

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**“Influência da Temperatura no Teste de  
Determinação da Tolerância Alcoólica de  
Leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*)”**

**Yemiko Makino**

Engenheira de Alimentos, Unicamp, 1989

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues**

**PARECER**

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Yemiko Makino aprovada pela Comissão Julgadora em 01 de março de 1999.

Campinas, 01 de março de 1999

Profa. Dra. Maria I. Rodrigues  
Presidente da Banca

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

**CAMPINAS**

**1999**

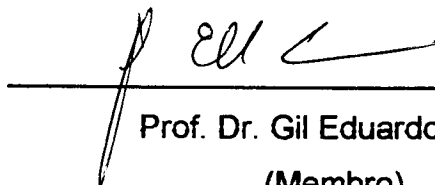
UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

184066

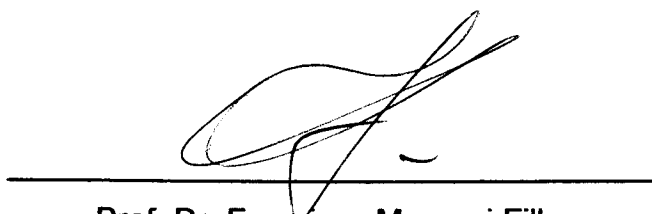
## BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Maria Isabel Rodrigues  
(Orientadora)



Prof. Dr. Gil Eduardo Serra  
(Membro)



Prof. Dr. Francisco Maugeri Filho  
(Membro)

Dra. Maria da Graça. S. Andrietta  
(suplente)

Campinas, de

de 1999

Ao Delson, que esteve sempre  
presente com amor, carinho e  
paciência...

Aos meus filhos Kleyton, Dyemi  
e Edylson, que estão sempre me  
ensinando coisas novas...

## Agradecimentos

- À Profa. Dra. Maria Isabel pela orientação, principalmente pela compreensão e palavras de incentivo que me ajudaram muito na realização deste trabalho.
- Aos meus pais Fumiko e Kenkichi (in memorian) e irmãos que sempre me ajudaram e apoiaram
- Aos amigos do laboratório de Bioengenharia: Lia, Belzinha, Oscar, Janaina, André, Marco, Marley, Fifa, Suzana, Fábila, Marió, Caco e D. Maria.
- Aos amigos de sempre Lucy, Wilfredo, Eliana.
- Às amigas que estão sempre prontas para me ouvir Dina, Amélia, Mitie, Iriani, Cristina e Sílvia.
- À Fernanda pela amizade e carinho no cuidar dos meus filhos, e sempre pronta nos momentos de apuros., sucesso em sua “nova vida”.
- À minha avó Tsuru (in memorian), a quem tenho como exemplo de luta e perseverança.

## Índice

1- Introdução .....	1
2- Revisão Bibliográfica .....	4
2.1- Fermentação .....	4
2.1.1- Fermentação alcoólica .....	4
2.1.2- Cinética dos processos fermentativos .....	5
2.2- Microrganismo .....	7
2.2.1- Leveduras .....	7
2.2.2- Metabolismo microbiano: produção de energia .....	9
2.3- Fatores que influenciam na tolerância alcoólica das leveduras .....	10
2.3.1- Membrana citoplasmática .....	10
2.3.2 - Influência da temperatura .....	13
2.3.3- Inibição Pelo Etanol .....	14
2.3.4- Composição do meio .....	19
2.4- Determinação da Tolerância ao Etanol .....	21
2.5- Viabilidade Celular de Leveduras .....	22
3- Materiais e Métodos .....	23
3.1- Microrganismo .....	23
3.2- Metodologia para Determinação da Tolerância Alcoólica de Leveduras ..	23
3.3- Obtenção da Curva de Decaimento de pH.....	25
3.4- Viabilidade celular das leveduras .....	27
4- Resultados e Discussão .....	29
4.1- Curva da Cinética de Decaimento de pH para o Fermento Fleischmann. 29	
4.2- Determinação do Parâmetro k de Tolerância Alcoólica .....	37
4.3- Curvas da Cinética de Decaimento de pH para o Fermento Itaiquara.....	45
4.4- Determinação do Parâmetro k de Tolerância Alcoólica para Fermento Itaiquara .....	47
4.5- Viabilidade Celular.....	53
5- Conclusão .....	55
6- Sugestões Para Trabalhos Futuros .....	56
7- Referências Bibliográficas.....	57

## Índice de Tabelas

Tabela 3.1 - tempo em que foram realizadas as leituras de pH .....	26
Tabela 4.1 - valores do parâmetro k e dos fatores de correlação linear para cada temperatura (fermento Fleishmann).....	37
Tabela 4.2- Valores do parâmetro k e dos fatores de correlação linear para cada temperatura, para o fermento Itaiquara .....	45
Tabela 4.3- Equações exponenciais ajustadas para temperaturas de 34 40 <sup>0</sup> C para o fermento Fleischmann .....	47
Tabela 4.4- equações exponenciais para temperaturas de 30 a 40 <sup>0</sup> C para o fermento Itaiquara.....	48
Tabela 4.5- Cálculo de k e os valores de pH <sub>f</sub> para T=26 <sup>0</sup> C .....	50
Tabela 4.6- Valores do parâmetro k do fermento Fleischmann .....	51
Tabela 4.7- Valores do parâmetro k do fermento Itaiquara.....	51
Tabela 4.8- Viabilidade celular (%) no final de cada curva de decaimento de pH (fermento Fleischmann) .....	53
Tabela 4.9- Viabilidade celular (%) no final de cada curva de decaimento de pH (fermento Itaiquara) .....	54

## Índice de Figuras

Figura 3.1- Fotografia da montagem experimental utilizada no teste de tolerância alcóolica .....	26
Figura 3.2- Curva de decaimento de pH realizado a 30°C e concentração de etanol de 4% .....	27
Figura 4.1- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste de 26 °C para o fermento Fleishmann . ....	32
Figura 4.2- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste de 28 °C para o fermento Fleishmann . ....	32
Figura 4.3- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste de 30 °C para o fermento Fleishmann . ....	33
Figura 4.4- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste de 32 °C para o fermento Fleishmann . ....	33
Figura 4.5- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste de 34 °C para o fermento Fleishmann . ....	34
Figura 4.6- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste de 36 °C para o fermento Fleishmann . ....	34
Figura 4.7- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste de 38 °C para o fermento Fleishmann . ....	35
Figura 4.8- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste de 40 °C para o fermento Fleishmann . ....	35
Figura 4.9- Curvas de pHf em função da concentração alcóolica, para as diferentes temperaturas de teste (Fermento Fleischmann).....	36
Figura 4.10- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste de 26 °C para o fermento Itaiquara .....	40
Figura 4.11- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste	

de 28 °C para o fermento Itaiquara . . . . .	40
Figura 4.12- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste	
de 30 °C para o fermento Itaiquara . . . . .	41
Figura 4.13- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste	
de 32 °C para o fermento Itaiquara . . . . .	41
Figura 4.14- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste	
de 34 °C para o fermento Itaiquara . . . . .	42
Figura 4.15- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste	
de 36 °C para o fermento Itaiquara . . . . .	42
Figura 4.16- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste	
de 38 °C para o fermento Itaiquara . . . . .	43
de 40 °C para o fermento Itaiquara . . . . .	43
Figura 4.18- Curvas de pHf em função da concentração alcóolica, para as diferentes temperaturas de teste (Fermento Itaiquara).....	44
Figura 4.19- Valores do parâmetro k em função da temperatura ....	46
Figura 4.20- Ajuste exponencial para a função pHf versus $X_{\log_{10}e}$ e para as temperaturas de 36 a 40°C (fermento Fleischmann).....	48
Figura 4.21- Ajuste exponencial para a função pHf versus $X_{\log_{10}e}$ e para	
Figura 4.17- pH extracelular como função do tempo e da concentração alcóolica (0 - 10%)na temperaturas de teste	
as temperaturas de 30 a 40°C (fermento Itaiquara).....	49
Figura 4.22- Parâmetro k em função da temperatura e concentração de etanol (Fleischmann) . . . . .	52
Figura 17- Parâmetro k em função da temperatura e concentração de etanol (Itaiquara).....	52



## Abreviaturas e Símbolos

$a, b, c$	constante empírica	
$C_x$	constante de difusão na concentração $x$ de etanol	
$C_0$	constante de difusão na concentração 0 de etanol	
$D_m$	coeficiente de difusão pela abertura na membrana	
$F$	constante de Faraday	
$I_x$	Inibição pela concentração celular	
$k$	parâmetro de tolerância alcóolica	
$k_p$	taxa de expulsão ativa de próton	
$k_1$	constante exponencial que expressa aumento de fluxo pelo álcool	
$k_2$	coeficiente de abertura	
$K_s$	cte de Monod	$\text{Kgm}^3$
$m, n$	índice de potência	
$P$	concentração de produto	$\text{Kgm}^{-3}$
$P_{\text{máx}}$	concentração de etanol limite de crescimento	
$P_{\text{er}}$	permeabilidade da membrana	
$\text{pH}_f$	pH final	
$\Delta \text{pH}$	diferença de pH através da membrana plasmática	
$\Delta \psi$	potencial da membrana	
$R$	constante da lei dos gases	$\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}$
$S$	concentração de substrato	$\text{Kg m}^{-3}$
$T$	temperatura absoluta	
$X$	concentração de células	$\text{Kgm}^{-3}$
$X_{\text{máx}}$	concentração máxima de células	$\text{Kgm}^{-3}$
$X_0$	concentração de células no mosto	$\text{Kgm}^{-3}$
$\mu$	taxa específica de crescimento do microorganismo	$\text{h}^{-1}$

$\mu_i$	taxa específica máxima de crescimento do microorganismo na presença de etanol	$h^{-1}$
$\mu_{max}, \mu_o$	taxa específica de crescimento máximo do microorganismo	$h^{-1}$
$\alpha, \beta$	índice de potência	
$v_i$	taxa específica de produção de etanol	
$v_o$	taxa específica de máxima produção de etanol	
$\delta$	espessura da membrana	

## RESUMO

O estudo da tolerância alcóolica de leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*, é de grande importância para a indústria de álcool como um parâmetro de seleção de cepas e de controle da fermentação

JIMÉNEZ & VAN UDEN (1985), propuseram um método prático e rápido para a obtenção do parâmetro de tolerância alcóolica (k), realizando testes numa temperatura fixa de 25°C. O método se baseia na queda do pH extracelular, devido ao contra-fluxo de prótons através da membrana plasmática.

Neste trabalho foi realizado um estudo do parâmetro k de leveduras (linhagens *Saccharomyces cerevisiae* Fleischmann e Itaiquara) para a faixa de temperatura de 26 a 40°C, com o objetivo de se verificar a influência e a sensibilidade do teste de tolerância alcóolica em relação a esta variável, uma vez que os processos fermentativos industriais para a produção de álcool, no Brasil, ocorrem nessa faixa de temperatura. Para este estudo foi utilizada a metodologia proposta por JIMÉNEZ & VAN UDEN (1985), onde o parâmetro k pode ser obtido pelo coeficiente angular da regressão linear dos valores de pH<sub>f</sub> (pH final da solução) em função da concentração de álcool. Foi verificado que a metodologia proposta é válida e eficiente para a determinação de k na faixa de temperatura de 26 a 32°C, mas que acima desta temperatura a variação do pH final em função da concentração de etanol deixa de ter um comportamento linear, sendo melhor representada por uma equação exponencial. Esses resultados sugerem que no caso da introdução deste método de determinação de tolerância alcóolica como rotina nas usinas de álcool, é importante a realização do teste na faixa de temperatura de 26 a 32°C. Uma vez que para temperaturas acima desta faixa a concentração alcóolica influencia de forma significativa no valor do parâmetro k.

## SUMMARY

The study of yeast tolerance to alcohol concentrations, such as for *Saccharomyces cerevisiae*, is one of the most important parameter in the control of industrial fermentation process. JIMÉNEZ & VAN UDEN (1985), proposed a practical technique to estimate the alcohol tolerance parameter (k). The method is based on the pH decreasing in the surrounding medium following the proton flux throughout the plasmatic membrane. The assay temperature, according to JIMÉNEZ & VAN UDEN was carried out at 25 °C, however the industrial fermentation processes usually are conducted at temperature higher than such a temperature.

In this work, the study of the yeast k parameter in the range of 26 to 40°C was carried out to the better understanding of the dependence of the k parameter relating to the process temperature. The technique proposed by JIMÉNEZ & VAN UDEN was adopted, where the parameter k may be obtained by the angular coefficient of the linear fitting of the final pH values as a function of alcohol concentration.

It was observed as a result that for the assay temperature between 26 to 32°C, k may be obtained by the proposed technique with reasonable accuracy. On the other hand for temperature higher than 32°C, and up to 40°C, the pH as a function of alcohol concentration deviate from the linear behavior to an exponential function. Concerned to this result, at the industrial application of such technique to determine the alcohol tolerance, it's important to test by using temperature in the range of 26 to 32°C, because for temperatures higher than 32°C a strong influence of alcohol concentration on k parameter was observed.

## 1- Introdução

Atualmente existe uma grande preocupação em relação aos problemas ambientais, mobilizando diversas áreas do conhecimento para se encontrar soluções e meios alternativos para um desenvolvimento sustentável. O álcool é uma alternativa para a substituição do combustível derivado do petróleo. No Brasil utiliza-se a cana-de-açúcar como matéria-prima e é produzido em grande escala por processo fermentativo, mas ainda existem barreiras econômicas para que o álcool substitua totalmente a gasolina.

Segundo SIQUEIRA (1993), em 92 a participação do álcool carburante, em seus tipos hidratado e anidro, contribuiu com o percentual de aproximadamente 12% do consumo em relação aos derivados de petróleo como diesel, óleo combustível, gasolinas e GLP, aproximando-se do consumo de gasolina que está ao redor de 15%. O mesmo autor cita ainda vários fatores que favorecem a defesa do Programa Nacional do Álcool e o uso deste como combustível:

- Contribui significativamente com a atual matriz energética nacional;
- trata-se de energia renovável e combustível menos poluente;
- permite a economia de divisas com a redução na importação de petróleo;
- utiliza tecnologia cem por cento nacional;
- emprega um grande número de mão-de-obra direta, com fixação do homem no meio rural, principalmente mão-de-obra pouco qualificada que não teria como sobreviver condignamente no meio urbano;
- é um programa de conteúdo estratégico pelo seu caráter nacionalista e pela sua dispersão territorial.

No início dos anos 90 houve uma escassez de álcool carburante e o Brasil foi obrigado a importar para abastecer a frota de quatro milhões de veículos. As montadoras diante da crise do abastecimento, diminuíram drasticamente a fabricação de carro a álcool, prevendo-se um rápido sucateamento da frota existente. Em 1994 entra em vigor a lei de proteção ambiental obrigando a mistura de 22% de álcool à gasolina, aumentando o consumo de álcool, com a vantagem de que a adoção de

uma mistura de álcool e gasolina garante a redução de poluição nas grandes cidades e da menor dependência do petróleo importado. (internet 30/Out./98).

A produção atual (safra 97/98) das 134 usinas e destilarias do Estado de São Paulo, totalizam mais de 3,58 bilhões litros de álcool anidro e 5,91 bilhões litros de álcool hidratado (Informativo Orplana, SOUZA, 1998).

Muitas pesquisas têm sido realizados para diminuir o custo de produção, para que o produto seja mais competitivo no mercado em relação a custo e benefício. Através das pesquisas são realizados estudos de otimização dos processos fermentativos para aumentar a produtividade e a eficiência das usinas, tendo-se, por exemplo, verificado uma maior eficiência fermentativa com a utilização de processos contínuos. No entanto, por razões históricas, a maioria das unidades industriais operantes ainda utilizam o sistema batelada-alimentada (Melle-Boinot), sendo que com o avanço tecnológico e a necessidade de uma maior produtividade com altos rendimentos, têm-se elevado o número de instalações com processos contínuos (ANDRIETTA & STUPIELLO, 1990), atualmente correspondendo a 30% das instalações nacionais.

O processo contínuo de fermentação em reator de tanque agitado simples, CSTR (Continuous Stirred Tank Reactor), pode ser melhorado com a utilização de um processo multiestágio e em cascata, resultando numa diminuição substancial do volume do reator quando comparado com o do processo CSTR simples (VIGIÉ *et alii*, 1990). A utilização do reciclo de células nesses fermentadores multiestágios aumenta ainda mais a produtividade quando comparado a sistema sem reciclo (LEE *et alii*, 1983)

Devido ao grande volume da produção, a condução da fermentação em condições estéreis é impossível, e para controlar a contaminação procura-se trabalhar com alta concentração de leveduras e alto teor alcóolico. Procura-se utilizar leveduras tolerantes a alta graduação alcoólica e também tolerantes a altas temperaturas, devido ao clima tropical do país.

Encontram-se em literatura vários estudos sobre a tolerância alcoólica em microrganismos, em particular de leveduras. A alta concentração de etanol no meio de fermentação provoca a inibição pelo produto, tendo-se ainda que as leveduras são menos tolerantes ao álcool com o aumento da temperatura de fermentação. A

determinação do parâmetro de tolerância alcoólica pode ajudar na otimização do processo de fermentação, na escolha de cepas mais tolerantes à alta temperatura e maiores concentrações de álcool, resultando numa maior produtividade e rendimento, ou mesmo prever efeitos danosos sobre o processo com a variação de temperatura. Verificou-se na literatura uma metodologia proposta por JIMÉNEZ & VAN UDEN (1985) eficiente e prática para ser colocada como rotina em usinas de álcool, com temperatura do teste fixada em 25<sup>0</sup>C. WANDERLEY (1997) utilizando esta metodologia como um parâmetro de acompanhamento de fermentação alcoólica, verificou que o aumento da temperatura da fermentação afetava drasticamente o valor do parâmetro de tolerância ao etanol (k). Assim, no presente trabalho a metodologia foi avaliada nas temperaturas entre 26 a 40<sup>0</sup>C, com intuito de se verificar a influência da temperatura na determinação do parâmetro k, usando leveduras comerciais muito comum na produção industrial de álcool, e cuja temperatura de processo varia com a temperatura ambiente, que pode variar de 26 a 40<sup>0</sup>C.

A avaliação do efeito da temperatura no teste de tolerância ao etanol é muito importante para verificar a sensibilidade desta metodologia em relação a este parâmetro já que a temperatura ambiente no nosso país pode sofrer grandes oscilações durante a safra de produção de álcool.

## **2- Revisão Bibliográfica**

### **2.1- Fermentação**

#### **2.1.1- Fermentação alcoólica**

A fermentação alcoólica no Brasil, iniciou-se historicamente com a utilização do sistema por batelada, passando para a batelada-alimentada, e mais recentemente para o processo de fermentação contínua, CSTR.

As principais vantagens do processo contínuo em relação aos anteriores são:

- maior produtividade;
- maior homogeneidade do produto e
- maior adaptabilidade ao controle automático.

DOURADO *et alii* (1987) observou que, para um mesmo volume total, a fermentação contínua num reator cascata apresenta maior produtividade em relação a um reator simples. Isto acontece pelo fato de que num reator cascata, parte da fermentação ocorrer num ambiente de baixa concentração de etanol, e portanto com baixa inibição pelo etanol.

Várias aplicações do sistema contínuo multiestágio para processos fermentativos têm sido relatados em literatura. Segundo VIGIÉ *et alii* (1990), alta concentração final de etanol num reator multiestágio, pode resultar em uma redução substancial (41%) no volume total do reator, quando comparado com sistema CSTR simples.

Segundo ANDRIETA & STUPIELLO (1990), o estudo do comportamento cinético deste processo é de grande importância para o esclarecimento de alguns pontos, tais como o número de estágios necessários, ou outros fatores que interferem diretamente na produtividade e operacionalidade do processo.

Estudos realizados por ANDRIETA (1994), comprovaram que um sistema com quatro estágios, a fermentação é similar a de um reator tubular considerado ideal para reações com inibição pelo produto.



### 2.1.2- Cinética dos processos fermentativos

Normalmente, o ciclo de vida dos microrganismos é constituído pelas fases lag, exponencial, estacionária e morte.

A velocidade específica de crescimento é definida como:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

onde  $\mu$  é uma constante da taxa de crescimento .

A forma mais simples citada na literatura para representar a constante da taxa de crescimento é a equação de Monod,

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{k_s + S}$$

onde  $\mu_{\max}$  representa o valor máximo de crescimento específico,  $S$  a concentração de substrato e  $k_s$  a constante de Monod.

Este é um modelo considerado adequado para descrever a cinética de fermentação com pouca inibição, citado por LEE *et alii* (1983), sendo que para sistemas com inibição pelo etanol, pode se utilizar a seguinte equação:

$$\mu = \mu_i \frac{S}{k_s + S}$$

onde  $\mu_i$  é o valor máximo de crescimento específico na presença de etanol.

Quatro tipos diferentes de dependência de  $\mu_i$  com relação à concentração de etanol foram citados em literatura por LUONG (1985):

Relação linear

$$\mu_i = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)$$

Relação exponencial

$$\mu_i = \mu_{\max} \exp(k_2 P)$$

Relação parabólica

$$\mu_i = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^{0.5}$$

Equação generalizada não linear

$$\mu_i = \mu_{\max} \left(1 - \left(\frac{P}{P_{\max}}\right)^n\right)$$

Em seu trabalho, LEVENSPIEL (1980) também propôs uma equação generalizada não linear do tipo:

$$\mu_i = \mu_{\max} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n$$

A inibição pelas células foi observada por CYSEWSKI & WILKE (1977), considerando-se que a alta densidade celular provoca uma inibição na fermentação alcoólica.

$$I_x = \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^m$$

sendo  $I_x$  o termo de inibição pela concentração celular.

LEE *et alii* (1983) propôs um modelo cinético, incluindo os termos de inibição pela concentração celular e produto, que é expressa pela seguinte equação:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{k_s + S} \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right)^n \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right)^m$$

JARZEBSKI *et alii* (1989) também propuseram um modelo considerando a inibição pelo produto e concentração celular, mas para fermentações com alta concentração de células, expressa pela equação:

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{k_s + S} \left(1 - \left(\frac{P}{P_{\max}}\right)^n\right) \left(1 - \left(\frac{X}{X_{\max}}\right)^m\right)$$

## 2.2- Microrganismo

### 2.2.1– Leveduras

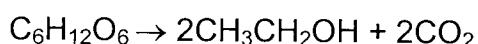
As leveduras são microorganismos eucarióticos que têm estado a serviço do homem durante muitos séculos, fermentando sucos de frutas, levedando o pão e fabricando outros produtos. Atualmente é utilizada na produção de álcool, certas

vitaminas, gorduras e proteínas a partir de açúcares simples e do nitrogênio amoniacal. Em geral, as células das leveduras são maiores do que as bactérias e suas dimensões variam de 1 a 5 micrômetros de largura e de 5 a 30 micrômetros de comprimento. Cada espécie tem uma forma característica, variando de tamanho com a idade e o ambiente, e as leveduras não possuem flagelos ou outros órgãos de locomoção.

A maior parte das informações sobre leveduras foram obtidas da *Saccharomyces cerevisiae* devido à sua importância industrial. Segundo D'AMORE & STEWART (1987) as leveduras são sem dúvida o grupo de microrganismos mais explorados comercialmente pelo homem, e sua contribuição se baseia na capacidade de certas leveduras de converter de forma rápida e eficiente os açúcares em etanol e dióxido de carbono, como em suco de uva, extrato de grãos e leite. A *Saccharomyces cerevisiae* tem a habilidade de fermentar uma ampla faixa de açúcares, especialmente quando crescem em meio anaeróbico ou próximas às condições anaeróbicas, como por exemplo, sacarose, glicose, frutose, galactose, maltose e maltotriose, além de que em adição junto às espécies relacionadas *Saccharomyces diastaticus* e *Saccharomyces uvarum* são hábeis para utilizar o amido ou dextrinas e melibiose, respectivamente. Apesar de centenas de experiências, o processo de produção de etanol e suas regulações, ainda não estão completamente esclarecidos, existindo maior interesse na habilidade das leveduras de tolerar meios com altas concentrações de etanol.

A parede celular das leveduras é fina nas células jovens e espessando-se com a idade. ROSE (1993) cita que na *Saccharomyces cerevisiae*, a parede contribui com 15 a 25 % da massa seca da célula, e entre 80 a 90 % da parede é composta por uma mistura de polissacarídeos (o glucana contribuindo com 30 a 34% e manana com aproximadamente 30%), e outros constituintes são de proteínas 6 a 8%, lipídios 8,5 a 13,5% e quitina 1 a 2%). A membrana citoplasmática da levedura funciona como uma barreira osmótica, constituído de duas camadas eletro-densas, encontrando-se vários estudos que tentam explicar como as soluções atravessam esta barreira (PELCZAR *et alii*, 1981).

As leveduras, e alguns outros microrganismos, realizam a fermentação alcoólica, processo pelo qual um mole de glucose resulta em dois moles de CO<sub>2</sub> e dois moles de etanol.



A fermentação alcoólica é idêntica à glicólise, exceto por duas reações no final da seqüência glicolítica (CONN & STUMF, 1980).

### **2.2.2- Metabolismo microbiano: produção de energia**

Para explicar o fluxo de prótons pela membrana plasmática, é necessário rever o metabolismo microbiano na produção de energia, como citado por PELCZAR *et alii* (1996). O metabolismo é toda atividade química realizada pelo organismo vivo, envolvendo a utilização e liberação de energia. A energia é utilizada para realizar trabalhos como produzir enzimas, sintetizar parede celular e membrana citoplasmática e reparar danos ocorridos na célula. A energia é obtida pela degradação de nutrientes ou substâncias químicas, sendo armazenada temporariamente até a sua utilização para a síntese dos constituintes da célula.

A *Saccharomyces cerevisiae* como um microrganismo quimioheterotrófico, obtém a energia pela degradação de compostos orgânicos, e é armazenada em compostos de transferência de energia, sendo o mais importante a adenosina trifosfato (ATP). A ATP é formado pela fosforilação da adenosina difosfato (ADP)

Existem três vias gerais nas quais a fosforilação da ADP pode ocorrer: fosforilação em nível de substrato, fosforilação oxidativa e fotofosforilação. Na fosforilação oxidativa a energia para a síntese da ATP é obtida pela energia liberada pelas reações de oxidação. A célula utiliza uma série integrada de reações de oxidação seqüenciais chamadas sistemas de transporte de elétrons, liberando energia de forma gradativa. Este transporte de elétrons promove o bombeamento de prótons (íons hidrogênio, H<sup>+</sup>) através da membrana, que não é permeável a prótons. Assim, a operação contínua do sistema de transporte de elétrons resulta no acúmulo de prótons em um lado da membrana (lado externo da célula) e no déficit de prótons no lado oposto, sendo que a relação da concentração de prótons entre os dois lados da membrana pode chegar a 100 vezes. Esta diferença na distribuição de prótons e cargas elétricas através da membrana representa uma importante forma de energia potencial chamada força protomotiva (PELCZAR, 1996).

Na membrana da célula existem canais específicos que permitem o retorno dos prótons para a célula, estes canais estão presentes dentro das moléculas da enzima adenosina trifosfatase (ATPase). Certos compostos químicos, denominados agentes desacopladores, são conhecidos como venenos para as células, uma vez que estes compostos impedem que a energia liberada pelo sistema seja utilizada para produção de ATP. O bioquímico PETER MITCHELL (citado por PELCZAR *et alii*, 1996) descobriu que os agentes desacopladores são capazes de destruir a força protomotiva por atuarem como condutores de prótons. Estes agentes conduzem livremente prótons através da membrana, impedindo o acúmulo de prótons no lado externo da célula e suprimindo a força protomotiva para a síntese de ATP.

O etanol provoca um aumento exponencial da constante de difusão do fluxo de prótons, e segundo LEÃO & VAN UDEN (1984) é expresso por:

$$C_x = C_0 e^{kx}$$

onde  $C_x$  e  $C_0$  são constantes de difusão nas concentrações  $X$  e  $0$  de etanol respectivamente, e  $k$  é a constante de aumento exponencial. O aumento de concentração de etanol provoca o aumento de pHf.

## **2.3– Fatores que influenciam na tolerância alcoólica das leveduras**

### **2.3.1– Membrana citoplasmática**

É largamente aceito que a movimentação do etanol pela membrana citoplasmática é puramente de natureza difusa, conforme LOUREIRO & FERREIRA (1982). Sendo que a permeabilidade da membrana ao etanol poderia ser estimada, mesmo que grosseiramente, assumindo que a transposição através da membrana se realiza por três processos: (i) a abertura (quebra) de uma passagem na membrana, (ii) a passagem por essa abertura, e (iii) a dissolução no banho aquoso do outro lado da membrana. Nesse processo, a permeabilidade da membrana é dado por:

$$P_{er} = \frac{kD_m}{\delta}$$

onde  $P_{er}$  é a permeabilidade da membrana,  $K$  o coeficiente de abertura (quebra),  $D_m$  o coeficiente de difusão pela abertura na membrana, e  $\delta$  a espessura da membrana.

Vários autores, THOMAS & ROSE, (1979); LOUREIRO-DIAS & PEINADO, (1982); LEÃO & VAN UDEN, (1982, 1983, 1984), descrevem os efeitos inibitórios causados pelo etanol no transporte de solutos pela membrana. CARTWRIGHT (citado por ROSE, 1993) afirma que, com exceção da glicose, todos outros solutos são acumulados ativamente e requerem energia no transporte através da membrana. Esse transporte ativo na *Saccharomyces cerevisiae*, e na maioria dos outros microorganismos, requer o estabelecimento de uma força protomotiva através da membrana, cuja energia efetiva o transporte ativo. Essa força protomotiva é o resultado da atividade ATPase, localizada na membrana plasmática, expulsando os prótons e conduzindo à uma diferença nos valores de pH através da membrana, isto é, formação de uma membrana potencial. A força protomotiva pode ser determinada pela fórmula:

$$\Delta p = -2,3 (RT/F)\Delta pH + \Delta \psi$$

onde:  $R$  é a constante dos gases,

$T$  a temperatura absoluta,

$F$  a constante de Faraday,

$\Delta pH$  a diferença de pH através da membrana plasmática, e

$\Delta \psi$  o potencial da membrana.

CARTWRIGHT (citado por ROSE, 1993), observou a diminuição da força protomotiva das células suspensas em solução de glicose contendo etanol, cuja explicação para o fenômeno foi atribuído ao efeito do álcool na força protomotiva, que

poderia inibir a ação da ATPase ligada à membrana, além de poder inibir a ação de uma ou mais proteínas envolvidas no processo de transporte de solutos, apesar de não ser totalmente conhecida a forma como o etanol inibe as proteínas da membrana plasmática ou como o álcool reage com essas proteínas.

A membrana plasmática é a primeira organela a estabelecer um contato com álcool desse modo está sujeito ao estresse do meio. Tem sido demonstrado que a incorporação de ácidos graxos e/ou esteróis, assim como proteolipídios dentro da membrana celular ajuda a aliviar a inibição pelo álcool. O estresse causado por sais é bem conhecido para alterar a composição de lipídios de bactérias e espécies de leveduras halotolerantes (RUSSELL, N. J. (1989) e HOSONO, K. (1992)). Segundo SHARMA *et alii* (1996), quando os microrganismos são crescidos em meio com alta concentração salina, a membrana plasmática pode se tornar rígida, no entanto foram observadas diminuições nas razões entre fosfolipídios/proteínas e esterol/fosfolipídios, assim como um aumento na razão entre fosfatilcolina/fosfatidiletanol-amino, aumentando a fluidez da membrana que por sua vez aumenta a tolerância a alta concentração de etanol

Durante o crescimento de *Saccharomyces* em etanol, lipídios enriquecidos com resíduos de ácido graxo C<sub>18:1</sub> são sintetizados para compensar a queda de resíduos de palmitil. Esta mudança com a suplementação de ácidos graxos insaturados favorece a tolerância alcoólica pela baixa permeabilidade da membrana, o que têm levado a concluir que a membrana celular é a principal causa da inibição pelo etanol e implica que resíduos de ácidos graxos na membrana são importantes determinantes da resistência ao álcool, JIMENEZ & BENÍTEZ (1987). Esta hipótese é consistente com a mudança estrutural observada na membrana celular de microrganismos tolerantes a alta concentração de álcool. A curva de acidificação tem provado ser uma medida real do grau de interferência do etanol na membrana celular.

KAJIWARA *et alii* (1996) estudou a biosíntese de ácidos graxos poli-insaturados em *Saccharomyces cerevisiae* e a influência dos ácidos graxos na tolerância alcoólica. Observou-se que quando a levedura induzida a produzir ácidos graxos poli-insaturados são mais resistentes a alta concentração de etanol. Foi considerado que a síntese de fosfolipídios durante a biogênese da membrana nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, têm muitas características dos organismos eucarióticos



superiores. Os resíduos de ácidos graxos da composição de fosfolipídios na membrana da levedura, é o mesmo que de outras membranas eucarióticas

### 2.3.2 - Influência da temperatura

Embora algumas leveduras sejam capazes de produzir altos níveis de etanol, a sensibilidade ao álcool ainda é um sério problema em fermentações industriais sendo que esta sensibilidade aumenta com a temperatura. Fermentações conduzidas com leveduras à temperaturas acima de 40 °C são pouco conhecidas, mas HACKING *et alii* (1984) chegaram a obter rendimentos superiores a 90% e níveis finais de etanol de 8%, v/v, para a *Saccharomyces cerevisiae*, na fermentação de glicose a 40 °C, e STEPHEN W. B. & STEPHEN G. O.(1982) verificaram que a fermentação por batelada de *Saccharomyces uvarum* se torna mais resistente à inibição pelo etanol com o aumento da temperatura. A sensibilidade ao etanol com a temperatura faz com que os fermentadores industriais necessitem de sistemas de resfriamentos caros, o que poderia ser contornado com a utilização de linhagens de leveduras termotolerantes. LALUCE (1991), em seu trabalho apresenta estudos de obtenção de linhagens de leveduras com maior tolerância à elevações de temperatura, concentrações de açúcar e etanol.

Com o aumento da temperatura aumenta também o efeito tóxico do etanol em leveduras. Tem sido mostrado que a causa da morte térmica e do aumento da sensibilidade ao etanol em *Saccharomyces cerevisiae* ocorre devido a uma alteração na região macromolecular localizado no interior da membrana mitocondrial, e que a causa do etanol induzir a morte que predomina em temperaturas de crescimento baixos e intermediários está localizado na membrana plasmática. D'AMORE & STEWART (1987) apresenta uma revisão sobre a tolerância ao etanol de leveduras.

GAO & FLEET (1988) estudaram a influência da temperatura e do pH na sobrevivência e crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* e *Klockera apiculata*, na presença de concentrações de etanol entre 2,5% e 15% (v/v), onde verificaram que a sensibilidade ao etanol aumenta com a diminuição do pH de 6,0 para 3,0.

Segundo CASEY *et alii* (1983, 1984), o fator limitante para a produção de altos níveis de etanol estaria mais relacionado com deficiências nutricionais da levedura do que com os efeitos tóxicos do mesmo, uma vez que em altas temperaturas as leveduras apresentam maiores exigência nutricionais devido às condições limitantes de oxigênio, fato comprovado por SAIGAL & VISWANATHAN (1983) que conseguiram melhorar a fermentação à 40 °C com a suplementação de óleos vegetais e ácidos graxos. Se uma exigência nutricional é encontrado, uma melhora na fermentação e um aumento na concentração final de etanol poderia ser esperado. No entanto, ainda existem muitas controvérsias quanto ao efeito da temperatura e/ou da concentração alcoólica na tolerância ao etanol.

### **2.3.3- Inibição Pelo Etanol**

Em seu trabalho de revisão, D'AMORE & STEWART (1987) encontraram concordância com vários autores na sugestão de que o aumento à tolerância alcoólica pode ser obtido com o alto conteúdo de ácidos graxos insaturados, sendo comprovado por HAYASHIDA (citado por D'AMORE & STEWART, 1987) e seus assistentes, estes relataram que as leveduras adquirem aumento de tolerância ao etanol quando crescem na presença de extrato de micélio fúngico contendo ácidos graxos insaturados

O interesse pela fisiologia básica de tolerância alcoólica foram sugeridos pelos trabalhos de GRAY & TROYER em 1940 e 1950 (citado por D'AMORE & STEWART, 1987), onde relatam que a tolerância ao etanol não está limitada a algum gênero ou espécie de leveduras e que as mesmas são menos tolerantes à altas temperaturas.

Uma revisão dos princípios biológicos que regem os efeitos do etanol foi realizado por JONES (1989), onde apresenta resultados deduzidos de estudos de mais de 60 tipos diferentes de células, desde bactérias, fermentos e fungos até células de animais e plantas. O efeito direto do etanol sobre o metabolismo parece ser mínimo, e os efeitos observados é mais um reflexo do metabolismo do etanol do que do mesmo propriamente dito. Na fermentação do etanol por leveduras, é sugerido que a habilidade de evitar a acumulação de acetaldeídos é um pré-requisito para o chamado tolerância ao etanol. Os efeitos devido ao etanol e relacionados à membrana também estão envolvidos. Esses efeitos são devidos às interações

polares, dielétricas e ligações de hidrogênio do etanol com as proteínas da membrana e com os grupos superficiais da membrana.

A inibição pelo etanol, seja pelo produzido na fermentação pela *Saccharomyces cerevisiae* ou quando adicionados externamente, apresenta um mecanismo complexo, havendo efeitos diferentes e independentes na taxa específica de crescimento da população de leveduras, viabilidade, e taxa específica de fermentação. Assim, diferentes constantes de inibição são derivadas para a ação de etanol em cada um destes parâmetros, sendo encontrados diferentes proposições de mecanismos que expliquem o efeito inibitório do etanol:

- desnaturação de enzimas glicolíticas;
- inibição de transporte de glicose, maltose, amônio, e aminoácidos;
- diminuição da temperatura ótima e máxima de crescimento e um aumento na temperatura mínima de crescimento;
- dano na membrana celular resultando na alteração da permeabilidade e organização da membrana;
- aceleração do retorno passivo de prótons e aumento da morte térmica;
- mutação de leveduras.

Papel da membrana plasmática- ácidos graxos e esteróis nas membranas são importantes para aumento da tolerância ao etanol e/ou produção em vários microorganismos. Estudos primeiramente com *E. coli* tem mostrado que inclusão de etanol no meio de crescimento resulta na mudança da composição da membrana. Há um aumento na proporção entre ácido graxo C<sub>18:1</sub> e com correspondente reduzido C<sub>16:1</sub>, e uma queda na quantidade de fosfatidiletanolamine resultando num aumento na proporção de fosfolipídios, e observou que o mesmo ocorre com crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* na presença de etanol. Esta mudança na composição da membrana afeta drasticamente a tolerância alcoólica em leveduras.

Efeito da pressão osmótica – Foi observado que com o aumento da pressão osmótica do meio, a viabilidade e a capacidade fermentativa diminui devido o acúmulo de altos níveis de etanol intracelular. Isto é comprovado em estudos e indica que alta pressão osmótica inibe a difusão de etanol produzido para o meio externo. E o etanol intracelular é tóxico para a levedura. Uma das maneiras de diminuir a pressão

osmótica do meio é alterar as condições de alimentação do substrato durante a fermentação.

Papel do acúmulo de etanol intracelular. – O etanol adicionado ao meio é menos tóxico que o etanol produzido pelas leveduras, e isto é confirmado por vários autores. A concentração de etanol dentro da célula pode ser maior que a de fora, pelo fato da taxa de produção ser maior que a taxa de excreção. Isto pode ocorrer em certos estágios da fermentação e sob condições especiais do meio, como a rápida fermentação, alta temperatura, alta pressão osmótica, etc. Aumento da temperatura e/ou aumento da pressão osmótica ambos têm sido correlacionados com o aumento do etanol intracelular e queda da tolerância alcoólica das células.

LOUREIRO & FERREIRA (1982), apresenta que a produção de etanol pela *Saccharomyces cerevisiae*, em fermentação por batelada, ou pela adição externa de etanol afetam de forma adversa a taxa de crescimento específico da população de leveduras, sua viabilidade, sua taxa de fermentação e a taxa específica de consumo de açúcar e aminoácidos. NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976), relataram que o etanol adicionado é menos tóxico para a *Saccharomyces cerevisiae* que o etanol produzido pela levedura, sendo esse efeito confirmado por vários autores como NOVAK *et alii* (1981). Estes autores verificaram que as taxas de morte celular foram menores na presença de etanol adicionado do que a medida em condições similares de concentração de etanol produzida endogenamente. Eles propuseram que, devido ao desbalanceamento entre a taxa de produção e o fluxo de etanol para fora da célula, poderia causar um acúmulo de etanol intracelular, que por sua vez explicaria o aparente aumento da potência inibidora da produção de etanol endógeno. Esta hipótese tem sido apoiada por diversos autores que verificaram que a concentração de etanol intracelular, em fermentações por bateladas, é muito maior que a concentração de etanol extracelular do meio. Este fenômeno é mais importante à altas temperaturas e esta observação sugere a limitação pela difusão de etanol pela parede celular. A permeabilidade do etanol extracelular para dentro da célula é muito pequeno. O efeito inibitório devido ao etanol intracelular ocorre no início e durante as primeiras etapas da fermentação, enquanto que no fim da fermentação o fenômeno é menos importante e desprezível. Por isso como a concentração de etanol intracelular é muito alta no início da fermentação, a sensibilidade para a concentração do etanol extracelular é baixa.

NAGODAWITHANA & STEINKRAUS (1976) postularam a hipótese de que o acúmulo intracelular muito rápido de etanol contribuiu para a alta taxa de morte a 30°C. A alta concentração intracelular é acompanhada pela inativação de álcool desidrogenase e pela perda da viabilidade.

A cinética de inibição pelo etanol do crescimento e fermentação em *Saccharomyces cerevisiae* e outras leveduras é composto e depende da contribuição de vários mecanismos de inibição. Entre estes, o efeito do etanol na membrana plasmática, incluindo o aumento exponencial de morte térmica e o fluxo passivo de prótons, inibição não competitiva do transporte de glicose, maltose, amônio, e aminoácidos. JIMÉNEZ & VAN UDEN (1985), fazendo uso da acidificação extracelular apresenta uma técnica pela qual a constante exponencial de difusão passiva de próton através da membrana plasmática de leveduras pode ser determinado, de uma maneira rápida e simples, e que pode constituir num método prático para uma avaliação preliminar da tolerância em leveduras.

A tolerância ao etanol das espécies *Saccharomyces* é conhecida como sendo controlada por um grande número de genes, e conseqüentemente, é difícil a obtenção de leveduras mutantes altamente tolerantes ao etanol. (BROWN & OLIVER, 1982). Os genes que limitam o crescimento são diferentes para diferentes concentrações de etanol, o que indica que a inibição da cinética de produção de etanol é resultado da inibição de diversas funções celulares com o aumento da concentração de etanol. Portanto a seleção de leveduras tolerantes ao etanol deve ser conduzido em uma larga faixa de concentração alcoólica. Esta consideração pode ser particularmente relevante na produção do etanol, onde o fermento necessita crescer e fermentar sob concentrações crescentes de etanol. Algumas linhagens tornam-se mais sensíveis após uma prolongada incubação no etanol, apesar da mudança substancial na composição de lipídios. Estas mudanças detectadas na composição da membrana pode ser devido a alteração na produção de enzimas pelo etanol, como tem sido observado em *Escherichia coli*. Alternativamente, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* poderiam alterar a permeabilidade da membrana ao etanol pela mudança de sua composição, mas esta mudança pode não resultar em um aumento da tolerância assim como do crescimento e fermentação, pois a cinética de inibição destes processos pelo etanol são diferentes.

JIMÉNEZ & BENÍTEZ (1988) apresenta que o crescimento e a fermentação são parâmetros parcialmente ligados, de forma que a taxa de fermentação cresce proporcionalmente ao aumento da taxa de crescimento. De acordo com esses resultados, o aumento em crescimento de leveduras tolerantes ao etanol provocam um aumento proporcional na taxa de produção de etanol. O fato da concentração de etanol inibir completamente a fermentação ser maior que a capacidade de inibir o crescimento, indica que as enzimas glicolíticas são mais tolerantes ao etanol que outras enzimas envolvidas no crescimento celular. Este resultado sugere que numa concentração extremamente alta de etanol, 16%, muitas funções celulares, incluindo as enzimas glicolíticas, podem ser afetadas com certa extensão para inibir o crescimento e a produção de etanol

No trabalho de LUONG (1985), dois modelos de cinética foram propostos para descrever a cinética padrão de inibição pelo etanol e taxa de crescimento específico e fermentação alcoólica:

Para o crescimento:

$$\frac{\mu_i}{\mu_0} = 1 - \left(\frac{P}{P_m}\right)^\alpha$$

Para a produção de etanol:

$$\frac{v_i}{v_0} = 1 - \left(\frac{P}{P_m}\right)^\beta$$

onde  $v_i$  é a taxa específica de produção de etanol, e  $v_0$  a taxa específica máxima de produção de etanol

ROSA & SÁ-CORREIA (1991) realizaram estudos de ativação *in vivo* de ATPase da membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*. A alteração estrutural da membrana plasmática se relaciona, entre outros, com a toxicidade alcoólica, e membrana plasmática ATPase poderia ser o alvo crítico. O fluxo de prótons através

da membrana foi observado ser sensível à taxa de concentração alcoólica, que reduz significativamente a taxa de fermentação. A dissipação do gradiente de prótons induzidos pelo etanol pode envolver a inibição da atividade da ATPase da membrana plasmática, e a estimulação do contrafluxo passivo de prótons devido ao aumento não específico da permeabilidade da membrana plasmática, ou da combinação de ambos.

LEÃO & VAN UDEN (1984) estudaram os efeitos dos álcoois sobre o fluxo passivo de prótons nas leveduras. Etanol, isopropanol, propanol e butanol aumentam o retorno passivo de prótons para dentro das células de *Saccharomyces cerevisiae*, esse fluxo segue a cinética de primeira ordem com a taxa constante que aumenta exponencialmente com a concentração do álcool.

NORTON & D'AMORE (1994) apresentam estudos com células imobilizadas, sendo que esta tecnologia é utilizada por poucas indústrias, principalmente na produção de vinagre, aminoácidos, e tratamento de águas. Problemas ligados às ampliações de escala dos processos fermentativos e a manufatura de gotas de gel inoculado, assim como a instabilidade mecânica causado pela quelação de íons de cálcio, foram os aparentes responsáveis pelo desinteresse dos pesquisadores por essa tecnologia. Alguns autores publicaram que as células imobilizadas aumentam a tolerância alcoólica, mas não há uma explicação clara deste fenômeno. Alguns relatam que não há diferença de tolerância ao etanol em células livres e imobilizadas. Outro importante efeito de tolerância alcoólica em células imobilizadas poderia estar ligado ao suprimento de oxigênio

#### **2.3.4– Composição do meio**

Segundo RAMOS & MADEIRA-LOPES (1990), a presença de ácido acético 1%(v/v) (normalmente formado durante a fermentação de D-glicose) diminui a tolerância ao etanol de 11% (v/v) para 0%, e simultaneamente limita a faixa de temperatura de crescimento de 3-42°C para 19-26°C.

MISHRA & PRASAD (1989) observaram que células enriquecidas com ácidos graxos poli-insaturados adquirem maior tolerância alcoólica que os comparados com os ácidos graxos mono insaturados. Os autores demonstraram que a *Saccharomyces cerevisiae* torna-se mais resistente a etanol com um aumento no nível de insaturação.

NABAIS *et alii* (1988) estudaram a influência de íon cálcio sobre a tolerância alcoólica na fermentação por leveduras. A adição de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{CaCl}_2$ ) em concentração ótima (0,75 a 2,0mM) num meio de fermentação com traços de contaminação de  $\text{Ca}^{2+}$  (0,025mM) conduz a uma rápida produção de altas concentrações de etanol por *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus*, e *Kluyveromyces marxianus*. O efeito positivo da suplementação de cálcio na fermentação alcoólica por *Saccharomyces bayanus*, foi explicado pelo aumento da tolerância ao etanol. Para concentrações letais de etanol, a taxa específica de morte foi mínima para células crescidas e incubadas em meio com etanol e com concentração ótima de íons cálcio, e máximo para células crescidas e incubadas em meio com etanol e sem o suplemento de cálcio. Esse efeito positivo é mais significativo em fermentações contínuas (células estão continuamente em contato com alta concentração de etanol) ou em batelada onde há produção de alta concentração de etanol. É possível que em fermentações com células imobilizadas envolvidas em alginato de cálcio sejam mais tolerantes ao etanol devido o efeito protetor exercido pelo cálcio em relação ao efeito tóxico do etanol.

Pré-incubação das células de *S. cerevisiae* com etanol 2M conduz a um decréscimo na taxa de L-alanina, fluxo de  $\text{H}^+$  e taxa de fermentação. Mas esta resposta foi modificada em leveduras com composição de fosfolipídios alteradas. Usando transporte de L-alanina e fluxo de prótons como indicador de tolerância alcoólica, foi observado que células enriquecidas com fosfatidilserina tiveram maior tolerância ao etanol. Isto resulta da mudança de fosfolipídios da membrana que altera a fluidez da membrana. (MISHRA & PRASAD, 1988) .

A tolerância alcoólica em leveduras termotolerantes, cultivados em meios com mistura de etanol e sacarose foi verificada por PERES & LALUCE (1998). O crescimento das células em presença de etanol mostrou mudanças na composição de lipídios da membrana plasmática das células e melhorando a tolerância a altos níveis de etanol externo. Trehalose é bem conhecido como protetor das células contra o estresse do meio e altos níveis de concentração intracelular deste açúcar foi observado quando a fermentação cessa.



## 2.4- Determinação da Tolerância ao Etanol

Em geral a tolerância ao etanol em leveduras tem sido examinadas através de três parâmetros: taxa de crescimento, taxa de fermentação e viabilidade celular.

Uma variedade de definições e métodos de medidas sob diferentes condições, tem sido proposto para tolerância alcoólica. Métodos usados para medida de etanol interno são contraditórios e as informações obtidas praticamente não esclarecem o entendimento do efeito tóxico. A interferência do etanol na estrutura da membrana celular e transporte, tem sido sugerida como causa primária para o efeito tóxico.

A ausência de uma metodologia padronizada e aceita universalmente, é uma das dificuldades fundamentais no estabelecimento da tolerância alcoólica em leveduras (D'AMORE & STEWART, 1987). Assim, a definição de tolerância ao etanol dependerá do parâmetro referido.

O método proposto por JIMÉNEZ & VAN UDEN (1985) é baseado no decaimento de pH. As leveduras mais tolerantes tem uma queda maior de pH que as menos tolerantes, pois o etanol provoca um retorno passivo de prótons para a célula e as mais resistentes são menos afetadas pelo etanol. Mas ainda não foram definidos limites para distinguir entre as mais e menos tolerantes, sendo portanto um método comparativo. Quando as células são suspensas em água contendo glicose, os prótons são liberados, provocando uma diminuição no pH extracelular; e o etanol provoca o retorno passivo desses prótons para a célula. LEÃO & VAN UDEN (1984) definem que o pH<sub>f</sub> (pH final) é determinado pelo balanço entre a saída e entrada de prótons.

ROSA & SÁ-CORREIA (1994) discutem as limitações para o uso da acidificação extracelular para a avaliação da atividade de H<sup>+</sup>-ATPase e na tolerância alcoólica em leveduras. Quando as células de leveduras crescem em concentrações pouco inibitórias, o bombeamento de prótons é estimulado, mas sem ser observado um aumento significativo da permeabilidade da membrana plasmática. Esta resposta da células pode apenas ser avaliada através do efeito de etanol na curva de acidificação quando as células crescem em presença de etanol. O etanol induz um aumento não específico na permeabilidade da membrana, aumentando a taxa de contrafluxo de prótons, inibindo a atividade do H<sup>+</sup>-ATPase da membrana plasmática. Ambos os

efeitos contribuem para a diminuição da taxa de acidificação extracelular, resultando no aumento do pH extracelular final.

Os resultados da curva de acidificação com células crescidas em etanol sugerem que uma boa correlação pode ser estabelecida entre a tolerância alcoólica e o efeito deletério de concentração para o máximo crescimento também na atividade de  $H^+$ -ATPase na membrana plasmática ou na estimulação da permeabilidade da membrana. Portanto parece ser possível usar a relação entre esta alta concentração de etanol e o pHf utilizando diferentes linhagens tolerantes ao etanol, como um critério para a estimativa de tolerância alcoólica em leveduras. Este método é similar ao proposto por JIMÉNEZ & VAN UDEN (1985), embora eles tenham considerado que a atividade de ATPase não é modificada pelo etanol e que o fluxo de  $H^+$  na ausência de etanol pode ser considerado o mesmo para todas linhagens de leveduras. De fato a atividade da ATPase na membrana plasmática depende da presença de etanol e atinge valores maiores ou menores que os valores observados em leveduras crescidas na ausência de etanol. Além disso, a atividade de  $H^+$ -ATPase depende da linhagem. A metodologia usada neste trabalho compara a tolerância de etanol em leveduras medindo o pH extracelular que pode ser realizado em várias concentrações de etanol com células que crescem em concentrações idênticas.

## **2.5– Comentários Gerais**

Como pode ser observado neste capítulo de revisão, há um grande interesse na literatura sobre a tolerância de leveduras ao etanol (k) e seus mecanismos bioquímicos. Verifica-se ainda que há grandes controvérsias sobre a metodologia de obtenção deste parâmetro, e que não foi feito um estudo sobre a influência da temperatura no mesmo.

Uma técnica bastante interessante é a proposta por JIMÉNEZ & VAN UDEN (1985) pois pode ser facilmente implantado em indústrias produtoras de etanol, como um parâmetro de controle de processo. No entanto, é muito interessante estudar a influência da temperatura no parâmetro K, verificando a sensibilidade do mesmo e seu comportamento, já que nos estudos propostos a temperatura foi mantida fixa em 25°C.

### 3- Materiais e Métodos

Foi realizado a determinação do parâmetro  $k$ , tolerância alcóolica, para duas marcas de fermento comercial, o Fleischmann e o Itaiquara, segundo o método de JIMENEZ & VAN UDEN (1985). Para cada fermento foram determinadas as curvas de decaimento de pH, de uma solução contendo microrganismos, glicose e soluções de etanol, conforme descrito no item 3.3. Neste trabalho os testes foram realizados para as temperaturas de 26 a 40°C com intervalos de 2 em 2°C, e para cada temperatura foram utilizadas as soluções de etanol de modo a obter concentrações finais de etanol no reator de 0, 2, 4, 6, 8 e 10%.

#### 3.1- Microrganismo

A maioria das leveduras pertencem a ordem *Saccharomycetales*, da classe dos Ascomycetes. Entre 350 espécies conhecidas de leveduras a mais comum, *Saccharomyces cerevisiae*, é a mais utilizada no processo de fermentação para produção de etanol e bebidas alcólicas. A levedura prensada *Saccharomyces cerevisiae* produzida pela Fleischmann e Itaiquara para utilização nas indústrias de panificação, ainda são as mais utilizadas também nas usinas de álcool como inóculo de partida de safra. Portanto foram escolhidas para o estudo do efeito da temperatura no parâmetro  $k$ .

#### 3.2- Metodologia para Determinação da Tolerância Alcoólica de Leveduras

JIMENEZ & VAN UDEN (1985) desenvolveram um teste rápido de tolerância alcóolica, baseado na acidificação extracelular, onde as leveduras mais tolerantes apresentam um maior abaixamento do pH extracelular que as leveduras menos tolerantes, uma vez que o etanol provoca o retorno passivo dos prótons para as células causando um aumento de pH extracelular.

A tolerância alcóolica das leveduras é expressa pelo parâmetro  $k$ , uma constante de difusão de prótons em função da concentração de etanol, como foi descrito por LEÃO & VAN UDEN (1984)

Na prática para determinar o valor de  $k$ , uma suspensão de levedura é colocada na presença de solução de glicose e de etanol nas concentrações finais de 0 a 10% e o pH foi medido durante 90 minutos nas temperaturas de 26 a 40°C para a obtenção das curvas de decaimento e ao final dos 90 minutos, quando o pH estabiliza é feita a leitura de pH final (pH<sub>f</sub>) da solução.

Quando as células são suspensas em solução contendo glicose, prótons são liberados e o pH extracelular cai segundo uma acidificação. O valor de pH final é balanceada pela expulsão ativa e pela entrada passiva de prótons.

O aumento da concentração de álcool provoca um aumento exponencial na constante de difusão segundo a equação (3.1).

$$C_x = C_0 e^{kx} \quad (3.1)$$

onde  $C_x$  e  $C_0$  são valores de constantes de difusão na concentrações  $X$  e 0 de etanol e o  $k$  é uma constante exponencial que expressa o aumento de entrada passiva de próton provocado pelo álcool.

Para interpretar os resultados dos valores de pH final, considerando que o etanol provoque um aumento na entrada passiva de prótons, o valor de pH<sub>f</sub> aumenta em sua presença, LEÃO & VAN UDEN (1984) propõem a seguinte equação (3.2) para a difusão de prótons:

$$k_p = C_0 e^{kx} [H^+]_f \quad (3.2)$$

onde  $k_p$  é a taxa de liberação ativa de próton,  $[H^+]_f$  a concentração de próton no pH final,  $C_0$  taxa constante de difusão de próton no pH final,  $X$  concentração de álcool e  $k$  é a constante de aumento de pH. Aplicando o logaritmo e rearranjando a equação (3.2), resulta na equação (3.3) que equivale a uma equação linear do tipo  $y=a+bx$  :

$$pH_f = \log_{10} C_0 - \log_{10} k_p + kX \log_{10} e \quad (3.3)$$

onde:

y = pH final da solução

x = concentração do etanol em molaridade  $X \log_{10} e$

a = coeficiente linear ( $\log_{10} C_0 - \log_{10} k_p$ )

b = coeficiente angular k ( $M^{-1}$ )

O valor do parâmetro k é determinado através da correlação linear entre pHf versus  $X \log_{10} e$ . Quanto maior o valor de k maior a sensibilidade da levedura ao etanol e portanto menor a tolerância alcóolica.

### 3.3- Obtenção da Curva de Decaimento de pH

O procedimento para a obtenção da cinética de decaimento de pH extracelular, a cada temperatura estudada foi realizado segundo JIMENEZ & VAN UDEN (1985) da seguinte forma:

- a) Preparava-se soluções de etanol 0; 2,4; 4,8; 7,2; 9,6; 12% (v/v) de modo que as concentrações finais no reator fosse de 0; 2; 4; 6; 8; 10%.
- b) Preparava-se solução de glicose 20% (p/p)
- c) Para cada curva da cinética de decaimento foi preparado uma nova suspensão de leveduras 30% (1,5g de levedura prensada + 3,5g de água destilada) para garantir a viabilidade inicial de 99-98%, pois a levedura em suspensão pode perder a viabilidade com o tempo e cada teste era uma corrida de 1,5hs.

A figura 3.1 mostra o reator encamisado de capacidade de 40ml acoplado a um banho de temperatura regulável, agitador magnético e um eletrodo para a leitura de pH.

Nesse reator encamisado as soluções foram adicionadas na seguinte ordem :

- 20ml de solução de etanol de 0 a 12%
- 2ml de solução de glicose 20%(p/p)
- 2ml de suspensão de levedura 30%(p/p) (Fleishmann e Itaiquara)..

A tomada de medida de pH é iniciada quando a suspensão de leveduras é adicionada

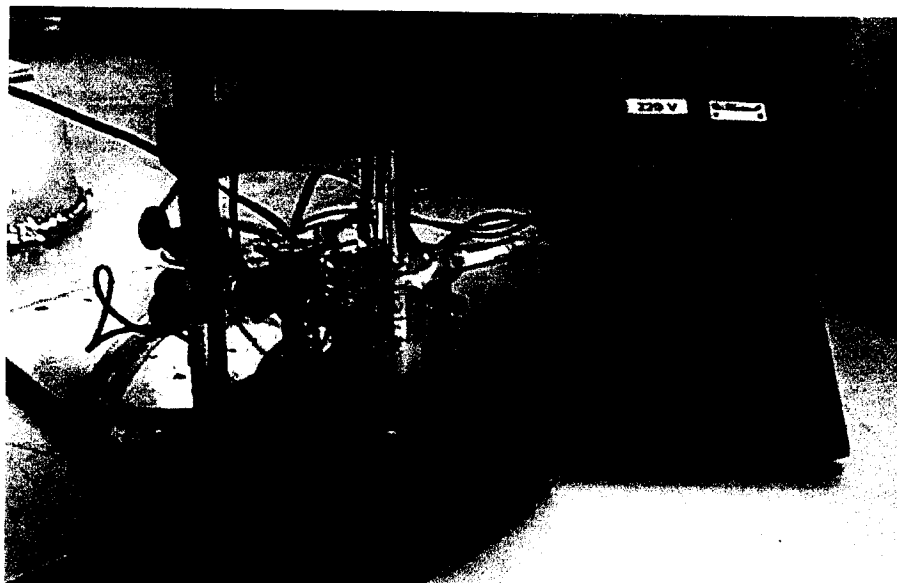


Figura 3.1 - Fotografia da montagem experimental utilizada no teste de tolerância alcóolica

As leituras de pH foram realizadas em intervalos diferentes como listados na tabela 3.1 por se tratar de um decaimento exponencial. Inicialmente o intervalo foi pequeno, a cada 30 segundos pois a queda de pH é muito rápida. No decorrer do tempo os intervalos se tornaram mais espaçados, quando a queda de pH fica mais lento após uns 20 minutos, e estabilizando num tempo aproximado de 90 minutos de teste.

Tabela 3.1 - tempo em que foram realizadas as leituras de pH durante o teste para a obtenção da curva de decaimento.

tempo de teste (min)	intervalo das medidas de pH
0-15	30seg
15-20	1min
20-60	5min
60-90	10min

Antes de se iniciar os experimentos para a determinação da tolerância alcóolica, foi realizado um teste para se verificar a necessidade ou não de lavar as células do fermento comercial prensada. Neste teste foram preparadas duas curvas de decaimento de pH, sendo o primeiro realizado com o fermento sem nenhum

tratamento, ou seja como encontrado comercialmente, e outro lavado com água destilada e centrifugada (duas vezes). Como resultado deste teste, obteve-se a variação do pH como função do tempo, como plotado na figura 3.2. Comparando-se essas curvas pode-se concluir que os resultados são idênticos, podendo a metodologia ser conduzida sem lavagem das células.

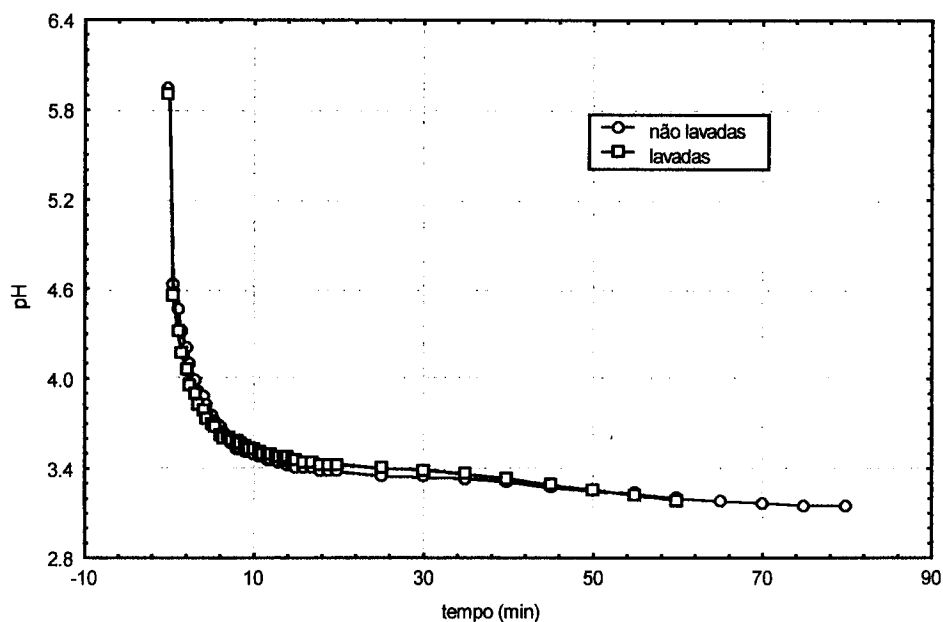


Figura 3.2- Curva de decaimento de pH realizado a 30°C e concentração de etanol de 4%

### 3.4- Viabilidade celular das leveduras

Na determinação de viabilidade celular das leveduras, foi utilizado o método de azul de metileno, como descrito por LEE *et alii* (1981). A determinação de viabilidade pelo método de azul de metileno para leveduras é internacionalmente aceito pela EBC (European Brewery Convention), é apenas um indicativo da viabilidade do que um valor absoluto, mas tem a vantagem de ser um método rápido. Alguns estudos comparativos foram realizados por vários autores comprovando a validade do método, como LEE *et alii* (1981), TREVORS *et alii* (1983) e SAMI *et alii* (1994).

Solução de azul de metileno foi preparado como:

- azul de metileno	0,125g
- NaCl	4,5g
- CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,24g
- NaHCO <sub>3</sub>	0,1g
- Glicose	5g
-q.s.q H <sub>2</sub> O destilada	500ml

A suspensão de células eram diluídas de modo que a contagem ficasse cerca de 150 células por quadrado. Misturava-se 0,1ml de amostra com 0,9ml de solução de azul de metileno. As células vivas não colorem e as mortas apresentam a coloração azul. A contagem de células foi feita transferindo a amostra para a Câmara de Neubauer, e utilizando o microscópio de campo claro e objetiva de 40x. O cálculo da viabilidade é feita através da seguinte equação.

$$IV(\%) = \frac{\text{no. de células incolores}}{\text{no. células incolores} + \text{no. de células coloridas}} \times 100$$

WANDERLEY (1997) comprovou em seus estudos de que a viabilidade inicial influencia drasticamente os resultados de tolerância alcóolica. Realizando testes de tolerância com viabilidade celular inicial de 98% e de 50%, e comparando os resultados chegou-se a conclusão de que o teste de tolerância só é valido para alta viabilidade inicial.



## 4- Resultados e Discussão

### 4.1- Curva da Cinética de Decaimento de pH para o Fermento Fleischmann

Seguindo o procedimento descrito na metodologia, os valores de pH foram medidos nos intervalos previamente estipulados e estão listados no Apêndice A1, cujo comportamento pode ser observado pelas curvas de decaimento de pH plotados nas figuras 4.1 a 4.8, para o fermento Fleischmann. Analisando-se essas curvas observa-se que a queda de pH é rápida e exponencial em função do tempo. Pode-se concluir também que os valores de pH<sub>f</sub> (pH final) são influenciados pela concentração de etanol, isto é, o valor de pH<sub>f</sub> é maior para as concentrações mais altas de etanol e este resultado é acentuado como aumento da temperatura.

O decaimento exponencial de pH observado nas figuras de 4.1 a 4.8 ocorre devido a expulsão extracelular de prótons H<sup>+</sup>, sendo que o etanol provoca um retorno passivo de H<sup>+</sup> para a célula, apresentando aumento de valores de pH<sub>f</sub> em função do aumento da concentração de etanol, esse comportamento é também observado nos estudos realizados por vários autores como ROSA & SÁ-CORREIA (1988), MISHRA & PRASSAD (1989), e LEÃO & VAN UDEN (1984).

Para o ajuste destas curvas, FURLAN & RODRIGUES (1996) propuseram uma equação (4.1) exponencial do tipo:

$$pH = pH_f + a \cdot \exp(b \cdot t) \quad (4.1)$$

onde: pH = pH em função do tempo; a, b = parâmetro da equação e t = tempo

A seguir estão apresentadas as equações e os coeficientes de correlação para as temperaturas estudadas. A equação de decaimento do pH proposta apresenta correlações muito boas. O parâmetro pH<sub>f</sub> aumenta com a concentração de etanol (como descrito no item 4.1.1) para a determinação do parâmetro k. O parâmetro de ajuste a não apresentam nenhuma tendência. No entanto, o parâmetro b apresenta uma diminuição com o aumento da concentração de etanol na solução de leveduras.

Temperatura: 26°C

Etanol%	Equações	r
0	$\text{pH}=3,509+2,127*\exp(-0,177*t)$	0,988
2	$\text{pH}=3,558+2,168*\exp(-0,176*t)$	0,996
4	$\text{pH}=3,635+2,527*\exp(-0,140*t)$	0,983
6	$\text{pH}=3,642+2,360*\exp(-0,124*t)$	0,998
8	$\text{pH}=3,684+2,364*\exp(-0,094*t)$	0,998
10	$\text{pH}=3,859+2,218*\exp(-0,075*t)$	0,995

Temperatura: 28°C

Etanol%	Equações	r
0	$\text{pH}=3,594+1,811*\exp(-0,333*t)$	0,967
2	$\text{pH}=3,605+2,149*\exp(-0,269*t)$	0,992
4	$\text{pH}=3,643+2,008*\exp(-0,240*t)$	0,975
6	$\text{pH}=3,641+1,754*\exp(-0,176*t)$	0,970
8	$\text{pH}=3,648+1,794*\exp(-0,125*t)$	0,986
10	$\text{pH}=3,684+1,577*\exp(-0,072*t)$	0,974

Temperatura: 30°C

Etanol%	Equações	r
0	$\text{pH}=3,479+1,906*\exp(-0,297*t)$	0,977
2	$\text{pH}=3,576+2,031*\exp(-0,437*t)$	0,930
4	$\text{pH}=3,535+2,128*\exp(-0,242*t)$	0,971
6	$\text{pH}=3,538+2,014*\exp(-0,194*t)$	0,980
8	$\text{pH}=3,539+1,662*\exp(-0,123*t)$	0,956
10	$\text{pH}=3,615+1,568*\exp(-0,080*t)$	0,960

Temperatura: 32°C

Etanol%	Equações	r
0	$\text{pH}=3,510+1,952*\exp(-0,324*t)$	0,985
2	$\text{pH}=3,555+1,944*\exp(-0,291*t)$	0,989
4	$\text{pH}=3,586+2,044*\exp(-0,229*t)$	0,996
6	$\text{pH}=3,666+2,247*\exp(-0,212*t)$	0,991
8	$\text{pH}=3,701+1,940*\exp(-0,129*t)$	0,992
10	$\text{pH}=3,862+1,989*\exp(-0,094*t)$	0,993

Temperatura: 34°C

Etanol%	Equações	r
0	$\text{pH}=3,498+2,093*\exp(-0,288*t)$	0,990
2	$\text{pH}=3,575+2,556*\exp(-0,319*t)$	0,990
4	$\text{pH}=3,605+2,177*\exp(-0,223*t)$	0,997
6	$\text{pH}=3,667+2,437*\exp(-0,191*t)$	0,994
8	$\text{pH}=3,753+2,225*\exp(-0,120*t)$	0,989
10	$\text{pH}=3,906+1,797*\exp(-0,079*t)$	0,993

Temperatura: 36°C

Etanol %	Equações	r
0	$\text{pH}=3,472+2,104*\exp(-0,271*t)$	0,989
2	$\text{pH}=3,530+2,274*\exp(-0,245*t)$	0,994
4	$\text{pH}=3,604+2,117*\exp(-0,189*t)$	0,997
6	$\text{pH}=3,654+2,020*\exp(-0,144*t)$	0,997
8	$\text{pH}=3,757+1,700*\exp(-0,094*t)$	0,995
10	$\text{pH}=4,205+1,943*\exp(-0,124*t)$	0,989

Temperatura:38°C

Etanol %	Equações	r
0	$\text{pH}=3,493+2,116*\exp(-0,262*t)$	0,990
2	$\text{pH}=3,570+2,248*\exp(-0,253*t)$	0,993
4	$\text{pH}=3,599+1,783*\exp(-0,148*t)$	0,888
6	$\text{pH}=3,815+2,109*\exp(-0,160*t)$	0,991
8	$\text{pH}=4,051+1,693*\exp(-0,124*t)$	0,991
10	$\text{pH}=4,296+1,476*\exp(-0,114*t)$	0,996

Temperatura: 40°C

Etanol %	Equações	r
0	$\text{pH}=3,506+1,957*\exp(-0,242*t)$	0,991
2	$\text{pH}=3,599+2,240*\exp(-0,236*t)$	0,994
4	$\text{pH}=3,712+2,025*\exp(-0,175*t)$	0,996
6	$\text{pH}=3,970+1,774*\exp(-0,160*t)$	0,991
8	$\text{pH}=4,225+1,534*\exp(-0,141*t)$	0,990
10	$\text{pH}=4,649+1,242*\exp(-0,171*t)$	0,999

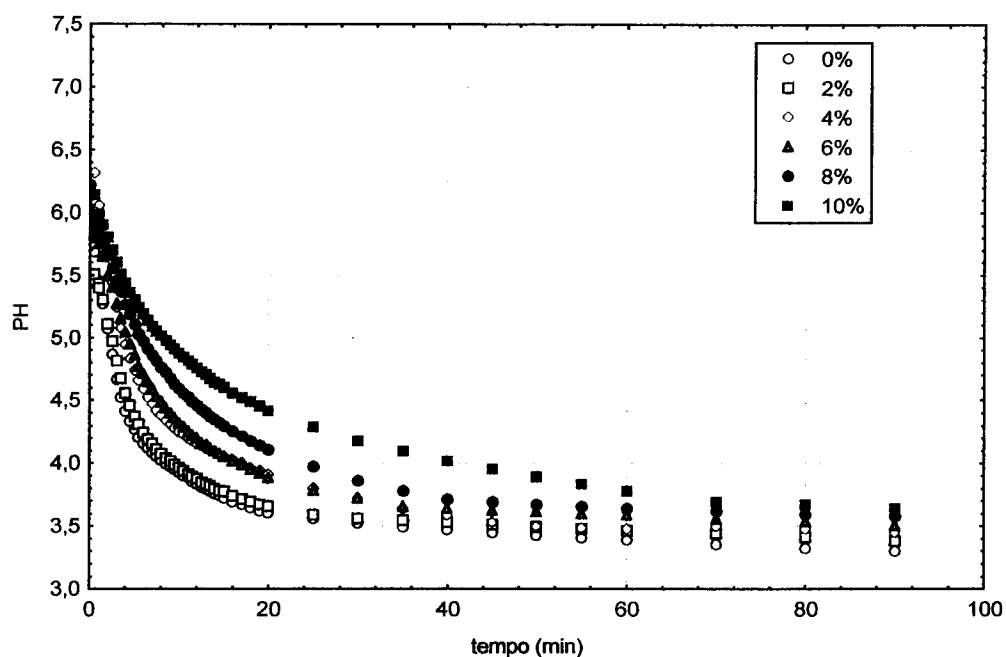


Figura 4.1 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 26<sup>o</sup>C para o fermento Fleischmann.

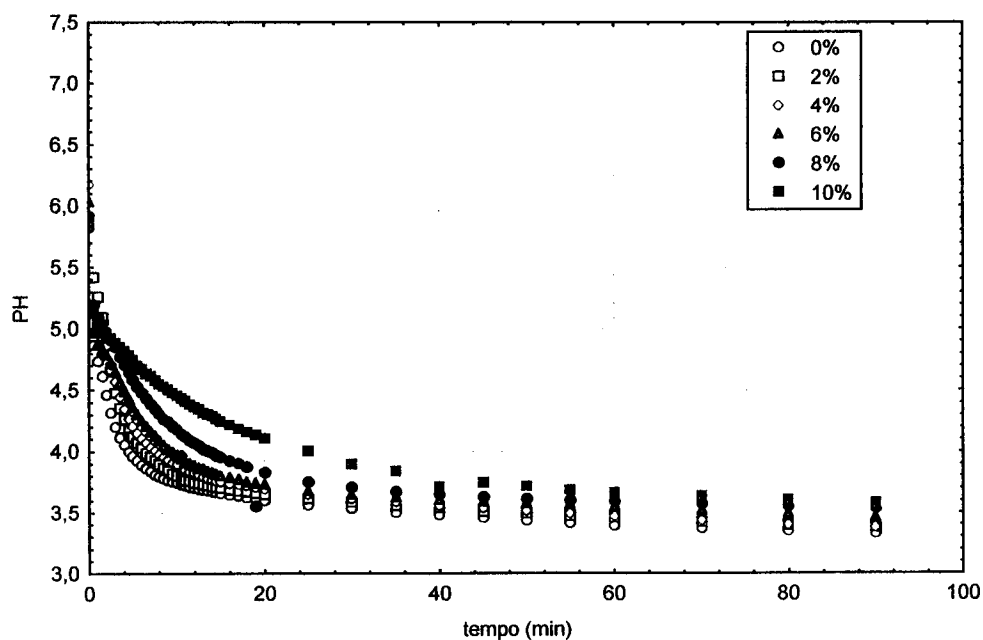


Figura 4.2 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 28<sup>o</sup>C para o fermento Fleischmann.

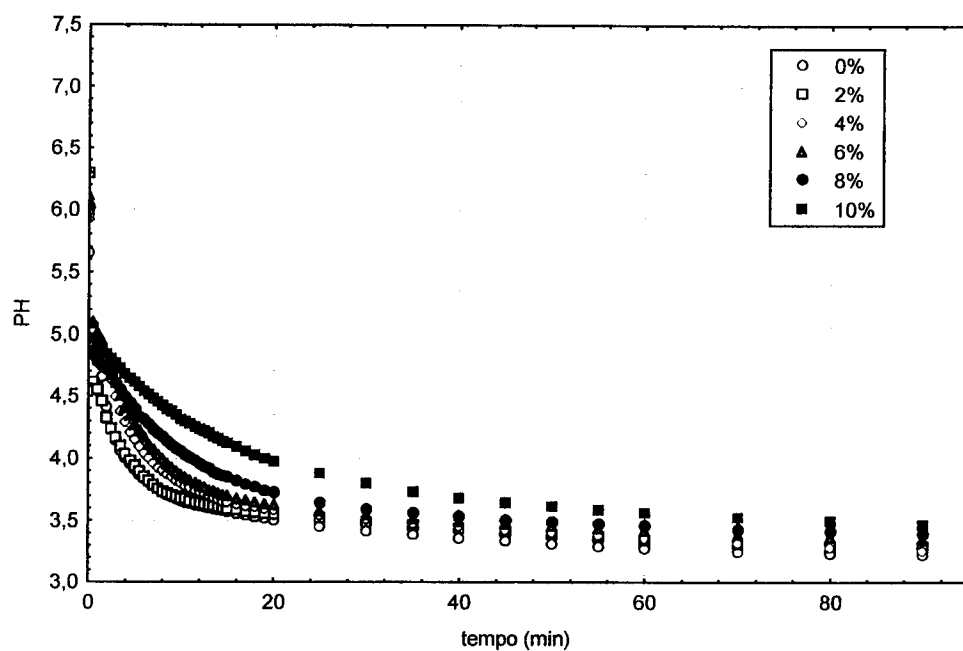


Figura 4.3 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 30°C para o fermento Fleishmann.

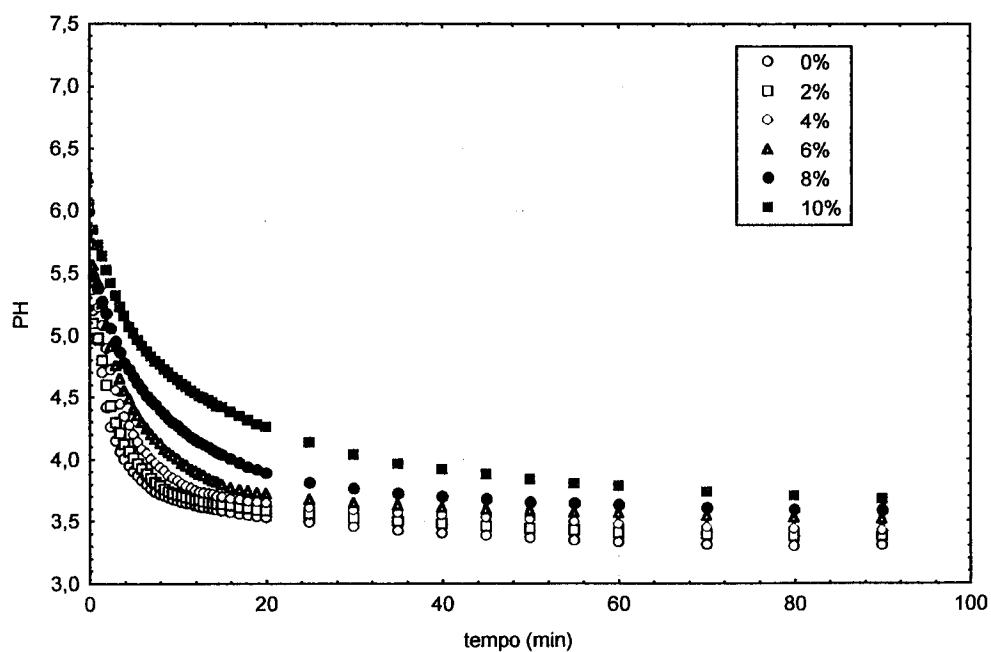


Figura 4.4 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 32°C para o fermento Fleishmann.

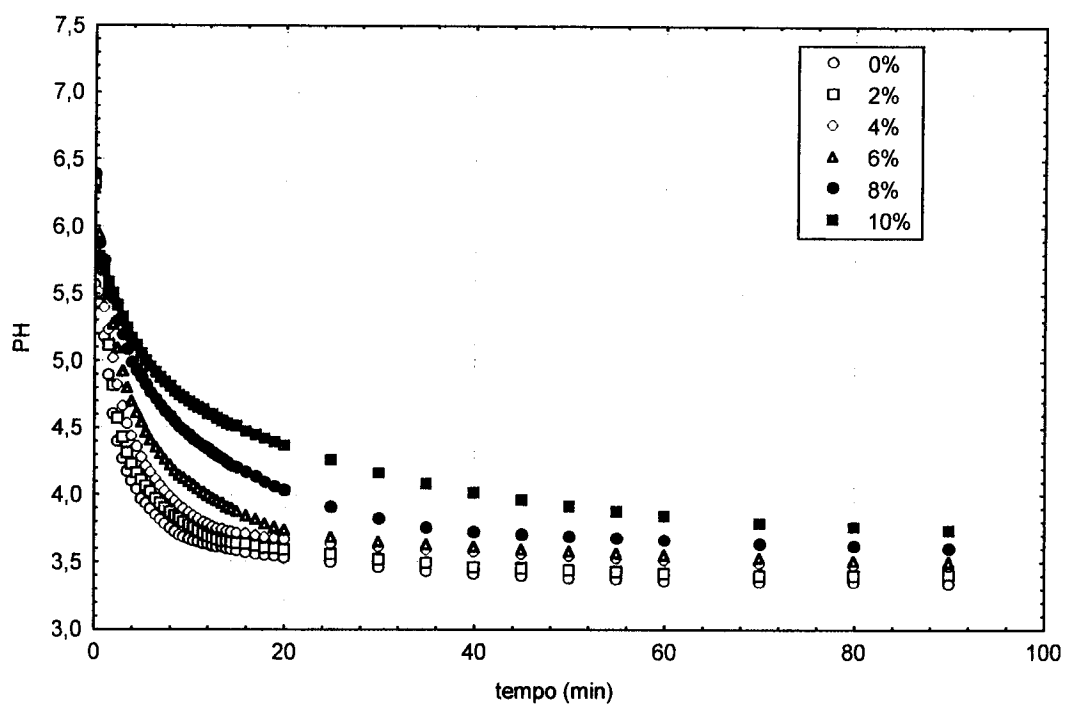


Figura 4.5 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 34°C para o fermento Fleischmann.

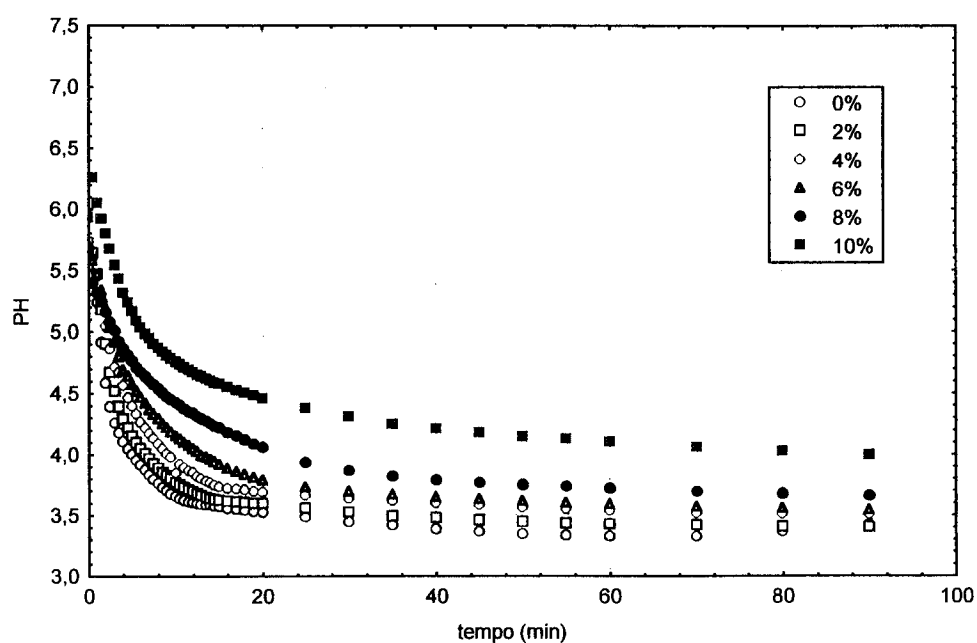


Figura 4.6 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 36°C para o fermento Fleischmann.

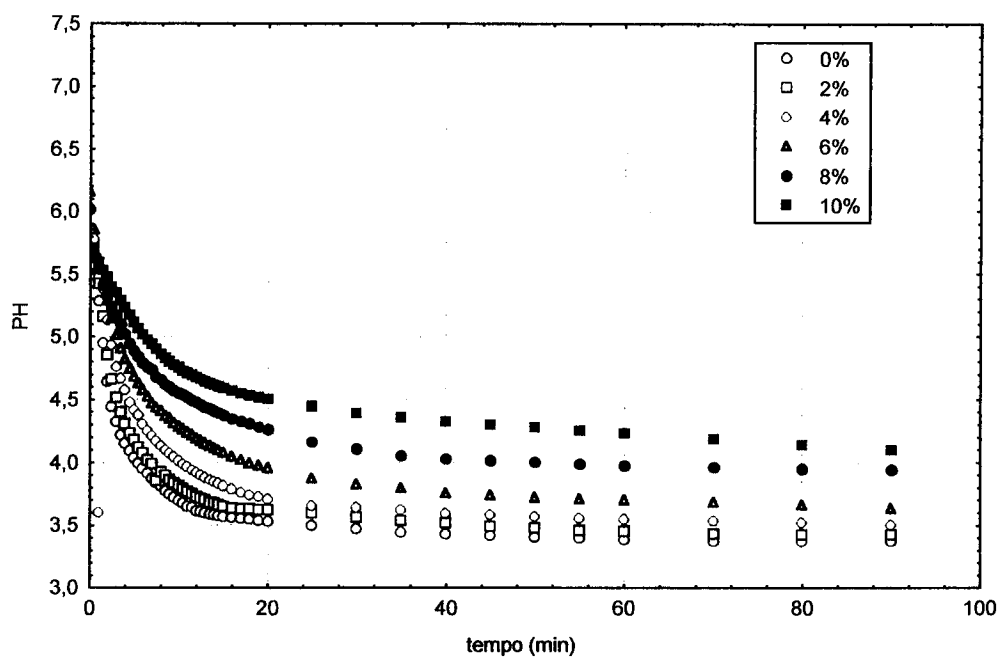


Figura 4.7 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 38°C para o fermento Fleischmann.

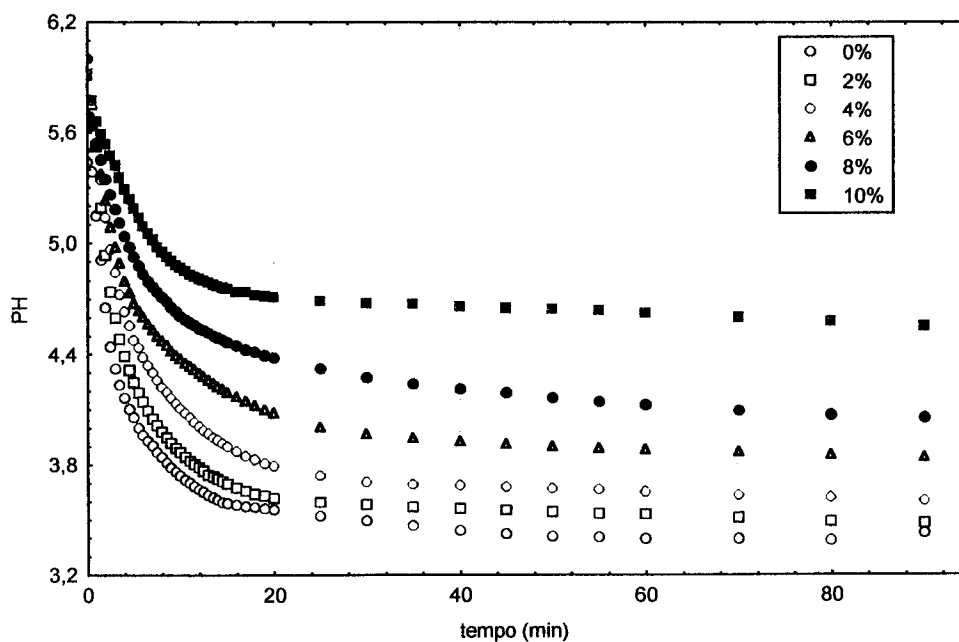


Figura 4.8 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 40°C para o fermento Fleischmann

#### 4.1.1- Determinação do Parâmetro k de Tolerância Alcoólica

Foi considerado como pH<sub>f</sub>, a leitura de pH tomado a 90 minutos de corrida pois como pode ser visto nas figuras de pH em função do tempo, as curvas se estabilizam praticamente após 60 minutos. Plotando os valores de pH<sub>f</sub> como função da concentração molar de etanol ( $X_{\log_{10}e}$ ) como mostra a figura 4.9, o parâmetro k é determinado pelo coeficiente angular da reta obtida por uma regressão linear dos pontos experimentais, conforme a equação (3.3) descrito na metodologia.

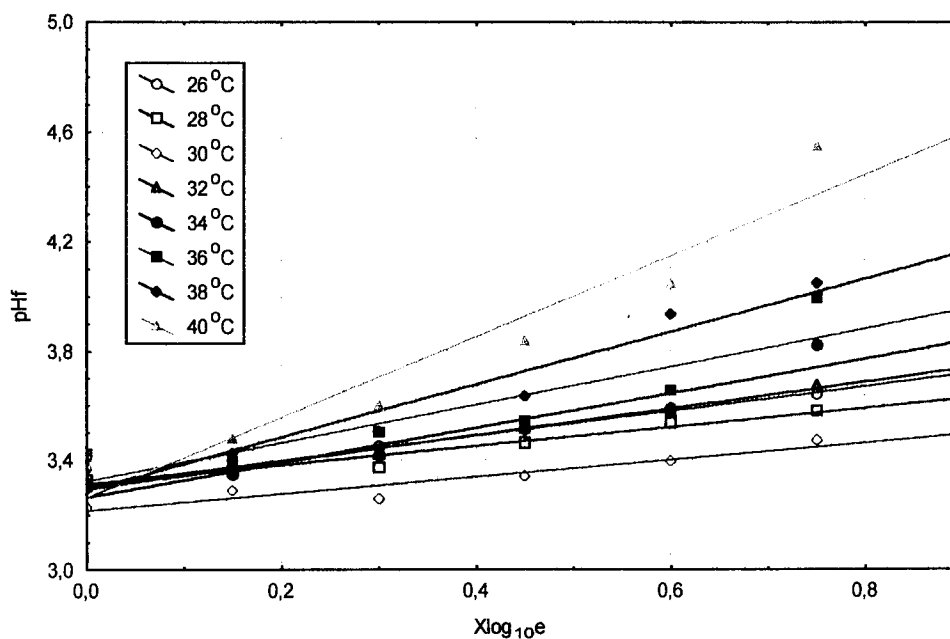


Figura 4.9- Curvas de pH<sub>f</sub> em função da concentração alcoólica, para as diferentes temperaturas de teste (Fermento Fleischmann).

Na tabela 4.1 estão listados os valores de k para cada temperatura e os respectivos valores de correlação linear. Os resultados obtidos mostram que o valor de k diminui até 30°C, aumentando acentuadamente com o aumento da temperatura de 32 a 40°C, mostrando a sensibilidade do parâmetro de tolerância com o aumento da temperatura. Verifica-se ainda que até 34°C a proposta de k em função da concentração de etanol como uma equação linear é bastante válida, no entanto acima deste valor os resultados experimentais fogem da linearidade.



Tabela 4.1- valores do parâmetro k e dos fatores de correlação linear para cada temperatura (fermento Fleischmann).

T (°C)	k (M <sup>-1</sup> )	r
26	0,453	0,999
28	0,347	0,974
30	0,310	0,948
32	0,489	0,995
34	0,635	0,956
36	0,700	0,889
38	0,968	0,967
40	1,480	0,958

#### 4.2- Curvas da Cinética de Decaimento de pH para o Fermento Itaiquara

Utilizando-se o fermento Itaiquara, foi realizado o mesmo procedimento experimental que para o fermento Fleischmann, cujos valores de pH em função do tempo para as várias concentrações de etanol estão listados nos apêndices B. As equações de ajuste estão listados a seguir, e o comportamento do decaimento de pH estão plotados nas figuras 4.10 a 4.17.

Temperatura: 26°C

Etanol %	equações	r
0	$\text{pH}=3,766+2,320*\exp(-0,178*t)$	0,948
2	$\text{pH}=3,902+2,351*\exp(-0,102*t)$	0,954
4	$\text{pH}=3,974+2,496*\exp(-0,183*t)$	0,949
6	$\text{pH}=4,072+2,487*\exp(-0,140*t)$	0,965
8	$\text{pH}=4,223+2,423*\exp(-0,117*t)$	0,973
10	$\text{pH}=4,208+2,223*\exp(-0,105*t)$	0,970

Temperatura: 28<sup>0</sup>C

Etanol %	equações	r
0	$\text{pH}=3,671+2,389*\exp(-0,125*t)$	0,947
2	$\text{pH}=3,828+2,637*\exp(-0,181*t)$	0,955
4	$\text{pH}=3,868+2,562*\exp(-0,170*t)$	0,962
6	$\text{pH}=3,928+2,317*\exp(-0,101*t)$	0,957
8	$\text{pH}=4,069+2,434*\exp(-0,132*t)$	0,967
10	$\text{pH}=4,219+2,412*\exp(-0,115*t)$	0,975

Temperatura: 30<sup>0</sup>C

Etanol %	equações	r
0	$\text{pH}=3,559+2,396*\exp(-0,106*t)$	0,949
2	$\text{pH}=3,773+2,611*\exp(-0,184*t)$	0,960
4	$\text{pH}=3,723+2,492*\exp(-0,101*t)$	0,956
6	$\text{pH}=3,826+2,511*\exp(-0,144*t)$	0,970
8	$\text{pH}=4,019+2,370*\exp(-0,119*t)$	0,969
10	$\text{pH}=4,121+2,205*\exp(-0,102*t)$	0,977

Temperatura: 32<sup>0</sup>C

Etanol %	equações	r
0	$\text{pH}=3,675+2,386*\exp(-0,220*t)$	0,950
2	$\text{pH}=3,680+2,404*\exp(-0,155*t)$	0,961
4	$\text{pH}=3,790+2,522*\exp(-0,193*t)$	0,965
6	$\text{pH}=3,825+2,554*\exp(-0,145*t)$	0,973
8	$\text{pH}=4,132+2,381*\exp(-0,123*t)$	0,970
10	$\text{pH}=4,223+2,335*\exp(-0,109*t)$	0,983

Temperatura: 34<sup>0</sup>C

Etanol %	equações	r
0	$\text{pH}=3,475+2,460*\exp(-0,106*t)$	0,964
2	$\text{pH}=3,675+2,635*\exp(-0,201*t)$	0,964
4	$\text{pH}=3,799+2,598*\exp(-0,177*t)$	0,966
6	$\text{pH}=3,853+2,637*\exp(-0,152*t)$	0,981
8	$\text{pH}=3,973+2,421*\exp(-0,125*t)$	0,988
10	$\text{pH}=4,281+2,406*\exp(-0,110*t)$	0,988

Temperatura: 36<sup>0</sup>C

Etanol %	equações	r
0	$\text{pH}=3,635+2,448*\exp(-0,214*t)$	0,962
2	$\text{pH}=3,713+2,600*\exp(-0,224*t)$	0,968
4	$\text{pH}=3,791+2,609*\exp(-0,198*t)$	0,970
6	$\text{pH}=4,043+2,678*\exp(-0,160*t)$	0,970
8	$\text{pH}=4,079+2,432*\exp(-0,141*t)$	0,986
10	$\text{pH}=4,378+2,345*\exp(-0,117*t)$	0,988

Temperatura:38<sup>0</sup>C

Etanol %	equações	r
0	$\text{pH}=3,615+2,313*\exp(-0,157*t)$	0,979
2	$\text{pH}=3,757+2,722*\exp(-0,233*t)$	0,975
4	$\text{pH}=3,887+2,570*\exp(-0,218*t)$	0,976
6	$\text{pH}=4,087+2,566*\exp(-0,175*t)$	0,984
8	$\text{pH}=4,297+2,568*\exp(-0,141*t)$	0,990
10	$\text{pH}=4,592+2,227*\exp(-0,150*t)$	0,988

Temperatura: 40<sup>0</sup>C

Etanol %	equações	r
0	$\text{pH}=3,710+1,998*\exp(-0,242*t)$	0,982
2	$\text{pH}=3,788+2,308*\exp(-0,203*t)$	0,981
4	$\text{pH}=4,021+2,422*\exp(-0,177*t)$	0,982
6	$\text{pH}=4,147+2,238*\exp(-0,155*t)$	0,989
8	$\text{pH}=4,520+2,167*\exp(-0,134*t)$	0,958
10	$\text{pH}=4,852+1,987*\exp(-0,152*t)$	0,987

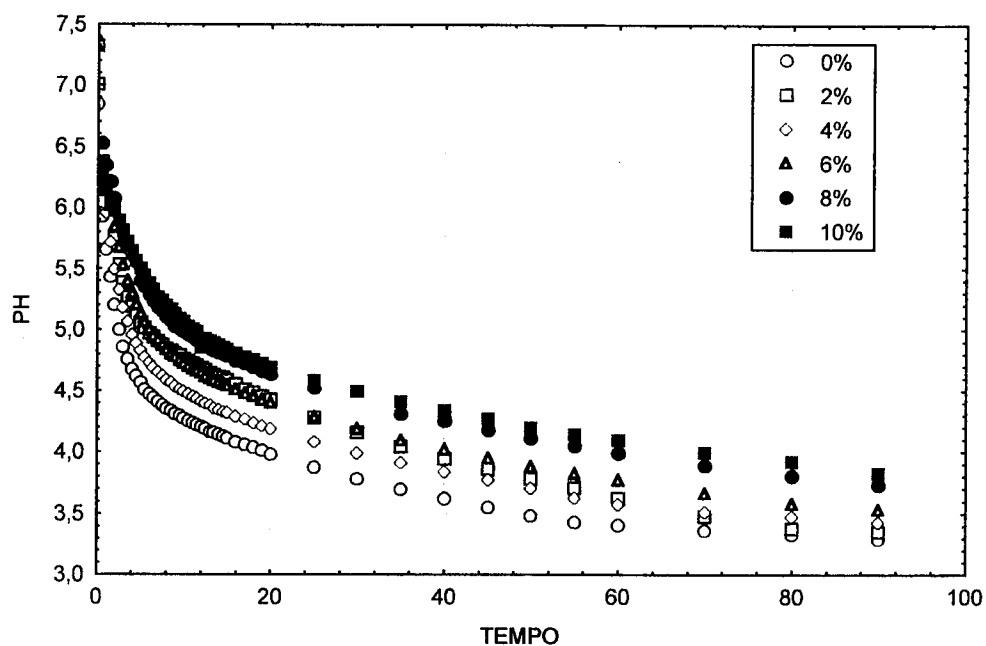


Figura 4.10 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 26°C para o fermento Itaiquara.

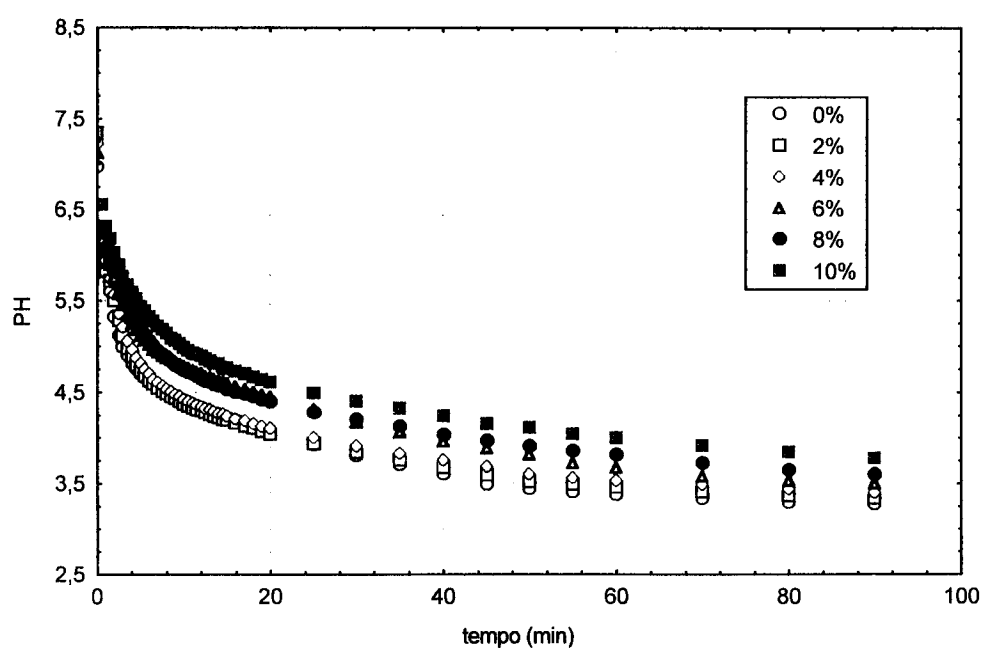


Figura 4.11 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 28°C para o fermento Itaiquara.

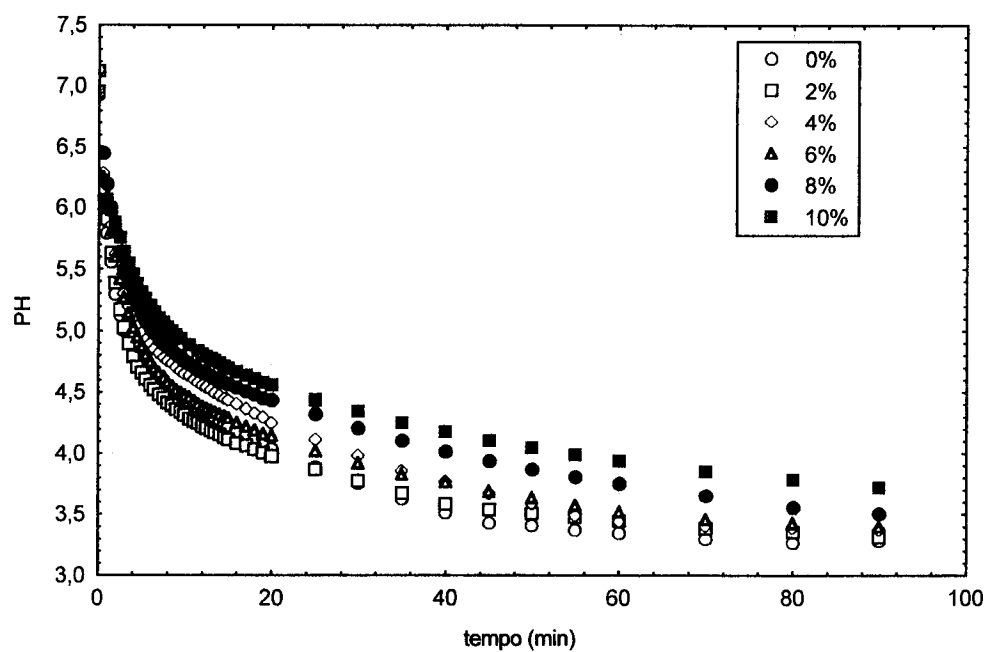


Figura 4.12 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 30°C para o fermento Itaiquara.

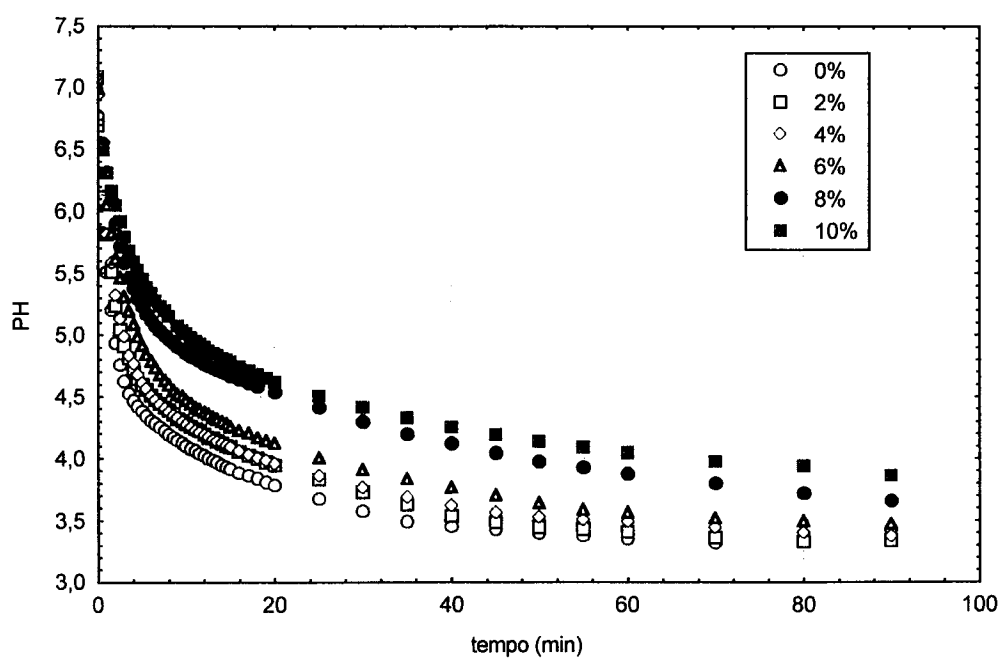


Figura 4.13 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 32°C para o fermento Itaiquara.

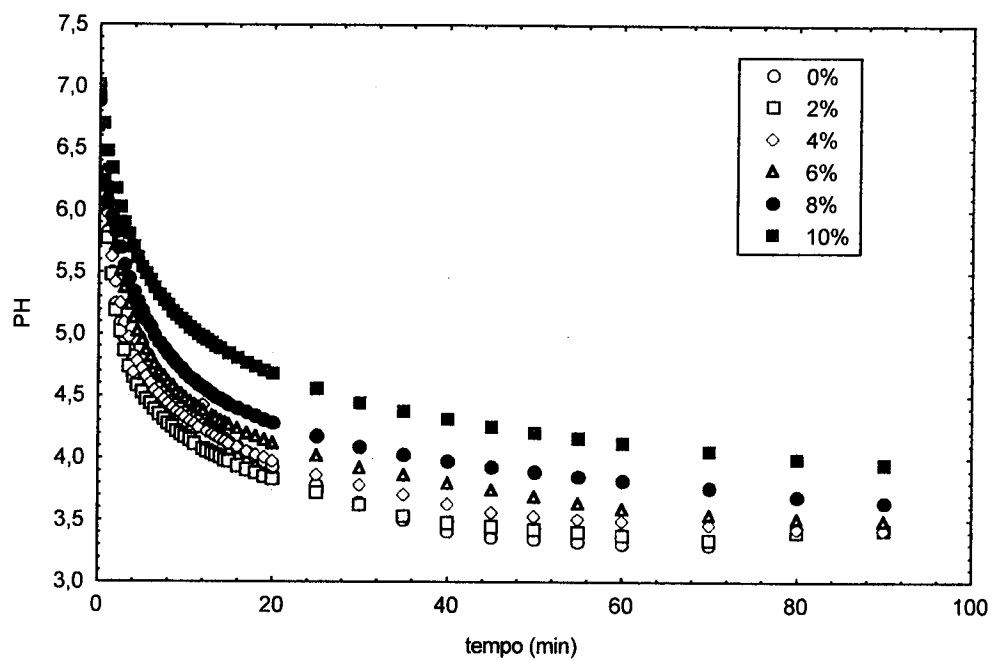


Figura 4.14 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 34°C para o fermento Itaiquara.

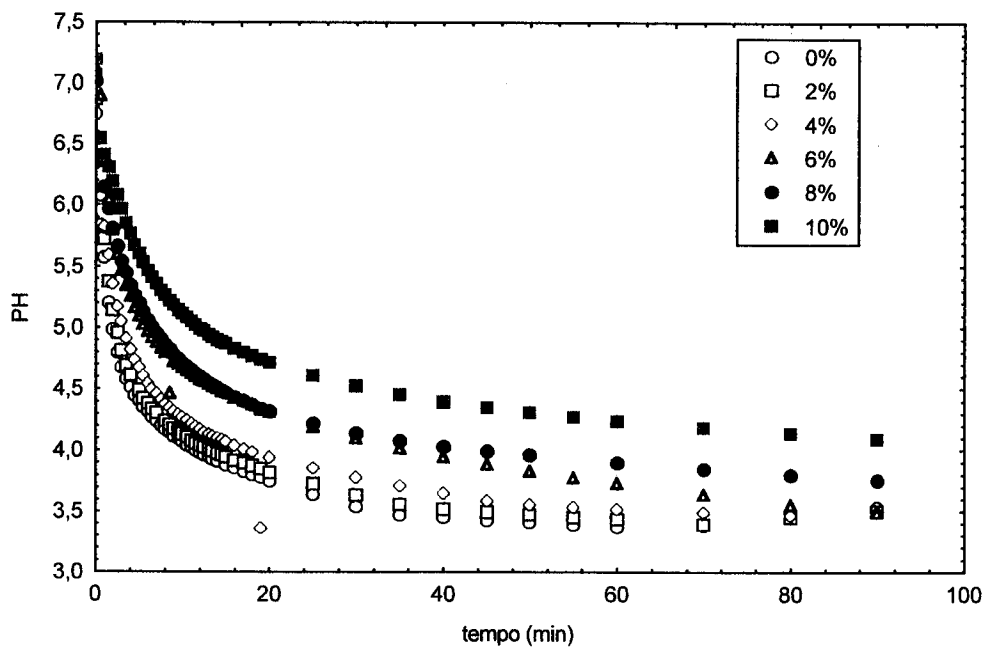


Figura 4.15 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 36°C para o fermento Itaiquara.

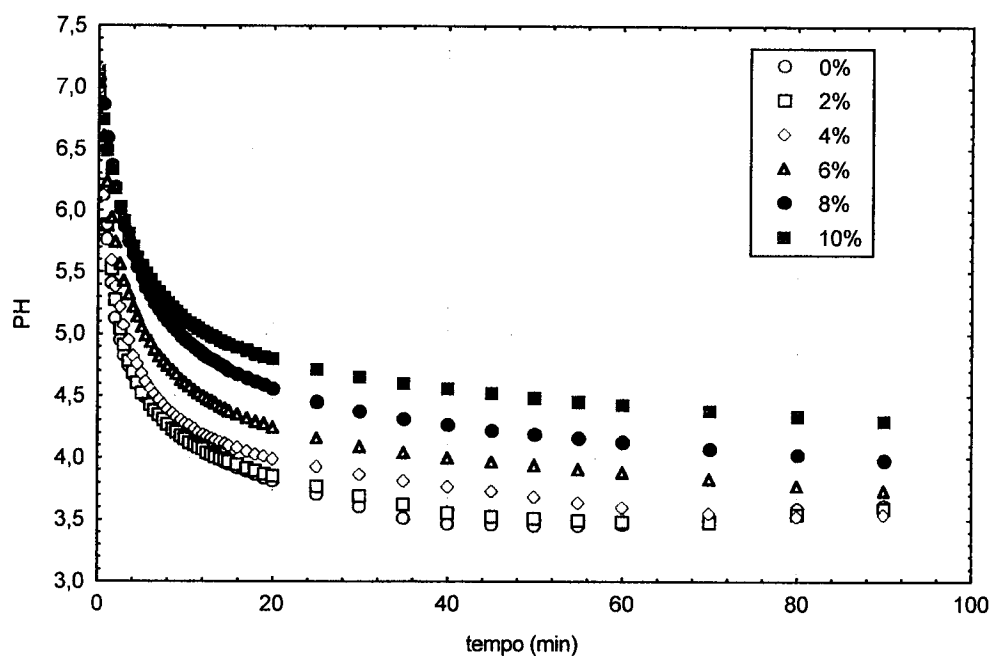


Figura 4.16 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 38°C para o fermento Itaiquara.

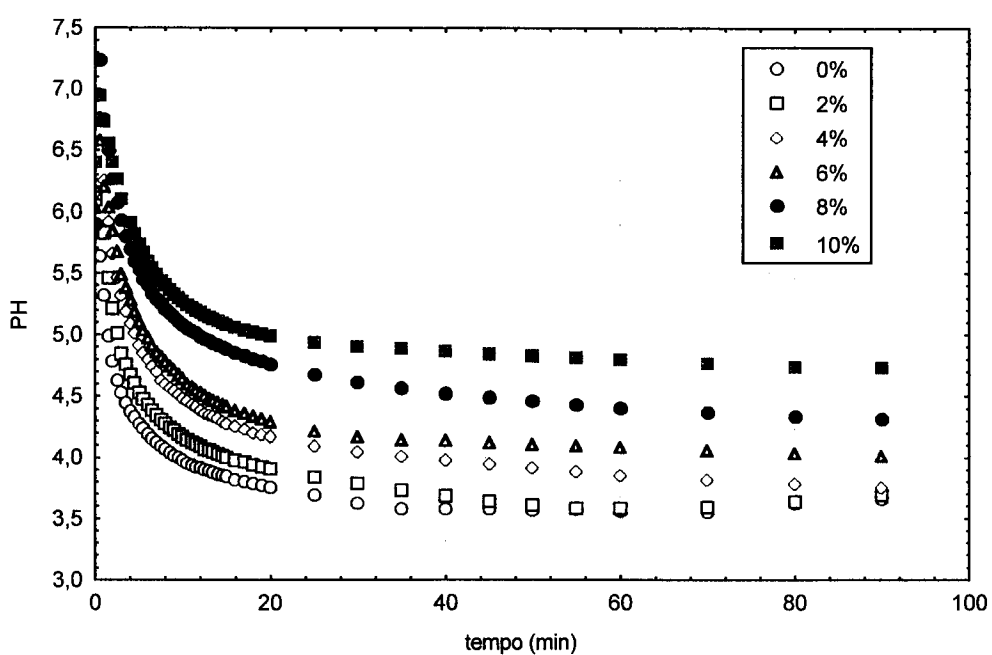


Figura 4.17 - pH extracelular em função do tempo e da concentração alcoólica (0 a 10%) na temperatura de 40°C para o fermento Itaiquara.

#### 4.2.1 - Determinação do Parâmetro k de Tolerância Alcólica para Fermento Itaiquara

Para cada temperatura, plotando-se os valores de pH<sub>f</sub> versus concentração de etanol, obtêm-se as relações apresentadas na figura 4.18.

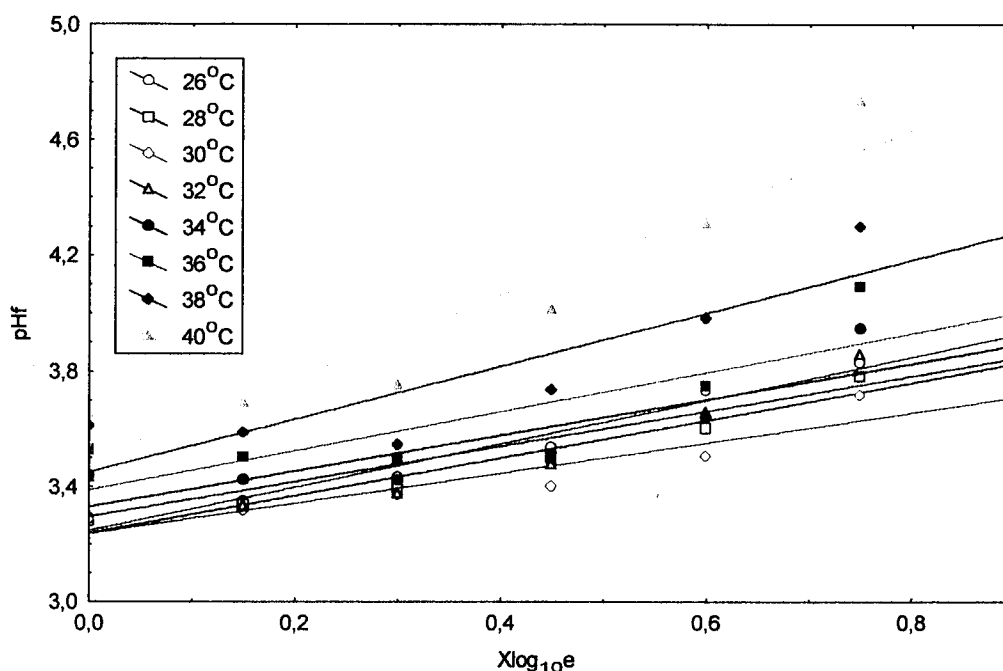


Figura 4.18 – curvas de pH<sub>f</sub> em função da concentração alcólica, para as diferentes temperaturas de teste (Fermento Itaiquara).

Realizando-se o mesmo procedimento, através da regressão linear foi determinado o coeficiente angular correspondente ao valor do parâmetro k, listado na tabela 4.2 a seguir. E pode-se observar que os valores de k diminuem com o aumento da temperatura de 26 para 30°C, aumentando acentuadamente com o aumento da temperatura de 32 até 40°C, o mesmo foi observado para o fermento Fleishmann. Verifica-se também que para as temperaturas acima de 30°C o comportamento foge da linearidade.



Tabela 4.2 - Valores do parâmetro  $k$  e dos fatores de correlação linear para cada temperatura, para o fermento Itaiquara.

T ( $^{\circ}\text{C}$ )	$k$ ( $\text{M}^{-1}$ )	$r$
26	0,755	0,983
28	0,655	0,978
30	0,526	0,928
32	0,612	0,860
34	0,623	0,847
36	0,680	0,791
38	0,918	0,876
40	1,432	0,943

#### 4.3 – Resultados comparativos para os dois fermentos utilizados

Os valores de  $k$ , determinados para os dois fermentos mostram uma forte dependência com a temperatura, como mostrados na figura 4.19 abaixo. Pelos resultados encontrados pode-se dizer que o fermento Itaiquara é menos tolerante para baixas temperaturas que o fermento Fleischmann, mas que para temperaturas acima de aproximadamente  $34^{\circ}\text{C}$  os dois fermentos apresentam a mesma tolerância.

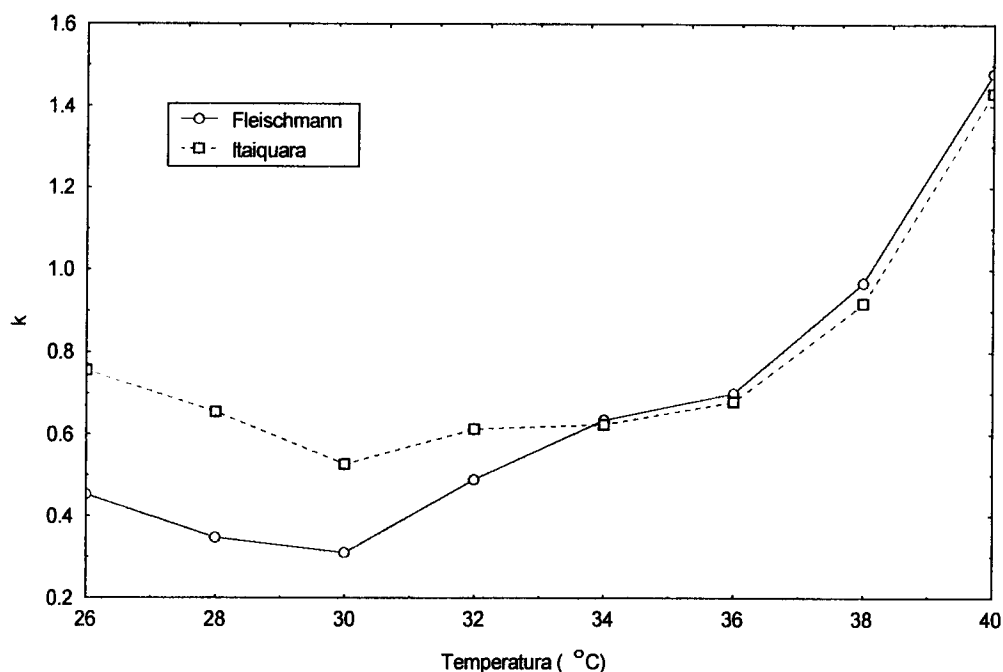


Figura 4.19 - Valores do parâmetro k em função da temperatura

Verifica-se então que a metodologia utilizada, a qual propõe a regressão linear da função  $pH_f$  versus concentração de etanol para a determinação de k, se ajusta com boa precisão para as temperaturas baixas de teste, mas para temperaturas mais altas os valores de  $pH_f$  deixam de ter um comportamento linear e passa a ser melhor representado por uma exponencial, indicando a influência da concentração de etanol e da temperatura para a determinação do parâmetro k. NABAIS *et alii* (1988), realizando testes de abaixamento de pH a temperaturas de 30°C, comentam que em condições experimentais de até 10% de etanol a relação de  $pH_f$  em função da concentração de etanol é linear, e WANDERLEY (1997) comprovou esta relação realizando os testes a 32°C. Mas para temperaturas mais elevadas, a faixa de concentração de etanol deve ser menor que 10% para manter a linearidade.

Neste trabalho, no caso do fermento Fleischmann, a função  $pH_f = f(X \log_{10} e)$  para as temperaturas de 26-34°C pode ser considerado linear, com o coeficiente de correlação maior ou igual a 0,95. Para o fermento Itaiquara a função deixa de ser linear já para temperaturas acima de 30°C como pode ser visto nas tabelas 4.1 e 4.2.

#### 4.4 – Estudo sobre o comportamento exponencial de pHf em função da concentração de etanol para altas temperaturas.

Para temperaturas acima de 36<sup>0</sup>C no caso do fermento Fleischmann e temperaturas acima de 30<sup>0</sup>C no caso do fermento Itaiquara, a função  $\text{pHf} = f(X \log_{10} e)$  passa a ter um comportamento exponencial do tipo  $y = a + b \cdot \exp(c \cdot x)$ , cujo ajuste por essa função apresenta correlação de aproximadamente 0,99. Na tabela 4.3 estão listados as equações representativas das curvas exponenciais para cada temperatura e os coeficientes de correlação, para o Fleischmann.

Tabela 4.3 - Equações exponenciais ajustadas para temperaturas de 36 a 40<sup>0</sup>C para o fermento Fleischmann.

T (°C)	equação	r
36	$\text{pHf} = 3,289 + 0,039 \cdot \exp(3,949 \cdot X \log_{10} e)$	0,995
38	$\text{pHf} = 3,339 + 0,013 \cdot \exp(5,888 \cdot X \log_{10} e)$	0,997
40	$\text{pHf} = 3,234 + 0,056 \cdot \exp(4,578 \cdot X \log_{10} e)$	0,999

E a figura 4.20 mostra o ajuste exponencial com os pontos experimentais para o fermento Fleischmann nas temperaturas de 36-40<sup>0</sup>C.

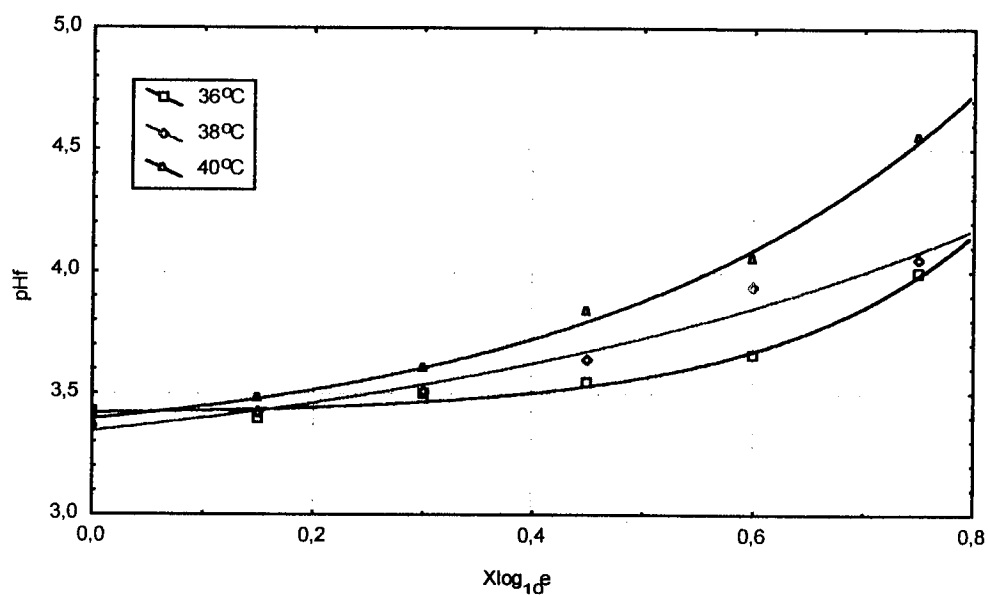


Figura 4.20 – Ajuste exponencial para a função pHf versus  $X\log_{10}e$  para as temperaturas de 36 a 40°C (fermento Fleischmann).

Os ajustes para o caso do fermento Itaiquara estão listados na Tabela 4.4, com os respectivos fatores de correlação exponencial, para as temperaturas entre 30 a 40°C.

Tabela 4.4 - equações exponenciais para temperaturas de 30 a 40°C para o fermento Itaiquara.

T (°C)	equação	r
30	$pHf=3,277+0,020*\exp(4,018*X\log_{10}e)$	0,996
32	$pHf=3,340+0,019*\exp(4,442*X\log_{10}e)$	0,973
34	$pHf=3,414+0,006*\exp(6,051*X\log_{10}e)$	0,997
36	$pHf=3,487+0,003*\exp(7,148*X\log_{10}e)$	0,985
38	$pHf=3,533+0,027*\exp(4,488*X\log_{10}e)$	0,984
40	$pHf=3,507+0,121*\exp(3,109*X\log_{10}e)$	0,997

Na figura 4.21, as curvas exponenciais estão ajustados aos pontos experimentais obtidos com o fermento Itaiquara para as temperaturas de 30 a 40°C.

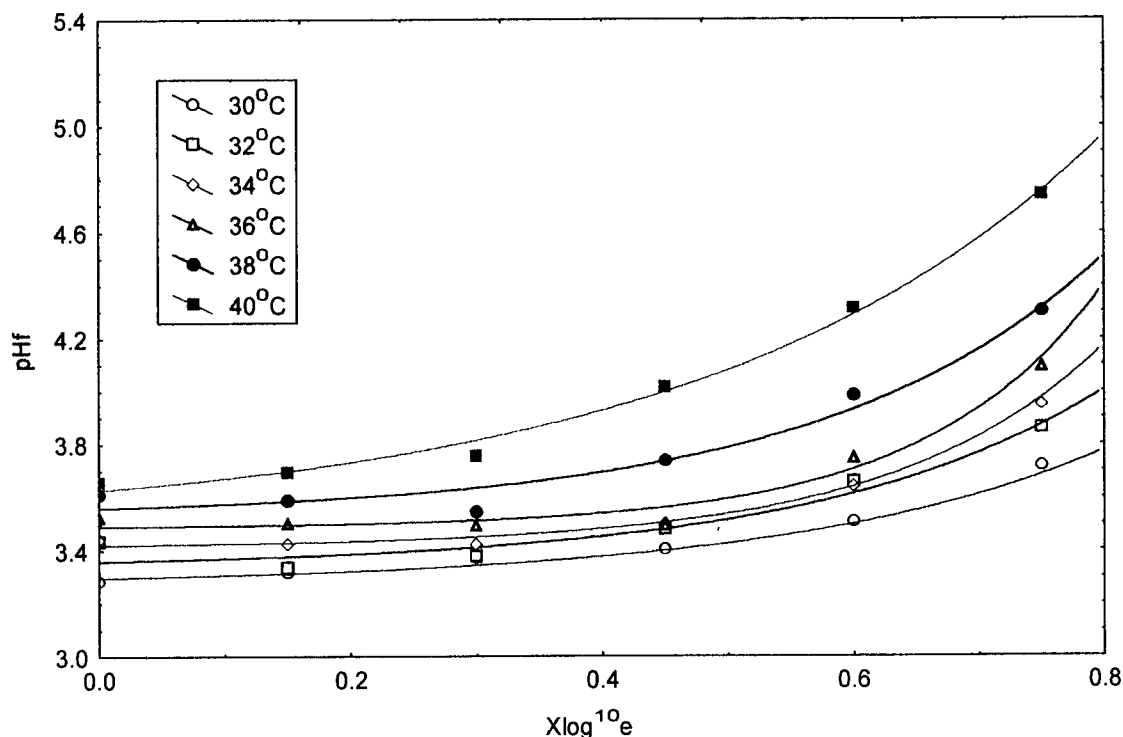


Figura 4.21 – Ajuste exponencial para a função pHf versus  $X\log_{10}e$  para as temperaturas de 30 a 40°C (fermento Itaiquara).

Ao considerar uma relação exponencial para pHf em função da concentração alcóolica, a determinação do parâmetro k passa a ser pontual, isto é para cada concentração de etanol deve-se calcular o valor de k.

Com intuito de visualizar esta relação exponencial, foi realizado um cálculo a partir da equação (3.1) proposta para a determinação de k pela regressão linear, e determinou-se um valor de k para cada concentração de etanol para uma determinada temperatura.

Partindo da equação (3.3):

$$pHf = \log_{10}C_0 - \log_{10}k_p + kX\log_{10}e \quad (3.3)$$

concentração. Quando a concentração de etanol é 0%, o valor de X (concentração de etanol) é 0 e substituindo na equação (3.1), é possível determinar o valor da constante  $(\log_{10}C_0 - \log_{10}k_p) = \log_{10}C_0/k_p$ , pois quando  $X=0 \rightarrow \text{pHf} = \log_{10}C_0 - \log_{10}k_p$  e o valor de pHf é obtido experimentalmente como mostra a equação (4.1), e quando a concentração é diferente de 0% o valor de k pode ser calculado conforme a equação (4.2):

$$X=0 \Rightarrow \text{pHf} = \log_{10}C_0 - \log_{10}k_p \Rightarrow \log_{10}C_0/k_p = \text{pHf} \quad (4.1)$$

$$X \neq 0 \Rightarrow \text{pHf} = \log_{10}C_0/k_p + kX\log_{10}e \Rightarrow k = (\text{pHf} - \log_{10}C_0/k_p)/X\log_{10}e \quad (4.2)$$

Exemplo de cálculo de k para  $T=26^\circ\text{C}$  e os valores de pHf do fermento Fleischmann obtidos experimentalmente.

$$X=0 \quad \text{pHf} = \log_{10}C_0/k_p = 3,300$$

$$X=2\% \quad k = (3,384 - 3,300)/0,15 = 0,56$$

$$X=4\% \quad k = (3,448 - 3,300)/0,3 = 0,49$$

Na tabela 4.5 abaixo estão listados os valores de concentração de etanol, pHf obtidos experimentalmente e os valores de k calculados pela equação 4.2, para cada concentração de etanol de 0 a 10% e temperatura de  $26^\circ\text{C}$ .

Tabela 4.5 - Cálculo de k e os valores de pHf para  $T=26^\circ\text{C}$

X(%)	0	2	4	6	8	10
$X\log_{10}e(\text{M}^{-1})$	0	0,15	0,3	0,45	0,6	0,75
pHf	3,300	3,384	3,448	3,512	3,584	3,643
k	-	0,56	0,49	0,47	0,47	0,46

Determinando todos os valores de k para cada concentração de etanol e para diferentes temperaturas, foi possível construir um gráfico onde pode ser visualizado o efeito da temperatura e da concentração de etanol no parâmetro k. Na tabela 4.6 estão listados os valores de k para o fermento Fleischmann e na tabela 4.7 os valores para o fermento Itaiquara.

Tabela 4.6 - Valores do parâmetro k para o fermento Fleischmann.

Xlog <sub>10</sub> e	26°C	28°C	30°C	32°C	34°C	36°C	38°C	40°C
0								
0,15	0,56	0,32	0,42	0,48	0,41	0,47	0,38	0,62
0,30	0,49	0,15	0,10	0,39	0,10	0,59	0,46	0,71
0,45	0,47	0,29	0,25	0,47	0,35	0,48	0,56	1,00
0,60	0,47	0,34	0,28	0,46	0,44	0,55	0,95	1,11
0,75	0,46	0,34	0,33	0,50	0,53	0,89	0,97	1,55

Tabela 4.7 - Valores do parâmetro k do fermento Itaiquara.

Xlog <sub>10</sub> e	26°C	28°C	30°C	32°C	34°C	36°C	38°C	40°C
0								
0,15	0,40	0,32	0,41	0,51	0,31	0,56	0,42	0,49
0,30	0,38	0,45	0,45	0,45	0,48	0,23	0,49	0,76
0,45	0,33	0,41	0,46	0,47	0,53	0,43	0,50	0,89
0,60	0,38	0,41	0,52	0,52	0,71	0,68	0,74	1,40
0,75	0,37	0,46	0,58	0,70	0,88	0,96	1,49	2,29

Graficando os valores do parâmetro k em função de temperatura e Xlog<sub>10</sub>e (figuras 4.22 e 4.23) pode se observar que o parâmetro é muito sensível ao aumento da temperatura e simultaneamente a altas concentrações de etanol. Para temperaturas abaixo de 32°C e baixa concentração de etanol o valor de k é praticamente estável.

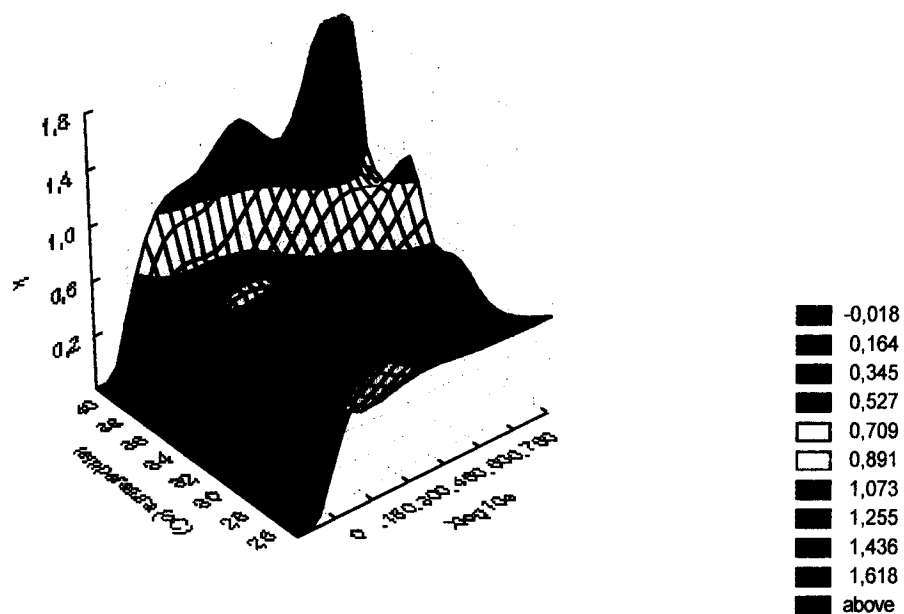


Figura 4.22 - Parâmetro  $k$  em função da temperatura e concentração de etanol (Fleischmann)

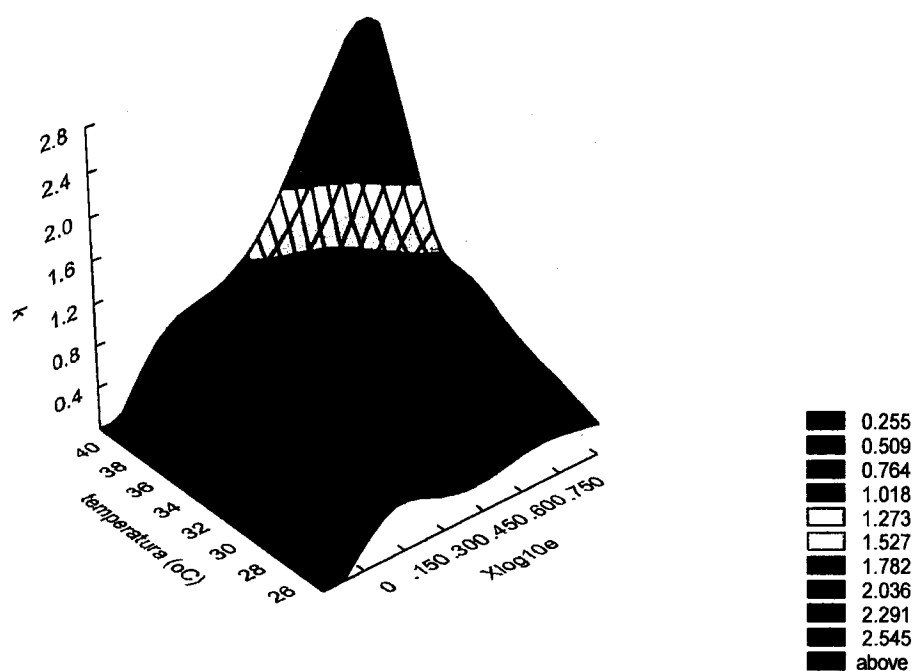


Figura 4.23 - Parâmetro  $k$  em função da temperatura e concentração de etanol (Itaiquara)



#### 4.5- Viabilidade Celular

A viabilidade celular da suspensão de leveduras antes de iniciar a cinética do decaimento de pH, e no final aos 90 minutos de corrida, foram determinados pelo método de azul de metileno. A viabilidade da suspensão de leveduras 30% estava sempre ao redor de 99-98%, ideal para a realização do teste. WANDERLEY (1997), em seus estudos verificou que quando a viabilidade inicial fica ao redor de 80%, os valores de k quase não variam com o aumento da temperatura de fermentação. Quando os valores de k foram obtidos, tendo a viabilidade inicial de 98%, aumentaram com o aumento de temperatura. A viabilidade no final da corrida variou em função da temperatura e de concentração de etanol, cujos resultados estão listados nas tabelas 4.8 e 4.9.

Tabela 4.8- Viabilidade celular (%) no final de cada curva de decaimento de pH (fermento Fleischmann).

	concentração de etanol (%)					
T (°C)	0	2	4	6	8	10
26	97	95	96	96	98	98
28	94	95	95	96	95	96
30	94	93	94	95	95	95
32	92	92	93	93	95	97
34	92	91	92	92	92	94
36	89	90	90	91	89	98
38	86	89	89	88	94	97
40	84	86	83	88	96	98

Analisando os resultados de viabilidade celular, observa-se uma queda de células viáveis com o aumento de temperatura, nas concentrações de etanol inferiores a 6%. No entanto, para concentrações maiores a viabilidade permanece bastante alta. PERES & LALUCE (1998) relatam que este efeito pode ser explicado pelo fato do etanol extracelular ser menos tóxico que o etanol intracelular, uma vez que a alta concentração de etanol

extracelular (8%), parece proteger a célula do efeito danoso do etanol interno, que é produzido mais rapidamente pelas células a baixas concentrações de etanol externo PERES & LALUCE (1998), e comenta ainda que a atividade de fermentação com a adição de alta concentração de etanol externo.

Tabela 4.9 - Viabilidade celular (%) no final de cada curva de decaimento de pH (fermento Itaiquara).

T (°C)	concentração de etanol (%)					
	0	2	4	6	8	10
26	98	98	98	98	99	98
28	97	98	97	98	98	98
30	96	97	97	96	98	97
32	90	93	93	95	96	96
34	92	92	90	94	94	96
36	87	92	91	95	91	94
38	84	85	87	91	90	97
40	82	82	89	80	91	94

## 5- CONCLUSÃO

Com o aumento da temperatura, o valor do parâmetro  $k$  aumenta, o que significa que há uma maior sensibilidade da levedura, diminuindo a tolerância ao etanol com a elevação da temperatura. Na faixa de temperatura de 26 a 30°C observa-se uma pequena queda no valor de  $k$ , para os dois fermentos estudados. Para temperaturas acima de 32°C o valor de  $k$  aumenta acentuadamente, o que significa que a 30°C a levedura é mais tolerante ao etanol. Comparando os valores de  $k$  para o fermento Fleishmann e Itaiquara, verificou-se que o fermento Fleishmann é mais tolerante que o Itaiquara na faixa de 26 a 32°C, sendo que acima de 34°C não foi observado diferença significativa do resultado.

Os resultados obtidos neste trabalho são importantes para se avaliar o quanto a metodologia de tolerância é sensível a temperatura, principalmente nas concentrações altas de etanol mostrando um efeito sinérgico entre esses dois parâmetros. Assim, a metodologia é rápida, simples e bastante útil, mas a temperatura deve ser perfeitamente controlada para usar o parâmetro de tolerância ao etanol como um indicador de estabilidade do processo.

A metodologia utilizada para a determinação de  $k$  se ajusta com boa precisão para as temperaturas baixas de teste, mas para temperaturas mais altas os valores de  $pH_f$  deixam de ter um comportamento linear em relação a concentração de etanol, e passa a ser melhor representado por uma exponencial, indicando a influência da concentração de etanol e da temperatura na determinação do parâmetro  $k$ .

## **6- SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

-Realizar o estudo da influência da temperatura no teste de tolerância em leveduras coletadas nas usinas de álcool e indústrias de bebidas alcólicas, e verificar o comportamento dos valores de  $k$  em função da temperatura e da concentração de etanol.

-Estudar com mais detalhes a viabilidade das leveduras em contato com altas concentrações de etanol e a altas temperaturas.

-Realizar testes de tolerância alcóolica em diferentes temperaturas de acordo com a variação de temperaturas das fermentações.

## 7- Referências Bibliográficas

1. ANDRIETTA, S. R.; STUPIELLO, J. P. Simulação e Modelagem para Processos de Fermentação Alcoólica Contínua. Revista STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos, Set.-Dez., p. 45-51, 1990
2. ANDRIETTA, S. R. Modelagem, Simulação e Contrô de Fermentação Alcoólica Contínua em Escala Industrial. Tese (Doutor em Eng. de Alimentos), Faculdade de Eng. de Alimentos, UNICAMP. 178 páginas, 1994
3. BROWN, S. W.; OLIVER, S. G. The effect of temperature on the ethanol tolerance of the yeast, *Saccharomyces uvarum*. Biotechnology Letters, v. 4, n. 4, p. 269-274, 1982.
4. CARTWRIGHT, C. P.; JUROSZEK, J. R.; BEAVAN, M. J.; RUBY, F. M. S.; DE MORAIS, S. M. F.; ROSE, A. H. Ethanol dissipates the proton-motive force across the plasma membrane in *Saccharomices cerevisiae*. Journal of General Microbiology, vol. 132, 369-377, 1986
5. CONN, E. E.; STUMPH, P. K. Introdução à bioquímica, Editora Edgard Blucher, SP, 1980,
6. CYSEWSKI, G. R.; WILKE, C. R. Rapid ethanol Fermentation Using Vacuum and Cell Recycle. Biotechnology and Bioengineering, vol. 19, p. 1125-1143, 1977
7. DALE, M. C.; CHEN, C.; OKOS, M. R. Cell growth and death rates as factors in the long-term performance, modeling, and design of immobilized cell reactors. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 36, n. 10, p. 983-992, Dez., 1990.
8. D'AMORE, T.; STEWART, G. G. reviews: Ethanol tolerance of yeast. Enzyme and Microb. Technol., Stoneham, v. 9, n. 6, p. 322-330, Jun., 1987.
9. DOURADO, A.; CALVET, J. L.; SEVELY, Y.; GOMA, G. Modelling and Statistic Optimization of the Ethanol Production in a Cascade Reactor I. Modelling. Biotechnology and Bioengineering, vol. 29, p. 187-194, 1987
10. FURLAN, E. L. P.; RODRIGUES, M. I. Estudo da influência da temperatura e concentração de etanol no teste de tolerância de etanol em leveduras, Relatório Parcial / PIBIC-CNPQ, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de campinas, 1996.
11. GAO, C.; FLEET, G. H. The effects of temperature and pH on the ethanol

- tolerance of wine yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. Journal of Applied Bacteriology, v. 65, p. 405-409, Jun., 1988.
12. GHOSE, T. K.; TYAGI, R. D.; Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II, Product and substrate inhibition and optimization of fermenter. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 21, p. 1401-1420, 1979b.
  13. Internet – Artigo retirado da Internet no dia 30/10/98 do endereço:  
<http://fpa.tvcultura.com.br/resguia/história/anas/proalc.htm>
  14. JARZEBSKI, A. B.; MALINOWSKI, J. J.; GOMA, G. Modelling of the Ethanol Fermentation at High Yest Concentrations. Biotechnology and Bioengineering, vol.43, p. 1225-1230, 1989
  15. JIMÉNEZ, J.; BENÍTEZ, T. Adaptation of yeast cell membranes to etanol. Appl. and Environmental Microbiology, Washington, D. C., v. 53, n. 5, p 1196-1198, May., 1987.
  16. JIMÉNEZ, J.; BENÍTEZ, T. Selection of ethanol-tolerant yeaY hybrids in pH-regulated continues culture. Applied and Environmental Microbiology, Washington, D-C-, v. 54, n. 4, p. 917 - 922, Abr., 1988.
  17. JIMÉNEZ, J; VAN UDEN, N. Use of extracellular acidification for the rapid testing of ethanol tolerance in yeasts. Biotechnology and Bioengineering, New York, v.27, p, 1596-1598, 1985.
  18. JONES, R. P. reviews: Biological principles for the effects of ethanol. Enzyme and Microb. Technol., v. 11, p. 130-152, Mar., 1989.
  19. KAJIWARA, S.; SHIRAI, A.; FUJII, T.; TOGURI, T.; NAKAMURA, K.; OHTAGUCHI, K. Polyinsaturated Fatty Acid Biosynthesis in *Saccharomyces Cerevisiae*: Expression of Ethanol Tolerance and the FAD2 Gene from *Arabidopsis Thaliana*. Applied and Environmental Microbiology, vol. 62, no. 12, p. 4309-4313, Dec. 1996.
  20. LALUCE, C.; Leveduras termotolerantes. Revista STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos, Julho-Agosto, p. 40-43, 1991;
  21. LEÃO, C.; VAN UDEN, N. Effect of ethanol and other alkanols on the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, vol. 26, p. 403-403, 1984;
  22. LEÃO, C.; VAN UDEN, N. Effect of ethanol and other alkanols on the ammonium

- transport system of *Saccharomyces*. Biotechnology and Bioengineering, vol. 25, 2085-2090, 1983
23. LEÃO, C.; VAN UDEN, N. Effect of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, vol. 24, p. 2601-2604, 1982
  24. LEÃO, C.; VAN UDEN, N. Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Biochimica et Biophysica Acta, v. 774; 43-48, 1984
  25. LEE, J.M.; POLLARD, J. F.; COULMAN, G. A. Ethanol Fermentation With Cell Recycling Computer Simulation. Biotechnology and Bioengineering, vol. 25, p. 497-511, 1983;
  26. LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WANG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. Biotechnology and Bioengineering Symposium, n. 11, p. 641-649, 1981.
  27. LEVENSPIEL, O. The Monod Equation: A Reviset and a Generalization to Product. Inhibition Situations. Biotechnology and Bioengineering, vol. 22, p. 1671-1687, 1980
  28. LOUREIRO V.; FERREIRA, H. G. On the Intracellular Accumulation of ethanol in Yeast. Biotechnology and Bioengineering, vol. 25, 2263-2269, 1983Letters. vol. 4, p. 721-724, 1982
  29. LOUREIRO-DIAS, M.; PEINADO, J. M. Effect of ethanol and other alkanols on the maltose transport system of *saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters. vol. 4, p. 721-724, 1982
  30. LUONG, J. H. T. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 27, n. 3, p. 280-285, Mar, 1985.
  31. MISHRA, P.; PRASAD, R. Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol., v. 30, p. 294-298, 1989.
  32. MISHRA, P.; PRASAD, R. Role of phospholipid head groups in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of General Microbiology, London, v. 134, p. 3205-3211, 1988.
  33. MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation by substrate and ethanol. Biotechnology and Bioengineering, New i'ork, v. 22, p. 2375-2381, Dez., 1980.

34. NABAIS, R. C.; SÁ-CORREIA, I.; VIEGAS, C. A.; NOVAIS, J. M. Influence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentations by yeast. Applied and Environmental Microbiology, Washington, ;v. 34, n. 10; 2439-2446, out, 1988.
35. NAGODAWITHANA, T. W.; STEINKRAUS, K. H. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in "rapid fermentation". Applied and Environmental Microbiology, Washington, D. C., v. 31, n. 2, p. 158-162, Feb., 1976.
36. NORTON, S. C.; D'AMORE, T. Physiological Effects of Yeast Cell Immobilization Applications for Brewing. Enzyme Microb. Technol., vol. 16, p. 365-375, May, 1994.
37. NOVAK, M.; STREHAIANO, P.; MORENO, M.; GOMA, G. Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. Biotechnology and Bioengineering, New York, v. 23, p 201-211, 1981.
38. PELCZAR, M. J., CHAN, E. C. S., KRIEG NOEL, R. Microbiologia, Conceitos e Aplicações, vol. 1, Ed. Makrom Books do Brasil Editora Ltda., 1996;
39. PELCZAR, M. J.; REID, R.; CHAN, E. C. S. , Microbiologia vol. 1, Editora Mc Graw-Hill do Brasil, 1980,
40. PERES, M. F. S. C.; LALUCE, C. Ethanol Tolerance of Thermotolerant Yeast Cultivated on Mixtures of Sucrose and Ethanol. Journal of Fermentation and Bioengineering, vol. 85, no. 4, p. 388-397, 1998.
41. RAMOS, M. T.; MADEIRA-LOPES, A. Effects of acetic acid on the temperatura profile of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology Letters, v. 12, n. 3, p. 229-234, Jan., 1990.
42. ROSA, M. F.; SÁ-CORREIA, I. In vivo activation by ethanol of plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, D. C., v. 57, n. 3, p. 830 - 835, Mar., 1991.
43. ROSA, M. F.; SÁ-CORREIA, I. Limitations to the use of extracellular acidification for the assessment of plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity and ethanol tolerance in yeast. Enzyme Microb. Technol., v. 16, 808-812, set., 1994.
44. ROSE, A. H. Composition of the Envelope Layers of *Sacharomices Cerevisiae* in Relation to Flocculation and Ethanol Tolerance. Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement, 74, 1105-1185, 1993.



45. SHARMA, S. C.; RAJ, D.; FOROUZANDEH, M.; BANSAL, M. P. Salt-Induced Changes in Liquid Composition and Ethanol Tolerance in *Saccharomyces Cerevisiae*. Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 56, p. 189-195, 1996.
46. SIQUEIRA, M. A. Proposta de Otimização para Destilarias Autônomas. STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos, Vol. 11, No. 5, p. 33-38, 1993
47. Souza, i. c. Gerenciamento de custos, Revista STAB Açúcar, Alcool e Subprodutos, vol.16, no. 6, 1998;
48. THOMAS, D. S.; ROSE, A. H. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. Archives of Microbiology, vol. 122, p. 49-55, 1979
49. VIGIÉ, P.; GOMA, G.; RENAUD, P. Y.; CHAMILOTHORIS, G.; DAHHOU, B.; POURCIEL, J. B. Adaptive and Predictive Control of a Multistage Fermentation Process. Biotechnology and Bioengineering, vol. 35, p. 217-223, 1990
50. WANDERLEY, M. T. Estudos da termo-tolerancia e parâmetros cinéticos da *Saccharomyces cerevisiae*. Tese (Mestre em Enge. de Alimentos). Faculdade de Eng. de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1997.

## **APÊNDICE A**

Resultados da cinética de decaimento de  
pH para as temperaturas de 26 a 40<sup>0</sup>C,  
utilizando o fermento Fleishmann.

Tabela A.1 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 26°C  
(Fleishmann).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH_10%
1	0,000	5,446	5,805	5,800	6,050	6,223	6,154
2	,500	5,684	5,512	6,321	5,878	5,942	6,146
3	1,000	5,457	5,397	6,062	5,753	5,820	5,981
4	1,500	5,269	5,300	5,905	5,652	5,750	5,899
5	2,000	5,071	5,112	5,677	5,493	5,664	5,800
6	2,500	4,863	4,971	5,443	5,404	5,563	5,697
7	3,000	4,668	4,816	5,245	5,275	5,459	5,601
8	3,500	4,529	4,672	5,082	5,157	5,365	5,510
9	4,000	4,414	4,557	4,950	5,041	5,263	5,436
10	4,500	4,334	4,460	4,837	4,945	5,181	5,364
11	5,000	4,268	4,376	4,742	4,857	5,106	5,299
12	5,500	4,210	4,314	4,662	4,773	5,032	5,244
13	6,000	4,158	4,248	4,592	4,709	4,967	5,190
14	6,500	4,124	4,197	4,529	4,643	4,911	5,140
15	7,000	4,086	4,155	4,474	4,588	4,860	5,090
16	7,500	4,057	4,113	4,424	4,538	4,812	5,052
17	8,000	4,026	4,079	4,384	4,489	4,761	5,014
18	8,500	3,998	4,044	4,341	4,441	4,722	4,978
19	9,000	3,972	4,016	4,316	4,403	4,672	4,944
20	9,500	3,949	3,991	4,285	4,364	4,634	4,911
21	10,000	3,931	3,964	4,254	4,322	4,595	4,875
22	10,500	3,902	3,937	4,230	4,288	4,560	4,843
23	11,000	3,883	3,916	4,202	4,257	4,524	4,814
24	11,500	3,858	3,894	4,180	4,225	4,488	4,785
25	12,000	3,837	3,875	4,161	4,200	4,459	4,755
26	12,500	3,811	3,852	4,142	4,169	4,430	4,728
27	13,000	3,796	3,833	4,124	4,148	4,405	4,701
28	13,500	3,779	3,816	4,105	4,122	4,372	4,678
29	14,000	3,759	3,800	4,088	4,101	4,349	4,649
30	14,500	3,742	3,784	4,071	4,079	4,324	4,629
31	15,000	3,725	3,773	4,055	4,057	4,296	4,603
32	16,000	3,695	3,741	4,031	4,021	4,257	4,560
33	17,000	3,669	3,719	4,000	3,986	4,216	4,521
34	18,000	3,646	3,697	3,970	3,955	4,177	4,487
35	19,000	3,622	3,675	3,942	3,926	4,141	4,457
36	20,000	3,605	3,656	3,916	3,889	4,109	4,420
37	25,000	3,559	3,589	3,807	3,785	3,974	4,289
38	30,000	3,526	3,563	3,725	3,721	3,866	4,184
39	35,000	3,498	3,544	3,643	3,657	3,779	4,096
40	40,000	3,473	3,530	3,592	3,641	3,718	4,017
41	45,000	3,450	3,511	3,529	3,626	3,690	3,953
42	50,000	3,430	3,498	3,503	3,611	3,674	3,891
43	55,000	3,409	3,482	3,488	3,599	3,656	3,835
44	60,000	3,391	3,468	3,481	3,587	3,644	3,783
45	70,000	3,357	3,441	3,503	3,563	3,620	3,694
46	80,000	3,324	3,413	3,479	3,538	3,600	3,671
47	90,000	3,300	3,384	3,448	3,512	3,584	3,643

Tabela A.2 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 28<sup>o</sup>C  
(Fleishmann).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH_10%
1	0,000	5,822	5,867	6,167	6,039	5,917	5,874
2	,500	4,865	5,419	5,161	4,971	5,191	5,124
3	1,000	4,734	5,261	5,022	4,875	5,095	5,034
4	1,500	4,611	5,090	4,961	4,832	5,031	4,988
5	2,000	4,460	4,865	4,858	4,787	4,978	4,959
6	2,500	4,314	4,671	4,709	4,719	4,913	4,926
7	3,000	4,199	4,476	4,568	4,649	4,851	4,886
8	3,500	4,117	4,357	4,447	4,561	4,773	4,856
9	4,000	4,059	4,256	4,348	4,492	4,709	4,816
10	4,500	4,001	4,186	4,267	4,426	4,646	4,778
11	5,000	3,962	4,122	4,208	4,360	4,584	4,747
12	5,500	3,925	4,072	4,153	4,305	4,529	4,700
13	6,000	3,891	4,028	4,110	4,254	4,481	4,670
14	6,500	3,858	3,985	4,073	4,210	4,434	4,634
15	7,000	3,838	3,953	4,035	4,168	4,391	4,612
16	7,500	3,813	3,925	4,008	4,129	4,348	4,579
17	8,000	3,795	3,897	3,980	4,091	4,310	4,549
18	8,500	3,783	3,869	3,954	4,053	4,266	4,525
19	9,000	3,767	3,844	3,933	4,023	4,244	4,504
20	9,500	3,756	3,818	3,915	4,001	4,209	4,480
21	10,000	3,744	3,802	3,897	3,973	4,179	4,458
22	10,500	3,732	3,781	3,971	3,949	4,145	4,430
23	11,000	3,723	3,769	3,857	3,921	4,121	4,408
24	11,500	3,713	3,758	3,841	3,904	4,090	4,383
25	12,000	3,704	3,749	3,825	3,887	4,069	4,364
26	12,500	3,694	3,741	3,811	3,871	4,047	4,344
27	13,000	3,687	3,732	3,797	3,859	4,024	4,319
28	13,500	3,677	3,724	3,783	3,843	4,007	4,304
29	14,000	3,672	3,717	3,771	3,831	3,990	4,287
30	14,500	3,664	3,710	3,761	3,819	3,972	4,266
31	15,000	3,658	3,703	3,753	3,805	3,958	4,246
32	16,000	3,643	3,690	3,738	3,790	3,927	4,216
33	17,000	3,634	3,680	3,728	3,772	3,903	4,190
34	18,000	3,622	3,670	3,721	3,755	3,877	4,161
35	19,000	3,612	3,660	3,712	3,743	3,550	4,138
36	20,000	3,603	3,651	3,695	3,731	3,836	4,111
37	25,000	3,566	3,616	3,652	3,683	3,755	4,005
38	30,000	3,535	3,585	3,617	3,655	3,711	3,895
39	35,000	3,503	3,561	3,588	3,632	3,673	3,839
40	40,000	3,481	3,538	3,560	3,611	3,650	3,709
41	45,000	3,457	3,506	3,537	3,594	3,631	3,748
42	50,000	3,435	3,493	3,511	3,578	3,615	3,716
43	55,000	3,414	3,473	3,495	3,563	3,604	3,691
44	60,000	3,392	3,453	3,472	3,548	3,591	3,667
45	70,000	3,369	3,421	3,437	3,518	3,570	3,634
46	80,000	3,347	3,397	3,401	3,490	3,552	3,609
47	90,000	3,329	3,377	3,374	3,462	3,534	3,582

Tabela A.3 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 30°C  
(Fleishmann).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH_10%
1	0,000	5,660	6,299	6,290	6,112	6,027	5,954
2	,500	5,030	4,616	5,083	5,101	4,844	4,961
3	1,000	4,860	4,553	4,978	5,014	4,779	4,907
4	1,500	4,662	4,460	4,911	4,942	4,749	4,879
5	2,000	4,419	4,328	4,783	4,843	4,718	4,845
6	2,500	4,251	4,239	4,639	4,741	4,673	4,807
7	3,000	4,145	4,167	4,497	4,610	4,609	4,768
8	3,500	4,067	4,100	4,377	4,507	4,559	4,729
9	4,000	4,003	4,038	4,290	4,413	4,499	4,684
10	4,500	3,954	3,987	4,214	4,346	4,450	4,643
11	5,000	3,911	3,938	4,151	4,267	4,404	4,614
12	5,500	3,870	3,893	4,091	4,217	4,337	4,578
13	6,000	3,839	3,852	4,044	4,166	4,311	4,540
14	6,500	3,811	3,820	4,008	4,110	4,281	4,511
15	7,000	3,784	3,784	3,960	4,072	4,234	4,484
16	7,500	3,754	3,758	3,924	4,030	4,207	4,453
17	8,000	3,725	3,737	3,903	3,993	4,174	4,424
18	8,500	3,703	3,720	3,874	3,958	4,138	4,398
19	9,000	3,687	3,705	3,850	3,928	4,111	4,378
20	9,500	3,673	3,693	3,824	3,899	4,082	4,350
21	10,000	3,662	3,679	3,804	3,868	4,054	4,314
22	10,500	3,649	3,677	3,779	3,847	4,028	4,297
23	11,000	3,638	3,657	3,764	3,825	4,003	4,280
24	11,500	3,627	3,649	3,745	3,801	3,984	4,254
25	12,000	3,619	3,637	3,726	3,779	3,956	4,234
26	12,500	3,609	3,630	3,711	3,764	3,935	4,218
27	13,000	3,603	3,623	3,695	3,744	3,915	4,201
28	13,500	3,595	3,614	3,682	3,731	3,891	4,178
29	14,000	3,585	3,607	3,667	3,717	3,876	4,160
30	14,500	3,579	3,602	3,653	3,707	3,860	4,141
31	15,000	3,572	3,595	3,645	3,697	3,849	4,125
32	16,000	3,555	3,586	3,630	3,678	3,819	4,093
33	17,000	3,540	3,576	3,616	3,661	3,795	4,057
34	18,000	3,527	3,568	3,606	3,644	3,769	4,026
35	19,000	3,518	3,559	3,592	3,635	3,745	4,000
36	20,000	3,508	3,552	3,584	3,621	3,728	3,978
37	25,000	3,453	3,521	3,545	3,574	3,649	3,878
38	30,000	3,416	3,491	3,512	3,541	3,596	3,797
39	35,000	3,387	3,466	3,479	3,515	3,562	3,736
40	40,000	3,358	3,438	3,453	3,492	3,533	3,686
41	45,000	3,335	3,410	3,429	3,473	3,510	3,647
42	50,000	3,313	3,390	3,404	3,455	3,489	3,616
43	55,000	3,295	3,371	3,381	3,437	3,475	3,587
44	60,000	3,280	3,348	3,359	3,422	3,461	3,566
45	70,000	3,252	3,316	3,320	3,389	3,437	3,529
46	80,000	3,233	3,297	3,289	3,368	3,417	3,499
47	90,000	3,228	3,291	3,259	3,342	3,397	3,473

Tabela A.4 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 32<sup>o</sup>C  
(Fleishmann).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH_10%
1	0,000	5,559	5,733	5,722	6,265	5,991	6,043
2	,500	5,195	5,093	5,361	5,564	5,466	5,847
3	1,000	4,957	4,971	5,221	5,421	5,370	5,723
4	1,500	4,698	4,794	5,081	5,253	5,268	5,633
5	2,000	4,417	4,595	4,891	5,078	5,172	5,522
6	2,500	4,257	4,425	4,722	4,905	5,053	5,417
7	3,000	4,143	4,294	4,554	4,757	4,947	5,315
8	3,500	4,062	4,205	4,441	4,651	4,857	5,226
9	4,000	4,001	4,120	4,342	4,548	4,776	5,152
10	4,500	3,948	4,060	4,269	4,480	4,720	5,068
11	5,000	3,902	4,007	4,196	4,406	4,663	5,012
12	5,500	3,864	3,963	4,140	4,352	4,606	4,962
13	6,000	3,829	3,923	4,082	4,293	4,561	4,910
14	6,500	3,792	3,881	4,045	4,243	4,511	4,868
15	7,000	3,759	3,840	4,000	4,198	4,467	4,826
16	7,500	3,732	3,808	3,967	4,161	4,433	4,789
17	8,000	3,714	3,778	3,935	4,122	4,389	4,759
18	8,500	3,702	3,754	3,904	4,081	4,354	4,720
19	9,000	3,688	3,736	3,870	4,051	4,318	4,693
20	9,500	3,675	3,722	3,849	4,024	4,290	4,658
21	10,000	3,663	3,710	3,825	3,999	4,261	4,634
22	10,500	3,651	3,700	3,802	3,967	4,231	4,605
23	11,000	3,643	3,688	3,783	3,945	4,206	4,579
24	11,500	3,633	3,679	3,765	3,923	4,170	4,552
25	12,000	3,625	3,670	3,748	3,901	4,150	4,528
26	12,500	3,616	3,666	3,738	3,883	4,130	4,505
27	13,000	3,607	3,656	3,729	3,866	4,110	4,488
28	13,500	3,601	3,649	3,722	3,842	4,091	4,469
29	14,000	3,594	3,644	3,712	3,827	4,071	4,449
30	14,500	3,588	3,638	3,705	3,814	4,052	4,425
31	15,000	3,580	3,633	3,696	3,796	4,034	4,414
32	16,000	3,570	3,620	3,685	3,770	3,997	4,377
33	17,000	3,558	3,609	3,673	3,756	3,965	4,345
34	18,000	3,547	3,601	3,664	3,744	3,936	4,312
35	19,000	3,537	3,592	3,654	3,729	3,911	4,278
36	20,000	3,528	3,584	3,646	3,722	3,884	4,259
37	25,000	3,489	3,553	3,612	3,678	3,806	4,134
38	30,000	3,455	3,523	3,587	3,648	3,760	4,031
39	35,000	3,426	3,499	3,567	3,626	3,722	3,963
40	40,000	3,406	3,478	3,550	3,608	3,697	3,914
41	45,000	3,383	3,460	3,528	3,593	3,674	3,871
42	50,000	3,363	3,440	3,515	3,581	3,650	3,834
43	55,000	3,344	3,423	3,498	3,570	3,642	3,804
44	60,000	3,330	3,407	3,479	3,562	3,628	3,778
45	70,000	3,309	3,391	3,452	3,546	3,605	3,735
46	80,000	3,300	3,378	3,434	3,529	3,592	3,703
47	90,000	3,305	3,377	3,421	3,515	3,582	3,677

Tabela A.5 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 34<sup>o</sup>C  
(Fleishmann).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH_10%
1	0,000	5,560	6,315	5,826	6,274	6,387	5,680
2	,500	5,420	5,708	5,510	5,940	5,873	5,775
3	1,000	5,177	5,486	5,397	5,739	5,746	5,664
4	1,500	4,896	5,109	5,228	5,492	5,588	5,579
5	2,000	4,599	4,811	5,018	5,268	5,461	5,503
6	2,500	4,399	4,571	4,820	5,091	5,299	5,408
7	3,000	4,262	4,420	4,659	4,920	5,191	5,322
8	3,500	4,171	4,311	4,529	4,792	5,084	5,246
9	4,000	4,098	4,227	4,436	4,694	4,987	5,161
10	4,500	4,037	4,158	4,354	4,607	4,925	5,111
11	5,000	3,964	4,106	4,278	4,534	4,877	5,052
12	5,500	3,934	4,062	4,213	4,464	4,817	4,999
13	6,000	3,892	4,017	4,162	4,403	4,759	4,952
14	6,500	3,848	3,969	4,109	4,348	4,715	4,914
15	7,000	3,813	3,934	4,066	4,301	4,666	4,874
16	7,500	3,778	3,903	4,026	4,260	4,622	4,843
17	8,000	3,746	3,869	3,989	4,220	4,582	4,805
18	8,500	3,720	3,841	3,952	4,174	4,541	4,770
19	9,000	3,696	3,819	3,921	4,141	4,505	4,744
20	9,500	3,680	3,792	3,893	4,121	4,476	4,719
21	10,000	3,669	3,770	3,866	4,089	4,445	4,697
22	10,500	3,657	3,745	3,840	4,063	4,412	4,670
23	11,000	3,646	3,726	3,819	4,041	4,382	4,650
24	11,500	3,636	3,706	3,795	4,016	4,355	4,632
25	12,000	3,628	3,689	3,780	3,990	4,334	4,605
26	12,500	3,618	3,675	3,764	3,968	4,309	4,592
27	13,000	3,612	3,662	3,750	3,951	4,287	4,568
28	13,500	3,606	3,651	3,740	3,932	4,261	4,548
29	14,000	3,599	3,648	3,731	3,910	4,237	4,530
30	14,500	3,590	3,641	3,723	3,892	4,213	4,516
31	15,000	3,584	3,636	3,717	3,873	4,197	4,506
32	16,000	3,571	3,626	3,706	3,839	4,162	4,468
33	17,000	3,559	3,613	3,695	3,811	4,132	4,440
34	18,000	3,551	3,603	3,685	3,782	4,090	4,414
35	19,000	3,540	3,598	3,675	3,757	4,059	4,388
36	20,000	3,529	3,592	3,669	3,738	4,030	4,364
37	25,000	3,494	3,553	3,636	3,683	3,907	4,255
38	30,000	3,459	3,516	3,612	3,651	3,820	4,161
39	35,000	3,431	3,487	3,591	3,628	3,756	4,076
40	40,000	3,412	3,458	3,576	3,612	3,724	4,013
41	45,000	3,398	3,449	3,559	3,592	3,701	3,959
42	50,000	3,380	3,434	3,541	3,574	3,687	3,912
43	55,000	3,368	3,422	3,528	3,560	3,673	3,871
44	60,000	3,357	3,413	3,515	3,547	3,659	3,838
45	70,000	3,353	3,396	3,492	3,527	3,638	3,786
46	80,000	3,349	3,396	3,477	3,509	3,621	3,758
47	90,000	3,339	3,401	3,469	3,496	3,603	3,734

Tabela A.6 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 36°C  
(Fleishmann).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH_10%
1	0,000	5,520	5,725	5,645	5,709	5,665	5,930
2	,500	5,460	5,640	5,593	5,582	5,398	6,256
3	1,000	5,236	5,466	5,451	5,471	5,316	6,053
4	1,500	4,910	5,176	5,297	5,337	5,243	5,921
5	2,000	4,584	4,901	5,048	5,189	5,160	5,799
6	2,500	4,390	4,668	4,857	5,031	5,076	5,672
7	3,000	4,258	4,515	4,713	4,912	5,005	5,539
8	3,500	4,178	4,390	4,665	4,802	4,919	5,428
9	4,000	4,105	4,292	4,565	4,687	4,858	5,318
10	4,500	4,048	4,217	4,465	4,637	4,809	5,234
11	5,000	4,002	4,153	4,399	4,569	4,761	5,163
12	5,500	3,956	4,101	4,332	4,515	4,708	5,087
13	6,000	3,915	4,048	4,263	4,460	4,673	5,035
14	6,500	3,872	4,003	4,216	4,414	4,634	4,981
15	7,000	3,833	3,964	4,172	4,363	4,599	4,943
16	7,500	3,793	3,917	4,129	4,330	4,566	4,902
17	8,000	3,761	3,888	4,084	4,289	4,534	4,867
18	8,500	3,730	3,854	4,046	4,250	4,502	4,836
19	9,000	3,702	3,825	4,007	4,215	4,471	4,805
20	9,500	3,678	3,798	3,980	4,182	4,449	4,780
21	10,000	3,655	3,771	3,848	4,151	4,420	4,751
22	10,500	3,635	3,746	3,919	4,127	4,403	4,732
23	11,000	3,620	3,726	3,891	4,101	4,373	4,708
24	11,500	3,612	3,710	3,865	4,074	4,346	4,688
25	12,000	3,605	3,692	3,852	4,049	4,334	4,668
26	12,500	3,597	3,675	3,822	4,026	4,310	4,650
27	13,000	3,590	3,660	3,801	3,992	4,292	4,635
28	13,500	3,585	3,646	3,781	3,980	4,269	4,618
29	14,000	3,580	3,635	3,765	3,961	4,253	4,602
30	14,500	3,574	3,628	3,750	3,941	4,234	4,585
31	15,000	3,569	3,625	3,738	3,923	4,216	4,572
32	16,000	3,559	3,619	3,722	3,888	4,180	4,550
33	17,000	3,550	3,612	3,713	3,858	4,150	4,521
34	18,000	3,540	3,604	3,706	3,832	4,118	4,500
35	19,000	3,530	3,594	3,695	3,806	4,085	4,480
36	20,000	3,522	3,593	3,689	3,787	4,057	4,458
37	25,000	3,481	3,553	3,660	3,726	3,936	4,376
38	30,000	3,445	3,524	3,637	3,697	3,864	4,308
39	35,000	3,415	3,492	3,618	3,670	3,819	4,244
40	40,000	3,387	3,474	3,599	3,650	3,790	4,210
41	45,000	3,361	3,457	3,583	3,631	3,767	4,175
42	50,000	3,346	3,444	3,566	3,614	3,749	4,146
43	55,000	3,333	3,431	3,547	3,601	3,735	4,122
44	60,000	3,325	3,424	3,535	3,589	3,722	4,098
45	70,000	3,325	3,414	3,518	3,569	3,697	4,057
46	80,000	3,362	3,406	3,510	3,554	3,676	4,025
47	90,000	3,416	3,395	3,501	3,542	3,656	3,995



Tabela A.7 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 38°C  
(Fleishmann).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH_10%
1	0,000	5,490	5,750	5,733	6,159	6,020	5,860
2	,500	5,577	5,715	5,781	5,860	5,673	5,704
3	1,000	5,281	5,424	3,603	5,625	5,544	5,595
4	1,500	4,946	5,156	5,384	5,445	5,411	5,527
5	2,000	4,642	4,855	5,128	5,290	5,325	5,474
6	2,500	4,441	4,658	4,933	5,143	5,236	5,393
7	3,000	4,323	4,514	4,762	5,009	5,164	5,352
8	3,500	4,221	4,395	4,665	4,906	5,099	5,287
9	4,000	4,150	4,307	4,572	4,818	5,018	5,230
10	4,500	4,092	4,234	4,479	4,747	4,939	5,172
11	5,000	4,039	4,175	4,415	4,682	4,887	5,111
12	5,500	3,992	4,120	4,380	4,631	4,838	5,062
13	6,000	3,955	4,071	4,307	4,576	4,784	5,014
14	6,500	3,915	4,021	4,252	4,525	4,756	4,970
15	7,000	3,876	3,989	4,209	4,469	4,737	4,936
16	7,500	3,839	3,856	4,173	4,434	4,676	4,899
17	8,000	3,806	3,919	4,134	4,410	4,656	4,860
18	8,500	3,777	3,892	4,101	4,371	4,618	4,829
19	9,000	3,750	3,862	4,074	4,348	4,598	4,798
20	9,500	3,722	3,836	4,044	4,310	4,567	4,773
21	10,000	3,697	3,811	4,015	4,285	4,551	4,753
22	10,500	3,673	3,789	3,987	4,262	4,537	4,727
23	11,000	3,651	3,768	3,967	4,240	4,513	4,707
24	11,500	3,639	3,750	3,942	4,217	4,490	4,693
25	12,000	3,618	3,730	3,922	4,194	4,473	4,673
26	12,500	3,606	3,713	3,901	4,173	4,453	4,658
27	13,000	3,595	3,699	3,882	4,153	4,437	4,643
28	13,500	3,586	3,685	3,863	4,134	4,421	4,630
29	14,000	3,581	3,672	3,847	4,115	4,404	4,617
30	14,500	3,576	3,661	3,835	4,098	4,392	4,599
31	15,000	3,568	3,648	3,817	4,081	4,370	4,591
32	16,000	3,560	3,635	3,790	4,048	4,345	4,571
33	17,000	3,553	3,632	3,764	4,019	4,321	4,550
34	18,000	3,547	3,627	3,743	3,991	4,302	4,531
35	19,000	3,535	3,625	3,725	3,975	4,279	4,515
36	20,000	3,530	3,621	3,711	3,955	4,256	4,500
37	25,000	3,499	3,593	3,658	3,876	4,158	4,441
38	30,000	3,471	3,564	3,639	3,830	4,106	4,393
39	35,000	3,446	3,538	3,620	3,797	4,054	4,357
40	40,000	3,428	3,515	3,598	3,756	4,029	4,327
41	45,000	3,419	3,493	3,581	3,743	4,011	4,300
42	50,000	3,404	3,475	3,568	3,723	3,998	4,277
43	55,000	3,398	3,459	3,559	3,710	3,986	4,251
44	60,000	3,385	3,447	3,550	3,703	3,974	4,228
45	70,000	3,374	3,430	3,535	3,685	3,960	4,183
46	80,000	3,370	3,422	3,521	3,662	3,946	4,141
47	90,000	3,368	3,425	3,505	3,636	3,937	4,099

Tabela A.8 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 40°C  
(Fleishmann).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH_10%
1	0,000	5,435	5,760	5,699	5,911	6,003	5,920
2	,500	5,386	5,751	5,670	5,681	5,637	5,772
3	1,000	5,146	5,522	5,534	5,530	5,540	5,658
4	1,500	4,909	5,191	5,340	5,371	5,448	5,592
5	2,000	4,653	4,934	5,135	5,228	5,346	5,532
6	2,500	4,441	4,737	4,963	5,082	5,260	5,472
7	3,000	4,320	4,594	4,843	4,977	5,180	5,419
8	3,500	4,232	4,478	4,724	4,888	5,112	5,351
9	4,000	4,160	4,386	4,631	4,794	5,034	5,290
10	4,500	4,101	4,314	4,556	4,730	4,980	5,239
11	5,000	4,054	4,246	4,476	4,673	4,923	5,187
12	5,500	4,000	4,190	4,435	4,636	4,877	5,136
13	6,000	3,961	4,138	4,383	4,600	4,834	5,089
14	6,500	3,930	4,091	4,340	4,564	4,793	5,050
15	7,000	3,901	4,047	4,298	4,531	4,760	5,019
16	7,500	3,868	4,014	4,258	4,497	4,735	4,976
17	8,000	3,839	3,976	4,219	4,469	4,707	4,950
18	8,500	3,810	3,946	4,193	4,448	4,681	4,923
19	9,000	3,784	3,917	4,162	4,418	4,651	4,901
20	9,500	3,762	3,888	4,133	4,392	4,628	4,883
21	10,000	3,739	3,865	4,106	4,373	4,604	4,867
22	10,500	3,718	3,840	4,080	4,350	4,585	4,848
23	11,000	3,697	3,819	4,057	4,332	4,570	4,830
24	11,500	3,680	3,799	4,031	4,316	4,555	4,821
25	12,000	3,664	3,781	4,008	4,294	4,538	4,805
26	12,500	3,648	3,763	3,987	4,276	4,530	4,796
27	13,000	3,631	3,744	3,966	4,259	4,517	4,788
28	13,500	3,620	3,732	3,947	4,243	4,499	4,775
29	14,000	3,606	3,719	3,931	4,223	4,489	4,767
30	14,500	3,595	3,708	3,913	4,212	4,476	4,758
31	15,000	3,587	3,694	3,899	4,195	4,464	4,753
32	16,000	3,579	3,673	3,869	4,167	4,443	4,736
33	17,000	3,572	3,654	3,846	4,145	4,424	4,734
34	18,000	3,566	3,639	3,825	4,119	4,409	4,720
35	19,000	3,559	3,626	3,804	4,096	4,392	4,715
36	20,000	3,553	3,614	3,791	4,078	4,378	4,708
37	25,000	3,519	3,593	3,737	4,004	4,320	4,688
38	30,000	3,490	3,580	3,705	3,964	4,272	4,675
39	35,000	3,465	3,566	3,689	3,940	4,238	4,670
40	40,000	3,440	3,556	3,685	3,923	4,209	4,658
41	45,000	3,422	3,549	3,675	3,912	4,188	4,649
42	50,000	3,409	3,540	3,670	3,899	4,163	4,642
43	55,000	3,403	3,532	3,662	3,889	4,142	4,632
44	60,000	3,395	3,525	3,652	3,881	4,124	4,622
45	70,000	3,393	3,508	3,634	3,870	4,091	4,600
46	80,000	3,387	3,487	3,618	3,853	4,069	4,575
47	90,000	3,427	3,480	3,601	3,838	4,050	4,552

## **APÊNDICE B**

Resultados da cinética de decaimento de  
pH para as temperaturas de 26 a 40°C,  
utilizando o fermento Itaiquara.

Tabela B.1 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 26°C  
(Itaquara).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH10%
1	0,000	6,846	7,012	7,369	7,341	7,336	7,322
2	,500	5,924	6,371	6,139	6,364	6,528	6,281
3	1,000	5,658	6,164	5,953	6,165	6,352	6,155
4	1,500	5,432	5,975	5,719	6,020	6,209	6,056
5	2,000	5,208	5,747	5,499	5,847	6,071	5,976
6	2,500	4,998	5,538	5,324	5,684	5,890	5,899
7	3,000	4,857	5,388	5,179	5,532	5,784	5,812
8	3,500	4,755	5,268	5,065	5,407	5,675	5,720
9	4,000	4,677	5,186	4,961	5,303	5,614	5,643
10	4,500	4,619	5,109	4,889	5,210	5,554	5,565
11	5,000	4,563	5,058	4,826	5,136	5,404	5,502
12	5,500	4,516	5,009	4,777	5,068	5,358	5,442
13	6,000	4,477	4,963	4,725	5,006	5,288	5,384
14	6,500	4,443	4,936	4,686	4,953	5,235	5,328
15	7,000	4,414	4,902	4,652	4,917	5,184	5,268
16	7,500	4,385	4,877	4,620	4,878	5,148	5,242
17	8,000	4,351	4,844	4,591	4,842	5,107	5,196
18	8,500	4,335	4,831	4,567	4,807	5,071	5,162
19	9,000	4,312	4,805	4,536	4,778	5,028	5,125
20	9,500	4,296	4,788	4,516	4,751	5,007	5,088
21	10,000	4,272	4,761	4,499	4,725	4,978	5,063
22	10,500	4,254	4,742	4,476	4,702	4,959	5,024
23	11,000	4,233	4,724	4,454	4,681	4,933	5,002
24	11,500	4,221	4,705	4,436	4,664	4,914	4,980
25	12,000	4,206	4,682	4,417	4,648	4,894	4,852
26	12,500	4,191	4,666	4,401	4,624	4,874	4,928
27	13,000	4,170	4,645	4,382	4,607	4,846	4,906
28	13,500	4,157	4,632	4,363	4,588	4,826	4,891
29	14,000	4,142	4,614	4,346	4,574	4,812	4,871
30	14,500	4,130	4,603	4,332	4,558	4,796	4,852
31	15,000	4,111	4,580	4,318	4,541	4,781	4,835
32	16,000	4,085	4,551	4,292	4,513	4,746	4,803
33	17,000	4,060	4,516	4,266	4,482	4,723	4,775
34	18,000	4,034	4,483	4,237	4,459	4,691	4,748
35	19,000	4,012	4,453	4,215	4,430	4,661	4,719
36	20,000	3,987	4,429	4,189	4,405	4,636	4,691
37	25,000	3,878	4,283	4,083	4,293	4,527	4,585
38	30,000	3,784	4,157	3,994	4,192		4,498
39	35,000	3,702	4,047	3,913	4,098	4,314	4,411
40	40,000	3,623	3,945	3,841	4,022	4,254	4,339
41	45,000	3,550	3,863	3,773	3,950	4,184	4,270
42	50,000	3,481	3,783	3,704	3,887	4,113	4,201
43	55,000	3,431	3,704	3,631	3,827	4,049	4,148
44	60,000	3,407	3,626	3,579	3,773	3,992	4,095
45	70,000	3,361	3,479	3,516	3,667	3,889	4,001
46	80,000	3,327	3,378	3,477	3,582	3,809	3,921
47	90,000	3,292	3,350	3,434	3,536	3,735	3,833

Tabela B.2 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 28°C  
(Itaquara).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH_10%
1	0,000	6,976	7,340	7,231	7,130	7,349	7,336
2	,500	6,128	6,134	6,138	6,174	6,290	6,557
3	1,000	5,818	5,944	5,942	6,071	6,089	6,317
4	1,500	5,601	5,711	5,745	5,896	5,953	6,175
5	2,000	5,330	5,498	5,571	5,758	5,814	6,022
6	2,500	5,120	5,287	5,361	5,595	5,663	5,885
7	3,000	5,003	5,116	5,212	5,456	5,537	5,770
8	3,500	4,902	4,976	5,059	5,334	5,444	5,676
9	4,000	4,819	4,886	4,970	5,254	5,353	5,588
10	4,500	4,761	4,799	4,876	5,185	5,266	5,522
11	5,000	4,710	4,735	4,819	5,118	5,198	5,442
12	5,500	4,673	4,681	4,751	5,066	5,131	5,387
13	6,000	4,626	4,628	4,697	5,019	5,067	5,325
14	6,500	4,600	4,587	4,642	4,964	5,012	5,277
15	7,000	4,567	4,548	4,608	4,936	4,957	5,229
16	7,500	4,536	4,514	4,571	4,909	4,921	5,185
17	8,000	4,515	4,486	4,542	4,880	4,883	5,140
18	8,500	4,488	4,459	4,503	4,851	4,840	5,093
19	9,000	4,460	4,431	4,478	4,822	4,803	5,068
20	9,500	4,436	4,406	4,456	4,801	4,778	5,026
21	10,000	4,412	4,379	4,428	4,781	4,742	4,991
22	10,500	4,391	4,357	4,403	4,758	4,721	4,961
23	11,000	4,371	4,335	4,386	4,735	4,697	4,931
24	11,500	4,354	4,316	4,366	4,713	4,677	4,918
25	12,000	4,334	4,298	4,347	4,698	4,655	4,895
26	12,500	4,312	4,278	4,327	4,674	4,634	4,867
27	13,000	4,294	4,261	4,311	4,663	4,615	4,841
28	13,500	4,276	4,244	4,293	4,639	4,594	4,815
29	14,000	4,258	4,227	4,270	4,624	4,577	4,811
30	14,500	4,242	4,211	4,261	4,610	4,567	4,777
31	15,000	4,226	4,196	4,240	4,590	4,543	4,763
32	16,000	4,196	4,169	4,215	4,559	4,512	4,730
33	17,000	4,161	4,131	4,189	4,529	4,482	4,698
34	18,000	4,131	4,103	4,157	4,499	4,451	4,671
35	19,000	4,098	4,077	4,132	4,467	4,428	4,643
36	20,000	4,068	4,050	4,108	4,442	4,407	4,614
37	25,000	3,931	3,948	4,008	4,313	4,286	4,502
38	30,000	3,812	3,845	3,918	4,184	4,214	4,402
39	35,000	3,712	3,759	3,830	4,067	4,128	4,318
40	40,000	3,607	3,677	3,756	3,969	4,039	4,241
41	45,000	3,495	3,595	3,683	3,894	3,972	4,164
42	50,000	3,439	3,526	3,610	3,820	3,911	4,113
43	55,000	3,407	3,491	3,570	3,733	3,864	4,048
44	60,000	3,382	3,460	3,536	3,679	3,817	4,007
45	70,000	3,341	3,416	3,489	3,582	3,726	3,924
46	80,000	3,302	3,370	3,443	3,535	3,654	3,852
47	90,000	3,278	3,335	3,397	3,502	3,604	3,783

Tabela B.3 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 30°C  
(Itaiquara).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH_10%
1	0,000	6,930	7,127	7,132	6,959	6,939	6,952
2	,500	6,078	6,154	6,286	6,246	6,450	6,224
3	1,000	5,792	5,905	6,084	6,004	6,193	6,066
4	1,500	5,556	5,635	5,862	5,819	6,000	5,981
5	2,000	5,300	5,391	5,626	5,603	5,800	5,882
6	2,500	5,126	5,177	5,438	5,417	5,629	5,760
7	3,000	5,001	5,028	5,301	5,267	5,493	5,641
8	3,500	4,897	4,897	5,194	5,140	5,377	5,550
9	4,000	4,826	4,792	5,110	5,031	5,290	5,460
10	4,500	4,772	4,705	5,039	4,952	5,217	5,381
11	5,000	4,717	4,662	4,984	4,872	5,144	5,314
12	5,500	4,684	4,606	4,930	4,807	5,079	5,257
13	6,000	4,651	4,562	4,895	4,750	5,022	5,202
14	6,500	4,618	4,521	4,852	4,700	4,980	5,153
15	7,000	4,587	4,482	4,820	4,660	4,930	5,106
16	7,500	4,558	4,450	4,784	4,621	4,891	5,069
17	8,000	4,530	4,416	4,760	4,584	4,863	5,031
18	8,500	4,510	4,388	4,734	4,552	4,832	4,997
19	9,000	4,481	4,363	4,705	4,522	4,809	4,967
20	9,500	4,455	4,336	4,677	4,497	4,780	4,935
21	10,000	4,435	4,311	4,654	4,475	4,752	
22	10,500	4,410	4,286	4,633	4,456	4,727	4,884
23	11,000	4,386	4,258	4,604	4,431	4,705	
24	11,500	4,365	4,243	4,582	4,404	4,685	4,833
25	12,000	4,342	4,223	4,561	4,386	4,670	4,813
26	12,500	4,322	4,205	4,541	4,370	4,652	4,789
27	13,000	4,303	4,185	4,521	4,355	4,630	4,771
28	13,500	4,282	4,167	4,499	4,333	4,615	4,756
29	14,000	4,264	4,149	4,477	4,318	4,601	4,737
30	14,500	4,244	4,130	4,454	4,303	4,585	4,715
31	15,000	4,222	4,113	4,436	4,288	4,566	4,700
32	16,000	4,178	4,083	4,404	4,250	4,538	4,667
33	17,000	4,142	4,057	4,364	4,218	4,509	4,638
34	18,000	4,107	4,028	4,328	4,194	4,484	4,610
35	19,000	4,070	4,006	4,297	4,163	4,455	4,585
36	20,000	4,036	3,979	4,255	4,141	4,433	4,558
37	25,000	3,881	3,871	4,110	4,024	4,318	4,436
38	30,000	3,757	3,774	3,981	3,925	4,209	4,342
39	35,000	3,633	3,678	3,864	3,832	4,106	4,249
40	40,000	3,513	3,585	3,770	3,766	4,012	4,172
41	45,000	3,432	3,539	3,677	3,695	3,940	4,103
42	50,000	3,404	3,504	3,589	3,638	3,866	4,043
43	55,000	3,369	3,473	3,491	3,577	3,804	3,989
44	60,000	3,347	3,444	3,448	3,525	3,751	3,939
45	70,000	3,301	3,386	3,411	3,462	3,654	3,856
46	80,000	3,267	3,352	3,392	3,429	3,560	3,787
47	90,000	3,286	3,318	3,373	3,403	3,507	3,719

Tabela B.4 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 32°C  
(Itaiquara).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH_10%
1	0,000	6,770	6,697	6,943	6,990	7,063	7,090
2	,500	5,825	6,115	6,086		6,551	6,495
3	1,000	5,512	5,818	5,816	6,059	6,315	6,308
4	1,500	5,204	5,509	5,586	5,828	6,112	6,167
5	2,000	4,939	5,238	5,329	5,619	5,900	6,052
6	2,500	4,760	5,044	5,138	5,465	5,717	5,921
7	3,000	4,627	4,913	4,990	5,312	5,587	5,793
8	3,500	4,531	4,811	4,837	5,193	5,468	5,680
9	4,000	4,470	4,720	4,763	5,090	5,383	5,597
10	4,500	4,421	4,647	4,685	4,987	5,300	5,526
11	5,000	4,379	4,601	4,616	4,921	5,236	5,456
12	5,500	4,346	4,557	4,566	4,841	5,171	5,392
13	6,000	4,304	4,514	4,515	4,786	5,122	5,334
14	6,500	4,280	4,474	4,473	4,733	5,077	5,284
15	7,000	4,249	4,446	4,437	4,682	5,032	5,232
16	7,500	4,221	4,411	4,403	4,635	4,994	5,194
17	8,000	4,193	4,390	4,374	4,599	4,966	5,151
18	8,500	4,166	4,357	4,351	4,554	4,934	
19	9,000	4,144	4,322	4,328	4,522	4,906	5,076
20	9,500	4,122	4,308	4,301	4,502	4,881	5,039
21	10,000	4,100	4,282	4,274	4,477	4,853	5,013
22	10,500	4,079	4,263	4,252	4,446	4,830	4,980
23	11,000	4,059	4,236	4,229	4,416	4,810	4,951
24	11,500	4,040	4,218	4,213	4,399	4,790	4,927
25	12,000	4,023	4,194	4,189	4,374	4,770	4,905
26	12,500	4,000	4,171	4,173	4,359	4,754	4,875
27	13,000	3,983	4,161	4,151	4,339	4,734	4,851
28	13,500	3,965	4,136	4,134	4,318	4,719	4,836
29	14,000	3,948	4,119	4,125	4,298	4,702	4,814
30	14,500	3,931	4,102	4,103	4,281	4,687	4,796
31	15,000	3,915	4,087	4,092	4,263	4,669	4,779
32	16,000	3,885	4,049	4,063	4,230	4,643	4,742
33	17,000	3,864	4,022	4,031	4,203	4,613	4,711
34	18,000	3,834	3,995	4,008	4,170	4,583	4,681
35	19,000	3,810	3,971	3,982	4,147		4,653
36	20,000	3,786	3,942	3,960	4,118	4,535	4,624
37	25,000	3,674	3,827	3,860	4,005	4,412	4,508
38	30,000	3,573	3,729	3,772	3,912	4,298	4,411
39	35,000	3,488	3,631	3,693	3,836	4,199	4,328
40	40,000	3,453	3,535	3,622	3,768	4,118	4,255
41	45,000	3,427	3,482	3,566	3,705	4,044	4,193
42	50,000	3,400	3,449	3,530	3,648	3,976	4,134
43	55,000	3,376	3,429	3,508	3,595	3,928	4,090
44	60,000	3,350	3,405	3,488	3,565	3,879	4,047
45	70,000	3,321	3,360	3,447	3,524	3,797	3,977
46	80,000	3,330	3,334	3,409	3,498	3,723	3,934
47	90,000	3,434	3,335	3,378	3,480	3,660	3,861

Tabela B.5 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 34°C  
(Itaquara).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH_10%
1	0,000	6,675	6,972	6,993	6,989	6,885	7,015
2	,500	6,165	6,100	6,273	6,316	6,229	6,704
3	1,000	5,829	5,773	5,971	6,126	6,053	6,476
4	1,500	5,498	5,480	5,628	5,922	5,950	6,337
5	2,000	5,242	5,191	5,421	5,722	5,823	6,180
6	2,500	5,092	5,021	5,250	5,521	5,692	6,023
7	3,000	4,977	4,864	5,097	5,381	5,557	5,903
8	3,500	4,878	4,735	4,970	5,244	5,451	5,807
9	4,000	4,820	4,653	4,686	5,132	5,346	5,705
10	4,500	4,749	4,585	4,779	5,029	5,265	5,618
11	5,000	4,709	4,530	4,719	4,955	5,191	5,545
12	5,500	4,662	4,478	4,658	4,874	5,114	5,490
13	6,000	4,630	4,433	4,602	4,818	5,056	5,431
14	6,500	4,586	4,390	4,543	4,756	4,989	5,373
15	7,000	4,556	4,354	4,513	4,698	4,927	5,322
16	7,500	4,519	4,312	4,476	4,659	4,882	5,276
17	8,000	4,479	4,272	4,436	4,613	4,836	5,234
18	8,500	4,454	4,255	4,409	4,579	4,794	5,184
19	9,000	4,425	4,216	4,377	4,538	4,755	5,152
20	9,500	4,402	4,194	4,349	4,514	4,718	5,120
21	10,000	4,363	4,169	4,329	4,482	4,683	5,090
22	10,500	4,332	4,148	4,300	4,455	4,646	5,050
23	11,000	4,315	4,114	4,275	4,427	4,618	5,028
24	11,500	4,289		4,248	4,405	4,588	5,000
25	12,000	4,261	4,074	4,430	4,382	4,565	4,973
26	12,500	4,236	4,052	4,210		4,540	4,948
27	13,000	4,213	4,036	4,190	4,338	4,513	4,926
28	13,500	4,185	4,020	4,177	4,320	4,490	4,900
29	14,000	4,170	4,006	4,150	4,300	4,471	4,878
30	14,500	4,147	3,984	4,135	4,280	4,452	
31	15,000	4,120	3,974	4,115	4,264	4,429	4,843
32	16,000	4,080	3,940	4,090	4,235	4,401	4,808
33	17,000	4,043	3,908	4,056	4,202	4,368	4,768
34	18,000	4,005	3,882	4,029	4,172	4,336	4,737
35	19,000	3,968	3,856	4,003	4,145	4,307	4,706
36	20,000	3,930	3,833	3,977	4,124	4,284	4,683
37	25,000	3,783	3,723	3,866	4,018	4,177	4,557
38	30,000	3,637	3,619	3,783	3,924	4,094	4,447
39	35,000	3,500	3,527	3,705	3,867	4,027	4,378
40	40,000	3,406	3,476	3,627	3,802	3,975	4,310
41	45,000	3,363	3,446	3,557	3,743	3,931	4,254
42	50,000	3,344	3,421	3,528	3,688	3,889	4,207
43	55,000	3,323	3,398	3,509	3,634	3,852	4,162
44	60,000	3,310	3,376	3,491	3,588	3,821	4,120
45	70,000	3,296	3,338	3,459	3,546	3,757	4,057
46	80,000	3,407	3,399	3,433	3,518	3,695	3,999
47	90,000	3,441	3,425	3,423	3,501	3,642	3,949



Tabela B.6 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 36°C  
(Itaquara).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH_10%
1	0,000	6,745	6,870	7,098	7,106	7,014	7,192
2	,500	5,833	6,102	6,069	6,901	6,365	6,546
3	1,000	5,572	5,724	5,830	6,387	6,151	6,413
4	1,500	5,208	5,376	5,592	6,051	5,965	6,308
5	2,000	4,979	5,139	5,357	5,803	5,809	6,195
6	2,500	4,798	4,958	5,174	5,605	5,668	6,079
7	3,000	4,672	4,810	5,047	5,469	5,543	5,968
8	3,500	4,583	4,693	4,914	5,349	5,447	5,853
9	4,000	4,510	4,613	4,821	5,256	5,342	5,763
10	4,500	4,447		4,735	5,167	5,263	5,674
11	5,000	4,402	4,488	4,672	5,099	5,200	5,602
12	5,500	4,353	4,423	4,602	5,031	5,131	5,533
13	6,000	4,311	4,385	4,544	4,976	5,058	5,463
14	6,500	4,271	4,340	4,499	4,923	5,008	5,411
15	7,000	4,238	4,304	4,457	4,882	4,954	5,358
16	7,500	4,202		4,412	4,837	4,907	5,302
17	8,000	4,170	4,237	4,377	4,795	4,859	5,262
18	8,500	4,142	4,209	4,345	4,465	4,821	5,218
19	9,000	4,114	4,179	4,314	4,731	4,784	5,180
20	9,500	4,092	4,149	4,289	4,705	4,741	5,139
21	10,000	4,070	4,129	4,264	4,675	4,706	5,110
22	10,500	4,040	4,104	4,241	4,655	4,681	5,079
23	11,000	4,022	4,079	4,211	4,629	4,648	5,051
24	11,500	3,998	4,055	4,189	4,606	4,623	5,021
25	12,000	3,978	4,040	4,169	4,582	4,594	4,991
26	12,500	3,962	4,021	4,146	4,565	4,571	4,971
27	13,000	3,945	4,004	4,131	4,542	4,545	4,944
28	13,500	3,924	3,988	4,111	4,523	4,532	4,921
29	14,000	3,906	3,971	4,096	4,504	4,507	4,899
30	14,500		3,958	4,080	4,486	4,485	4,884
31	15,000	3,878	3,945	4,064	4,471	4,465	4,867
32	16,000	3,849	3,913	4,034	4,432	4,425	4,830
33	17,000	3,824	3,888	4,008	4,402	4,400	4,798
34	18,000	3,798	3,867	3,983	4,371	4,364	4,765
35	19,000	3,773	3,842	3,364	4,340	4,334	4,735
36	20,000	3,745	3,818	3,940	4,314	4,314	4,715
37	25,000	3,636	3,725	3,850	4,190	4,215	4,608
38	30,000	3,535	3,631	3,775	4,095	4,136	4,519
39	35,000	3,468	3,551	3,707	4,012	4,074	4,452
40	40,000	3,443	3,518	3,644	3,942	4,030	4,393
41	45,000	3,425	3,492	3,583	3,885	3,991	4,343
42	50,000	3,406	3,470	3,552	3,827	3,958	4,305
43	55,000	3,386	3,449	3,531	3,779		4,268
44	60,000	3,367	3,429	3,514	3,732	3,901	4,233
45	70,000	3,383	3,393	3,488	3,636	3,847	4,184
46	80,000	3,488	3,442	3,466	3,556	3,797	4,135
47	90,000	3,527	3,503	3,494	3,495	3,749	4,093

Tabela B.7 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 38°C  
(Itaiquara).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH_10%
1	0,000	6,107	6,967	6,983	7,038	7,075	7,135
2	,500	6,129	6,200	6,127	6,603	6,866	6,737
3	1,000	5,762	5,880	5,883	6,233	6,596	6,489
4	1,500	5,411	5,525	5,596	5,943	6,364	6,334
5	2,000	5,124	5,270	5,383	5,745	6,186	6,176
6	2,500	4,953	5,041	5,217	5,562	6,014	6,027
7	3,000	4,830	4,909	5,070	5,424	5,874	5,912
8	3,500	4,744	4,783	4,949	5,322	5,747	5,809
9	4,000	4,664	4,687	4,823	5,223	5,640	5,706
10	4,500	4,596	4,605	4,755	5,142	5,542	5,618
11	5,000	4,538	4,523	4,681	5,060	5,460	5,553
12	5,500	4,491		4,615	4,989	5,372	5,488
13	6,000	4,443	4,429	4,562	4,935	5,311	5,434
14	6,500	4,395	4,384	4,513	4,877	5,249	5,376
15	7,000	4,357	4,342	4,465	4,824	5,196	5,336
16	7,500	4,328	4,305	4,431	4,780	5,143	5,285
17	8,000	4,289	4,268	4,391	4,745	5,104	5,249
18	8,500	4,255	4,230	4,358	4,703	5,059	5,211
19	9,000	4,219	4,203	4,332	4,671	5,026	5,178
20	9,500	4,191	4,178	4,302	4,630	4,981	5,150
21	10,000	4,154	4,154	4,278	4,602	4,953	5,115
22	10,500	4,133	4,122	4,256	4,575	4,923	5,087
23	11,000	4,108	4,104	4,234	4,545	4,893	5,063
24	11,500	4,087	4,083	4,208	4,519	4,863	5,043
25	12,000	4,071	4,064	4,191	4,498	4,838	5,023
26	12,500	4,040	4,036	4,176	4,474	4,815	5,004
27	13,000	4,033	4,026	4,159	4,457	4,792	4,984
28	13,500	4,006	4,007	4,143	4,435	4,771	4,965
29	14,000	3,988	3,992	4,126	4,417	4,748	4,945
30	14,500	3,970	3,984	4,113	4,395	4,726	4,929
31	15,000	3,953	3,964	4,100	4,377	4,707	4,912
32	16,000	3,922	3,941	4,080	4,348	4,677	4,888
33	17,000	3,893	3,914	4,052	4,318	4,644	4,863
34	18,000	3,867	3,893	4,033	4,294	4,614	4,833
35	19,000	3,839	3,871	4,011	4,274	4,588	4,815
36	20,000	3,814	3,852	3,993	4,248	4,556	4,795
37	25,000	3,704	3,766	3,930	4,161	4,453	4,712
38	30,000	3,604	3,692	3,867	4,094	4,375	4,653
39	35,000	3,518	3,620	3,817	4,048	4,316	4,600
40	40,000	3,469	3,553	3,766	4,002	4,264	4,557
41	45,000	3,460	3,524	3,726	3,967	4,223	4,521
42	50,000	3,457	3,509	3,680	3,939	4,190	4,486
43	55,000	3,455	3,495	3,640	3,907	4,156	4,455
44	60,000	3,459	3,486	3,601	3,881	4,127	4,428
45	70,000	3,530	3,475	3,550	3,829	4,073	4,379
46	80,000	3,591	3,547	3,533	3,779	4,028	4,336
47	90,000	3,612	3,589	3,546	3,737	3,984	4,301

Tabela B.8 - Cinética de decaimento de pH para a temperatura de 40°C  
(Itaiquara).

	1 TEMPO	2 ETOH_0%	3 ETOH_2%	4 ETOH_4%	5 ETOH_6%	6 ETOH_8%	7 ETOH_10%
1	0,000	5,889	6,092	6,157	6,032	5,893	6,401
2	,500	5,636	6,210	6,760	6,582	7,237	6,949
3	1,000	5,318	5,824	6,255	6,201	6,749	6,729
4	1,500	4,989	5,460	5,915	6,035	6,504	6,557
5	2,000	4,778	5,215	5,660	5,842	6,262	6,402
6	2,500	4,631	5,012	5,467	5,670	6,072	6,266
7	3,000	4,528	4,845	5,318	5,486	5,923	6,101
8	3,500	4,444	4,760	5,190	5,383	5,798	
9	4,000	4,374	4,675	5,090	5,279	5,695	5,909
10	4,500	4,325	4,605	5,010	5,190	5,595	5,815
11	5,000	4,273	4,530	4,913	5,105	5,525	5,736
12	5,500	4,235	4,474	4,851	5,034	5,453	5,667
13	6,000	4,188	4,431	4,796	4,975	5,400	5,597
14	6,500	4,149	4,385	4,740	4,910	5,336	5,541
15	7,000	4,119	4,342	4,694	4,862	5,291	5,487
16	7,500	4,090	4,307	4,632	4,818	5,250	5,438
17	8,000	4,065	4,276	4,599	4,782	5,207	5,402
18	8,500	4,039	4,246	4,563	4,744	5,172	5,362
19	9,000	4,017	4,222	4,542	4,710	5,141	5,330
20	9,500	3,995	4,192	4,511	4,672	5,105	5,300
21	10,000	3,973	4,171	4,479	4,641	5,081	5,274
22	10,500	3,954	4,146	4,461	4,598	5,053	5,243
23	11,000	3,940	4,125	4,432	4,574	5,030	5,220
24	11,500	3,925	4,107	4,410	4,549	5,010	5,200
25	12,000	3,913	4,090	4,383	4,525	4,982	5,179
26	12,500	3,898	4,071	4,363	4,505	4,965	5,158
27	13,000	3,888	4,057	4,343	4,484	4,947	5,141
28	13,500	3,872	4,044	4,333	4,469	4,926	5,127
29	14,000	3,860	4,029	4,319	4,453	4,911	5,109
30	14,500	3,849	4,011	4,292	4,428	4,897	5,097
31	15,000	3,842	4,001	4,276	4,415	4,882	5,079
32	16,000	3,818	3,975	4,253	4,386	4,851	5,057
33	17,000	3,800	3,958	4,232	4,362	4,826	5,038
34	18,000	3,783	3,940	4,200	4,333	4,798	5,018
35	19,000	3,771	3,920	4,183	4,313	4,778	5,004
36	20,000	3,755	3,904	4,165	4,287	4,761	4,989
37	25,000	3,690	3,835	4,090	4,215	4,675	4,936
38	30,000	3,625	3,781	4,045	4,171	4,611	4,905
39	35,000	3,579	3,732	4,007	4,148	4,567	4,886
40	40,000	3,578	3,685	3,976	4,133	4,524	4,867
41	45,000	3,573	3,640	3,943	4,122	4,489	4,845
42	50,000	3,572	3,604	3,912	4,106	4,461	4,828
43	55,000	3,573	3,581	3,882	4,096	4,432	4,810
44	60,000	3,563	3,581	3,853	4,082	4,407	4,796
45	70,000	3,555	3,591	3,814	4,059	4,368	4,769
46	80,000	3,624	3,639	3,780	4,039	4,335	4,747
47	90,000	3,658	3,694	3,756	4,016	4,314	4,738