



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIAS E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
CURSO DE ENGENHARIA QUÍMICA

ANDREWS MESSIAS BARBOSA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E CAPACIDADE PRODUTIVA DE ETANOL DA
ESPÉCIE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PROVENIENTE DE MARCAS
COMERCIAIS**

Recife

2022

ANDREWS MESSIAS BARBOSA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E CAPACIDADE PRODUTIVA DE ETANOL DA
ESPÉCIE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PROVENIENTE DE MARCAS
COMERCIAIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha

Recife

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Santos, Andrews Messias Barbosa.

Avaliação da viabilidade e capacidade produtiva de etanol da espécie
Saccharomyces cerevisiae proveniente de marcas comerciais / Andrews
Messias Barbosa Santos. - Recife, 2022.

44 p. : il., tab.

Orientador(a): Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Engenharia Química -
Bacharelado, 2022.

1. Fermentação. 2. Levedura. 3. Neubauer. 4. *Saccharomyces cerevisiae*. 5.
Viabilidade. I. Palha, Maria de Los Angeles Perez Fernandez. (Orientação). II.
Título.

660 CDD (22.ed.)

ANDREWS MESSIAS BARBOSA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E CAPACIDADE PRODUTIVA DE ETANOL DA
ESPÉCIE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* PROVENIENTE DE MARCAS
COMERCIAIS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à coordenação do curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Química.

Aprovado em: 26/10/2022

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Antônio Carlos Duarte Coelho (Examinador)

Universidade Federal de Pernambuco

MSc. Gisely Alves da Silva (Examinadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho à minha mãe, que, com grande esforço, sempre batalhou pela minha educação. Esta formação acadêmica é fruto do seu empenho, dedicação e apoio incondicional nos meus momentos mais difíceis ao longo da graduação.

AGRADECIMENTOS

À professora orientadora Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha, pela paciência, inspiração e apoio.

À técnica de laboratório Gisely Alves da Silva, por todo o suporte prestado.

À minha família, pelo apoio e pela tranquilidade fornecida.

À minha namorada, Ana Laura da Silva, pelo apoio e suporte emocional em todos os momentos que precisei.

À UFPE e seus docentes, pelo comprometimento com a qualidade de ensino e desenvolvimento profissional dos seus alunos.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar tudo de você, menos o seu conhecimento”
(Albert Einstein).

RESUMO

A espécie *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura capaz de promover a fermentação alcoólica de açúcares, consumindo a fonte de carbono e produzindo etanol e CO₂. As leveduras estão por toda parte, são comercialmente encontradas diferentes marcas e tipos, podendo ser na forma liofilizada ou líquida. As principais aplicações são na panificação, cervejaria e produção de etanol. Este trabalho analisou, por contagem direta em câmara de Neubauer, a viabilidade celular de 3 marcas comerciais dessa espécie ao longo de 8 semanas, fornecendo valores de viabilidade distintos entre as diferentes marcas, denominadas como (A), (B) e (C). As marcas (A) e (B) mantiveram-se em torno de uma média, enquanto a (C) apresentou uma queda de cerca de 8%. Além disso, foram preparados reatores descontínuos para promover a fermentação alcoólica de todas as 3 marcas estudadas, acompanhando parâmetros relevantes a esse processo. O primeiro deles é o crescimento celular promovido pela conversão de substrato em biomassa. Para essa etapa também foi realizada contagem, mostrando crescimento celular em todas as marcas, com destaque a marca (A) que teve sua viabilidade reduzida de forma significativa. Outro parâmetro foi o consumo de glicose, cuja concentração foi acompanhada pelo método DNSA. Esse método mostrou, para as 3 marcas, um consumo de aproximadamente 98% da quantidade inicial de glicose presente no meio de cultura. Por fim, foi analisada, através da eboliometria, a produção de etanol. Obteve-se uma formação de etanol semelhante entre as 3 marcas, com valores próximos a 5°GL. Ficou evidenciado que apesar da variação dos valores de viabilidade, o consumo de glicose e produção de etanol foram bem semelhantes.

Palavras-chave: Fermentação; Levedura; Neubauer; *Saccharomyces cerevisiae*; Viabilidade.

ABSTRACT

The species *Saccharomyces cerevisiae* is a yeast capable of promoting the alcoholic fermentation of sugars, consuming the carbon source and producing Ethanol and CO₂. Yeasts are everywhere, commercially different brands and types are found, and can be in lyophilized or liquid form. The main applications are in bakery, brewery and ethanol production. This work analyzed, through direct counting in a Neubauer chamber, the cell viability of 3 commercial brands of this species over 8 weeks, providing distinct viability values between the different brands, called (A), (B) and (C) . Brands (A) and (B) remained around an average, while (C) showed a drop of around 8%. In addition, batch reactors were prepared to promote the alcoholic fermentation of all 3 brands studied, following parameters relevant to this process. The first one is the cell growth promoted by the conversion of substrate into biomass, for this step counting was also performed, showing cell growth in all brands, especially brand (A) which had its viability significantly reduced. Another parameter was glucose consumption, glucose concentration was followed by DNSA method, which showed consumption of almost all glucose in all brands. Finally, the production of Ethanol was analyzed through ebulliometry. Presenting a similar Ethanol formation between the 3 brands, with values around 5°GL. Showing that despite the variation in viability values, glucose consumption and Ethanol production were very similar.

Keywords: Fermentation; Neubauer; *Saccharomyces cerevisiae*; Viability; Yeast.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Reação global da fermentação alcoólica da glicose	17
Figura 2 – Rota metabólica de fermentação alcoólica	18
Figura 3 – Câmara de Neubauer	20
Figura 4 – Células vivas e mortas	21
Figura 5 – Microscópio óptico	25
Figura 6 – Ordem de contagem dos quadrantes	26
Figura 7 – Cálculo da viabilidade celular	26
Figura 8 – Equipamento utilizado para determinar teor alcoólico, eboliômetro, termômetro e régua	28
Figura 9 – Viabilidade da marca (A)	30
Figura 10 – Viabilidade da marca (B)	30
Figura 11 – Viabilidade da marca (C)	31
Figura 12 – Cálculo do Número de células por mm ³	32
Figura 13 – Determinação da concentração celular (em g.L ⁻¹)	33
Figura 14 – Curva analítica do reagente DNSA	36
Figura 15 – DNSA utilizado	37
Figura 16 – Fatores de conversão	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do meio de cultura	23
Tabela 2 – Contagem celular da marca (A) antes e depois da fermentação	33
Tabela 3 – Viabilidade da marca (A) antes e depois da fermentação	34
Tabela 4 – Contagem celular da marca (B) antes e depois da fermentação	34
Tabela 5 – Viabilidade da marca (B) antes e depois da fermentação	35
Tabela 6 – Contagem celular da marca (C) antes e depois da fermentação	35
Tabela 7 – Viabilidade da marca (C) antes e depois da fermentação	36
Tabela 8 – Determinação da concentração de glicose da marca (A)	37
Tabela 9 – Determinação da concentração de glicose da marca (B)	37
Tabela 10 – Determinação da concentração de glicose da marca (C)	38
Tabela 11 – Determinação da concentração de etanol da marca (A)	39
Tabela 12 – Determinação da concentração de etanol da marca (B)	39
Tabela 13 – Determinação da concentração de etanol da marca (C)	39
Tabela 14 – Fatores de conversão	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVO GERAL	14
1.1.1 Objetivos específicos	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	16
2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	17
2.2.1 Etanol	19
2.3 CONTAGEM DE LEVEDURAS	19
2.3.1 Câmara de Neubauer	20
2.4 MÉTODO DNSA	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA	23
3.2 MICRO-ORGANISMO	24
3.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	24
3.4 VIABILIDADE CELULAR	25
3.4.1 Contagem direta no microscópio	25
3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE	27
3.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO	27

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR	29
4.1.1 Viabilidade semanal da marca (A)	29
4.1.2 Viabilidade semanal da marca (B)	30
4.1.3 Viabilidade semanal da marca (C)	31
4.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	31
4.2.1 Análise do crescimento celular	31
4.2.1.1 Crescimento celular da marca (A)	33
4.2.1.2 Crescimento celular da marca (B)	34
4.2.1.3 Crescimento celular da marca (C)	35
4.2.2 Análise da concentração de glicose no processo de fermentação alcoólica	36
4.2.3 Análise da produção de etanol na fermentação alcoólica	38
4.3 FATORES DE CONVERSÃO	40
5 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

As leveduras estão por toda parte, no solo, nas águas, nos alimentos, nos vegetais e nos animais. Esse micro-organismo consegue realizar diversos processos microbiológicos com impacto significativo nas atividades humanas. Por isso, é utilizado pela humanidade há milhares de anos para a fermentação de frutas e cereais. Essa ampla gama de funcionalidades torna as leveduras candidatas atraentes para as muitas aplicações, principalmente na cervejaria e panificação (HATOUM; LABRIE; FLISS, 2012).

Ao longo da história, os micro-organismos mais utilizados na fermentação alcoólica são as leveduras do gênero *Saccharomyces*, sendo a *Saccharomyces cerevisiae*, a principal delas. As leveduras desse gênero podem ser usadas em alimentos para consumo humano, propiciando como, por exemplo, seu uso para a produção de bebidas alcoólicas e produtos relacionados à panificação.

As leveduras conseguem crescer, tanto na presença, quanto na ausência de oxigênio. Quando há oxigênio suficientemente disponível e a concentração de substrato é baixa, ocorre a fosforilação oxidativa (respiração aeróbica), que tem, nesse processo, o oxigênio como acceptor final de elétrons. Nesse caso, a produção de etanol é pouca ou inexistente. Por outro lado, na ausência de oxigênio ou na presença de alta concentração de glicose, ocorre a anaerobiose, fazendo com que o etanol seja o principal produto formado (CINELLI, 2012).

Dessa forma, quando a *Saccharomyces cerevisiae* não realiza respiração, ocorre a fermentação produzindo etanol. A esse processo dá-se o nome de fermentação alcoólica. Nesse processo, açúcares, como a glicose, são convertidos em energia celular, levando à formação de etanol e dióxido de carbono. A utilização da glicose para a produção de energia é um processo comum a praticamente todos os organismos vivos. A transformação da glicose em outras substâncias liberando energia durante o processo, é chamada de glicólise (MONGELO, 2012).

As leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae* podem ser encontradas comercialmente de diferentes formas, destacando-se as destinadas à panificação e a produção de cerveja. As marcas destinadas à produção de cerveja conferem neutralidade ao sabor característico do fermento. Para serem comercializadas, estas leveduras passam por um processo de liofilização, o qual é uma técnica de secagem destinada à remoção de água através da sublimação. Nesse processo físico, o

material é congelado e levado a uma câmara hermética e, em seguida, o ar interno é removido. Assim, gera-se um ambiente de baixíssima pressão, fornecendo condições para ocorrer a sublimação (TERRONI et al., 2013).

Para além das aplicações nas indústrias já mencionadas, a expansão da produção de etanol a partir de fermentação de açúcares, sob a ação de leveduras, mostrou-se, com o passar dos anos, uma alternativa economicamente viável no combate aos impactos ambientais associados aos combustíveis fósseis. Dessa forma, a tecnologia tem contribuído, de forma sustentável, para o suprimento da demanda energética do país (ASSIS, 2021).

O Brasil é pioneiro no uso do etanol como combustível para automóveis, abastecendo veículos pela primeira vez há cerca de 100 anos, na década de 1920. Entretanto, o setor industrial em questão ganhou força em 1975 quando o Programa Nacional do Álcool (Proálcool), programa financiado pelo governo federal. O Brasil estava diante da crise mundial do petróleo e tinha como objetivo a substituição dos combustíveis fósseis em grande escala. O sucesso do programa está atrelado à obrigatoriedade da mistura do etanol à gasolina e à expansão da comercialização de carros que utilizam etanol hidratado como combustível, denominados de “flex fuel” (CASTILLO, 2013; PENSAMENTO VERDE, 2014).

A produção de etanol no Brasil é de grande importância social e econômica. Esse álcool é utilizado em diversas áreas, como, alimentos, bebidas alcoólicas e na produção de combustíveis. Esses fatores tornam necessária a constância nos estudos, propiciando avanços tecnológicos na área da fermentação alcoólica de açúcares. Pelo exposto, devido à importância socioeconômica da produção de etanol no Brasil e no mundo, estudos visando a melhoria de procedimentos no processo fermentativo tornam-se de fundamental importância.

1.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho visa avaliar a viabilidade celular e a capacidade alcooleira de 3 marcas comerciais de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*).

1.1.1 Objetivos específicos

- Realizar contagem celular das leveduras analisadas;
- Preparar meio de cultura adequado ao crescimento das leveduras em estudo;
- Preparar biorreatores em processo descontínuo para cada marca de levedura;
- Acompanhar e quantificar o crescimento celular das leveduras;
- Acompanhar e quantificar o consumo de substrato (glicose);
- Acompanhar e quantificar a formação do produto principal (etanol).
- Determinar o rendimento da produção de etanol em cada marca estudada.
- Calcular os fatores de conversão

2 REVISÃO DE LITERATURA

Este capítulo apresenta conceitos fundamentais para a compreensão de diversos tópicos relevantes ao trabalho. Para isso, a espécie *Saccharomyces cerevisiae* foi caracterizada; o processo de fermentação alcoólica foi detalhado, desde a quebra da molécula de glicose (glicólise) até a produção do principal produto formado (etanol); e as técnicas empregadas nas análises realizadas nesta pesquisa foram descritas e devidamente fundamentadas.

2.1 SACCHAROMYCES CEREV рSIAE

As leveduras possuem crescimento dominante unicelular, não apresentam flagelos ou outros órgãos de locomoção. Sua reprodução, quando assexuada, ocorre por brotamento multilateral e polar ou por fissão. Já quando ocorre de forma sexuada, é por meio de esporos. A morfologia das leveduras pode ser analisada por microscopia, sendo observadas diversas formas: esféricas, ovóides, pêra, cilíndrica e até alongadas em pseudomicélio. Apesar de cada espécie possuir uma forma característica, culturas puras apresentam variações no tamanho e na forma das células. Em 1670, Antony Van Leeuwenhoek visualizou microscopicamente pela primeira vez uma célula de levedura, trazendo contribuições relevantes para a microbiologia, incentivando, por meio dos seus trabalhos, estudos mais aprofundados acerca das leveduras (CECCATO-ANTONINI, 2012).

As *Saccharomyces* têm grande importância e aplicabilidade em processos biotecnológicos de diferentes áreas: panificação, produção de bebidas alcoólicas e produção de combustível alternativo e renovável, fazendo com que esse micro-organismo seja amplamente estudado. Assim, características como a eficiência fermentativa, o nível de tolerância ao etanol, resistência a elevadas concentrações de açúcares, desempenho na floculação e produção de metabólitos anti-contaminantes, são constantemente objeto de estudo (BORTOLI et al., 2013).

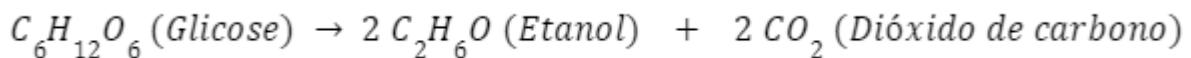
As leveduras podem utilizar tanto o oxigênio quanto um componente orgânico como acceptor final de elétrons, fazendo com que elas possam sobreviver em diversos ambientes. Quando possui oxigênio disponível, as leveduras respiram aerobicamente para metabolizar hidratos de carbono, levando à formação de dióxido de carbono e

água. Por outro lado, na ausência de oxigênio, elas fermentam os hidratos de carbono e produzem etanol e dióxido de carbono. Vale destacar também que o pH ideal para as leveduras encontra-se entre 4,0 e 4,5. Já os limites de tolerância 2,2 e 8,0 (CINELLI, 2012).

2.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Primeiramente, ressalta-se que a fermentação alcoólica é uma técnica utilizada há milhares de anos. Os egípcios já fabricavam pão e produziam bebidas alcoólicas a partir de cereais e frutas a mais de 4 mil anos. A fermentação alcoólica ocorre através da atividade enzimática da levedura sobre açúcares fermentescíveis presentes na solução. Nesse processo biológico, a energia fornecida pelas reações de oxidação parcial possibilita o crescimento dos micro-organismos, enquanto a oxidação anaeróbia dos açúcares é utilizada para a formação de etanol e dióxido de carbono, podendo ser demonstrada pela reação global contida na figura 1 (BASTOS 2010; CINELLI, 2012).

Figura 1 – Reação global da fermentação alcoólica da glicose

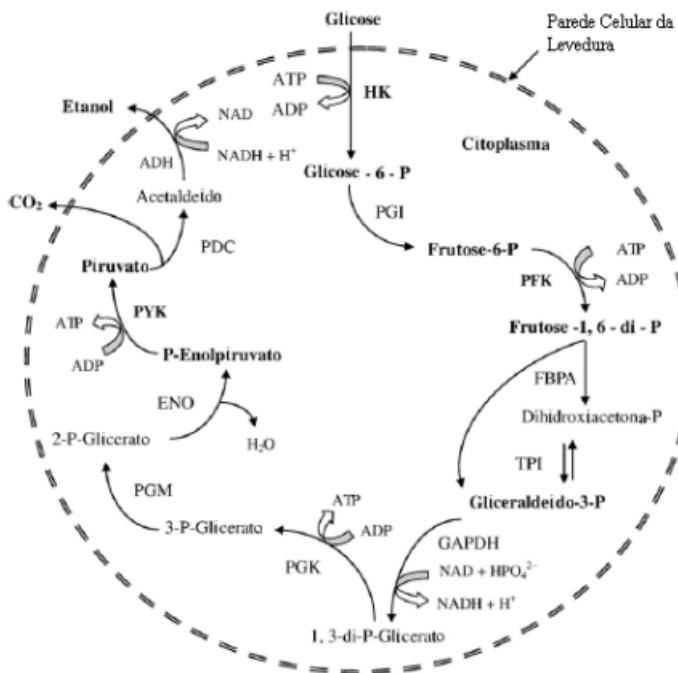


Fonte: Autor (2022).

Na produção do etanol a partir de fermentação alcoólica são destacadas 3 fases, são elas: preparo do substrato, fermentação e destilação. O preparo do substrato consiste na obtenção dos açúcares. A fermentação é a etapa onde os açúcares são convertidos em etanol e dióxido de carbono. A destilação é a etapa onde o etanol é separado. Para isso, primeiro é separado do substrato fermentado e depois o etanol é purificado e concentrado (CORREA, 2015).

A glicólise é a principal rota de metabolização na fermentação alcoólica por meio de leveduras, pela qual uma molécula de glicose é oxidada, produzindo duas moléculas de piruvato. Para ilustrar, a Figura 2 mostra a formação de etanol, a partir da fermentação de glicose sob ação de leveduras.

Figura 2 – Rota metabólica de fermentação alcoólica



Fonte: CINELLI (2012)

No processo fermentativo, a glicólise produz ácido pirúvico, encontrado como piruvato e NADH no meio celular. É necessário que o NADH seja oxidado, pois o processo de produção de energia requer a sua forma oxidada (NAD^+). E é justamente a forma de oxidação deste composto que caracteriza o tipo de fermentação. Na fermentação alcoólica, o piruvato perde um átomo de carbono na forma de CO_2 , isso ocorre sob a ação de uma enzima chamada de piruvato descarboxilase. Para catalisar, essa enzima necessita de um sal de magnésio. Além dela, existe também uma coenzima, a tiamina pirofosfato, que auxilia a catálise e forma aldeído acético. No que lhe concerne, o aldeído acético sofre redução e causa a oxidação do NADH para NAD^+ , formando também o etanol, intermediado por outra enzima, a álcool desidrogenase (BORZANI et al., 2001).

2.2.1 Etanol

O etanol C_2H_6O é uma substância orgânica que faz parte da família dos álcoois, compostos em que o carbono saturado se liga à hidroxila. Sua nomenclatura é formada a partir da junção do prefixo "etano" (composto orgânico com 2 átomos de carbono na cadeia), com o sufixo "ol", o qual indica ser um álcool que possui uma única hidroxila. A presença dessa hidroxila em sua composição torna o etanol uma substância polar, ou seja, possui polos eletrônicos distintos em sua cadeia, algo que é possível graças à presença do oxigênio. Devido a essa característica, o etanol mistura-se facilmente com água e outros líquidos que também são polares. Seu aspecto é um líquido incolor, volátil, inflamável, que possui um cheiro bem característico. O álcool etílico, como também é conhecido esse composto, pode ser obtido a partir da fermentação de açúcares (como a glicose) (BORZANI et al., 2001).

2.3 CONTAGEM DE LEVEDURAS

A contagem de micro-organismos é de grande importância nos processos fermentativos, indicando o crescimento celular e formação do produto. Esta pode ser realizada por plaqueamento que é um método clássico. Ele consiste no inóculo de 1ml em meio de cultura em placa de Petri, podendo levar até 72 horas para ser realizado. Esse tempo de resposta faz com que esse método seja inviável na utilização em empresas como destilarias e cervejarias. Em função dessa limitação, o método adotado pela maioria das empresas é a contagem em câmara de Neubauer, utilizando azul de metileno preparado em citrato, cujo resultado é imediato e direto, uma vez que este método distingue células vivas das mortas (MONGELO, 2012).

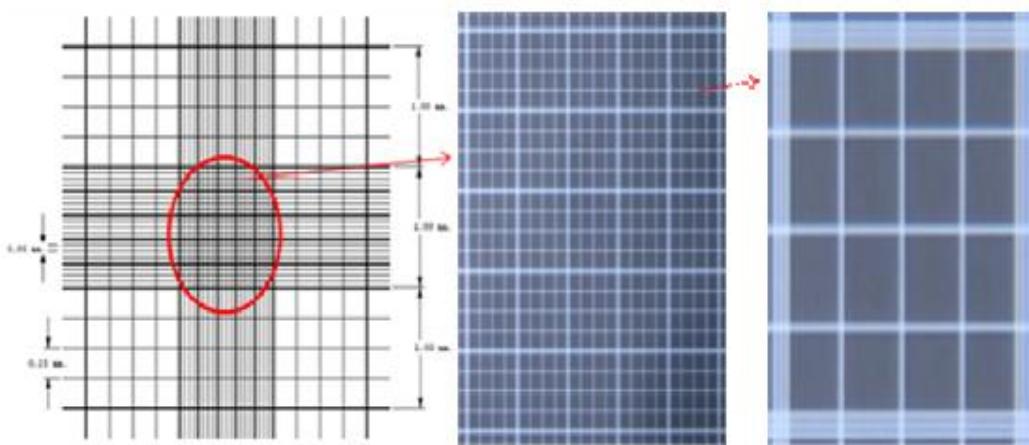
Para determinar a proporção de células viáveis em uma cultura ou em uma fermentação, são comumente empregados os métodos de plaqueamento ou o método de observação microscópica. O método de contagem direta exige a utilização de menos equipamentos, possibilitando, inclusive, analisar a morfologia celular simultaneamente à contagem. Outro ponto importante a ser analisado é a tolerância da levedura ao etanol. Além deste álcool, a presença de álcoois superiores, ácidos graxos e seus ésteres, que também podem intoxicar a célula da levedura, ocasionando a sua morte e prejudicando a viabilidade celular (CECCATO-ANTONINI, 2012).

2.3.1 Câmara de Neubauer

Um método direto é a contagem de leveduras na câmara de Neubauer, que consiste em uma lâmina de microscopia com espessura maior que a de uma lâmina normal. Cada lâmina possui duas câmaras gravadas. Uma lamínula especial de quartzo é colocada em cima da câmara de Neubauer, ficando a exatamente 0,1 mm acima da base da câmara. Dessa forma, ao se adicionar uma solução na câmara de Neubauer a profundidade é conhecida. As marcações dos quadrantes são feitas a partir de linhas perpendiculares que se conectam. Ao realizar o aumento dessa imagem no microscópio, é possível perceber três tipos de quadrantes distintos, que juntos formam um quadrado maior. Para realizar a contagem de leveduras, os quadrantes utilizados são os centrais. O padrão é que existam 25 quadrantes, sendo cada quadrante constituído por 16 retículos. São nesses quadrantes onde a contagem ocorre, determinando a concentração de células presentes no volume da amostra, sendo possível calcular a concentração total de células de leveduras (MONGELO, 2012).

A figura 3 ilustra uma câmara de Neubauer.

Figura 3 – Câmara de Neubauer



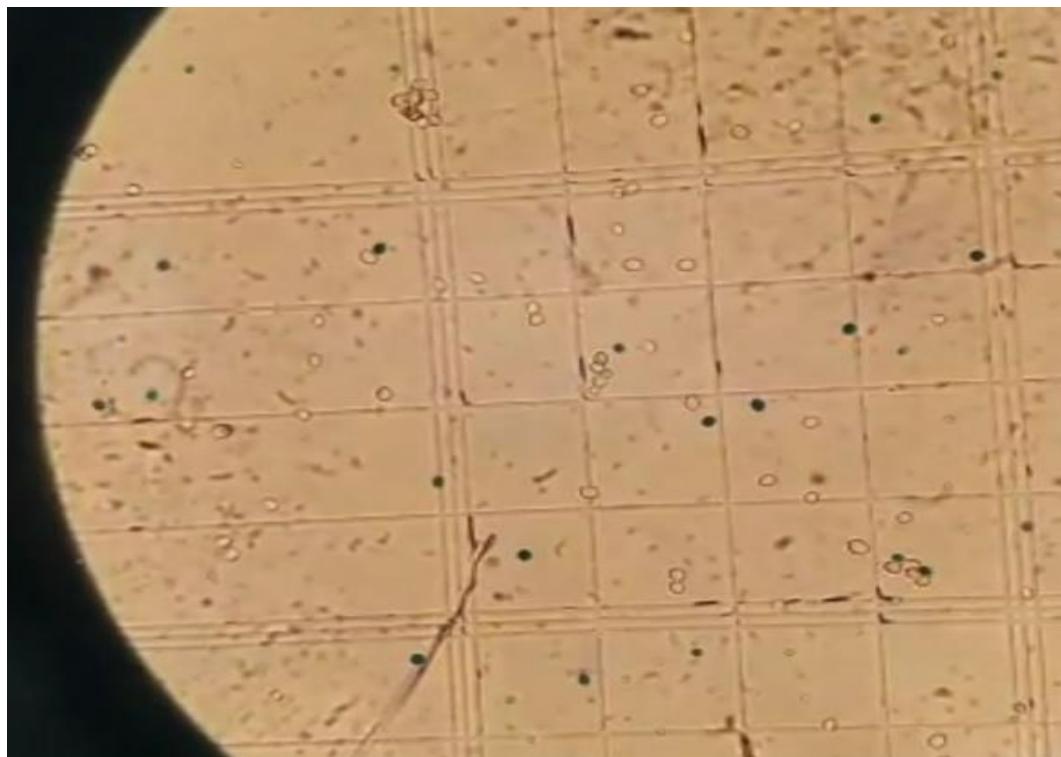
Fonte: Mongelo (2012)

Para distinguir as células vivas das células mortas, é empregada a técnica de coloração com azul de metileno, que consiste em misturar partes iguais de levedura (amostra) e do corante (azul de metileno). Dessa forma, as células vivas não se colorem, enquanto as células mortas serão tingidas de azul. Isso ocorre porque suas

enzimas, quando ativas, conseguem reduzir o grupo cromofórico do azul de metileno, perdendo, assim, sua coloração azul. Para a contagem de células viáveis é utilizado um microscópio óptico comum para leitura realizada na câmara de Neubauer.

A Figura 4 é uma foto tirada durante uma das contagens de células e serve para ilustrar o tingimento de células mortas pelo corante azul de metileno.

Figura 4 – Células vivas e mortas



Fonte: Autor (2022).

2.4 MÉTODO DNSA

O teste de DNSA (ácido dinitrosalicílico) foi desenvolvido por Sumner em 1921 e baseia-se na capacidade de o ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA) ser reduzido pela glicose a um composto nitroamino análogo (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) de coloração acastanhada intensa. Esse composto acastanhado obedece à lei de Lambert-Beer, ou seja, a transmitância é proporcional à concentração da substância dissolvida que, neste caso, são os açúcares redutores (LIMA, 2013; VASCONCELOS, 2013).

Ao longo das décadas, Sumner realizou diversos estudos acerca do DNSA aplicado à determinação de açúcares redutores. Em 1924, Sumner apresentou

modificações no método, sugerindo a introdução do tartarato de sódio e potássio ao meio alcalino. Além de Sumner, Bernfeld (em 1955) e Miller (em 1959) também sistematizaram variações desse método de análise, fazendo com que seus trabalhos sejam frequentemente citados. O uso de técnicas de determinação de açúcares redutores ocorre de forma rotineira em diversos laboratórios de ensino e pesquisa, vale ressaltar também, que diversos laboratórios utilizam adaptações desses métodos. Dessa forma, a análise por meio do espectrofotômetro, a espectrofotometria, é considerada simples e potente, pois permite que em poucas horas de trabalho sejam realizadas várias análises de diferentes amostras (VASCONCELOS, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo e a coleta de dados foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco ao longo de 8 semanas, realizando contagem de células viáveis de cada uma das marcas a cada 7 dias. Além disso, na sétima semana, foi estudada a capacidade de fermentação alcoólica de cada marca, analisando-se as concentrações de biomassa (células), substrato (glicose) e a formação de produto (etanol). Foram analisadas 03 marcas de leveduras comerciais que foram denominadas como A, B, C.

Para a elaboração deste trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos: pipetas graduadas, volumétricas e de Pasteur; erlenmeyers de 50 ml e 125 ml; balão volumétrico de 50 ml; tubos de ensaio; câmaras de Neubauer; Béqueres e provetas de diversos tamanhos; espátulas; balança analítica; centrifuga; banho-maria; microscópio óptico; ebuliômetro; espectrofotômetro.

Os materiais utilizados foram: corante celular (0,02% de azul de metileno e 2% de citrato de sódio); fermento biológico de 3 marcas distintas (A, B e C); meio de cultura; reagente DNSA ($C_7H_4N_2O_7$ em meio alcalino – NaOH e $KNaC_4H_4O_6$).

3.1 COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

O meio de cultura utilizado para promover o crescimento celular do micro-organismo está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Composição do meio de cultura

Glicose ($C_6H_{12}O_6$)	100 g
Extrato de levedura	2 g
Uréia (CH_4N_2O)	1 g
Fosfato monopotássio (KH_2PO_4)	1 g
Sulfato de magnésio heptahidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,5 g
Água (H_2O)	1 l

Fonte: Autor (2022).

3.2 MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo estudado foi a levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae* proveniente de fermento biológico comercial de três marcas diferentes. Os nomes das marcas foram omitidos e a cada uma delas foi atribuída uma letra (A; B; C).

Um detalhe importante a ser mencionado é que a marca C já estava fora da validade quando foi aberta para a primeira contagem, sua validade era até 07/22 e ela foi aberta dia 09/08/22 para a primeira contagem.

3.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Cada fermentação alcoólica foi realizada em um erlenmeyer de 125 ml contendo 83 ml de meio de cultura e 0,083 g de levedura liofilizada resultando numa concentração de 1 g.L^{-1} de levedura.

Foram realizadas, pelo método de contagem direta no microscópio, contagens de células logo após a inoculação e ao final das 48 horas de fermentação. Além disso, as concentrações iniciais e finais de glicose foram determinadas pelo método DNSA. E por fim, a quantidade de etanol produzida foi determinada por eboliometria.

De posse dos resultados, foi possível comparar as marcas, determinando qual a levedura comercial dentre as estudadas que apresenta a maior capacidade alcooleira.

3.4 VIABILIDADE CELULAR

3.4.1 Contagem direta no microscópio

Para realizar a contagem, primeiramente deve ser preparada uma suspensão, para isso, para preparar cada suspensão foram pesados e adicionados a um balão volumétrico de 50 ml, 0,025 g de levedura liofilizada, preenchendo o balão com água destilada até a marca dos 50 ml, proporcionando uma concentração de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$.

Após homogeneizar bem, foram adicionados, com o auxílio de uma pipeta graduada, 1 ml da suspensão a um tubo de ensaio, em seguida, a esse mesmo tubo de ensaio também foram adicionados 1 ml da solução de corante celular (0,02% de azul de metileno e 2% de citrato de sódio) sendo deixado reagir por 15 minutos. Após este lapso de tempo, a mistura foi homogeneizada e uma alíquota dessa mistura foi adicionada a uma câmara de Neubauer, com a ajuda de uma pipeta de Pasteur. Câmara essa que havia sido colocada e focada previamente no microscópio óptico modelo (Nikon eclipse E100) no qual foram realizadas todas as contagens. O equipamento mencionado está apresentado abaixo, na Figura 5.

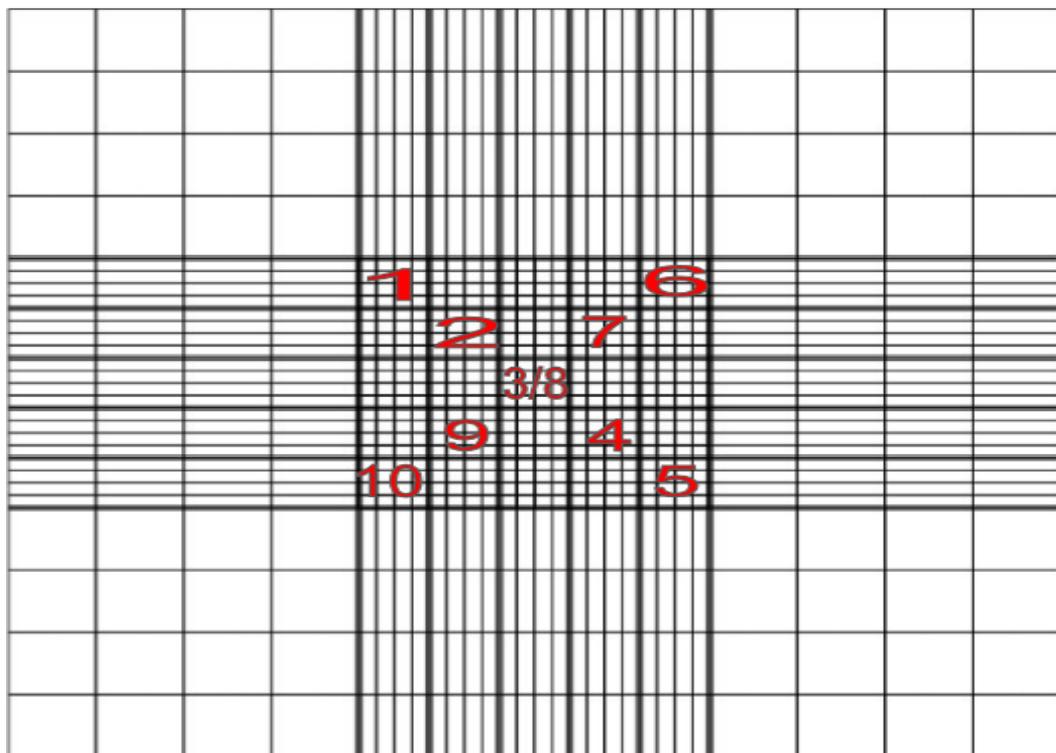
Figura 5 – Microscópio óptico



Fonte: Autor (2022).

A contagem foi realizada nos quadrantes centrais da câmara de Neubauer, onde são contados 10 quadrantes que seguem a ordem de contagem do quadrante 1 até o quadrante 10, ilustrada a seguir na Figura 6.

Figura 6 – Ordem de contagem dos quadrantes



Fonte: SPLABOR, adaptada pelo autor (2022).

Foram adotados 2 limites em cada quadrante, sendo desprezadas as células encontradas em cima deles. A metodologia adotada foi contar as células que estavam no limite superior e no limite lateral esquerdo do quadrante, desprezando as dos limites inferior e lateral direito. Assim, foi anotado o número de células vivas e mortas e a viabilidade celular da amostra foi calculada. (CECCATO-ANTONINI, 2012).

A viabilidade celular é obtida conforme a equação apresentada na figura 7.

Figura 7 – Cálculo da viabilidade celular

$$\text{Viabilidade em \%} = \left(\frac{\text{Nº de células vivas}}{\text{Nº de células vivas} + \text{Nº de células mortas}} \right) \times 100$$

Fonte: Autor (2022).

3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE

A determinação da concentração de glicose foi realizada pelo método DNSA. Segundo o método, para cada uma das determinações desejadas, uma alíquota de 0,5 ml da amostra foi transferida para um tubo Folin Wu e em seguida foi adicionado 1 ml do reagente DNSA ao mesmo tubo. Sendo a mistura agitada e o tubo de ensaio colocado em banho-maria em água a 100°C durante 5 minutos. Após o aquecimento, a reação foi interrompida colocando o tubo em banho de água fria, previamente preparado.

Em seguida, o tubo foi preenchido com água destilada até a marca de 12,5 ml e a mistura é homogeneizada. Posteriormente a amostra foi colocada em uma cubeta onde se realizou a leitura da intensidade da cor da amostra em um espectrofotômetro a 540 nm contra um branco preparado de maneira análoga, porém, usando-se 0,5 ml de água ao invés da amostra.

3.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR ALCOÓLICO

O teor alcoólico foi determinado por meio de um ebuliômetro, seguindo a metodologia apresentada por (SILVA, 2016).

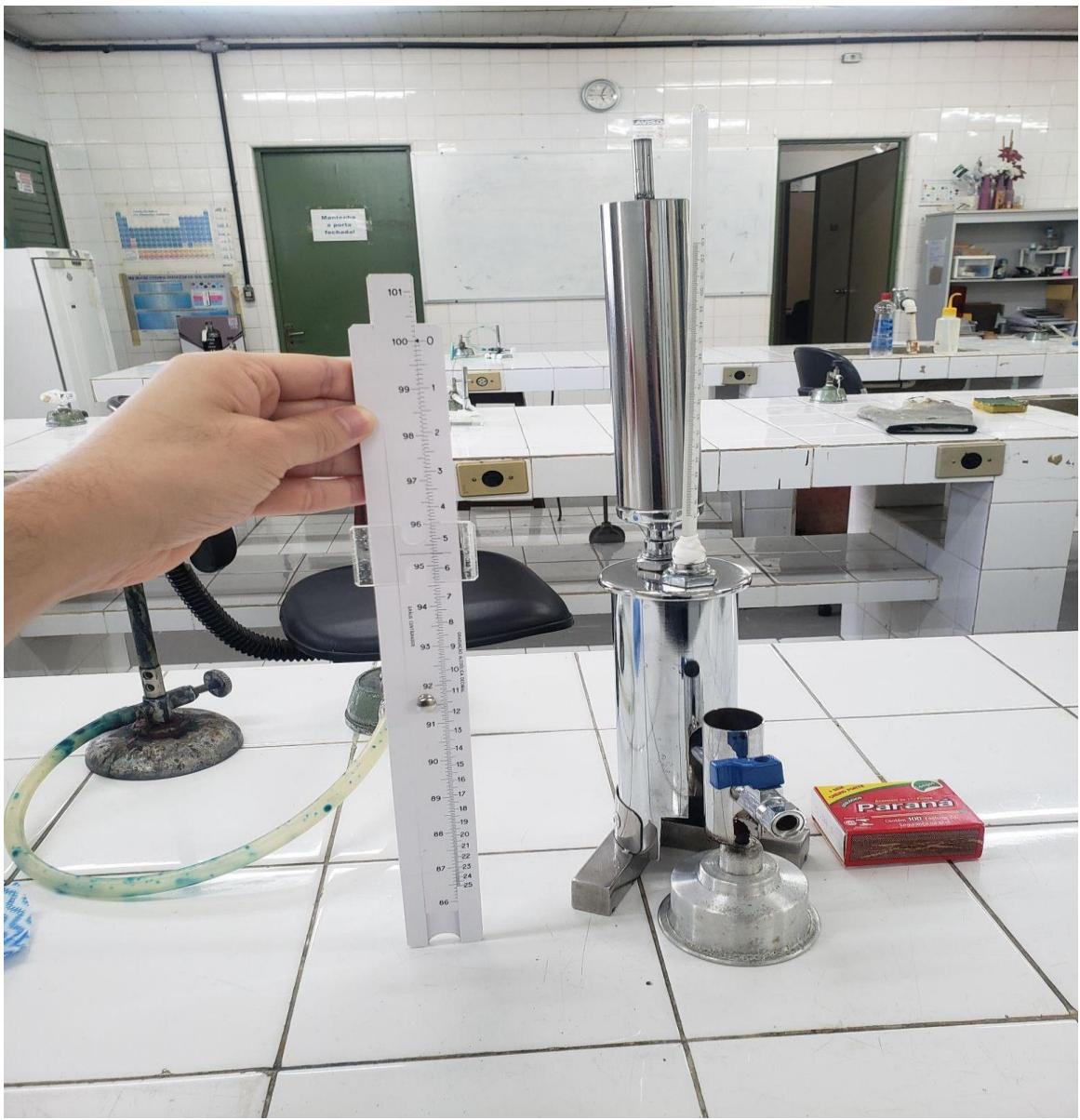
Primeiramente foi determinado o ponto de ebulação da água destilada (calibração do equipamento). Para isso, 50 ml de água destilada foram adicionados na caldeira do ebuliômetro previamente limpa e lavada com água destilada. Em seguida, o termômetro foi conectado e o condensador preenchido com água destilada. Através do termômetro, acompanhou-se o aumento da temperatura. Ao perceber a estabilização da temperatura, foi aguardado 1 minuto para garantir que a temperatura de ebulação foi mesmo atingida, anotou-se, em seguida, o valor. Zerou-se a régua do equipamento, fazendo com que a temperatura de ebulação para a água pura determinada no equipamento fosse igual a zero °GL.

Posteriormente, a água da caldeira e a água do condensador foram despejadas e o condensador foi resfriado com água corrente. Para determinar o teor de etanol presente em cada amostra, o procedimento anterior foi repetido substituindo a água destilada pela amostra. Dessa forma, obteve-se os valores de temperatura de ebulação das amostras.

E por fim, com o auxílio da régua, determinou-se a concentração alcoólica que corresponde à temperatura de ebulação encontrada.

A Figura 8 mostra os instrumentos utilizados nesta etapa.

Figura 8 – Equipamento utilizado para determinar teor alcoólico, ebuliômetro, termômetro e régua



Fonte: Autor (2022).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir serão explanados os resultados obtidos na pesquisa deste trabalho de TCC.

4.1 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR

A partir do método de contagem direta em câmara de Neubauer, foi obtido o número de células vivas e mortas em cada amostra, sendo possível calcular a viabilidade celular por meio da equação contida na figura 7.

As viabilidades de cada marca de fermento biológico determinadas ao longo de 8 semanas foram compiladas em gráficos, apresentados pelas figuras 9,10 e 11.

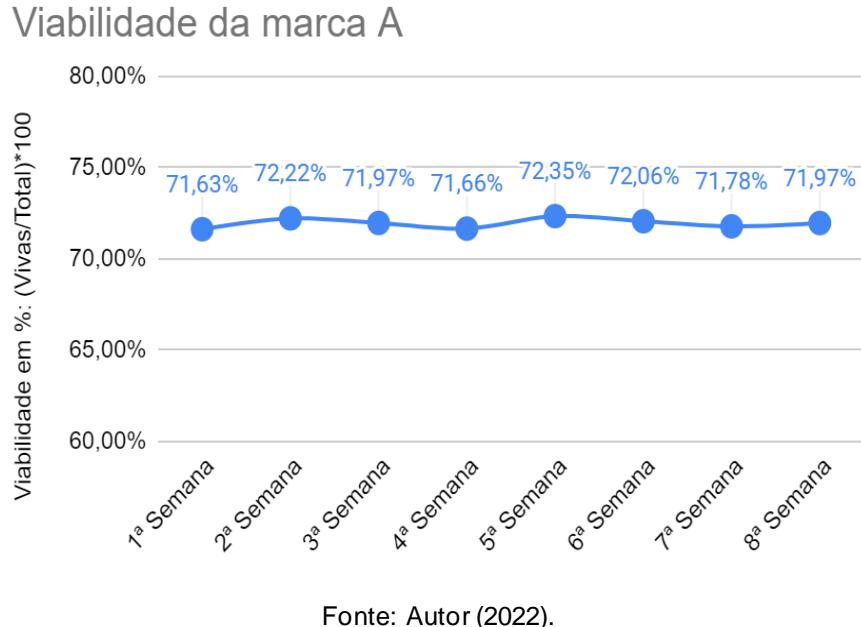
4.1.1 Viabilidade semanal da marca (A)

Como pode-se observar na Figura 9, a marca (A) oscilou em torno de uma média (71,97%) apresentando um desvio padrão de 0,0026. Trata-se de um valor interessante, pois é desejável que o desvio padrão apresente números próximos a zero.

É importante ressaltar que essa contagem é realizada com a levedura liofilizada suspensa em água. A falta de nutrientes dificulta um possível crescimento celular. Então, essa oscilação de resultados está relacionada a erros decorrentes dessa etapa, como, por exemplo: dificuldade na homogeneização da suspensão de leveduras, tempo empregado na contagem e acuidade visual do analisador.

Observa-se que durante as 08 semanas em que o pacote de leveduras esteve parcialmente fechado e mantido sob refrigeração, o número de células viáveis manteve-se constante.

Figura 9 – Viabilidade da marca (A)



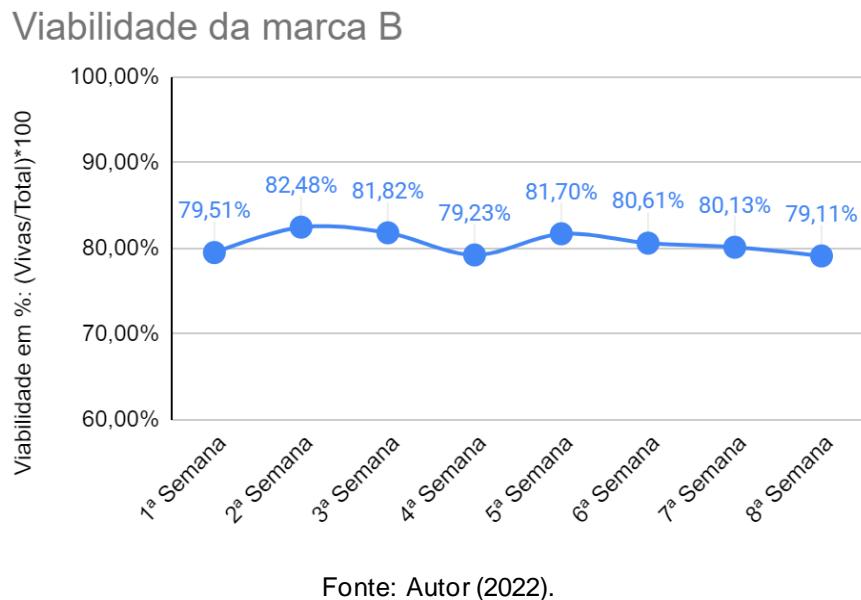
Fonte: Autor (2022).

4.1.2 Viabilidade semanal da marca (B)

Como mostra a figura 10, a viabilidade da marca (B) também oscilou em torno de uma média (80,37%), com desvio padrão foi de 0,0130, resultado um pouco maior do que o da marca (A).

Os mesmos erros citados anteriormente explicam a oscilação desta marca.

Figura 10 – Viabilidade da marca (B)



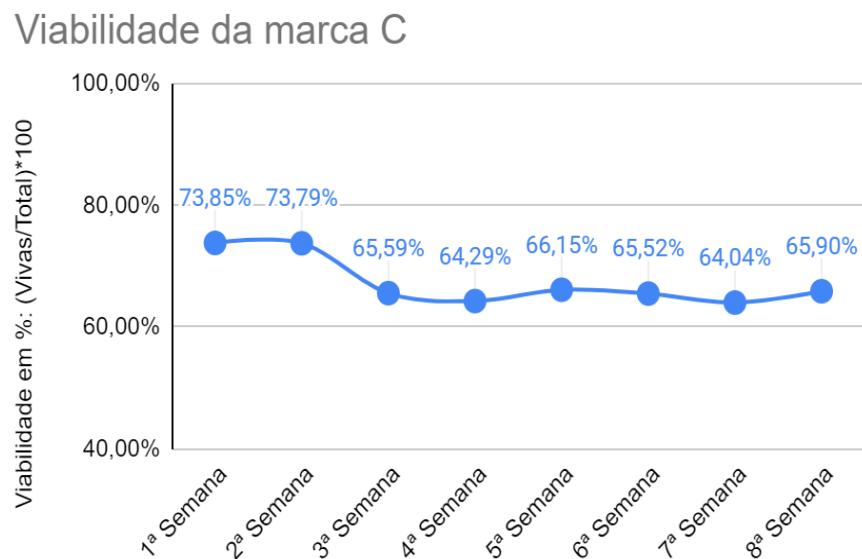
Fonte: Autor (2022).

4.1.3 Viabilidade semanal da marca (C)

A figura 11 mostra que a marca (C) apresentou um comportamento um pouco diferente das duas anteriores, nas duas primeiras semanas apresentou valores de viabilidade acima dos 73%, mas na terceira semana houve uma queda na sua viabilidade. A partir da terceira semana, os valores oscilaram próximos a uma média de 65,55%. O desvio padrão ao longo das 8 semanas foi de 0,0404.

Para a marca (C), além dos erros anteriormente citados, deve-se considerar que esse fermento estava fora da validade do fabricante, fator esse que pode explicar essa queda significativa da viabilidade.

Figura 11 – Viabilidade da marca (C)



Fonte: Autor (2022).

4.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

4.2.1 Análise do crescimento celular

Por meio do método de contagem em câmara de Neubauer, foram obtidos os valores de células vivas e mortas de cada uma das marcas, tanto logo após a inoculação quanto após a fermentação.

Com esses dados, foi possível acompanhar o crescimento celular e, consequentemente, a viabilidade e contagem celular de cada marca durante a fermentação alcoólica.

Para determinar a concentração de células vivas em N^océlulas.mm⁻³, deve-se considerar o volume câmara de Neubauer. Esse volume é calculado da seguinte forma: cada quadrículo possui 0,0025 mm² de área e a distância entre a câmara e a lâmina é de 0,1 mm. Cada quadrante tem 16 quadrículos menores, como foram contados 10 quadrantes, totalizam-se 160 quadrículos. Portanto, o volume total é de 0,04 mm³.

Além disso, também deve ser considerado o fator de diluição adotado no preparo da amostra para a contagem.

Figura 12 – Cálculo do Número de células por mm³

$$\frac{N^{\circ} \text{ de células}}{mm^3} = N^{\circ} \text{ de Células contadas} \times \text{fator de diluição} \times \frac{1}{0,04 \text{ mm}^3}$$

Fonte: Autor (2022).

De posse do valor em N^océlulas.mm⁻³, basta multiplicar por 10⁶ se obter o resultado em N^océlulas.L⁻¹. Para converter a concentração de N^océlulas.L⁻¹ para g.L⁻¹ é necessário dividir o valor em N^océlulas.L⁻¹ pela quantidade de células vivas presentes em 1 g de fermento biológico. Esse valor não é facilmente encontrado e as poucas marcas que o disponibilizam, trabalham com valores médios.

O valor adotado foi extraído do site da associação dos cervejeiros artesanais do Espírito Santo, que mostra que as 11 marcas apresentam um valor na ordem de 6.10⁹ N^océlulas.g⁻¹ (ASSOCIAÇÃO DOS CERVEJEIROS ARTESANAIS DO ESPÍRITO SANTO, 2022).

Com isso, foi realizada a seguinte divisão, apresentada na figura 13:

Figura 13 – Determinação da concentração celular (em g.L⁻¹)

$$\frac{X \frac{\text{Nº células}}{l}}{6 \times 10^9 \frac{\text{Nº células}}{g}} = \frac{X}{6 \times 10^9} \frac{g}{l}$$

Fonte: Autor (2022).

4.2.1.1 Crescimento celular da marca (A)

A tabela 2 apresenta os dados referentes à contagem celular na inoculação e após a fermentação para a marca (A).

Tabela 2 – Contagem celular da marca (A) antes e depois da fermentação

Tempo (h)	Células vivas	Células mortas	Células totais	[Cvivas] (Nºcélulas.mm ⁻³)	[Cvivas] (Nºcélulas.L ⁻¹)	[Cvivas] (g.L ⁻¹)
0	262	36	298	6,55.10 ³	7,75.10 ⁹	1,09
48	310	700	1010	7,75.10 ³	7,75.10 ⁹	1,29

Fonte: Autor (2022).

Para a análise e determinação dos fatores de conversão, é considerado apenas o número de células vivas, porém, no caso dessa marca de levedura, para enxergar que houve de fato crescimento celular relevante, faz-se necessário apresentar também o número de células mortas.

Dessa forma, o total de células demonstra que houve de fato crescimento celular, porém ocorreu uma significativa queda na viabilidade, como mostra a tabela 3.

Tabela 3 – Viabilidade da marca (A) antes e depois da fermentação

Tempo (h)	Viabilidade
0	87,92%
48	30,69%

Fonte: Autor (2022).

Como pode-se perceber, houve uma queda de 57,23% da viabilidade.

4.2.1.2 Crescimento celular da marca (B)

A tabela 4, apresentada a seguir, contém os dados referentes à contagem celular na inoculação e após a fermentação para a marca (B).

Tabela 4 – Contagem celular da marca (B) antes e depois da fermentação

Tempo (h)	Células vivas	Células mortas	Células totais	[C _{vivas}] (Nº células.mm ⁻³)	[C _{vivas}] (Nº células.L ⁻¹)	[C _{vivas}] (g.L ⁻¹)
0	376	54	430	9,40.10 ³	9,40.10 ⁹	1,57
48	1590	307	1897	3,98.10 ³	3,98.10 ¹⁰	6,63

Fonte: Autor (2022).

No caso da marca (B) o crescimento celular já fica evidenciado pelo aumento de células vivas, passando de uma concentração de 1,57 g.L⁻¹ na inoculação para 6,63 g.L⁻¹ após a fermentação de 48 horas.

As viabilidades inicial e final também foram comparadas, os valores estão na tabela 5.

Tabela 5 – Viabilidade da marca (B) antes e depois da fermentação

Tempo (h)	Viabilidade
0	87,44%
48	83,82%

Fonte: Autor (2022).

Como pode-se analisar, houve uma queda de 3,62% da viabilidade, valor bem inferior ao obtido para a marca (A).

4.2.1.3 Crescimento celular da marca (C)

A tabela 6 apresenta os valores referentes à contagem celular na inoculação e após a fermentação para a marca (C).

Tabela 6 – Contagem celular da marca (C) antes e depois da fermentação

Tempo (h)	Células vivas	Células mortas	Células totais	[Cvivas] (Nºcélulas.mm ⁻³)	[Cvivas] (Nºcélulas.L ⁻¹)	[Cvivas] (g.L ⁻¹)
0	243	32	275	6,08.10 ³	6,08.10 ⁹	1,01
48	1140	360	1500	2,85.10 ³	2,85.10 ¹⁰	4,75

Fonte: Autor (2022).

Para a marca (C) houve um aumento da concentração de células vivas, passando de 1,01 g.L⁻¹ para 4,75 g.L⁻¹.

As viabilidades mais uma vez foram comparadas.

Tabela 7 – Viabilidade da marca (C) antes e depois da fermentação

Tempo (h)	Viabilidade
0	88,36%
48	76,00%

Fonte: Autor (2022).

A tabela 7, mostra uma queda de 12,36% na viabilidade celular da marca (C).

4.2.2 Análise da concentração de glicose no processo de fermentação alcoólica

A determinação da concentração de glicose foi obtida através do método DNSA, onde a concentração de glicose se relaciona com a absorbância observada no espectrofotômetro, podendo ser determinada pela equação da curva analítica do DNSA utilizado, curva essa, apresentada na figura 14.

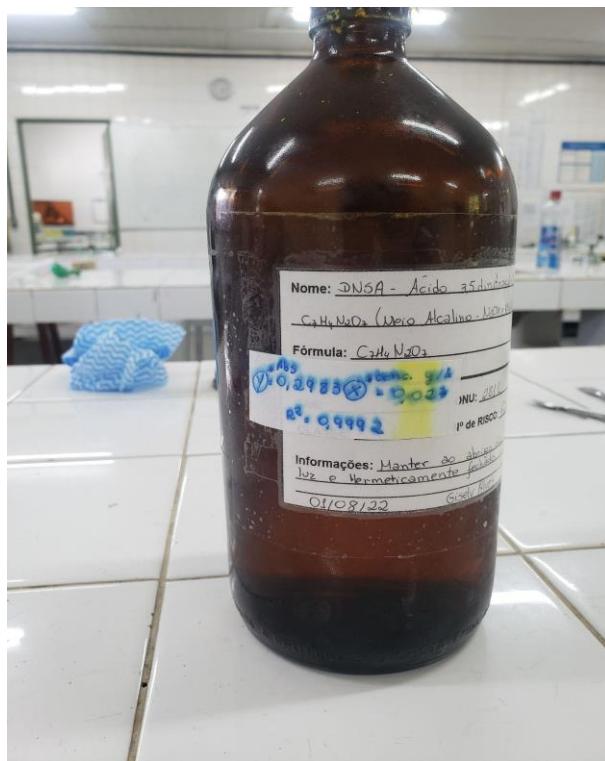
Figura 14 – Curva analítica do reagente DNSA

$$Y = 0,2983 * x - 0,027$$

Fonte: Autor (2022).

A Figura 15 é uma foto tirada do DNSA utilizado. Nela pode-se ver a equação utilizada neste trabalho.

Figura 15 – DNSA utilizado



Fonte: Autor (2022).

Os valores obtidos para as 3 marcas estão apresentados nas tabelas 8, 9 e 10.

Tabela 8 – Determinação da concentração de glicose da marca (A)

Tempo (h)	Absorbância	Fator de diluição	Concentração de glicose (g.L ⁻¹)
0	0,268	1/100	98,89373114
48	0,615	1	2,152195776

Fonte: Autor (2022).

Tabela 9 – Determinação da concentração de glicose da marca (B)

Tempo (h)	Absorbância	Fator de diluição	Concentração de glicose (g.L ⁻¹)
0	0,2725	1/100	99,56419712
48	0,501	1	1,770030171

Fonte: Autor (2022).

Tabela 10 – Determinação da concentração de glicose da marca (C)

Tempo (h)	Absorbância	Fator de diluição	Concentração de glicose (g.L ⁻¹)
0	0,2725	1/100	100,4022796
48	0,488	1	1,726449883

Fonte: Autor (2022).

O comportamento observado em todas as marcas está conforme o esperado, no início a concentração de glicose foi próxima a 100 g.L⁻¹, justamente a concentração de glicose adicionada aos erlenmeyers para a fermentação. Além disso, a concentração de glicose diminuiu conforme a fermentação transcorreu, uma vez que as leveduras consomem a glicose produzindo etanol.

Os valores finais de glicose em todas as 3 marcas ficaram bem baixos, demonstrando a capacidade da *Saccharomyces cerevisiae* em consumir glicose.

4.2.3 Análise da produção de etanol na fermentação alcoólica

A concentração de etanol foi determinada por meio do método de eboliometria e os valores obtidos para cada uma das marcas estão apresentados nas tabelas 11, 12 e 13.

A definição de Gay-Lussac (°GL) diz que cada grau GL é equivalente a 1 ml de etanol puro por 100 ml de solução.

A densidade do etanol puro é de 0,789 g.ml⁻¹, multiplicando a concentração em ml/100ml pela densidade do etanol, obtém-se o valor em g/100ml. Por fim, para obter o valor em g.L⁻¹ deve-se multiplicá-lo por 10.

Tabela 11 – Determinação da concentração de etanol da marca (A)

Tempo (h)	P (°GL)	P (ml/100ml)	P (g/100ml)	P (g.L ⁻¹)
0	0	0	0	0
48	5,57	5,57	4,2369	42,3690

Fonte: Autor (2022).

Tabela 12 – Determinação da concentração de etanol da marca (B)

Tempo (h)	P (°GL)	P (ml/100ml)	P (g/100ml)	P (g.L ⁻¹)
0	0	0	0	0
48	5,26	5,26	4,1501	41,5010

Fonte: Autor (2022).

Tabela 13 – Determinação da concentração de etanol da marca (C)

Tempo (h)	P (°GL)	P (ml/100ml)	P (g/100ml)	P (g.L ⁻¹)
0	0	0	0	0
48	5,40	5,40	4,2606	42,6060

Fonte: Autor (2022).

No caso da formação de produtos, os resultados mostram uma produção de etanol em torno de 4%, justificável, uma vez que são leveduras comercializadas para produção de pão e outras massas.

Com esses resultados, é possível determinar o rendimento e a eficiência da produção de etanol. Para determinar o rendimento teórico, foi utilizada a reação que mostra a produção de etanol pelo consumo da glicose, apresentada anteriormente na figura 1.

Segundo a reação citada, 180,156 g.L⁻¹, de glicose formam 92,14 g.L⁻¹, de etanol, ou seja, o rendimento teórico é de 51,1446%.

Como cada erlenmeyer possui uma concentração de 100 g.L⁻¹ de glicose, é calculado o rendimento teórico de etanol em g.L⁻¹.

Portanto, 51,14 g.L⁻¹ é a maior concentração de etanol que poderia ser produzida.

Como indica a tabela 11, a marca (A) apresentou uma concentração de etanol após a fermentação de 42,3690 g.L⁻¹ indicando uma eficiência de 82,84%.

Já a tabela 12 mostra que a marca (B) apresentou uma concentração de etanol após a fermentação de 41,5010 g.L⁻¹, ou seja, 81,14% de eficiência.

A tabela 13, por sua vez, mostra que a marca (C) apresentou uma concentração de etanol após a fermentação de 42,6060 g.L⁻¹, que equivale a 83,30% de eficiência.

4.3 FATORES DE CONVERSÃO

Foram calculados os fatores de conversão $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ e $Y_{P/X}$, para cada uma das marcas analisadas. $Y_{X/S}$ representa a conversão de substrato em biomassa, $Y_{P/S}$ a conversão de substrato em produto e $Y_{P/X}$ a conversão de biomassa em produto. A figura 16 apresenta as expressões utilizadas para determinar esses fatores.

Figura 16 – Fatores de conversão

$$Y_{\frac{X}{S}} = \frac{X_f - X_i}{S_i - S_f} \quad Y_{\frac{P}{S}} = \frac{P_f}{S_i - S_f} \quad Y_{\frac{P}{X}} = \frac{P_f}{X_f - X_i}$$

Fonte: Autor (2022).

Os resultados estão expressos na Tabela 14.

Tabela 14 – Fatores de conversão

Marca	$Y_{X/S}$	$Y_{P/S}$	$Y_{P/X}$
A	0,0021	0,4380	211,8465
B	0,0513	0,4208	8,2046
C	0,0382	0,4355	11,3996

Fonte: Autor (2022).

De posse desses valores, é possível compará-los com resultados encontrados na literatura.

Primeiramente, vale ressaltar que dentre os 3 fatores, o $Y_{P/S}$ é o mais explorado na literatura.

Farias (2019), apresentou em seu trabalho, uma conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) igual a 0,40. Além de seus resultados, Farias (2019) também fez um

levantamento de valores de $Y_{P/S}$ encontrados na literatura, fornecendo valores que variam de 0,41 até 0,485.

Souza (2016), determinou os mesmos 3 fatores analisados neste trabalho, obtendo-se 0,034, 0,37 e 11,19 para $Y_{X/S}$, $Y_{P/S}$ e $Y_{P/X}$, respectivamente.

Os valores de $Y_{P/S}$ obtidos neste trabalho estão próximos aos encontrados na literatura. Essa variação entre os valores pode ser explicada devido a variações de parâmetros adotados em cada trabalho.

Os valores de $Y_{P/X}$ e $Y_{X/S}$ das marcas (B) e (C) estão próximos aos valores obtidos pelo trabalho de Souza (2016).

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram analisadas, a viabilidade celular da espécie de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a sua capacidade alcooleira.

Durante as 8 semanas estudadas, a viabilidade celular das marcas (A) e (B) apresentou valores próximos à viabilidade inicial, com baixo desvio padrão. Por outro lado, a marca (C) apresentou redução da viabilidade na terceira semana, queda essa, que foi sustentada até a oitava. Isso indica que a viabilidade celular das leveduras liofilizadas varia conforme a marca utilizada.

Analizando-se o crescimento celular das leveduras durante a fermentação alcoólica, observou-se que as 3 marcas apresentaram aumento do número de células. Nas contagens realizadas logo após a inoculação das leveduras, todas as marcas apresentaram aumento na viabilidade, atingindo valores bem próximos entre si.

Na análise da concentração de glicose na fermentação, os valores obtidos para as 3 marcas estão de acordo com o esperado. A determinação inicial próxima da concentração de glicose inicial adicionada ao meio de cultura. E a determinação final com valores baixos, cerca de 98% menores.

Quanto à formação de produto (etanol), as 3 marcas forneceram uma produção de etanol semelhante. Com rendimentos superiores a 80% do rendimento teórico.

Portanto, embora as diferentes marcas tenham apresentado valores divergentes quanto à viabilidade celular das leveduras liofilizadas, todas mostraram resultados muito semelhantes entre si, demonstrando a capacidade da *Saccharomyces cerevisiae* consumir glicose e produzir etanol.

REFERÊNCIAS

ASSIS, E. C. **Análise da fermentação associada à determinação dos açúcares redutores totais e dos subprodutos.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de Uberaba, Uberaba, 2021.

ASSOCIAÇÃO DOS CERVEJEIROS ARTESANAIS DO ESPÍRITO SANTO. **Tabela de leveduras cervejeiras.** Disponível em: <https://acervaes.com.br/biblioteca/Tabela-de-leveduras-cervejeiras/>. Acesso em: 14/10/2022.

BASTOS, R. G. **Tecnologia das fermentações:** fundamentos de bioprocessos. São Carlos: EdUFSCar, 2010.

BORTOLI, D. A. S; DOS SANTOS, F.; STOCCO, N.M.; ORELLI JR, A.; TON, A.; NEME, F. F.; DO NASCIMENTO, D. D. **Leveduras e produção de cervejas – Revisão.** Bioenergia em Revista: Diálogos, v. 3, n.1, 2013.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial** – Volume 1 – Fundamentos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

CASTILLO, R. **A expansão do setor sucroenergético no Brasil.** In: BERNARDES, J. A.; SILVA, C. A.; ARRUZZO, R. C. (Org.). Espaço e energia: mudanças no paradigma sucroenergético. Rio de Janeiro: Lamparina, 2013.

CECCATO-ANTONINI, S. R. **Microbiologia da fermentação alcoólica.** A importância do monitoramento microbiológico em destilarias. São Carlos: EduFSCar, 2012.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial.** Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2012.

CORREA, F. F. B. **Desenvolvimento de um bioprocesso utilizando-se resíduos para produção de amilases por Rhizopus oligosporus e etanol por Saccharomyces cerevisiae.** Dissertação (Mestrado em ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2015.

TERRONI, H. C.; DE JESUS, J.M.; ARTUZO, L.T.; VENTURA, L.V.; SANTOS, R.F. & DAMY-BENEDETTI, P. **Liofilização.** Revista Cientifica UNILAGO, 2013.

FARIAS, A. V. **Estudo cinético da fermentação alcoólica de *inga edulis*.** Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, AM, Brasil, 2019.

FERRARI, F. C. S. **Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol em escala industrial.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.Jaboticabal, 2013.

HATOUM, R.; LABRIE, S.; FLISS, I. **Antimicrobial and probiotic properties of yeasts**: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Microbiology*. v. 3, a. 421, 2012.

LIMA L. S. **Lei de Lambert–Beer**. *Rev. Ciência Elem*, v. 1, 2013.

MONGELO, A. I. **Validação de método baseado em visão computacional para automação da contagem de viabilidade de leveduras em indústrias alcooleiras**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2012.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. São Paulo: McGraw-Hill, 1980.

PENSAMENTO VERDE. **A origem do etanol e seu importante papel no Brasil**. 24 mar. 2014. Disponível em: <<https://www.pensamentoverde.com.br/economia-verde/origem-etanol-e-seu-importante-papel-brasil/>>. Acesso em: 20 out. 2022.

SILVA A. F. **Produção de videoaulas de práticas experimentais como ferramenta auxiliar no ensino de biotecnologia industrial**; (Química Industrial) - Universidade Federal da Paraíba, 2016.

SOUZA, G. S. **Estudo da fermentação alcoólica em um biorreator de leito fixo em sistema contínuo com células de *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em alginato cálcio revestido com quitosana**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil, 2016.

SPLABOR. **Câmara de Neubauer**: Saiba como realizar a limpeza correta. 14 jul. 2016. Disponível em: <http://www.splabor.com.br/blog/camara-de-contagem-neubauer/aprendendo-mais-saiba-como-realizar-a-limpeza-correta-de-sua-camara-de-contagem-camara-de-neubauer>. Acesso em: 20 out. 2022.

VASCONCELOS N. M.; PINTO G. A. S.; ARAGÃO F. A. S. **Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5 - Dinitrosalicílico**: Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. *Boletim de Pesquisa e desenvolvimento* 88, Fortaleza, 2013.