



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

PETROS GABRIEL FERNANDES SEVERO DA SILVA

**ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR E POTENCIAL PRODUTIVO DE ETANOL
EM MARCAS COMERCIAIS DE FERMENTO BIOLÓGICO**

Recife
2023

PETROS GABRIEL FERNANDES SEVERO DA SILVA

**ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR E POTENCIAL PRODUTIVO DE ETANOL EM
MARCAS COMERCIAIS DE FERMENTO BIOLÓGICO**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à coordenação do Curso de
Engenharia Química da Universidade
Federal de Pernambuco, Centro
Acadêmico de Recife, como requisito para
a obtenção do título de Bacharel em
Engenharia Química.

Orientador(a):

Maria de Los Angeles Perez F. Palha

RECIFE
2023

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

Silva, Petros Gabriel Fernandes Severo da.

Análise da viabilidade celular e potencial produtivo de etanol em marcas comerciais de fermento biológico / Petros Gabriel Fernandes Severo da Silva. - Recife, 2023.

50 : 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, 2023.

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

660 CDD (22.ed.)

PETROS GABRIEL FERNANDES SEVERO DA SILVA

**ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR E POTENCIAL PRODUTIVO DE ETANOL
EM MARCAS COMERCIAIS DE FERMENTO BIOLÓGICO**


Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Coordenação do Curso de
Graduação em Engenharia Química da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial à obtenção do título
de Engenheiro Químico.

Aprovado em: 14/04/2023.


BANCA EXAMINADORA

 Documento assinado digitalmente
MARIA DE LOS ANGELES PEREZ FERNANDEZ
Data: 04/09/2023 10:56:47-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profª. Drª. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

 Documento assinado digitalmente
ANTONIO CARLOS DUARTE COELHO
Data: 01/09/2023 08:09:29-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. Antônio Carlos Duarte Coelho (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

 Documento assinado digitalmente
GISELY ALVES DA SILVA
Data: 04/09/2023 10:44:24-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Msc. Gisely Alves da Silva (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e amados amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, à minha família, aos meus amigos, à minha orientadora Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha e à doutoranda Gisely Alves da Silva, bem como a todos que tornaram possível essa pesquisa.

Finalmente, à Universidade Federal de Pernambuco que me proporcionou a formação profissional que estou concluindo!

“Ele fixa o número das estrelas, a cada uma dá um nome.”

(Salmo 147).

RESUMO

A viabilidade celular é um dos parâmetros fundamentais na análise do potencial de uma levedura, no que diz respeito à sua capacidade de gerar produtos de interesse em um processo fermentativo, como é o caso na produção de cerveja, pães, entre outros. Assim, essa avaliação, quando atrelada aos fatores de conversão, traz consigo o número de células, teor de etanol e substrato no início e fim do processo fermentativo. Nesse estudo, foram realizadas contagens semanais de células viáveis de 3 marcas comerciais de fermento biológico em câmara de Neubauer, durante 8 semanas, após aberto o pacote de células liofilizadas. As marcas de fermento biológico, denominadas de X, Y e Z, contendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foram avaliadas quanto ao consumo de glicose, aplicando-se o método de açúcares redutores com o reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). No que se refere à produção de etanol, este foi avaliado pelo método da ebulliometria. O consumo de glicose e a produção de etanol foram avaliadas após um período de 48h de fermentação. Os rendimentos de etanol (g.g^{-1}) das 3 marcas foram, respectivamente: $R_x = 82,15$, $R_y = 84,46$ e $R_z = 82,15$. As marcas X e Y apresentaram valores de viabilidade celular próximos aos relatados na literatura, sendo 75,85% e 58,68%, respectivamente. Entretanto, a marca Z apresentou um valor médio de 26,88%, muito abaixo da viabilidade relatada em trabalhos similares. No entanto quanto a produção de etanol e crescimento celular, a marca Z equiparou-se às outras duas marcas.

Palavras-chave: Etanol, Levedura Comercial, *Saccharomyces cerevisiae*, Viabilidade celular.

ABSTRACT

Cell viability is one of the fundamental parameters in the analysis of the potential of a yeast regarding its ability to generate products of interest in a fermentation process, as in the case of beer and bread production, among others. Thus, this evaluation, when coupled with conversion factors, provides information on the number of cells, ethanol content, and substrate at the beginning and end of the fermentation process. In this study, weekly counts of viable cells were performed on three commercial brands of biological yeast in a Neubauer chamber for 8 weeks after opening the package of lyophilized cells. The biological yeast brands, named X, Y, and Z, containing *Saccharomyces cerevisiae* yeast, were evaluated for glucose consumption using the reducing sugars method with the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) reagent. As for ethanol production, it was evaluated by the ebulliometry method. Glucose consumption and ethanol production were evaluated after a fermentation period of 48 hours. The ethanol yields (g/g) of the three brands were, respectively, $R_X = 82.15$, $R_Y = 84.46$, and $R_Z = 82.15$. Brands X and Y had cell viability values close to those reported in the literature, at 75.85% and 58.68%, respectively. However, brand Z had an average viability value of 26.88%, much lower than that reported in similar studies. However, regarding ethanol production and cell growth, brand Z was comparable to the other two brands.

Keywords: Ethanol, Commercial Yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, Cell viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Conversão do piruvato em etanol	19
Figura 2 – Câmara de Neubauer e seus quadrantes	21
Figura 3 – Microscópio com a câmara de Neubauer acoplada	22
Figura 4 – Espectro eletromagnético	23
Figura 5 – Funcionamento simplificado de um espectrofotômetro UV-Vis	24
Figura 6 – Reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA)	25
Figura 7 – Reação simplificada do DNS	26
Figura 8 – Diagrama de equilíbrio líquido-vapor para a mistura etanol-água	27
Figura 9 – Balança analítica em repouso na bancada	31
Figura 10 – Banho-maria	33
Figura 11 – Amostras da fermentação após reagir com o DNS	34
Figura 12 – Régua de conversão de temperatura (°C) em grau Gay-Lussac	35
Figura 13 – Ebuliômetro com caldeira, lamparina e termômetro	36
Figura 14 – Gráfico da viabilidade celular ao longo das semanas (X)	37
Figura 15 – Gráfico da viabilidade celular ao longo das semanas (Y)	38
Figura 16 – Gráfico da viabilidade celular ao longo das semanas (Z)	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
Tabela 2 – Massa molecular dos compostos (g/mol)	29
Tabela 3 – Composição do meio de cultura	31
Tabela 4 – Valores estatísticos relativos à viabilidade celular	38
Tabela 5 – Concentração de glicose no início da fermentação	40
Tabela 6 – Teor de etanol produzido pelas 3 marcas	41
Tabela 7 – Rendimentos de etanol de marca de levedura (%)	41
Tabela 8 – Valores de número de células no início da fermentação	42
Tabela 9 – Número de células ao fim de 48h de fermentação	43
Tabela 10 – Fatores de conversão (g/g)	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 OBJETIVO GERAL.....	14
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 HISTÓRICO.....	16
2.2 <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	16
2.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	17
2.4 CONDIÇÕES FAVORÁVEIS À FERMENTAÇÃO	19
2.5 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE LEVEDURAS.....	21
2.6 TESTE DE AÇÚCARES REDUTORES	23
2.7 EBULIOMETRIA	26
2.8 FATORES DE CONVERSÃO DA FERMENTAÇÃO	27
2.9 RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 CONTAGEM NA CÂMARA DE NEUBAUER	30
3.2 MEIO DE CULTURA E MÉTODO DE AÇÚCARES REDUTORES	31
3.3 EBULIOMETRIA	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 VIABILIDADE CELULAR	37
4.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	40
4.2.1 Açúcares Redutores.....	40
4.2.2 Análise do álcool	40
4.2.2.1 <i>Rendimento de etanol em relação ao teórico (gay-lussac)</i>	41
4.3 ANÁLISE DOS FATORES DE CONVERSÃO DA FERMENTAÇÃO.....	42
5 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido certamente o micro-organismo mais utilizado pela humanidade no decurso da história, devido à sua elevada capacidade fermentativa, possibilitando a fabricação de pães, vinhos, cervejas e, recentemente, álcool para combustível. Seu nome científico foi estabelecido pelos vocábulos Saccharo (açúcar), myces (fungo) e cerevisiae (cerveja), evidenciando ser uma espécie do reino Fungi, que consome substratos como glicose e sacarose, produzindo dióxido de carbono e etanol, sendo este um dos principais componentes da cerveja e do vinho (SUÁREZ-MACHÍN *et al.*, 2016).

O processo fermentativo é descrito de forma simplificada a seguir:



As hexoses consistem em monossacarídeos de fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, utilizados para a produção de energia e crescimento celular e possuem como principais exemplos a glicose e a galactose.

As leveduras são seres anaeróbios facultativos, isto é, conseguem sobreviver e desenvolver-se na carência ou na disponibilidade de oxigênio. Quando o meio dispõe abundantemente de oxigênio e há, simultaneamente, baixa concentração de substrato, a produção de etanol torna-se baixíssima e a levedura segue a etapa de fosforilação oxidativa. Entretanto, a ausência de oxigênio, denominada anaerobiose, atrelada à uma alta concentração de glicose, permite que o etanol seja o principal produto obtido (NELSON; COX, 2014).

Historicamente, a produção de pão e a utilização de fermento estão entre os meios de produção de alimentos que remontam às origens mais remotas da humanidade, reservada, entretanto, a descoberta de seus mecanismos microbiológicos, a avanços recentes na ciência e na tecnologia. Apesar da existência remota de fabricação artesanal de alimentos provenientes de processos fermentativos, somente com os estudos de Louis Pasteur, no século XIX, foi possível adquirir o conhecimento necessário sobre os micro-organismos, em especial as leveduras, das quais se destaca a *Saccharomyces cerevisiae*, possibilitando uma posterior otimização nos processos fermentativos e ampla aplicação industrial. A maior compreensão acerca dos mecanismos de respiração anaeróbia, as várias

etapas da glicólise e os subprodutos da fermentação têm impactado a ciência, a sociedade e o meio-ambiente (LAHUE *et al.*, 2020).

No contexto alimentício, as leveduras trazem consigo fatores essenciais para sua utilização como complemento nutricional, sobretudo por serem fontes de nutrientes assimiladas depressa pelo organismo e possuindo alto valor biológico. Além disso, o etanol obtido no processo fermentativo possui alto valor como fonte renovável de energia, sendo um combustível sustentável, menos poluente do que os combustíveis fósseis, atingindo positivamente três esferas fundamentais de uma nação: social, econômica e ambiental. Nesse contexto, há uma redução de até 90% na emissão de dióxido de carbono, quando do uso de etanol brasileiro ao invés da gasolina comum, o que realça a importância deste produto no combate ao aquecimento global (ROSSETO, 2017).

Na análise fermentativa etanólica, um dos parâmetros fundamentais para a estimativa de células viáveis, é a medição de tolerância da levedura ao etanol formado no processo fermentativo, levando em consideração a eficiência de produção de etanol a nível industrial. Além disso, a presença de diversos componentes, como álcoois superiores, ácidos graxos e seus ésteres, ainda que a baixas concentrações, juntamente com o etanol, agem conjuntamente intoxicando a célula da levedura, proporcionando sua morte e, conseqüentemente, reduzindo a viabilidade celular como um todo. Por essa razão, diversos são os parâmetros a serem controlados de modo a obter-se um número otimizado de células viáveis (SUÁREZ-MACHÍN *et al.*, 2016).

Dado o sucesso dos fermentos biológicos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2000) ocupou-se por definir o fermento biológico industrial como uma seleção de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* obtida através de processo industrial. Dessa forma, o termo abrange e abre espaço para uma ampla variedade de fermentos que têm sido inseridos no mercado, incluindo aqueles direcionados à tradicional panificação.

A indústria de alimentos fermentados vem ampliando bastante sua gama de atuação, incluindo entre seus produtos alimentos de panificação, bebidas, laticínios, soja, peixe e café. Sendo a etapa crítica de produção, a fermentação sofre influência de fatores internos (por exemplo, a natureza e a concentração do substrato e insumos) e externos, como umidade e temperatura. Nesse sentido, diversos métodos têm sido adotados para monitorar e otimizar o progresso da fermentação, tomando como

parâmetros potencial REDOX, pH, acidez, crescimento de biomassa, consumo de açúcares fermentáveis e CO₂ produzido (COZMUTA *et al.*, 2022).

No Brasil, a matéria-prima principal utilizada para produzir o etanol é a cana-de-açúcar, da qual se extrai o caldo, o qual é submetido a um tratamento físico-químico de clareamento e ajuste de pH, sendo transportado em seguida para as dornas de fermentação. Nelas, são adicionadas as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* que são responsáveis por realizar a fermentação (MUELLER *et al.*, 2022).

Diversas condições presentes no meio fermentativo geram um ambiente desagradável às leveduras, como bruscas variações de pH, elevadas temperaturas e pressão osmótica, bem como acentuado teor alcoólico. Entretanto, esses fatores forçam a adaptação dos micro-organismos visando um ótimo rendimento final de etanol (MARTINS *et al.*, 2017).

A levedura liofilizada é uma forma desidratada e estabilizada de levedura, que é utilizada em diversos setores da indústria, como a indústria alimentícia e de bebidas, os ramos farmacêuticos, bem como na pesquisa científica. A levedura liofilizada possui como principais vantagens a capacidade de armazenamento prolongado, que pode ser de até dois anos, sem que ocorra perda significativa de viabilidade ou de qualidade do produto. Ela é geralmente fornecida em forma de pó, e por ser facilmente solúvel em água, a levedura é rapidamente reidratada e utilizada em processos de fermentação. Além disso, ela dispõe de uma maior resistência a variações de temperatura e pressão, o que a torna uma opção ideal para ambientes com condições de armazenamento e transporte desfavoráveis (STRELLO; NICOLINI; REINEHR, 2018).

1.1 OBJETIVO GERAL

Essa pesquisa tem como objetivo geral mensurar a viabilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em 3 marcas comerciais, bem como sua produção de etanol.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar contagens semanais de cada uma das leveduras.

- Prover meio de cultura apropriado para o crescimento e desenvolvimento das espécies analisadas.
- Acompanhar e quantificar o crescimento das leveduras.
- Quantificar o consumo de glicose.
- Quantificar a produção etanólica das três linhagens comerciais.
- Avaliar o rendimento da produção de etanol.
- Calcular os fatores de conversão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste tópico, são tratados temas referentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae*, suas principais aplicações, aspectos alimentícios e econômicos associados; meios de cultura, fermentação e a fundamentação teórica necessária para um excelente entendimento da pesquisa.

2.1 HISTÓRICO

Os primeiros relatos da produção de bebidas fermentadas advêm de registros arqueológicos da China datados de 7 mil anos a.C., onde se preservava o fermentado em vasos de bronze das dinastias Shang e Zhou Ocidental. Em outro contexto geográfico, há o Irã com indícios de produção de bebidas fermentadas datadas de 6 mil anos a.C. Este fato foi evidenciado na descoberta de vasos de argila destinados ao preparo e ao armazenamento de vinho, dentre eles alguns vasos encontrados em construções na região de Hajji Firuz Tepe com idade de 5400 a 5000 a.C (McGOVERN, 2003). Enquanto isso, as primeiras produções de pão fermentado datam do intervalo entre 4000 até 2600 anos a.C. no Egito antigo, diferentemente do pão asmo, produzido a partir de trigo e frutas.

2.2 *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Dentre as leveduras mais estudadas no mundo, destacam-se as espécies: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* e *Candida utilis*, todas consideradas GRAS, do inglês, Generally Recognized As Safe, ou seja, consideradas seguras para o consumo humano. Dentre elas, destaca-se a *S. cerevisiae*, cuja composição bioquímica é apresentada na Tabela 1. Ela obtém energia via processos fermentativos e pode ser facilmente isolada de plantas e solo, bem como do trato gastrointestinal e genital humano. É um produto do processo de produção de álcool, fonte valiosa de vitaminas para animais. Por sua vez, evidencia-se que, na formulação de ração para aves e suínos, emprega-se a recuperação de leveduras da fermentação alcoólica, pois é um componente rico em proteínas. A *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada na nutrição de ruminantes como aditivo probiótico beneficiando a digestão

animal, produção de leite, estabilização de pH, dentre outros parâmetros ruminais (NOSCHANG; SCHMDIT; BRAUNER 2019).

O uso da *Saccharomyces cerevisiae* difunde-se nas indústrias de manufatura de cerveja, vinhos e álcool. A levedura inativada pela temperatura é usada como fonte de nutrientes em alimentos animais e humanos, tanto em forma de levedura íntegra, bem como a partir de seus derivados (SUÁREZ-MACHÍN *et al.*, 2016).

Tabela 1 – Composição da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Componentes (%)				
Polissacarídeos	29,71	34,1	36	34,1
Trealose	NR	5	NR	NR
Ácidos Nucleicos e nucleotídeos	10,65*	10,8	7,41*	9,00*
Fosfolipídeos	1,18	4,5	2,63	0,5
Triglicerídeos	NR	2,5	NR	NR
Esteróis	NR	1	NR	NR
Cinza	8,32	3,1	7,34	4,60
Proteína	40,20	39	44,7	42,67

Fonte: Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), 2016

2.3 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

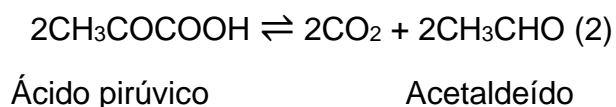
A fermentação alcoólica e a *Saccharomyces cerevisiae* são praticamente sinônimos, uma vez que esta protagoniza a produção industrial de etanol, destacando-se entre diversas leveduras que sintetizam etanol ao fermentar açúcar anaerobicamente. A *S. cerevisiae* realiza a quebra da hexose, processo denominado de glicólise, para catabolizar açúcares atingindo a etapa de formação do ácido pirúvico (SANTOS *et al.*, 2018):

De forma resumida, tem-se:

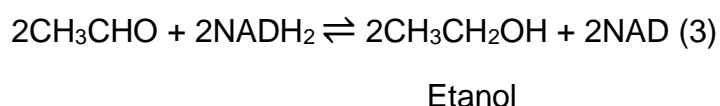


Glicose Ácido pirúvico

Em seguida, este é convertido pela enzima piruvato descarboxilase em acetaldeído e dióxido de carbono:



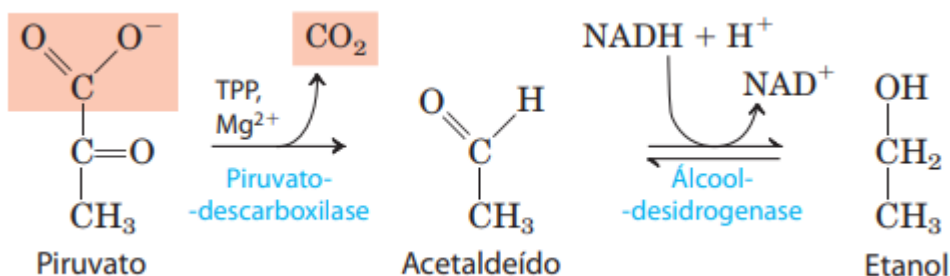
sendo, ao final, reduzido a etanol pela álcool desidrogenase (ADH) e liberando NAD^+ :



Sendo assim, são críticas as reações da etapa terminal que levam ao etanol, estabelecendo a base para as principais indústrias de fermentação (PARAPOULI *et al.*, 2020).

A primeira etapa do processo de obtenção de energia das leveduras é denominada de glicólise, isto é, a degradação da glicose com a formação final de trifosfato de adenosina (ATP), molécula de energia. A glicólise possui essencialmente as chamadas fases preparatória e a de pagamento. Na primeira, a glicose é convertida em frutose 1,6-bifosfato, que por sua vez, é quebrada em duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato, adentrando a fase de pagamento e iniciando diversas reações de fosforilação e oxidação. Assim, é incorporado um grupo fosfato à esta molécula, dando origem ao 1,3-fosfoglicerato. Nessas diversas etapas, os dois grupos fosfatos presentes em cada uma das duas moléculas são transferidos para os 4 ADP produzidos pelas reações, formando 4 ATP, resultando em um saldo líquido energético de 2 ATP, considerado o consumo de 2 ATP na fase preparatória (NELSON; COX, 2014). Ao término dessa etapa, são obtidas 2 moléculas de piruvato, que, a depender do micro-organismo, formará diferentes produtos, característicos da fermentação como alcoólica (Figura 1), acética ou láctica.

Figura 1 – Conversão do piruvato em etanol



Fonte: NELSON, COX (2014)

A descarboxilação do piruvato é catalisada irreversivelmente graças à enzima piruvato-decarboxilase, a qual é encontrada em leveduras e outros micro-organismos que realizam fermentação alcoólica.

2.4 CONDIÇÕES FAVORÁVEIS À FERMENTAÇÃO

Relativamente aos parâmetros desejados para que uma boa fermentação ocorra, tem-se necessária uma alta atividade de água, que no caso da *S. cerevisiae*, possui um valor médio de 65%. A água é intrinsecamente fundamental para a fermentação e os meios com elevada quantidade de açúcar podem impor estresse osmótico nas células, prejudicando o mecanismo interno da fisiologia celular. Quanto às condições ideais de temperatura e pH para fermentações alcoólicas, as leveduras prosperam em ambientes levemente ácidos, com a maioria das cepas de *S. cerevisiae* crescendo bem em intervalos de 20 e 30°C e pH 4,5 e 6,5 (WALKER; STEWART, 2016).

Alguns fatores essenciais a serem levados em consideração de modo a otimizar uma fermentação alcoólica foram citados por Yan Lin *et al* (2012):

- Pressão osmótica: a nutrição da levedura é um processo puramente osmótico, sendo importante evitar meios hipertônicos ou hipotônicos para prevenir plasmoptise e plasmólise, fenômenos de elevado ganho e perda de água, respectivamente, onde o estresse osmótico pode reduzir o volume da célula, afetando também a velocidade de fermentação, bem como a viabilidade celular.
- Temperatura: temperaturas elevadas causam diminuição da biomassa, devido a redução do teor de proteínas, RNA, DNA e aminoácidos livres, induzindo uma

rigidez da membrana celular. Por outro lado, temperaturas muito baixas causam um estado de latência na célula, interrompendo seu desenvolvimento.

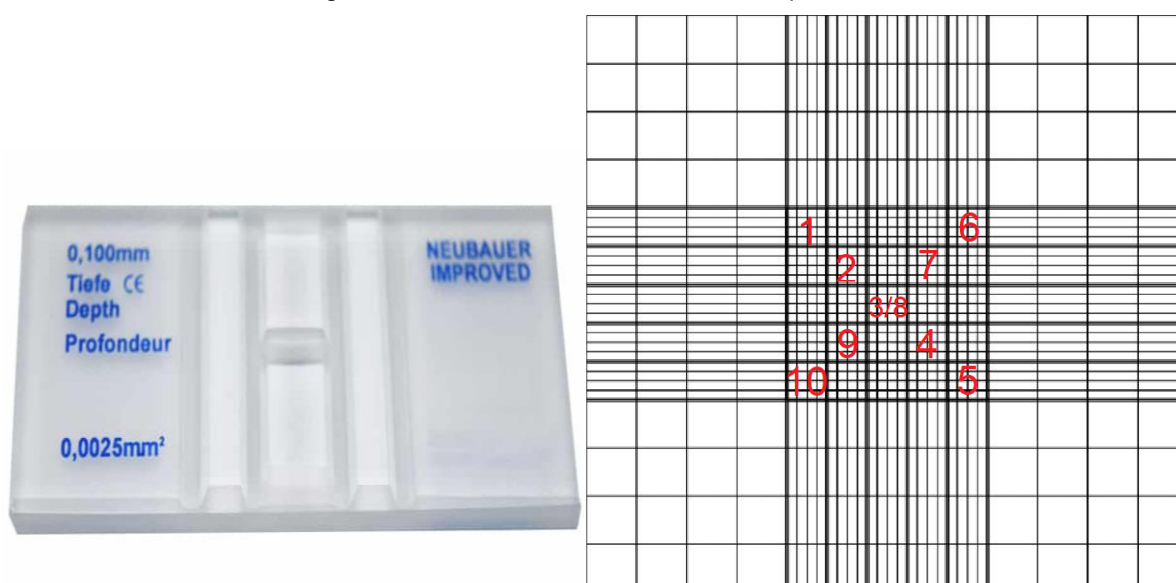
- pH: o pH ideal em que esses micro-organismos melhor se desenvolvem se encontra num patamar levemente ácido de 4 a 5. As leveduras têm a vantagem de suportar meios mais ácidos do que outros micro-organismos, o que se aproveita para que sejam utilizadas em processos de plantas industriais, garantindo um ambiente controlado de bactérias que possam competir pelo substrato.
- Álcool: O efeito do etanol na célula é uma combinação de inibição de crescimento e diminuição da viabilidade, podendo atuar como inibidor de fermentação a partir de 8%. Assim, o rendimento final será uma variável em termos de eficiência da fermentação, tolerância ao etanol e à temperatura, bem como a altas concentrações de açúcares, e presença de micro-organismos invasores. Esse último fator é crítico, visto que bactérias consumidoras do substrato podem competir com as leveduras, duplicando-se e inibindo o crescimento destas ao produzir ácido láctico, fenômeno denominado de floculação, afetando drasticamente a viabilidade e a produção de etanol.

2.5 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE LEVEDURAS

A viabilidade celular é uma medida da proporção de células vivas em uma cultura celular ou em uma amostra biológica. Esse valor é importante para avaliar a qualidade e a integridade das células e para determinar se as condições de cultivo são adequadas. O cálculo da viabilidade celular depende do método usado para determinar a proporção de células vivas e mortas. Nesse estudo, será utilizada a contagem de células vivas e mortas por coloração em câmara de Neubauer: esse método utiliza corantes que se ligam a células mortas, tornando-as visíveis sob um microscópio. A contagem de células mortas e vivas pode ser usada para calcular a viabilidade celular. Nesse caso, se a contagem de células vivas e mortas for usada, a viabilidade celular é calculada pela divisão do número de células vivas pelo número total de células (vivas e mortas) multiplicado por 100%.

Também conhecido como hemocitômetro, a câmara de Neubauer consiste em uma lâmina de microscopia, em cujo centro há diversas linhas perpendiculares divisoras de quadrantes, onde é possível realizar aumentos oculares, de modo a melhor observar os micro-organismos na amostra diluída no meio. Essa diluição é realizada de modo a reduzir o elevado número de células que aparecem no microscópio, inviabilizando assim a leitura. Assim, aplica-se geralmente azul de metileno com citrato na amostra, de modo que as células inviáveis sejam coradas e as viáveis permaneçam incolores.

Figura 2 – Câmara de Neubauer e seus quadrantes



Fonte: (LUCARINI; SILVA; BIANCHI, 2004)

A contagem é realizada pelos quadrantes centrais, começando pelo quadrante esquerdo superior, seguindo diagonalmente até o 5º quadrante, diametralmente oposto ao primeiro. Deve-se contabilizar as leveduras vivas e mortas em cada quadrante. Concluída a contagem para os 5 primeiros, inicia-se pelo quadrante superior direito, seguindo até o inferior esquerdo.

Figura 3 – Microscópio com a câmara de Neubauer acoplada



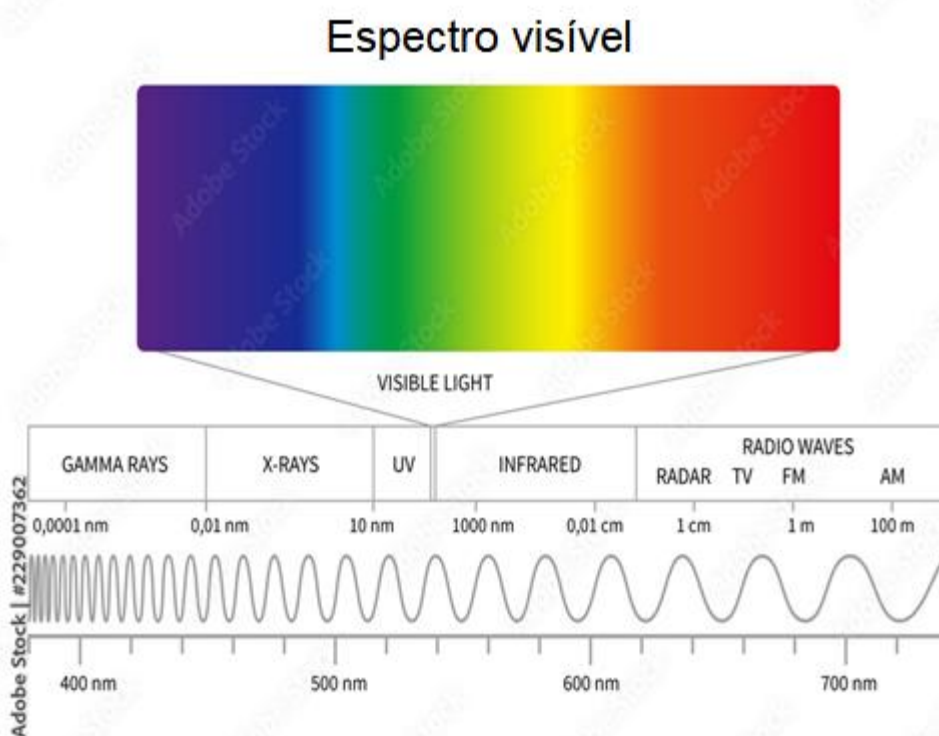
Fonte: Autor

2.6 TESTE DE AÇÚCARES REDUTORES

Um dos parâmetros de interesse ao término da fermentação é a concentração de açúcar residual no meio, ou seja, a quantidade não consumida pelo micro-organismo, fator importante na avaliação do potencial da levedura em utilizar a fonte de energia para seu crescimento e produção de etanol.

O método para se determinar a concentração de glicose inicial e final utiliza o equipamento de espectroscopia UV-Vis, o qual, através da interação entre radiação eletromagnética, matéria e energia, permite o levantamento de dados sobre a amostra. A porção visível do espectro eletromagnético se encontra entre $380 \text{ nm} < \lambda < 780 \text{ nm}$, como ilustra a Figura 4:

Figura 4 – Espectro eletromagnético



Fonte: Adobe Stock (2022)

O sistema do equipamento é ilustrado de forma simplificada na Figura 5, a qual apresenta inicialmente a fonte policromática de luminosidade, seguida do monocromador, o qual é responsável por selecionar o comprimento de onda incidente

na amostra. Uma vez que a amostra absorve parte da radiação, a luz residual alcança o detector e este, por sua vez, gera um sinal elétrico que é identificado pelo *software* no computador e traduz o resultado para o analista.

Figura 5 – Funcionamento simplificado de um espectrofotômetro UV-Vis



Fonte: Autor

A ordem dos componentes do sistema é dada da seguinte forma: fonte de luz, monocromador, amostra contendo o analito, detector e o processador de sinal elétrico.

Esse resultado pode ser apresentado em termos de transmitância (T), uma porcentagem que consiste na razão entre a luz residual (P) e a luz incidente (Po), de modo que:

$$T = 100 \frac{P}{P_o}$$

Como artifício matemático, define-se a grandeza “absorbância” da seguinte forma:

$$\text{Abs} = -\log(T)$$

A absorbância conecta-se diretamente à concentração do analito (C), e essa relação é conhecida como lei de Lambert-Beer. Levando em consideração a absorvidade do analito (a), o caminho óptico da cubeta que contém a amostra (b), tem-se:

$$\text{Abs} = abC$$

Assim, relacionando graficamente absorbância e concentração da solução-padrão utilizada, é possível obter uma curva de calibração, ou uma equação de reta por regressão. Feito isso, os valores de absorbância das amostras gerados pelo espectrômetro UV-Vis são utilizados nessa equação de modo a determinar suas concentrações correspondentes.

Como padrão-primário, é utilizado o reagente Ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA ou DNS), ilustrado na Figura 6, o qual consiste em um composto colorimétrico amarelado que, ao reagir com a glicose em banho-maria a 100°C, é convertido em Ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, de cor alaranjada, absorvendo em um comprimento de onda de 540nm.

A mudança de coloração se explica pela troca do grupo cromóforo nitro pelo auxocromo amino, alterando a intensidade e o comprimento de onda de absorção.

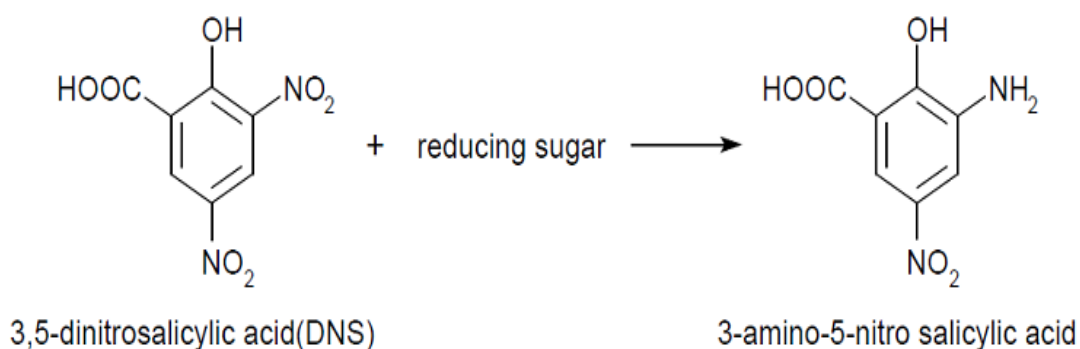
Figura 6 – Reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNSA)



Fonte: Autor

A reação entre o DNS e o açúcar é, por sua vez, representada logo a seguir, evidenciando a alternância dos grupos funcionais que causam o efeito colorimétrico.

Figura 7 – Reação simplificada do DNS



Fonte: Igem Kyoto (2011)

2.7 EBULIOMETRIA

O método da ebuliometria consiste em medir a redução do ponto de ebulição, que ocorre quando se encontra presente o etanol em bebidas alcoólicas. O princípio que norteia esse método se fundamenta na Lei de Raoult:

$$P = hx_1$$

Sendo

P : a pressão de vapor da solução;

h : uma constante de proporcionalidade e

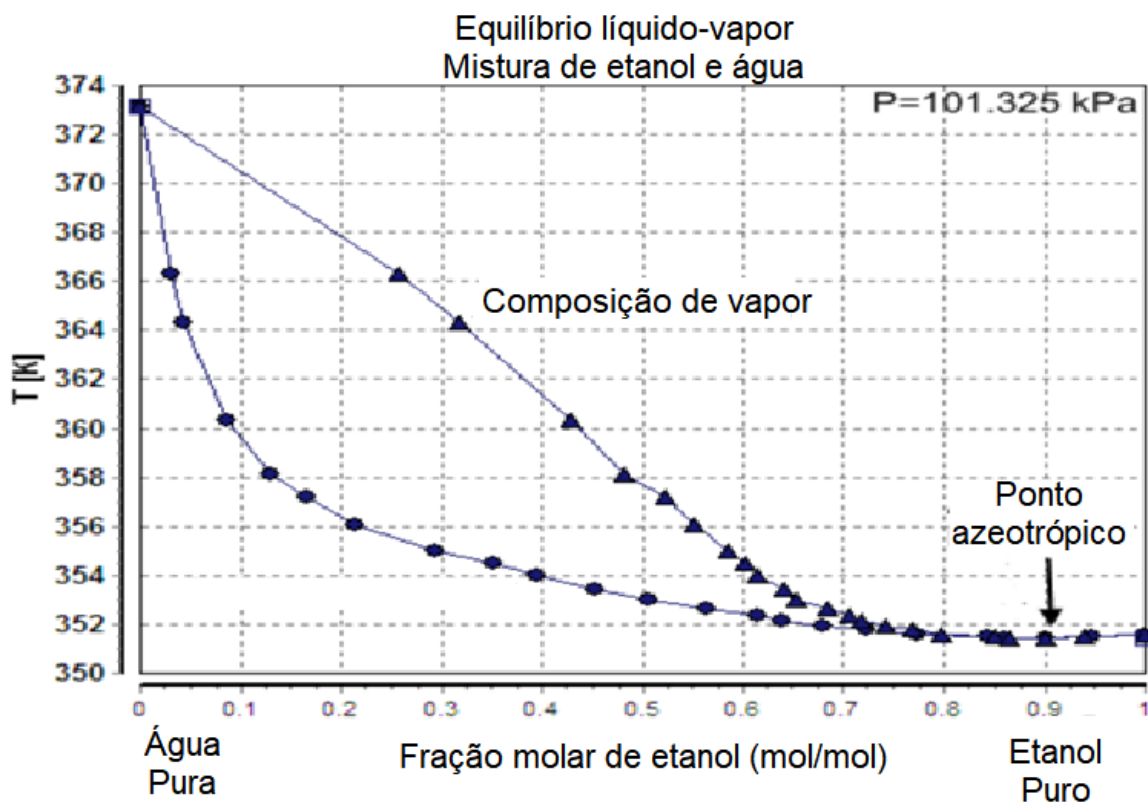
x_1 : a fração molar do solvente.

Em outras palavras, há uma relação de proporcionalidade direta entre a pressão de vapor do etanol na água e sua concentração.

A visualização dessa relação se concretiza no gráfico da Figura 8, correlacionando a composição do sistema água-etanol com a temperatura de ebulição em K, à pressão atmosférica. A curva inferior ilustra a temperatura de ebulição das misturas entre água e etanol à pressão constante, enquanto a curva superior representa o equilíbrio líquido-vapor existente. É esperado que a fase vapor contenha mais etanol do que a fase líquida, uma vez que o etanol é mais volátil que a água, exercendo assim uma maior pressão do que aquela. Assim, quanto mais elevada a porção de vapor que é perdida no sistema, como este se encontra em equilíbrio, maior também será a quantia de etanol líquido a migrar para a fase vapor, visando

compensar a última perda. Consequentemente, há uma elevação no ponto de ebulição da fase líquida.

Figura 8 – Diagrama de equilíbrio líquido-vapor para a mistura etanol-água



Fonte: Dortmund Data Bank (2022)

2.8 FATORES DE CONVERSÃO DA FERMENTAÇÃO

A análise de um processo fermentativo integra o acompanhamento da evolução das concentrações de determinadas variáveis do sistema de cultivo conforme se estende o tempo de fermentação. Os componentes do sistema mais relevantes e, consequentemente, os mais frequentemente analisados são:

Biomassa (X);

Produtos do metabolismo (P);

Nutrientes ou substrato (S).

Os valores experimentais dessas variáveis em função do tempo permitem determinar graficamente suas concentrações instantâneas a qualquer momento

desejado. Como esse estudo não apresenta um perfil cinético de todo o processo fermentativo, restringindo-se tão somente aos valores inicial e final, será dedicado a esse tema apenas uma breve síntese.

Os cálculos neste tópico são determinados a partir dos valores obtidos do substrato, do teor de etanol e do número estimado de células.

Inicialmente, os valores do número de células viáveis por mL foram calculados após as contagens na câmara de Neubauer, considerando suas dimensões de 0,0025mm² x 0,1mm, e seus 10 quadrantes com 16 quadrados cada. Assim:

$$X \text{ (nº células. mm}^{-3}\text{)} = \text{nº células}/(160/4000)$$

De modo a reescrever o valor em termos de nº de células por litro, basta multiplicar por 1 . 10⁶. Assim, assumindo a estimativa de que em cada 1g de levedura, há pelo menos 5 x 10⁹ de células (LALLEMAND BREWING, 2023), divide-se por esse valor para obter a concentração (g.L⁻¹) correspondente.

De posse destes dados, valores de substrato inicial e final e o teor de etanol produzido, é possível calcular os fatores de conversão por meio das fórmulas a seguir:

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X - X_0}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

O $Y_{X/S}$ é um fator proposto por Monod e corresponde à biomassa celular produzida mediante o substrato fornecido. Uma vez que a célula é inoculada no meio de cultura, ela utilizará esses nutrientes disponíveis para desenvolver-se e atingir a maturidade para duplicar e gerar outras duas células. Esse intervalo é conhecido como tempo de duplicação, a partir do qual se estima o número de gerações formadas.

O $Y_{P/X}$ consiste na relação entre a quantidade de etanol (P) produzida por unidade de biomassa celular (X) formada durante o processo de fermentação. Finalmente, o parâmetro de maior interesse econômico apresentado é o $Y_{P/S}$, a proporção entre o substrato concedido às leveduras e o teor de etanol produzido ao final da fermentação. Esse resultado possui íntima conexão com o tópico a seguir: o rendimento da fermentação.

2.9 RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO

Entende-se por rendimento da fermentação a porcentagem de produto de interesse econômico (ou seja, o etanol) que foi obtida efetivamente quando comparado ao ideal, isto é, estequiometricamente.

Considerando a reação química envolvida na fermentação:



tem-se a seguinte proporção: $n_{\text{etanol}} = 2n_{\text{glicose}}$

Assim, são necessários para esse cálculo os valores fornecidos na Tabela abaixo:

Tabela 2 – Massa molecular dos compostos (g/mol)

Glicose	180,156
Etanol	46,07

Utilizando-se desses valores, a massa de etanol teórica como resultado da fermentação segue a seguinte equação:

$$m_{\text{etanol}} = 0,5114m_{\text{glicose}}$$

O rendimento final será então a razão entre a massa de etanol obtida experimentalmente e a massa de etanol teórica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONTAGEM NA CÂMARA DE NEUBAUER

Não há um método absoluto na literatura para a avaliação de viabilidade celular. Dessa forma, a estimativa realizada baseou-se na contagem de quadrantes previamente enumerados de 1 a 10, como ilustra a Figura 3, sendo o quadrante central contado duas vezes. O padrão de contagem escolhido foi a consideração das extremidades superior e direita dos quadrantes selecionados, desprezando os lados inferior e esquerdo. Para isso, foi utilizado um microscópio óptico com lente de aumento de 40x.

O procedimento de contagem nas câmaras de Neubauer foi iniciado com a preparação do corante com a composição de 0.02% de azul de metileno e 2% de citrato de sódio. Em seguida, foram pesados 0,025g de levedura liofilizada de cada marca, diluído com água destilada em um balão volumétrico de 50mL, homogeneizando-se em seguida a solução. Dessa suspensão, foi retirado uma alíquota de 1mL, e adicionado 1mL de azul de metileno em um tubo de ensaio. Após um intervalo de 15 minutos, a mistura foi novamente homogeneizada e inserida, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, em uma das câmaras de Neubauer, até esta ser plenamente preenchida, bastando para isso, não mais que 1 ou 2 gotas. Realizados esses procedimentos, foi iniciada a contagem das células viáveis e inviáveis, obtendo, ao final, a viabilidade celular. Após a pesagem de cada levedura, as embalagens foram novamente vedadas e recolhidas à geladeira, a uma temperatura aproximada de 6°C. Ao término, as câmaras foram banhadas em hipoclorito de sódio a 2,5%, sendo novamente lavadas cuidadosamente para reutilização.

A Figura 9 apresenta a balança analítica empregada em todas as pesagens dessa pesquisa.

Figura 9 – Balança analítica em repouso na bancada



Fonte: Autor

3.2 MEIO DE CULTURA E MÉTODO DE AÇÚCARES REDUTORES

O meio de cultura foi elaborado pela mistura de cada componente citado na Tabela 3. Uma vez que o meio foi preparado, distribuiu-se 6 volumes de 80mL para inoculação em duplicata de cada uma das marcas de levedura. Em seguida, foram pesadas amostras de 0,083g de cada marca de levedura, de modo que a concentração de cada inóculo fosse de 1g de levedura por litro de solução, após a adição estéril de 3mL de KH_2PO_4 . Logo após a inoculação, foram realizadas as contagens para avaliação da viabilidade celular, considerando-se o momento inicial to. Posteriormente, repetiu-se a contagem para o tempo final.

Tabela 3 – Composição do meio de cultura

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

Inicialmente, os tubos contendo as amostras foram centrifugados, de modo a garantir que fosse retirado apenas o sobrenadante. Em seguida, adicionou-se 0,5mL de cada amostra fermentada em diferentes tubos do tipo Folin Wu reagindo por 5min a 100°C com 1mL de DNS. Após o banho-maria, representados na Figura 10, os tubos de ensaio foram depositados no banho de gelo, de modo a interromper a reação.

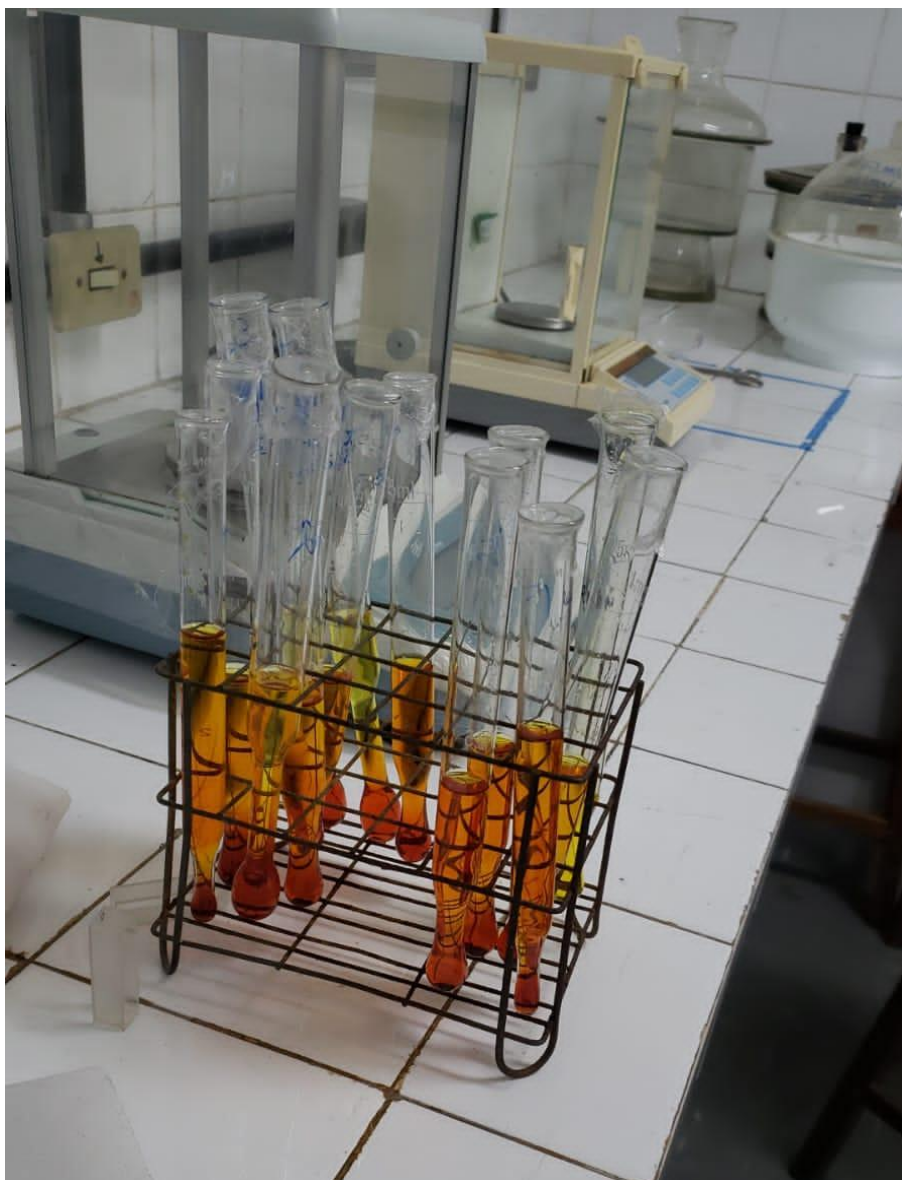
Figura 10 – Banho-maria



Fonte: Autor

Em seguida, foi adicionada água destilada até a marca de 12,5mL dos tubos e todas as amostras foram avaliadas no espectrofotômetro com o auxílio de cubetas, sendo previamente conhecida a curva do padrão primário DNS. Como não houve necessidade de diluição nas amostras finais, o valor de concentração obtido na relação linear foi efetivamente o de açúcar residual. As amostras foram fotografadas logo antes de serem dirigidas ao espectrofotômetro (Figura 11).

Figura 11 – Amostras da fermentação após reagir com o DNS



Fonte: Autor

Segue abaixo a equação do DNSA:

$y = 0,2983x - 0,027$, cujo coeficiente de determinação $R^2 = 0,9992$, na qual:
x é a concentração de glicose em g.L^{-1} e y é a absorbância.

3.3 EBULIOMETRIA

O teor de etanol produzido em determinado momento de uma fermentação foi avaliado com o método da ebuliometria, o qual consistiu em medir a temperatura de ebulição da mistura alcoólica, e relacioná-la com a unidade de medida graus Gay-

Lussac (GL), a partir de uma régua apropriada para essa finalidade, a qual é ilustrada na Figura 12.

Figura 12 – Régua de conversão de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) em grau Gay-Lussac



Fonte: Autor

Esta régua é responsável pela relação entre a temperatura de ebulição da mistura e o teor de etanol proveniente da fermentação.

Inicialmente, mediu-se a temperatura de ebulição de 50mL de água destilada, adicionada ao ebulliômetro, juntamente com um condensador que impede a evaporação brusca dos componentes das amostras, conforme mostra a Figura 13.

Figura 13 – Ebuliômetro com caldeira, lamparina e termômetro



Fonte: Autor

Em seguida, a marca 0° GL foi fixado na temperatura de ebulição obtida para a água, que se encontra geralmente próximo dos 100°C, mas não necessariamente esse valor exato. Feito isso, adicionou-se no interior do equipamento 50mL da amostra, acendeu-se a lamparina contendo álcool, a qual foi acesa, fornecendo uma fonte de calor para que a ebulição ocorra. Além disso, foi adicionado ao conjunto um termômetro de mercúrio, pelo qual se acompanhou visivelmente a estabilização da temperatura durante 1 ou 2 minutos. Finalmente, o equipamento foi lavado, e repetiu-se o mesmo procedimento para as outras amostras.

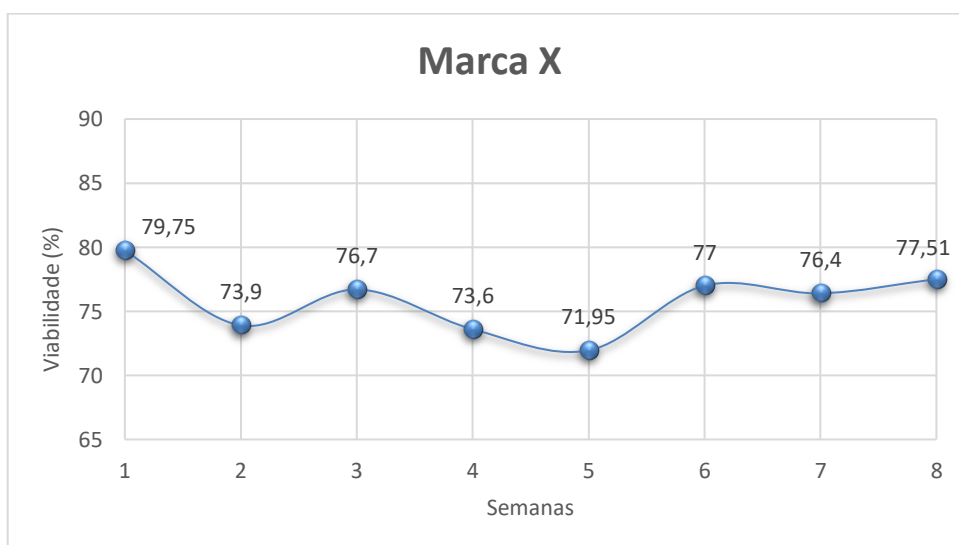
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VIABILIDADE CELULAR

A contagem de células na câmara de Neubauer foi realizada ao longo de 8 semanas, de modo a observar o comportamento e a qualidade das leveduras em um intervalo de tempo razoável. Foram avaliadas três diferentes marcas de fermento biológico, denominadas X, Y e Z. Por tratar-se de uma técnica não-automatizada, há imprecisões intrínsecas ao método, decorrente da visão individual do operador, bem como sua experiência na realização da tarefa, dentre outras fontes de erros que se buscou minimizar tanto quanto possível.

O gráfico da viabilidade da levedura de marca X, apresentado na Figura 14, ilustra a flutuação da viabilidade celular no decorrer das semanas, trazendo consigo um desvio padrão de 2,52. Apesar da consistência dos dados, a Tabela 4 revela uma amplitude razoável, uma vez que era esperado uma constância da viabilidade com o passar do tempo e, conseqüentemente, valores ligeiramente mais próximos entre si. Em contrapartida, o desvio padrão da marca X revela que a levedura X se manteve com a viabilidade celular estável ao fim da análise.

Figura 14 – Gráfico da viabilidade celular ao longo das semanas (X)



Fonte: Autor

Tabela 4 – Valores estatísticos relativos à viabilidade celular

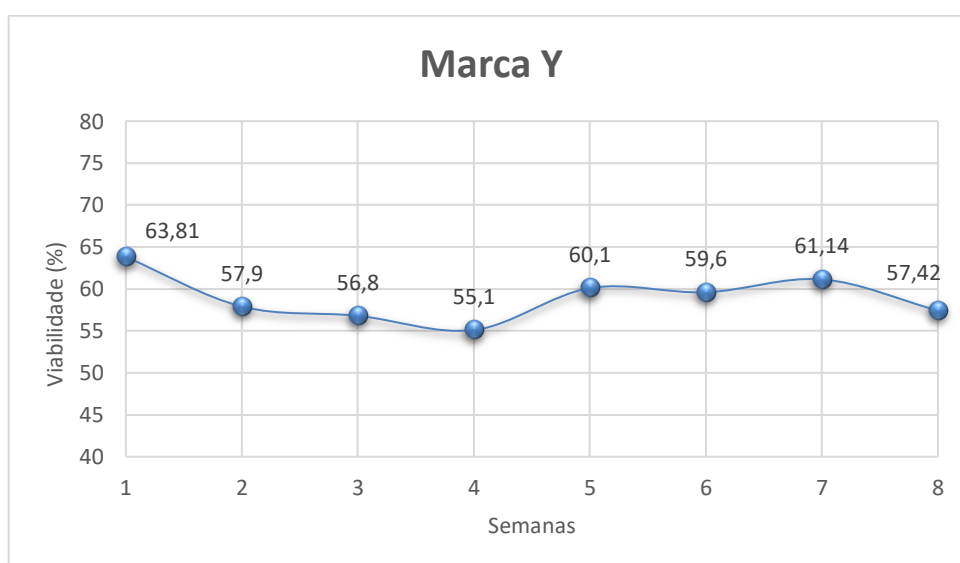
Marcas	Média (%)	Desvio Padrão	Amplitude
X	75,85	2,52	7,8
Y	58,98	2,75	8,7
Z	26,88	2,76	9,3

A pesquisa de Santos (2022) também apresenta viabilidades celulares para 3 leveduras comerciais, denominadas A, B e C. Em sua análise da marca A, ele obteve o valor médio de viabilidade de 71,97%, similar à média obtida para a marca X no presente trabalho.

Não obstante a marca X apresentar a viabilidade mais elevada, indicando uma boa qualidade da marca, deve ser analisada em conjunto com o consumo de açúcar e a produção de etanol para uma avaliação mais completa do desempenho dessa levedura comercial.

A marca Y teve como ponto inicial de sua contagem uma viabilidade ligeiramente mais elevada em relação às semanas seguintes, como mostra a Figura 15.

Figura 15 – Gráfico da viabilidade celular ao longo das semanas (Y)



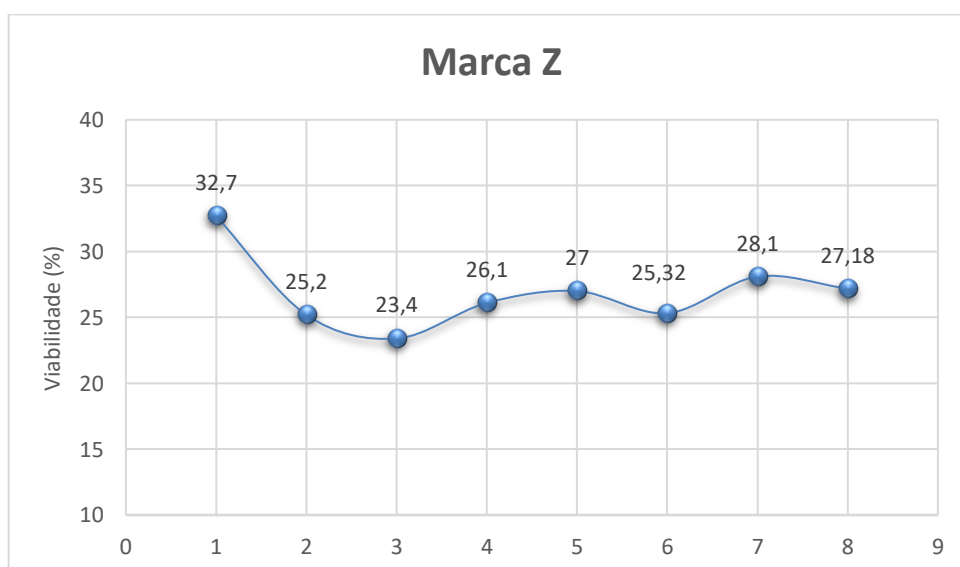
Fonte: Autor

É possível que a levedura de fato tenha apresentado uma boa viabilidade inicialmente e tenha decaído com o passar do tempo. Para garantir uma melhor representatividade dos dados, foram realizadas contagens em triplicatas. Dessa forma, os valores obtidos para essa linha demonstram uma parcela apreciável de leveduras inviáveis, cerca de 41% do total. As embalagens de fermento biológico foram vedadas após cada pesagem das amostras semanalmente, sendo devolvidas à geladeira logo em seguida. A viabilidade celular média da marca Y, 58,98%, é próxima do valor obtido por Santos (2022) em sua marca C.

Finalmente, o fermento de marca Z foi o que apresentou a menor das viabilidades, desde o início das contagens, mantendo esse padrão até o final das análises. Esse comportamento é ilustrado na Figura 16.

Uma hipótese para isso é a possibilidade de a unidade do produto comprado pertencer a um lote defeituoso, ou mesmo que suas condições de armazenamento e transporte tenham afetado drasticamente a qualidade da levedura. Diante disso, é notável que, apesar de constituir um parâmetro válido do potencial do produto, a viabilidade celular não é fator resolutivo em avaliar a qualidade da marca em questão, visto que diversas são as possibilidades de ocasionar uma baixa viabilidade.

Figura 16 – Gráfico da viabilidade celular ao longo das semanas (Z)



Fonte: Autor

4.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

Foram tomadas amostras nos momentos inicial e final (48h) da fermentação, de modo a proceder aos testes de açúcares redutores. No ponto inicial, foram preparadas diluições 1:100 das amostras do meio de cultura com a levedura para serem analisadas no espectrofotômetro, e pela reta experimental do reagente DNS, relacionar as absorbâncias obtidas com as respectivas concentrações de glicose.

4.2.1 Açúcares Redutores

Os resultados obtidos após a análise das absorbâncias das amostras no início e fim da fermentação foram compilados na Tabela 5:

Tabela 5 – Concentração de glicose no início da fermentação

Marca	Glicose inicial (g.L ⁻¹)	Glicose final (g.L ⁻¹)
X	97,552	1,758
Y	100,402	1,778
Z	99,229	1,696

Os resultados mostram que cada marca de leveduras consumiu quase todo o substrato nessas primeiras 48h de fermentação. Como será visto adiante, os teores de etanol produzidos não foram superiores a 8° GL, o que implica não ter havido uma inibição (por etanol) apreciável nas células.

4.2.2 Análise do álcool

O teor de álcool produzido foi avaliado pela régua adequada pelo método da ebulliometria, e assim os valores foram convertidos para concentrações alcoólicas, como já descrito na seção de revisão bibliográfica. Assim, ambos os valores se encontram apresentados na Tabela 6.

O teor de álcool em GL é, por definição, o volume de etanol (mL) por 100 mL da mistura. Entretanto, para a obtenção dos fatores de conversão, foram convertidos os valores de biomassa, produto e substrato se encontrem em g.L⁻¹. Para isso,

multiplica-se pela densidade do etanol = $0,789\text{g.L}^{-1}$, obtendo-se a concentração em $\text{g}/100\text{mL}$, e multiplica-se por 10 para que a unidade coincida finalmente com g.L^{-1} .

Tabela 6 – Teor de etanol produzido pelas 3 marcas

Marcas	P(°GL)	P (g.L^{-1})
X	5,325	42,014
Y	5,475	43,198
Z	5,325	42,014

A produção de etanol no período de 48h de fermentação, obtida por cada marca, foi muito próxima.

4.2.2.1 *Rendimento de etanol em relação ao teórico (gay-lussac)*

Para o cálculo dos rendimentos, sabe-se que, como a concentração de glicose presente em cada Erlenmeyer foi de 100g.L^{-1} , a produção máxima de etanol seria de $51,14\text{g.L}^{-1}$, sendo este o rendimento considerado ideal. Assim, considerando as concentrações de etanol produzidas por cada marca, a Tabela 7 apresenta os rendimentos obtidos:

Tabela 7 – Rendimentos de etanol de marca de levedura (%)

X	82,15
Y	84,46
Z	82,15

Da Tabela 7, é perceptível que o rendimento de etanol em todas as marcas foi acima de 80%, o que é bastante aceitável, dado que não são leveduras próprias de bebidas alcoólicas.

4.3 ANÁLISE DOS FATORES DE CONVERSÃO DA FERMENTAÇÃO

Imediatamente após a inoculação, foram realizadas as contagens das leveduras no meio de cultura, permitindo a avaliação posterior dos fatores de conversão, relacionando número de células, substrato e produto.

$Y_{X/S}$: Fator de conversão substrato em biomassa

$Y_{P/S}$: Fator de conversão de substrato em produto

$Y_{P/X}$: Fator de conversão de produto em biomassa

Os resultados apresentados por esses termos em uma fermentação descontínua são fundamentais para a compreensão do potencial das linhagens de leveduras estudadas.

A estimativa de número de células por grama de levedura foi de $5 \cdot 10^9$ de células/g (LALLEMAND BREWING, 2022). Assim, conhecendo a quantidade de células por litro obtida experimentalmente, foi possível determinar a massa correspondente, apresentada na Tabela 8:

Tabela 8 – Valores de número de células no início da fermentação

Marca	X (cél.L) ⁻¹ (10 ⁹)	X (g.L ⁻¹)
X	5,10	1,02
Y	6,70	1,34
Z	7,08	1,41

É possível depreender dos valores imediatamente subsequentes à inoculação o rápido aumento de células viáveis, sobretudo da marca Z, a que possui a menor viabilidade. Tem-se assim, um indicativo de revitalização das células inviáveis pelo meio de cultura fornecido. Ao término do período de 48h, foram obtidos os seguintes valores de biomassa na Tabela 9:

Tabela 9 – Número de células ao fim de 48h de fermentação

Marca	X (cél.L) ⁻¹ (10 ⁹)	X (g.L ⁻¹)
X	10,3	2,05
Y	16	3,20
Z	31,8	6,35

Passadas 48h desde o início da fermentação, aumentou-se ainda mais o número de células viáveis, visto que o teor de etanol formado não era suficiente para causar inibição celular.

Os valores relativos à biomassa, etanol e glicose inicial e final permitiram obter os fatores de conversão da fermentação, mostrados na Tabela 10 a seguir:

Tabela 10 – Fatores de conversão (g/g)

Marca	Y _{X/S}	Y _{P/S}	Y _{P/X}
X	0,011	0,439	40,79
Y	0,019	0,438	23,224
Z	0,057	0,484	8,513

Uma vez de posse esses dados, é necessário que sejam comparados com os valores relatados por outros pesquisadores na literatura.

Sabendo-se que o maior interesse econômico envolvido nos processos fermentativos está relacionado à conversão de substrato em etanol, é natural a maior frequência do parâmetro Y_{P/S} nas pesquisas acadêmicas. Nesse contexto, Farias (2019) apresenta em seu estudo cinético um Y_{P/S} = 0,40, utilizando como substrato o fermentado alcoólico de ingá (*Inga edulis*). Ramos (2013), por sua vez, apresentou uma faixa máxima de Y_{P/S} entre 0,43 até 0,46 com linhagens indígenas de *Saccharomyces cerevisiae* contra apenas 0,38, obtido por uma linhagem tradicional. Além disso, Farias (2019) também elencou dados da literatura entre uma faixa de 0,30 a 0,485. Diante desses dados, observa-se que a marca X e Y possuíam valores muito próximos entre si, 0,439 e 0,438, respectivamente, e encaixam-se no intervalo relatado na literatura, sabendo-se não se tratar de leveduras cervejeiras. Finalmente, a marca Z, apesar de ter apresentado a menor viabilidade no decurso da pesquisa, foi a que apresentou o Y_{P/S} mais elevado, 0,484, encontrando-se muito próximo ao limite

máximo citado por Farias. Esse fato revela a alta capacidade de produção de etanol dessa linhagem comercial, não obstante sua baixa viabilidade celular.

Quanto ao $Y_{X/S}$, Oliveira (2016) apresentou em seu trabalho um valor igual a 0,034, enquanto Silva (2016) relatou $Y_{X/S} = 0,0242$ em outra pesquisa. Há outras pesquisas que apresentaram uma faixa de 0,30 a 0,45 (TOMOVA *et al.*, 2019). Desses valores é possível observar que as marcas X e Y estiveram abaixo, indicando que estas marcas não se utilizaram da glicose para se reproduzir tanto quanto era de se esperar. A marca Z, no entanto, apresentou um valor acima da média, revelando que a pouca parcela viável de células se desenvolveu e se replicou bastante, compensando sua baixa viabilidade inicial.

Relativamente ao fator $Y_{P/X}$, Silva (2016) apresentou um valor de $Y_{P/X} = 22,17$, ao passo que Oliveira *et al* (2016) apresentaram um resultado correspondente a $Y_{P/X} = 4,25$. Como é possível observar, os valores sofrem grande variação entre os estudos. Isso porque, embora o teor de etanol se mantenha próximo, há uma grande variação na parcela de células no início e ao final da fermentação. As marcas X e Y se comportaram dentro desse intervalo, apresentando valores iguais $Y_{P/X} = 41,67$ e $Y_{P/X} = 23,22$, respectivamente. Entretanto, a levedura do fermento Z apresentou um resultado inferior, devido à acentuada diferença entre a quantidade de células iniciais X_0 e finais X_f , evidenciando seu elevado crescimento.

5 CONCLUSÃO

A primeira etapa da pesquisa foi a análise da viabilidade celular durante as 8 semanas, e o resultado foi que as marcas X e Y apresentaram valores razoáveis, próximos a valores relatados na literatura, enquanto a marca Z mostrou valores consideravelmente inferiores em relação às outras. Além disso, não houve variação apreciável de viabilidade celular em nenhum dos fermentos biológicos, salientando-se que estes foram armazenados adequadamente, e as suspensões foram homogeneizadas antes de cada análise.

Na segunda etapa do experimento, as amostras provenientes dos meios de cultura foram analisadas anterior e posteriormente à fermentação. Os valores obtidos para os 3 fermentos biológicos valores próximos de consumo de substrato e produção de etanol.

Tornou-se evidente que, mesmo a marca Z possuindo uma baixa viabilidade celular com o decorrer das semanas, ela apresentou um elevado desenvolvimento e replicação celular, comparado com as outras 2 marcas analisadas, bem como um teor de etanol semelhante às demais.

A comparação dos valores obtidos na pesquisa com aqueles relatados na literatura mostrou um comportamento deveras similar para o fator de conversão $Y_{P/S}$, indicando que o consumo majoritário de glicose foi direcionado para a produção de etanol. Por isso, os rendimentos de etanol obtidos pelas 3 linhagens foram muito próximos. Quanto aos demais fatores de conversão, as diferenças foram decorrentes principalmente do elevado crescimento celular da levedura Z.

Foi possível observar a praticidade e a robustez dos métodos de açúcares redutores e de ebulliometria, os quais entregam valores precisos, desde que realizados com o cuidado e rigor analítico necessários.

Finalmente, a pesquisa indica que a avaliação do desempenho de uma levedura deve levar em consideração não apenas um parâmetro, como a viabilidade celular, mas diversos resultados em conjunto.

REFERÊNCIAS

AGU, K. C.; ADUOLA, M. K. Kinetic modeling of ethanol production by batch fermentation of sugarcane juice using immobilized yeast. **Global Journal of Engineering and Technology Advances (GJETA)**, v. 7, n. 1, p. 124-136, 21 abr. 2021.

ARAÚJO, M. A. S. **Avaliação da viabilidade celular de leveduras no processo de fermentação em uma cervejaria artesanal em Mossoró-RN**. 2019. Trabalho de conclusão de curso - Universidade Federal Rural do Semi-árido - Campus Mossoró, 2019.

BARNETT, J. A. **Beginnings of microbiology and biochemistry: the contribution of yeast research**. **Microbiology**, v. 149, (Pt 3), p. 557– 567. 2003.

BORTOLI, Daiane A. da S. *et al.* Leveduras e produção de cervejas - Revisão. **Bioenergia em revista: diálogos**, v. 3, n. 1, p. 45- 58, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Resolução **CNS nº 38**, de 21 de dezembro de 1977. Aprova normas e padrões para alimentos. Disponível em:

https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/cnnpa/1977/res0038_21_12_1977.html. Acesso em: 27 jan. 2023.

COZMUTA, L. M.; CAMELIA, N.; PETER, A.; APJOK, R. Insights into the fermentation process of fresh and frozen dough bread made with alginate-immobilized *S. cerevisiae* yeast cells. **Journal of Cereal Science**, v. 107. 2022.

CRUZ, M. L.; SILVA, F. T. M.; RAMINHO, M. L. F.; CASTRO, A. L. M.; RIBEIRO, M. M. R. E. J. ESTUDO DA VIABILIDADE DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* Y904 EMPREGANDO PROCESSO FERMENTATIVO EM BATELADA REPETIDA. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química**, Florianópolis/SC, 2014.

EBULIOMETRIA. Disponível em: https://files.cercomp.ufg.br/weby/up/56/o/FQExpServ_P6_ebuliometria.pdf. Acesso em: 18 set. 2022

FARIAS, M. G. **Potencial da produção de etanol por leveduras amazônicas**. 2019. Trabalho de conclusão de curso. Manaus, AM: UEA, 2019.

GARCÍA, J.; SÁENZ, T. Levadura *Saccharomyces*. In: **MANUAL DE LOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR**. Tercera Edición. Capítulo 4.12, pág.239-242. 2000.

GÓES-FAVONI, S. P.; MONTEIRO, A. C. C.; DORTA, C.; CRIPPA, M. G.; SHIGETMASU, E. Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 9, n. 4, p. 285-296, 2018.

IGEM Kyoto. In: **Project Digestion**. 2011. Disponível em: <https://2011.igem.org/Team:Kyoto/Digestion>. Acesso em: 7 fev. 2023.

JANK, M. S.; NAPPO, M. **Etanol de cana-de-açúcar: uma solução energética global sob ataque**. São Paulo: Senac, 2008.

LAHUE, C.; MADDEN, A. A.; DUNN, R. R.; HEIL, C. S. History and Domestication of *Saccharomyces cerevisiae* in Bread Baking. **Frontiers in genetics**, v. 11, 2020.

LALLEMAND BREWING. 2022. Disponível em: <https://www.lallemantbrewing.com/en/canada/products/brewing-yeast/#:~:text=For%20most%20strains%2C%201g%20of,slightly%20from%20batch%20to%20batch>. Acesso em: 1 fev. 2023.

LIN, Y.; ZHANG, W.; LI, C.; SAKAKIBARA, K.; TANAKA, S.; KONG, H. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. **Biomass and Energy**, v. 47, p. 395-401, 2012.

MACHÍN, C. S.; CARRALERO, N. A. G.; RODRÍGUEZ, C. A. G. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. **ICIDCA**. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, v. 50, n. 1, p. 20-28, 2016.

MARTINS, F.; MAMEDE, M. E. O.; SILVA, A. F. da; GUERREIRO, J. Ultraestrutura celular e expressão de proteínas de leveduras *hanseniaspora* sob efeito do estresse etanólico. **Braslian Journal of Food Technology**, v. 20, p. 1-6, 2017.

McGOVERN, P. E. **The Origins and Ancient History of Wine**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 2003.

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar**. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MIRANDA JÚNIOR, M. **“Estudos fisiológicos com leveduras industriais produtoras de etanol: efeito da natureza da fonte de nitrogênio”**. Tese de Doutorado. Araraquara, SP: UNESP, 2012.

MOREIRA C. S.; COSTA, M. A. S.; GONÇALVES, T. I.; CARDOSO, C. A. L.; HERNANDES, J. R.; BATISTOTE, M. **Avaliação da Capacidade Fermentativa e Fisiológica de Linhagens de Leveduras Cultivadas em Caldo de Cana**. BBR – Biochemistry and Biotechnology Reports. ISSN 2316-5200, número especial v. 2, n. 3, p. 324-327, 2013.

MUELLER, L. P.; SARABIA, D. T.; SANTOS, M. S. M.; CARDOSO, C. A. L.; BATISTOTE, M. O POTENCIAL ASSOCIADO DAS FONTES RENOVÁVEIS E *Saccharomyces cerevisiae* PARA PRODUÇÃO DE BIOETANOL. **Educação Ambiental em Ação**, v. 21, n. 81, 2022-2023.

NOSCHANG, J.; SCHMIDT, A. P.; BRAUNER, C. C. *Saccharomyces cerevisiae* na nutrição de ruminantes: Revisão. **Pubvet**, v. 13, n. 02, 2019. DOI: 10.31533/pubvet.v13n2a272.1-8.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. São Paulo: Artmed, 2014. 1220 p. ISBN 9781429234146.

OLIVEIRA, S. C.; OLIVEIRA, R. C.; TACIN, M. V.; GATTÁS, E. A. Kinetic Modeling and Optimization of a Batch Ethanol Fermentation Process. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, v. 6, ed. 1, 2016.

PARAPOULI, M., VASILEIADIS, A.; AFENDRA, A. S.; HATZILOUKAS, E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. **AIMS Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1-31, 2020.

PAULINO DE SOUZA, J. Improvement of Brazilian bioethanol production – Challenges and perspectives on the identification and genetic modification of new strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts isolated during ethanol process. **Fungal Biology**, 2017.

PORTAL LABORATÓRIO VIRTUAL DE PROCESSOS QUÍMICOS: **Processos Biológicos: Fermentação**. 17 fev. 2013. Disponível em: http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=92&Itemid=196. Acesso em: 10 jan. 2023.

RAMOS, C. L. Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2013.

ROSSETO, R. E. Panorama do etanol brasileiro. **II Seminário de Engenharia de Energia na Agricultura**, ano 13-22, v. 6, ed. 5, 2017.

SANTOS, S. F. M.; MORAES, F. S.; FERNANDES, L. M.; RIBEIRO, L. B.; FREIRE, K. R. L. **Análise Cinética da Fermentação das Leveduras Comerciais S-04 e S-33**. Revista Saúde e Ciência online, 2018.

SANTOS, A. M. B. **AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E CAPACIDADE PRODUTIVA DE ETANOL DA ESPÉCIE SACCHAROMYCES CEREVISIAE PROVENIENTE DE MARCAS COMERCIAIS**. 2022. Trabalho de conclusão de curso. Recife, PE: UFPE, 2022.

SHANKAR, T.; THANGAMATHI, P.; RAMA, R.; SIVAKUMAR, T. Characterization of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 170. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 13, p. 1386-1393, 2014.

SILVA, C. L. da; SANTANA, P. L. de; SILVA, C. F.; PAGANO, R. L. Modelagem e estimação de parâmetros do processo de produção de etanol em reator batelada por *Saccharomyces cerevisiae*. **Scientia Plena**, v. 12, ed. 5, 2016.

STRELLO, J.; NICOLINI, K.; REINEHR, C. O. VIABILIDADE DA LEVEDURA *Saccharomyces* spp. APÓS OS PROCESSOS DE CONGELAMENTO E LIOFILIZAÇÃO. **X simpósio de alimentos**, v. 10, 2018.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M., HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 7. ed. Porto Alegre: Bookman, 2006.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S. R. **Principles of Instrumental Analysis**. 6. ed. International Student Edition, 2007.

TEIXEIRA, J. F. **A levedura *Saccharomyces cerevisiae*: caracterização do gênero, domesticação e importância na composição de vinhos**. Monografia (Especialização em Microbiologia Aplicada). Belo Horizonte, MG: UFMG, 2015.

TOMOVA, A. A.; KUJUMDZIEVA, A. V.; PETROVA, E. Y. Carbon source influences *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell survival strategies: quiescence or sporulation. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, ed. 1, 2019.

STOCK.ADOBE.COM. **Visible light diagram color electromagnetic spectrum light wave frequency educational school physics vector background illustration of spectrum diagram rainbow infrared and electromagnetic**. Disponível em: <https://stock.adobe.com/images/visible-light-diagram-color-electromagnetic-spectrum-light-wave-frequency-educational-school-physics-vector-background-illustration-of-spectrum-diagram-rainbow-infrared-and-electromagnetic/229007362>. Acesso em: 07 jan. 2023.

WALKER, G.M. Fermentation (Industrial). Media for Industrial Fermentations. In: **Encyclopedia of Food Microbiology**; Batt, C., Tortorello, M.L., Eds.; Elsevier Science Publishers: Boston, MA, USA, 2014.

WALKER, G. M.; STEWART, G. G. *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. **MDPI Open Access Journals**, 17 nov. 2016.

WILLARD, H. H.; MERRITT, L. L. J.; DEAN, J. A.; SETTLE, F. A. J. **Métodos Instrumentais de Análise**. 6. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 1981.