



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
COORDENAÇÃO DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA**

**ESTUDO DE CONDIÇÕES ÓTIMAS PELO MÉTODO DE ANÁLISE  
DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EFICIÊNCIA DA  
FERMENTAÇÃO ACÉTICA**

**MESTRANDA: JOELMA MORAIS FERREIRA**

**ORIENTADORES: Dr. FLÁVIO LUIS HONORATO DA SILVA  
Dr. RAMDAYAL SWARNAKAR**

**ESTUDO DE CONDIÇÕES ÓTIMAS PELO MÉTODO DE ANÁLISE DE  
SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EFICIÊNCIA DA FERMENTAÇÃO  
ACÉTICA**

**JOELMA MORAIS FERREIRA**

Dissertação apresentada ao Curso de  
Mestrado em Engenharia Química da  
Universidade Federal da Paraíba, em  
cumprimento às exigências para  
obtenção do Grau de Mestre em  
Engenharia Química.

**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: OPERAÇÕES E PROCESSOS**

**ORIENTADORES: Dr. FLÁVIO LUIS HONORATO DA SILVA  
Dr. RAMDAYAL SWARNAKAR**

**Campina Grande - Paraíba**



F383e Ferreira, Joelma Morais  
Estudo de condicoes otimas pelo metodo de analise de  
superficie de resposta para eficiencia da fermentacao  
acetica / Joelma Morais Ferreira. - Campina Grande, 2001.  
94 f. : il.

Dissertacao (Mestrado em Engenharia Quimica) -  
Universidade Federal da Paraiba, Centro de Ciencias e  
Tecnologia.

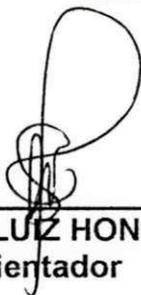
1. Fermentacao Acetica 2. Superficie de Resposta 3.  
Vinagre 4. Dissertacao - Engenharia Quimica I. Silva,  
Flavio Luiz Honorato da II. Swarnakar, Ramdayal III.  
Universidade Federal da Paraiba - Campina Grande (PB) IV.  
Título

CDU 663.15(043)

**ESTUDO DE CONDIÇÕES ÓTIMAS PELO MÉTODO DE ANÁLISE DE  
SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA EFICIÊNCIA DA FERMENTAÇÃO  
ACÉTICA**

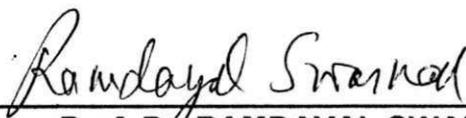
**JOELMA MORAIS FERREIRA**

**DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26 / 04 / 2001**



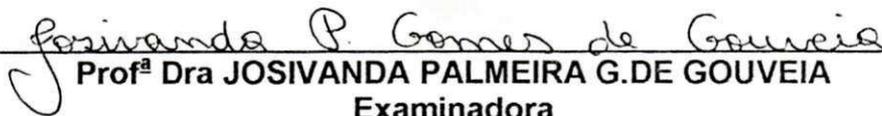
---

**Prof. Dr. FLÁVIO LUZ HONORATO SILVA**  
Orientador



---

**Prof. Dr. RAMDAYAL SWARNAKAR**  
Orientador



---

**Profª Dra JOSIVANDA PALMEIRA G. DE GOUVEIA**  
Examinadora



---

**Profª Dra MARIA WILMA N.C. CARVALHO**  
Examinadora

## DEDICATÓRIA

Ao Meu Pai Manoel Ferreira.

A memória da minha Mãe Josefa Morais.

Aos meus irmãos Joselma, Janailma e Joelson.

A Luis Eduardo, meu sobrinho.

## AGRADECIMENTOS

"Entrega o teu caminho ao Senhor, confia nele e o mais Ele fará" (Sl 37:5).

Em primeiro lugar quero agradecer à **Deus**, por ter dado a oportunidade de realizar mais um sonho e me fortalecido com muita perseverança e inteligência, superando as dificuldades enfrentadas ao longo deste caminho percorrido.

Ao meu **Pai Manoel** que não mediu esforços para concretização deste meu sonho e sempre me apoiou em todos os momentos. À minha **Mãe Josefa**, que apesar do pouco tempo presente nesta caminhada sempre esteve orgulhosamente ao meu lado dando força e incentivo em todos os instantes.

À toda minha família que tão carinhosamente me ajudou, principalmente meus irmãos (**Joselma, Janailma e Joelson**), **Cau** e meu Sobrinho **Luís Eduardo**.

Aos professores **Ramdayal Swarnakar** e **Flávio Luís Honorato** pela amizade e orientação, possibilitando-me desta forma crescer nos meus conhecimentos teóricos e práticos.

À minha Turma Especial e Inesquecível (**Christiano, Bonádia, Fabiana, Gorethe, Josy e Keila**) que estiveram ao meu lado em todos os momentos, incentivando e apoiando em tudo. Agradeço a Deus por ter colocado todos vocês no meu caminho.

Aos Amigos (**Elba, Zora, Múcio, Isolda, Sharline, Wilma, Suelândia, Lucimar, Flávio, Cristiane, Joselito, Jadilson, Franklin, Drailton, João e Hebert**) que conquistei no mestrado e que tiveram grandes contribuições nessa etapa da minha vida.

À minha Amiga **Mônica** (Bola) e toda sua família pela amizade, incentivo e orações.

Ao funcionário do Laboratório de Bioquímica, **Sr João**, pela ajuda fornecida ao longo do trabalho.

Às secretárias da coordenação de pós-graduação em Engenharia Química, **D.Maria José e Maricé**, pela paciência e dedicação oferecida.

À **CAPES**, pelo suporte financeiro.

À **Roseany**, pela ajuda nas vezes que esteve presente na hora da preparação e coleta das amostras.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram diretamente e indiretamente para a realização deste trabalho.

## **SUMÁRIO**

<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b>	<b>iii</b>
<b>RESUMO</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b><u>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO</u></b>	<b><u>1</u></b>
<b><u>CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u></b>	<b><u>5</u></b>
<b>2.1 – FERMENTAÇÃO</b>	<b>5</b>
2.1.1 – FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA	6
2.1.2 – FERMENTAÇÃO CONTÍNUA	7
2.1.3 – FERMENTAÇÃO SEMICONTÍNUA	8
<b>2.2 – PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO</b>	<b>8</b>
2.2.1 – PROCESSOS DE FABRICAÇÃO DE VINAGRE	14
2.2.2 - COMPARAÇÃO ENTRE OS PROCESSOS DE FABRICAÇÃO	17
<b>2.3 – RENDIMENTO E PRODUTIVIDADE</b>	<b>18</b>
<b>2.4 – USOS DO VINAGRE</b>	<b>19</b>
<b>2.5 – CINÉTICA DO PROCESSO</b>	<b>20</b>
2.5.1 – CINÉTICA DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS	21
2.5.1.1 – MODELO DE MICHAELIS E MENTEM	22
2.5.2 - CINÉTICA DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS	25
2.5.2.1 - MODELO DE MONOD	25
<b>2.6 – PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO</b>	<b>27</b>
2.6.1 – SIMPLEX SEQUÊNCIAL	30
2.6.2–PLANEJAMENTO FATORIAL E ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	31

<b><u>CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS</u></b>	<b>34</b>
<b>3.1 – MATERIAIS E EQUIPAMENTOS</b>	<b>34</b>
<b>3.2 – METODOLOGIA EXPERIMENTAL</b>	<b>34</b>
<b><u>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES</u></b>	<b>40</b>
<b>4.1 – CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO</b>	<b>40</b>
<b>4.2 – PLANEJAMENTO FATORIAL E ANÁLISE DE SUPERFÍCIE</b>	<b>43</b>
<b><u>CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES</u></b>	<b>65</b>
<b><u>CAPÍTULO 6 - PERSPECTIVAS</u></b>	<b>67</b>
<b><u>CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u></b>	<b>68</b>
<b><u>ANEXOS</u></b>	<b>71</b>
<b>ANEXO A</b>	<b>72</b>
<b>ANEXO B</b>	<b>76</b>
<b>ANEXO C</b>	<b>87</b>
<b>ANEXO D</b>	<b>92</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da produção de vinagre	12
Figura 2 - Representação esquemática da equação de Michaelis - Mentem	23
Figura 3 - Representação esquemática da equação de Lineweaver-Burk	24
Figura 4 - Variação da velocidade específica de crescimento com a concentração de substrato limitante	26
Figura 5 - Esquema do sistema utilizado na obtenção dos dados experimentais	36
Figura 6 - Esquema da metodologia experimental	39
Figura 7 - Perfil da molaridade do ácido acético formado versus o tempo para concentração de fósforo igual à 0,05g/ml na ausência de nitrogênio.	43
Figura 8 - Perfil da molaridade do ácido acético formado versus o tempo para concentração de fósforo igual à 0,2g/ml na ausência de nitrogênio	43
Figura 9 - Perfil da molaridade do ácido acético formado versus o tempo para concentração de nitrogênio igual à 0,5g/ml na ausência de fósforo	44
Figura 10 - Perfil da molaridade do ácido acético formado versus o tempo para concentração de nitrogênio igual à 2,0g/ml na ausência de fósforo	44
Figura 11 - Valores observados versus valores previstos para o modelo linear (a)(Rendimento e (b) Produtividade	49
Figura 12 - Efeitos da concentração de etanol e do fósforo sobre o rendimento.	52
Figura 13 - Efeitos da concentração de etanol e fósforo sobre a produtividade.	53
Figura 14 - Efeitos da concentração de etanol e nitrogênio sobre o rendimento	54
Figura 15 - Efeitos da concentração de etanol e nitrogênio sobre a produtividade	55
Figura 16 - Efeitos da concentração do fósforo e nitrogênio sobre o rendimento	56
Figura 17 - Efeitos da concentração do fósforo e nitrogênio sobre a produtividade	57

Figura 18 - Valores observados versus valores previstos para o modelo 61 quadrático. (a) Rendimento e (b) Produtividade.

Figura 19 - Efeitos do fósforo e nitrogênio sobre o rendimento no segundo 62 planejamento

Figura 20 - Efeitos do fósforo e nitrogênio sobre a produtividade no segundo 63 planejamento.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das bactérias e produção de ácido acético	9
Tabela 2 – Produtividade média dos processos de produção de vinagre	19
Tabela 3 - Análise de Variância (ANOVA)	28
Tabela 4 – Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo $2^3$	38
Tabela 5 – Matriz do Planejamento experimental fatorial $2^3$	38
Tabela 6 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial $2^2$ + configuração estrela	40
Tabela 7 – Matriz do Planejamento experimental fatorial $2^2$ + configuração estrela mantendo a concentração de etanol em 6%	41
Tabela 8 - Valores da velocidade inicial da reação	42
Tabela 9 - Resultados obtidos do planejamento experimental fatorial $2^3$	46
Tabela 10 - Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o rendimento	47
Tabela 11-Análise da variância para o ajuste do modelo linear para a produtividade	48
Tabela 12 - Resultados do planejamento experimental fatorial $2^2$ + configuração estrela	58
Tabela 13 - Análise da variância para o ajuste do modelo quadrático do segundo planejamento para o rendimento.	60
Tabela 14 - Análise da variância para o ajuste do modelo quadrático do segundo planejamento para a produtividade.	60

## RESUMO

A fermentação acética é um processo de oxidação realizada por um conjunto de bactérias do gênero *Acetobacter*. O ácido acético produzido por bactérias desse gênero é o composto principal do vinagre. A produção de um bom vinagre depende de uma série de fatores como concentração de álcool, temperatura, oxigenação, pH e nutrientes. Este trabalho teve por objetivo estudar em escala de bancada as melhores condições da fermentação acética em batelada, processo muito utilizado nas indústrias de pequeno porte do Estado da Paraíba na produção do vinagre. Inicialmente, realizou-se um estudo cinético da fermentação acética com a intenção de determinar a influência das variáveis: concentração de etanol, concentração de fósforo e concentração de nitrogênio sobre o processo em diferentes intervalos de tempo. Para esse estudo, realizou-se ensaios com concentrações de etanol de 2, 4, 6 e 8%, concentrações de fósforo de 0,05 e 0,2g.ml<sup>-1</sup>, e concentrações de nitrogênio de 0,5 e 2,0 g.ml<sup>-1</sup>. Através da cinética não foi possível observar conclusivamente a influência das variáveis estudadas no processo. Foi utilizado a metodologia de planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, onde as variáveis de entrada foram: concentração inicial de etanol, concentração de fósforo e concentração de nitrogênio. Foram realizados ensaios com concentrações de etanol de 3, 6 e 9%, em volume, concentrações de fósforo de 0,01, 0,03 e 0,05 g.ml<sup>-1</sup> e concentrações de nitrogênio de 0,1, 0,3 e 0,5 g.ml<sup>-1</sup>. Após as análises foi necessário elaborar um outro planejamento, ampliando as faixas das variáveis, desta vez o planejamento foi do tipo 2<sup>2</sup> mais configuração estrela. Através dos modelos matemáticos empíricos obtidos e análise de superfície de resposta verificou-se que a variável controlada, dentre as estudadas, que apresentou maior influência sobre o rendimento e produtividade do processo, foi a concentração inicial de etanol, que apresentou um valor ótimo em 4%. O nitrogênio apresentou uma discreta influência a uma concentração de 1,7 g.ml<sup>-1</sup> enquanto que o fósforo não exerceu nenhuma influência perceptível. Foi possível também observar, através dos dados da análise de variância, que o modelo empírico encontrado é estatisticamente significativo.

## ABSTRACT

The acetic fermentation is an oxidation process accomplished by a group of bacterias of the gender *Acetobacter*. The acetic acid produced by bacterias of this gender is the main compound of the vinegar. The production of a good vinegar depends on a series of factors as concentration of alcohol, temperature, oxygenation, pH and nutritious. This work had objective to study on bench scale, the optimum conditions of acetic acid fermentation, a process very much used in small industries of the state of Paraíba in the production of the vinegar. Initially a kinetic study of the acetic fermentation was performed with the intention of determining the influence of the variables: ethanol concentration, phosphorous concentration and concentration of nitrogen on the process in different intervals of time. For this a study with concentrations of ethanol of 2%, 4%, 6% and 8%, of phosphorous 0,05g/ml and 0,2g/ml, and of nitrogen of 0,5g/ml and 2,0g/ml, was made. Through the kinetics, it was not possible to observe conclusively the influence of the variables of the process studied. The methodology of complete factorial  $2^3$  planning was used, where the entrance variables were initial concentrations of ethanol, phosphorous and nitrogen. Tests were, accomplished with concentrations of ethanol 3%, 6% and 9%, in volume, concentrations of phosphorus 0,01g/ml, 0,03g/ml and 0,05g/ml and concentrations of nitrogen 0,1g/ml, 0,3g/ml and 0,5g/ml. After the analyses it was necessary to elaborate another planning, enlarging the range of the variables. This time the planning was of the type  $2^2$  plus star configuration. Through the empirical mathematical models obtained and analysis of surface response it was verified that the controlled variable that presented great influence on the yield and productivity of the process was initial concentration of ethanol which has an optimum value of 4%. The nitrogen presented a discreet influence at the concentration of 1,7g/ml while the phosphorus didn't show any perceptible influence. It was also possible to observe, through the data of the variance analysis, that the empirical model observed is statistically significant.

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

A fermentação acética é realizada por um conjunto de bactérias do gênero *Acetobacter* ou *Gluconobacter*, da família pseudomonaceae. O nome do gênero *Acetobacter* foi originalmente utilizado para determinar todas as bactérias do ácido acético, mas hoje já se sabe que essas bactérias compreendem um gênero bacteriano bem heterogêneo. Um outro gênero presente no grupo das bactérias do ácido acético, denominado primeiramente *Acetomonas* e posteriormente *Gluconobacter*, apesar de produzirem ácido acético, o fazem de forma pouco eficiente. As *Acetobacters* são bactérias muito pequenas, em forma de bastonete muito curtos, geralmente sem mobilidade, são aeróbias e podem usar vários hidratos de carbono como substratos, embora sua fonte favorita de energia seja o álcool etílico que oxidam para formar o ácido acético, quando lhes é fornecido oxigênio (CRUESS, 1973). As *Acetobacters* são muito produtivas. Em contrapartida pelo seu desempenho elas requerem condições especiais para o seu trabalho:

- Relação balanceada entre as concentrações de álcool e ácido acético;
- Perfeita oxigenação do meio;
- Faixa do pH;
- Concentração adequada dos nutrientes essenciais;
- Temperatura de fermentação favorável

O ácido acético produzido por bactérias desse gênero é o composto principal do vinagre, condimento obtido a partir da fermentação alcoólica do mosto açucarado e subsequente "fermentação acética". A palavra "vinagre" deriva de: "vin" - vinho e "aigre" - amargo. Sua origem é muito antiga, não tendo data definida para o seu aparecimento. Seu uso não é restrito ao

tempero de alimentos, encontra-se várias utilidades para o vinagre na cultura popular, desde saúde à limpeza. Com um produto já estabelecido e bem aceito, o vinagre básico na cultura alimentar do brasileiro.

Os processos fermentativos podem ser classificados de acordo com a maneira da qual o substrato é adicionado e o produto é retirado. Quando o substrato é inicialmente carregado num recipiente e ao término do processo o produto é retirado do mesmo, chama-se fermentação descontínua, já a fermentação contínua é quando a vazão é a mesma tanto quando a matéria-prima é adicionada no processo como na retirada do meio fermentado. Também tem a fermentação semi-contínua, que é considerada como intermediária entre os processos contínuos e descontínuos e que ocorre quando a adição do meio e retirada do produto são realizadas interminantemente.

Os processos contínuos destacam-se entre os outros processos pela sua importância, principalmente com relação ao aspecto econômico, pois apesar da escassez das instalações industriais existentes e da pouca diversificação dos produtos fabricados, muitos pesquisadores têm mostrado, em escala-piloto ou semi-industrial, a possibilidade de fabricação de diversos produtos através de cultivo contínuo, e também as vantagens deste sobre as fermentações descontínuas (BORZANI *et al.*, 1986).

As fermentações para produção de vinagre podem ser realizadas pelo processo lento, rápido ou submerso. O processo lento é um método pouco utilizado em escala comercial devido à baixa rentabilidade e lentidão, sendo indicado apenas para produção caseira (ZARDINI, 2000). O método submerso, embora rápido, eficiente e com rendimento e produtividade alta, tem seus inconvenientes por causa do seu elevado custo de instalação além de requerer um controle eficiente, principalmente na aeração e temperatura. O processo rápido é adequado para ser utilizado em regiões com poucos recursos técnicos, pois apesar de apresentar baixos valores de rendimento e produtividade possui a vantagem de apresentar pequenos custos de instalação.

A produção de ácido acético por fermentação, utilizando o álcool etílico, apresenta vantagens econômicas. Dezenas de pequenas indústrias de "fundo de quintal" na região Nordeste, produz o vinagre, utilizando o álcool etílico, por

ser a matéria-prima mais barata comparada com as demais. Em função desta produção, na sua maioria usarem dados sem consistência, ou seja, sem critérios técnicos, faz-se necessário um estudo cinético e a análise das variáveis que interferem no sistema. Com base nestes dados é possível fazer a otimização do processo de produção de vinagre, possibilitando resultados eficientes (altos rendimentos e altas produtividades), além de ajudar a aumentar os conhecimentos a respeito da fermentação acética. Com o estudo, pode-se facilitar a implantação das faixas ótimas encontradas nos processos de produção de vinagre locais (pequenas e médias empresas), aumentando o ganho econômico destes produtores.

Um dos problemas mais comuns que um experimentador pode enfrentar é a determinação da influência de uma ou mais variáveis sobre uma outra variável de interesse. Uma das maneiras para resolver este problema é a utilização de métodos utilizando o planejamento experimental, como por exemplo o método de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta.

O planejamento experimental e otimização pelo método de análise de superfície de resposta tem como princípio a técnica de planejamento fatorial, onde os experimentos são programados através de um planejamento fatorial (BOX *et al.*, 1978), sendo então possível a realização de vários experimentos ao mesmo tempo.

O principal objetivo do planejamento fatorial é relacionar empiricamente as variáveis dependentes (respostas) com as variáveis independentes (variáveis de entrada), além de se poder determinar estatisticamente o efeito de cada variável na(s) resposta(s) desejada(s).

Partindo deste princípio, é possível o planejamento e realização do processo de maneira organizada e utilizando uma quantidade mínima necessária de experimentos.

Desta forma o objetivo deste trabalho foi estudar a cinética da fermentação acética, para obter os dados sobre as faixas das variáveis do processo e usando as faixas das condições escolhidas avaliar a influência das variáveis: concentração inicial do álcool e concentração dos nutrientes: fósforo e

nitrogênio, utilizando o planejamento experimental fatorial e análise de superfície de resposta para otimização do processo.

## CAPÍTULO 2

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 2.1 - FERMENTAÇÃO

O termo “fermentação”, no sentido mais amplo possível, pode ser definido como todo processo no qual microrganismos catalisam a conversão de uma dada substância num determinado produto (BORZANI *et al.*, 1986). Muitas vezes a atividade microbiana pode ser utilizada pelo homem na obtenção de compostos orgânicos de grande utilidade, através de processos industriais, simples ou complexos. Dependentemente do processo, este, pode ou não exigir a presença de oxigênio e os microrganismos podem estar incluídos entre os produtos formados.

Para obtenção de uma boa operação do processo de fermentação, alguns critérios devem ser seguidos como:

- Os microrganismos devem propagar-se com facilidade, mantendo uma uniformidade biológica e conseqüentemente um melhor rendimento;
- Fermentação rápida;
- Produto recuperado e purificado com facilidade;
- Rendimentos aceitáveis.

Os fundamentos do entendimento científico da fermentação, na realidade, da ação de todos os microrganismos e, portanto, do seu controle econômico, estão baseados firmemente sobre o gênero de um único homem, Louis Pasteur. Foi ele quem mostrou que a fermentação é diretamente provocada pelo processo vital de pequeninos organismos (SHREVE e BRINK, 1977). É possível controlar os processos de fermentação numa forma científica exata pelo entendimento da atividade dos microrganismos e das condições do meio que afetam de maneira básica a ação dos mesmos.

Segundo SHREVE e BRINK (1977), para compreender e usar corretamente os microrganismos, deve-se fazer uma diferença nítida entre o crescimento inicial de uma certa linhagem escolhida dos organismos até uma certa população e os processos posteriores, em que, mediante a continuação dos processos vitais, ou em consequência de enzimas previamente secretadas, consegue-se a formação da substância química desejada. Para se ter o rendimento químico máximo, é necessário impedir o crescimento adicional da população de microrganismo.

Algumas condições são estabelecidas no controle da atividade dos microrganismos, podendo assim fortalecer inicialmente a multiplicação e sucessivamente seu funcionamento. Durante o período de crescimento, além de alimentação primária, é importante a presença de alguns nutrientes, controle de pH e temperatura favorável ao processo.

Um processo fermentativo genérico pode ser considerado como constituído de duas etapas principais, a saber: a) o preparo do inóculo e b) a fermentação propriamente dita. A primeira etapa tem, basicamente, por finalidade preparar o microrganismo em condições apropriadas, de modo a garantir o desenvolvimento adequado da segunda etapa.

Os processos fermentativos industriais podem ser classificados em três grandes grupos:

- Processos descontínuos;
- Processos contínuos;
- Processos semicontínuos.

### 2.1.1 – FERMENTAÇÃO DESCONTÍNUA

A fermentação descontínua pode ser definida como aquela na qual o substrato é inicialmente colocado em um recipiente e ao final do processo, o produto é retirado do mesmo.

Os processos fermentativos descontínuos podem ser classificados em três grandes grupos:

a) GRUPO I – Processos em que cada dorna recebe um inóculo

Neste tipo de processo, cada fermentador recebe uma quantidade de microrganismos de elevada atividade e basicamente sem nenhuma célula contaminante. Esse sistema é o que oferece condições melhores para uma boa fermentação.

b) GRUPO II – Processos com recirculação de microrganismos

Na fermentação com recirculação, algumas dornas são inoculadas com o pé-de-cuba, uma vez completamente fermentado, centrifuga-se para assim obter-se uma elevada concentração de microrganismos. Nesta suspensão obtida, é geralmente feito um tratamento, visando à eliminação de microrganismos contaminantes, e depois utilizada como inóculo de um outro fermentador. Quando bem conduzida, esta técnica poderá ser desenvolvida, sem necessidade de preparo de novo pé-de-cuba, durante meses consecutivos.

c) GRUPO III – Processos por meio de cortes

Neste processo os microrganismos são colocados em um fermentador, quando este atinge o estágio de fermentação completa, transfere-se parte do conteúdo desse recipiente para um outro vazio, e em seguida, enchem-se os dois fermentadores com o meio a fermentar. Essa operação é conhecida com o nome de corte. A sucessão de cortes pode acarretar uma queda no rendimento do processo, principalmente quando o meio não for esterilizado.

### 2.1.2 - FERMENTAÇÃO CONTÍNUA

A fermentação contínua é um tipo de processo onde a matéria-prima é adicionada com uma vazão constante e o meio fermentado é retirado com a mesma vazão de alimentação. De acordo com BORZANI *et al.* (1986) esse tipo de fermentação ainda constitui um enorme campo a ser explorado, principalmente no que se refere a sua maior aplicação em processos de interesse econômico, constituindo uma das tecnologia mais promissoras no campo da biotecnologia.

### 2.1.3 - FERMENTAÇÃO SEMICONTÍNUA

Numa fermentação semicontínua a adição de meio e retirada de produto são efetuadas interruptamente. Tais processos podem ser considerados como intermediário entre descontínuos e contínuos.

Este tipo de processo de fermentação é utilizado, em alguns casos, em escala industrial.

## 2.2 – PRODUÇÃO DE ÁCIDO ACÉTICO

Ácido acético,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , é um líquido incolor com um odor característico e gosto azedo. Em solução aquosa, funciona como um ácido fraco. É miscível em todas as proporções com água e com muitos solventes orgânicos. É também chamado de ácido acético glacial devido o fato de gelar-se ligeiramente a uma temperatura baixa.

O ácido acético é uma substância química orgânica importante, com uma taxa de produção anual de aproximadamente 4,68 bilhões de libras nos Estados Unidos em 1995 (HUANG e YANG, 1998).

O ácido acético é produzido por um metabolismo microbiano primário chamado de fermentação ácida acética. A fermentação ácida acética é uma fermentação de oxidação, a qual, soluções diluídas de etanol é oxidada através de bactérias ácidas acéticas (REHM e REED, 1983).

A fermentação ácida acética tem uma longa história e muito esforço tem sido feito para melhorar a seleção das bactérias ácidas acéticas e com isso desenvolver processos mais eficientes (FUKAYA *et al.*, 1992).

De acordo com BORZANI *et al.* (1993) a primeira equação química de formação do ácido acético a partir do álcool foi descrita por Döbereiner em 1822 e a identificação dos microrganismos causadores da transformação acética como bactérias foi feita por Knieriem e Mayer em 1873. Em 1878 através de Hansen, outras bactérias ácidas acéticas foram descobertas até que, no século XX, em 1926, Henneberg publica uma obra citando numerosas bactérias acéticas.

ASAI, citado por REHM e REED (1983) classificou bactérias de ácido acético em dois grandes grupos principais válidos até hoje: *Acetobacter* e

*Gluconobacter*. Onde observou que *Gluconobacter* só produziu ácido de glicose, não de etanol. Os dados da Tabela 1 indicam várias espécies de *Acetobacter* quanto a produção de ácido acético.

**Tabela 1 - Classificação das bactérias e produção de ácido acético**

Bactérias produtoras de ácido acético	Ácido acético (%)
<i>A. oxydans</i>	2,0
<i>A. acetigenus</i>	2,7
<i>A. xylinum</i>	4,5
<i>A. pasteurianus</i>	6,2
<i>A. aceti</i>	6,6
<i>A. kuentzingianus</i>	6,6
<i>A. ascendens</i>	9,0
<i>A. schutzenbavhii</i>	10,9

Fonte: ZARDINI, 2000

Embora mais de 100 espécies, subespécies e variedades do gênero *Acetobacter* tenham sido classificadas através dos anos, poucas são aquelas com qualidades industriais, isto é:

- Produzir concentrações elevadas de ácido acético;
- Ter tolerância a concentrações razoáveis de ácido acético;
- Ter tolerância a concentrações razoáveis de etanol;
- Trabalhar em temperaturas entre 25°C e 30°C.

VAUGLN (1942) deu instruções detalhadas para a diferenciação bacteriológica das espécies da *Acetobacter*. Segundo ele este gênero se tornou complicado com um grande número de espécies e é provável que, em considerável número de casos, uma simples espécie tenha recebido vários nomes.

As bactérias acéticas (*Acetobacter*), são bastonetes eclipsoidais, retos ou ligeiramente curvos, ocorrem isolados, aos pares ou em cadeias, às vezes móveis e compreendem um grupo de microrganismos aeróbios. Segundo CRUESS (1973) são bactérias facilmente destruídas pelo calor, em geral a 65°C. As *Acetobacters* são

capazes de fermentar vários açúcares, formando o ácido acético, ou ainda, utilizam este ácido como fonte de carbono, produzindo  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$ .

As *Acetobacters* são muito produtivas, incansáveis transformadoras de álcool do substrato fermentativo em ácido acético. Em contrapartida pelo seu desempenho elas requerem condições especiais para o seu trabalho como:

I) Influência da concentração de álcool – Concentrações de álcool etílico abaixo de 40 g/litro favorecem contaminações e pequenas perdas por evaporação e podem levar a formação de ácido acético com concentração inferior à 4%. De acordo com BORZANI *et al* (1993) concentrações alcoólicas acima de  $100\text{g.l}^{-1}$  são tóxicas à maioria das bactérias acéticas, podendo ser utilizadas só em casos muito especiais quando se trabalha com culturas especialmente adaptadas.

II) Nutrientes – O homem e os microrganismos têm muito em comum no que se refere as suas exigências nutricionais (BORZANI *et al.*, 1990). Os microrganismos apresentam exigências referente ao metabolismo de sais minerais e de acordo com STUPIELO (1985) os elementos carbono, hidrogênio, nitrogênio, fósforo, potássio, enxofre, cálcio e magnésio, em concentrações maiores e os elementos manganês, zinco e ferro, em concentrações menores, assim como a água, são fundamentais. Estes elementos fornecidos nas mais diferentes formas, desempenham papéis de grande importância no metabolismo.

O fósforo é de suma importância no metabolismo de carboidratos, relacionado com o mecanismo de acúmulo, transferência e liberação de energia, através das ligações fosfóricas de alto nível energético (STUPIELO, 1985).

O nitrogênio é um elemento essencial para a vida e todos os seres dele necessitam numa proporção relativamente elevada (BORZANI *et al.*, 1990). O suprimento de nitrogênio é fundamental ao crescimento e a fisiologia dos microrganismos. Segundo STUPIELO (1985) a utilização de sulfato de amônia é recomendada como fonte nitrogenada, devido aos benefícios sobre o rendimento e velocidade de fermentação.

III) Temperatura – O fator temperatura exerce influência tanto na multiplicação dos microrganismos, como na produção do ácido acético. Durante a fermentação,

a temperatura tende a se elevar, em consequência das reações exotérmicas que caracteriza, apresentando os inconvenientes de favorecer o desenvolvimento dos microrganismos indesejáveis e como também a inibição gradativa dos próprios microrganismos. A maioria das bactérias acéticas apresentam ótima atividade entre 25 ou 30°C.

IV) Oxigenação – PARK *et al.* (1989a) afirmam que a concentração de oxigênio dissolvida é um fator importante para se obter uma alta produtividade na produção de ácido acético. O fornecimento adequado de oxigênio, por meio da aeração, depende o sucesso da fermentação. Segundo MURAOKA *et al.* (1982) e PARK *et al.* (1989b) a falta de oxigênio pode ser considerado uma causa principal da deterioração de produção ácida acética em fermentação submersa. Richardson e Takeuchi citado por MURAOKA *et al.*, (1982) mostram a importância da oxigenação no processo fermentativo de obtenção do vinagre. Devido a essas exigências deve-se, dentro dos limites, favorecer o fornecimento de ar e sua transferência às bactérias acéticas.

V) Tempo de fermentação – O tempo de fermentação é variável em cada processo e deve ser conhecido, pois a permanência das bactérias acéticas no ácido acético pode ocasionar perda de acidez devida ao consumo do ácido por esses próprios microrganismos.

VI) pH do meio- O pH tem uma influência profunda em crescimento microbiano. A bactéria acética pode mostrar crescimento ótimo em pH entre 5 e 6,5.

O ácido acético produzido por bactérias do gênero *Acetobacter* é o composto principal do vinagre (BORZANI *et al.*, 1987). Acredita-se que o primeiro vinagre surgiu a partir de um vinho que "passou do ponto" (GONÇALVES, 1998).

A produção de vinagre requer duas fermentações. A primeira é a fermentação alcoólica, quando o açúcar é convertido em álcool e é realizada por leveduras. A segunda é o resultado da oxidação do álcool para dar ácido acético e é causadora pelas bactérias do vinagre (Figura 1).

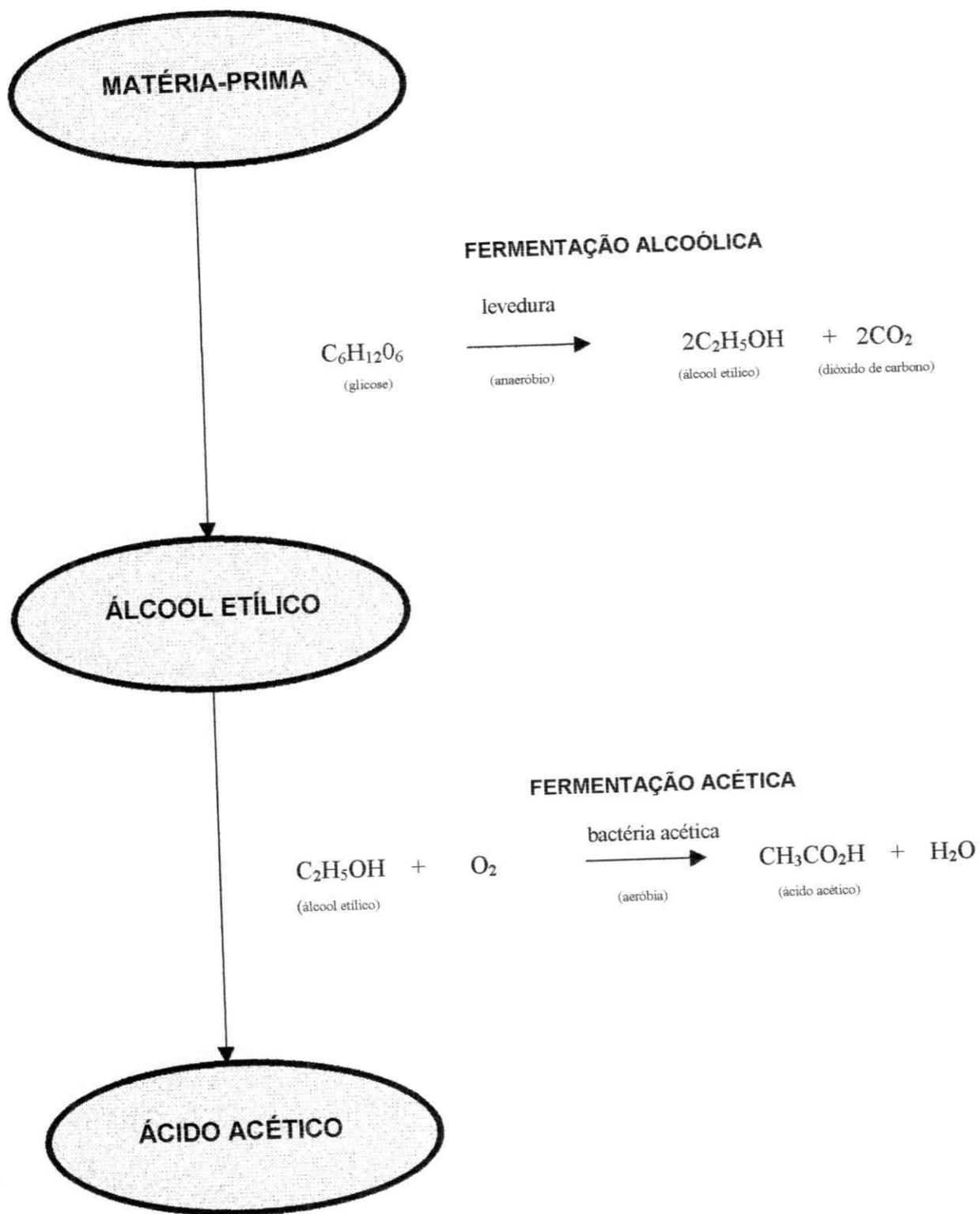


Figura 1 - Esquema da produção de vinagre

Ao entender o processo de fabricação do vinagre, o homem foi capaz de produzir diversos tipos de vinagre, usando vários tipos de matérias-primas. A matéria-prima utilizada para a fabricação do vinagre é variável em função da disponibilidade de cada país. Qualquer fruta que contenha mais de 9% de açúcar pode ser convertida em vinagre. É necessário que primeiro ocorra a fermentação alcoólica desta matéria-prima para depois ocorrer a fermentação acética, resultando o vinagre. As duas fermentações, a alcoólica e a acética, não podem continuar simultaneamente, pelo fato do ácido acético formado pela bactéria do vinagre, diminuir o crescimento e a atividade da levedura.

Ao ser utilizado como alimento, o vinagre de frutas é mais nutritivo por conter mais substâncias assimiláveis pelo organismo, como vitaminas, ácidos orgânicos, e mesmo proteínas e aminoácidos, originários do fruto e da fermentação alcoólica de que proveio. Além disso, os vinhos de frutas dão origem a vinagres mais suaves e menos agressivos ao paladar por ter seu pH atenuado pelas substâncias orgânicas presentes (BORZANI *et al.*, 1993).

Todavia, o álcool etílico apresenta vantagens econômicas por constituir a matéria-prima mais barata quando comparada com as demais. Este fato incentiva a substituição do vinho de frutas por álcool para a produção de vinagre, principalmente em regiões tropicais ou subtropicais com indústrias alcooleira ou açucareira muito desenvolvida.

Como o vinagre provém, em geral, de duas fermentações sucessivas, a alcoólica e a acética, toda matéria-prima usada para a produção fermentativa de álcool serve, em princípio, também como matéria-prima do vinagre.

Segundo REHM e REED (1983), a maioria das bactérias ácidas acéticas utilizadas na indústria de vinagre, não são derivadas de culturas puras. É empregado uma cultura mista de *Acetobacter* contendo uma variabilidade alta de microrganismo que é considerada mais eficiente.

A legislação brasileira diz que vinagre ou vinagre de vinho é produto obtido da fermentação acética do vinho, o qual deve conter uma acidez volátil mínima de 40g por litro expressa em ácido acético (4%), e adicionado de elementos nutritivos para os fermentos acéticos. Sua graduação alcóolica não pode exceder a 1<sup>o</sup>GL e deve ser obrigatoriamente pasteurizado. Deve ser preparado do álcool etílico retificado, limpo, isento de detritos animais e vegetais. Um vinagre com mais de

80g por litro de acidez volátil é o concentrado de vinagre usado exclusivamente para diluição.

### 2.2.1 – PROCESSOS DE FABRICAÇÃO DE VINAGRE

As fermentações para produção de vinagre podem ser realizadas pelos seguintes processos:

Processo Lento – Surgiu em 1823, também conhecido como processo Francês ou de Orleans, é o mais antigo para a produção de vinagres e admite-se fornecer vinagre de excelente qualidade empregando só vinho como matéria-prima. Neste processo, o líquido fermentado é posto em barris que são enchidos até  $\frac{3}{4}$  de sua capacidade. Adiciona-se vinagre fresco ao líquido em fermentação, na proporção de  $\frac{1}{4}$  ou  $\frac{1}{5}$  do volume deste. Essa adição acidifica o líquido até o ponto em que se evita o crescimento de *Mycoderma* e facilita o crescimento da bactéria do vinagre. O vinagre adicionado semeia o líquido com um grande número de bactérias do vinagre e funciona como cultura inicial da bactéria do vinagre.

Geralmente, ao fim de 3 meses, o líquido estará convertido em vinagre. Um quarto ou um terço do vinagre pode ser retirado para o engarrafamento e um volume equivalente do líquido alcoólico pode ser adicionado.

A temperatura ambiente para este processo não deve exceder 25°C, evitando-se assim perdas de álcool por evaporação. Todas as entradas e janelas do local, assim como as aberturas do barril, devem ser protegidas com telas finas para evitar a presença de moscas e outros insetos que interferem prontamente aos primeiros odores de vinagre.

Quando cuidadosamente conduzido, produz vinagre de muita boa qualidade, praticamente límpido, dispensando clarificações e filtrações. Entretanto é um processo muito lento, de baixa produtividade e altamente custoso, pela enorme quantidade de barris que seriam necessários para uma produção mínima desejável, sendo inviável comercialmente e usado praticamente só na produção doméstica.

Processo Rápido – Uma acetificação mais rápida pode ser conseguida por meio de um artifício utilizado no processo conhecido pelo nome de processo Alemão, processo rápido ou processo por gerador, introduzido na Alemanha em 1832 (BORZANI *et al.*, 1993).

Este processo consiste em uma recirculação do componente alcoólico através de um material que contém as bactérias acéticas fixadas, transformando o conteúdo alcoólico em ácido acético. A recirculação ocorre quantas vezes forem necessárias até a total transferência.

O equipamento é conhecido por gerador de vinagre ou vinagreira, de construção normalmente em madeira, embora possa ser usado aço inoxidável, alvenaria ou então outro material que não seja atacado pelo ácido acético.

O material de enchimento mais utilizado nesses geradores é o bagaço de cana-de-açúcar. Podem ser usado também bagaços de frutas como: uva, maçãs e outras mais que contenha requisitos necessários para obtenção do vinagre. O bagaço da cana-de-açúcar possui a grande vantagem de ser mais barato e praticamente disponível em qualquer época do ano. Normalmente, o material de enchimento é totalmente substituído após um ano de uso.

A velocidade de acetificação é proporcional à quantidade de oxigênio que está em contato com os reagentes, ou seja, proporcional à superfície exposta ao ar porque o oxigênio do ar é um dos reagentes. Neste processo devido à grande rapidez da reação de oxidação, a temperatura tende a elevar-se devido ao calor despreendido, portanto a temperatura geralmente é controlada.

Caso a vinagreira seja desativada por algum tempo, deve-se manter vinho no material de enchimento para que as *Acetobacters* sejam alimentadas, caso contrário, elas morrerão e necessitar-se-á de um novo vinagre forte ao reiniciar o processo.

Por possuir, normalmente, grandes dimensões, os geradores de vinagre sempre estão sujeitos a infestações por insetos e nematóides que causam danos ao vinagre, mas certos cuidados podem ser tomados para evitar esse tipo de problema, como por exemplo a adaptação de telas nas entradas de ar.

O vinagre novo, preparado neste processo tem o sabor e o cheiro um pouco desagradáveis. Deixando-se vinagre novo em tanques ou barris, em

repouso durante certo tempo, o sabor desagradável desaparece e é substituído por um suave e delicado sabor.

De acordo com BORZANI *et al.* (1993), a produtividade média de uma vinagreira é cerca de 1/100 de seu volume útil em litros de vinagre por dia.

Processo Submersos – Com o correr do tempo e com aumento da necessidade de se produzir cada vez mais e de maneira economicamente compensadora, as pesquisas continuaram, os processos foram mudando e o vinagre passou a ser produzido por meio de cultura submersa. Esse processo foi desenvolvido após a Segunda Guerra Mundial e o evento foi trazido à luz por Hromatka e Ebner, em 1949 (BORZANI *et al.*, 1987). O método se baseia em manter a cultura de bactérias acéticas submergidas no vinho a acetificar com um suprimento abundante de ar. Para catalisar essa reação que lhes fornece energia, as bactérias acéticas necessitam da administração contínua, íntima e adequada de oxigênio em todos os pontos do tanque, pois pequenas interrupções no fornecimento de oxigênio, ainda que por alguns minutos, principalmente nas fases finais de fermentação, podem afetar sobremaneira o rendimento. Essa massa adequada de oxigênio não pode ser obtida através da injeção excessiva de ar no meio, pois isso acarretaria sérios problemas, como: perda de álcool por evaporação e arraste com ar efluente do fermentador; perda das substâncias aromáticas e voláteis da matéria-prima e formação excessiva de espuma. Por isso o sistema de agitação e aeração dos acetificadores submersos é altamente especializado e construído de forma a aproveitar praticamente todo o oxigênio contido num mínimo possível de ar existente dentro do equipamento (BORZANI *et al.*, 1993).

No processo submerso, o aumento da produção de ácido, em relação ao tempo, dá uma função exponencial. Por isso, mesmo uma igual quantidade de substrato pode ser fermentada trinta vezes mais rapidamente, em relação ao tempo gasto nos mais modernos métodos industriais.

Por meio do processo submerso pode-se fabricar tanto vinagre de vinho como de álcool, com concentrações iniciais de álcool de 4 à 13% em volume e obter-se vinagre com concentrações até 10% e com rendimentos superiores a 90%.

O processo submerso, em relação aos demais processos, possui uma série de vantagens, como:

- Alta eficiência- diariamente podem-se produzir cerca de 6% ou mais, de vinagre;
- Rendimento- calculados em relação ao teórico, alcançam porcentagem de 90 a 95%;
- Prático- dispensa tratamentos de clarificação e de filtração, via de regra, onerosos e demorados.

O método submerso, embora seja o mais rápido e eficiente, tanto na produtividade como no rendimento, tem um grande inconveniente de requerer um controle eficiente no processo, principalmente na aeração e temperatura (ZARDINI, 2000).

### 2.2.2 – COMPARAÇÃO ENTRE OS PROCESSOS DE FABRICAÇÃO

#### a) Quanto a qualidade do produto

De acordo com BORZANI *et al.* (1993) os três processos básicos de produção podem fornecer vinagres de boa qualidade, desde que a matéria-prima, os microrganismos e as condições de fermentação sejam adequados.

#### b) Quanto à durabilidade e manutenção do equipamento

O processo submerso apresenta uma vantagem com relação aos demais, devido utilizar equipamentos de aço inoxidável de grande durabilidade, enquanto que os processos lento e o rápido utilizam dornas de madeiras, as quais estão sujeitas a diversas inconveniências como vazamentos, infestações e ressecamentos.

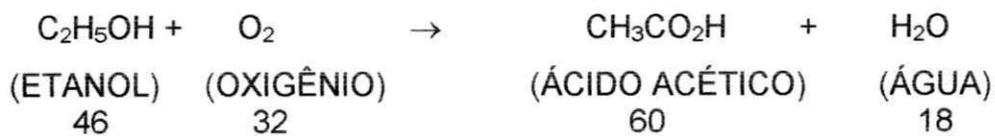
Por outro lado a manutenção e controle é mais simples nos processos lento, enquanto que no processo rápido é exigido uma certa técnica. No submerso o processo deve ser totalmente automatizado.

c) Quanto ao custo

Os modernos acetificadores submersos, constituem-se na melhor opção, em virtude da durabilidade, economia de espaço, mão de obra, tempo e muitas outras vantagens.

### 2.3 - RENDIMENTO E PRODUTIVIDADE

De acordo com a equação estequiométrica representativa da transformação de etanol em ácido acético, 1g de etanol pode fornecer 1,304g de ácido acético.



Industrialmente, a conversão de 1g de etanol a 1g de ácido acético (rendimento de 76,7%) é considerada econômica. É possível obter-se rendimentos maiores que 90%, através de modernos acetificadores submersos. Em laboratórios, através de frascos agitados, atingem-se 100% de rendimento. As diminuições de rendimento, em relação ao teórico, são devidas ao consumo parcial dos produtos e matérias-primas, pelos microrganismos, como fonte de carbono. Outro fato que deve ser lembrado é que os produtos das fermentações consecutivas são o etanol e o ácido acético, produtos voláteis.

No caso da produtividade, esta é bastante variável, dependendo do processo utilizado para a fabricação. E segundo TODA *et al.* (1989) a produtividade depende também fortemente da concentração de ácido acético. De acordo com BORZANI *et al.* (1993), o processo submerso apresenta a maior produtividade, conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 – Produtividade média dos processos de produção de vinagre

PROCESSOS	PRODUTIVIDADE MÉDIA (g/lh)
Lento	0,03
Rápido	1,0
Submerso	5,0

Fonte: BORZANI *et al* (1993)

PARK *et al.* (1988) estudaram a produção de ácido acético por bactérias *Acetobacter Aceti* M23 em um bioreator equipado com um módulo de filtro de fibra oca.

PARK *et al.* (1991) fizeram um estudo sobre o aumento da taxa de produção de ácido acético com culturas de grupo repetido com o reciclo de células de *Acetobacter Aceti* M23 de elevadas concentrações.

PARK e TODA (1992), estudaram a produção de ácido acético com concentração elevada de *Acetobacter Aceti* em um reator de biofilme multi-fase.

GHOMMIDH *et al.* (1982) apresentaram um tipo de bioreator para a produção de ácido acético, utilizando células *Acetobacter* isoladas.

## 2.4 – USOS DO VINAGRE

Na maioria das vezes o vinagre é empregado como condimento ou como constituinte de condimentos. Segundo FUKAYA *et al.* (1992) o vinagre é um dos condimentos mais velhos. É utilizado em saladas, maioneses, molhos, picles, ketchup assim como também em panificação, para pães vendidos em supermercados, que se mantêm frescos por vários dias. Nesse caso, o vinagre é usado para evitar o crescimento de fungos. Mas seu uso não fica restrito só a essas finalidades, encontra-se várias utilidades para o vinagre na cultura popular, desde saúde à limpeza.

Ao contrário do que algumas pessoas pensam, o vinagre não é um produto prejudicial à saúde. Pelo contrário, o organismo humano produz e utiliza o ácido acético no processo digestivo e no metabolismo de gorduras e carboidratos. Por este motivo, a medicina popular aconselha o uso do vinagre para emagrecer ou

mesmo uma solução de vinagre com água para ser usada para lavar o rosto deixando a pele mais macia.

O vinagre é consumido em quase toda parte do mundo. Segundo REHM e REED (1983) a produção mundial de vinagre de ácido acético é em torno de 1600 milhões de litros por ano, onde afirmam ser o produto de metabolismo microbiano primário de maior produção. O volume per capita nos países industrializados é superior a 2 litros de vinagre com 5% de acidez por ano. Spinosa citado por ZARDINI (2000) afirma que na Europa esse valor pode chegar a 4 litros/ano. Acredita-se que no Brasil o consumo seja menor que 1 litro/ano.

Atualmente a produção do vinagre no Brasil está concentrada em poucas empresas que utilizam unidades fabris de médio a grande porte. Devido ao seu valor comercial ser baixo, o custo de embalagem, distribuição e transporte apresentam componentes importantes no preço final desse produto .

## 2.5 - CINÉTICA DO PROCESSO

A cinética da fermentação é um dos estudos mais complexos na Engenharia Bioquímica. Um aspecto a ser considerado no estudo da cinética das fermentações reside no fato de que as concentração dos microrganismos, catalisadores das reações que se processam, não se mantém constante com o tempo, o que pode trazer dificuldades no exame dos problemas envolvidos. Com isso, o estudo da cinética dos processos fermentativos defronta-se com grandes obstáculos. Em alguns casos, pode ocorrer uma decomposição relativamente rápida desses catalisadores em virtude de condições ambientais pouco favoráveis. E na maioria dos outros casos, as concentrações dos microrganismos aumentam de maneira considerável, com o tempo, como consequência da sua reprodução, o que faz-se necessário medir a concentração de células ativas existentes em diferentes estágios da fermentação.

Um outro fator que deve ser mencionado está no que diz respeito as atividades metabólicas das bactérias *Acetobacter* utilizadas industrialmente, que são culturas misturadas e onde sua composição pode sempre variar, portanto alguns sistemas de enzima nas células podem ser inibidos pelas condições circunvizinhas externas.

Em confirmação a Vera e Wang, citado por REHM e REED (1983) a formação de ácido acético segue cinéticas de crescimento até uma concentração ácida acética de 3g/100ml, enquanto um modelo cinético misturado é requerido para concentração entre 4 e 7g/100ml nos quais a formação de ácido depende ambos de crescimento e de concentração dos microrganismos.

Muitas tentativas têm sido realizadas no sentido de se procurar interpretar resultados experimentais com auxílio de modelos matemáticos visando-se, por um lado, colaborar no esclarecimento de mecanismos envolvidos no processo e, por outro lado, estabelecer um conjunto de equações que possibilitem o adequado controle do sistema e sua otimização.

### 2.5.1 - CINÉTICA DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS

Um dos fatores principais que afetam a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima é a concentração do substrato presente. De acordo com WANG *et al.* (1999) a inibição pelo substrato complica o comportamento cinético. Estudar os efeitos da concentração de substrato é complicado pelo fato dessa concentração variar durante o período de uma dada reação à medida que o substrato é convertido em produto. Uma maneira de simplificar isto é medir a velocidade inicial da reação (LEHNINGER *et al.*, 1995).

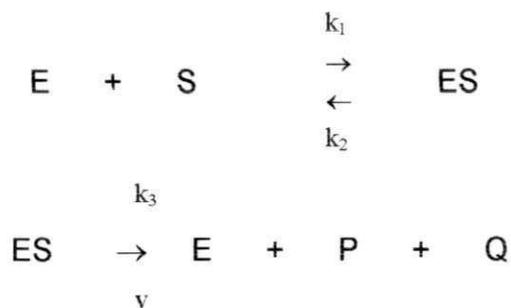
O conhecimento das velocidades com que as transformações acontecem e dos fatores que nelas influenciam são pontos extremamente necessários para este estudo. A rigor, o único instante em que as condições experimentais são bem conhecidas é o instante inicial. Por esse motivo, a velocidade da reação deve ser calculada, sempre que possível no instante zero, obtendo-se assim a velocidade inicial ou de consumo do substrato ou de formação do produto (BORZANI *et al.*, 1986).

Na Figura 2 pode-se observar que a velocidade comporta-se como uma função crescente da concentração do substrato até um determinado valor dessa concentração, após um determinado instante a velocidade mantém-se praticamente constante.

2.5.1.1 - MODELO DE MICHAELIS E MENTEM

BORZANI *et al.* (1986) admitem que o modelo cinético de Michaelis e Mentem é ainda hoje um dos mais aceitos com objetivo básico de explicar a influência da concentração do substrato na cinética de reação enzimática. A teoria de Michaelis e Mentem afirma que no início do processo fermentativo a enzima e o substrato reagem reversivelmente dando a formação de um composto intermediário denominado complexo enzima-substrato que reage ou decompõe com uma outra substância, regenerando a enzima e formando o produto final da reação.

Esquemáticamente, teremos:



A Figura 2 mostra a relação entre a concentração do substrato e a velocidade de formação dos produtos para uma reação enzimática. A curva que expressa esta relação tem a mesma forma geral para a maioria das enzimas, ela se aproxima de uma hipérbole retangular.

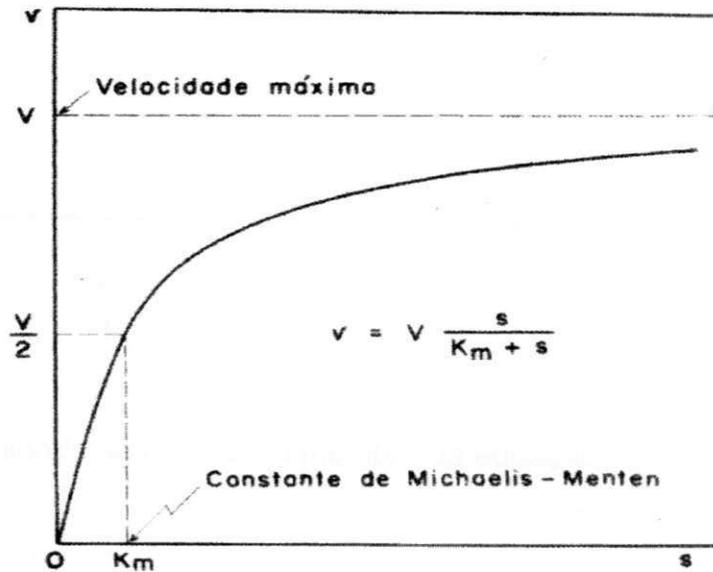


Figura 2 - Representação esquemática da equação de Michaelis - Mentem

A forma hiperbólica desta curva pode ser expressa algebricamente pela equação 1, chamada de equação de Michaelis e Mentem.

$$V = V_{\text{máx}} \frac{S}{K_m + S} \quad (1)$$

$$K_m = \frac{K_2 + K_3}{K_1} \quad (2)$$

onde:  $V_{\text{máx}}$  = velocidade máxima de formação de produtos

$K_m$  = constante de Michaelis e Mentem

A velocidade máxima de formação de produtos e a constante de Michaelis e Mentem podem variar muito de enzima para enzima e mesmo para diferentes substratos de uma mesma enzima.

A equação de Michaelis e Mentem pode ser algebricamente rearranjada em forma que são mais úteis no tratamento gráfico dos dados experimentais. Uma transformação muito empregada é obtida de forma simples invertendo-se os dois lados da equação de Michaelis e Mentem.

## 2.5.2 - CINÉTICA DOS PROCESSOS FERMENTATIVOS

Anteriormente foi examinado o caso em que uma determinada enzima catalisa a transformação de uma certa substância em outra ou outras, agora tem-se o caso mais complicado que é a cinética de processos fermentativos. Nesses processos, um certo microrganismo, desenvolvendo sua atividade vital em meios de elevada complexidade, transforma substâncias em outras, podendo conduzir a resultados de interesse econômico. O agente responsável pela transformação é agora uma célula viva que assimila diversos materiais, se reproduz e produz outras substâncias alterando profundamente a composição do meio em que vive (BORZANI *et al.*, 1986).

O estudo da cinética dos processos fermentativos defronta-se com alguns obstáculos como: saber variações de concentrações das substâncias consumidas e produzidas pelos microrganismos e saber também a concentração de células responsáveis pelas transformações, obrigando-se a medir a concentração de células ativas existentes, em diferentes estágios da fermentação. Uma vez disponíveis métodos seguros de medida de concentração de nutrientes, de produtos e de microrganismos durante a fermentação, já se pode iniciar o processo e retirar periodicamente uma amostra do material e determinar as concentrações de uma substância que está sendo consumida de um produto e do microrganismo.

### 2.5.2.1 – MODELO DE MONOD

A lei de Monod apresenta um bom ajuste para várias cinéticas de fermentação, sendo o valor da velocidade máxima calculada a partir da regressão linear dos dados experimentais levantados.

A Figura 4 representa uma curva típica de variação de concentração de um microrganismo no caso da cinética fermentativa. A equação 6 é denominada Equação de Monod.

$$\mu_x = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_s + S} \quad (6)$$

onde:  $\mu_{m\acute{a}x}$  = velocidade máxima

$\mu_x$  = velocidade especica de crescimento de microrganismos

$K_s$  = constante de saturação

$S$  = concentração do substrato

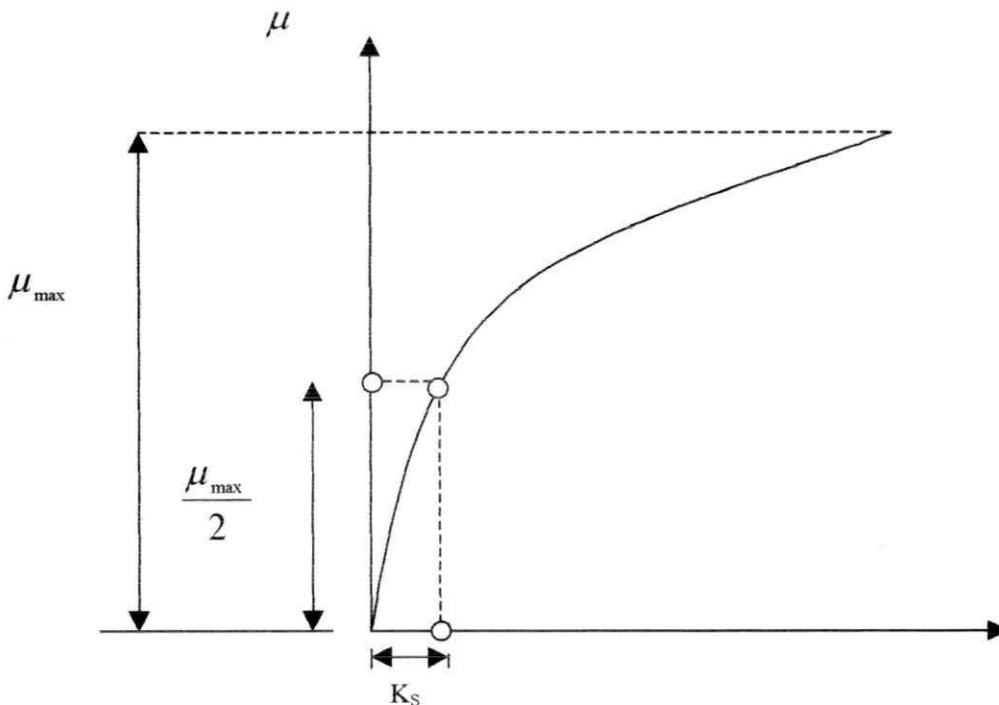


Figura 4 - Variação da velocidade especica de crescimento com a concentração de substrato limitante

PARK *et al.* (1990) fizeram um estudo cinético da produção de ácido acético com culturas de *Acetobacter aceti* e propuseram um modelo matemático simples para descrever quantitativamente a taxa de produção do ácido acético como uma função da área de superfície especica e taxa de diluição.

## 2.6 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO

No exame das transformações que se processam, como no caso das fermentações e mais especificamente a fermentação acética, pode-se interessar pelo estudo da influência dos diversos fatores independentes nas variáveis dependentes (respostas) como: velocidades de consumo de nutrientes, velocidades de formação de produtos, de reprodução das células, rendimento, produtividade e demais outros fatores, por ser um sistema multivariável. Não é difícil imaginar as dificuldades inerentes a um estudo como esse, e com isso surge um dos problemas mais comuns que o pesquisador pode defrontar-se que é a determinação da influência de uma ou mais variáveis sobre uma outra variável de interesse. Uma das maneiras para resolver este problema é a utilização de métodos de planejamento experimental, que vem sendo aplicado, com relativo sucesso, ao estudo de problemas de engenharia bastante complicados. Apesar de não ter ele por finalidade chegar ao conhecimento dos mecanismos envolvidos nos fenômenos estudados, sua aplicação conduz freqüentemente a correlações de indiscutível utilidade prática.

Todos os processos que envolvem coleta de dados devem ser usados planos estruturados para a condução dos trabalhos, os quais são denominados planejamento experimental.

O planejamento experimental é a especificação detalhada das operações experimentais que devem ser realizadas, se refere ao procedimento de planejar um experimento de forma que dados apropriados sejam coletados em tempo e custo mínimo. A análise destes dados por meio de técnicas estatísticas resultará em conclusões confiáveis (WERKEMA e AGUIAR, 1996). Uma técnica estatística muito útil, a qual pode ser aplicada em muitas situações, é a análise de regressão. Um outro fator importante para observar o modelo ajustado é o teste F, que testa se a equação de regressão é estatisticamente significativa. Comparando o valor de F calculado pela regressão dos dados experimentais com o valor tabelado para uma distribuição de referência  $F_{\text{Confiança}, L-1, N-L}$ , e através destes encontrando valores de F quatro vezes superior ao valor de F tabelado, o modelo é preditivo, quer dizer, os valores experimentais são bem representados pelo modelo proposto.

Para facilitar a avaliação da qualidade do ajuste do modelo, todas as análises estatísticas são acopladas de maneira resumida em uma só tabela conhecida como tabela de Análise de Variância ou ANOVA ("Analysis of Variance"), que está representada na Tabela 3.

O valor da qualidade do ajuste ( $Ra^2$ ) mostra que a variação total em torno da média é explicada pelo ajuste (regressão).

O coeficiente de correlação ( $\sqrt{Ra^2}$ ) representa a comparação da variância dos pontos experimentais em relação ao modelo ajustado. Quanto mais próximo o valor estiver de 1, os valores previstos pelo modelo estão em concordância com os valores observados experimentalmente. No caso de concordância total, o valor de  $Ra$  será igual a 1 (SILVA,1998).

**Tabela 3 - Análise de Variância (ANOVA)**

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Média da Soma dos Quadrados	Grau de Liberdade	Teste F
Devido a regressão	$SQ_R$	$MQ_R$	L-1	$MQ_R/MQ_r$
Resíduos	$SQ_r$	$MQ_r$	N-L	-
Falta de ajuste	$SQ_{faj}$	$MQ_{faj}$	M-L	-
Erro puro	$SQ_{ep}$	$MQ_{ep}$	N-M	-
Total	$SQ_T$	-	N-1	-
Qualidade do ajuste	$Ra^2 = SQ_R/SQ_T$	-	-	-
Coeficiente de correlação	$Ra$	-	-	-
F tabelado	-	-	-	$F_{confiança, L-1, N-L}$

Fonte: SILVA,1998

Onde:

$SQ_R$  = soma quadrática devido à regressão;

$SQ_r$  = soma quadrática residual (desvio);

$SQ_{faj}$  = soma quadrática devida à falta de ajuste;

$SQ_{ep}$  = soma quadrática devido o erro puro;

$SQ_T$  = soma quadrática em torno da média;  
 $MQ_R$  = média quadrática devido à regressão;  
 $MQ_r$  = média quadrática residual;  
 $MQ_{fa}$  = média quadrática devido à falta de ajuste;  
 $MQ_{ep}$  = média quadrática devido o erro puro;  
 $L$  = número de termos do modelo completo;  
 $M$  = número de níveis distintos;  
 $N$  = número total de experimentos.

No emprego das técnicas de planejamento e análise de experimentos, na maioria das situações será necessário realizar interferências no processo, ou seja, deverão ser provocadas alterações planejadas e controladas nos fatores de processo com o propósito de observar as variações correspondentes nos seus efeitos.

Os objetivos de um planejamento experimental são:

- Determinar as causas que mais influenciam o efeito de interesse do processo;
- Determinar as faixas de valores para os itens de verificação associados aos fatores controláveis.

Uma das primeiras coisas à serem feitas no planejamento de um experimento, é determinar quais são os fatores e as respostas de interesse para o sistema que se deseja estudar. Os fatores, isto é, as variáveis controladas pelo experimentador, tanto podem ser qualitativos como quantitativos. Dependendo do problema, pode haver mais de uma resposta de interesse (BARROS NETO *et al.*, 1995).

Para planejar de modo adequado a coleta de dados devem ser levado em consideração dois princípios básicos, que são:

- Réplica - São repetições do experimento feitas sob as mesmas condições experimentais. Em um experimento, a realização de réplicas é importante, pois permitem avaliar a variabilidade devida ao erro experimental presente nos

dados coletados e também detectar efeitos produzidos pelas diferentes condições experimentais.

- Aleatorização - Se refere a ordem segundo os ensaios individuais do experimento serão realizados. São determinados ao acaso. A aleatorização permite que os efeitos de fatores não-controlados, sejam balanceados entre todas as medidas. Este balanceamento evita possíveis confundimentos na avaliação dos resultados (WERKEMA e AGUIAR., 1996).

Um outro passo a ser dado no planejamento é definir claramente que objetivo se pretende alcançar com os experimentos, porque isso determinará que tipo de planejamento experimental deve ser utilizado.

Uma das vantagens do planejamento consiste justamente em agrupar variáveis, diminuindo-se ou o número de variáveis em estudos ou o número de níveis de cada, procurando-se, em seguida, correlacionar experimentalmente. Dessa maneira, torna-se possível reduzir consideravelmente o número de ensaios a realizar.

Existem dois métodos de planejamento experimental mais conhecidos para otimização de processo, são eles:

- Simplex Seqüencial;
- Planejamento Fatorial e Análise de Superfície de Resposta.

### 2.6.1 – SIMPLEX SEQÜENCIAL

Os métodos Simplex necessitam do conhecimento da resposta da etapa imediatamente anterior para a continuação dos ensaios seguintes, limitando este método a realização de um experimento de cada vez. Como consequência desta limitação, o método Simplex só otimiza uma resposta de cada vez (SILVA, 1998). O Simplex tem a característica de termo seqüencial, tornando-o mais adequado para experimentos de respostas rápida (BARROS NETO *et al.*, 1995).

## 2.6.2 – PLANEJAMENTO FATORIAL E ANÁLISE DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

No planejamento fatorial, precisa-se inicialmente especificar os níveis, ou seja, os valores dos fatores que irão ser utilizados nos experimentos. Neste tipo de planejamento é necessário a elaboração de diversos experimentos para todas as possíveis combinações de níveis. De acordo com SILVA (1998) o principal objetivo do planejamento fatorial é relacionar empiricamente as variáveis dependentes (respostas) com as variáveis independentes (variáveis de entrada), além de se poder determinar estatisticamente o efeito de cada variável na(s) resposta(s) desejada(s).

A metodologia de superfícies de resposta (ou RSM, de "Response Surface Methodology") é uma técnica de otimização baseada em emprego de planejamentos fatoriais, introduzida por G.E.P.Box na década de 1950, e que desde então tem sido usada com grande sucesso na modelagem de diversos processos industriais (BARROS NETO *et al.*, 1995). Essa metodologia é constituída de duas etapas distintas: modelagem e deslocamento. Com o intuito de atingir uma região ótima da superfície estudada, essas etapas são repetidas tantas vezes quantas forem necessária.

A modelagem normalmente é realizada ajustando-se os modelos lineares ou até mesmo quadráticos, com os resultados experimentais adquiridos durante os planejamentos fatoriais. Já o deslocamento se dá sempre ao longo da trajetória de inclinação máxima de um determinado modelo, que é o caminho na qual a resposta varia de forma mais evidente, e assim visualizada pela análise de superfície de resposta.

De acordo com BOX (citado por SILVA, 1998) a técnica de planejamento experimental por análise de superfície de resposta pode ser empregada para responder as seguintes perguntas:

- Como um conjunto de variáveis de entrada podem ter efeitos, numa faixa de interesse, sobre às variáveis dependentes;
- Quais conjuntos de variáveis de entrada produzirão um produto dentro das especificações desejadas;

- Quais valores ou faixas das variáveis de entrada produzirão valor ótimo para uma resposta específica e como se comporta a superfície de resposta próxima deste ponto.

O planejamento experimental fatorial e análise de superfície de resposta tem como ponto de partida fixar o número de níveis para cada uma das variáveis de entrada, com isso, é necessário realizar ensaios com todas as possíveis combinações. Segundo BARROS NETO *et al.* (1995), para evitar a ocorrência de distorção estatística nos resultados, isto é, para impedir que erros atípicos sejam obrigatoriamente associados a determinadas combinações de níveis, os ensaios devem ser realizados em ordem totalmente aleatória. Uma maneira simples de fazer isso é sortear a ordem de realização dos experimentos.

Um outro fator importante que deve ser levado em consideração neste tipo de planejamento é a realização das repetições que deve refletir também na variabilidade do processo em toda a faixa de estudo, e não somente em uma certa combinação de níveis. A partir das repetições realizadas pode-se obter uma estimativa do erro experimental. BARROS NETO *et al.* (1995) afirma que duplicação tem que consistir numa repetição autêntica, isto é, na realização, pela segunda vez, de todas as etapas do processo em estudo, desde a limpeza do recipiente antes de se iniciar o experimento até a separação e a análise do produto final.

Como um dos objetivos do planejamento experimental fatorial e posterior análise de superfície de resposta é executar o mínimo de ensaios e determinar inicialmente as variáveis de entrada com significativa influência ou não sobre a resposta, é necessário fazer inicialmente um planejamento fatorial com dois níveis para cada fator. Costuma-se identificar os níveis como superior e inferior com os sinais (+) e (-), respectivamente. De acordo com BARROS NETO *et al.* (1995) se  $n$  fatores estão contidos no estudo, o planejamento fatorial necessitará da realização de  $2^n$  ensaios diferentes, cobrindo todas as combinações possíveis. Para o cálculo do erro experimental é importante e necessário realizar no mínimo dois ensaios no ponto central, ponto este equivalente a exatamente a média aritmética dos níveis -1 e +1.

SILVA (1998) afirma que para obter um modelo de 2ª ordem e percorrer outros níveis ou condições experimentais são pressupostas pelo planejamento fatorial inicial, que apenas oferece modelo de 1ª ordem, pode-se ampliar o planejamento realizando experimentos nos pontos axiais, ou seja, completar o planejamento fatorial inicial com mais  $2n$  experimentos, este tipo de planejamento é conhecido como configuração tipo estrela. O planejamento fatorial mais configuração estrela pode também ser realizado apenas com os fatores que apresentam efeitos significativos no planejamento fatorial inicial mais os experimentos deslocados axialmente (níveis  $-\delta, -1, +1, +\delta$ ). O cálculo do valor de  $\delta$  é feito através da equação de BOX & WILSON (1951).

$$\delta = (2^\lambda)^{1/4} \quad (7)$$

onde:  $\lambda$  = número de variáveis (fatores) independentes

## CAPÍTULO 3

### MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal da Paraíba, Campus II. Utilizou-se Bagaço de cana-de-açúcar como elemento incorporador das bactérias acéticas.

#### 3.1 – MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Materiais:

- Bagaço de cana-de-açúcar;
- Álcool Etílico P.A., 99,5% (NUCLEAR);
- NaOH, Hidróxido de Sódio (0,1M);
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , Fosfato de Potássio Monobásico, P.A (VETEC);
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , Sulfato de Amônia P.A (REAGEN);
- Fenolftaleína

Equipamentos:

- Reator (25 l);
- Reator de 200ml;
- Balança Analítica Sartorius;
- Balança Digital Martel A200;

#### 3.2 – METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Esse trabalho foi realizado em duas etapas. A primeira etapa foi destinada ao estudo cinético da fermentação acética, o qual teve como objetivos determinar as concentrações formadas de ácido acético em diferentes intervalos de tempo da reação, e observar a influência dos efeitos da concentração de etanol e dos nutrientes sobre o processo. A segunda etapa

realizada foi o estudo da otimização do processo utilizando o planejamento fatorial e análise de superfície de resposta, cuja finalidade foi obter informações mais detalhadas da influência das variáveis de entrada (concentração de etanol, concentração de fósforo e concentração de nitrogênio) sobre as variáveis dependentes (rendimento e produtividade), possibilitando uma completa combinação e variação simultânea entre elas, além de permitir aumentar progressivamente as faixas dos fatores (variáveis) até encontrar um modelo empírico ajustado do fenômeno estudado, que apresente parâmetros estatisticamente validados.

O sistema utilizado na obtenção dos dados experimentais encontra-se representado pela Figura 5. Os estudos foram realizados à uma temperatura ambiente de 25°C e foram procedidos da seguinte forma:

- O inóculo (microrganismo), ou seja, o pé-de-cuba, foi proveniente de um reator confeccionado de tambor plástico (reator 1) com enchimento de pedaços de cana-de-açúcar e com capacidade de alimentação de solução de álcool de 25 litros;
- Em seguida preparou-se uma amostra de 100 gramas de bagaço, retirado do reator 1, em um becker de vidro de 200 ml (reator 2), onde neste recipiente foi adicionado a solução de etanol e os nutrientes estudados, quando necessário;
- Uma vez preparada a solução, amostras eram retiradas em alíquotas de 2 ml, em diferentes intervalos de tempo até um período de 120 min, mas observou-se que após 90 min o processo começava a se comportar de forma constante, não havendo nenhuma alteração, com isso as amostras foram coletadas até somar um tempo final de 90 minutos para o estudo cinético;
- Através das alíquotas retiradas foi determinada a concentração do ácido acético, utilizando o método volumétrico por titulação com solução de hidróxido de sódio (0,1 M) na presença do indicador fenolftaleína.

Os cálculos de acidez em g do ácido acético/100g de solução de vinagre e da concentração do ácido acético em mol/litro, estão apresentados nas equações 8 e 9, respectivamente:

$$\text{Acidez} = \frac{V_g \times N \times M_{eq} \times 100}{V_a} \quad (8)$$

Onde:  $V_g$  = volume de NaOH 0,1 N gasto;

$M_{eq}$  = Miliequivalente-grama do  $\text{CH}_3\text{COOH}$  (0,06);

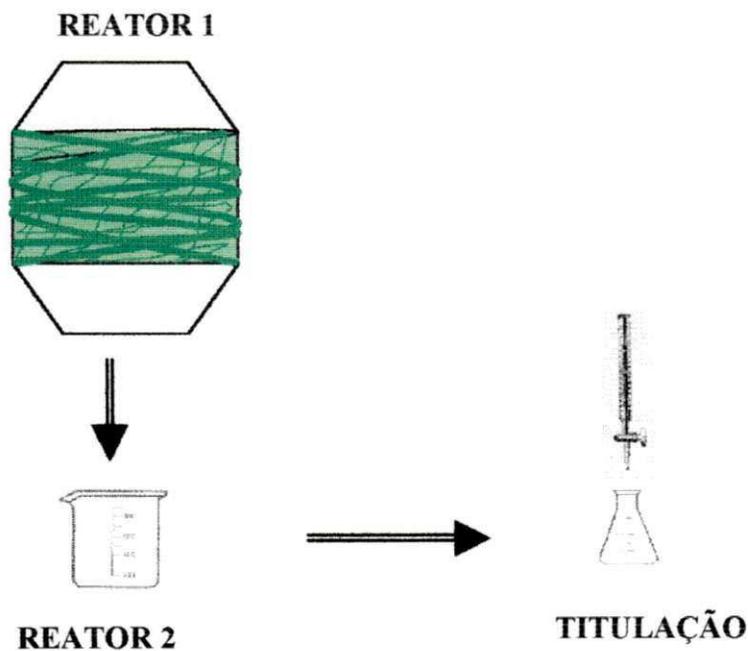
$N$  = Normalidade da padronização 0,1N;

$V_a$  = Volume da amostra (2,0 ml)

$$\text{Ácido acético} = 0,05 \times V_g \quad (9)$$

A dedução matemática da equação 9 encontra-se no Anexo A.

Para o estudo cinético foram realizados ensaios (Anexo B) utilizando concentrações de etanol de 2, 4, 6 e 8% e concentrações dos nutrientes de 0,05 e 0,2 g/ml para o fósforo e de 0,5 e 2,0 g/ml para o nitrogênio. Com o objetivo de verificar o efeito individual de cada uma das variáveis sobre o estudo, o fósforo e o nitrogênio foram adicionados separadamente junto ao etanol, no reator 2.



**Figura 5** - Esquema do sistema utilizado na obtenção dos dados experimentais.

**Tabela 4 – Níveis das variáveis do planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>**

Variáveis (Concentração)	Nível (-1)	Ponto central (0)	Nível (+1)
álcool (% em volume)	3	6	9
fósforo (g/ml)	0,01	0,03	0,05
nitrogênio (g/ml)	0,1	0,3	0,5

**Tabela 5 – Matriz do Planejamento experimental fatorial 2<sup>3</sup>**

Concentração de álcool	Concentração de fósforo	Concentração de nitrogênio
-1	-1	-1
+1	-1	-1
-1	+1	-1
+1	+1	-1
-1	-1	+1
+1	-1	+1
-1	+1	+1
+1	+1	+1
0	0	0
0	0	0
0	0	0

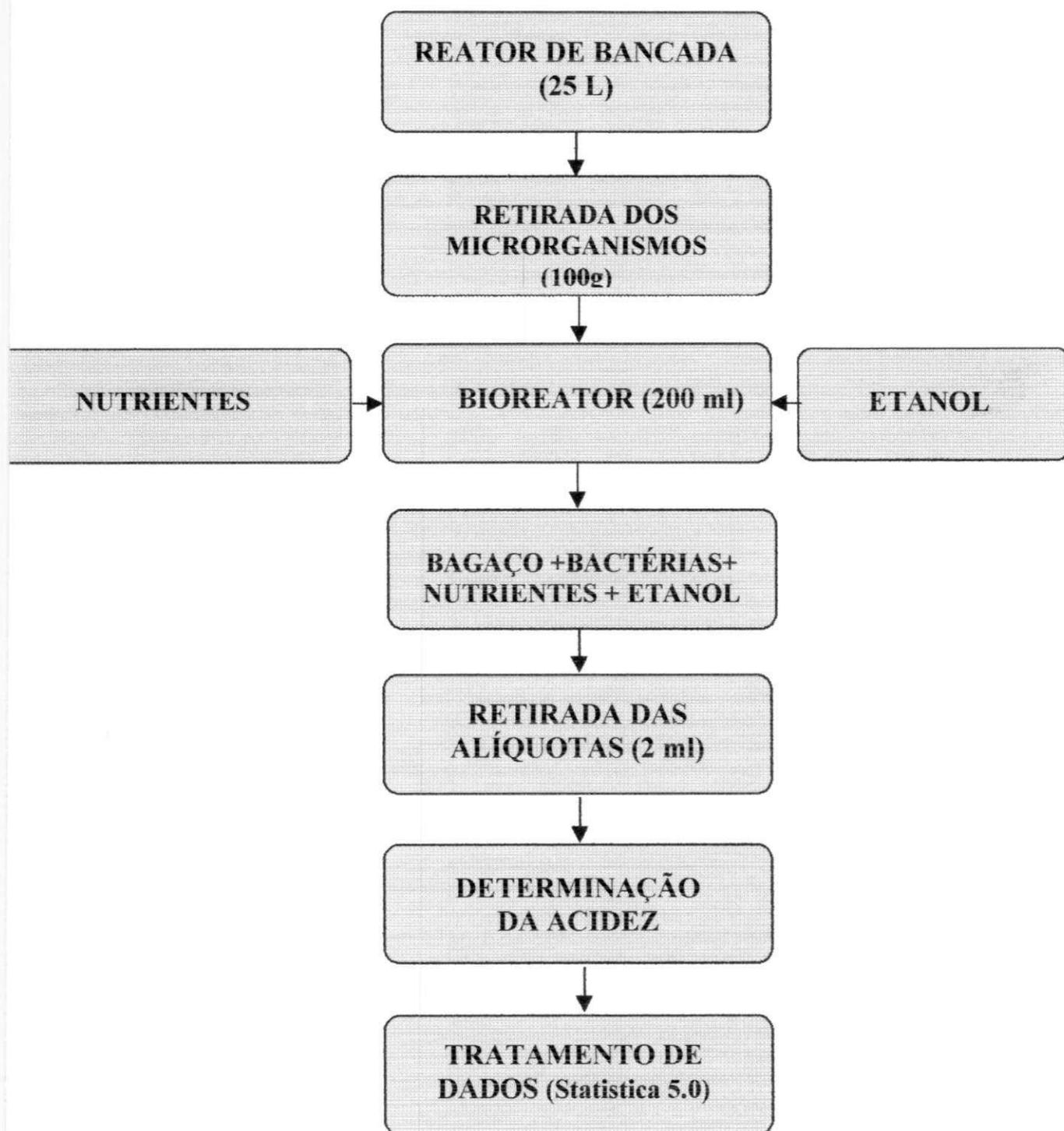


Figura 6 - Esquema da metodologia experimental.

Após analisar os resultados do primeiro planejamento, foi elaborado um segundo, com o objetivo de ampliar as faixas das variáveis: concentração de fósforo e concentração de nitrogênio uma vez que não foi possível observar a influência destas variáveis dependentes. Desta vez o planejamento foi do tipo fatorial  $2^2$  mais configuração estrela, realizando experimentos em pontos axiais complementando e percorrendo outros níveis não analisados no planejamento fatorial inicial.

Os níveis das variáveis do segundo planejamento estão mostrados na Tabela 6, e na Tabela 7 encontra-se a segunda matriz de planejamento.

Os valores das variáveis obtidos experimentalmente foram aplicados em um programa computacional Statistica, versão 5.0 onde a partir dos resultados foi possível verificar a influência de cada uma dessas variáveis sobre o sistema, e com isso a possibilidade de otimizar o processo.

**Tabela 6 - Níveis das variáveis do planejamento fatorial  $2^2$  + configuração estrela**

Variáveis	Nível ( $-\alpha$ )	Nível (-1)	Ponto central (0)	Nível (+1)	Nível ( $+\alpha$ )
Concentração de fósforo (g/ml)	0,02	0,05	0,125	0,2	0,23
Concentração de nitrogênio (g/ml)	0,2	0,5	1,25	2,0	2,3

**Tabela 7 – Matriz do Planejamento experimental fatorial  $2^2$  + configuração estrela mantendo a concentração de etanol em 6%**

Concentração de Fósforo	Concentração de Nitrogênio
-1	-1
+1	-1
-1	+1
+1	+1
0	0
0	0
0	0
$-2^{1/2}$	0
0	$2^{1/2}$
$2^{1/2}$	0
0	$-2^{1/2}$

## CAPÍTULO 4

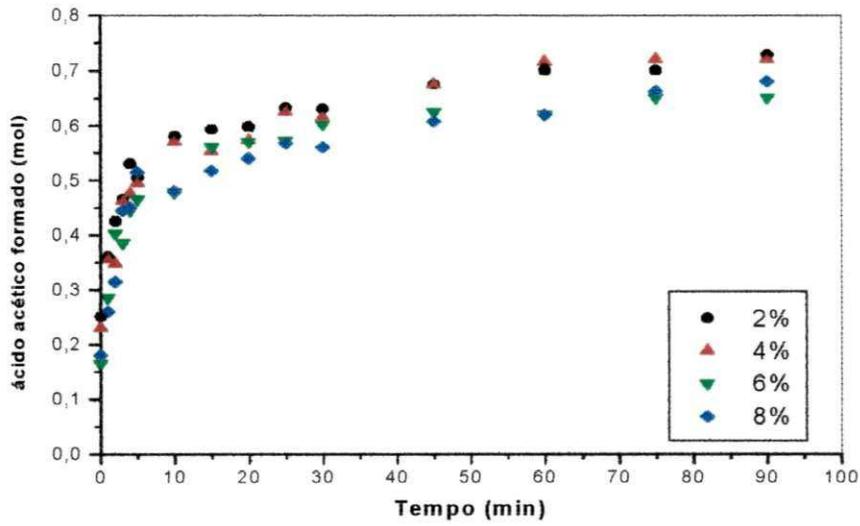
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 4.1 - CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO

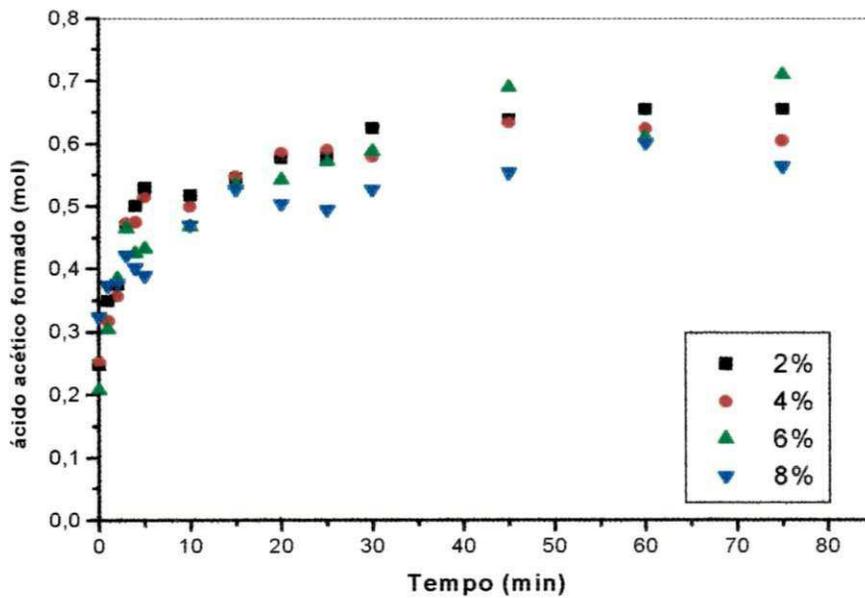
Na Tabela 8 encontram-se os valores das velocidades, nos instantes iniciais, calculadas a partir da inclinação (Ver Anexo C, Figuras C1 à C4) das curvas apresentadas nas Figuras 7, 8, 9 e 10. Através destas curvas observou-se que a molaridade de ácido acético formado no vinagre se comportou de forma crescente em função do aumento do tempo, conforme VIEIRA (2000). Com relação ao perfil dos resultados da Tabela 8, não verificou-se a influência nítida da concentração de etanol e nem das concentrações dos nutrientes (fósforo e nitrogênio) sobre a velocidade inicial da reação. Houve um pequeno aumento na velocidade inicial quando a concentração de fósforo foi igual à 0,05 g/ml e a de nitrogênio igual à 2,0 g/ml, para concentrações de etanol superiores à 2%, entretanto, observou-se uma diminuição na velocidade inicial de 0,10 para 0,06 com aumento da concentração de etanol de 4 a 8% para concentração de nitrogênio equivalente a 0,5 g/ml. Como os valores obtidos da velocidade inicial da reação não variaram apreciavelmente, não foi possível tirar conclusões estatísticas precisas a esse respeito. Portanto foi necessário realizar um segundo estudo, nesse caso, o Planejamento Fatorial e Análise de Superfície de Resposta, permitindo desse modo observar o efeito das variáveis de entrada sobre as respostas (rendimento e produtividade), fornecendo dados estatísticos que servirão para análises mais precisas e mais detalhadas dos resultados, o que não foi possível verificar através do estudo da cinética da fermentação.

Tabela 8 - Valores da velocidade inicial da reação

Concentração de etanol (%)	Concentração de fósforo (g/ml)		Concentração de nitrogênio (g/ml)	
	0,2	0,05	2,0	0,5
2	0,06	0,07	0,04	0,10
4	0,05	0,05	0,02	0,09
6	0,08	0,07	0,04	0,06
8	0,05	0,10	0,10	0,06



**Figura 7** - Perfil da molaridade do ácido acético formado versus o tempo para concentração de fósforo igual à 0,05g/ml na ausência de nitrogênio.



**Figura 8** - Perfil da molaridade do ácido acético formado versus o tempo para concentração de fósforo igual à 0,2g/ml na ausência de nitrogênio.

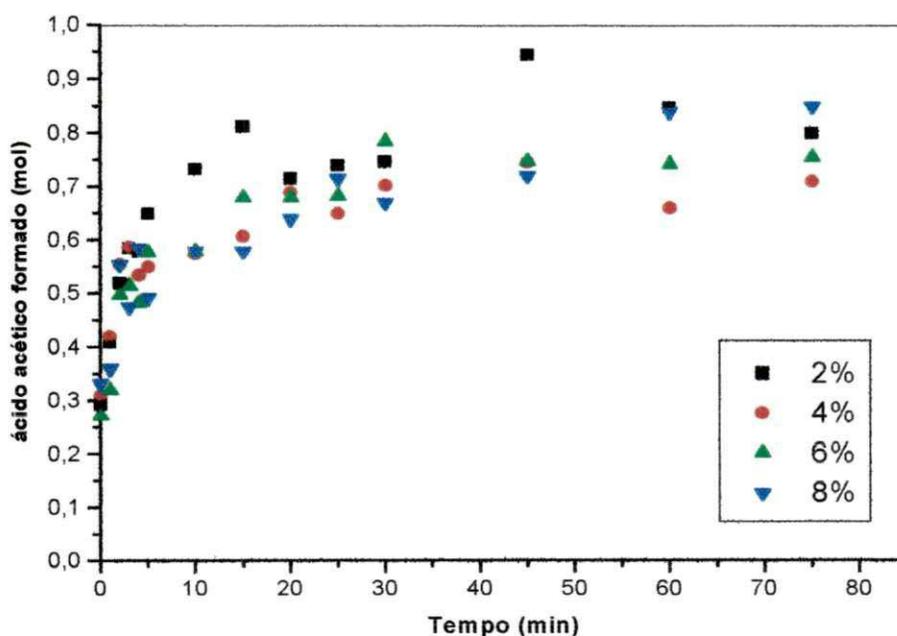


Figura 9 - Perfil da molaridade do ácido acético formado versus o tempo para concentração de nitrogênio igual à 0,5g/ml na ausência de fósforo.

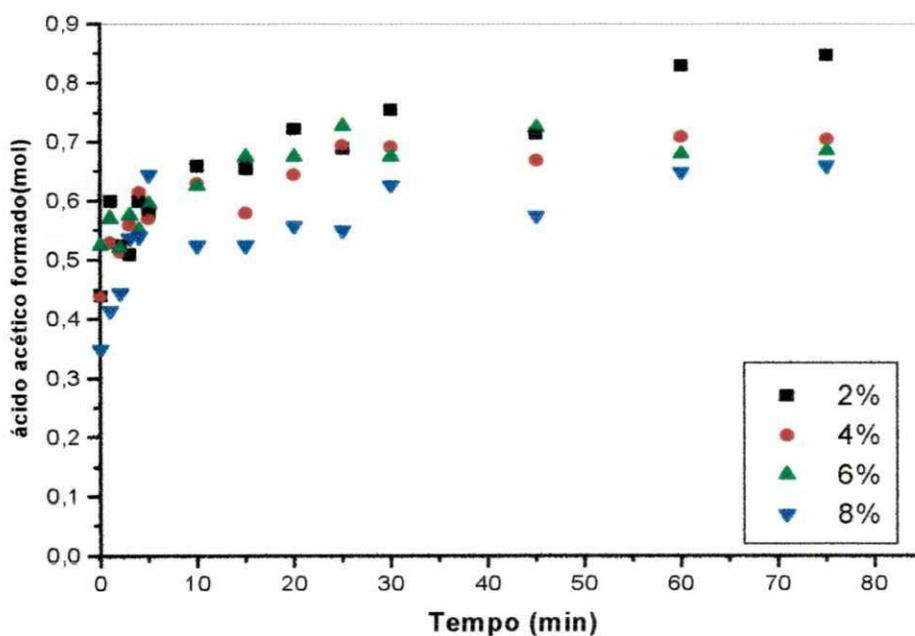


Figura 10 - Perfil da molaridade do ácido acético formado versus o tempo para concentração de nitrogênio igual à 2,0g/ml na ausência de fósforo.

## 4.2 - PLANEJAMENTO FATORIAL E ANÁLISE DE SUPERFÍCIE

Com a utilização do planejamento experimental fatorial foi possível fazer um estudo mais abrangente das variáveis realizando de maneira mais organizada uma quantidade mínima de experimentos. Inicialmente usou-se um planejamento fatorial  $2^3$ , onde foram realizados 11 ensaios, sendo 3 deles repetições no ponto central. A Tabela 9 mostra os resultados obtidos do planejamento com as respostas produtividade e rendimento calculados experimentalmente em cada combinação de níveis. Os números entre parênteses apresentam a ordem de realização dos ensaios, tendo como finalidade realizar a aleatorização dos experimentos. A ordem aleatória permite que os efeitos não-controlados, que podem afetar a variável resposta, sejam minimizados entre todos os experimentos, evitando interferências na verificação dos efeitos das variáveis controladas (variáveis independentes) sobre as variáveis respostas (dependentes).

Os cálculos do rendimento e da produtividade encontram-se no ANEXO D (Tabela D1) assim como também os valores experimentais encontrados. Uma análise de significância estatística dos dados da Tabela 9 é um fator importante, pois os dados experimentais são usados para produzir o modelo empírico, que se deseja, através de uma regressão.

Os modelos lineares codificados obtidos, tanto para o rendimento como para a produtividade, em função das variáveis estudadas são mostradas através das equações (9) e (10) respectivamente, onde os parâmetros em negrito são os valores significativos no modelo encontrado.

$$\text{Rendimento} = \mathbf{39,68} - \mathbf{26,36C} - 2,86P + 0,29N - 1,18CP + 4,00CN + 0,52PN \quad (9)$$

**Tabela 9 - Resultados obtidos do planejamento experimental fatorial 2<sup>3</sup>**

Ensaio	Concentração (níveis reais)			Concentração (níveis codificados)			Acidez (ml)			Rendimento (%)	Produtividade (g/lh)
	Etanol (%)	Fósforo (g/ml)	Nitrogênio (g/ml)	Etanol	Fósforo	Nitrogênio	A1*	A2*	Média		
1 (1 <sup>o</sup> )	3	0,01	0,1	-1	-1	-1	2,29	2,29	2,29	78,00	1,00
2 (3 <sup>o</sup> )	9	0,01	0,1	+1	-1	-1	1,50	1,38	1,44	16,31	0,63
3 (11 <sup>o</sup> )	3	0,05	0,1	-1	+1	-1	1,98	2,16	2,07	70,27	0,90
4 (5 <sup>o</sup> )	9	0,05	0,1	+1	+1	-1	0,90	0,96	0,93	10,54	0,40
5 (6 <sup>o</sup> )	3	0,01	0,5	-1	-1	+1	1,95	1,95	1,95	66,20	0,85
6 (4 <sup>o</sup> )	9	0,01	0,5	+1	-1	+1	2,55	2,25	2,40	27,18	1,05
7 (10 <sup>o</sup> )	3	0,05	0,5	-1	+1	+1	1,98	1,98	1,98	67,22	0,86
8 (2 <sup>o</sup> )	9	0,05	0,5	+1	+1	+1	1,50	1,47	1,48	16,82	0,65
9 (9 <sup>o</sup> )	6	0,03	0,3	0	0	0	1,35	1,89	1,62	27,54	0,70
10 (7 <sup>o</sup> )	6	0,03	0,3	0	0	0	1,62	1,87	1,74	29,58	0,76
11 (8 <sup>o</sup> )	6	0,03	0,3	0	0	0	1,42	1,74	1,58	26,86	0,70

A1 = amostra 1 e A2 = amostra 2

$$\text{Produtividade} = 0,77 - 0,11C - 0,09P + 0,11CN + 0,06N - 0,07CP - 0,01PN \quad (10)$$

Onde:

C = concentração de etanol;

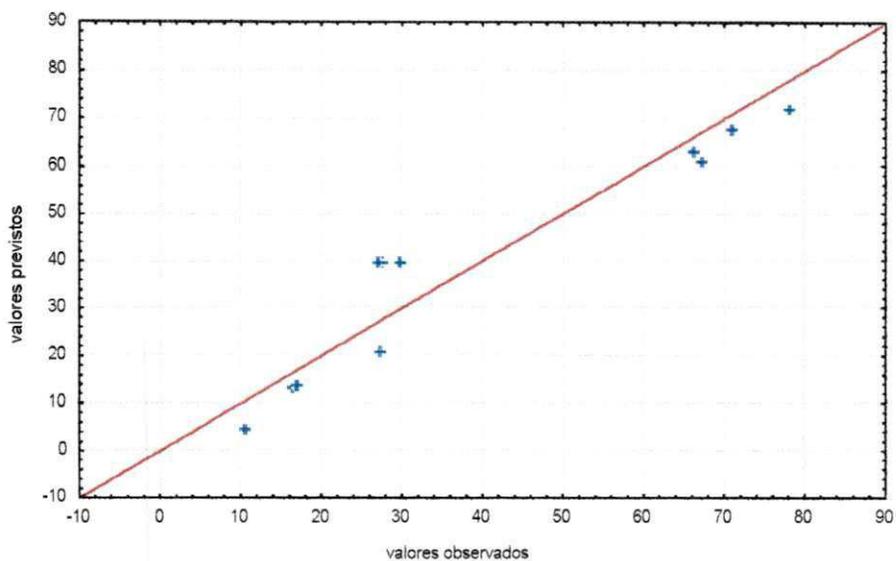
P = concentração de fósforo;

N = concentração de nitrogênio.

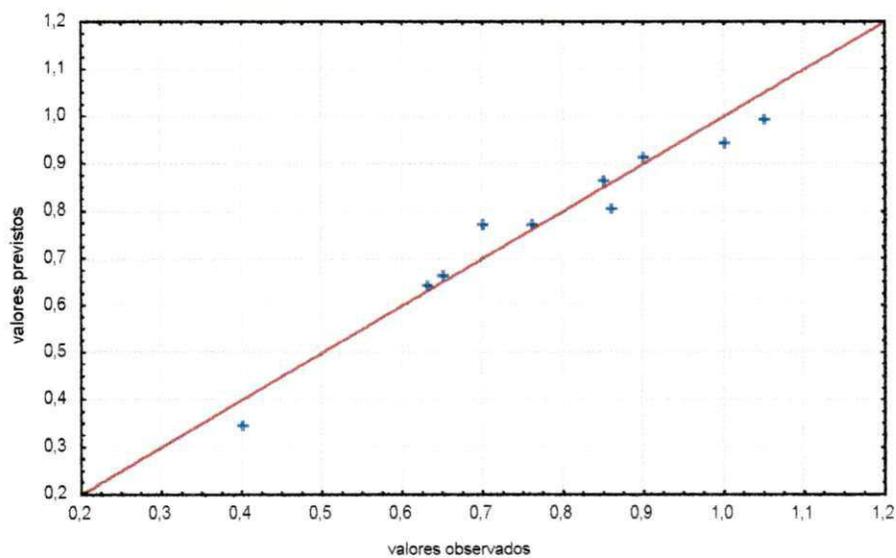
As Tabelas 10 e 11 apresentam os resultados das análises de variância (ANOVA) para o rendimento e para a produtividade do modelo estatístico obtido. Observa-se que os valores do coeficiente de correlação foram significativos tanto para o rendimento que foi de 0,95 como para a produtividade que foi igual à 0,96. Os coeficientes de correlação indica a comparação da variância dos pontos experimentais em relação ao modelo ajustado, portanto quanto mais próximo estiver de 1 o valor do coeficiente de correlação maior concordância entre os valores previstos pelo modelo e os valores observados experimentalmente. Dessa forma o modelo apresentou uma qualidade de ajuste maior para a produtividade.

**Tabela 10 - Análise da variância para o ajuste do modelo linear para o rendimento**

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de graus de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	5763,81	6	960,64	
Resíduos	589,99	4	147,50	6,51
Falta de ajuste	585,98	2	293,00	
Erro puro	4,01	2	2,00	146,50
Total	6353,80	10	635,38	
% de variação explicada	90,71	-		
Coeficiente de correlação	0,95			
F <sub>Tabelado</sub> para 95% de confiança				F <sub>0,95;6,4</sub> = 6,16 F <sub>0,95;2,2</sub> = 19,00



(a)



(b)

**Figura 11** - Valores observados versus valores previstos para o modelo linear.

(a) Rendimento e (b) Produtividade.

Na Figura 12 é apresentado o efeito da concentração do etanol e concentração de fósforo sobre o rendimento, mantendo o valor da concentração de nitrogênio no ponto central (0,3g/ml). Verifica-se que o rendimento aumenta com o decréscimo da concentração de etanol, chegando a atingir valores aproximadamente de 70%, para valores de concentração de etanol abaixo de 4%. Com relação a produtividade a concentração de etanol não demonstrou influência significativa (Figura 13), quando a concentração de nitrogênio foi fixada no ponto central. A faixa ótima verificada para a produtividade, nesta figura, está entre os baixos valores da concentração de fósforo e de etanol, obtendo-se valores de produtividade acima de 0,87g/lh.

Nas Figuras 14 e 15 estão mostradas as superfícies de resposta para o rendimento e produtividade respectivamente, quando a concentração de fósforo foi fixada no ponto central (0,03g/ml), variando a concentração de etanol e concentração de nitrogênio. Observa-se que a concentração de etanol exerce uma maior influência em relação ao nutriente nitrogênio sobre o rendimento (Figura 14) e sobre a produtividade (Figura 15). Para valores elevados de concentração de etanol o valor do rendimento decresce abaixo de 15%, para qualquer valor de concentração de nitrogênio. A melhor faixa de produtividade observada na Figura 15 está na concentração de etanol abaixo de 4% e concentração de nitrogênio abaixo de 0,2g/lh.

Nas Figuras 16 e 17 são mostradas as superfícies de resposta do efeito da concentração de nitrogênio e fósforo sobre o rendimento e produtividade, para a concentração de etanol fixa no ponto central (6%). Observa-se que a concentração de fósforo exerceu influência significativa no rendimento. Quanto a produtividade, o efeito maior ocorreu na concentração de nitrogênio, observando-se que quanto maior a concentração de nitrogênio maior a produtividade.

Na segunda etapa a concentração de etanol foi fixada em 6%, isso devido os resultados apresentados na primeira matriz, mostrarem que com a concentração abaixo de 4% os rendimentos obtidos alcançam valores superiores. Com base nesse resultado optou-se fixar em 6% a concentração do etanol, permitindo desse modo verificar a existência ou não da influência das concentrações dos nutrientes sobre as variáveis de saída (rendimento e produtividade). Para o planejamento fatorial  $2^2$  mais configuração estrela realizou-se 11 ensaios e entre eles 3 repetições no ponto central. A Tabela 12 mostra os resultados obtidos do planejamento com as respostas (rendimento e produtividade). Os cálculos para o rendimento e produtividade encontram-se no ANEXO D (Tabela D2).

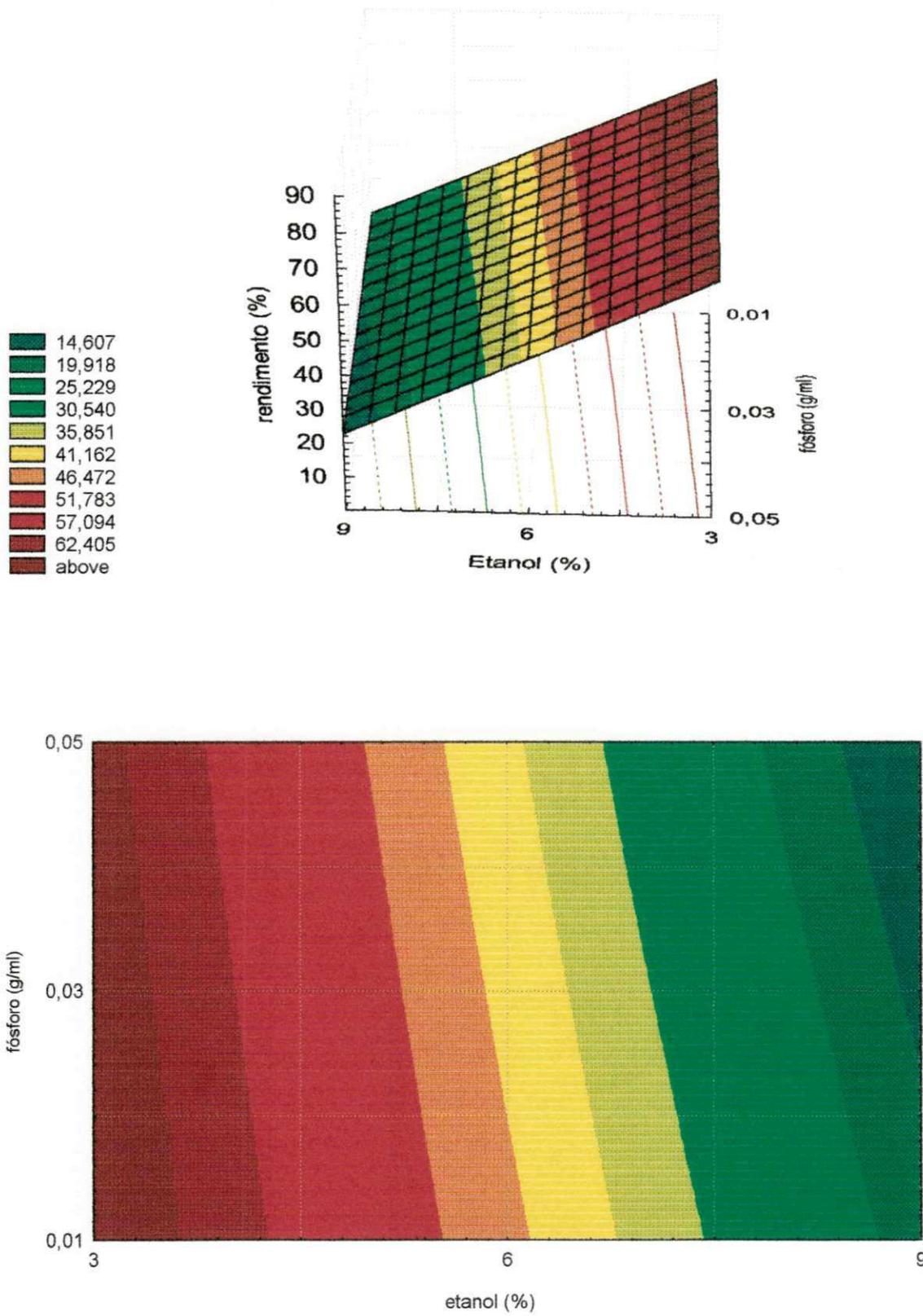


Figura 12 – Efeitos da concentração de etanol e do fósforo sobre o rendimento.

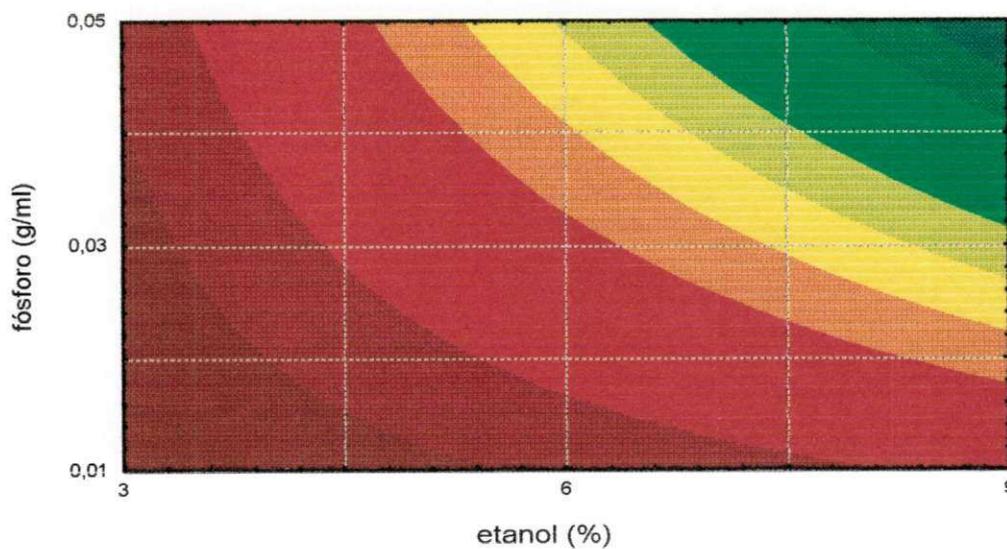
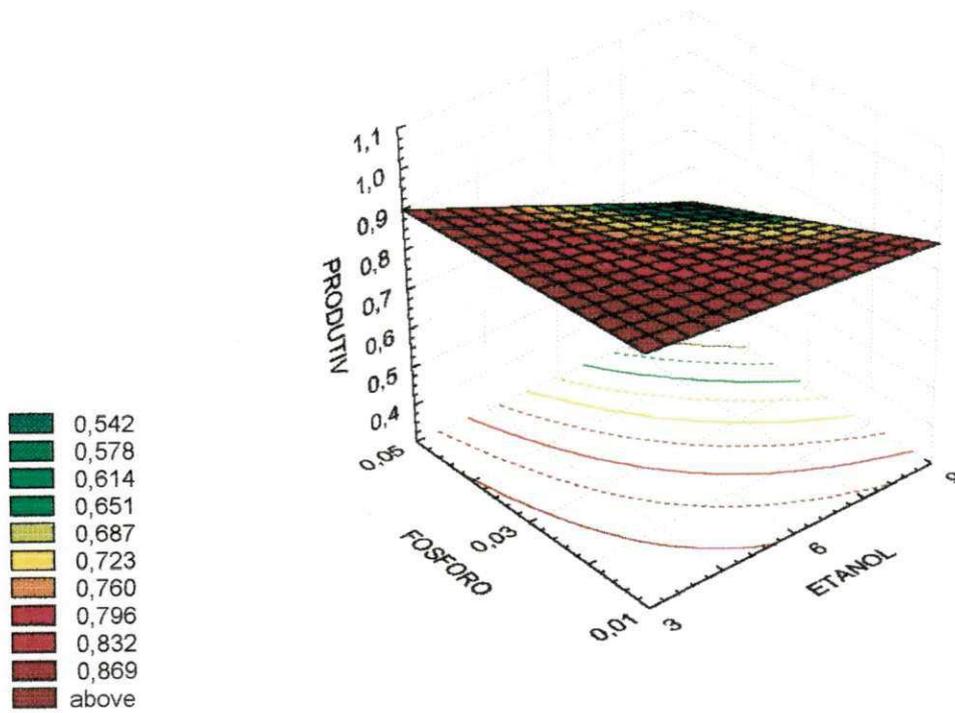


Figura 13 - Efeitos da concentração de etanol e fósforo sobre a produtividade.

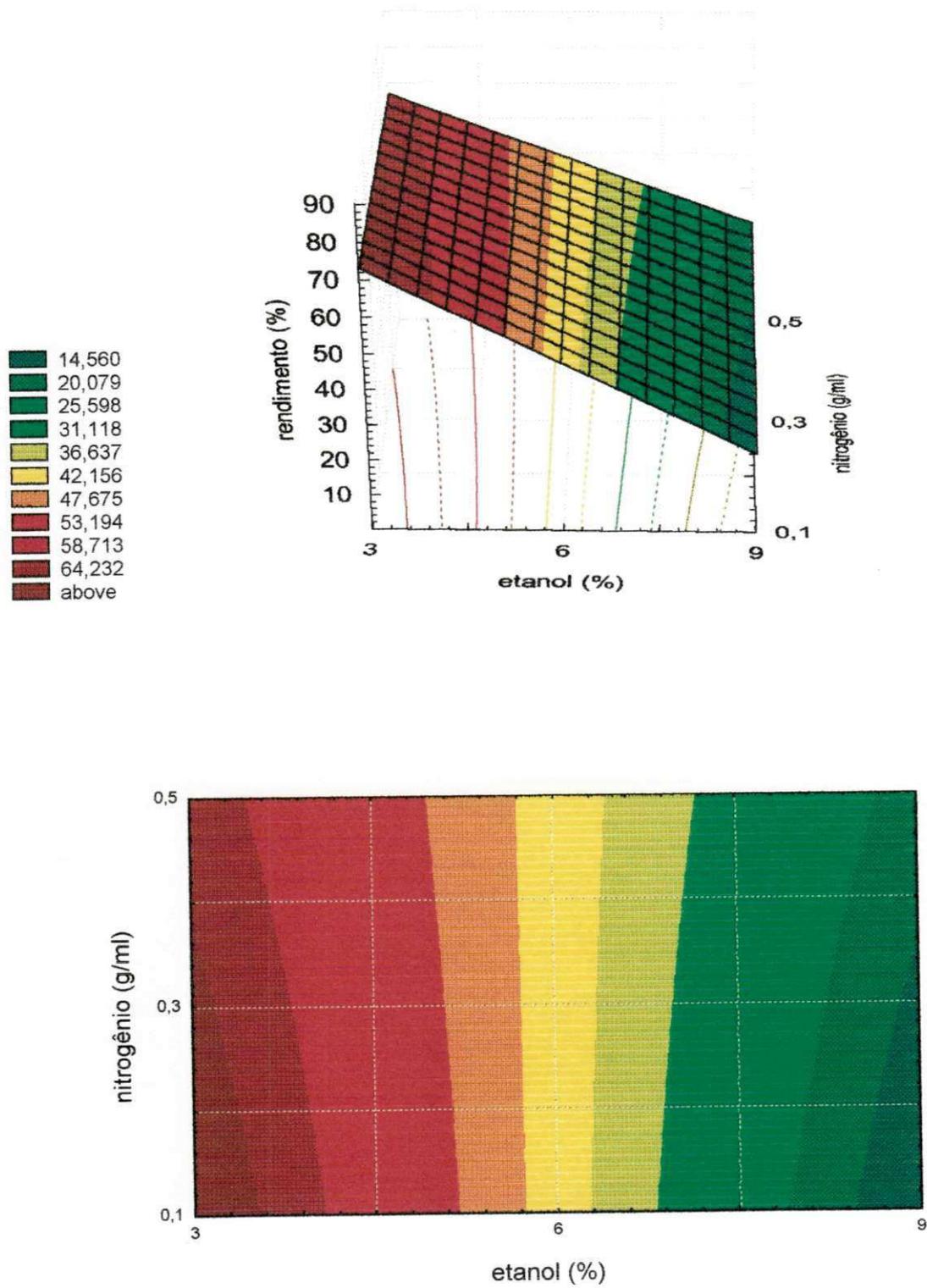
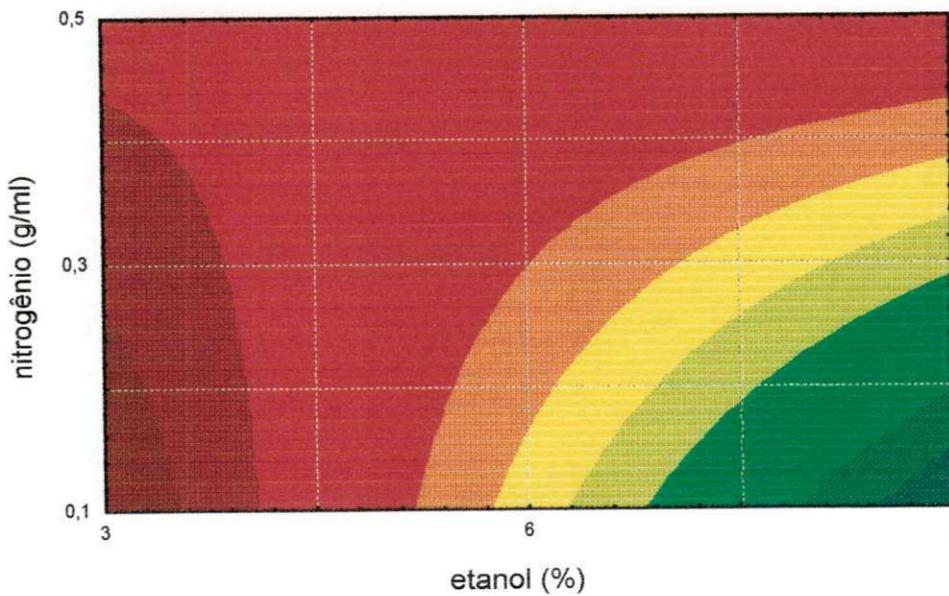
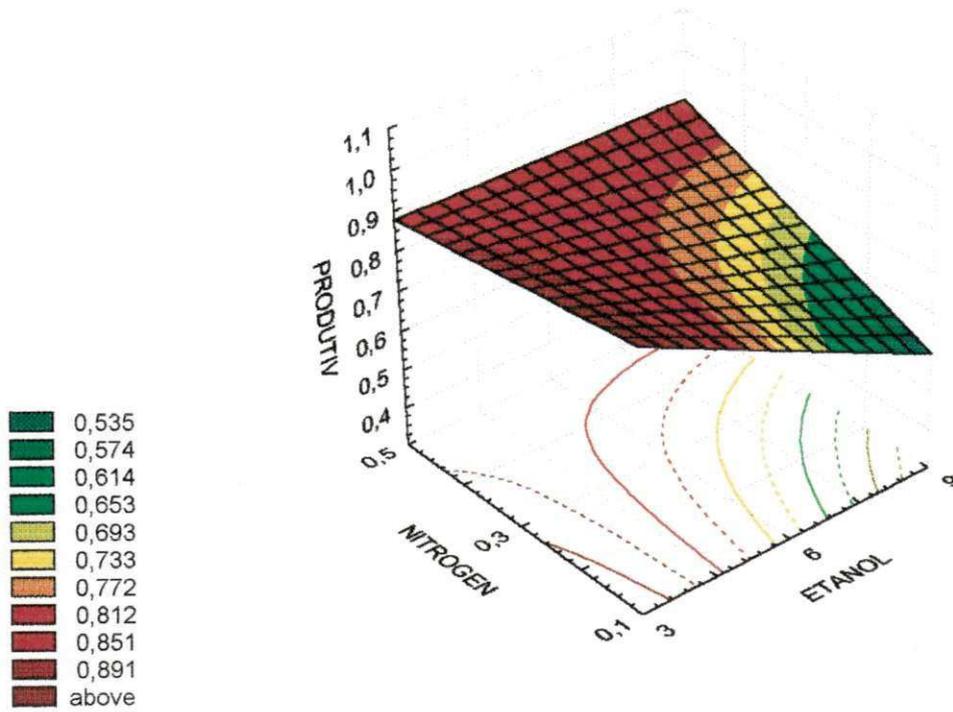
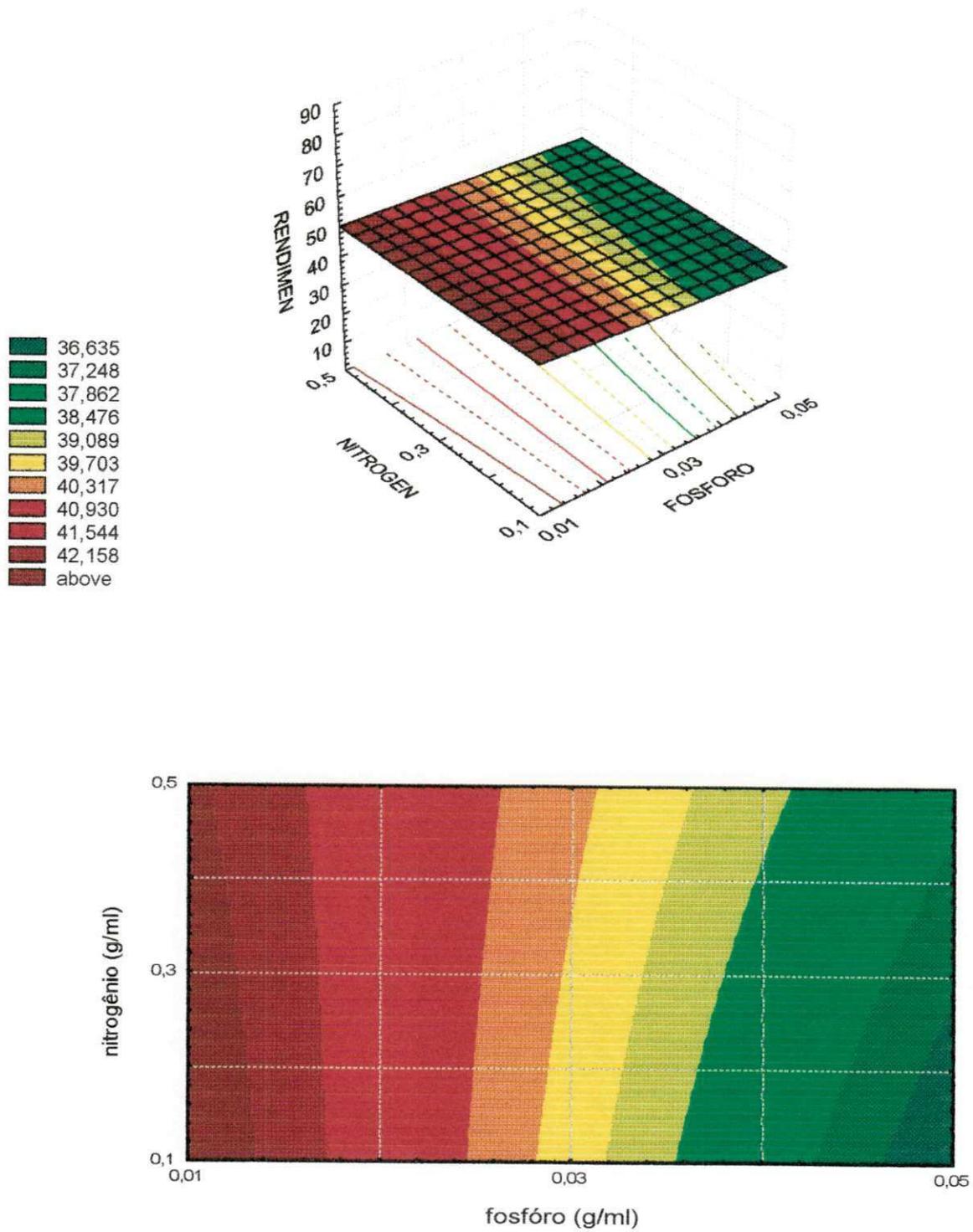


Figura 14 – Efeitos da concentração de etanol e nitrogênio sobre o rendimento.



**Figura 15** - Efeitos da concentração de etanol e nitrogênio sobre a produtividade.



**Figura 16** – Efeitos da concentração do fósforo e nitrogênio sobre o rendimento.

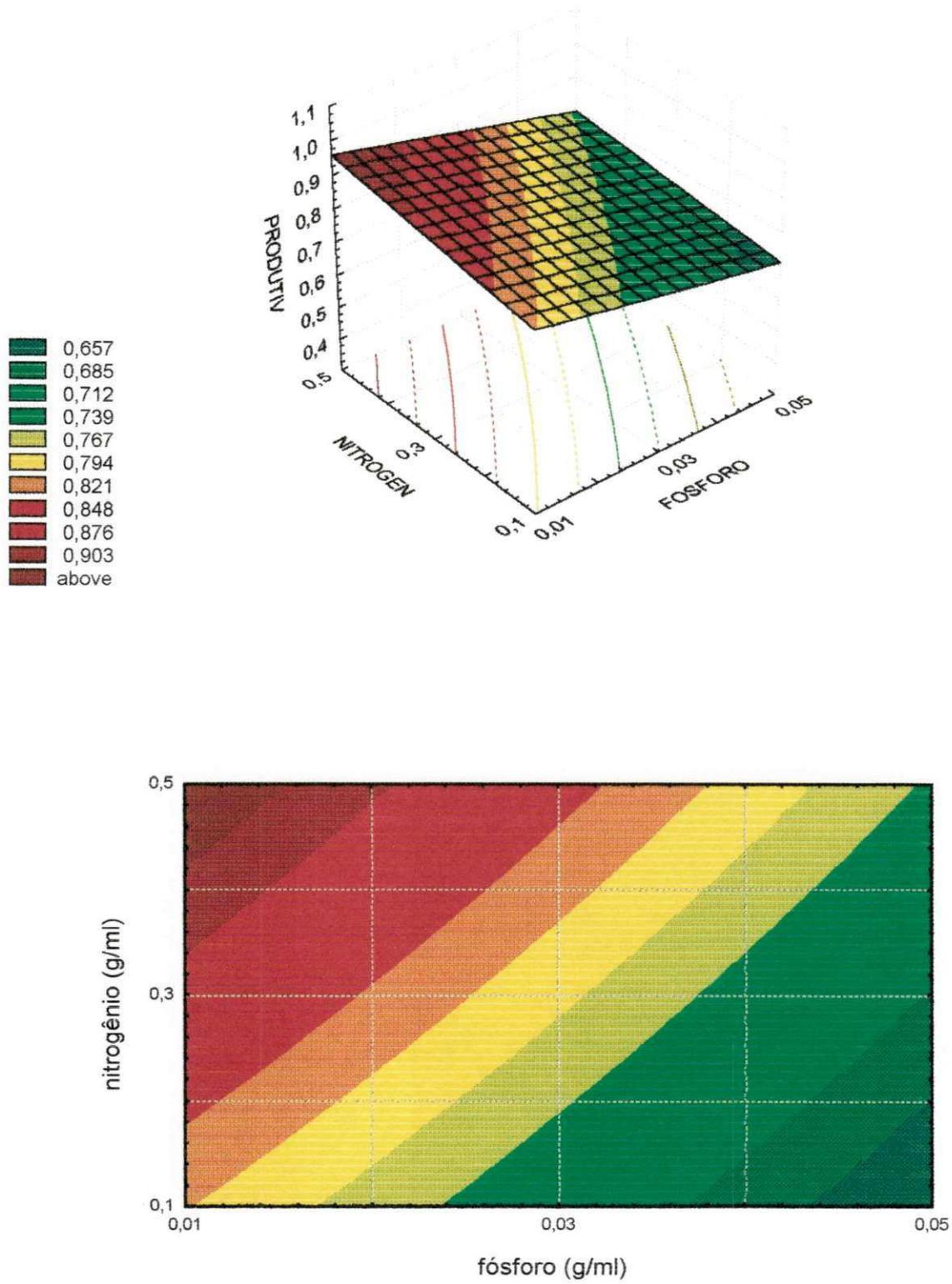


Figura 17 - Efeitos da concentração do fósforo e nitrogênio sobre a produtividade

Tabela 12 - Resultados do planejamento experimental fatorial  $2^2$  + configuração estrela

Ensaio	Concentração (níveis reais)		Concentração (níveis codificados)		Acidez (ml)			Rendimento (%)	Produtividade (g/lh)
	Fósforo (g/ml)	Nitrogênio (g/ml)	Fósforo	Nitrogênio	A1*	A2*	Média		
1 ( $7^0$ )	0,05	0,5	-1	-1	1,62	1,83	1,72	29,33	0,75
2 ( $2^0$ )	0,20	0,5	+1	-1	1,84	1,92	1,88	31,96	0,82
3 ( $4^0$ )	0,05	2,0	-1	+1	2,62	2,59	2,61	44,33	1,14
4 ( $8^0$ )	0,20	2,0	+1	+1	2,38	2,36	2,37	40,29	1,04
5 ( $9^0$ )	0,125	1,25	0	0	2,32	2,26	2,29	38,93	0,91
6 ( $3^0$ )	0,125	1,25	0	0	2,40	2,70	2,55	43,35	1,12
7 ( $1^0$ )	0,125	1,25	0	0	2,13	2,19	2,16	36,72	0,94
8 ( $5^0$ )	0,02	1,25	$-2^{1/2}$	0	2,25	2,50	2,37	40,42	1,04
9 ( $11^0$ )	0,125	2,3	0	$2^{1/2}$	3,42	3,27	3,34	56,87	1,46
10 ( $6^0$ )	0,23	1,25	$2^{1/2}$	0	1,99	1,89	1,94	32,98	0,84
11 ( $10^0$ )	0,125	0,2	0	$-2^{1/2}$	1,53	1,68	1,60	27,30	0,70

A1 = amostra 1 e A2 = amostra 2

Mais uma vez, com a finalidade de permitir a obtenção de uma estimativa da variabilidade em função do erro experimental, realizou-se a repetição de três experimentos no ponto central.

Pela análise do planejamento através do software Statistic 5.0 obteve-se os modelos quadráticos para o rendimento e a produtividade em função das variáveis estudadas. Os modelos quadráticos codificados são mostrados pelas equações (11) e (12), onde os parâmetros em negrito são as variáveis consideradas estatisticamente significativas.

$$\text{Rendimento} = \mathbf{39,67} + \mathbf{8,14N} - 1,49P - 2,21P^2 + 0,48N^2 - 1,67PN \quad (11)$$

$$\text{Produtividade} = \mathbf{0,99} + \mathbf{0,21N} - 0,04P - 0,04P^2 + 0,03N^2 - 0,04PN \quad (12)$$

P = concentração de fósforo;

N = concentração de nitrogênio

As Tabelas 13 e 14 mostram os resultados das análises de variância (ANOVA) para o rendimento e a produtividade. Os coeficientes de correlação obtidos foi de 0,93 para o rendimento e de 0,92 para a produtividade uma boa qualidade de ajuste, pois quanto mais próximo de 1 o valor do coeficiente de correlação melhor a qualidade de ajuste, ou seja, maior concordância entre os valores previstos pelo modelo e os valores observados, o que é possível verificar também através da Figura 18 (a) e (b).

Com relação ao teste F observa-se que o valor calculado de F é mais uma vez superior ao valor tabelado a um nível de confiança de 95%, mostrando que a equação é estatisticamente significativa.

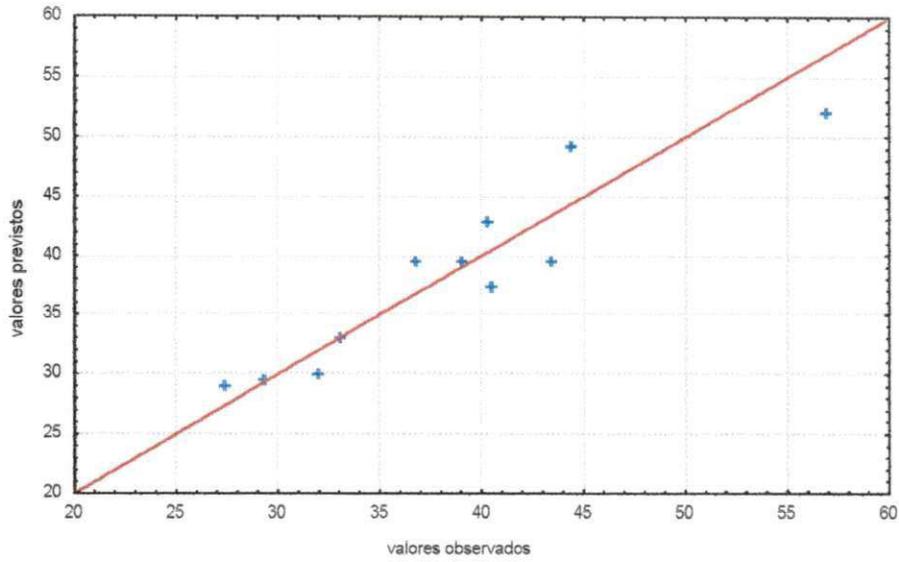
As Figuras 19 e 20 apresentam os efeitos da concentração de fósforo e concentração de nitrogênio sobre o rendimento e produtividade quando a concentração de etanol foi fixada em 6%. Verifica-se que o fósforo não exerce influência significativa sobre nenhuma das respostas observadas. Observa-se que tanto para o rendimento como para a produtividade, o aumento da concentração de nitrogênio aumenta os valores das respostas. Os melhores valores de rendimento e da produtividade foram obtidos para concentrações de nitrogênio superiores à 1,7g/ml.

**Tabela 13 - Análise da variância para o ajuste do modelo quadrático do segundo planejamento para o rendimento.**

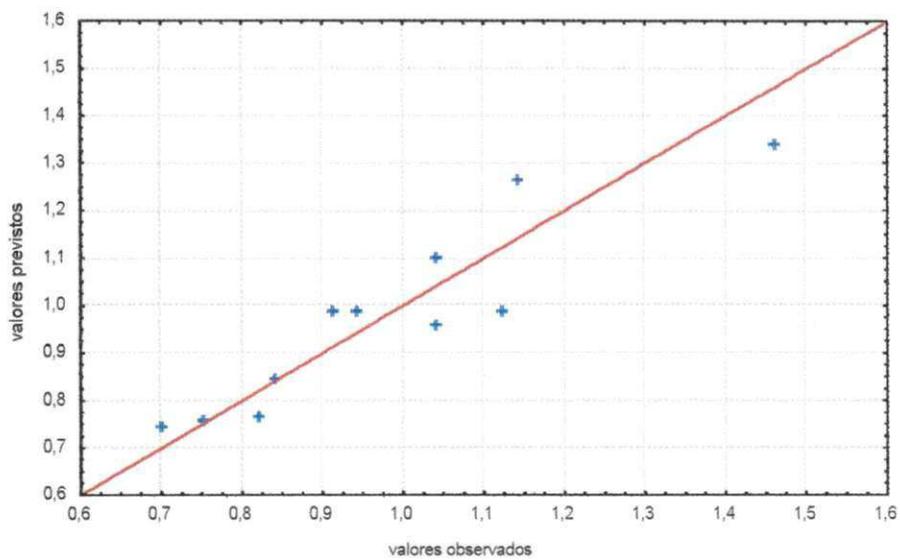
Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de graus de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	595,00	5	119,00	
Resíduos	92,89	5	18,58	6,40
Falta de ajuste	70,10	3	23,37	
Erro puro	22,79	2	11,39	2,05
Total	687,89	10	68,79	
% de variação explicada	86,50			
Coeficiente de correlação	0,93			
F <sub>Tabelado</sub> para 95% de confiança				F <sub>0,95;5,5</sub> = 5,05 F <sub>0,95;3,2</sub> = 19,16

**Tabela 14 - Análise da variância para o ajuste do modelo quadrático do segundo planejamento para a produtividade.**

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de graus de liberdade	Média quadrática	Teste F
Regressão	0,3945	5	0,0789	
Resíduos	0,0713	5	0,0143	5,52
Falta de ajuste	0,0455	3	0,0152	
Erro puro	0,0258	2	0,0129	1,18
Total	0,4658	10	0,0466	
% de variação explicada	84,69			
Coeficiente de correlação	0,92			
F <sub>Tabelado</sub> para 95% de confiança				F <sub>0,95;5,5</sub> = 5,05 F <sub>0,95;3,2</sub> = 19,16



(a)



(b)

**Figura 18** - Valores observados versus valores previstos para o modelo quadrático. (a) Rendimento e (b) Produtividade

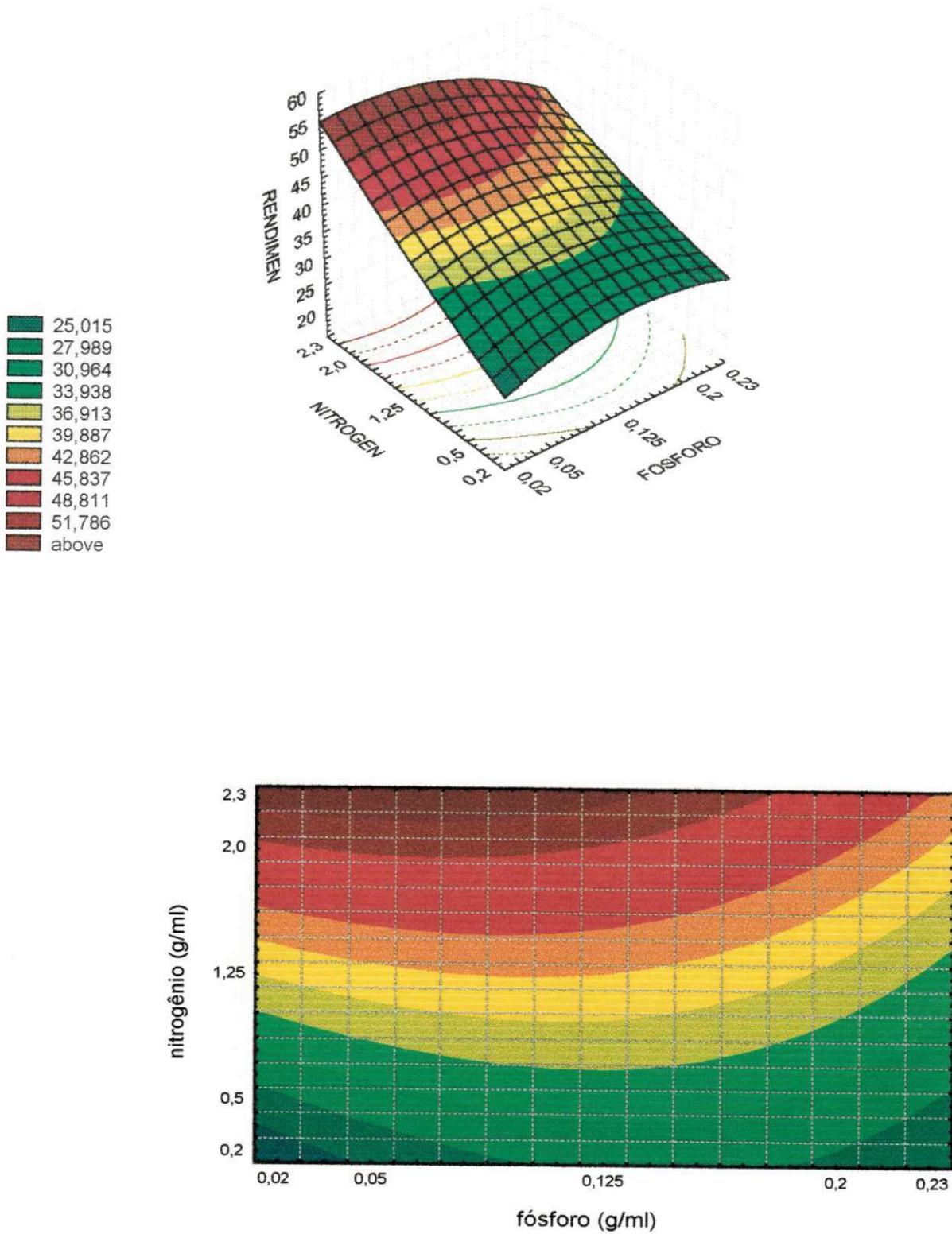


Figura 19 - Efeitos do fósforo e nitrogênio sobre o rendimento no segundo planejamento

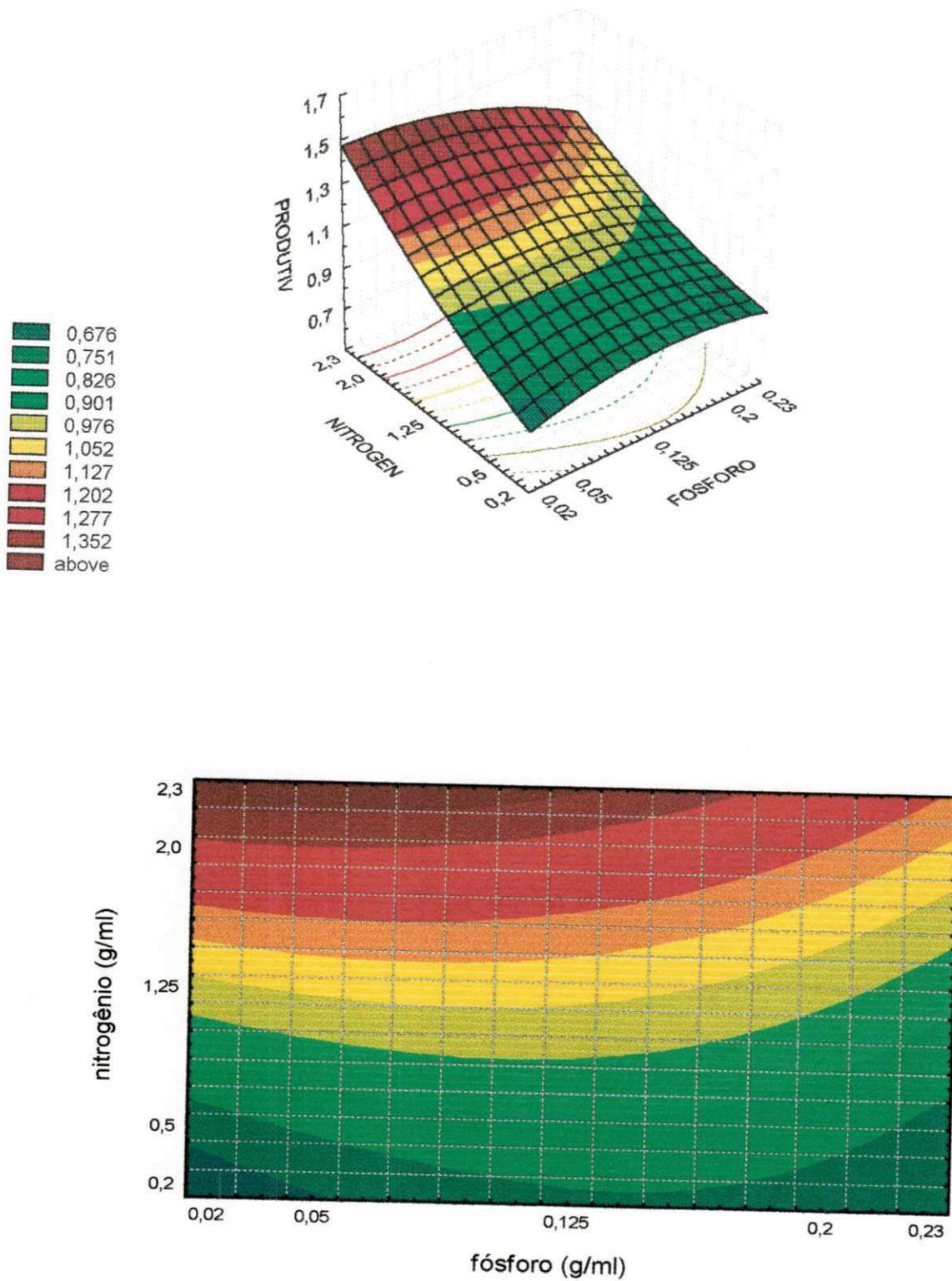


Figura 20 - Efeitos do fósforo e nitrogênio sobre a produtividade no segundo planejamento.

Analisando os resultados dos planejamentos realizados (1ª e 2ª ordem), verifica-se que para melhores valores de rendimento e produtividade as variáveis estudadas que exerceram maiores influências em ordem crescente foram: concentração de etanol e concentração de nitrogênio. A concentração de fósforo apresentou influência significativa apenas no primeiro planejamento quando comparado com a concentração do nitrogênio para o rendimento, já para a produtividade o efeito maior foi do nitrogênio quando comparado com o fósforo, dentro das faixas estudadas neste trabalho.

Os valores ótimos encontrados para operar a produção de vinagre e conseguir o valor mínimo permitido pela legislação que é de 4% de ácido acético, utilizando a metodologia deste trabalho, que é bastante usada pelos pequenos produtores de vinagre da região Nordeste, foi de concentração inicial de etanol em torno de 6% e concentração de nitrogênio em 1,7g/ml, com adição mínima de uma fonte de fósforo.

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSÕES

Através do estudo da cinética da fermentação não foi possível observar uma influência nítida da concentração de etanol como também, das concentrações dos nutrientes, com base nos valores da velocidade inicial da reação, pois a mesma não variou apreciavelmente.

Com o auxílio do planejamento experimental, foi possível verificar que a concentração do etanol é uma variável importante, influenciando tanto no rendimento quanto na produtividade do processo.

A concentração ótima do etanol para maximizar o rendimento e produtividade, utilizando a metodologia usada nas pequenas indústrias da região Nordeste, foi aproximadamente 4%, com a qual encontrou rendimentos superiores à 70% e produtividade acima de 0,87 g/lh, para um tempo de fermentação de 24 horas.

Em virtude da legislação brasileira considerar vinagre após a concentração de ácido acético acima de 4%, observou-se pelos rendimentos médio encontrados que com concentração inicial de etanol igual a 6% produz concentração de ácido acético de 4%.

Comparando os valores da produtividade do nosso processo com a produtividade média dos processos de produção de vinagre encontrada na literatura, observa-se que o processo em estudo equivale ao processo rápido.

Os valores experimentais são bem representados pelos modelos ajustados, validando dessa forma os modelos estudados quando comparados aos valores de  $F_{\text{TABELADO}}$  em relação aos obtidos pelos modelos, garantindo que tanto o modelo linear como o quadrático para as variáveis respostas indicaram uma quantidade de variação devido ao modelo ajustado superior ao valor tabelado a um nível de confiança de 95%.

Dentre os nutrientes estudados o único que mostrou um pouco de influência sobre as respostas foi o nitrogênio, e esta influência só foi melhor

percebida depois do segundo planejamento onde as faixas de concentração de nutrientes foram ampliadas.

As variáveis estudadas que obtiveram maiores influências sobre as variáveis respostas (rendimento e produtividade) em ordem crescente, para o modelo de 1ª ordem foram, para o rendimento: concentração de etanol, concentração de nitrogênio e concentração de fósforo e para a produtividade: concentração de fósforo, concentração de etanol e concentração de nitrogênio. Para o modelo de 2ª ordem, fixando a concentração de etanol em 6%, as variáveis em ordem crescente que mais influenciaram sobre as respostas foram: concentração de nitrogênio e de fósforo, tanto para o rendimento quanto para a produtividade.

A metodologia utilizada baseada no planejamento experimental e análise de superfície de resposta demonstrou ser uma importante ferramenta, na realização dos experimentos, fornecendo muito mais informações através do número mínimo possível de experimentos.

## CAPÍTULO 6

### PERSPECTIVAS

- Trabalhar com outros processos como o lento e o submerso, utilizando outros tipos de reatores;
- Estudar o efeito de outros nutrientes sobre a fermentação, analisando as faixas de valores que possibilitem um maior rendimento e produtividade.
- Verificar a importância de outras variáveis, como por exemplo: temperatura, pH e concentração de oxigênio, sobre o processo.

## CAPÍTULO 7

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, J.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**, Campinas : Editora. da UNICAMP, 1995.
- BORZANI, W.; AQUARONE, E.; ALMEIDA LIMA, U. **Tecnologia da Fermentações**, São Paulo, v.1, 1987.
- BORZANI, W.; AQUARONE, E.; ALMEIDA LIMA, U. **Tópicos de Microbiologia Industrial**, São Paulo, v. 2, 1990.
- BORZANI, W.; AQUARONE, E.; ALMEIDA LIMA, U. **Engenharia Bioquímica**, São Paulo, v. 3, 1986.
- BORZANI, W.; AQUARONE, E.; ALMEIDA LIMA, U. **Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação**. São Paulo, v. 5, 1993.
- BOX, G.E.P; WILSON,K.B. **On the experimental attainment of optimum condition**. J. Royal Stat, v 13, P.1 - 45, 1951.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for Experimenters**, New York, 1978.
- CRUESS, W.V. **Produtos Industriais de Frutas e Hortaliças**. Rio de Janeiro, v 1, 1973.
- FUKAYA, M; PARK,Y.S; TODA,K. **Improvement of Acetic Acid Fermentation by Molecular Breeding and Process Development**, Journal of Applied Bacteriology, 73, 447 - 454, 1992.
- GHOMMIDH, C.; NAVARRO, J.M.; DURAND, G. **A Study of Acetic Acid Production by Immobilized Acetobacter Cells: Oxygen Transfer**. Biotechnology and Bioengineering, 24, 605 - 617, 1982.
- GONÇALVES, N.C. **O Livro do Vinagre**. 15<sup>o</sup> Edição, São Paulo, 1998.
- HUANG, Y; YANG, S.T. **Acetate Production from Whey Lactose Using Co-Immobilized Cells of Homolactic and Homoacetic Bacteria in a Fibrous-Bed Bioreactor**. Biotechnology and Bioengineering, 60, 498 - 506, 1998.

- LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª Edição, São Paulo, 1995.
- MURAOKA, H; WATABE Y; OGASAWARA,N. **Effect of Oxygen Deficiency on Acid Production and Morphology of Bacterial Cells in Submerged Acetic Fermentation by *Acetobacter aceti***. J. Ferment. Technol., 60, 171 - 180, 1982.
- PARK, Y.S; OHTAKE, H.; TODA, K.; FUKAYA, M.; OKUMURA, H.; KAWAMURA,Y. **Acetic Acid Production Using a Fermentor Equipped with a Hollow Fiber Filter Module**, Biotechnology and Bioengineering, 33, 918 - 923, 1988.
- PARK, Y.S; OHTAKE, H.; TODA, K.; FUKAYA, M.; OKUMURA, H.; KAWAMURA, Y. **Acetic Acid Production Using a Fermentor Equipped with a Hollow Fiber Module**, Biotechnology and Bioengineering, v.33, n.7, P. 918 – 923, 1989a.
- PARK, Y.S.; OHTAKE, H.; TODA, K.; FUKAYA, M.; KAWAMURA, Y. **Effects of Dissolved Oxygen and Acetic Acid Concentration on Acetic Acid Production in Continous Culture of *Acetobacter Aceti***, Journal. Ferment and Bioeng, v.68, n. 2, P. 96 – 101, 1989b.
- PARK, Y.S.; OHTAKE, H.; TODA, K. **A Kinetic Study of Acetic Acid Production by Liquid-surface Cultures of *Acetobacter Aceti***, Applied Microbiology Biotechnology, v.33, P. 259-263, 1990.
- PARK, Y.S.; M.; OKUMURA.; KAWAMURA, Y.; TODA, K. **Production of Acetic Acid by a Repeated Batch Culture with Cell Recycle of *Acetobacter Aceti***, Biotechnology Letters, v.13, n. 4, P. 271-276, 1991.
- PARK, Y.S.; TODA, K. **Multi-Stage Biofilm Reactor for Acetic Acid Production at High Concentration**, Biotechnology Letters, v.14, n.7, P. 609-612, 1992.
- REHM, H.J.; REED, G. **Biomass, Microorganismos for Special Applications, Microbial Products I, Energy from Renewable Resources**, v. 3, 1983.
- SILVA, F.L.H. **Modelagem, Simulação e Controle de Fermentação Alcoólica Contínua Extrativa**, Tese de Doutorado, UNICAMP, Campinas, 1998.
- SHREVE, R.N.; BRINK JR, J.A. **Indústrias de Processos Químicos**, Rio de Janeiro, 4ª Edição, 1977.
- STUPIELLO, J.P. & HORII, J. **Condução da Fermentação Alcoólica**, Piracicaba, v.4, 1985.

- TODA, K.; YONG SOO, P.; ASAKURA, T.; CHENG, C.Y.; OHTAKE, H. **High-rate of Acetic Acid Production in Shallow Flow Bioreactor**, Applied Microbiology and Biotechnology, v.30, n. 6, P 559 – 563, 1989.
- VAUGHN, R.H. **The acetic bacteria**, Wallerstein Labs. Commun., v.5, n. 14, P. 5-27, 1942.
- VIEIRA, R. V. **Estudo Cinético de Formação de Vinagre de Álcool Catalizada por Enzimas**. Relatório Parcial de Iniciação Científica PIBIC/CNPq. (Setembro de 1999 - Julho de 2000), UFPB, Campina Grande.
- ZARDINI, F. A. **Construção e Operação de um Gerador de Vinagre**. Dissertação de mestrado, UNICAMP, Campinas, 2000.
- WANG, J.; ARAKI, T.; OGAWA, T.; MATSUOKA, M. **A method of Graphically Analyzing Substrate-Inhibition Kinetics**. Biotechnology and Bioengineering, v. 62, n.4, P. 402 - 409, 1999.
- WERKEMA, M.C.C; AGUIAR, S. **Planejamento e Análise de Experimentos : Como Identificar as Principais Variáveis Influentes em um Processo**. Belo Horizonte, v 8, 1996.

# ANEXOS

## **ANEXO A**

**Deduções de expressões**

## ANEXO A

### DEDUÇÕES DE EXPRESSÕES

#### 1. Concentração do ácido acético em mol/litro

$$M_1V_1 = M_2V_2$$

$$0,1 \times V_g = M \times 2$$

$$M_2 = \frac{0,1}{2} \times V_g$$

$$M_2 = 0,05V_g$$

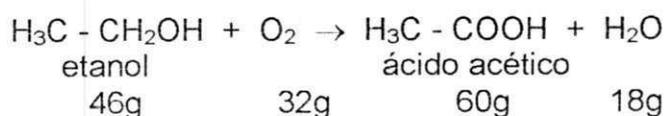
onde: os subscritos 1 e 2 são para solução de hidróxido de sódio e solução de vinagre, respectivamente.

#### 2. Conversão teórica do etanol em ácido acético

$$\text{Concentração Inicial de Etanol} \begin{cases} 3\% = 3\text{ml}/100\text{ml} \times D_E = 2,37 \text{ g}/100\text{ml} \\ 6\% = 6\text{ml}/100\text{ml} \times D_E = 4,73 \text{ g}/100\text{ml} \\ 9\% = 9\text{ml}/100\text{ml} \times D_E = 7,10 \text{ g}/100\text{ml} \end{cases}$$

Onde:  $D_E$  = Densidade do etanol (0,789 g/ml)

- Reação Estequiométrica:



46g de etanol → 60g de ácido acético  
1g de etanol → X ácido acético

X = 1,304 g de ácido acético (Fator de Conversão)

### 3. Rendimento máximo teórico de ácido acético

$$\begin{cases} 3\% = 2,37\text{g}/100\text{ml} \times \text{FC} = 3,09 \text{ g ácido acético}/100\text{ml} \\ 6\% = 4,73\text{g}/100\text{ml} \times \text{FC} = 6,17 \text{ g ácido acético}/100\text{ml} \\ 9\% = 7,10\text{g}/100\text{ml} \times \text{FC} = 9,26 \text{ g ácido acético}/100\text{ml} \end{cases}$$

Onde: FC = Fator de conversão (1,304 g de ácido acético)

### 4. Rendimento experimental do ácido acético

Rendimento experimental de ácido acético = Acidez do ácido acético (ml) ×  $D_{AA}$

Onde:  $D_{AA}$  = Densidade do ácido acético (1,049 g/ml)

### 5. Cálculo do rendimento do processo

$$\text{Rend} = \frac{\text{rendimento experimental do ácido acético (g/100ml)}}{\text{rendimento máximo teórico do ácido acético (g/100ml)}} \times 100\%$$

## 6. Cálculo da produtividade do processo

$$\text{Prod} = \frac{\text{rendimento experimental (g/l)}}{\text{Tempo (h)}}$$

## 7. Exemplo de cálculos

Exemplo 1: cálculo do rendimento e produtividade para Experimento 1 do planejamento experimental fatorial  $2^3$ , onde concentração de etanol foi igual à 3%, concentração de fósforo igual à 0,01g/ml e concentração de nitrogênio igual à 0,1g/ml.

- conversão teórica do etanol em ácido acético  
concentração inicial de etanol = 3% = 3ml/100ml  $\times$  0,789 g/ml = 2,37g/100ml
- rendimento máximo teórico de ácido acético  
3% = 2,37g/100ml  $\times$  1,304 g de ácido acético = 3,09 g ácido acético/100ml
- rendimento experimental do ácido acético  
rend exp do ácido acético = 2,29 ml  $\times$  1,049 g/ml = 2,40 g ácido acético/100ml
- cálculo do rendimento do processo  
$$\text{rendimento} = \frac{2,40 \text{ g/100ml}}{3,09 \text{ g/100ml}} \times 100\% = 78,00\%$$
- cálculo da produtividade  
$$\text{produtividade} = \frac{24,00 \text{ g/l}}{24 \text{ h}} = 1,00 \text{ g/lh}$$

## **ANEXO B**

**Tabelas**

**Tabela B1 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 2% e concentração de fósforo igual à 0,05g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	5,00	1,50	0,25
2	1	7,20	2,16	0,36
3	2	8,50	2,55	0,43
4	3	9,30	2,79	0,47
5	4	10,60	3,18	0,53
6	5	10,10	3,03	0,51
7	10	11,60	3,48	0,58
8	15	11,85	3,56	0,59
9	20	11,95	3,58	0,60
10	25	12,65	3,80	0,63
11	30	12,60	3,80	0,63
12	45	13,50	4,05	0,68
13	60	14,00	4,20	0,70
14	75	14,00	4,20	0,70
15	90	14,50	4,40	0,70

**Tabela B2 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 4% e concentração de fósforo igual à 0,05g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	4,60	1,40	0,23
2	1	7,10	2,10	0,35
3	2	7,00	2,10	0,35
4	3	9,30	2,80	0,47
5	4	9,50	2,80	0,47
6	5	10,00	3,00	0,50
7	10	11,40	3,40	0,57
8	15	11,00	3,30	0,55
9	20	11,45	3,40	0,57
10	25	12,50	3,80	0,63
11	30	12,30	3,70	0,67
12	45	13,50	4,00	0,67
13	60	14,30	4,30	0,72
14	75	14,40	4,30	0,72
15	90	14,40	4,30	0,72

**Tabela B3 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 6% e concentração de fósforo igual à 0,05g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	3,30	1,00	0,17
2	1	5,70	1,70	0,28
3	2	7,60	2,30	0,38
4	3	7,70	2,30	0,38
5	4	8,90	2,70	0,45
6	5	9,30	2,80	0,47
7	10	9,55	2,90	0,48
8	15	11,20	3,40	0,57
9	20	11,40	3,40	0,57
10	25	11,45	3,40	0,57
11	30	12,05	3,60	0,60
12	45	12,50	3,80	0,63
13	60	12,40	3,70	0,62
14	75	13,00	3,90	0,65
15	90	13,00	3,90	0,65

**Tabela B4 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 8% e concentração de fósforo igual à 0,05g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	3,60	1,10	0,18
2	1	5,20	1,60	0,27
3	2	6,30	1,90	0,32
4	3	8,90	2,70	0,45
5	4	9,00	2,70	0,45
6	5	10,30	3,10	0,52
7	10	9,60	2,90	0,48
8	15	10,35	3,10	0,52
9	20	10,80	3,20	0,53
10	25	11,35	3,40	0,57
11	30	11,20	3,40	0,57
12	45	12,15	3,60	0,60
13	60	12,40	3,70	0,61
14	75	13,25	4,00	0,67
15	90	13,60	4,10	0,68

**Tabela B5 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 2% e concentração de fósforo igual à 0,2g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	5,00	1,50	0,25
2	1	7,00	2,10	0,35
3	2	7,50	2,25	0,38
4	3	9,40	2,82	0,47
5	4	10,00	3,00	0,50
6	5	10,60	3,20	0,53
7	10	10,40	3,12	0,52
8	15	10,90	3,30	0,55
9	20	11,60	3,50	0,58
10	25	11,60	3,50	0,58
11	30	12,50	3,80	0,63
12	45	12,80	3,84	0,64
13	60	13,10	3,93	0,66
14	75	13,10	3,90	0,65
15	90	13,40	4,02	0,67

**Tabela B6 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 4% e concentração de fósforo igual à 0,2g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	5,10	1,53	0,26
2	1	6,40	1,92	0,32
3	2	7,20	2,16	0,36
4	3	9,50	2,85	0,48
5	4	9,50	2,85	0,48
6	5	10,30	3,09	0,52
7	10	10,00	3,00	0,50
8	15	11,00	3,30	0,55
9	20	11,70	3,51	0,58
10	25	12,10	3,63	0,60
11	30	11,60	3,48	0,58
12	45	12,70	3,81	0,64
13	60	12,50	3,75	0,63
14	75	12,10	3,63	0,61
15	90	12,50	3,75	0,63

**Tabela B7 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 6% e concentração de fósforo igual à 0,2g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	4,20	1,30	0,22
2	1	6,10	1,83	0,31
3	2	7,70	2,31	0,38
4	3	9,30	2,79	0,46
5	4	8,50	2,55	0,43
6	5	8,80	2,64	0,44
7	10	9,40	2,82	0,47
8	15	10,70	3,21	0,54
9	20	11,20	3,86	0,54
10	25	11,50	3,50	0,57
11	30	11,80	3,54	0,59
12	45	13,80	4,14	0,69
13	60	12,20	3,66	0,61
14	75	14,20	4,26	0,71
15	90	12,20	3,66	0,61

**Tabela B8 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 8% e concentração de fósforo igual à 0,2g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	6,50	1,95	0,32
2	1	7,50	2,25	0,38
3	2	8,00	2,40	0,40
4	3	8,00	2,40	0,42
5	4	8,10	2,43	0,40
6	5	7,80	2,34	0,39
7	10	9,40	2,82	0,47
8	15	10,60	3,18	0,53
9	20	10,10	3,03	0,51
10	25	9,90	2,97	0,50
11	30	10,60	3,20	0,53
12	45	11,10	3,30	0,55
13	60	12,10	3,63	0,61
14	75	11,30	3,39	0,56
15	90	11,10	3,33	0,56

**Tabela B9 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 2% e concentração de nitrogênio igual à 0,5g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	5,90	1,77	0,30
2	1	8,20	2,46	0,41
3	2	10,40	3,12	0,52
4	3	11,70	3,51	0,58
5	4	11,60	3,48	0,58
6	5	12,50	3,75	0,62
7	10	14,60	4,40	0,73
8	15	16,20	4,90	0,82
9	20	14,30	4,30	0,72
10	25	14,80	4,44	0,74
11	30	15,00	4,50	0,75
12	45	18,90	5,67	0,94
13	60	17,00	5,10	0,85
14	75	16,00	4,80	0,80
15	90	16,00	4,80	0,80

**Tabela B10 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 4% e concentração de nitrogênio igual à 0,5g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	6,20	1,86	0,31
2	1	8,40	2,52	0,42
3	2	11,10	3,33	0,56
4	3	11,80	3,54	0,59
5	4	10,70	3,21	0,54
6	5	11,00	3,30	0,55
7	10	11,50	3,45	0,58
8	15	12,20	3,66	0,61
9	20	13,80	4,14	0,69
10	25	13,00	3,90	0,65
11	30	14,10	4,23	0,71
12	45	14,90	4,47	0,74
13	60	13,20	3,96	0,66
14	75	14,20	4,26	0,71
15	90	14,20	4,26	0,71

**Tabela B11 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 6% e concentração de nitrogênio igual à 0,5g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	5,40	1,62	0,27
2	1	6,40	1,92	0,32
3	2	10,00	3,00	0,50
4	3	10,30	3,09	0,52
5	4	9,70	2,91	0,48
6	5	11,60	3,48	0,58
7	10	11,60	3,48	0,58
8	15	13,60	4,08	0,68
9	20	13,60	4,08	0,68
10	25	13,70	4,11	0,68
11	30	15,70	4,72	0,79
12	45	15,00	4,50	0,75
13	60	14,90	4,47	0,74
14	75	15,10	4,53	0,76
15	90	15,10	4,53	0,76

**Tabela B12 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 8% e concentração de nitrogênio igual à 0,5g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	6,70	2,01	0,34
2	1	7,20	2,16	0,36
3	2	11,10	3,33	0,56
4	3	9,50	2,85	0,48
5	4	11,70	3,51	0,58
6	5	9,80	2,94	0,49
7	10	11,60	3,48	0,58
8	15	11,60	3,48	0,58
9	20	12,80	3,84	0,64
10	25	14,30	4,29	0,72
11	30	13,40	4,02	0,67
12	45	14,40	4,32	0,72
13	60	16,80	5,04	0,84
14	75	17,00	5,10	0,85
15	90	17,01	5,10	0,85

**Tabela B13 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 2% e concentração de nitrogênio igual à 2,0g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	8,80	3,64	0,44
2	1	12,00	3,60	0,60
3	2	10,50	3,15	0,52
4	3	10,20	3,06	0,51
5	4	12,00	3,60	0,60
6	5	11,60	3,48	0,58
7	10	13,20	3,96	0,66
8	15	13,10	3,93	0,66
9	20	14,50	4,35	0,72
10	25	13,80	4,14	0,69
11	30	15,10	4,53	0,76
12	45	14,30	4,29	0,72
13	60	16,60	4,98	0,83
14	75	17,00	5,10	0,85
15	90	17,02	5,11	0,85

**Tabela B14 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 4% e concentração de nitrogênio igual à 2,0g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	8,80	2,64	0,44
2	1	10,60	3,18	0,53
3	2	10,30	3,09	0,52
4	3	11,20	3,36	0,56
5	4	12,30	3,69	0,62
6	5	11,40	3,42	0,57
7	10	12,60	3,78	0,63
8	15	11,60	3,48	0,58
9	20	12,90	3,87	0,64
10	25	13,90	4,17	0,70
11	30	13,80	4,14	0,69
12	45	13,40	4,02	0,67
13	60	14,20	4,26	0,71
14	75	14,10	4,20	0,70
15	90	14,00	4,20	0,70

**Tabela B15 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 6% e concentração de nitrogênio igual à 2,0g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	10,50	3,15	0,52
2	1	11,40	3,42	0,57
3	2	10,40	3,12	0,52
4	3	11,50	3,45	0,58
5	4	11,00	3,30	0,55
6	5	11,90	3,57	0,60
7	10	12,50	3,75	0,62
8	15	13,50	4,05	0,68
9	20	13,50	4,05	0,68
10	25	14,60	4,38	0,73
11	30	13,50	4,05	0,68
12	45	14,50	4,35	0,73
13	60	13,60	4,08	0,68
14	75	13,70	4,11	0,68
15	90	13,72	4,11	0,68

**Tabela B16 - Resultados obtidos para concentração de etanol igual à 8% e concentração de nitrogênio igual à 2,0g/ml**

Ensaio	Tempo(min)	NaOH (0,1M)	Acidez (ml)	Molaridade (M)
1	0	7,00	2,07	0,34
2	1	8,30	2,49	0,41
3	2	8,90	2,67	0,44
4	3	10,80	3,24	0,54
5	4	10,80	3,24	0,54
6	5	12,90	3,87	0,64
7	10	10,50	3,15	0,52
8	15	10,50	3,15	0,52
9	20	11,20	3,36	0,56
10	25	11,00	3,30	0,63
11	30	12,60	3,78	0,58
12	45	11,50	3,90	0,65
13	60	13,00	3,90	0,65
14	75	13,20	3,96	0,66
15	90	13,22	3,97	0,66

Tabela B17 - Dados preliminares obtidos do planejamento fatorial experimental  $2^3$  nos intervalos de tempo equivalentes a 18 h, 24h e 48h para concentração de etanol igual à 3%, concentração de fósforo de 0,01 g/ml e nitrogênio de 0,1g/ml

Tempo (horas)	NaOH (ml)	Acidez ml)	Rendimento Experimental (%)
18	9,55	9,55	3,01
24	9,65	9,65	3,04
48	9,70	9,70	3,05

Tabela B18 - Dados preliminares obtidos do planejamento fatorial experimental  $2^3$  nos intervalos de tempo equivalentes a 18 h, 24h e 48h para concentração de etanol igual à 9%, concentração de fósforo de 0,05 g/ml e nitrogênio de 0,5g/ml

Tempo (horas)	NaOH (ml)	Acidez(ml)	Rendimento Experimental(%)
18	8,75	2,63	2,75
24	8,70	2,61	2,74
48	8,30	2,49	2,61

Tabela B19 - Dados preliminares obtidos do planejamento fatorial experimental  $2^3$  nos intervalos de tempo equivalentes a 18 h, 24h e 48h para concentração de etanol igual à 9%, concentração de fósforo de 0,01 g/ml e nitrogênio de 0,1g/ml

Tempo (horas)	NaOH (ml)	Acidez(ml)	Rendimento Experimental(%)
18	9,45	2,84	2,97
24	9,60	2,88	3,02
48	9,80	2,94	3,08

**Tabela B20 - Dados preliminares obtidos do planejamento fatorial experimental 2<sup>3</sup> nos intervalos de tempo equivalentes a 24h e 48h para concentração de etanol igual à 9%, concentração de fósforo de 0,01 g/ml e nitrogênio de 0,5g/ml**

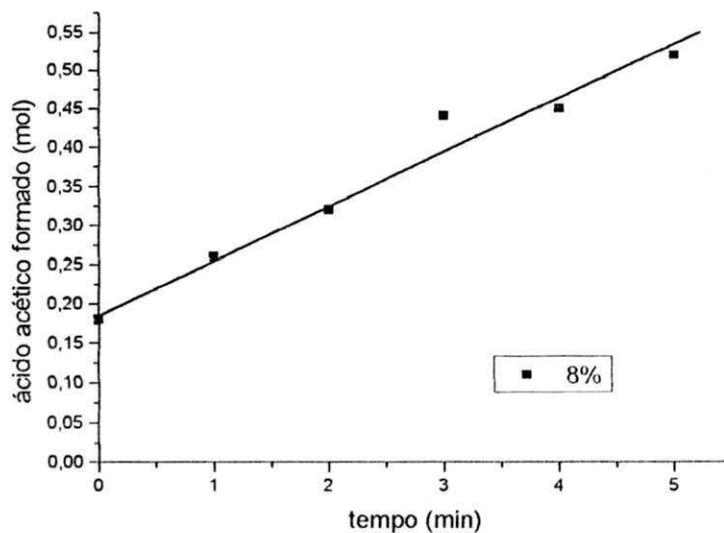
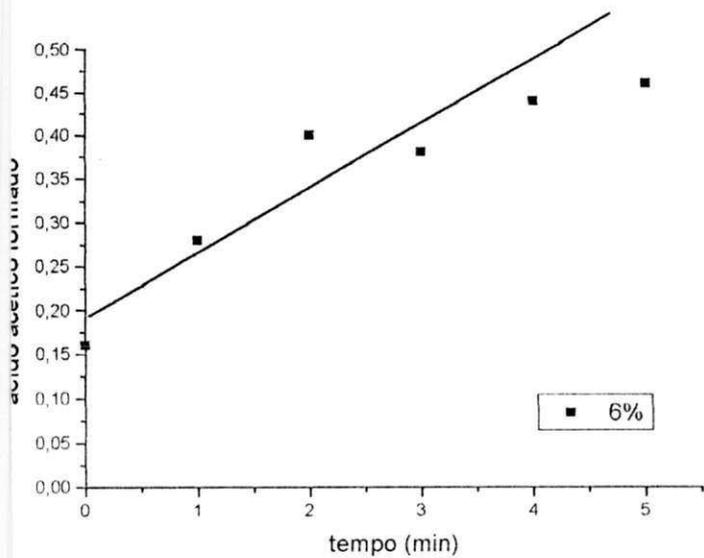
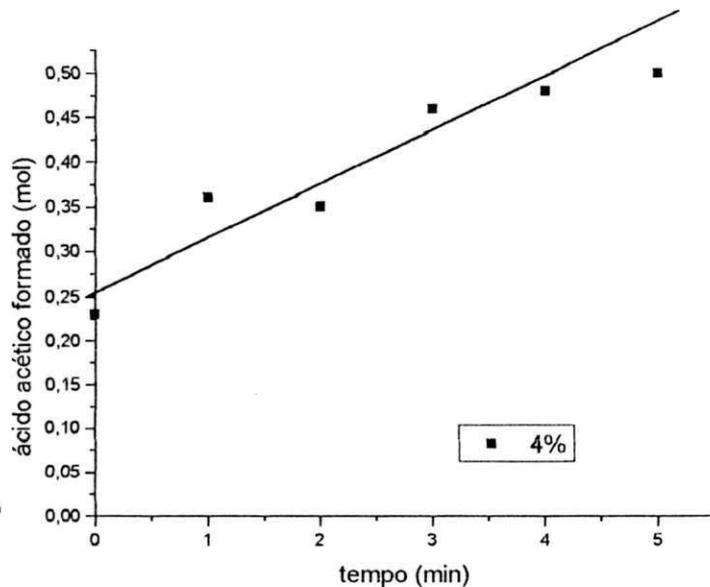
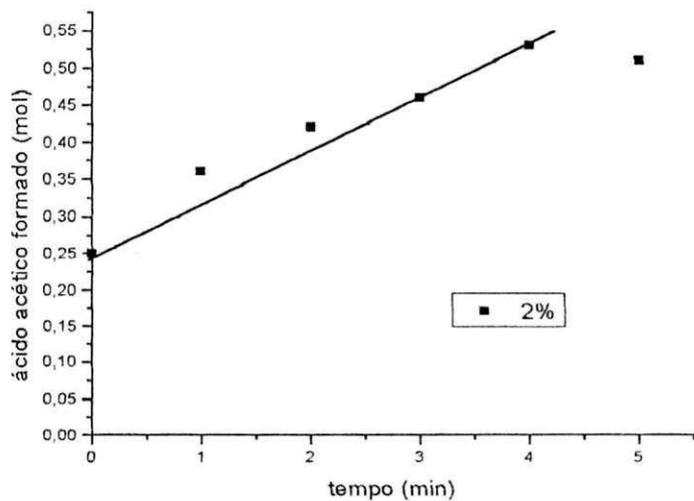
Tempo (horas)	NaOH (ml)	Acidez(ml)	Rendimento Experimental(%)
24	9,7	2,91	3,05
48	10,25	3,08	3,23

**Tabela B21 - Dados preliminares obtidos do planejamento fatorial experimental 2<sup>3</sup> nos intervalos de tempo equivalentes a 24h e 48h para concentração de etanol igual à 9%, concentração de fósforo de 0,05 g/ml e nitrogênio de 0,1g/ml**

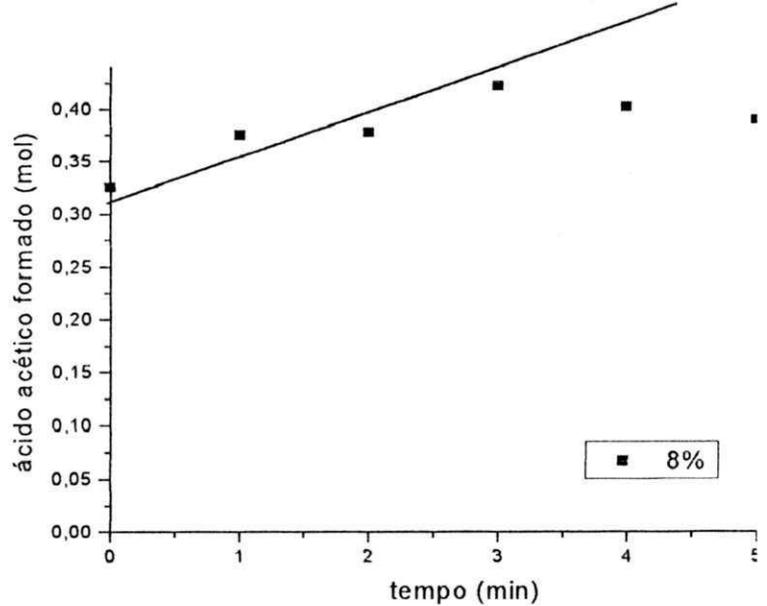
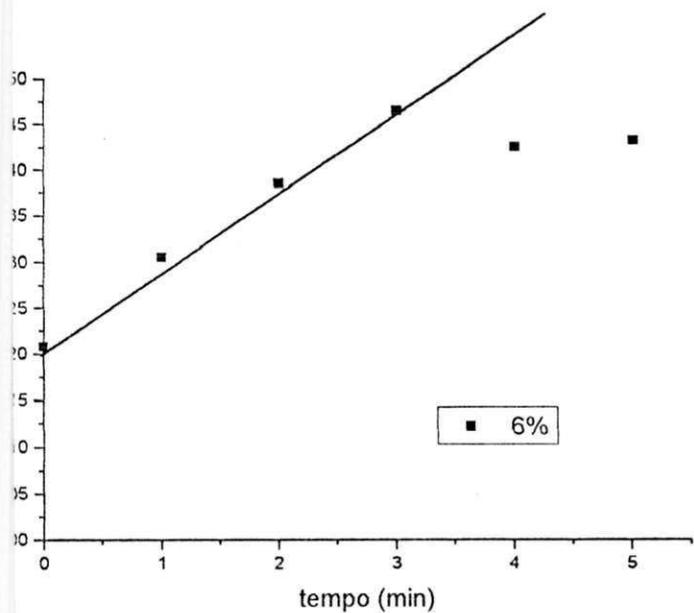
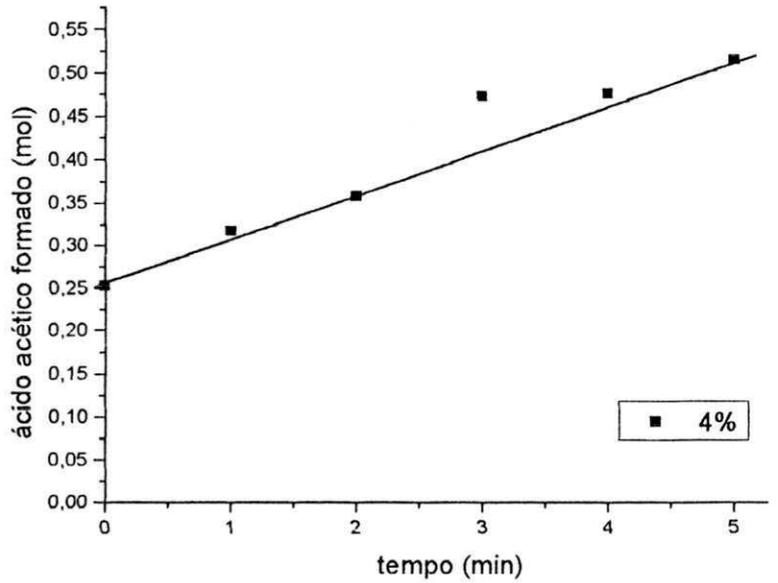
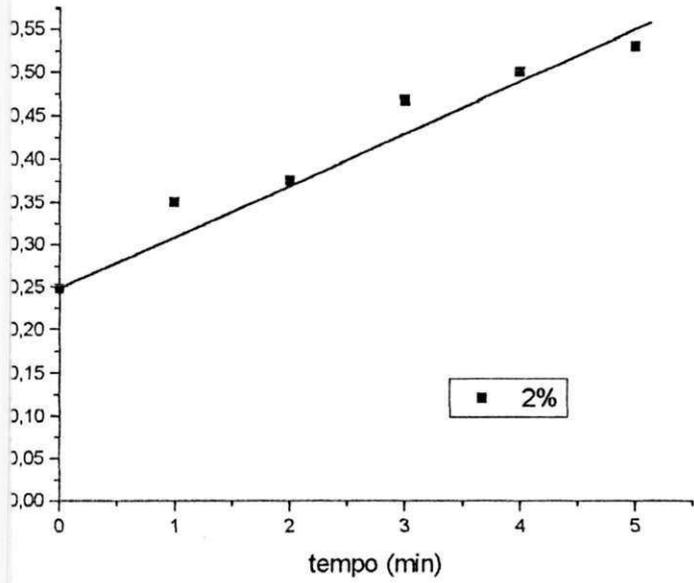
Tempo (horas)	NaOH (ml)	Acidez(ml)	Rendimento Experimental(%)
24	10,50	3,15	3,30
48	10,95	3,29	3,45

## **ANEXO C**

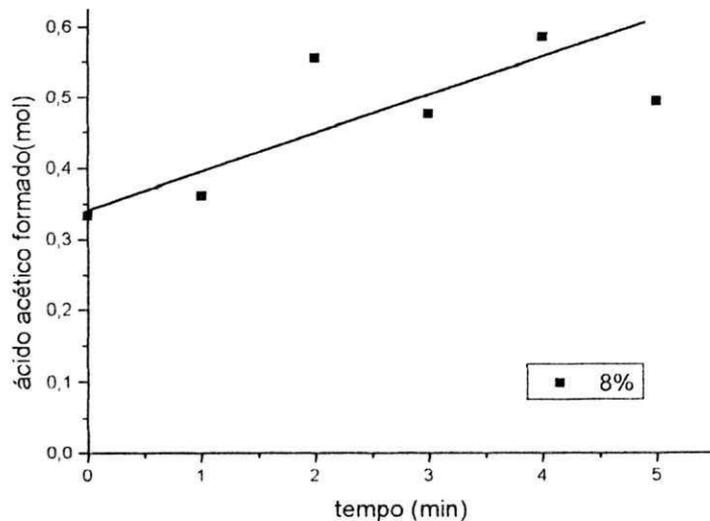
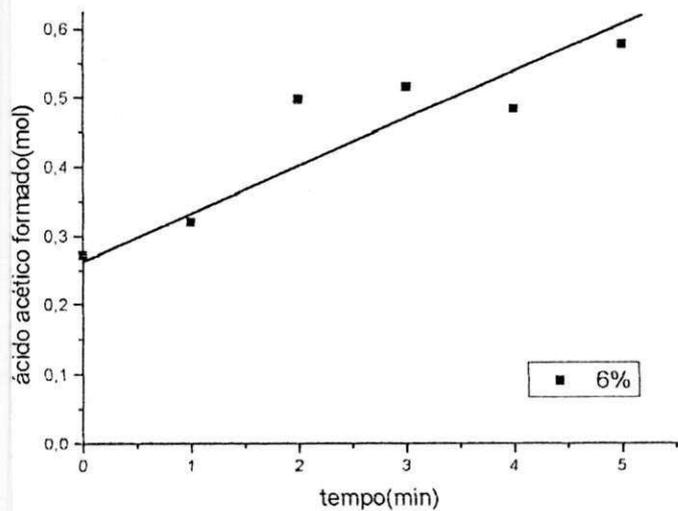
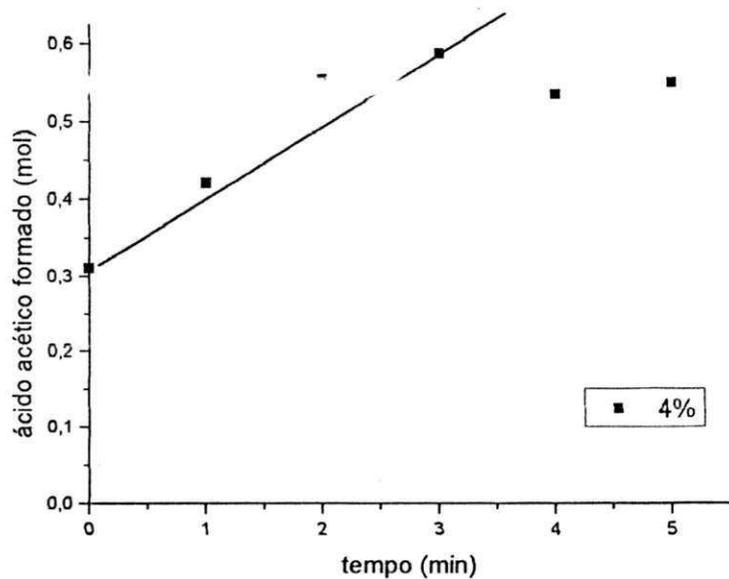
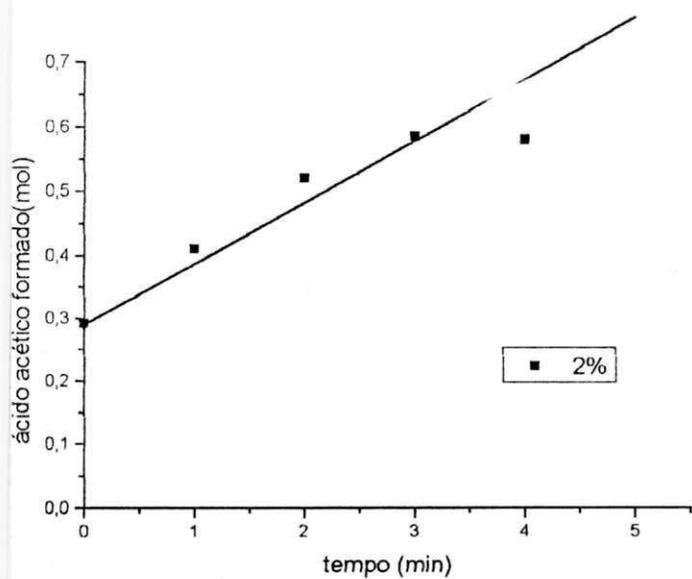
### **Gráficos**



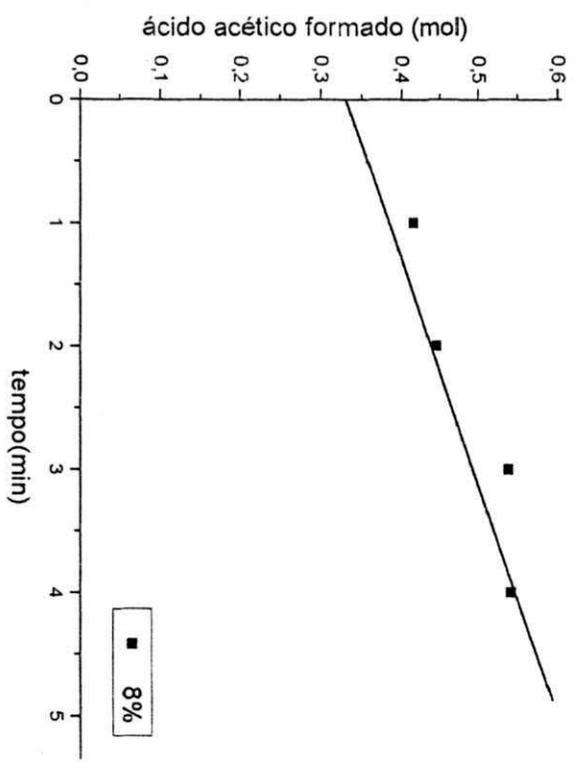
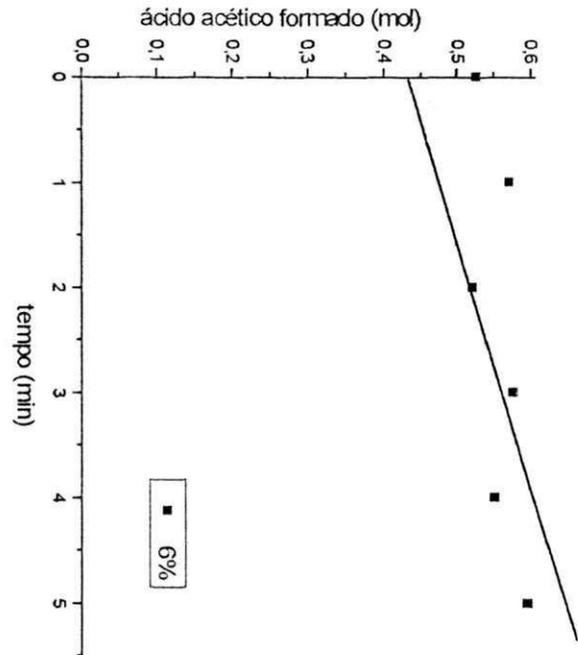
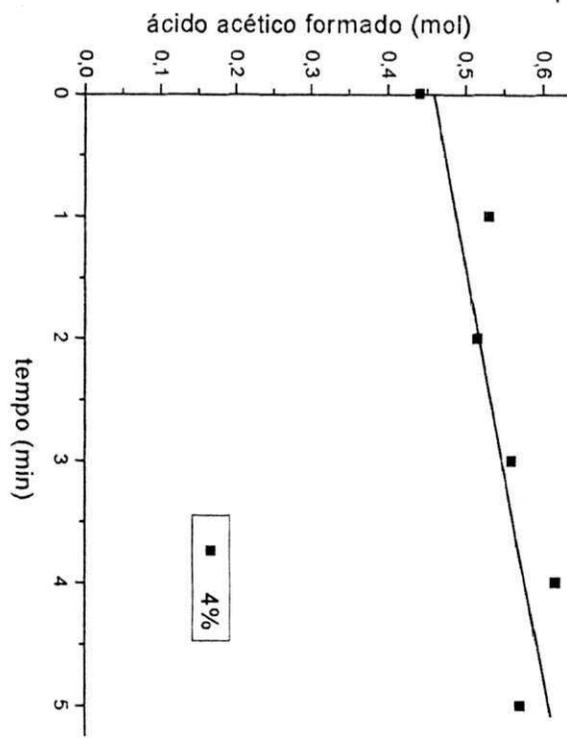
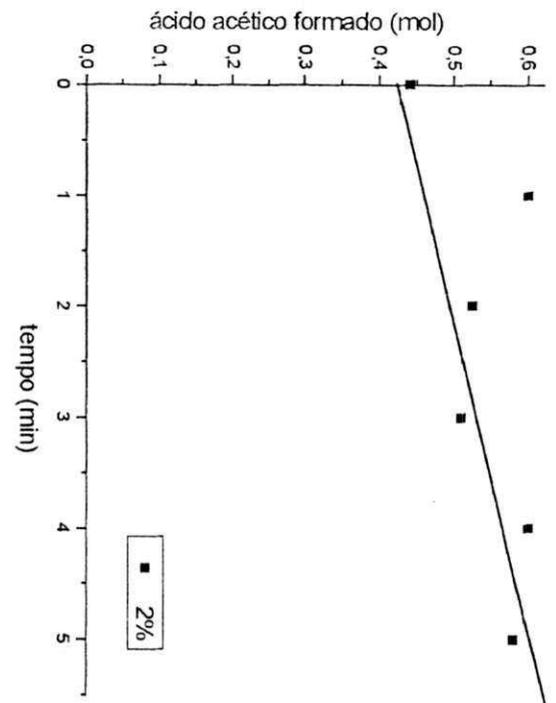
**Figura C1** - Gráfico da molaridade do ácido acético formado nos primeiros 5 minutos para concentração de fósforo igual à 0,05g/ml na ausência de nitrogênio.



**Figura C2** - Gráfico da molaridade do ácido acético formado nos primeiros 5 minutos para concentração de fósforo igual à 0,2g/ml na ausência de nitrogênio.



**Figura C3** - Gráfico da molaridade do ácido acético formado nos primeiros 5 minutos para concentração de nitrogênio igual à 0,5g/ml na ausência de fósforo.



**Figura C4** - Gráfico da molaridade do ácido acético formado nos primeiros 5 minutos para concentração de nitrogênio igual à 2,0g/ml na ausência de fósforo.

## ANEXO D

Valores médios do volume de NaOH (0,1M) titulado no  
tempo de 24 horas

**Tabela D1 - Valor médio do volume de NaOH (0,1M) titulado no tempo de 24 horas para o planejamento experimental fatorial 2<sup>3</sup>**

Ensaio	Concentração			NaOH(ml)		
	Etanol (%)	Fósforo (g/ml)	Nitrogênio (g/ml)	Amostra 1	Amostra 2	Média
1 (1 <sup>o</sup> )	3	0,01	0,1	12,35	12,35	12,35
2 (3 <sup>o</sup> )	9	0,01	0,1	9,30	9,70	9,50
3 (11 <sup>o</sup> )	3	0,05	0,1	11,30	11,90	11,60
4 (5 <sup>o</sup> )	9	0,05	0,1	7,70	7,90	7,80
5 (6 <sup>o</sup> )	3	0,01	0,5	11,20	11,20	11,20
6 (4 <sup>o</sup> )	9	0,01	0,5	13,20	12,20	12,70
7 (10 <sup>o</sup> )	3	0,05	0,5	11,30	11,30	11,30
8 (2 <sup>o</sup> )	9	0,05	0,5	9,70	9,60	9,65
9 (9 <sup>o</sup> )	6	0,03	0,3	9,20	11,00	10,10
10 (7 <sup>o</sup> )	6	0,03	0,3	10,10	10,95	10,50
1 (8 <sup>o</sup> )	6	0,03	0,3	9,45	10,50	9,98

Para o cálculo do rendimento e produtividade, os valores médio do hidróxido de sódio encontrados na Tabela D1 foram subtraído do valor inicial do ácido acético encontrado na amostra que foi igual à 4,7 ml.