pH 7, esterilizado e adicionado leveduras com uma concentração da ordem de 10^6 células/mL. Em seguida o meio foi inoculado com uma ponta de espátula contaminada com esporos de *Penicillium*. O sistema é termostaticado a 28 ± 1 °C e agitado a 150 rpm por sete dias. Desta forma, ocorre imobilização espontânea e as biocápsulas são produzidas. O tempo e a intensidade da agitação é que determinam o diâmetro das biocápsulas. O referido trabalho comparou o sistema estudado com leveduras imobilizadas com outro sistema similar com células livres. O sistema imobilizado foi capaz de fermentar mostos com concentração em melão de 20 e 40% (m/v), não havendo fermentação significativa no sistema com células livres com o mesmo mosto de 40% em melão. Eficiências e rendimentos em etanol não foram avaliados.



Figura 2.17 – Biocápsulas de leveduras. A porção superior da figura exhibe uma biocápsula à direita de uma moeda (diâmetro aproximado de 2 cm). A porção inferior da figura exhibe uma biocápsula aberta, evidenciando sua estrutura oca.

3 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Diversos trabalhos encontrados na literatura descrevem tentativas de melhoria da produção de etanol no Brasil. São vários os materiais testados, podendo-se citar: mineral kissiris (NIGAM *et al.*, 1997), colmos de cana-de-açúcar (VASCONCELOS, 1998), agar (NIGAM *et al.*, 1998), celulose (FUJII *et al.*, 2001), alginato de cálcio (PRADELLA, 2001), sabugo de milho (SÁ, 2003), crisotila (ALEGRE *et al.*, 2003), biocápsulas de leveduras (PEINADO *et al.*, 2005).

Sá (2003) cita que a busca por melhorias da produção de etanol através de técnicas de imobilização refere-se às suas vantagens, bastante significativas, frente aos processos convencionais em uso atualmente no Brasil (maior concentração celular nos reatores, eliminação da etapa de recuperação de inóculo, maiores produtividades e rendimentos, etc.). Porém, de acordo com Verbellen *et al.* (2006), há ainda fatores técnicos e econômicos que inibem a plena implantação de processos com células imobilizadas em nível industrial (grande quantidade de suporte por reator, o que implica em dificuldade operacional para fracionar os suportes nas dimensões necessárias, dificuldades de manuseio e transporte, custo elevado das citadas operações, etc). Isto sugere a necessidade de um maior número e diversidade de estudos que contribuam para a eliminação dos citados impedimentos técnico/econômicos.

A fibra de coco é abundante na região nordeste do Brasil e apresenta baixo custo, requisitos básicos para utilização de um material como suporte para imobilização de células. Sendo a fibra de coco um resíduo de indústrias de beneficiamento ou da utilização direta do coco para outros fins, seu uso como suporte de imobilização de células constituiria uma importante alternativa para redução de seu potencial poluidor.

Já as diversas variedades de bambu constituem um recurso natural renovável, principalmente devido a seu altíssimo rendimento em peso por hectare, aproximadamente 25 vezes maior que o da madeira. Sua utilização em processos industriais aliada à exploração e cultivo ecologicamente corretos, não representaria nenhum dano ao meio-ambiente, principalmente se as próprias unidades produtoras de etanol combustível cultivassem a variedade de bambu para consumo próprio como suporte de imobilização.

Em razão das inúmeras vantagens dos processos com células imobilizadas e da necessidade de otimização dos mesmos para utilização em nível industrial, o estudo comparativo entre diversos potenciais suportes, justificam a realização deste trabalho. A eliminação de fatores que dificultam a utilização em escala industrial de sistemas com células imobilizadas poderia contribuir para a redução do custo de produção do etanol.

O objetivo geral do presente trabalho foi estudar a aplicabilidade do processo de fermentação alcoólica conduzido em batelada com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em duas variedades de bambu, *Phyllostachys caniço* e *Guadua angustifolia*, e em fibra de coco anão, *Cocus nucifera*, em substituição ao processo convencional conduzido com células livres. Os objetivos específicos são:

- Avaliar a capacidade de imobilização das células de levedura nos três suportes citados, através dos resultados de eficiências de processo e quantificação de células de leveduras livres nos meios fermentados de cada sistema leveduras-suporte;
- Avaliar o desempenho das fermentações alcoólicas promovidas pelos três sistemas leveduras-suporte no decorrer de diversos ciclos de fermentação consecutivos, de 24 horas cada, através das determinações de eficiência de processo, eficiência da fermentação e rendimento em etanol (determinações efetuadas ao término de cada ciclo);
- Avaliar a estabilidade física dos três sistemas leveduras-suporte, durante um longo período, observando visualmente possível alteração da rigidez de cada suporte ao término de cada ciclo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Microrganismo utilizado

Foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* sob a forma de fermento seco, produzido pela Fleischmann, na concentração de 77g fermento seco / L água.

4.1.2 Melaço

Para o preparo do mosto foi utilizado melaço cedido pela Usina Caeté S/A – Unidade Cachoeira, com Brix de $85,16 \pm 0,83\text{g}/100\text{ g}$ e $56,58 \pm 0,33\text{ g}$ de ART/100g.

4.1.3 Suportes para imobilização

Foram utilizados como suportes os seguintes materiais:

Duas variedades de bambu, denominadas *Phyllostachys caniço* e *Guadua angustifolia*, designados neste trabalho como caniço e guadua, respectivamente. As referidas variedades foram fornecidas pelo Instituto do Bambu, da Universidade Federal de Alagoas, nas seguintes dimensões: *Guadua angustifolia* (Figura 4.1, “A”) com 1,5 cm x 1,5 cm x 2,0 cm e *Phyllostachys caniço* (Figura 4.1, “B”) com 1,5 cm x 2,0 cm.

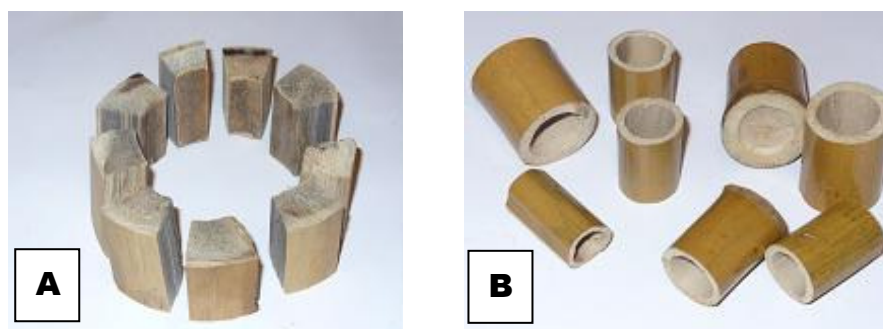


Figura 4.1 – Variedades de bambu utilizadas para imobilização de *Saccaromyces cerevisiae*: (A) *Guadua angustifolia*, (B) *Phyllostachys caniço*.

- Fibra de coco anão (*Cocos nucifera*), designada neste trabalho como *coco*, fatiada no sentido longitudinal. Estas fatias foram fracionadas em três partes de cerca de 4 cm de comprimento (Figura 4.2).



Figura 4.2 – Fibra de coco anão (*Cocos nucifera*) fatiada para imobilização de *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2 Caracterização dos suportes

4.2.1 Umidade dos suportes

A umidade dos suportes foi determinada por gravimetria, pesando-se cerca de 5 g de cada amostra, devidamente fracionada nas menores partículas possíveis, e levando-se a estufa a 105°C por períodos de uma hora, até peso constante. Este parâmetro foi calculado pela equação:

$$\text{Umidade (\%)} = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

- m_1 : massa do suporte antes da secagem em estufa;
- m_2 : massa do suporte após secagem em estufa até peso constante.

4.2.2 Porosidade, absorção de umidade e densidade dos leitos confeccionados com os suportes

A porosidade, absorção de umidade e densidade dos leitos foram determinadas seguindo-se as etapas abaixo:

- Foram selecionados baldes idênticos de 9 litros para cada suporte, os quais foram utilizados como reatores em todos os ciclos de fermentação.
- A massa de cada reator vazio, nomeada de M, foi determinada em balança de precisão, com uma casa decimal;
- Foi medido 2 litros de água potável em balão volumétrico, o qual foi vertido em cada reator. Foi feita uma marcação em cada reator correspondente ao volume de água adicionado;
- Foi inserido em cada reator uma quantidade do referido suporte até a marca de 2 litros. Cada sistema foi pesado em balança de precisão para posterior determinação da massa do suporte utilizado, por diferença com relação à massa do reator vazio. Esta massa (reator + suporte) foi nomeada de M_s (Figura 4.3);



Figura 4.3 – Reatores com os suportes utilizados nos experimentos (A: *coco*, B: *caniço*, C: *guadua*).

- Dentro de cada reator foi inserido um disco de plástico perfurado (Figura 4.4);



Figura 4.4 – Vista superior de reator contendo suporte com um disco de plástico perfurado.

- Visto que os três suportes são menos densos que a água, um bastão de vidro foi utilizado para manter os leitos submersos quando fosse adicionada água a cada reator. Cada reator com seu respectivo suporte, disco e bastão de vidro foi pesado em balança de precisão. Esta massa foi nomeada de M_{SDB} ;

- Com auxílio de proveta de 2 litros foi adicionada água até que o disco plástico perfurado ficasse totalmente submerso. O suporte foi mantido submerso com auxílio do bastão de vidro. O volume de água utilizado observado na proveta foi nomeado de $V_{\text{ÁGUA}}$. Cada reator nesta etapa foi pesado em balança de precisão e a massa determinada foi nomeada de M_{SDBA} . Após a drenagem da água realizada por inversão do reator, a porosidade dos leitos foi calculada pela relação:

$$\text{Porosidade\%} = \frac{V_{\text{ÁGUA}}}{2000} \times 100 \quad (2)$$

Onde:

- Porosidade%: porosidade do leite;
- $V_{\text{ÁGUA}}$: volume de água adicionado em mL, suficiente para submergir o leite;
- 2000: volume de trabalho de cada reator.

• Cada reator foi drenado e cada leite úmido foi pesado em balança de precisão. Esta massa foi nomeada de M_{SU} . A absorção de umidade e a densidade dos leitos foram calculadas pelas equações:

$$\text{Absorção (\%)} = \frac{(M_{\text{SDBA}} - M_{\text{SDB}}) - M_{\text{SU}}}{M_{\text{S}} - M} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

- Absorção (%): absorção de umidade pelo leite;
- $(M_{\text{SDBA}} - M_{\text{SDB}})$: massa do reator com suporte, disco de plástico, bastão de vidro e água (M_{SDBA}) subtraída da massa do reator com suporte, disco de plástico, bastão de vidro (M_{SDB}). Refere-se, portanto, à massa de água adicionada;
- M_{SU} : massa de suporte úmido, após a drenagem da água;
- M : massa do reator vazio.

$$\text{Densidade (g/cm}^3\text{)} = \frac{M_{\text{S}} - M}{2000 - V_{\text{ÁGUA}}} \times 100 \quad (4)$$

Onde:

- $M_{\text{S}} - M$: massa do reator com o suporte (M_{S}) subtraído da massa do reator vazio (M). Isto corresponde à massa de suporte seco;

- “ $2000 - V_{\text{ÁGUA}}$ ” corresponde ao volume em cm^3 ocupado pelo leito.

4.3 Técnica de imobilização

O processo de imobilização foi o de adsorção, realizado por imersão dos materiais usados como suporte em suspensão concentrada de leveduras, contendo cerca de $1,588 \times 10^9$ células vivas/mL (equivalente a 77 g de fermento seco / L), valor próximo ao já utilizado com êxito por Vasconcelos (1998) para imobilização em colmos de cana-de-açúcar e por Sá (2003) para imobilização em sabugos de milho.

Os suportes fracionados nas dimensões já citadas foram inseridos nos reatores (descritos no item 4.2.2), até o volume de 2 litros. Em seguida foi adicionada a suspensão de células em cada reator em quantidade suficiente para deixar todos os suportes totalmente imersos. Uma garrafa de vidro sobre um disco plástico perfurado foi utilizada em cada reator, para manter os suportes imersos na suspensão de células (Figura 4.5). Os três sistemas permaneceram em repouso por uma hora (tempo de imobilização) da mesma forma como foi citado por Sá (2003). Ao término deste tempo, a suspensão de células foi drenada retendo-se manualmente os suportes com auxílio do disco plástico perfurado e vertendo-se o líquido de cada reator. Após a drenagem, foi adicionado mosto de melão a cada reator, iniciando-se os ciclos de fermentação (Figura 4.6).



Figura 4.5 – Reator utilizado nos experimentos, com disco plástico perfurado e frasco de vidro para manutenção dos suportes submersos.

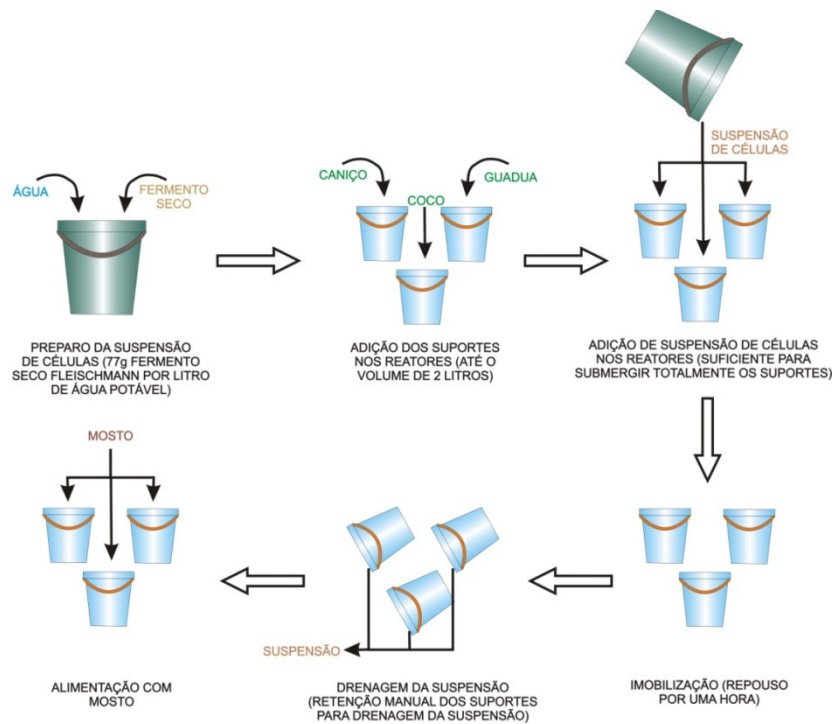


Figura 4.6 – Fluxograma representativo do processo de imobilização de células nos suportes.

4.4 Fermentação

O mosto foi preparado por diluição do melão em água potável. O pH foi corrigido com ácido sulfúrico comercial em todos os ciclos de fermentação para $4,26 \pm 0,06$, para controle da infecção bacteriana. Vasconcelos (1998) e Sá (2003) também efetuaram o mesmo controle com valores de pH próximos ao citado. Para auxiliar o controle da infecção bacteriana foi adicionado ao mosto, em todos os ciclos de fermentação, 3 ppm de BIOTRAN VIRG da PRATENSE QUÍMICA, um bactericida com espectro limitado a bactérias gram-positivas.

O mosto também foi adicionado de 10 ppm de PRATENSE FÓS M GRANULADO da PRATENSE QUÍMICA em todos os ciclos de fermentação, um suplemento à base de fósforo (21% de P_2O_5), nitrogênio amoniacal (23% de NH_3) e íons de magnésio e zinco.

O volume de mosto utilizado em cada reator, em todos os ciclos, foi de 1.600 mL. Este valor refere-se ao maior volume de água utilizado nos experimentos para determinação

da porosidade dos leitos. Esta medida serviu de padronização para a quantidade efetiva de açúcares para todos os suportes. A cada ciclo de fermentação, o mesmo mosto preparado foi utilizado nos três sistemas leveduras-suporte.

A duração dos ciclos de fermentação foi fixada em 24 horas. Foi adotado este valor, dado o grande volume de análises e ciclos de fermentação necessários para a condução deste trabalho.

Inicialmente foi avaliada qual seria a melhor concentração de açúcares a ser utilizada em todos os ciclos de fermentação. Os seguintes valores de Brix do mosto foram utilizados na referida avaliação: $(10,22 \pm 0,10)$ g/100g, $(11,98 \pm 0,10)$ g/100g, $(14,91 \pm 0,12)$ g/100g, $(18,08 \pm 0,29)$ g/100g e $(20,14 \pm 0,12)$ g/100g. Os ciclos foram iniciados com Brix de $(10,22 \pm 0,10)$ g/100g. Ao final de cada ciclo foram calculadas as eficiências do processo fermentativo dos três sistemas levedura-suporte. Não foi avaliada a cinética das fermentações dos sistemas leveduras-suporte.

A cada 4 – 9 ciclos de fermentação, elevou-se o Brix do mosto para o valor imediatamente superior até ser observada queda na eficiência do processo fermentativo. A escolha entre 4 – 9 ciclos de fermentação para cada Brix de mosto ficou condicionada ao tempo que a Usina Caeté – Unidade Marituba (Penedo/AL) levava para informar os resultados de teor alcoólico dos meios fermentados após cada ciclo de fermentação. Sem os valores de teor alcoólico seria impossível o cálculo da eficiência do processo fermentativo (item 4.6.1) dos sistemas leveduras-suporte para cada valor de Brix. A Tabela 4.1 exibe para cada concentração de açúcares, o correspondente número de ciclos de fermentação utilizado.

Tabela 4.1 – Brix e ART médios do mosto e o número correspondente de ciclos de fermentação utilizados para avaliar a melhor concentração de açúcares para realização dos experimentos.

Ciclos	Total de ciclos	Brix (g/100g)	ART (g/100mL)
1 a 9	9	$10,22 \pm 0,10$	$6,79 \pm 0,41$
10 a 13	4	$11,98 \pm 0,10$	$8,17 \pm 0,35$
14 a 17	4	$14,91 \pm 0,12$	$10,92 \pm 0,10$
18 a 22	5	$18,08 \pm 0,29$	$13,28 \pm 0,51$
23 a 27	5	$20,14 \pm 0,12$	$15,40 \pm 0,08$

Para o controle físico-químico das fermentações, foram determinados os seguintes parâmetros ao final de cada ciclo fermentativo: Brix, pH, acidez sulfúrica, ART e AR no mosto e nos meios fermentados. Apenas o teor de AR não foi determinado no mosto.

Para o controle microbiológico foram determinadas, ao final de cada ciclo fermentativo, as concentrações de células vivas, mortas e brotos nos meios fermentados, bem como a viabilidade celular e o percentual de brotamento (item 4.5.5). Ao término de todos os ciclos de fermentação, os mesmos parâmetros foram determinados nos três suportes utilizados.

4.5 Determinações quantitativas

Todas as determinações quantitativas foram realizadas em triplicata. Segue abaixo a descrição das referidas determinações.

4.5.1 Brix

Consiste na determinação da concentração dos sólidos dissolvidos, expressos em g/100g, de determinada solução. Este parâmetro foi determinado através de refratômetro de campo, conforme metodologia descrita por Caldas (1998). A determinação do Brix é a maneira mais rápida de verificar indiretamente a concentração de açúcares do mosto durante seu preparo.

4.5.2 Açúcares Redutores Totais (ART)

Refere-se aos açúcares capazes de reduzir o cobre ($\text{Cu}^{2+} + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu}^+$). Contempla-se principalmente, no caso da cana-de-açúcar e do melaço, a glicose e frutose, somados à sacarose presente no meio, que, após hidrólise, se transforma em glicose e frutose. O método utilizado foi o de Enyon-Lane (CALDAS, 1998), que consiste na titulação em ebulição da amostra a ser analisada, previamente hidrolisada com ácido clorídrico 1:1 a 65°C por 12 minutos. A titulação foi efetuada em equipamento apropriado (REDUTEC,

marca TECNAL, modelo TE-088). A equação seguinte foi utilizada para o cálculo do ART das amostras:

$$\text{ART} = \frac{5D}{Vg} \quad (5)$$

Onde:

- ART: gramas de açúcares redutores totais por 100 mL de amostra;
- D: diluição da amostra;
- Vg: volume gasto da solução de amostra.

4.5.3 Acidez sulfúrica

Trata-se da determinação da concentração das substâncias ácidas das amostras (expressa em g de H₂SO₄/L) por neutralização com NaOH 0,01M, previamente padronizada, de acordo com a metodologia descrita por Caldas (1998), tendo como indicador fenolftaleína 1%. Este parâmetro foi utilizado como medida indireta do nível de contaminação bacteriana dos meios em fermentação, visto que o aumento da contaminação bacteriana elevaria o teor de substâncias ácidas dos meios. A equação seguinte foi utilizada para cálculo da acidez sulfúrica:

$$\text{Acidez sulfúrica} = 0,01 \times 49 \times F \times Vg \quad (6)$$

Onde:

- Acidez sulfúrica: acidez sulfúrica em g de H₂SO₄ por litro de amostra;
- 0,01: molaridade da solução de NaOH;
- 49: equivalente-grama do ácido sulfúrico;

- F: fator de correção da solução de NaOH 0,01M;
- Vg: volume gasto da solução de NaOH 0,01M.

4.5.4 Teor alcoólico

Foi utilizado o método densimétrico (densímetro digital ANTON-PAAR), conforme descrito por Sá (2003): 25 mL de cada meio fermentado adicionados de 25 mL de água destilada foram destiladas em microdestilador de álcool TECNAL modelo TE-012. Após serem coletados 50mL de destilado, os mesmos foram acondicionados em frasco de vidro com tampa, prontamente congelados e enviados para análise em densímetro digital ANTON-PAAR na Usina Caeté S/A - Unidade Marituba. A equação seguinte foi utilizada para cálculo do teor alcoólico das amostras:

$$\text{EtOH} = 0,7936 \times L \times 2 \quad (7)$$

Onde:

- EtOH: teor alcoólico em gramas de etanol por mL de amostra;
- 0,7936: densidade do etanol em g/mL a 15°C;
- L: leitura da amostra no densímetro ANTON-PAAR em °GL (v/v a 15°C);
- 2: fator de diluição das amostras.

4.5.5 Contagem de células vivas, mortas e brotos, percentual de brotamento e viabilidade celular

Foi utilizada câmara de Neubauer conforme metodologia descrita por Vasconcelos (2000) para contagem das células no mosto e nos meios fermentados (células vivas/mL, células mortas/mL, células totais/mL, percentual de brotamento e percentual de viabilidade celular). A contagem foi realizada em 16 campos (Figura 4.7), utilizando-se solução de azul

de metileno 0,01%, nas amostras para determinação das células vivas e mortas (estas últimas, coradas pelo azul de metileno).

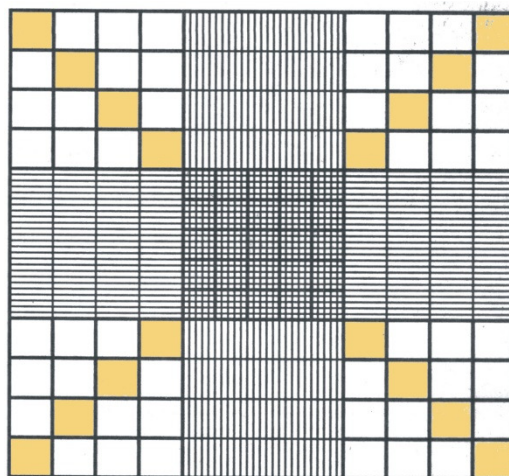


Figura 4.7 – Câmara de Neubauer visualizada ao microscópio óptico. Os campos em laranja sinalizam a configuração utilizada para contagem de células de leveduras em todas as determinações: 16 campos ao total, sempre na direção diagonal.

Diluições de 20, 100/3 e 50 foram utilizadas nos meios fermentados, devido às variações observadas nas concentrações de células livres. A equação seguinte foi utilizada para cálculo dos parâmetros:

$$\text{Células/mL} = D \times n \times 10^4 \quad (8)$$

Onde:

- D: fator de diluição da amostra;
- n: total de células (vivas ou mortas ou brotos) nos 16 campos da câmara de Neubauer.

Também foi utilizada a mesma metodologia nos suportes, apenas ao final do último ciclo, para quantificação de células vivas/g, células mortas/g, percentual de brotamento e percentual de viabilidade celular nos leitos dos sistemas leveduras-suporte. A trituração dos suportes foi realizada de acordo com o procedimento desenvolvido em laboratório:

- 50g de cada suporte foi pesado com precisão de quatro casas decimais em becker de plástico de 250mL e transferido para o copo de liquidificador industrial limpo e seco (m_S);
- No mesmo becker foi colocado cerca de 150 mL de água destilada. O conjunto (becker + água) foi pesado em balança analítica (m_{A1});
- O conteúdo foi transferido para o copo do liquidificador. A massa do frasco vazio foi anotada (m_{A2});
- O liquidificador foi acionado por dois minutos;
- Com um bastão, os pedaços de suporte da tampa e do copo foram raspados para o fundo do copo do liquidificador. Ao final, o bastão foi reservado dentro do becker de plástico de 250mL;
- O liquidificador foi acionado por mais dois minutos;
- Cerca de 150mL de água destilada (a qual foi utilizada para lavar o bastão) foi pesado em balança analítica no becker de plástico de 250mL, anotando-se peso do conjunto becker + água (m_{A3});
- Com a água, os pedaços de suporte das paredes da tampa do copo foram lavados para o fundo do mesmo. O becker vazio foi pesado e anotado o peso (m_{A4}).
- O liquidificador foi acionado por mais dois minutos;
- A mistura foi homogeneizada e transferida para becker de 600mL com o máximo de suporte triturado;
- Homogeneizando sempre o conteúdo do becker, foram pesados 10g da mistura com precisão de quatro casas decimais. O peso foi anotado (m_{ST});
- A alíquota foi transferida quantitativamente para balão de 100mL e completado o volume;

- Após homogeneização, o conteúdo do balão foi filtrado em tela metálica fina para becker de 100mL;
- A partir desta diluição foi dado prosseguimento do preparo da amostra conforme metodologia descrita anteriormente. A equação seguinte foi utilizada para cálculo das concentrações de células:

$$\text{Células/g} = 2000 \times n \times \frac{100}{m_{ST}} \times \frac{m_{A1} + m_{A2} + m_{A3} + m_{A4} + m_S}{m_S} \quad (9)$$

Onde:

- Células/g: total de células por grama de suporte;
- n: total de células (vivas ou mortas ou brotos) nos 16 campos da câmara de Neubauer;
- m_{A1} : massa do sistema 150mL de água + becker (primeira adição de água);
- m_{A2} : massa do becker anterior vazio;
- m_{A3} : massa do sistema 150mL de água + becker (segunda adição de água adicionada);
- m_{A4} : massa do becker anterior vazio;
- m_{ST} : massa da suspensão de suporte triturado;
- m_S : massa de suporte utilizada.

O brotamento (percentual de brotos de células de leveduras) e a viabilidade celular (percentual de células de leveduras vivas) foram calculados fazendo-se uso das equações:

$$\text{Brotamento (\%)} = \frac{b}{n} \times 100 \quad (10)$$

Onde:

- Brotamento (%): percentual de brotos de células de levedura;
- b: número de brotos contados nos 16 campos da câmara de Neubauer;
- n: número total de células de levedura contados nos 16 campos da câmara de Neubauer.

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{v}{n} \times 100 \quad (11)$$

Onde:

- Viabilidade (%): percentual de células vivas de leveduras;
- v: número de células de leveduras vivas nos 16 campos da câmara de Neubauer;
- n: número total de células de levedura contados nos 16 campos da câmara de Neubauer.

4.6 Parâmetros de fermentação

4.6.1 Eficiência do processo fermentativo (η_P)

Compreende o percentual de etanol produzido com relação à quantidade de ART disponível no mosto. A equação seguinte foi utilizada para o cálculo deste parâmetro:

$$\eta_P = \frac{\text{EtOH}}{(\text{ART}_{\text{MOSTO}} \times 0,511)} \times 100 \quad (12)$$

Onde:

- η_P : eficiência do processo fermentativo, em %;
- EtOH: teor alcoólico do meio fermentado;
- ART_{MOSTO} : ART em g / 100 mL do mosto;
- 0,511: fator estequiométrico para conversão de ART em etanol.

É válido lembrar que para o cálculo deste parâmetro não é considerado o teor de açúcares redutores totais do meio fermentado, que se refere aos açúcares que não foram metabolizados pelas leveduras.

4.6.2 Eficiência da fermentação (η_B)

Refere-se ao percentual de etanol produzido com relação à quantidade de ART efetivamente consumido. O teor de ART efetivamente consumido é obtido pela diferença entre o teor de ART do mosto e o teor de ART do meio fermentado. A equação seguinte foi utilizada para o cálculo deste parâmetro:

$$\eta_B = \frac{EtOH}{(ART_{MOSTO} - ART_{VINHO}) \times 0,511} \times 100 \quad (13)$$

Onde:

- η_B : eficiência da fermentação, em %;
- EtOH: teor alcoólico do meio fermentado, em g/100mL;
- ART_{MOSTO} : ART em g / 100mL do mosto;

- ART_{VINHO} : ART em g / 100mL do meio fermentado;
- 0,511: fator estequiométrico para conversão de ART em etanol.

Como é levada em consideração a quantidade de açúcares não consumida, observa-se pela equação acima que este parâmetro é maior que a eficiência do processo.

4.6.3 *Rendimento em produção de etanol ($Y_{P/S}$)*

É o rendimento da produção de etanol com relação à quantidade de ART consumida. Para um processo com 100% de rendimento, $Y_{P/S}$ seria 0,511 g de etanol/ g de ART consumido, que corresponde ao fator estequiométrico de conversão de glicose em etanol. A equação seguinte foi utilizada para o cálculo deste parâmetro:

$$Y_{P/S} = \frac{EtOH}{ART_{MOSTO} - ART_{VINHO}} \quad (14)$$

Onde:

- $Y_{P/S}$: rendimento em produção de etanol, em grama de etanol / grama de ART consumidos;
- EtOH: teor alcoólico do meio fermentado, em g/100mL;
- ART_{MOSTO} : teor de ART do mosto, em gramas de ART / 100mL;
- ART_{VINHO} : teor de ART do meio fermentado, em gramas de ART / 100mL.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Microrganismo utilizado

Foram determinados alguns parâmetros para caracterização da qualidade microbiológica do fermento, os quais estão listados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Características microbiológicas do fermento seco utilizado nos experimentos.

Parâmetro	Valor
Células vivas (células / mL)	$2,062 \times 10^{10}$
Células mortas (células / mL)	$0,836 \times 10^{10}$
Brotos (células / mL)	$0,035 \times 10^{10}$
Células totais (células / mL)	$2,933 \times 10^{10}$

5.2 Mosto

Inicialmente foi determinada a melhor concentração de açúcares do mosto para realização dos ensaios, aumentando-se o Brix a cada 4 – 9 ciclos de fermentação, conforme já descrito no item 4.4. Foi observada queda na eficiência do processo fermentativo nos sistemas leveduras-suporte com mosto de $15,40 \pm 0,08$ g de ART/100mL (equivalente a Brix de $20,14 \pm 0,12$ g / 100 g) entre os ciclos de fermentação 23 e 27. A concentração imediatamente anterior ao valor observado na queda da eficiência foi utilizada a partir do 28º ciclo de fermentação (Brix médio de 18 g / 100 g). A Figura 5.1 exibe as médias dos resultados de eficiência do processo fermentativo para os três sistemas leveduras-suporte (calculadas ao término de cada ciclo de fermentação) com relação ao Brix do mosto. A Tabela 5.2 exibe os mesmos dados acrescidos dos valores referentes aos ciclos após a definição do Brix (ciclos de número 28 a 91).

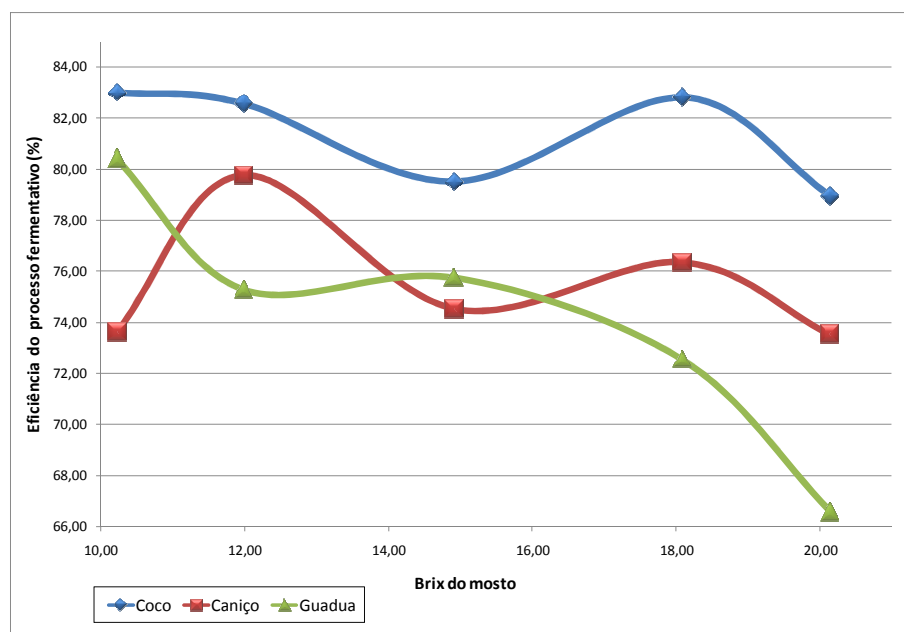


Figura 5.1 – Eficiências dos processos fermentativos (médias) com células imobilizadas em fibra de coco e bambus (caniço e guadua) a vários valores de Brix do mosto.

Tabela 5.2 - Brix e ART do mosto e os respectivos valores de eficiência do processo fermentativo (η_P) durante a determinação do Brix do mosto mais adequado. Os valores da última linha (ciclos 28 - 91) referem-se aos ciclos de fermentação após a definição do Brix mais adequado.

Ciclos	Brix do mosto (g/100g)	ART do mosto (g/100mL)	η_P (%)		
			Leveduras-Coco	Leveduras-Caniço	Leveduras-Guadua
1-9	10,22 ± 0,10	6,79 ± 0,04	84,39 ± 6,32	74,36 ± 9,53	81,13 ± 7,59
10-13	11,98 ± 0,10	8,17 ± 0,35	82,57 ± 4,03	79,77 ± 8,13	75,28 ± 6,04
14-17	14,91 ± 0,12	10,92 ± 0,1	79,51 ± 2,17	74,52 ± 9,5	75,75 ± 2,85
18-22	18,08 ± 0,29	13,28 ± 0,51	82,81 ± 4,54	76,34 ± 5,14	72,55 ± 6,36
23-27	20,14 ± 0,12	15,40 ± 0,08	78,94 ± 1,45	73,52 ± 0,48	66,56 ± 0,48
28-91	18,17 ± 0,11	13,31 ± 0,27	82,30 ± 1,85	81,41 ± 2,90	77,67 ± 3,67

Na Tabela 5.2 pode-se observar melhores resultados de eficiência do processo do sistema leveduras-caniço com Brix de mosto de (11,98 ± 0,1)g/100g e do sistema leveduras-guadua com Brix de (10,22 ± 0,10)g/100g. Estes valores de Brix são inadequados para uso industrial por serem muito baixos, que resulta em baixas concentrações de etanol no meio fermentado. Na indústria é preferível concentrações maiores de açúcares, que resulta em concentrações de etanol mais elevadas nos meios fermentados e, por conseguinte, maior economia de vapor na destilação e menor custo de produção (COPERSUCAR, 1987).

Observa-se ainda na Figura 5.1 que no sistema leveduras-guadua houve queda na eficiência de processo ao se utilizar mosto com $18,08 \pm 0,29$ °Brix, comportamento oposto aos dos outros sistemas. Isto ocorreu, provavelmente, pela baixa capacidade de imobilização inicial do sistema leveduras-guadua, com aumento gradativo do número de células imobilizadas ao longo dos ciclos de fermentação (item 5.4). Isto pode ser observado na Figura 5.6 (também no item 5.4) onde, nos ciclos finais, o desempenho dos três suportes é semelhante.

A definição da concentração mais adequada de açúcares no mosto foi feita através do Brix. Justifica-se a utilização da determinação do Brix do mosto por dois motivos: rápida determinação em relação à de ART e à forte correlação entre ART e Brix, observada na Figura 5.2.

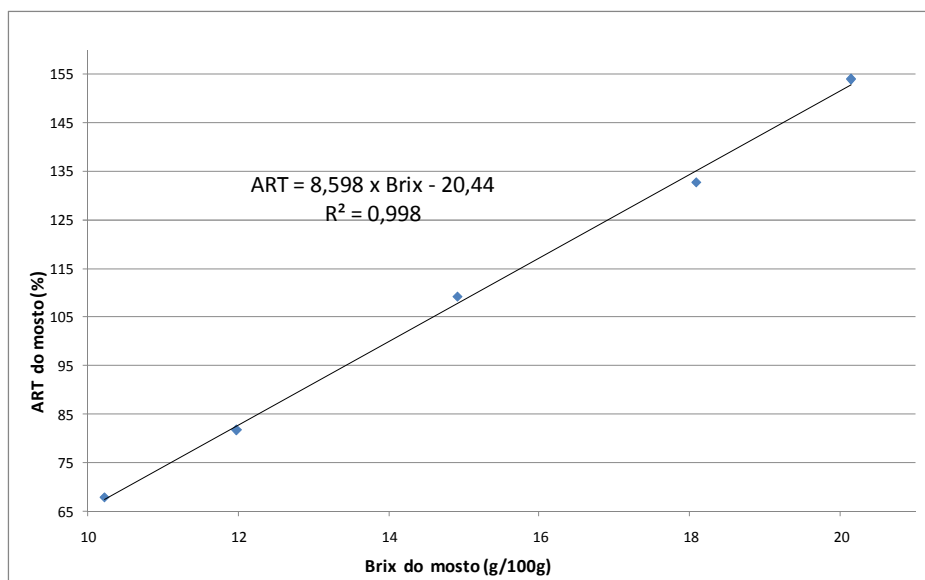


Figura 5.2 – Correlação entre ART e Brix do mosto. Foram utilizados os dados da Tabela 5.2.

5.3 Suportes

Algumas características dos leitos confeccionados com os citados suportes foram determinadas em laboratório, as quais estão dispostas na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Umidade (UMD), porosidade (PRS), absorção de umidade (ABU) e densidade (DENS) dos leitos confeccionados com os suportes

Leito	UMD (%)	PRS (%)	ABU (g água / g suporte)	DENS (g/cm ³)
<i>Cocos nucifera</i>	10,92 ± 0,19	67,93 ± 1,45	121,5 ± 2,59	0,1864 ± 0,0040
<i>Phyllostachys caniço</i>	10,79 ± 0,09	71,43 ± 1,77	11,6 ± 0,29	0,5821 ± 0,01
<i>Guadua angustifolia</i>	9,77 ± 0,10	54,79 ± 0,75	7,5 ± 0,10	0,7041 ± 0,0096

Pode-se observar na Tabela 5.3 que os leitos confeccionados com *coco* e *caniço* apresentaram porosidades próximas, muito diferentes da porosidade do leito confeccionado com *guadua*. Por outro lado, o leito confeccionado com *coco* apresentou absorção de umidade elevada, comparada com os outros suportes.

A Figura 5.3 exibe as concentrações de leveduras vivas livres nos meios em fermentação nos primeiros ciclos, quantificadas ao final das fermentações. Percebe-se que, no 2º ciclo de fermentação, houve queda brusca na concentração de células livres nos meios fermentados dos três sistemas. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de, após o processo de imobilização, a suspensão de células ter sido apenas drenada e grande quantidade de células livres permaneceu nos reatores no primeiro ciclo de fermentação.

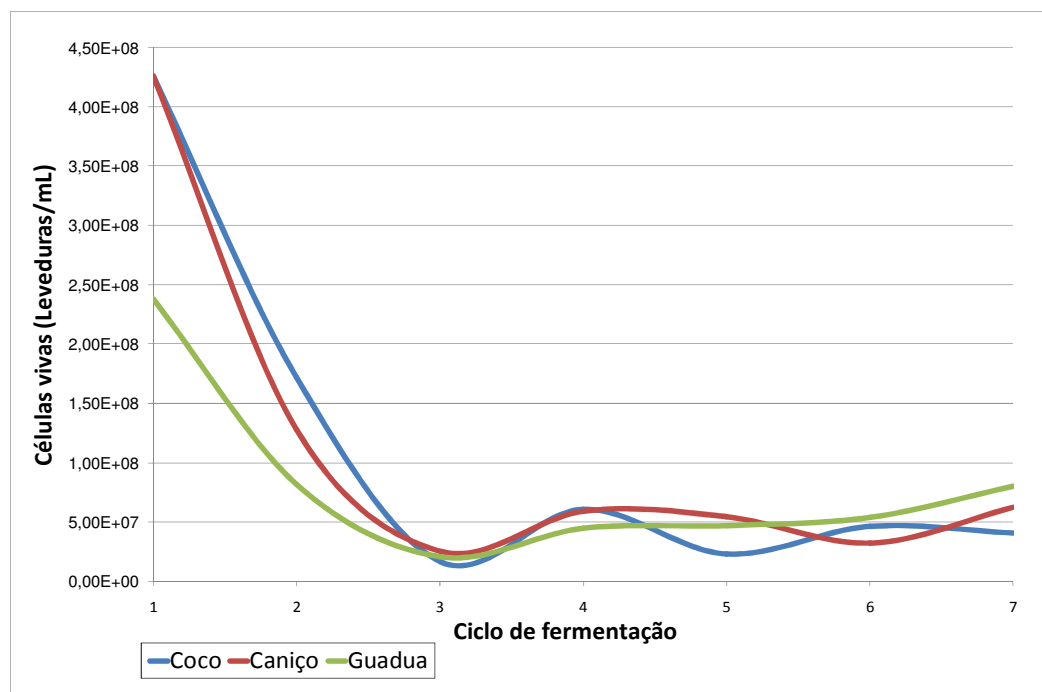


Figura 5.3 – Concentração de leveduras vivas livres nos meios fermentados nos primeiros sete ciclos.

Verbelen *et al.* (2006) afirmam que, utilizando a técnica de adsorção natural em superfícies, é possível ocorrer o desprendimento celular por não haver barreiras físicas entre as células e a solução, havendo reposição celular em seguida. O desprendimento de células de leveduras para os meios fermentados dos três reatores foi semelhante aos observados por Vasconcelos (1998) e Sá (2003). Estes autores observaram concentração de células totais da ordem de 10^7 leveduras / mL de meio fermentado. A partir do momento em que foi definido o Brix mais adequado do mosto, foi observada concentração de células totais livres de $(6,10 \pm 3,75) \times 10^7$ leveduras / mL, $(4,55 \pm 2,31) \times 10^7$ leveduras / mL e $(5,03 \pm 2,33) \times 10^7$ leveduras / mL, respectivamente para os meios fermentados dos sistemas leveduras-coco, leveduras-caniço e leveduras-guadua.

Levando-se em consideração que mosto de melaço freqüentemente apresenta teor considerável de leveduras, a quantidade de células que efetivamente se desprende dos suportes pode ser menor que 10^7 leveduras/mL. Vasconcelos (1998) e Sá (2003) observaram valores da ordem de 10^5 leveduras / mL no mosto de melaço com concentração de ART de $159,67 \pm 18,28$ g / L e $138,12 \pm 12$ g / L, respectivamente. Nesse trabalho utilizamos mosto de melaço com concentração de ART de $133,11 \pm 2,66$ g / L.

Vasconcelos (1998) faz referência à concentração de células livres em vinho delevurado da ordem de 10^7 células / mL. O vinho delevurado é o meio fermentado com teor reduzido de células, obtido após centrifugação, utilizada para recuperação de inóculo no processo Melle-Boinot. Com base nestas considerações, o desprendimento de células dos três sistemas leveduras-suporte apresentou resultados semelhantes aos obtidos na literatura.

A Figura 5.4 exibe a variação da concentração de células totais livres nos meios fermentados para todos os ciclos de fermentação, quantificadas ao final de cada ciclo. Percebe-se que a concentração de células totais permaneceu com valores da ordem de 10^7 leveduras / mL em todos os sistemas células-suporte, a partir do 40.º ciclo de fermentação. Antes deste ciclo houve grande variação do total de células livres (entre 10^7 e 10^8 leveduras/mL). Este fato se verificou, provavelmente, porque foi a partir do 28º ciclo que foi definido o Brix do mosto para todos os demais ciclos subseqüentes, ou seja, mosto com Brix de 18g/100g. Este período, portanto, pode ser considerado como de adaptação dos sistemas leveduras-suporte.

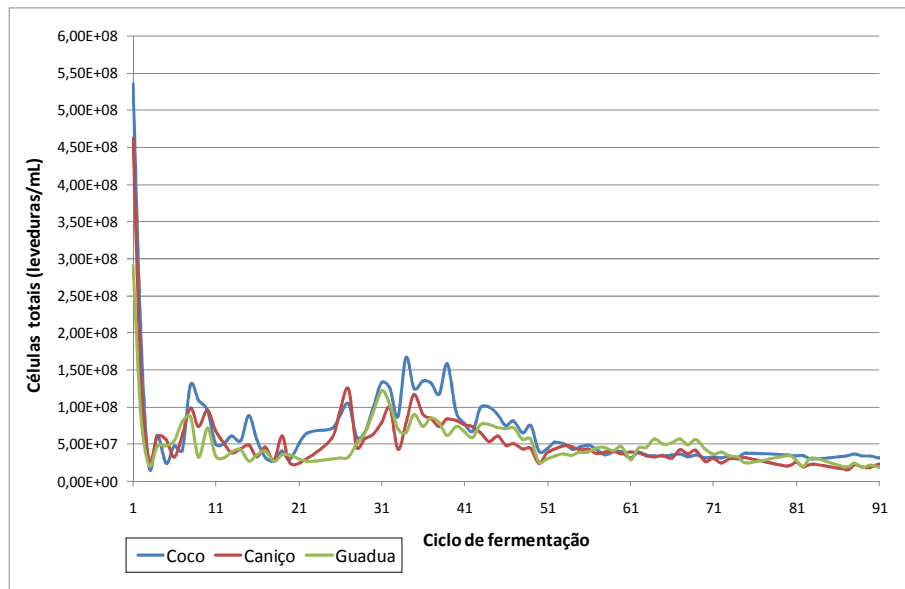


Figura 5.4 – Concentração de células totais (leveduras/mL) nos meios fermentados em todos os ciclos de fermentação.

A Figura 5.5 exibe grande variação da percentagem de brotamento nos meios fermentados, quantificados ao final de cada ciclo de fermentação. Tal variação pode ser reflexo de picos na concentração de células nos suportes e posterior desprendimento celular do excesso (VERBELEN *et al*, 2006).

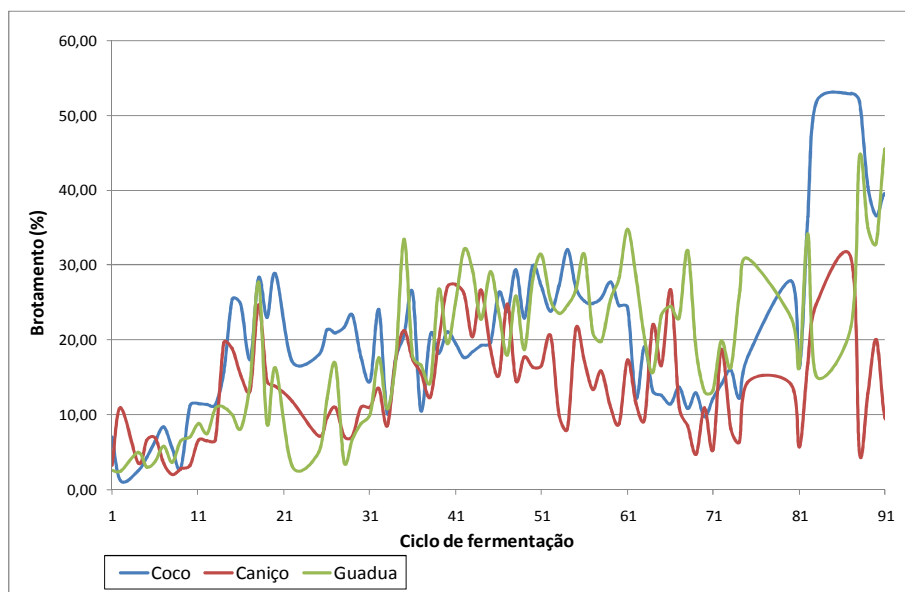


Figura 5.5 – Percentual de brotamento de células de leveduras livres nos meios fermentados.

Após o último ciclo de fermentação, os suportes foram triturados para determinação das concentrações de células, conforme metodologia descrita no item 4.5.5. Os resultados estão dispostos nas Tabelas 5.4 e 5.5, onde se observam concentrações de células totais da ordem de 10^9 (coco) e 10^8 (bambus), valores compatíveis com os encontrados em Vasconcelos (1998) e Sá (2003), respectivamente.

Tabela 5.4 – Concentração de células totais (CLT), concentração de células vivas (CLV) e concentração de células mortas (CLM) em leveduras / mL nos suportes e nos meios fermentados do último ciclo fermentativo.

Sistema	CLT		CLV		CLM	
	Suporte ($\times 10^{-9}$)	Vinho ($\times 10^{-7}$)	Suporte ($\times 10^{-8}$)	Vinho ($\times 10^{-7}$)	Suporte ($\times 10^{-8}$)	Vinho ($\times 10^{-6}$)
Leveduras-coco	1,16	3,26	4,89	2,42	6,75	8,40
Leveduras-caniço	0,64	2,16	1,97	1,78	4,39	3,80
Leveduras-guadua	0,55	1,90	1,55	1,70	3,92	2,00

Tabela 5.5 – Viabilidade celular em % (VC) e porcentagem de brotamento de células (BT) nos suportes e nos meios fermentados do último ciclo fermentativo.

Sistema	VC (%)		BT (%)	
	Suporte	Vinho	Suporte	Vinho
Leveduras-coco	41,88	74,23	11,13	35,54
Leveduras-caniço	31,14	82,41	6,18	12,36
Leveduras-guadua	28,62	89,47	3,43	44,71

Por outro lado, observaram-se baixos valores de viabilidade celular em todos os suportes. Ressalte-se que, como os suportes foram triturados, os resultados apresentados se referem à viabilidade celular de todas as camadas de células nos suportes, justificando-se, portanto, os baixos resultados apresentados. Pradella (2001) afirma que um dos principais problemas na utilização de sistemas com células imobilizadas são as limitações difusionais através das partículas de alguns suportes. Tais limitações são encaradas como resistências ao transporte de massa interparticular (devido ao filme fluido ao redor das partículas) e intraparticular (devido ao transporte através das próprias partículas). Tais resistências são atenuadas ao se determinar condições ótimas de: vazão e agitação do meio fluido, tamanho das partículas de suporte e concentração de células ativas nas partículas de suporte.

Os baixos resultados de viabilidade celular nos suportes sugerem assim que as limitações difusionais promoveram a queda na viabilidade celular nas camadas mais internas dos suportes. Contudo, as camadas mais externas não devem ter sido afetadas pelas mesmas resistências ao transporte de massa, visto que as eficiências e rendimento de produção de etanol permaneceram elevados (com exceção da eficiência de processo do sistema leveduras-guadua) durante todos os ciclos após a definição do Brix mais adequado do mosto, o que pode ser observado na Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Eficiência do processo fermentativo (η_P), eficiência da fermentação alcoólica (η_B) e fator de rendimento em produção de etanol ($Y_{P/S}$) nos sistemas com fibra de coco e bambus entre os ciclos 28 a 91.

Sistema	η_P (%)	η_B (%)	$Y_{P/S}$ (g/g)
Leveduras-Coco	82,30 ± 1,85	88,97 ± 1,73	0,455 ± 0,009
Leveduras-Caniço	81,41 ± 2,91	89,57 ± 1,76	0,458 ± 0,009
Leveduras-Guadua	77,67 ± 3,67	88,91 ± 2,38	0,454 ± 0,012

Sá (2003) obteve resultados semelhantes de viabilidade celular com sabugo de milho, o qual deduziu que provavelmente houve morte de células nas camadas mais internas, sem comprometimento significativo da capacidade fermentativa do sistema leveduras-sabugo nas camadas mais externas.

Quanto à integridade física dos suportes após todos os ciclos fermentativos, foi observada visualmente boa estabilidade, sem alteração aparente da rigidez dos materiais, o que condiz com a manutenção das eficiências e rendimentos constatados durante os ciclos fermentativos (Figura 5.6).



Figura 5.6 – Amostras dos suportes após os 91 ciclos fermentativos.

5.4 Fermentação

As Figuras 5.7 e 5.8 apresentam os dados relativos à eficiência de processo e concentrações de etanol para os sete primeiros ciclos de fermentação. Nas citadas figuras observa-se que o sistema leveduras-coco mostra comportamento diferente dos sistemas leveduras-bambu, nos três primeiros ciclos de fermentação. Enquanto o primeiro caso apresentou comportamento crescente, com ligeira estabilidade, nos sistemas leveduras-caniço e leveduras-guadua houve queda acentuada nos parâmetros citados no segundo ciclo de fermentação, voltando a aumentar a partir do terceiro ciclo, mantendo esta tendência, porém em valores inferiores aos do coco.

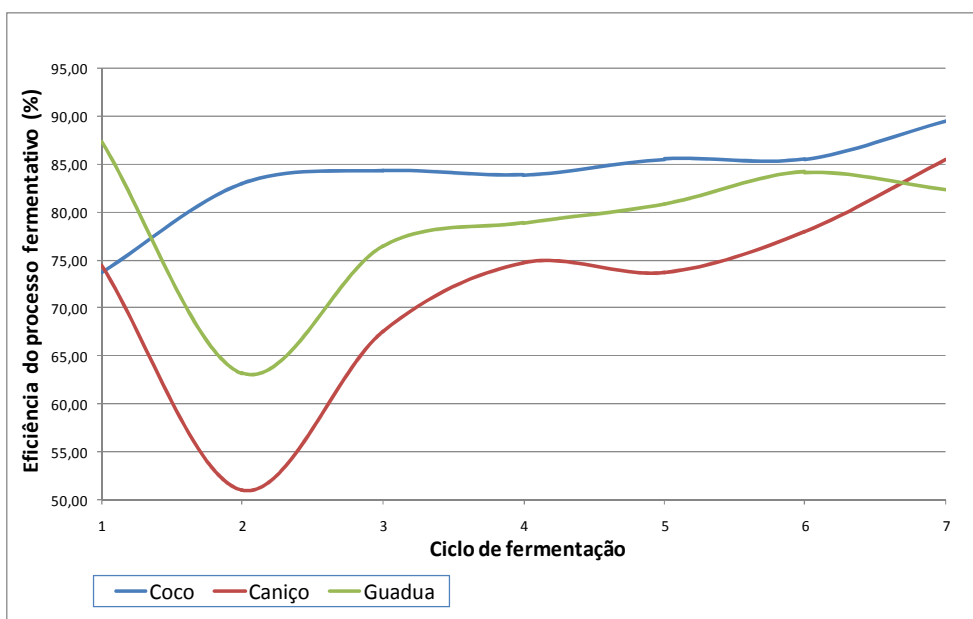


Figura 5.7 – Eficiência do processo fermentativo nos reatores com leitos de fibra de coco e bambus nos primeiros ciclos.

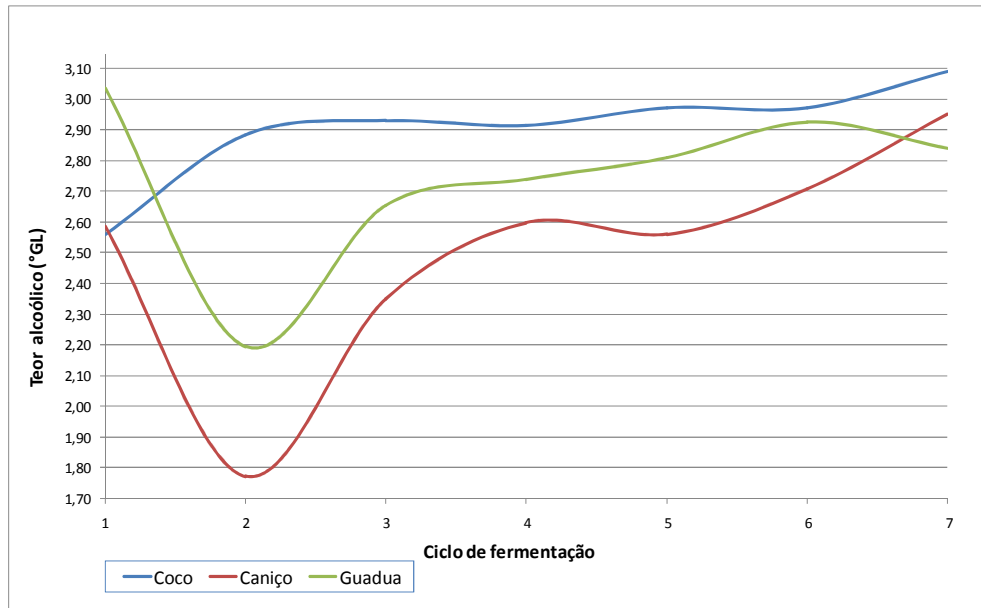


Figura 5.8 – Teor alcoólico dos meios fermentados nos reatores com leitos de fibra de coco e bambus nos primeiros ciclos.

Isto evidencia que o leito com coco apresentou imobilização imediata e satisfatória, o que visivelmente não ocorreu nos leitos com bambu. A elevada capacidade de absorção de umidade da fibra de coco (Tabela 5.3) sugere uma maior capacidade de imobilização em relação ao bambu. Sá (2003) também observou fenômeno semelhante ao utilizar sabugos de milho como suporte de imobilização de *Saccharomyces cerevisiae*.

Este comportamento pode ser explicado pelo fato de, após o processo de imobilização, a suspensão de células ter sido apenas drenada e grande quantidade de células livres permaneceu nos reatores no primeiro ciclo fermentativo. Vale lembrar que a concentração de leveduras vivas na suspensão de células utilizada na imobilização foi de $1,59 \times 10^9$ leveduras/mL. No caso do coco, provavelmente a quantidade de células imobilizadas inicialmente foi superior aos outros suportes. A concentração de células nos suportes só foi realizada após o último ciclo de fermentação.

Ao longo dos demais ciclos fermentativos, o teor de células nos bambus provavelmente aumentou gradativamente, em virtude do aumento observado das eficiências dos processos (Figura 5.9). Isto sugere que as células de levedura se multiplicaram nos

bambus nos ciclos consecutivos de fermentação. Como a imobilização inicial foi maior no coco, provavelmente este fenômeno também ocorreu, porém numa escala menor.

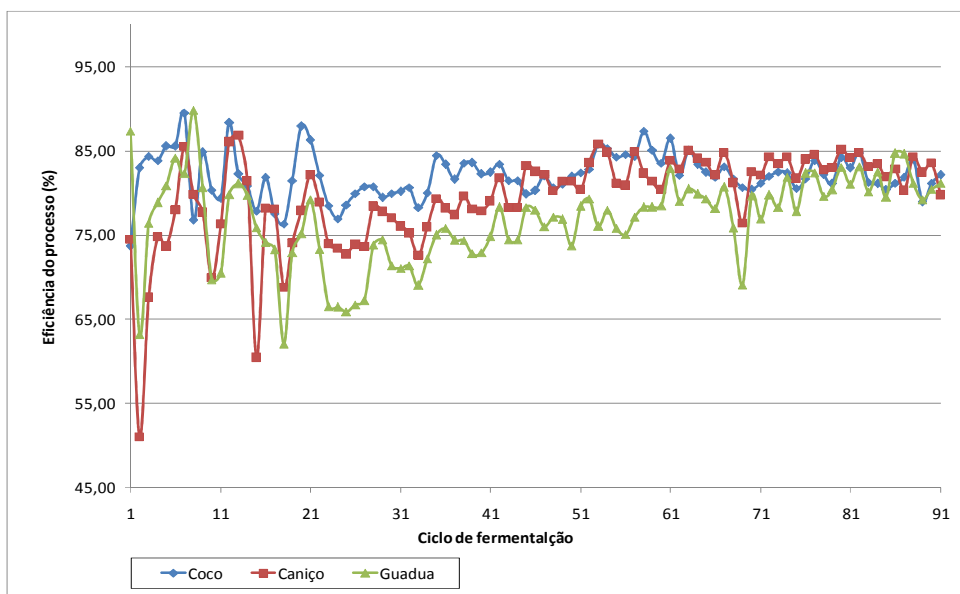


Figura 5.9 – Eficiências do processo fermentativo, nos reatores com leitos de fibra de coco e bambus em todos os ciclos de fermentação.

As análises seguintes têm como base os resultados obtidos a partir da definição do Brix mais adequado do mosto ($18,08 \pm 0,29$ g/100g), que ocorreu a partir do ciclo 28.

A infecção bacteriana foi controlada pela adição de ácido sulfúrico comercial, suficiente para manter o pH do mosto em torno de 4,2, aliada à adição de 3 ppm de bactericida (conforme item 4.1.2). As Figuras 5.10 e 5.11 exibem a eficácia do tratamento em decorrência da manutenção dos valores de pH e acidez sulfúrica em intervalos restritos. Observa-se na Figura 5.11 maior oscilação na acidez sulfúrica do que no pH. Observa-se também uma elevação crescente da acidez do mosto. A Tabela 5.7 exhibe os mesmos dados, acrescidos dos referentes aos demais ciclos de fermentação.

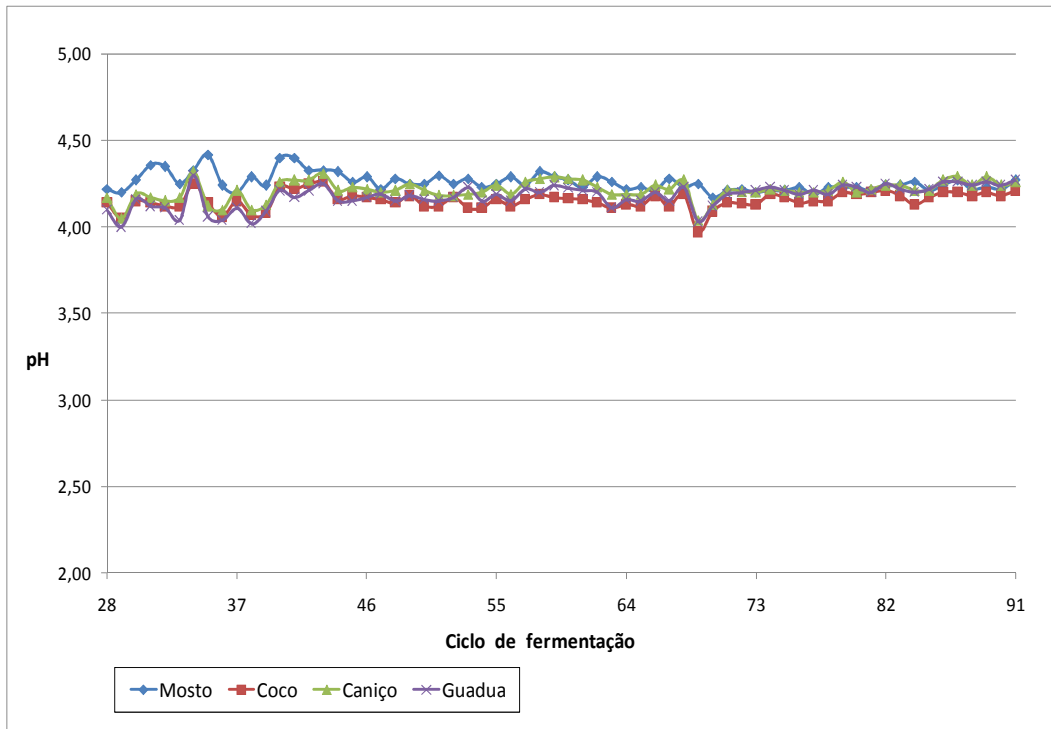


Figura 5.10 – pH do mosto e dos meios fermentados dos sistemas leveduras-coco, leveduras-caniço e leveduras-guadua entre os ciclos 28 e 91.

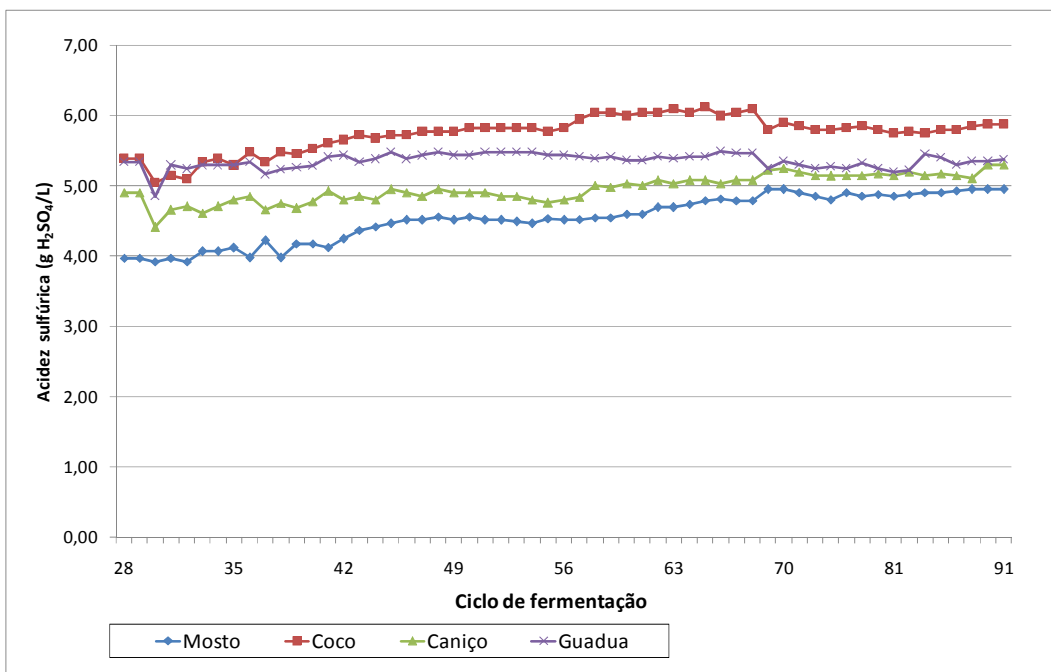


Figura 5.11 – Acidez sulfúrica do mosto e dos meios fermentados dos sistemas leveduras-coco, leveduras-caniço e leveduras-guadua entre os ciclos 28 e 91.

Tabela 5.7 - pH e acidez sulfúrica do mosto no início dos ciclos de fermentação e pH e acidez sulfúrica dos meios fermentados dos sistemas levedura-suporte ao final de todos os ciclos de fermentação

Ciclos	pH				Acidez sulfúrica (g H ₂ SO ₄ / L)			
	Mosto	Leveduras-Coco	Mosto	Leveduras-Coco	Mosto	Leveduras-Coco	Mosto	Leveduras-Coco
1-9	4,30 ± 0,10	4,18 ± 0,06	4,22 ± 0,04	4,17 ± 0,05	2,29 ± 0,10	2,72 ± 0,08	2,65 ± 0,14	2,70 ± 0,09
10-13	4,26 ± 0,04	4,20 ± 0,05	4,14 ± 0,08	4,14 ± 0,06	2,77 ± 0,10	3,12 ± 0,21	3,20 ± 0,19	3,49 ± 0,13
14-17	4,20 ± 0,04	4,15 ± 0,02	4,09 ± 0,01	4,08 ± 0,02	3,63 ± 0,07	4,17 ± 0,17	4,05 ± 0,21	4,45 ± 0,07
18-22	4,29 ± 0,11	4,22 ± 0,07	4,18 ± 0,08	4,15 ± 0,06	4,06 ± 0,14	4,79 ± 0,18	4,48 ± 0,16	5,02 ± 0,10
23-27	4,28 ± 0,04	4,22 ± 0,05	4,17 ± 0,04	4,14 ± 0,04	4,99 ± 0,12	5,48 ± 0,1	5,09 ± 0,06	5,57 ± 0,11
28-91	4,26 ± 0,05	4,15 ± 0,05	4,21 ± 0,06	4,18 ± 0,07	4,52 ± 0,33	5,11 ± 1,82	4,41 ± 1,57	4,77 ± 1,69

Isto pode ser explicado pela necessidade ligeiramente crescente do aumento da dosagem de ácido sulfúrico comercial no preparo do mosto no decorrer dos ciclos, para manter o pH controlado. Foi observado que à medida que o melaço era retirado do recipiente onde estava armazenado, aumentava a quantidade de sacarose cristalizada, o que alterou ligeiramente a composição do mosto, exigindo, pois, pequenas correções para a padronização do Brix do mosto. Por essa razão, a acidez do mosto apresentou-se crescente apesar da manutenção do seu pH.

Todos os sistemas apresentaram manutenção satisfatória da capacidade fermentativa, o que pode ser observado nas Figuras 5.12 (eficiência de processo), 5.13 (eficiência de fermentação) e 5.14 (rendimento em etanol). Os mesmos dados estão dispostos na Tabela 5.8. Ressalte-se que, antes do 69º ciclo de fermentação, foi necessário realizar tratamento ácido enérgico (choque ácido), onde os sistemas leveduras-suporte foram imersos em água acidulada com pH 2,2, permanecendo por 60 minutos, quando então foram reiniciados os ciclos de fermentação. Em função deste tratamento, o ciclo posterior sofreu queda acentuada de desempenho para todos os suportes. Ressalte-se que foi possível observar elevação da acidez sulfúrica do meio fermentado do sistema leveduras-coco antes do ciclo de fermentação 69, provavelmente pelo aumento da contaminação bacteriana, maior neste suporte (Figura 5.11), fato este que contribuiu para a realização do choque ácido.

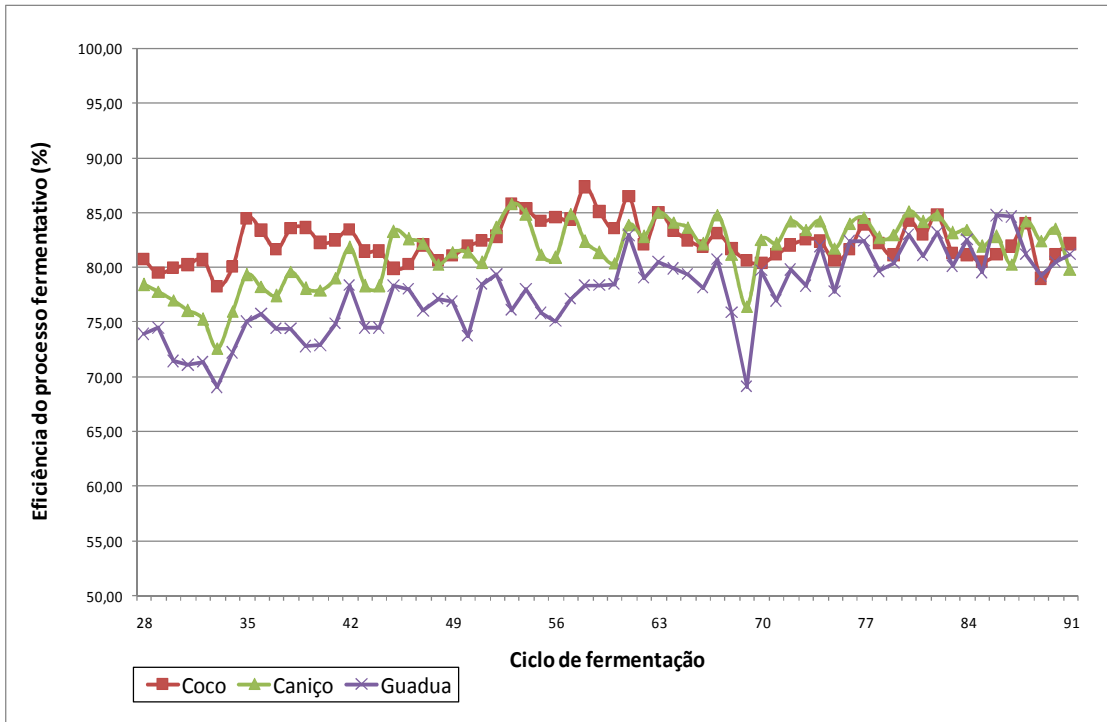


Figura 5.12 – Eficiência do processo fermentativo (η_P) dos sistemas leveduras-coco, leveduras-caniço e leveduras-guadua entre os ciclos 28 e 91.

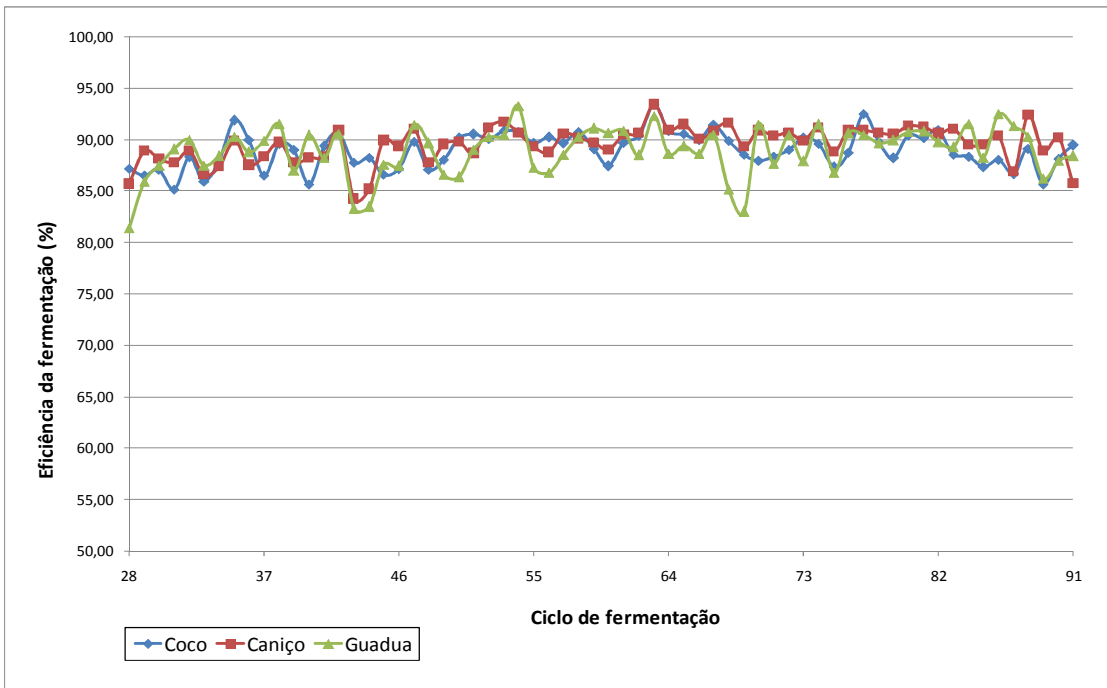


Figura 5.13 – Eficiência da fermentação (η_P) dos sistemas leveduras-coco, leveduras-caniço e leveduras-guadua entre os ciclos 28 e 91.

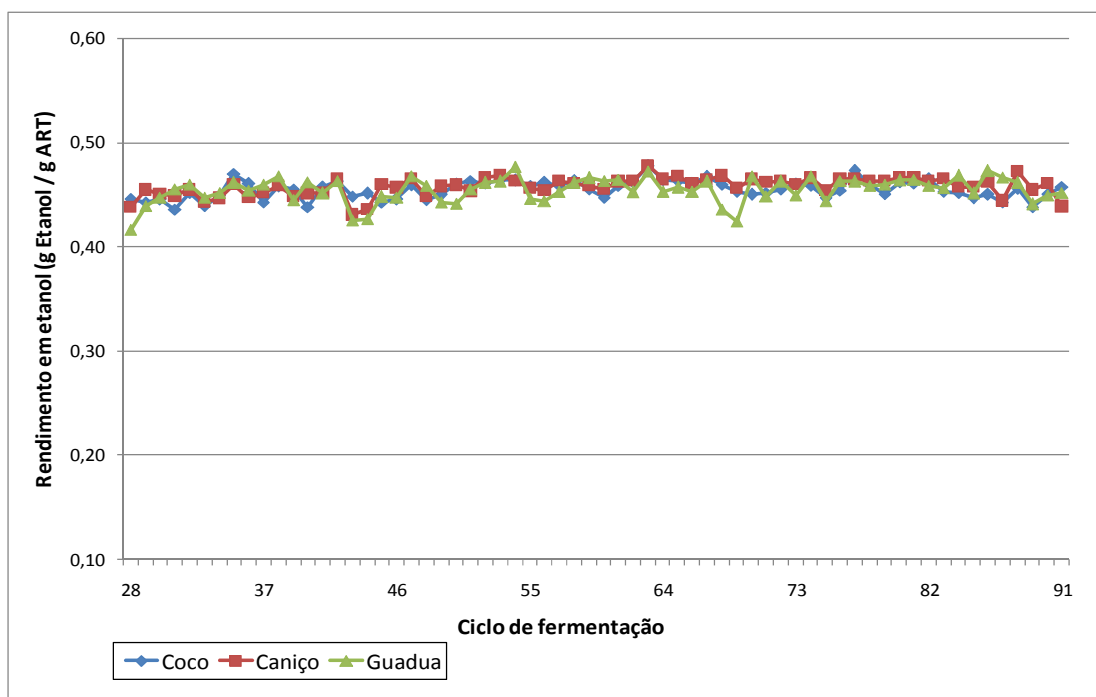


Figura 5.14 – Rendimento em etanol dos sistemas leveduras-coco, leveduras-caniço e leveduras-guadua entre os ciclos 28 e 91.

Tabela 5.8 - Eficiência do processo, eficiência de fermentação e rendimento em etanol dos sistemas leveduras-suporte do ciclo 28 ao 91

(continua)

Ciclos	η_P (%)			η_B (%)			$Y_{p/s}$		
	Leveduras-Coco	Leveduras-Caniço	Leveduras-Guadua	Leveduras-Coco	Leveduras-Caniço	Leveduras-Guadua	Leveduras-Coco	Leveduras-Caniço	Leveduras-Guadua
28	80,74	78,41	73,86	87,20	85,68	81,37	0,446	0,438	0,416
29	79,48	77,81	74,47	86,52	88,93	85,95	0,442	0,454	0,439
30	79,93	77,00	71,38	87,11	88,13	87,45	0,445	0,450	0,447
31	80,20	76,05	71,07	85,19	87,77	89,08	0,435	0,448	0,455
32	80,66	75,24	71,35	88,31	88,92	89,99	0,451	0,454	0,460
33	78,25	72,57	69,04	85,94	86,59	87,50	0,439	0,442	0,447
34	80,05	75,96	72,18	87,98	87,36	88,41	0,450	0,446	0,452
35	84,46	79,32	75,02	91,88	89,91	90,26	0,470	0,459	0,461
36	83,37	78,24	75,78	90,01	87,52	88,80	0,460	0,447	0,454
37	81,64	77,40	74,40	86,51	88,37	89,88	0,442	0,452	0,459
38	83,53	79,61	74,36	89,61	89,75	91,53	0,458	0,459	0,468
39	83,59	78,07	72,77	89,00	87,74	87,00	0,455	0,448	0,445
40	82,23	77,89	72,87	85,65	88,28	90,43	0,438	0,451	0,462
41	82,46	79,04	74,81	89,37	88,35	88,24	0,457	0,451	0,451
42	83,44	81,81	78,31	90,66	90,90	90,54	0,463	0,465	0,463
43	81,46	78,30	74,46	87,74	84,25	83,26	0,448	0,430	0,425
44	81,46	78,30	74,46	88,23	85,20	83,48	0,451	0,435	0,427
45	79,88	83,26	78,30	86,59	89,94	87,57	0,442	0,460	0,447

(conclusão)

46	80,27	82,57	77,98	87,14	89,36	87,44	0,445	0,457	0,447
47	82,03	82,18	76,03	89,77	91,05	91,44	0,459	0,465	0,467
48	80,62	80,23	77,12	87,07	87,74	89,65	0,445	0,448	0,458
49	81,09	81,40	76,88	88,03	89,55	86,61	0,450	0,458	0,443
50	81,93	81,37	73,72	90,15	89,78	86,38	0,461	0,459	0,441
51	82,44	80,42	78,44	90,52	88,69	89,05	0,463	0,453	0,455
52	82,79	83,58	79,31	90,11	91,18	90,25	0,460	0,466	0,461
53	85,80	85,80	76,05	90,82	91,71	90,49	0,464	0,469	0,462
54	85,32	84,85	77,96	90,74	90,66	93,29	0,464	0,463	0,477
55	84,24	81,20	75,82	89,68	89,30	87,30	0,458	0,456	0,446
56	84,60	80,89	75,10	90,24	88,77	86,79	0,461	0,454	0,443
57	84,40	84,87	77,13	89,65	90,60	88,56	0,458	0,463	0,453
58	87,33	82,36	78,34	90,78	90,14	90,24	0,464	0,461	0,461
59	85,09	81,36	78,33	89,09	89,67	91,11	0,455	0,458	0,466
60	83,51	80,42	78,47	87,42	89,01	90,65	0,447	0,455	0,463
61	86,47	83,86	82,91	89,70	90,46	90,89	0,458	0,462	0,464
62	82,11	82,83	79,02	90,40	90,65	88,49	0,462	0,463	0,452
63	85,05	85,05	80,51	93,41	93,43	92,31	0,477	0,477	0,472
64	83,39	84,09	79,86	90,88	90,95	88,64	0,464	0,465	0,453
65	82,46	83,67	79,33	90,55	91,50	89,35	0,463	0,468	0,457
66	81,90	82,13	78,16	90,02	90,07	88,63	0,460	0,460	0,453
67	83,12	84,80	80,72	91,39	90,86	90,49	0,467	0,464	0,462
68	81,67	81,20	75,85	89,86	91,62	85,16	0,459	0,468	0,435
69	80,64	76,39	69,08	88,55	89,30	82,97	0,452	0,456	0,424
70	80,38	82,52	79,67	87,99	90,89	91,47	0,450	0,464	0,467
71	81,18	82,12	76,92	88,37	90,37	87,68	0,452	0,462	0,448
72	82,01	84,25	79,76	89,04	90,64	90,45	0,455	0,463	0,462
73	82,52	83,47	78,28	90,15	89,92	87,92	0,461	0,459	0,449
74	82,36	84,25	81,89	89,62	91,17	91,49	0,458	0,466	0,468
75	80,57	81,72	77,82	87,33	88,83	86,77	0,446	0,456	0,443
76	81,65	84,02	82,36	88,73	90,91	90,63	0,453	0,465	0,463
77	83,86	84,57	82,43	92,47	90,95	90,49	0,473	0,465	0,462
78	82,21	82,68	79,63	89,78	90,66	89,67	0,459	0,463	0,458
79	81,11	82,99	80,40	88,19	90,57	89,93	0,451	0,463	0,460
80	84,20	85,16	83,00	90,43	91,31	90,74	0,462	0,467	0,464
81	82,98	84,17	81,07	90,16	91,21	90,81	0,461	0,466	0,464
82	84,81	84,81	83,15	90,96	90,62	89,76	0,465	0,463	0,459
83	81,27	83,15	80,10	88,56	91,08	89,28	0,453	0,465	0,456
84	81,11	83,47	82,52	88,37	89,52	91,57	0,452	0,457	0,468
85	80,47	81,89	79,52	87,33	89,51	88,24	0,446	0,457	0,451
86	81,14	82,81	84,73	88,03	90,39	92,48	0,450	0,462	0,473
87	81,90	80,30	84,63	86,64	86,90	91,33	0,443	0,444	0,467
88	84,01	84,24	81,20	89,12	92,38	90,27	0,455	0,472	0,461
89	78,96	82,44	79,19	85,66	88,90	86,24	0,438	0,454	0,441
90	81,18	83,54	80,47	88,18	90,16	87,93	0,451	0,461	0,449
91	82,13	79,78	81,19	89,45	85,76	88,40	0,457	0,438	0,452
M ± DP	82,30 ± 1,85	81,41 ± 2,90	77,67 ± 3,67	88,97 ± 1,72	89,57 ± 1,76	88,91 ± 2,38	0,455 ± 0,009	0,4577 ± 0,009	0,454 ± 0,012

Através das Figuras 5.12 e 5.13 pode-se observar comportamento homogêneo das eficiências de processo e de fermentação, demonstrando a estabilidade na produção de

etanol dos sistemas utilizados. A Tabela 5.9 exibe os resultados médios da eficiência de fermentação e da eficiência de processo, assim como seus respectivos desvios-padrão e coeficientes de variação dos sistemas estudados, entre os ciclos 28 e 91. Ressalte-se que, de acordo com Ferreira (1996), experimentos com coeficientes de variação inferiores a 10% apresentam ótima precisão experimental. De acordo com a Tabela 5.9, os coeficientes de variação das três séries de experimentos, muito abaixo de 10%, apresentam variação numa faixa considerada estatisticamente muito estreita. Em outras palavras, revelam grande estabilidade quanto à eficiência do processo.

Tabela 5.9 – Eficiências do processo (η_P), de fermentação (η_B) e respectivos coeficientes de variação (CV) dos sistemas leveduras-suporte entre os ciclos 28 e 91 ($M \pm DP$: média \pm desvio-padrão)

Sistema	η_P ($M \pm DP$)	η_B ($M \pm DP$)	CV de η_P (%)	CV de η_B (%)
Leveduras-Coco	82,30 \pm 1,85	88,97 \pm 1,73	2,25	1,94
Leveduras-Caniço	81,41 \pm 2,90	89,57 \pm 1,76	3,56	1,96
Leveduras-Guadua	77,67 \pm 3,67	88,91 \pm 2,38	4,73	2,68

Próximo ao ciclo 74, os três sistemas leveduras-suporte apresentaram maior similaridade nas eficiências de processo (Figura 5.12). Foi observado que o sistema leveduras-coco, provavelmente devido a sua porosidade e elevada absorção de umidade, imobilizou células numa quantidade superior às dos sistemas leveduras-bambu já nos primeiros ciclos de fermentação. Contudo, a similaridade das eficiências de processo dos três sistemas, por volta do ciclo 74, sugere que os sistemas leveduras-bambu apresentaram boa capacidade de imobilização, o que provavelmente ocorreu gradativamente por meio da reprodução celular e conseqüente aumento do número de células imobilizadas, ao longo dos 74 primeiros ciclos.

Existem diversos trabalhos na literatura sobre fermentação alcoólica com células imobilizadas. Uma maneira de avaliá-los é comparar seus fatores de rendimento em produção de etanol, $Y_{P/S}$, com o rendimento em etanol máximo teórico (fator estequiométrico de conversão de glicose em etanol), parâmetro utilizado para o cálculo das eficiências de processo e de fermentação (item 4.2.4). Este tipo de avaliação foi realizada por Pradella (2001), Pushalkar e Rao (1998), Silva *et al.* (2005) e Kotaka *et al.* (2008). A Figura 5.15

relaciona $Y_{P/S}$ de alguns sistemas com células imobilizadas com o rendimento máximo teórico.

Analisando os dados da Figura 5.15 percebe-se que os valores encontrados de $Y_{P/S}$ para os sistemas estudados neste trabalho são compatíveis com os demais citados, sendo até superiores a outros sistemas. Também verifica-se que os três sistemas estudados apresentaram capacidades fermentativas similares, representando cerca de 88% do rendimento máximo teórico (0,511 g etanol / g glicose). Wheals *et al.* (1999) citam rendimentos da ordem de 90 – 92% em fermentações com células livres de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*.

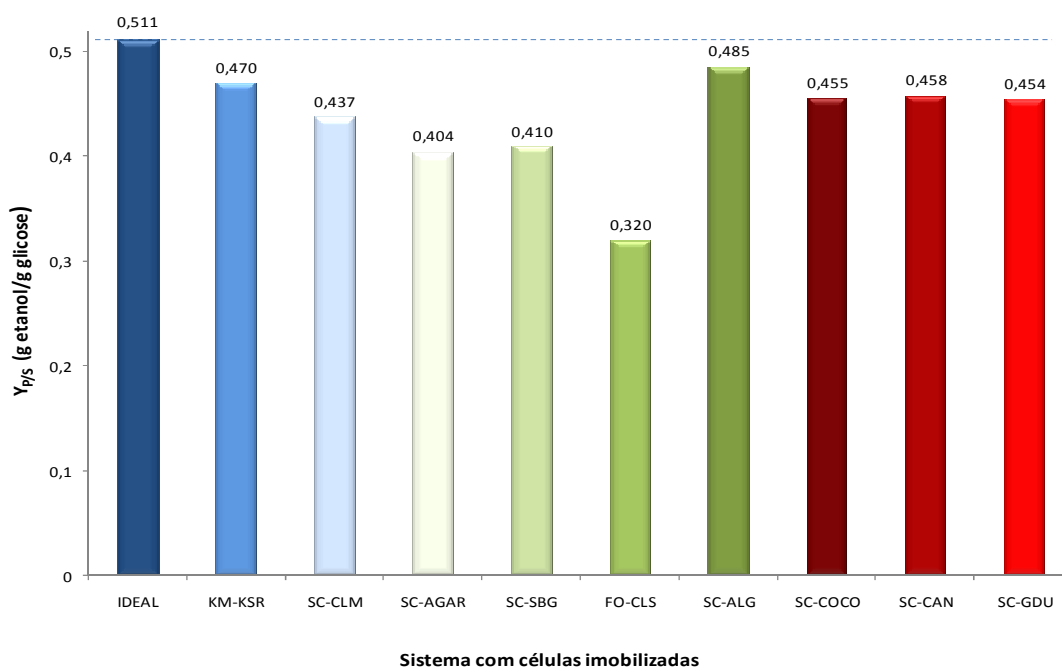


Figura 5.15 – Fator de rendimento em produção de etanol de alguns sistemas com células imobilizadas:

- IDEAL: $Y_{P/S}$ ideal, o que equivale a 100% do fator estequiométrico etanol/glicose
- KM-KSR: *K. marxianus* em kissiris (NIGAM *et al.*, 1997)
- SC-CLM: *S. cerevisiae* em colmos de cana-de-açúcar (VASCONCELOS,1998)
- SC-AGAR: *S. cerevisiae* em agar (NIGAM *et al.*,1998)
- SC-SBG: *S. cerevisiae* em sabugo de milho (SÁ, 2003)
- FO-CLS: *F. oxysporum* em celulose (RUIZ *et al.*,2006)
- SC-ALG: *S. cerevisiae* em alginato de cálcio (processo da Kyowa Kogyo Co. citado por PRADELLA, 2001)
- SC-COCO: *S. cerevisiae* em fibra de coco (este trabalho)
- SC-CAN: *S. cerevisiae* em bambu *Phyllostachys caníço* (este trabalho)
- SC-GDU: *S. cerevisiae* em bambu *Guadua angustifolia* (este trabalho)

O tempo de fermentação dos sistemas leveduras-suporte não foi determinado, visto que os ciclos de fermentação foram fixados em 24 horas. Por essa razão não foi determinada a produtividade dos sistemas leveduras-suporte estudados. O tempo de fermentação, essencial para a determinação de produtividade, refere-se ao tempo necessário para que as células imobilizadas convertam totalmente os açúcares fermentescíveis do meio de fermentação.

Apesar de não ter sido possível determinar diretamente a produtividade dos sistemas leveduras-suporte, percebe-se que o sistema leveduras-coco pode apresentar produtividade superior aos dos demais sistemas. A Figura 5.16 exibe o teor de ART dos meios fermentados dos três sistemas, determinado ao final cada ciclo de fermentação. Pode-se observar teor de ART menor no meio fermentado do sistema leveduras-coco do que nos meios fermentados dos sistemas leveduras-caniço e leveduras-guadua (respectivamente $1,00 \pm 0,19$ g / mL, $1,22 \pm 0,32$ g / mL e $1,69 \pm 0,49$ g / mL). Como a duração dos ciclos fermentativos foi a mesma para todos os sistemas, pode-se estimar que o sistema leveduras-coco será capaz de metabolizar os açúcares numa velocidade superior ao dos demais sistemas, apresentando, portanto, produtividade superior.

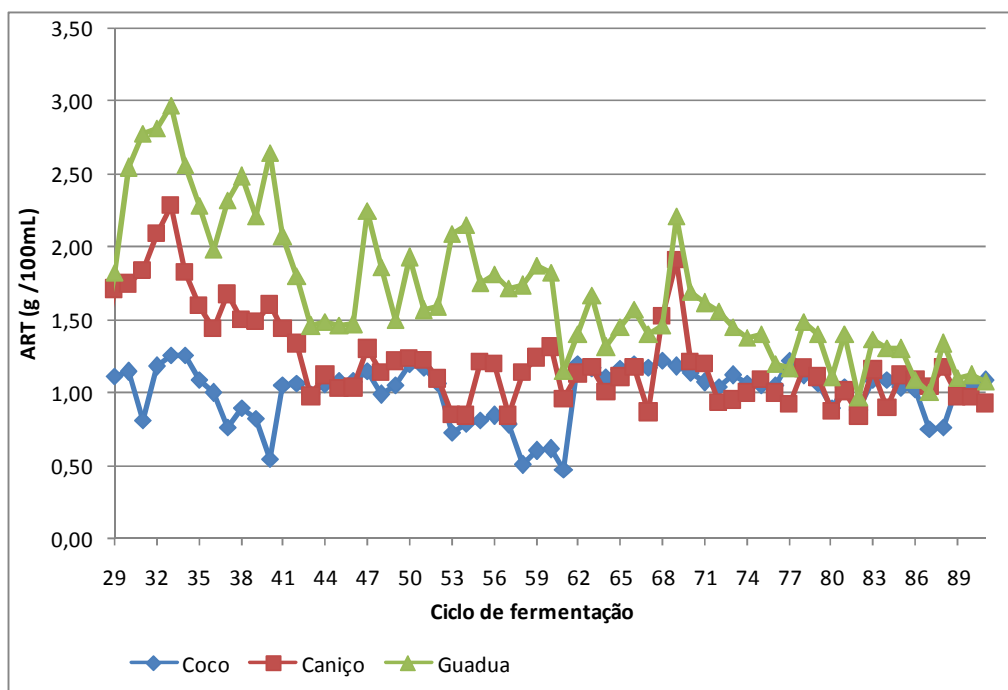


Figura 5.16 – ART dos meios fermentados provenientes dos sistemas leveduras-suporte para os ciclos de fermentação 29 a 91.

Considerando-se que, se o tempo de fermentação fosse de 24 horas, os sistemas estudados apresentariam as seguintes produtividades:

Sistema leveduras-coco:

$$\text{produtividade} = \frac{5,60 \text{ g etanol}}{100 \text{ mL}} \times \frac{100 \text{ mL}}{0,1 \text{ L}} \times \frac{1}{24 \text{ horas}} \quad (15)$$

$$\text{produtividade} = 2,33 \text{ g etanol.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

Sistema leveduras-caniço:

$$\text{produtividade} = \frac{5,53 \text{ g etanol}}{100 \text{ mL}} \times \frac{100 \text{ mL}}{0,1 \text{ L}} \times \frac{1}{24 \text{ horas}} \quad (16)$$

$$\text{produtividade} = 2,31 \text{ g etanol.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

Sistema leveduras-quadua:

$$\text{produtividade} = \frac{5,28 \text{ g etanol}}{100 \text{ mL}} \times \frac{100 \text{ mL}}{0,1 \text{ L}} \times \frac{1}{24 \text{ horas}} \quad (17)$$

$$\text{produtividade} = 2,20 \text{ g etanol.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$$

Os valores obtidos seriam menores do que as produtividades de 4 a 8 g etanol.L⁻¹.h⁻¹ dos processos industriais em fermentação contínua com células livres citados por Vasconcelos (1998), Nigan *et al.* (1998) e Sá (2003).

6 CONCLUSÕES

Entre os três sistemas estudados, o leveduras-coco mostrou-se superior aos demais quanto à rápida imobilização/adaptação das células frente aos sistemas leveduras-bambus. Quanto às eficiências e rendimento em etanol, os sistemas leveduras-coco e leveduras-caniço mostraram-se compatíveis. Os sistemas leveduras-bambus só começaram a apresentar capacidades fermentativas similares ao do leito com fibra de coco por volta do 74º ciclo fermentativo.

Em comparação com outros suportes utilizados para imobilização de *Saccharomyces cerevisiae*, os estudados neste trabalho apresentaram-se compatíveis e até mesmo superiores, em rendimento em etanol e eficiências de processo e de fermentação.

O tratamento do mosto com ácido sulfúrico comercial para manter o pH em torno de 4,2 e adição de 3 ppm de bactericida mostrou-se eficiente para o controle da infecção bacteriana.

Quanto à eficiência dos processos, os leitos com *coco* e com *caniço* apresentaram resultados compatíveis (respectivamente $82,30 \pm 1,85\%$ e $81,41 \pm 2,91\%$), porém superiores à eficiência do processo observado com leito de *guadua* ($77,67 \pm 3,67\%$). As eficiências das fermentações dos três sistemas mostraram-se elevadas, em torno de 89% do valor teórico (respectivamente para *coco*, *caniço* e *guadua*: $88,97 \pm 1,73\%$, $89,57 \pm 1,76\%$ e $88,91 \pm 2,38$). Apesar de a viabilidade celular nos suportes ter sido baixa ao final dos experimentos, isto não afetou a capacidade fermentativa dos três sistemas, o que evidencia que problemas difusionais nas partículas dos suportes promoveram a morte de células nas camadas mais internas. Contudo, as camadas mais externas devem ter mantido uma alta viabilidade celular e conseqüente atividade fermentativa praticamente constante.

A boa estabilidade física dos materiais utilizados neste estudo, mesmo após 91 ciclos fermentativos, reforçam suas utilizações potenciais como suportes de células para a produção de etanol. São suportes que podem ser obtidos em grande quantidade nas próprias regiões produtoras de etanol, de baixo custo, com processo de imobilização rápido e reprodutível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEGRE, R.M.; RIGO, M.; JOEKES, I.; 2003; "Ethanol Fermentation of a Diluted Molasses Medium by *Saccharomyces cerevisiae* Immobilized on Chrysotile"; Brazilian Archives of Biology and Technology; v.46; n.4; pp.751-757
- ALMEIDA, J.R., 1960, "Processo de recuperação de Levedura ou processo Melle-Boinott" *Semana da Fermentação Alcoólica*, vol 1, pp. 254-262, Piracicaba.
- AMORIM, H. V., BASSO, L.C., ALVES, D.M.G., 1996, *Processos de Produção de Álcool – Controle e Monitoramento*, FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, Piracicaba - São Paulo, 103 p;
- ARAÚJO, J.A., 1982, *Obtenção de Etanol por Fermentação Alcoólica*, PLANALSUCAR, Maceió - Alagoas, 83 p;
- BELLUCO, 2001, *Alterações fisiológicas e de composição em Saccharomyces cerevisiae sob condições não proliferantes*; Dsc. Dissertação, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- CALDAS, 1998, *Manual de análises selecionadas para indústrias sucroalcooleiras*, 1a ed., Maceió/AL, Sindicato da Indústria do Açúcar e do Álcool no Estado de Alagoas
- CARVALHO, J.C.M.; SATO, S.; 2001; "Fermentação Descontínua"; In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. *et al.*; *Biotecnologia Industrial, vol. 2, Engenharia Bioquímica*; 1.ª ed; cap. 9; São Paulo, SP; Editora Edgard Blücher Ltda
- COPERSUCAR, 1987, *Fermentação*, 1a ed, Centro de Tecnologia COPERSUCAR – CTC, Divisão Industrial – CTDI, São Paulo/SP, Brasil
- FACCIOTTI, M.C.R; 2001; "Fermentação contínua"; In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. *et al.*; *Biotecnologia Industrial, vol. 2, Engenharia bioquímica*; 1.ª ed; cap. 12; São Paulo, SP; Editora Edgard Blücher Ltda
- FERREIRA, J.M.S., WARWICK, D.R.N., SIQUEIRA, L.A, 1997, *A cultura do coqueiro no Brasil*. 2a ed., Brasília, Embrapa-SPI; Aracaju: Embrapa-CPATC, 292 p.
- FERREIRA, P.V., 1996, *Estatística experimental aplicada à agronomia*, 2ª ed., Maceió, EDUFAL

- FUJII, N.; OKI, T.; SAKURAI, A. *et al.*; 2001; "Ethanol production from starch by immobilized *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces pastorianus* using cellulose carriers"; *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*; v.2001; n.27, pp.52–57
- KOTAKA, A., SAHARA, H., HATA, Y. *et al.*, 2008, "Efficient and Direct Fermentation of Starch to Ethanol by Sake Yeast Strains Displaying Fungal Glucoamylases", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v.72, n.5, pp.1376–1379.
- LIMA, U.A.; 1992; "Produção de Etanol"; In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; *Biotechnologia – Tecnologia das Fermentações, vol. 1, Biotechnologia*, 5.ª Ed; cap. 3; São Paulo, SP; Editora Edgard Blücher Ltda
- LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V.; 2001; "Produção de Etanol"; In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *et al.*; *Biotechnologia Industrial – Processos Fermentativos e Enzimáticos, vol. 3*; 1.ª ed; cap. 1; São Paulo, SP; Editora Edgard Blücher Ltda
- LONDOÑO, X., 1999; "Evaluation of bamboo resources in Latin America. A summary of the final report of project N 96-8300-01-4", International Network for bamboo and rathan
- MARINHO, F.J.L., GREYI, H.R, FERNANDES, P.D. *et al.*, 2006, "Cultivo de coco 'Anão Verde' irrigado com águas salinas", *Pesq. agropec. bras.*, v.41, n.8, pp.1277-1284
- CARVALHO NETO, C.C., FARIA, R.B., MARTINS, S., *et al.*, 1990, "Produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, em escala industrial, através do processo contínuo empregando levedura floculante", *Congresso Brasileiro de Energia*, 5: 1990 : Rio de Janeiro
- PEINADO, R.A.; MORENO, J.J.; VILLALBA, J.M. *et al.*; 2005; "Yeast biocapsules: a new immobilization method and their applications"; *Enzyme and microbial technology*; v.40; n.2006; pp. 79-84
- PRADELLA, J. G. C., 1982, "Utilização de Fermentadores não Convencionais na Produção de Etanol", ENCONTRO SOBRE ESCOAMENTO EM MEIOS POROSOS, 10, São Carlos, p.15-51.
- PRADELLA, J.G.C., 2001, "Reatores com células imobilizadas". In: SCHMIDELL, E.A., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., *Biotechnologia industrial vol 1- Engenharia bioquímica vol. 2*, 1 ed., cap. 16, São Paulo, Brasil, Editora Edgard Blücher Ltda

- PUSHALKAR, S., RAO, K.K., 1998, "Short Communication: Ethanol fermentation by a cellulolytic fungus *Aspergillus terreus*", *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.14, n.1998, pp.289-291
- RAMALHO FILHO, R., VASCONCELOS, J. N., 1991, Du PROÁLCOOL à la Valorisation Integrale de la Canne à Sucre, Dans L'Etat d'Alagoas, Brésil, *Cahiers du Brésil Contemporain*, 16:99-129.
- RIBEIRO, F.J., LOPES, J.J.C., FERRARI, S.E., 1987, *Complementação de nitrogênio de forma contínua no processo de fermentação alcoólica*, *Brasil Açucareiro*, v.105, n.1, p.26-30
- RODRIGUES, M. L; ANDRIETTA, S. R.; MAUGERI FILHO, F., 1992, "Simulação da produtividade e rendimento em fermentação alcoólica contínua, para reatores em fermentação alcoólica contínua, para reatores operando em condições ideais e não ideais de mistura", *Stab. Açúcar, Álcool e Sub-produtos*, 10(5): 35-47
- RUIZ, E., ROMERO, I., MOYA, M. *et al.*, 2006, "Sugar fermentation by *Fusarium oxysporum* to produce ethanol", *World J Microbiol Biotechnol*, v. 2007, n.23, pp.259–267
- SÁ, M.J.P, 2003, *Produção de etanol por levedura imobilizada em sabugos de milho*; M. Sc. Dissertação; Universidade Federal de Alagoas; Maceió, Alagoas, Brasil
- SALAZAR, V.L.P; LEÃO, A.L., 2000, "Aproveitamento da fibra de coco com látex para aplicação em assentos automobilísticos", *XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental*, III-0009
- SCHIMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R.; 2001; "Biorreatores e Processos Fermentativos"; In: SCHMIDELL, W; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. *et al.*; *Biotechnologia Industrial, vol. 2, Engenharia Bioquímica*; 1.^a ed; cap. 8; São Paulo, SP; Editora Edgard Blücher Ltda
- SENAI/DN, 2000, *Elementos de apoio para o sistema APPCC (Série Qualidade e Segurança Alimentar)*, 2a ed, Brasília, Projeto APPCC Indústria Convênio CNI/SENAI/SEBRAE
- SILVA, G.P., ARAÚJO, E.F., SILVA, D.O., GUIMARÃES, W.V., 2005, "Ethanol fermentation of sucrose, sugarcane juice and molasses by *Escherichia coli* strain KO11 and *klebsiella oxytoca* strain P2", *Brazilian Journal of Microbiology* v.36, n.2005, pp.395-404

- VASCONCELOS, J. N. de, 1998, *Fermentação alcoólica com levedura imobilizada em colmos de cana-de-açúcar*. D.Sc. dissertação, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil
- VASCONCELOS, J.N., LOPES, C.E., FRANÇA, F.P., 2004, "Continuous ethanol production using yeast immobilized on sugar-cane stalks", *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 21, n. 03, pp. 357-365
- VELEZ, S., 2001, Grow your own huose - Simon Velez and bamboo architecture. Vitra Design Museum / ZERI / C.I.R.E.C.A
- VERBELEN, P.J., DE SCHUTTER, D.P., DELVAUX, F., *et al.*, 2006, *Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications*; Springer Science+Business Media B.V.
- WHEALS, A. E., BASSO, L. C., ALVES, D. M. G. *et al.*, 1999, "Fuel ethanol after 25 years"; *Trends in Biotechnology*; v.17; n.12; pp. 482-487
- VASCONCELOS, J. N. de. Guia de Aulas Práticas: Engenharia Bioquímica e Tecnologia do álcool. Laboratório de Derivados da Cana-de-Açúcar, Centro de Tecnologia da Universidade Federal de Alagoas, 2000, 26 p.
- NIGAN, J.N.; GOGOI, B.K.; BEZBARUAH, R.L.; 1998; "Short communication: Alcoholic fermentation by agar-immobilized yeast cells"; *World Journal of Microbiology & Biotechnology*; v.14; n.1998; pp.457-459