

**Universidade de Brasília - UnB  
Faculdade UnB Gama - FGA  
Curso de Engenharia de Energia**

**ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR  
DE CAQUI (*Diospyros kaki*) POR FERMENTAÇÃO DE  
*Saccharomyces cerevisiae***

**Autor: Jacques Kenemo Shako  
Orientadora: Profa. Dr. Tallita K. Nunes  
Rocha**

**Brasília, DF  
2019**



**JACQUES KENEMO SHAKO**

**ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR  
DE CAQUI (*Diospyros kaki*) POR FERMENTAÇÃO DE  
*Saccharomyces cerevisiae***

Monografia submetida ao curso de graduação em Engenharia de Energia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Energia.

Orientadora: Profa. Dra.  
Tallita Karolline Nunes Rocha

**Brasília - DF  
2019**

## CIP – Catalogação Internacional da Publicação

Jacques Kenemo Shako

Estudo cinético da produção de bioetanol a partir de caqui (*Diospyros kaki*) por fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*/ Jacques Kenemo Shako. Brasília: UnB, 2019. 52p.: il; 29,5 cm.

Monografia (Graduação) – Universidade de Brasília  
Faculdade do Gama, Brasília, 2019. Orientação: Tallita  
Karolline Nunes Rocha

1. Biocombustíveis 2. Biomassa. 3. Cinética de  
Crescimento Microbiano

I. Nunes, T. K. II. Doutora.

CDU Classificação



**ESTUDO CINÉTICO DA PRODUÇÃO DE BIOETANOL A PARTIR  
DE CAQUI (*Diospyros kaki*) POR FERMENTAÇÃO DE  
*Saccharomyces cerevisiae***

**Jacques Kenemo Shako**

Monografia submetida como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Energia da Faculdade UnB Gama - FGA, da Universidade de Brasília, apresentada e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

---

**Prof. Dra. Tallita Karolline Nunes Rocha, UnB/FGA**  
Orientadora

---

**Prof. Dra. Roseany V. Vieira Lopes, UnB/ FGA**  
Membro Interno

---

**Prof. Dra. Nizamara S. Pereira, IFB/GAMA**  
Membro Externo

**Brasília, DF**  
**2019**

Dedico este trabalho a todas as pessoas que me ajudaram diretamente ou indiretamente, e me incentivaram de alguma forma ao meu crescimento pessoal e profissional e ao meu Deus Jeová pela força de seguir adiante .

## AGRADECIMENTOS

Nenhuma palavra poderá descrever o que eu sinto neste exato momento. Um sentimento de gratidão primeiramente a Deus, por ter me mantido na trilha certa durante este projeto de pesquisa com saúde e forças para chegar até o final. Sou extremamente grato à minha família pelo apoio que sempre me deram durante toda a minha vida, um sentimento de gratidão especialmente pelos meus pais, pela sua presença e amor incondicional na minha vida mesmo sendo longe de casa. Este trabalho de conclusão de curso é uma prova vivante de que os esforços deles pela minha educação não foram em vão e valeram a pena.

Deixo um agradecimento especial a minha orientadora Profa. Dr. Tallita K. Nunes Rocha pelo incentivo e pela dedicação do seu escasso tempo ao meu projeto de pesquisa.

À professora Dra. Roseany de Vasconcelos Vieira Lopes, pela compreensão, motivação e disponibilidade em poder me ajudar durante esse trabalho.

À professora Nizamara pelo grande apoio que nos concedeu durante esse trabalho, disponibilizando o laboratório da IFB do Gama para a realização do nosso experimento.

À técnica de laboratório Paula, que durante este trabalho, auxiliou com os equipamentos necessários para a realização das análises e com o seu conhecimento de química que foi relevante durante esse projeto.

À técnica de laboratório da IFB do Gama Elaine Aquivo pela sua ajuda durante o projeto.

Também quero agradecer à Universidade de Brasília, todos os professores do meu curso pela elevada qualidade do ensino oferecido e todas as pessoas que me ajudaram diretamente ou indiretamente durante a minha formação.

“La persévérance, c’est qui rend  
l’impossible possible, le possible  
probable et le probable réalisé.”

Léon Trotsky.

## RESUMO

O estudo cinético da produção de bioetanol a partir de caqui (*Diospyros kaki*) por fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*, em escala de laboratório, foi apresentado nesse trabalho. O processo para extração do suco foi realizado por congelamento, prensagem manual e filtração. Após preparo do mosto esse foi dividido em dois tratamentos: T1 com o suco puro e T2 com o suco diluído. O processo de fermentação foi realizado em sistema de bateladas, com agitação constante, para os dois tratamentos. Avaliou-se o pH, os sólidos solúveis totais, concentração de células viáveis, concentração de células inviáveis, concentração de etanol ao longo de 31 horas e 28 horas de fermentação para T1 e T2, respectivamente. As análises físico-químicas de pH mostraram que o mosto manteve na faixa ideal para processos fermentativos. A análise da concentração de biomassa e de substrato indicam que o a fase de latência terminou em 4 horas e o ponto máximo da Fase Exponencial foi aproximadamente de 9 horas, para ambos os tratamentos. Os valores experimentais de concentração de biomassa (X), substrato (S) e/ou produto (P), apresentados em função do tempo, foram utilizados para funções por  $X = f[X(t)]$ ,  $S = f[S(t)]$  e  $P = f[P(t)]$ , que podem ser utilizadas para predizerem as determinadas concentração em qualquer instante do processo.

**Palavras-chave:** 1. Biocombustíveis 2. Biomassa. 3. Cinética de Crescimento Microbiano



## ABSTRACT

The kinetic modeling of bioethanol production from kaki (*Diospyros kaki*) using *Saccharomyces cerevisiae*, in laboratory scale, was presented in this work. The juice extraction process was performed by freezing, manual pressing and filtration. After wort preparation, it was divided into two treatments: T1 with whole juice and T2 with diluted juice. The fermentation process was performed in a batch system, with constant agitation, for both treatments. The pH, total soluble solids, viable cell concentration, lifeless cell concentration, ethanol concentration over 31 hours and 28 hours of fermentation were evaluated for T1 and T2, respectively. The physicochemical analyzes of pH showed that the must kept in the ideal range for fermentation processes. Analysis of biomass and substrate concentration indicate that the latency phase ended in 4 hours and the Exponential Phase peak was approximately 9 hours for both treatments. Experimental values of biomass (X), substrate (S) and/or product (P) concentration, presented as a function of time  $X = f[X(t)]$ ,  $S = f[S(t)]$  e  $P = f[P(t)]$ , that can be used to predict certain concentrations at any time in the process

**Keywords:** 1. Biofuels 2. Biomass. 3. Microbial Growth Kinetics

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Oferta Interna de Energia no Brasil - 2018%.....	16
Figura 2. Vias potenciais para obtenção de biocombustível.....	20
Figura 3. Fórmula molecular e forma 3D do etanol. ....	20
Figura 4. Processo simplificado de obtenção de etanol. Adaptado de (BNDES, 2008)23	
Figura 5. Etapas de crescimento da levedura. ....	24
Figura 6. Esquema das reações enzimáticas realizadas pela levedura para conversão da glicose em etanol. ....	26
Figura 7. Modelo das curvas de X, S e P obtido em cinética de processo fermentativos .....	28
Figura 8. Gelatina comercial utilizada para a etapa de clarificação.....	32
Figura 9 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> liofilizada utilizada como inóculo no processo de fermentação.....	33
Figura 10. Disposição das quatro bateladas durante fermentação, na ordem: T2A1, T1A1, T1A2 e T2A2. ....	34
Figura 11. Câmara de Neubauer.....	36
Figura 12. Amostras das 4 bateladas diluídas 10x nos balões volumétricos e a duas amostras diluídas 100 x, com a solução de Azul de Metileno, nos béqueres .....	36
Figura 13. Gabarito da Câmara de Neubauer. ....	37
Figura 14. Ebuliômetro.....	38
Figura 15. Processo de destilação do mosto de caqui fermentado. ....	39
Figura 16. Amostra do suco de caqui utilizado como mosto no processo de fermentação.....	40
Figura 17. Desenvolvimento do perfil de pH médio ( $pH_m$ ), com desvio padrão, para os Tratamentos 1 e 2 durante fermentação .....	41
Figura 18. Distribuição do °Brix médio ( $^{\circ}Brix_m$ ) e da concentração de substrato no mosto (S), em g de açúcar por litro de mosto, para T1 e T2, durante a fermentação. .	43
Figura 19. Ajuste polinomial de $S = função(t)$ , para os Tratamentos 1 (esquerda) e 2 (direita) .....	44
Figura 20. Ajuste polinomial de $X = função(t)$ , para os Tratamentos 1 (esquerda) e 2 (direita) .....	44
Figura 21. Curva cinético de crescimento microbiano, em escala semilogarítmica, para os Tratamentos 1 (esquerda) e 2 (direita) .....	45
Figura 22. Curva cinética de morte da levedura, representada em ordenadas lineares para os Tratamentos 1 (esquerda) e 2 (direita). ....	46
Figura 23. Desenvolvimento do perfil do Teor alcoólico médio ( $\%álcool_m$ ), com desvio padrão, para os Tratamentos 1 e 2 durante fermentação. ....	48
Figura 24. Ajuste polinomial de $P = função(t)$ , para os Tratamentos 1 (esquerda) e 2 (direita) .....	48

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do etanol.....	21
Tabela 2. Evolução da produção agroindustrial no Brasil.....	22
Tabela 3. Principais componentes na composição química do caqui ( <i>Diospyros kaki</i> L.), in natura, .....	29
Tabela 4. Comparação do teor de sólidos solúveis (°Brix) de algumas variedades de caqui ( <i>Diospyros kaki</i> ), in natura.....	30
Tabela 5. Valores de pH para as amostras 1 e 2 e valores de pH médio (pH <sub>m</sub> ), com desvio padrão, para o Tratamento 1, durante 31 horas de fermentação .....	40
Tabela 6. Valores de pH para as amostras 1 e 2 e valores de pH médio (pH <sub>m</sub> ), com desvio padrão, para o Tratamento 2, durante 28 horas de fermentação .....	40
Tabela 7 °Brix para as amostras 1 e 2 e °Brix médio (°Brix <sub>m</sub> ), com desvio padrão, para o Tratamento 1, durante 31 horas de fermentação. ....	42
Tabela 8. °Brix para as amostras 1 e 2 e °Brix médio (°Brix <sub>m</sub> ), com desvio padrão, para o Tratamento 2, durante 28 horas de fermentação. ....	42
Tabela 9. Teor alcoólico para as amostras 1 e 2 e Teor alcoólico médio (%álcool <sub>m</sub> ), com desvio padrão, para o Tratamento 1, durante 31 horas de fermentação .....	47
Tabela 10. Teor alcoólico para as amostras 1 e 2 e Teor alcoólico médio (%álcool <sub>m</sub> ), com desvio padrão, para o Tratamento 2, durante 28 horas de fermentação .....	47

**LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

ANEEL – Agência Nacional de Energia Elétrica

ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ATP – trifosfato de adenosina

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}/ \text{C}_2\text{H}_6\text{O}$  – etanol

$^{\circ}\text{C}$  – graus Célsius

PNE – Plano Nacional de Energia

$^{\circ}\text{Brix}$  – Grau Brix

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	ii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT .....	v
LISTA DE FIGURAS .....	vi
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	14
2. OBJETIVOS .....	15
2.1 Objetivo geral .....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
3.1 MATRIZ ENERGÉTICA BRASILEIRA.....	16
3.2 BIOCOMBUSTÍVEL .....	17
3.2.1 Breve histórico de legislação para biocombustíveis .....	18
3.2.2 Biomassa para geração de energia.....	19
3.3 PRODUÇÃO DE ETANOL .....	20
3.3.1.Etanol de primeira geração .....	22
3.3.2 Processo de fermentação para obtenção de etanol .....	23
3.3.2 Levedura .....	26
3.4 ESTUDO CINÉTICO EM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO .....	27
3.5 CAQUI.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1 PRODUÇÃO DO SUCO DE CAQUI.....	31
4.2 CLARIFICAÇÃO e FILTRAÇÃO DO SUCO .....	31
4.3 PREPARO DO MOSTO .....	32
4.5 Amostragem E INOCULAÇÃO DO MOSTO.....	33
4.6 FERMENTAÇÃO DO MOSTO .....	34
4.7 ANÁLISES REALIZADAS DURANTE A FERMETNAÇÃO.....	34
4.7.1 Análise de pH.....	35
4.7.2 Análise do teor de sólidos solúveis .....	35
4.7.3 Determinação da Concentração Celular.....	35
4.7.4 Teor alcoólico .....	37
4.8 DESTILAÇÃO.....	38
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
6 CONCLUSÃO.....	49
6.1 PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	50

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com o relatório *Brundtland*, o desenvolvimento sustentável é um processo de transformação, no qual a exploração dos recursos, a direção dos investimentos, a orientação do desenvolvimento tecnológico e a mudança institucional se harmonizam e reforçam o potencial presente e futuro. Esse processo de transformação deve atender às necessidades do presente sem comprometer as possibilidades das gerações futuras de atenderem as suas próprias necessidades (BARBOSA,2008).

O principal argumento, que justifica a necessidade do desenvolvimento sustentável, está baseado no crescimento populacional em todo o mundo. Já é comprovado que o crescimento da população mundial resulta em um aumento significativo no uso de energia e, por consequência, causa inúmeros impactos no meio ambiente, tais como o efeito de estufa. Segundo a análise realizada pela Agência Internacional de Energia, até 2035, se não houver algumas mudanças em relação às políticas governamentais, a necessidade de energia terá um crescimento maior do que 50%, se comparado com o início do século XXI (SANTOS et al, 2013).

Em relação às mudanças indispensáveis na produção mundial de energia, nas últimas décadas, inúmeros estudos foram impulsionados ao redor do mundo para investigar diversas biomassas como fonte de energia (MME, 2016). A biomassa é considerada também como sendo uma alternativa para a obtenção de combustível líquido, também denominado de biocombustível, dentro de uma série de combustíveis com potencial de utilização, visto a sua elevada capacidade de reduzir a dependência do uso dos combustíveis fósseis, responsáveis pela descarga de gases poluentes na atmosfera terrestre e inúmeros problemas associados ao meio ambiente (SANTOS et al, 2013).

Um biocombustível muito conhecido em todo mundo e objeto de estudo desse trabalho é o etanol ( $C_2H_5OH$ ), que também é conhecido como álcool etílico ou álcool, que é uma substância orgânica que possui um grupo hidroxila (OH) ligado a um átomo de carbono saturado. O etanol não é um produto encontrado de uma forma pura na natureza, ele é obtido a partir do processo de fermentação de açúcares encontrados em espécies vegetais como cana-de-açúcar, milho, beterraba, batata, trigo e mandioca (BASTOS,2007). O uso de etanol no Brasil foi incentivado por volta de 1975 com o programa Proálcool, tornando o país um dos maiores produtores mundiais de etanol e tendo como principal objetivo a redução da importação de barris de petróleo (LEITE, LEAL, 2007; SANTOS et al,2013).

Um exemplo da biomassa mais utilizada no Brasil é a cana-de-açúcar; que é utilizada para a obtenção de etanol, embora haja grande competição com as indústrias alimentícias. Desta maneira, tornam-se relevantes os estudos de novas espécies vegetais para a quantificação de seu potencial e geração de bioetanol. Com o intuito de estudar novas biomassas para obtenção do bioetanol, associado à valorização das culturas do bioma Cerrado, neste trabalho foi escolhido o caqui para produção de etanol de primeira geração (CAVALCANTE et al, 2008). Portanto, diante do cenário energético mundial, da importância das biomassas como fontes de energia e o desenvolvimento de novas matérias-primas para produção de etanol no Brasil, esse trabalho tinha com objetivo principal de analisar o processo produtivo de bioetanol a partir de caqui (*Diospyros kaki*), estudando a cinética do processo fermentativo por *Saccharomyces cerevisiae*, em escala de laboratório.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo principal desse trabalho foi realizar o estudo cinético da produção de bioetanol a partir de caqui (*Diospyros kaki*) por fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*, em escala de laboratório.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Os objetivos específicos desse trabalho foram:

1. Apartar uma metodologia padrão que determine a concentração de biomassa aos experimentos;
2. Definir as concentrações de biomassa, substrato e produto durante aproximadamente 24 horas de fermentação do caqui;
3. Elaborar o perfil cinético de pH, °Brix, Contagem de leveduras e Teor alcoólico para o processo de produção de etanol a partir de caqui.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 MATRIZ ENERGÉTICA BRASILEIRA

Compreende-se por Matriz Energética como sendo a energia disponibilizada para ser transformada, distribuída e posteriormente consumida nos processos produtivos. De forma geral, essa matriz é definida como uma representação da quantidade de recursos energéticos oferecidos por um país ou por uma região, sendo eles renováveis ou não (EPE, 2016).

A matriz energética mundial das últimas décadas mostra o uso descontrolado de fontes de energia fósseis, fato que acarretou algumas consequências consideráveis no meio ambiente, por exemplo, o efeito de estufa. Diante dessa situação, a utilização de biocombustíveis a partir das fontes renováveis vem sendo destacado e utilizado como uma alternativa mundial de energia para remediar a escassez das reservas de petróleo e para reduzir a emissão de gases tóxicos (ANTUNES, s/d.).

Com a preocupação mundial em relação ao impacto causado pelo uso de energias fósseis, inúmeros estudos foram impulsionados ao redor de mundo utilizando fontes de energia renováveis para diminuir ou minimizar a poluição e vários outros impactos ambientais causados pelo uso destes combustíveis. No Brasil para remediar esse problema de dependência da utilização dos derivados de petróleo, foi empregado o uso de biocombustíveis na matriz energética brasileira, fazendo assim com que os indicadores de emissões de CO<sub>2</sub> possam ficar abaixo da média mundial (MME, 2016). A Figura 1 demonstra a estrutura da Oferta Interna de Energia (OIE) no Brasil, durante o ano de 2018.

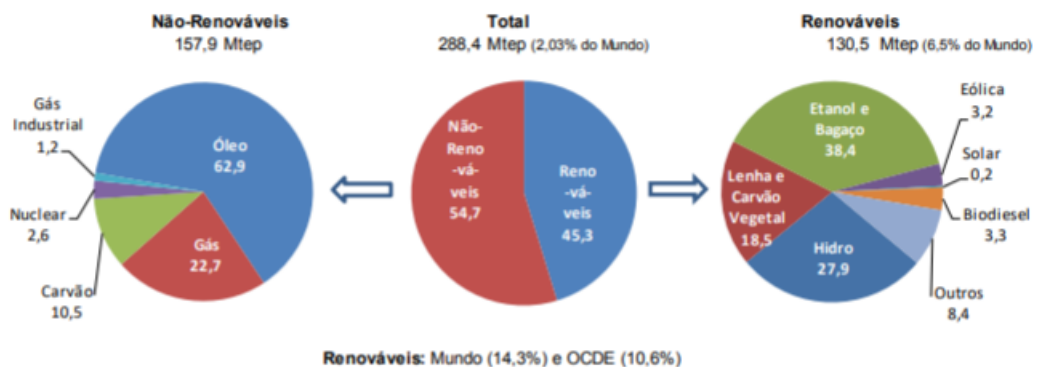


Figura 1. Oferta Interna de Energia no Brasil - 2018%  
Fonte: Resenha Energética, 2018



O gráfico (Figura 1) indica que as fontes renováveis de energia são de 10,6% dos países da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico ou Económico (OCDE) e de 14,3% na média mundial (RESENHA ENERGÉTICA,2018). No entanto, percebe-se no gráfico do centro, que no Brasil quase a metade da matriz energética brasileira, aproximadamente 45,3%, é derivado das fontes renováveis. Entre essas fontes estão somadas: lenha, carvão vegetal, hidráulica, derivados de cana e outras renováveis, como indica o gráfico da direita (Figura 1). Esse perfil brasileiro na sua matriz energética pode ser justificada pela produção de etanol, à partir da cana-de-açúcar. Afinal, essa biomassa é a segunda principal fonte de energia no Brasil, ultrapassando a energia hidráulica e ficando atrás apenas do petróleo (BEN, 2018), como mostra a Figura 1.

### 3.2 BIOCMBUSTÍVEL

A história de biocombustíveis no Brasil iniciou por volta dos anos 1905 e 1925, com um teste que foi realizado com álcool combustível. A partir de 1931, foi estabelecido pelo governo brasileiro a obrigatoriedade de adição de 5% de etanol na gasolina importada pelo país; depois de alguns anos foi estabelecido o decreto-lei nº 737 que ampliou essa obrigatoriedade à gasolina nacional, ou seja, gasolina produzida dentro do país. Depois da descoberta de algumas regiões petrolíferas no mundo, o interesse para o biocombustível foi reduzido e com a primeira crise de petróleo que ocorreu em 1975, surgiram os novos interesses à procura de novas alternativas ao petróleo (MAIA,2010).

Nesse mesmo ano, o Brasil lançou o maior programa comercial de uso de biomassa para fins energéticos no mundo chamado de programa Nacional do Álcool (Proálcool), que teve como objetivo tentar remediar a crise do petróleo que tinha afetado o mundo inteiro. O Brasil com as suas potencialidades (clima, geográfica, terras etc.) e tecnologia desenvolvida pela Petrobrás, o Brasil se tornou o maior produtor mundial do biocombustível etanol. A primeira geração de biocombustíveis engloba os derivados de matérias-primas, pela sua constituição em açúcar, amido e óleo, passíveis de serem convertidos por hidrólise/fermentação e prensagem/esterificação. Podem ser misturados com gasolina ou diesel, na forma simples ou quase pura. A segunda geração trata dos produzidos pela biomassa lignocelulósica de plantas herbáceas e perenes, através de tecnologias de hidrólise/fermentação, gaseificação ou pirólise.

Mesmo diante das dificuldades empregadas, o setor sucroalcooleiro nacional se destaca, correspondendo a 20% de produção global e 40% da exportação mundial.

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol, e o *ranking* é liderado pelos Estados Unidos. O estado de São Paulo foi o maior produtor brasileiro de etanol, seguido por Goiás e Minas Gerais (BRASIL, 2015; CONAB, 2016).

No Brasil, entre 2014 e 2015, ocorreu o aumento de 4,9 % na produção de cana-de-açúcar. No entanto, a produção de açúcar em toneladas teve um declínio de 5,8%. Esse fato é justificado pelo aumento na produção de etanol em 6,3% no país (CONAB, 2016).

### **3.2.1 Breve histórico de legislação para biocombustíveis**

A preocupação incessante com as questões ambientais, junto com a volatilidade dos preços do petróleo e a procura pela segurança energética, entusiasma alguns países, como Brasil, Japão, Coreia do Sul, Argentina, Índia, Estados Unidos, União Europeia, a implementarem algumas políticas de incentivo ao uso de biocombustíveis. No Brasil, a Política Energética Nacional, determinada pela Lei nº 9.478/1997, contempla o aproveitamento das fontes renováveis (BRASIL, 1997). Em seu Artigo 1º, destacam-se dentre os objetivos traçados em 1997 para o aproveitamento racional das fontes de energia:

*I – preservar o interesse nacional; II – promover o desenvolvimento, ampliar o mercado de trabalho e valorizar os recursos energéticos; IV – proteger o meio ambiente e promover a conservação de energia; VIII – utilizar fontes alternativas de energia, mediante o aproveitamento econômico dos insumos disponíveis e das tecnologias aplicáveis.*

Vale ressaltar que os objetivos especificamente direcionados aos biocombustíveis foram acrescentados posteriormente à Política Energética Nacional. Primeiramente, cita-se a meta inserida através da Lei nº 11.097, de 2005 (BRASIL, 2005a):

*XII – incrementar, em bases econômicas, sociais e ambientais, a participação dos biocombustíveis na matriz energética nacional.*

Assinalam-se também os seguintes objetivos que foram incluídos pela Lei nº 12.490, de 2011 (BRASIL, 2011):

*XIII garantir o fornecimento de biocombustíveis em todo o território nacional; XIV incentivar a geração de energia elétrica a partir da biomassa e de subprodutos da produção de biocombustíveis (...); XV promover a competitividade do País no mercado internacional de biocombustíveis; XVI atrair investimentos em infraestrutura para transporte e estocagem de biocombustíveis; XVIII mitigar as emissões de gases causadores de efeito estufa e de poluentes nos setores de energia e de transportes, inclusive com o uso de biocombustíveis.*

No dia 27 de dezembro de 2017, foi sancionado, com vetos, a lei Lei nº 13.576/2017 com objetivo de expandir a produção de biocombustíveis no Brasil por intermédio de uma adição obrigatória de etanol e biodiesel aos combustíveis de fontes fósseis, com a gasolina. Ademais, essa lei origina a Política Nacional de Biocombustíveis que estimula a produção de etanol e biodiesel, além de determinar as metas a serem cumpridas anualmente para reduzir as emissões de gases que causa o famoso efeito de estufa (BRASIL,2017).

As vantagens dos biocombustíveis contemplam benefícios socioambientais. Entre eles estão a fixação do homem no campo e a redução das emissões de CO<sub>2</sub> e particulados. Entre as desvantagens estão a alta disponibilidade de água necessária para irrigação dos combustíveis de primeira geração ou consumida na evaporação dos de segunda geração, além da competição com a produção de alimentos e os subempregos criados nas colheitas, principalmente em países do terceiro mundo (VIEGA et al, 2018).

### **3.2.2 Biomassa para geração de energia**

Biomassa é definida como toda matéria gerada através do processo físico-químico denominado fotossíntese e seus derivados, ou seja, são materiais orgânicos, biológicos, como as biomassas vegetais que contém energia química transformada a partir da energia cedida pela radiação solar (BARROS, 2008). A origem da biomassa também se dá a partir de resíduos sólidos urbanos como: animais, vegetais, indústrias e florestais (BARBOSA, 2008).

Durante alguns anos o uso de biomassa foi perdendo o seu *ranking* de liderança em relação ao carvão, e com o crescimento incessante do uso do petróleo e do gás natural. Mas, atualmente, percebe-se que inúmeros países, sendo eles

desenvolvidos ou não, tentam integrar o uso de energia renovável em suas matrizes energéticas. Podendo assim, remediar o uso de derivados do petróleo e contribuir com a redução do efeito de estufa (BARBOSA, 2008).

A Agência Internacional de Energia (AIE) estima que dentro de aproximadamente 20 anos cerca de 30% do total da energia consumida pela humanidade será proveniente das fontes renováveis. Hoje, essa parcela representa 14% da energia produzida no mundo (Figura 1), e onde a biomassa tem 11,7% na participação da oferta (Ministério de Minas e Energia – BEN, 2004).

Há inúmeras maneiras de converter a energia de biomassa em várias outras formas de energia. A Figura 2 mostra o diagrama de blocos, com os principais processos, para a obtenção de combustível a partir de fontes renováveis.

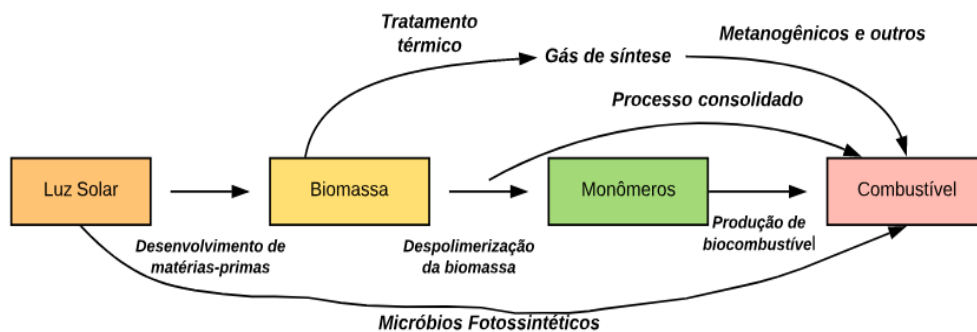


Figura 2. Vias potenciais para obtenção de biocombustível.  
Fonte: COUNCIL, 2007

### 3.3 PRODUÇÃO DE ETANOL

O etanol cuja fórmula molecular é  $C_2H_5OH$ , também conhecido como álcool etílico e no dia a dia conhecido como álcool, é um líquido incolor, límpido e inflamável, não gera fuligem, possui alta volatilidade, apresentando cor azulada, odor ardente característico, muito quente e pouco luminoso no momento da queima (SANTOS et al, 2013; VÁSQUES, 2007). A Figura 3 apresenta a representação da fórmula molecular e a geometria molecular em 3D do etanol.

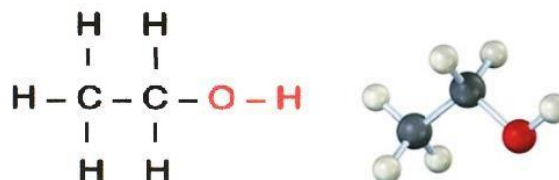


Figura 3. Fórmula molecular e forma 3D do etanol.  
Fonte: Adaptado de (MCMURRY, 2012).

A substância orgânica etanol é obtida pelo processo de fermentação de açúcares, principalmente hexoses e /ou polissacarídeos encontrados nos vegetais como cereais, beterrabas, mandioca, milho, grãos e cana-de-açúcar, seguida da destilação. O etanol tem em sua estrutura o grupo funcional hidroxila (-OH), associado ao carbono saturado da cadeia de hidrocarbonetos da substância e integra a família dos álcoois (DE SOUZA JR, 2007). A Tabela 1 apresenta algumas propriedades físicas e químicas do etanol.

Tabela 1. Propriedades físico-químicas do etanol.

<b>Propriedade</b>	<b>Característica</b>
Fórmula molecular	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH
Peso molecular	46 g/mol
pH	6-7
Densidade API	47,17
Temperatura de ebulição (1 atm)	78,32°C
Temperatura de fusão ( 1 atm)	-117,22°C
Temperatura de auto ignição	793°C
Temperatura de inflamabilidade	12°C
Ponto de congelamento	-114,1°C
Limite de estabilidade	300°C
Tensão de vapores (0°C)	12,00 mmHg
(20°C)	44,0 mmHg
Octanagem (ASTM)	99
Índice de cetano	10
Razão ar combustível	9,0:1,0

Fonte: Adaptado de ( SOUZA JR, 2007)

Os choques dos preços do petróleo, entre 1973 e 1979, despertou o interesse crescente de empresas, governos e pesquisadores em relação ao etanol. Esse interesse envolveu objetivos diversos, entre eles: o controle de impactos ambientais ligados à emissão de substâncias que prejudicam o meio ambiente, remediar o problema relacionado ao esgotamento de combustíveis fósseis que é uma fonte não-renovável (ETANOL E BIOELETRICIDADE, 2010). Em busca de novas soluções para a crise do petróleo, o governo brasileiro estabeleceu em 1975 um programa nacional do Álcool (Proálcool) (CRUZ, 2016). O objetivo primordial deste programa na sua primeira fase entre 1975 e 1979 era produzir álcool etílico anidro para ser adicionado à gasolina, estender e mecanizar os processos produtivos nos canaviais e desenvolver tecnologia para a fabricação de automóveis movidos a etanol hidratado (CRUZ,2016).

A segunda fase de Proálcool entre 1980 e 1985 teve por objetivo alcançar a produção de 10,7 bilhões de litros de álcool. Esse período foi caracterizado pela elevação do preço de barril do petróleo e escassez do insumo no mercado internacional, causada pelo declínio da produção do petróleo, associada ao conflito político religioso entre Irã e Iraque (CRUZ, 2016). O etanol hidratado, cresceu entre 1979 e 1989 até atingir o seu ponto culminante, porém, com a aumento da demanda e

a diminuição da oferta criou uma crise de desabastecimento, devido à redução bruta dos recursos públicos que foram investidos no crescimento do Proálcool. Com o decaimento de preço do petróleo no mercado internacional e um acréscimo da produção deste último acarretou uma diminuição da confiança dos clientes, e uma redução considerável das vendas dos automóveis movidos a álcool (SHIKIDA, BACHA, 1999; PIACENTE, 2006).

A Tabela 3 mostra o crescimento da indústria sucroalcooleira logo depois o surgimento do Proálcool, dando ênfase ao aumento da produção de álcool no Brasil, nos anos de 1975, por exemplo, o país produziu cerca de 609,97 m<sup>3</sup> de álcool só no primeiro ano do implante do Proálcool, e depois de 10 anos, o país produziu 11.219,16 m<sup>3</sup>. A Tabela 2 mostra os dados da indústria sucroalcooleira no Brasil nos anos de 1975, 1980, 1985, 1995/96 e 2006.

Tabela 2. Evolução da produção agroindustrial no Brasil.

Variável	1975	1980	1985	1995/96	2006
Área colhida(ha)	1.860.401	2.603.292	3.798.117	4.216.427	5.682.297
Quantidade colhida(mil t)	79.959,02	139.584,52	229.882,04	259.806,70	407.466,57
Rendimento(t/ha)	42,98	53,62	60,53	61,62	71,71
Cana moída (mil t)	78.074,64	118.163,01	225.541,06	269.698,55	428.816,92
Produção de açúcar (mil t)	6.548,17	7.373,25	7.988,23	13.141,49	30.629,83
Produção de álcool total (m <sup>3</sup> )	609,97	3.551,41	11.219,16	13.573,60	17.909,82

Adaptado de (SANTOS, 2016).

Os dados da Tabela 2 comprovam o crescimento da indústria sucroalcooleira no Brasil logo depois o surgimento do Proálcool, com ênfase no aumento da produção de álcool nos anos de 1975. Nesse ano, o país produziu cerca de 609,97 m<sup>3</sup> de álcool e depois de 10 anos do Proálcool, o Brasil produziu cerca de 11.219,16 m<sup>3</sup> do biocombustível.

### 3.3.1. Etanol de primeira geração

Para que o etanol possa ser comercializado em suas mais diversas formas, ele precisa passar por inúmeros testes que comprova a sua qualidade, assim permitindo que ele seja usado de uma maneira segura. Cada tipo desse produto possui um tipo de especificação própria. A resolução ANP 36 de 2006 estabelece as especificações que o etanol carburante deve atender. Dentro dessas especificações, podemos citar: a cor, a graduação alcóolica, acidez, pH, teor de hidrocarbonetos, metais, entre outros.

O etanol de primeira geração pode ser obtido principalmente a partir do processo da fermentação de açúcares ou amidos extraídos de culturas como: de cana-de-açúcar, para o caso do Brasil e do milho, para o caso dos Estados Unidos (HORST,

2013). O Brasil é considerado um dos maiores produtores mundiais desse biocombustível, perdendo apenas para os Estados Unidos (EPE, 2016).

O etanol da primeira geração apresenta alguns benefícios como: a sua baixa porcentagem de emissões de gases tóxicos no momento da queima, a sua capacidade em satisfazer a demanda mundial de uso de energia renovável com custo menor. Além disso, o etanol da primeira geração possui algumas desvantagens consideradas mínimas em relação ao uso de combustível fóssil como: a competição com a indústria alimentícia acarretando o aumento do preço de alimentos, potencial de impacto negativo na biodiversidade e aceleração do desmatamento (SIMS et al, 2008).

A Figura 3 apresenta o diagrama de blocos para a produção do etanol de primeira geração a partir de cana-de-açúcar. As cinco principais etapas desse processo são: (i) recebimento e limpeza da cana-de-açúcar, (ii) obtenção do caldo que acontece durante o processo de moagem, (iii) processo de fermentação, (iv) destilação, (v) retificação e, caso seja obtido o etanol anidro, ocorrerá ainda (vi) o processo de desidratação (AQUINO et al, 2014).

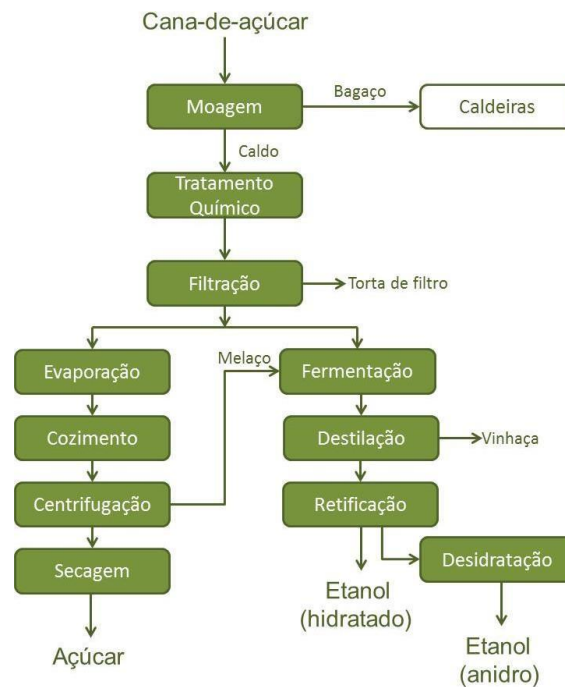


Figura 4. Processo simplificado de obtenção de etanol. Adaptado de (BNDES, 2008)

### 3.3.2 Processo de fermentação para obtenção de etanol

A fermentação alcoólica é um processo que transforma os açúcares em etanol por meio de enzimas e leveduras (JUNQUEIRA et al, 2009a). A levedura obtém energia química celular na forma de trifosfato de adenosina (ATP) relevante para sua sobrevivência e que mais tarde poderá ser utilizada para fisiologia e biossíntese (LIMA

et al, 2001). Alguns cuidados são relevantes durante o processo da fermentação para obtenção do etanol como: a temperatura reacional que deve estar por volta de 28 e 35 °C, o pH em uma faixa razoável, sendo de 4 a 5 considerada ótima, visto que o mosto industrial apresentam um pH na faixa de 4,5 e 5,5 (AMORIM, BASSO, ALVES, 1996; SANTOS 2008). Com essas propriedades ajustadas o crescimento da levedura é favorecido e segue quatro principais etapas apresentadas na curva de crescimento (Figura 5).

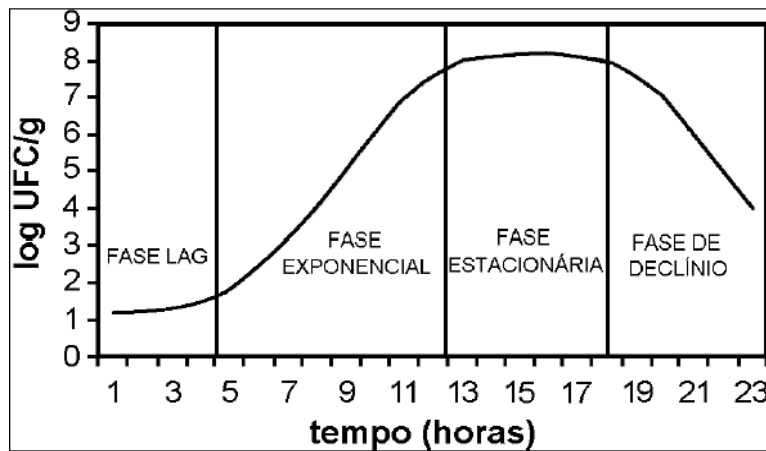


Figura 5. Etapas de crescimento da levedura.  
Fonte: W.S. ROBAZZA, J.T. TELEKEN, G.A. GOMES (2010)

A primeira fase da Figura 5, conhecida como fase *lag*, é a fase de crescimento do tamanho dos microrganismos e das suas funções metabólicas. Essa fase é destacada pela adaptação e reconstituição das leveduras e é importante salientar que nessa fase não há multiplicação de células. A segunda fase, denominada de fase *log* ou fase exponencial de crescimento, é considerada como sendo a fase mais relevante para o rendimento do processo produtivo, visto que o crescimento microbiano consiste na multiplicação exponencial do meio de cultura.

A fase estacionária é caracterizada pelo baixo consumo de energia, a estabilidade de número de células da cultura durante um determinado tempo, acúmulo de produtos tóxicos e a finalização de nutrientes do meio. E na última fase que é a fase de morte, conhecido também como sendo a fase de declínio; o número de células que morrem superam o de células novas.

Durante o processo de fermentação alcoólica a levedura mais cultivada é a *Saccharomyces cerevisiae* (ROSSELL, 2006). Essa espécie de microrganismo apresenta um rendimento considerado bom para o processo de fermentação e pode atingir proximamente 90-92 % do rendimento ideal. No entanto, para garantir o rendimento do processo, é importante o controle de alguns parâmetros como: tempo



de fermentação, eficiência, controle de temperatura, teor de açúcares residuais e redução de °Brix (RIBEIRO et al, 1999).

Segundo Ernandes e Garcia (2009), a fermentação alcoólica realizada para a obtenção do etanol é representada pela equação global da reação de Gay-Lussac, como:



A reação de Gay-Lussac mostra que a fermentação da glicose, com fórmula molecular de  $C_6H_{12}O_6$ , produz: (i) duas moléculas de álcool etílico, representado pela fórmula  $C_2H_5OH$ ; (ii) duas moléculas de dióxido de carbono ( $CO_2$ ), (iii) energia para a levedura, na forma de duas moléculas de ATP; e (iv) duas moléculas de água ( $H_2O$ ) (BORZANI et al, 2001; ERNANDES; GARCIA, 2009). As reações parciais para produção de etanol por fermentação da glicose, que ocorrem na célula do microrganismo fermentativo, são apresentadas no esquema da Figura 6.

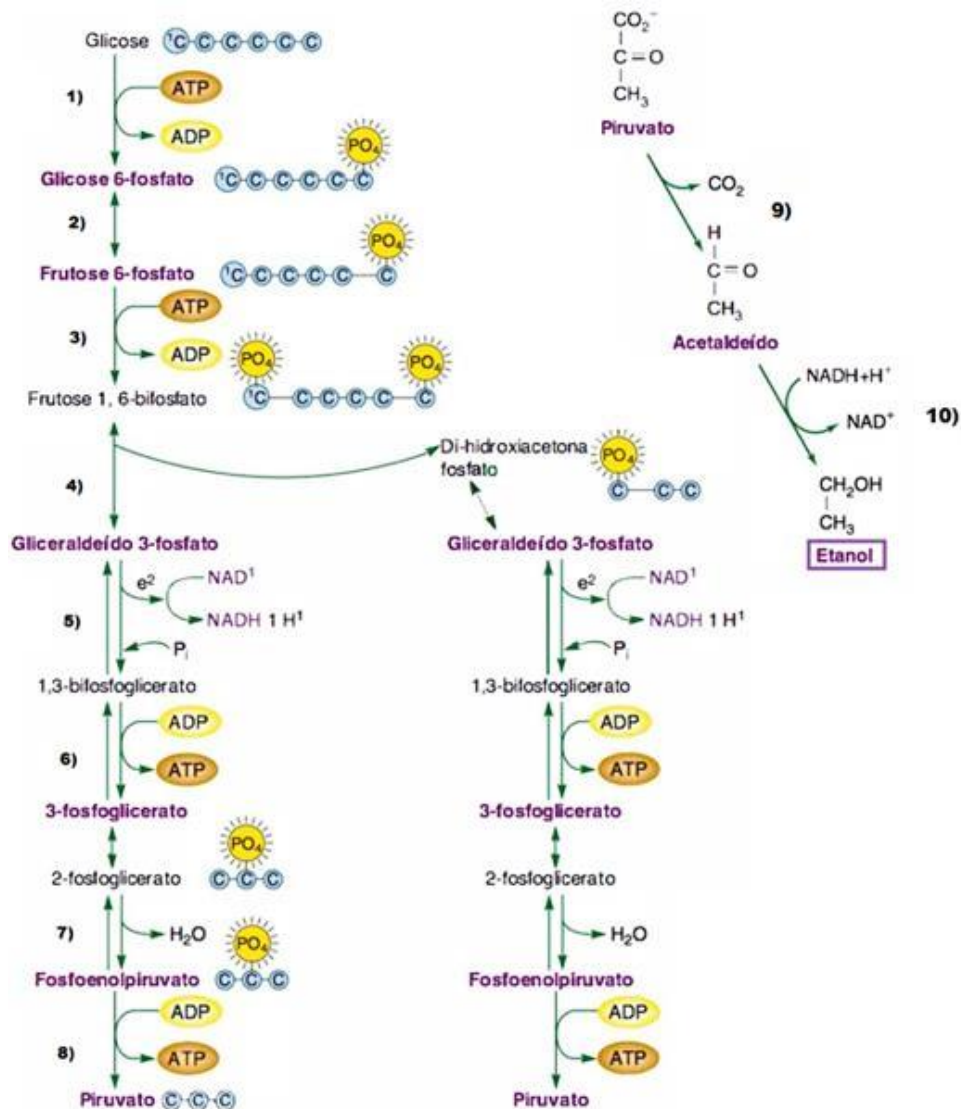


Figura 6. Esquema das reações enzimáticas realizadas pela levedura para conversão da glicose em etanol.

Fonte: Adaptado de (BROOKS et al, 2014)

A primeira etapa da glicólise consiste na fosforilação da glucose, em glucose-6-fosfato precursor metabólico das próximas reações, em presença de ATP. Esta segunda etapa consiste na isomerização da glucose. A glucose-6-fosfato é transformada em frutose-6-fosfato, assim ocorrendo a transformação de aldeído em cetona. Etapa (3) - considerado o ponto mais importante de controle de glicólise, a enzima fosfofrutquinase-1 catalisa a transferência irreversível de um fosfato de ATP à frutose-6-fosfato para liberar a frutose-1,6-difosfato. Etapa (4) é caracterizada pela quebra da frutose-1,6-difosfato em duas moléculas de três carbonos (trioses) diferentes que são: o gliceraldeído-3-fosfato, uma aldose e a dihidroxiacetona fosfato, uma cetose. Etapa (5) - esta etapa de oxidação do gliceraldeído-3-fosfato encerra a única oxidação que ocorre durante a glicólise. Durante o processo, o gliceraldeído-3-fosfato é oxidado e simultaneamente fosforilado resultando em transferência de energia liberada pela oxidação e transferida para a formação de uma nova ligação rica em energia, liberando elétrons que reduzem o NAD<sup>+</sup> a NADH (Dinucleótido de nicotinamida e adenina). Etapa (6) – Acontece a produção de ATP a partir de outra fosforilação, formando um precursor metabólico, assim como acontece na etapa (7). Etapa (8) - Nessa fase ocorre a última fosforilação do precursor metabólico anterior, onde a clivagem oxidativa de uma molécula de glucose resulta em duas moléculas de piruvato. A partir da formação de piruvato com as reações enzimáticas anteriores, chega-se à etapa final de conversão. Na etapa (9), tem-se o piruvato que é descarboxilado em acetaldeído, que será utilizado para a oxidação do NADH, resultando assim, na fase (10), formação do etanol (BROOKS et al, 2014).

### 3.3.2 Levedura

As leveduras são microrganismos eucarióticos unicelulares, heterotróficos e presentes naturalmente no meio ambiente. Essas podem ser consideradas como sendo os microrganismos facultativos; isto quer dizer, que podem realizar a respiração na presença ou ausência de gás oxigênio. Então, podem transformar o açúcar em etanol, mesmo na falta de oxigênio. Vale destacar que além de produzindo o etanol, durante o processo fermentativo liberam também dióxido de carbono, água e alguns subprodutos como o glicerol e os ácidos orgânicos (ALBARELLI, 2013).

Entre as espécies desse microrganismo, a *Saccharomyces cerevisiae* é considerada como a levedura mais utilizada para o processo da fermentação e a

obtenção do etanol. Essa consegue fazer a fermentação de açúcar à etanol resultando em altos rendimentos, mesmo em aerobiose (BORZANI et al, 2001; DIEN; COTTA; JEFFRIES, 2003; apud BALAT, 2011).

No entanto, para obter rendimentos altos o setor sucroalcooleiro, em conjunto com as indústrias de biotecnologia, pesquisa diversos parâmetros do processo de fermentação que impactam na conversão do açúcar em etanol pelas várias espécies de leveduras. Alguns parâmetros importantes do processo são: taxa de crescimento, produtividade, rendimento, estabilidade genética, faixa de temperatura, faixa de pH, tolerância ao álcool, estabilidade genética e tolerância a inibidores. Então, os estudos sobre a cinética dos processos de produção de etanol são importantes para descrever quais espécies de microrganismos são aptos para realizar a fermentação da glicose em bioetanol (BORZANI et al, 2001; DIEN; COTTA; JEFFRIES, 2003; apud BALAT, 2011).

### 3.4 ESTUDO CINÉTICO EM PROCESSO DE FERMENTAÇÃO

Durante a fermentação alcoólica, os açúcares (substrato) são transformados em etanol (produtos) e parte do ATP (energia) gerado é usado pela levedura para sua multiplicação, ou seja, para a produção de células (biomassa). Assim, as concentrações de substrato (açúcar), produto (etanol) e biomassa (células) variam com o tempo da fermentação (BORZANI et al, 2001).

A cinética de biotransformação em fermentação está diretamente relacionada com a velocidade de consumo de substrato e de aparecimento de produto e no caso mais específico de processos de fermentação utilizando leveduras, também com a velocidade de crescimento celular. As condições do meio em processos fermentativos, comumente denominado de mosto, causam efeitos na adaptação e multiplicação das células de levedura, e conseqüentemente, no processo de transformação do substrato em produto. (ANDRIETTA, 2007). Portanto, o estudo cinético de um processo de biotransformação é importante, pois, permite a aquisição de conhecimento básico do processo.

A Figura 7 apresenta a curva de crescimento de biomassa (B), a curva de consumo de substrato (S) e a curva de formação produto (P), todas em função do tempo, comumente obtidas em estudos cinéticos de processos fermentativos

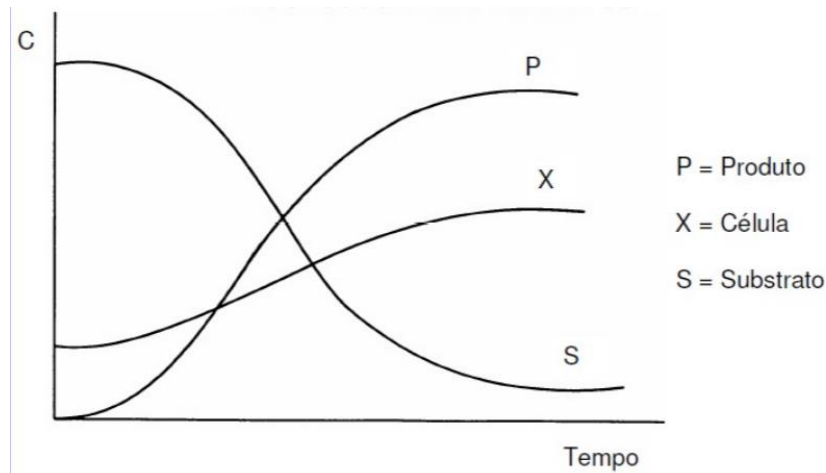


Figura 7. Modelo das curvas de X, S e P obtido em cinética de processo fermentativos  
Fonte: BORZANI et al, 2001

Para obter as curvas apresentadas no gráfico da Figura 7, os valores experimentais de concentração de um ou mais componentes do processo fermentativo, ou seja, a concentração de biomassa (X), substrato (S) e/ou produto (P) são representados em função do tempo. A partir dos dados experimentais de concentração, variando com o tempo de fermentação, é possível traçar as curvas de ajuste, indicadas por  $X = f[X(t)]$ ,  $S = f[S(t)]$  e  $P = f[P(t)]$  (BORZANI et al, 2001).

Nascimento et al (2009) recomenda que o acompanhamento nos estudos cinéticos siga os seguintes critérios: (i) substrato chamado de S eleger-se o composto que limita a reação, (ii) X como a concentração do microrganismo fermentativo e (iii) produto é chamado de P e tem o interesse econômico. Desta forma, no processo de conversão de glicose em etanol por levedura fermentativa, padroniza-se S = glicose, X = levedura e P = etanol.

### 3.5 CAQUI

O caqui (*Diospyros Kaki L*) é uma fruta oriundo da Ásia, cultivado especialmente na China e no Japão, mas o seu cultivo é realizado em várias partes do globo de clima subtropical e clima temperado. Em conformidade com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura – *Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)*, a produção mundial de caqui é maior que 4 milhões de toneladas, sendo a China responsável por 82% dessa produção (MOLINER et al, 2016).

No Brasil, em 2018, área cultivada de caqui foi de 8.170 ha e 161 toneladas do fruto foram colhidas. Esses números classificando o país entre os quatro maiores produtores mundiais de caqui, ficando atrás apenas dos países asiáticos China, Coreia

e Japão. Os principais estados brasileiros produtores do caquizeiro são: São Paulo, Rio Grande do Sul e Minas Gerais, que totalizam 86% do volume total comercializado no país (CEPEA, 2018; FAO, 2018).

O desenvolvimento do pé de caqui acontece de uma maneira demorada em comparação com outras plantas. A primeira colheita dos frutos frequentemente acontece no 4º ou 5º ano depois da plantação. No entanto, essa fruta apresenta alguns fatores que geram um interesse internacional como: a planta possui facilidade de adaptação nas diferentes condições do solo e clima e o caqui é rico em fibras, vitaminas, sais minerais e açúcares. Vale destacar que o período de safra do caqui no Brasil acontece, normalmente, entre os meses de fevereiro a julho, com o pico nos meses de abril e maio (CEPEA, 2018; FAO, 2018).

Os caquis podem ser separados em três tipos: taninoso (*Sibugaki*), as principais variedades são o Taubaté, Pomelo e Rubi; doce ou não taninoso (*Amagaki*), as principais variedades são o Fuyu, Jiro e Fuyuhana; e variável, as variedades são o Rama Forte, Giombo e Kaoru. A cor da casca varia em tons de vermelho e amarelo, sua polpa é frequentemente amarelada, mas pode variar em função da presença ou não de sementes. O caqui da cor verde é muito rico em tanino, que torna o fruto margo e adstringente, responsável pela sensação de perder a língua. Os frutos amadurecidos não indicam acidez e são ricos em açúcares, sais minerais e vitaminas A e C (TACO, 2019).

A composição percentual ou composição centesimal dos alimentos determina a porcentagem em massa de cada substância no produto. Portanto, a composição centesimal determina a massa de cada componente que existe em 100 grama de massa do alimento. A tabela 3 mostra a composição centesimal de alguns componentes do caqui .

Tabela 3. Principais componentes na composição química do caqui (*Diospyros kaki L.*), *in natura*.

Componente	Valor em 100 g de caqui
Energia (kJ)	285,00
Umidade (g)	80,60
Carboidrato total (g)	18,30
Proteínas (g)	0,48
Lipídeos (g)	0,20
Álcool (g)	0,00
Cinzas (g)	0,00
Fibra Alimentar (g)	4,56
Vitamina A (mg)	239,00
Vitamina C (mg)	20,60
Potássio (mg)	156,00

Fonte: TACO, 2019

Um outro fator relevante para a utilização do caqui em processo de fermentação é o teor de sólidos solúveis, que simboliza a quantidade de açúcar disponível para a fermentação, impactando diretamente na capacidade fermentativa desse fruto como fonte de substrato ao processo.(Ribeiro,2016). A Tabela 4 apresenta a comparação do teor de sólidos solúveis de distintos tipos de caquis.

Tabela 4. Comparação do teor de sólidos solúveis (°Brix) de algumas variedades de caqui (*Diospyros kaki*), *in natura*.

<b>Variedade</b>	<b>Teor de sólidos solúveis (°Brix)</b>	<b>Referência</b>
Chocolate	10.5 – 13.5	Elias et al, 2006
Giombo	21.4	Golçalves et al, 2006
Rama forte	18.0	Santos et al, 2011
Caqui Fuyu	15.4	Santos et al,2011
Média caqui	14.0	Botana et al, 2013

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

A extração do suco de caqui, utilizado como mosto no processo fermentativo, e a destilação do mosto fermentado foram realizadas no Laboratório de Química da Faculdade UnB Gama (FGA). A etapa de fermentação e as análises realizadas durante esse processo foram executadas no Laboratório de Pesquisa, localizado no campus do Gama do Instituto Federal de Brasília (IFB/Gama).

### 4.1 PRODUÇÃO DO SUCO DE CAQUI

O caqui utilizado neste trabalho foi da variedade Rama Forte, adquirido no Centrais de Abastecimento do Distrito Federal (CEASA/DF) durante a safra de 2019. No recebimento dos frutos esses foram selecionados, conforme grau de maturidades, sendo descartados os frutos classificados como verde ou em deterioração.

Em seguida, os 6 kg de frutos selecionados foram lavados com solução de hipoclorito de sódio (NaClO), com concentração 2,5% (p/p). O objetivo dessa etapa foi retirar as sujeiras e reduzir a contagem microbiológica encontrados nos frutos. Nesse processo, os caquis foram imersos, durante 15 minutos, na solução de hipoclorito de sódio e, logo em seguida, os frutos foram colocados em água corrente para eliminar o cloro residual. Os frutos limpos e secos foram pesados e acondicionados em sacos plásticos para serem conservados e congelados em *freezer*, a aproximadamente -30 °C durante 3 meses.

O processo de extração do suco de caqui, utilizado como mosto na fermentação, iniciou com o processo de descongelamento dos frutos, em temperatura ambiente por 24 horas. Nessa etapa, parte do suco já havia sido extraído. Porém, para aumentar o rendimento na extração do suco, após esse período de 24 horas, os frutos foram prensados manualmente, com auxílio de tecidos de algodão limpos.

Com o processo de prensagem manual, com base de torção aplicada no tecido que continha o fruto, foi possível também filtrar o suco e separar as parcelas maiores do fruto, como casca, bagaço e semente. Após extração do suco, os 3 litros de suco foram armazenados em *freezer*, à temperatura de -30 °C por 2 meses, para preservar suas características químicas e microbiológicas.

### 4.2 CLARIFICAÇÃO E FILTRAÇÃO DO SUCO

A clarificação foi realizada com o objetivo de retirar a pectina, encontrado naturalmente no suco, visto que a sua existência no mosto pode causar o aparecimento de elementos indesejados como o metanol. A presença do metanol é

considerada prejudicial ao processo de fermentação por ser um inibidor da levedura de *Saccharomyces cerevisiae*.

O processo da clarificação foi realizado adicionando ao suco uma solução de gelatina a 10%, na proporção de 6 mL solução por litro de suco. Para preparação dessa solução de gelatina, o produto foi dissolvido em água quente de aproximadamente 80 °C, na proporção indicada pelo fabricante. A gelatina comercial (marca Qualitá) utilizada no processo de clarificação era incolor e inodora, como mostra a Figura.



Figura 8. Gelatina comercial utilizada para a etapa de clarificação  
Fonte: O Autor, 2019

Após a adição da solução de gelatina, o suco em processo de clarificação foi conservado por 24 horas em geladeira, aproximadamente 4 °C, para floculação do conjunto gelatina+pectina.

Após o período de 24 horas, foi realizado o processo de filtração do suco com gelatina. Esse processo foi realizado manualmente com tecido de algodão higienizado, torcido para separar o suco clarificado do conjunto gelatina+pectina.

#### 4.3 PREPARO DO MOSTO

Como os seres vivos precisam dos nutrientes para o bom funcionamento do seu organismo, da mesma maneira a levedura precisa de nutrientes e de um ambiente com menos competidores para o seu melhor rendimento. Desse fato, durante a preparação de mosto, foi acrescentado alguns componentes químicos com fósforo, nitrogênio e o metabissulfito de potássio, em concentrações diferentes.

Os dois primeiros nutrientes, fósforo e nitrogênio, foram adicionados ao mosto com o propósito de complementar convenientemente as necessidades nutricionais do microrganismo para aumento celular. Os nutrientes fósforo e nitrogênio foram acrescentados ao mosto nas formas de fosfato de potássio ( $K_3PO_4$ ) (marca VETEC) e sulfato de amônio [ $SO_4(NH_4)_2$ ] (marca VETEC), nas concentrações de 0,6 e 0,2 gramas para cada litro de mosto, respectivamente.



O Metabissulfito de potássio ( $K_2S_2O_5$ ) (marca VETEC) foi adicionado ao mosto com objetivo principal de realizar a esterilização química do meio. Esse procedimento é comumente utilizado na produção de etanol e bebidas alcoólicas. A concentração de metabissulfito utilizada foi de 0,3 gramas por litro de mosto.

#### 4.5 AMOSTRAGEM E INOCULAÇÃO DO MOSTO

Após a etapa de preparo, os 3 litros de mosto foram igualmente divididos em 2 Tratamentos (T1 e T2), sendo que cada tratamento foi dividido novamente em duas amostras (A1 e A2). O mosto do Tratamento T1 é composto por duas amostras de suco puro, ou seja, não diluído. A primeira amostra do tratamento 1 (T1-A1) possui 1 litro de mosto. Já a amostra 2 do tratamento 1 (T1-A2) possui o volume de 800 ml.

O mosto de Tratamento 2 foi diluído com 600 ml de água e totalizou 1,8 L de mosto, sendo que a Amostra 1 (T2A1) e a Amostra 2 (T2A2) continham 1 L e 0,8 L, respectivamente. Essa diluição foi realizada para facilitar a agitação, por agitador magnético, do meio durante fermentação.

A levedura utilizada no processo foi a *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada, da marca Red Star, destinada à produção de vinho *Premier Blanc* (Figura 9). Essa levedura foi escolhida porque, segundo o fabricante, essa cepa de fermento é particularmente forte com uma alta tolerância ao álcool entre 13-15%, apresenta baixa acidez volátil e produção de acetaldeído, produz baixos teores de  $H_2S$  e  $SO_2$ , possui taxa de fermentação rápida e não necessita de altas concentrações de nutrientes como nitrogênio e ácidos graxos.



Figura 9: *Saccharomyces cerevisiae* liofilizada utilizada como inóculo no processo de fermentação.

Fonte: O Autor, 2019

Para utilizar a levedura liofilizada (Figura 9) como inóculo no mosto, o processo de reidratação foi realizado parcialmente conforme indicado pelo fornecedor: (i) prepare 10 vezes o peso de fermento a ser reidratado de água pura e quente; (ii) transfira a água para um erlenmeyer previamente esterilizado, deixando esfriar até 38/40°C, sempre coberto; e (iii) adicione o fermento, misturando e mantendo em

agitação suavemente com uma colher esterilizada por 20 minutos. No entanto, não foi realizada a etapa (iv), que descreve o preparo do pé-de-cuba praticado pela indústria, e indicada pelo fornecedor como:

*(iv) Vagorosamente e em pequenas adições, misture a solução reidratada em 3 vezes seu peso de mosto a fim de permitir que a levedura se adapte as condições do meio de fermentação final. Mantenha por 10 minutos em descanso, adicione o creme ao fermentador cuidando para que a diferença de temperatura entre ambos não seja maior do que 10°C (idealmente 5°C).*

Como esse trabalho desejava identificar a cinética do processo de fermentação desde o tempo de adaptação da levedura ao meio, a levedura reidratada na etapa (iii) foi adicionada diretamente ao mosto total. Em relação à concentração de inóculo, foi seguida a recomendação do fornecedor de 0,2 gramas de fermento liofilizada para cada litro de mosto.

#### 4.6 FERMENTAÇÃO DO MOSTO

As fermentações foram conduzidas em reatores em batelada de vidro, com capacidade de 2000 mL, utilizando agitadores magnéticos. As quatro bateladas de fermentação foram codificadas de acordo como: T1-A1 amostra 1 do tratamento 1, sem diluição; T1-A2 amostra 2 do tratamento 1, sem diluição; T2-A1 amostra 1 do tratamento 2, com diluição; T2-A2 amostra 2 do tratamento 2, com diluição. A Figura 10 apresenta a distribuição no laboratório das quatro bateladas durante o processo de fermentação.



Figura 10. Disposição das quatro bateladas durante fermentação, na ordem: T2A1, T1A1, T1A2 e T2A2.

Fonte: O Autor, 2019

#### 4.7 ANÁLISES REALIZADAS DURANTE A FERMENTAÇÃO.

Para realização do estudo cinético da produção de etanol a partir de caqui, durante a fermentação do mosto foram coletadas amostras para análise de pH, °Brix, concentração de células viáveis e inviáveis, e teor alcoólico. Neste processo, 60 ml de

cada mosto era retirado da batelada e esse volume era dividido conforme a necessidade de volume para cada análise.

Em razão do tempo necessário para efetuar todas as análises com cada tratamento-amostra, o período da fermentação, aplicado no estudo cinético, diverge levemente entre o Tratamento 1 (T1) e o Tratamento (T2). As amostras 1 e 2 do T1 foram analisadas nas horas 0; 5; 7; 9; 26; 29 e 31 do processo fermentativo. Já as amostras 1 e 2 do T2 foram analisadas nas horas 0; 4; 7; 9; 24 e 28 da fermentação.

#### 4.7.1 Análise de pH

A medida do pH do mosto, durante fermentação, foi realizada com pHmetro digital de bancada, com uma escala usual de 0 a 14 pH, uma resolução de 0.001 pH. Destaca-se que a calibração é realizada com soluções do tipo tampão, preparadas e utilizadas conforme orientação do fornecedor do equipamento.

#### 4.7.2 Análise do teor de sólidos solúveis

O aparelho utilizado para determinar o teor de sólidos solúveis do mosto, durante o processo de fermentação, foi o refratômetro portátil modelo Q767 com um grau de precisão de 0,2 °Brix.

A primeira etapa para leitura do °Brix foi a limpeza do prisma do refratômetro com água destilada e papel suave, para secar a superfície a ser utilizada. Em seguida, algumas gotas do mosto, através de uma conta-gotas, foram depositadas no prisma de refratômetro e, então realizou-se a leitura, apontando o prisma com a amostra para uma fonte luminosa.

#### 4.7.3 Determinação da Concentração Celular

A realização da contagem de levedura ou, em outras palavras, a quantificação de número de células disponíveis em um volume específico de uma solução foi realizada por intermédio de uma Câmara de Neubauer (Figura 11). Essa também é conhecida como Câmara de Contagem (LEE et al, 1981 apud NEVES, 2003).

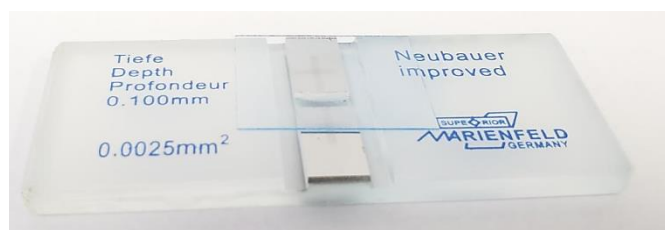


Figura 11. Câmara de Neubauer

A Câmara de Neubauer utilizada foi o modelo  $0,0025 \text{ mm}^2 \times 0,100 \text{ mm}$  espelhada. O método de análise de viabilidade empregado foi o de coloração com Azul de Metileno, baseado em NEVES (2003), foi dividido em 3 partes: (i) diluição da amostra, (ii) colocação com Azul de Metileno, (iii) contagem em câmara de Neubauer e (iv) determinação da concentração de células viáveis e inviáveis.

Para diluição da amostra, com uma pipeta automática, coletou-se 2,5 mL da amostra e transferiu-se esta alíquota para um balão volumétrico de 25 mL. O balão contendo a amostra foi avolumado com água destilada para formar uma diluição de 10x (Figura 12). A solução foi homogeneizada com a inversão do balão por, aproximadamente, 5 vezes.

Em um bequer de 50 ml, foram adicionadas 0,1 mL da solução de células diluída, preparada no balão volumétrico, e 0,9 mL de solução de Azul de Metileno. Essa etapa resultou em uma diluição final de 100 x (Figura 12).



Figura 12. Amostras das 4 bateladas diluídas 10x nos balões volumétricos e a duas amostras diluídas 100 x, com a solução de Azul de Metileno, nos béqueres

O preenchimento da Câmara de Neubauer iniciou fixando a lamínula de vidro e, com o auxílio de uma pipeta automática, coletou-se uma alíquota da solução diluídas 100 x e carregou-se a câmara. Em seguida, levou-se a câmara ao microscópio e iniciou-se a contagem.

A contagem foi efetuada nos 4 quadriláteros maiores localizados nas laterais da Câmara de Neubauer e indicados com "A" na Figura 13. Cada quadrado tinha a área de  $1 \text{ mm}^2$  e era subdividido em 16 quadrados menores, com área de  $1/16 \text{ mm}^2$ . A contagem foi efetuada no sentido horário, tomando-se o cuidado de se observar a existência de células localizadas na linha que divide os quadrados menores.

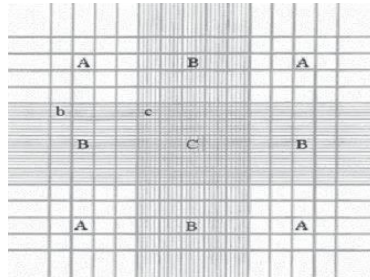


Figura 13. Gabarito da Câmara de Neubauer.  
Fonte: Viera, 2000

As células identificadas como viáveis tinham o contorno azul, porém o centro transparente. Já as células consideradas inviáveis possuíam o contorno e o centro azuis. Por fim, o número total de células viáveis ou inviáveis era a soma encontrada de cada tipo de levedura nos 4 quadrados maiores.

Para definir a concentração, células/L, utilizou-se:

$$X_{viável} = X_v = \frac{A}{V \times D} \times 10^6 \text{ e } X_{inviável} = X_{inv} = \frac{B}{V \times D} \times 10^6 \quad (2)$$

onde  $X_{viável} = X_v$  é a concentração de células viáveis, em células/L;  $X_{inviável} = X_{inv}$  é a concentração de células inviáveis, em células/L; A é contagem das células viáveis, em células; B é a contagem das células inviáveis, em células; V é o volume da câmara, em mm<sup>3</sup>; D é o fator de diluição, que corresponde ao inverso da diluição realizada; e 10<sup>6</sup> corresponde à conversão do volume em mm<sup>3</sup> para litros.

Segundo Neves (2003), para definir o valor do volume da câmara utiliza-se: a área total da câmara que corresponde à 64/61 mm<sup>2</sup> e a distância entre a lamínula e a Câmara, que era de 1/100 mm. Essas dimensões geram o volume de 61/160 mm<sup>3</sup>.

#### 4.7.4 Teor alcoólico

Para determinar o teor de álcool (°GL) presente no mosto durante o processo fermentativo, usou-se um ebulliômetro (Figura 14). Esse equipamento é composto basicamente por uma caldeira, onde fica a amostra a ser analisada; um condensador, onde são coletados os vapores; e uma lamparina, que fornece aquecimento ao ebulliômetro.

Inicialmente realizou-se a calibração do equipamento, transferindo 50 mL de água corrente em temperatura ambiente no orifício inferior através de um tubo de vidro. Em seguida a lamparina foi acesa para aquecer a caldeira e esperou-se alguns minutos até a temperatura estabilizar. Por fim, o valor obtido durante no termômetro foi

definido como o ponto zero da escala fixa à direita da régua, que representa a graduação alcoólica decimal.

As análises das amostras, durante o processo de fermentação, foram realizadas de forma similar. No entanto, a partir das temperaturas dessemelhante de ponto de ebulição do fermentado, mostrado através do termômetro acoplado na caldeira e da água, tornou-se possível determinar o teor de álcool (°GL) em cada amostras por conversão na régua previamente calibrada com a temperatura de ebulição da água (LOPES & SILVA, 2006). Vale destacar que a escala Gay-Lussac (°GL) calcula quantos mililitros de álcool absoluto existem em 100 mililitros de mistura hidro alcoólica.

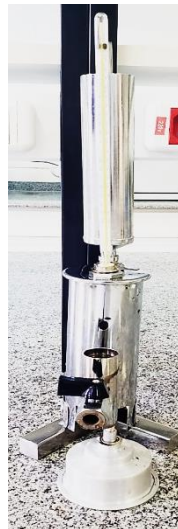


Figura 14. Ebuliômetro  
Fonte: O Autor, 2019

#### 4.8 DESTILAÇÃO

A destilação é um processo que consiste na separação de dois ou mais componentes de uma solução homogênea, baseando-se nas diferenças do ponto de ebulição de cada solução, nada obstante essa dessemelhança de temperatura de ebulição é realmente pequena. Neste trabalho foi utilizada a destilação simples que emprega um balão em aquecimento compondo da mistura a ser separada. Esse balão foi conectado com o conector de destilação que foi então acoplado à um condensador, utilizado para condensar os vapores ao estado líquido. Em seguida, o composto separado e na fase líquida foi recolhido em recipientes separados. Vale destacar que o condensador foi mantido com uma certa inclinação para facilitar o escoamento do líquido para o recipiente de recolha. A Figura 15 mostra o aparato de destilação e condensação utilizado nesse trabalho.



Figura 15. Processo de destilação do mosto de caqui fermentado.  
Fonte: O Autor, 2019

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Foram usadas ferramentas gráficas e estatísticas no software Microsoft Excel para o cálculo da média e do desvio padrão entre as amostras e um mesmo tratamento, ou seja, amostras 1 e 2 nos tratamentos 1 e 2, e para a elaboração das curvas no estudo cinético da fermentação.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 16 apresenta uma amostra do suco de caqui produzido neste trabalho, utilizando as etapas de limpeza, congelamento, prensagem e filtração, e usado como mosto para o processo de fermentação estudado.



Figura 16. Amostra do suco de caqui utilizado como mosto no processo de fermentação.

O pH tem influência marcante nas fermentações industriais, devido à sua importância no controle de contaminação bacteriana, ao seu efeito sobre o crescimento de leveduras, às taxas de fermentação e à formação de subprodutos. As Tabelas 5 e 6 apresentam o pH para cada amostra e a distribuição da média do pH ( $pH_m$ ), com desvio-padrão, para os Tratamentos 1 e 2, respectivamente, durante a fermentação. A Figura 17 apresenta o perfil cinético do pH para os Tratamentos 1 e 2, durante a fermentação.

Tabela 5. Valores de pH para as amostras 1 e 2 e valores de pH médio ( $pH_m$ ), com desvio padrão, para o Tratamento 1, durante 31 horas de fermentação.

T1					
tempo (h)	$pH_1$	$pH_2$	$pH_m$		Desvio Padrão
0	4,83	4,74	4,785	±	0,064
5	4,80	4,75	4,775	±	0,035
7	4,78	-	4,780	±	0,000
9	4,50	4,63	4,565	±	0,092
26	4,12	4,05	4,085	±	0,049
29	4,04	3,95	3,995	±	0,064
31	3,99	3,94	3,965	±	0,035
<b><math>pH_m</math> para todo o processo</b>			<b>4,421</b>	<b>±</b>	<b>0,048</b>

- valor não analisado. Fonte: O Autor, 2019

Tabela 6. Valores de pH para as amostras 1 e 2 e valores de pH médio ( $pH_m$ ), com desvio padrão, para o Tratamento 2, durante 28 horas de fermentação

T2					
tempo (h)	$pH_1$	$pH_2$	$pH_m$		Desvio Padrão
0	4,83	4,80	4,82	±	0,021
4	4,83	4,80	4,82	±	0,021
7	4,71	-	4,71	±	0,000
9	4,50	4,50	4,50	±	0,000
24	4,04	4,12	4,08	±	0,057



28	3,95	3,98	3,97	±	0,021
<b>pH<sub>m</sub> para todo o processo</b>			<b>4,481</b>	<b>±</b>	<b>0,020</b>

- valor não analisado. Fonte: O Autor, 2019

Em geral, as fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, sendo adequada entre 4 e 5 (LIMA, 2001; MEDEIROS, 2019). No entanto, Lima (2001) destaca que a fermentação alcoólica finaliza com valores de pH entre 3,5 a 4,0. Avaliando as Tabelas 5 e 6 percebe-se que o pH dos dois tratamentos reduziu durante a fermentação. Além disso, ambos os mostos mantiveram o pH entre 4 e 5 como esperado para processos fermentativos.

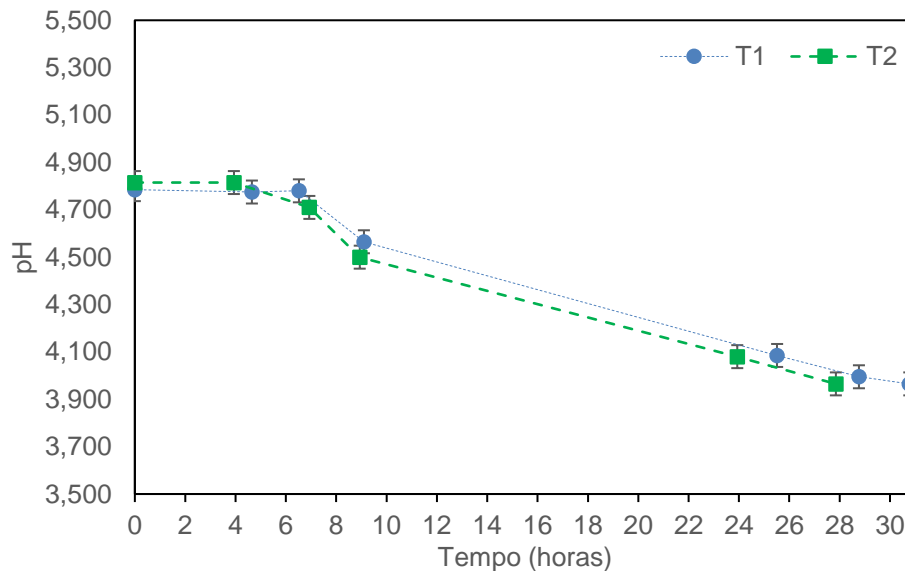


Figura 17. Desenvolvimento do perfil de pH médio (pH<sub>m</sub>), com desvio padrão, para os Tratamentos 1 e 2 durante fermentação

Fonte: O Autor, 2019

O °Brix é uma escala numérica que determina a quantidade de sólidos solúveis, começando com açúcar, sal, proteínas, ácidos e outros, em uma solução. Em alimentos, como o suco de caqui utilizado nesse projeto, o °Brix está fortemente correlacionado ao teor de sacarose e açúcares totais presentes no meio. Então, neste trabalho, a escala Brix foi utilizada para definir o número de gramas de açúcar contidos em 100 gramas de suco e mosto (CORAZZA; RODRIGUES; NOZAKI, 2001; SIMEONE et al; 2016).

O valor do °Brix para cada amostra e a distribuição da média do °Brix (°Brix<sub>m</sub>), com desvio-padrão, para os Tratamentos 1 e 2, durante a fermentação, são apresentados nas Tabelas 7 e 8 respectivamente.

Avaliando as Tabelas 7 a 8, verifica-se que a diluição, realizada no mosto do Tratamento 2, não alterou significativamente o pH médio, quando comparado ao mosto do Tratamento T1. No entanto, o teor de sólidos solúveis reduziu em

aproximadamente 80% no T2, quando se compara o °Brix inicial entre os dois tratamentos avaliados.

Tabela 7 °Brix para as amostras 1 e 2 e °Brix médio (°Brix<sub>m</sub>), com desvio padrão, para o Tratamento 1, durante 31 horas de fermentação.

T1					
tempo (h)	°Brix	°Brix	°Brix <sub>m</sub>		Desvio Padrão
0	10,00	10,00	10,00	±	0,00
5	10,00	10,00	10,00	±	0,00
7	10,00	-	10,00	±	0,00
9	10,00	9,6	9,80	±	0,28
26	6,00	6,00	6,00	±	0,00
29	4,00	5,20	4,60	±	0,84
31	4,00	4,80	4,40	±	0,56

- valor não analisado. Fonte: O Autor, 2019

Tabela 8. °Brix para as amostras 1 e 2 e °Brix médio (°Brix<sub>m</sub>), com desvio padrão, para o Tratamento 2, durante 28 horas de fermentação.

T2					
tempo (horas)	°Brix	°Brix	°Brix <sub>m</sub>		Desvio Padrão
0	2,80	3,00	2,90	±	0,141
4	2,80	3,00	2,90	±	0,141
7	2,80	-	2,80	±	0,000
9	2,80	2,60	2,70	±	0,141
24	2,00	2,00	2,00	±	0,000
28	1,00	1,60	1,30	±	0,424

- valor não analisado. Fonte: O Autor, 2019

Para determinar a concentração de substrato nos T1 e T2, ou seja, a concentração de açúcar no mosto definiu-se que:

$$S = \text{°Brix}_m \times \rho_{\text{suco}} \times 10^{-3} \quad (3)$$

onde: S é a concentração de açúcar no mosto, em g<sub>aç</sub>/L<sub>mosto</sub>; °Brix<sub>m</sub> foi aproximado como o teor médio de açúcar no mosto, em g<sub>aç</sub>/g<sub>sq</sub>;  $\rho_{\text{suco}}$  é a massa específica do suco, em kg/m<sup>3</sup>; e 10<sup>-3</sup> é o fator de conversão entre m<sup>3</sup> e litros.

A massa específica do suco de caqui foi obtida através da correção entre  $\rho_{\text{suco}}$  e °Brix apresentada por MATTOS e MEDEIROS (2008) como:

$$\rho_{\text{suco}} = (4,4181 \times \text{°Brix}_m) + 997,61 \quad (4)$$

onde:  $\rho_{suco}$  é a massa específica do suco, em  $\text{kg/m}^3$ ;  $^{\circ}\text{Brix}_m$  é o teor de sólidos solúveis médio para o tratamento analisado.

Relacionado as Equações 3 e 4, obtém-se a concentração de substrato, em g de açúcar por litro de mosto, durante a fermentação por:

$$S = ^{\circ}\text{Brix}_m \times [(4,4181 \times ^{\circ}\text{Brix}_m) + 997,61] \times 10^{-3} \quad (5)$$

O gráfico da Figura 18 foi elaborado utilizando a Eq. 5. Essa figura apresenta as distribuições do  $^{\circ}\text{Brix}$  médio e da concentração de substrato durante a fermentação, em g de açúcar por litro de mosto, para os Tratamentos 1 e 2.

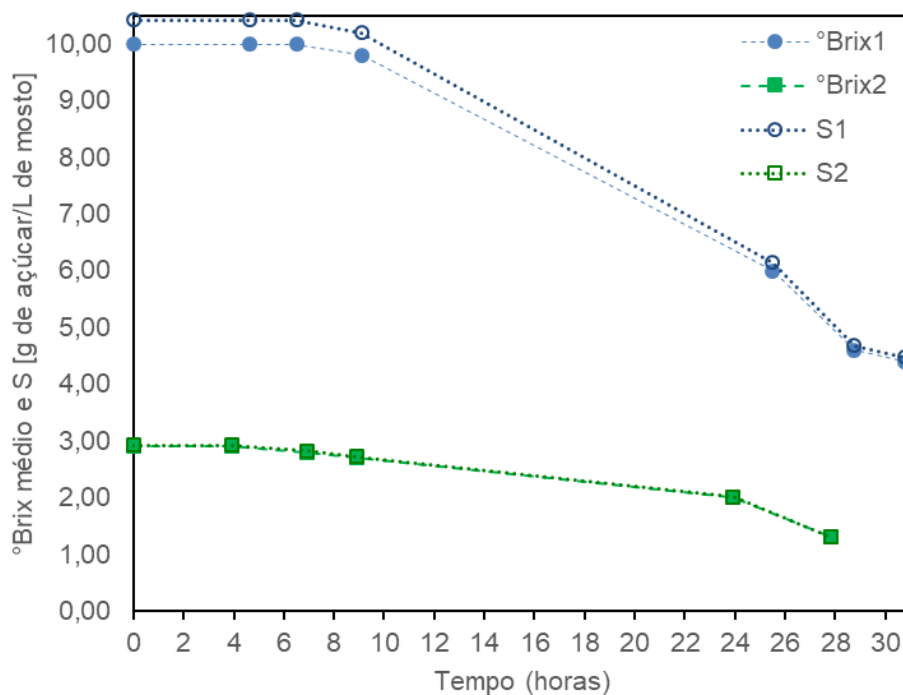


Figura 18. Distribuição do  $^{\circ}\text{Brix}$  médio ( $^{\circ}\text{Brix}_m$ ) e da concentração de substrato no mosto (S), em g de açúcar por litro de mosto, para T1 e T2, durante a fermentação.

Fonte: O Autor, 2019

Avaliando a Figura 18 verifica-se que os parâmetros  $^{\circ}\text{Brix}$  e concentração de substrato apresentaram um perfil característico de processo fermentativo para os dois tratamentos estudados, durante todo o período do experimento. Pode-se afirmar que o açúcar do mosto começou a ser consumido como substrato 9 horas após o início da fermentação.

A Figura 19 mostra ajuste polinomial da função  $S$  versus  $t$  para os Tratamento 1 no lado esquerdo e para o Tratamento 2 no lado direito.

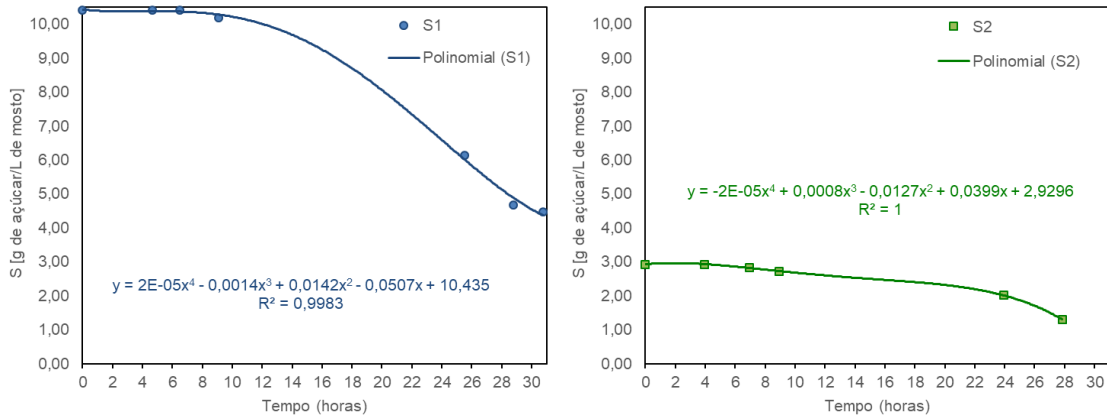


Figura 19. Ajuste polinomial de  $S = \text{função}(t)$ , para os Tratamentos 1 (esquerda) e 2 (direita)  
Fonte: O Autor, 2019

Avaliados os gráficos da Figura 19 pode-se determinar as funções para o consumo de substrato ( $S$ ) ao longo do tempo ( $t$ ), no T1 e T2, como:

$$S_1 = (2,0 \times 10^{-5} \times t^4) - (0,0014 \times t^3) + (0,0142 \times t^2) - (0,0507 \times t) + 10,435$$

$$R^2 = 0,9983 \quad (6)$$

$$S_2 = (-2,0 \times 10^{-5} \times t^4) + (0,0008 \times t^3) - (0,0127 \times t^2) + (0,0399 \times t) + 2,9896$$

$$R^2 = 1 \quad (7)$$

A curva de crescimento cinético da levedura, representada em ordenadas lineares, ou seja, a função Concentração de Células (nº células/litro de mosto) *versus* o tempo de fermentação é apresentada na Figura 19.

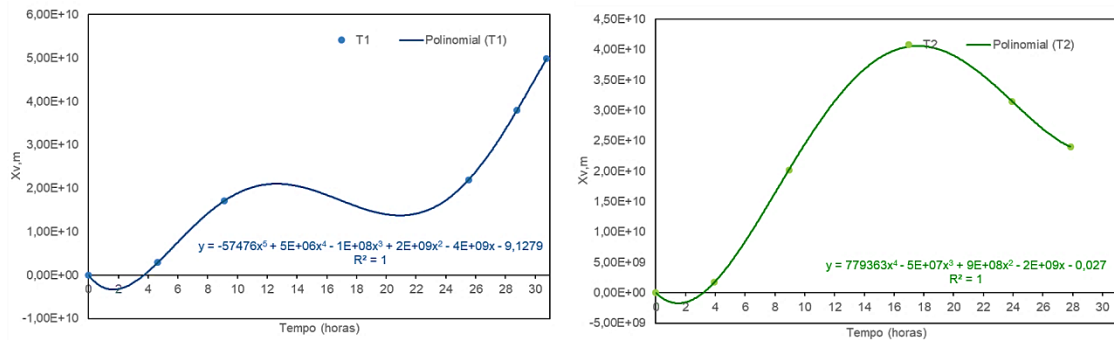


Figura 20. Ajuste polinomial de  $X = \text{função}(t)$ , para os Tratamentos 1 (esquerda) e 2 (direita)  
Fonte: O Autor, 2019

O gráfico do lado esquerdo dessa figura representa o T1 e o gráfico direito o T2. Para elaborar essa curva utilizou-se o número de células viáveis médio, entre as amostras 1 e 2 de ambos os tratamentos, como o valor de  $A$  na Eq. (2).

Com base nos gráficos da Figura 20 pode-se determinar as funções para a biomassa (X) ao longo do tempo (t), no T1 e T2, como:

$$X_1 = -(0,0014 \times t^5) + (5,0 \times 10^6 \times t^4) - (10^8 \times t^3) + (2 \times 10^9 \times t^2) - (4 \times 10^9 \times t) - 9,1279$$

$$R^2 = 1 \quad (8)$$

$$X_2 = (779.363 \times t^4) - (5,0 \times 10^7 \times t^3) + (9,0 \times 10^8 \times t^2) - (2,0 \times 10^9 \times t) - 0,027$$

$$R^2 = 1 \quad (9)$$

Com o cálculo da concentração média de células viáveis ( $X_{v,m}$ ), em células/L de mosto, também foi elaborada a curva, a escala semilogarítmica, que representa o crescimento da levedura durante a fermentação dos dois tratamentos estudados (Figura 21).

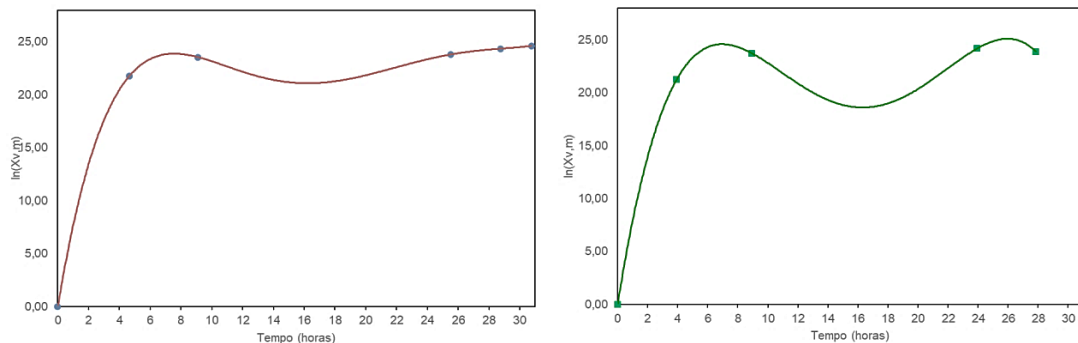


Figura 21. Curva cinética de crescimento microbiano, em escala semilogarítmica, para os Tratamentos 1 (esquerda) e 2 (direita)

Fonte: O Autor, 2019

Avaliando os gráficos da Figura 21, não é possível identificar a transição entre a Fase de Latência, período de adaptação onde a célula sintetiza as enzimas necessárias e não reproduz, e a Fase de Crescimento Exponencial, período de maior importância para na cinética de processos fermentativos. Esse dado pode ser justificado pelo longo tempo dedicado para análise em cada amostra, que foi de aproximadamente 50 minutos por amostra, impedindo a realização de mais contagem de leveduras nas primeiras 4 horas de experimentação. No entanto, se observamos os gráficos da Figura 20, podemos estimar que a transição entre de adaptação e o crescimento exponencial foi próximo de 4 horas após o início da fermentação.

Em estudos cinéticos de processo fermentativos, a fase de crescimento exponencial é identificada como o período na qual a concentração de nutrientes no meio é superior as necessidades do microrganismo (BORZANI et al, 2001) e a célula possui condições ótimas para reprodução. Avaliando os gráficos da Figura 21

determina-se que o pico da fase de crescimento exponencial, para ambos os Tratamentos, ocorreu após 9 horas de fermentação.

Esse dado confere com os perfis para a concentração de substrato no mosto (S), em g de açúcar por litro de mosto, apresentado nos gráficos das Figuras 18 e 19. Isso porque, naqueles gráficos a redução significativa da concentração de substrato iniciou após 9 horas de fermentação.

A Fase Estacionária inicia após a concentração de células atingir o valor máximo e apresenta crescimento celular constante. Nessa fase, há um equilíbrio entre a velocidade de crescimento e morte dos microrganismos e se iniciam as modificações na estrutura bioquímica da célula.

O gráfico da esquerda na Figura 21 mostra que o Tratamento 1 apresentou a Fase Estacionária entre 9 e 31 horas, quando o experimento foi finalizado. Já o Tratamento 2, no gráfico à direita (Figura 21), apresentou o período estacionário entre 9 e 28 horas, quando o experimento foi finalizado.

A curva cinética de morte da levedura, representada em ordenadas lineares, durante o processo estudado, também foi elaborada (Figura 22). Para definir a concentração média de células inviáveis ( $X_{iv,m}$ ), em células/L de mosto, aplicou-se ao valor de B na Eq. (2) o número de células contadas como inviáveis, durante a análises.

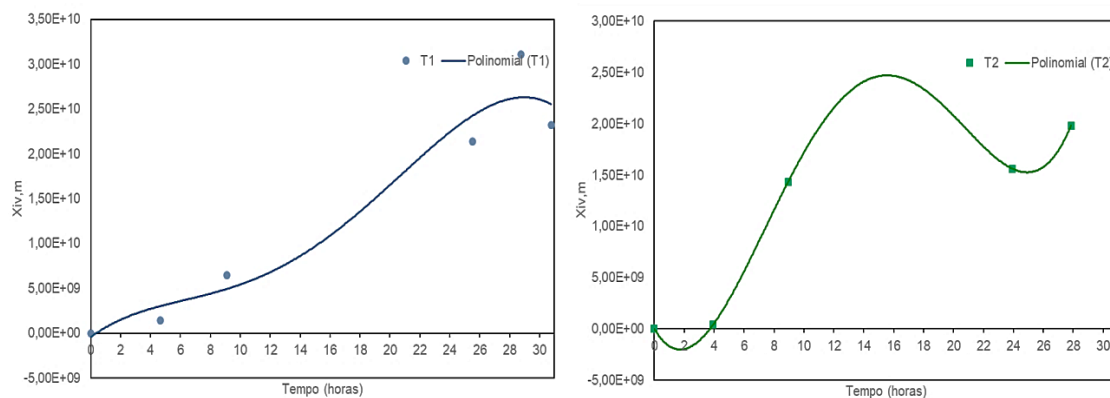


Figura 22. Curva cinética de morte da levedura, representada em ordenadas lineares para os Tratamentos 1 (esquerda) e 2 (direita).

Fonte: O Autor, 2019

Apesar dos gráficos da Figura 21 não identificarem a Fase de Declínio da levedura no T1 e T2, as curvas da Figura 22 mostram claramente o aumento de células inviáveis, ou seja, o aumento no número de células morte com o passar do tempo na fermentação. Isso indica, que o início da Fase de Declínio estava próximo.

As Tabelas 5 e 6 apresentam o teor alcoólico para cada amostra e a distribuição da média desse ( $\%álcool_m$ ), com desvio-padrão, para os Tratamentos 1 e 2, durante a fermentação.

Tabela 9. Teor alcoólico para as amostras 1 e 2 e Teor alcoólico médio (%álcool<sub>m</sub>), com desvio padrão, para o Tratamento 1, durante 31 horas de fermentação.

<b>T1</b>					
<b>tempo (horas)</b>	<b>%álcool<sub>1</sub></b>	<b>%álcool<sub>2</sub></b>	<b>%álcool<sub>m</sub></b>	<b>Desvio Padrão</b>	
0	0,00	0,00	0,000	±	0,000
5	0,00	0,00	0,000	±	0,000
7	0,00	-	0,000	±	0,000
9	0,00	0,00	0,000	±	0,000
26	2,09	1,30	1,695	±	0,559
29	2,42	1,35	1,885	±	0,757
31	3,00	1,80	2,400	±	0,849

Tabela 10. Teor alcoólico para as amostras 1 e 2 e Teor alcoólico médio (%álcool<sub>m</sub>), com desvio padrão, para o Tratamento 2, durante 28 horas de fermentação.

<b>T2</b>					
<b>tempo (horas)</b>	<b>%álcool<sub>1</sub></b>	<b>%álcool<sub>2</sub></b>	<b>%álcool<sub>m</sub></b>	<b>Desvio Padrão</b>	
0	0,00	0,00	0,00	±	0,000
4	0,00	0,00	0,00	±	0,000
7	0,00	-	0,00	±	0,000
9	0,00	0,00	0,00	±	0,000
24	5,75	2,00	3,88	±	2,652
28	1,42	1,60	1,51	±	0,127

Avaliando os valores das Tabelas 9 e 10 percebe-se as amostras 1 e 2 do T1 apresentam um aumento do teor alcoólico entre os tempos de 9, 29 e 31 horas. Assim como, a amostra 2 do T2 também aumenta o teor alcoólico entre os períodos de 9, 24 e 28 horas.

Porém, a amostra 1 do T2 apresenta um aumento superior que as demais entre os períodos de 9 e 24 horas e, então, uma queda no teor alcoólico entre 24 e 28 horas. Esse perfil para a amostra 1 do Tratamento 2 indica que a análise do teor alcoólico após 24 horas de fermentação apresentou erro na realização ou na leitura da régua.

Esse mesmo ponto de divergência é identificado no gráfico da Figura 23 que representa o perfil do Teor Alcoólico médio (%v/v), com desvio padrão, para os Tratamentos 1 e 2 durante fermentação.

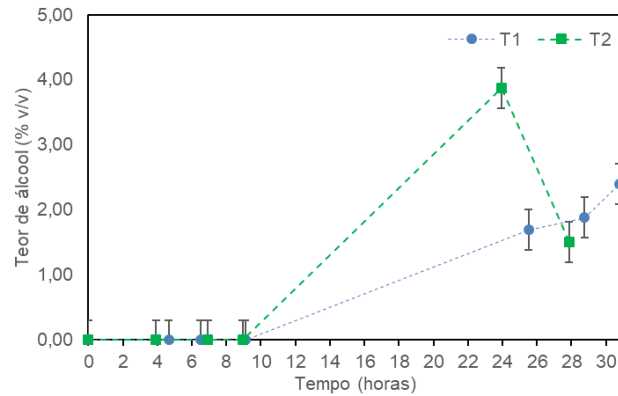


Figura 23. Desenvolvimento do perfil do Teor alcoólico médio (%álcool<sub>m</sub>), com desvio padrão, para os Tratamentos 1 e 2 durante fermentação.

Fonte: O Autor, 2019

Devido ao ponto de divergência no Teor Alcoólico do Tratamento 2, após 24 horas de fermentação, esse tratamento foi descartado na elaboração do estudo cinético da produção de etanol, apresentado na Figura 24.

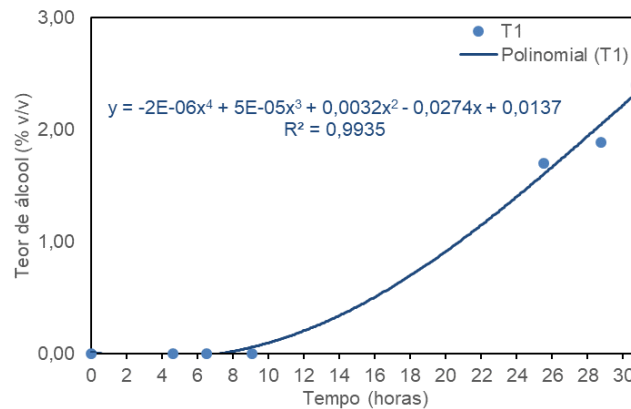


Figura 24. Ajuste polinomial de  $P = \text{função}(t)$ , para os Tratamentos 1 (esquerda) e 2 (direita)

Fonte: O Autor, 2019

Avaliando os gráficos da Figura 19 pode-se determinar as funções para o consumo de substrato (S) ao longo do tempo (t), no T1 e T2, como:

$$P_1 = -(2,0 \times 10^{-6} \times t^4) + (5,0 \times 10^{-5} \times t^3) + (0,0032 \times t^2) - (0,0274 \times t) + 0,0137$$

$$R^2 = 0,9935 \quad (10)$$

Com as funções  $S = \text{função}(t)$ ,  $X = \text{função}(t)$  e  $P = \text{função}(t)$ , representadas nas Equações de (6) a (10), é possível avaliar o desempenho cinético do processo fermentativo realizado nos Tratamentos 1 e 2. Ou seja, é possível prever a concentração de biomassa (X), substrato (S) e/ou produto (P), em qualquer instante, para do processo de produção de etanol a partir de caqui por fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*, em escala laboratorial.



## 6 CONCLUSÃO

Com base na revisão bibliográfica e nas análises realizadas, a metodologia para determinar a concentração de biomassa em fermentações aplicada neste trabalho mostrou-se eficiente e será sugerida como metodologia padrão para o laboratório de Laboratório de Pesquisa em Recursos Renováveis e Energéticos (LaPRREn), da Universidade de Brasília, campus Gama (FGA). Vale destacar que o LaPRREn estuda a produção de bioetanol a partir de diversas biomassas, principalmente do Centro-Oeste do Brasil, e a utilização dessa metodologia validade será de grande aplicabilidade nas próximas pesquisas.

Além disso, o estudo cinético do processo produtivo de bioetanol a partir de caqui por fermentação da *Saccharomyces cerevisiae*, em escala de bancada, determinou as equações necessárias para prever a concentração de biomassa, substrato e produto em qualquer instante de tempo. Porém, deve-se considerar que parâmetros como temperatura e atmosfera não foram controladas neste estudo.

### 6.1 PROPOSTA PARA TRABALHOS FUTUROS

Como proposta para trabalhos futuros e no ponto de vista empresarial, como o desenvolvimento de usinas de bioetanol a partir de caqui, recomenda-se que mais bateladas do mosto de caqui sejam fermentadas com avaliação dos outros parâmetros do processo. Como exemplo de controles que podem ser objeto de estudo para pesquisa futuras, pode-se citar o estudo cinético do processo com variação da concentração de células inóculas, temperatura e/ou concentração de gás oxigênio na atmosfera do reator.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBARELLI, J. Produção de açúcar e etanol de primeira e segunda geração: simulação, integração energética e análise econômica. 2013.

ALBARELLI. Produção de açúcar e Etanol da Primeira e Segunda Geração?. Disponível em: <[http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/266572/1/Albarelli\\_JulianaQueiroz\\_D.pdf](http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/266572/1/Albarelli_JulianaQueiroz_D.pdf)>. Acessado em novembro de 2018.

ALBARELLI. Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/32985/1/CITE-04.pdf>>. Acessado em novembro de 2018.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. Processos de produção de álcool: controle e monitoramento. Piracicaba: USP, 1996.

AQUINO, A. F.; BIDÔ, É. S.; GALVÃO, M. L. M.; OLIVEIRA, V. N. O etanol da cana de açúcar: possibilidades energéticas da região de Ceará-mirim-RN. HOLOS, v. 1, p. 105-125, 2014.

BARBOSA SILVA. O DESAFIO DO DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL. Disponível em: <[http://files.gtsustentabilidade.webnode.com/200000055d44dfd5476/4ed\\_O\\_Desafio\\_Do\\_Developmento\\_Sustentavel\\_Gisele.pdf](http://files.gtsustentabilidade.webnode.com/200000055d44dfd5476/4ed_O_Desafio_Do_Developmento_Sustentavel_Gisele.pdf)>. Acessado em novembro de 2018.

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, n. 25, p. 5-38, 2007.

BNDES; CGEE. Bioetanol de cana-de-açúcar: Energia para o desenvolvimento sustentável. Rio de Janeiro.2008.

BORZANI, W., SCHMIDELL, W., ALMEIDA LIMA, U., AQUARONE, E. Biotecnologia Industrial – Engenharia Bioquímica. Volume 2. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

BROOKS, G.; CARROLL, K.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T.A. Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg-26. AMGH Editora, 2014.

CALDAS,C; BORÉN,A; SANTOS,F .Cana-de-açúcar Bioenergia, Açúcar e Etanol - Tecnologias e Perspectivas .2. ed. Viçosa MG , 2012. 637p.

CORAZZA, M. L.; RODRIGUES, D. G.; NOZAKI, J. Preparação e caracterização do vinho de laranja. Quím. Nova vol.24 no.4 São Paulo July/Aug. 2001. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422001000400004](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422001000400004)

DE SOUZA JR, M. B. (2007). *Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar*.

ERNANDES, F. M., & GARCIA, C. H. (2009). *Zymomonas mobilis*: um microrganismo promissor para a fermentação alcoólica. *Semina: Ciências Agrárias*.

FAGUNDES, G.R.; YAMANISHI, O.K. Características físicas e químicas de frutos de mamoeiro do grupo solo comercializados em 4 estabelecimentos de Brasília – DF Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal, v. 23, n.3, p.541-545, 2001.

GOMES, S. O.; SOUZA, V. A. B. D.; COSTA, M. D. P. S. D.; SILVA, C. C. P. D.; GUIDINI, C. Z. Fermentação Alcoólica em Batelada Alimentada Empregado *Saccharomyces cerevisiae* de Características Floculantes. p-41 Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) - Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2013.

HORST, D. J. Avaliação da produção energética a partir de ligninas contidas em biomassas. Dissertação de mestrado (UTFPR). Ponta Grossa - PR, 2013.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. *Biotechnol. Bioeng.* New York, v 11. P. 641-649, 1981 apud Neves, L. C. M. Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando 'Saccharomyces cerevisiae' W303-181. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-08102006-175534/pt-br.php>.

LIMA, U. A. et al *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo - SP, Blucher, v. 3, 593p., 2001.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*; Edgard Blücher: São Paulo, Brazil, 2001; Vol. 3, p. 1-43.

LOPES, R.V.V.; SILVA, F.L.H.;. **Elaboração de fermentados a partir do figo-da-índia**. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 6, n. 2, p. 305-315, 2006.

MATRIZ ENERGÉTICA - Biocombustível. Portal Brasil. 14 de out. 2010. Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/sobre/economia/matriz-energetica/biocombustivel>>. Acesso em: 20 de out. 2018.

MATTOS, J. S.; MEDEROS, B. J. T. Densidade de polpas de frutas tropicais: banco de dados e determinação experimental. *BioEng*, Campinas, v.2, n.2, p. 109-118, jan/abr., 2008. Disponível em: <http://seer.tupa.unesp.br/index.php/BIOENG/article/viewFile/60/61>

MCMURRY, J. *Química orgânica*, Vol. 1 - 10ª Ed. Tradução da 7ª Ed. norte americana. Cengage Learning Editores, 2012.

MEDEIROS, S. S. Fermentação alcoólica empregando altas concentrações de açúcares. Monografia de graduação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia. 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/24267/3/Fermenta%C3%A7%C3%B5esAlco%C3%B3licasEmpregando.pdf>.

NEVES, L. C. M. Obtenção da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase utilizando 'Saccharomyces cerevisiae' W303-181. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9134/tde-08102006-175534/pt-br.php>.

PIACENTE, E. A.. *Perspectiva do Brasil no mercado internacional de etanol*. Dissertação de Mestrado de Engenharia Mecânica. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.

RIBEIRO, C. A.; BLUMER, S. A.; HORII, J. *Fundamentos da Tecnologia Sucoalcooleira: Tecnologia do álcool*. Piracicaba. (1999).

ROSSELL, C. E. Fermentação do hidrolisado. III Workshop Tecnológico sobre

Hidrólise para Produção de Etanol, São Paulo, dez. 2006.

SANTOS, M. S.; COLNAGO, L. A. Validação de método quantitativo por RMN de <sup>1</sup>H para análises de formulações farmacêuticas. *Quim. Nova*, v. 36, n. 2, p. 324- 330, 2013

SHIKIDA, P. F. A.; BACHA, C. J. C., Evolução da Agroindústria Canavieira Brasileira de 1975 a 1995. p. 70-78, 1998.

SIMEONE, M. L. F.; COELHO, L. F. D. C.; SOUZA, E. A.; LEAL; M. C. B.; PARRELLA, R. A. C. Avaliação do Brix e Perfil de Açúcares em Diferentes Genótipos de Sorgo Sacarino. 2016. XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo. Disponível em: [https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/-/asset\\_publisher/5qTVmWdGWiRK/content/id/16619428](https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/-/asset_publisher/5qTVmWdGWiRK/content/id/16619428)

SIMS, R.; TAYLOR, M.; SADDLER, J.; MABEE, W. From 1st-to 2nd-generation biofuel technologies: an overview of current industry and RD&D activities. *International Energy Agency*, p. 16-20, 2008.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 7.0. São Paulo, 2019. [Acesso em: novembro 2019]. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Universidade de São Paulo (USP). Food Research Center (FoRC). Versão 7.0. São Paulo, 2019. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>.

VÁSQUES, M. P. Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar. Universidade Federal de Rio de Janeiro Escola de Química 2007.