



SISTEMA DE PRODUÇÃO CONTÍNUA DE ÁLCOOL FERMENTADA POR LEVEDURAS FLOCULANTES EM REATOR ASCENDENTE ACOPLADO A ARDUÍNO®

Adeyvisson Nataniel Silva Lima^{1*}
Camilly Victória Roseno dos Santos
Letícia Vilas Boas Correia
Mariana Urbano Rodrigues Dias da Silva
Miguel Bernardo Militão Aparecido
Orientador: Dr. Alexandre de Jesus Barros
Coorientador: Dr. Fábio Rizzo de Aguiar

RESUMO

O presente artigo tem como objetivo o desenvolvimento de um sistema de produção contínua de álcool. O projeto parte da fermentação de caldo de cana em reator de escoamento ascendente, recheado com material poroso (mídia biológica), tendo seu fluxo controlado por uma bomba peristáltica acoplada a um Arduino®. Este trabalho busca aprimorar a velocidade e economia de energia em relação ao sistema de produção por batelada, tendo em vista a dispensa do tempo de repouso do substrato para a fermentação antes das etapas posteriores.

Apresentando duas torres de PVC, o sistema utiliza a primeira como reserva para o substrato, e a segunda para o armazenamento do meio poroso, já com as leveduras fixadas. Foram realizados testes de adesão celular no material, através de soluções de PBS, formol, azul de metileno e etanol P.A, em água deionizada e clara de ovo, considerando a potencialização da fixação na presença da albumina, proteína componente do ovo.

Todavia possíveis continuações do projeto, sugere-se o aprimoramento e adaptação de métodos de separação da água e do etanol produzido pelo sistema, como pervaporação por membrana, em substituição à destilação convencional, uma vez que mostra um processo com alto gasto de água e energia.

Palavras-chave: Fermentação, Processo Contínuo, Etanol, Leveduras, Arduino®.

ABSTRACT

This article aims to develop a continuous alcohol production system. The project starts with the fermentation of sugarcane juice in an upward flow reactor, filled with porous material (biological media), with its flow controlled by a peristaltic pump coupled to an Arduino®. This project seeks to improve speed and energy savings in relation to the batch production system, with a view to eliminating the resting time of the substrate for fermentation before the subsequent stages.

Featuring two PVC towers, the system uses the first as a reserve for the substrate, and the second for storing the biological media, with the yeast already attached. Cell adhesion tests were carried out on the material, using solutions of PBS, formaldehyde, methylene blue and P.A ethanol, in deionized water and egg white, considering the enhancement of fixation in the presence of albumin, a component protein of the egg.

For possible continuations of the project, it is suggested to improve and adapt methods for separating water and ethanol produced by the system, such as membrane pervaporation, to replace conventional distillation, as this proves to be a process that requires high water consumption and energy.

Keywords: Fermentation, Continuous Process, Ethanol, Yeast, Arduino®.

¹ Curso Técnico em Química – ETEC Irmã Agostina
Av. Feliciano Correa s/n – Jardim Satélite - CEP 04815-240 - São Paulo – Brasil
*nadeyvisson@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O etanol vem sendo considerado uma alternativa para abrandar os efeitos negativos do uso a longo prazo de combustíveis fósseis, diminuir a emissão de gases do efeito estufa, impactos ambientais e contornar a recente alta dos preços da gasolina.

O Brasil possui uma vasta rede produtora de etanol em diversos estados que funciona a nível prático. Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a safra brasileira coletada nos anos de 2022 e 2023 produziu cerca de 27,37 bilhões de litros de etanol, derivados principalmente da cana-de-açúcar, e 3,97 bilhões de litros partindo do milho, tendendo a aumentar nos anos seguintes. Entretanto, há espaço para otimizações como o complexo de produção atual que ocorre em etapas distintas. (CONAB, 2023 p.39-41)

O método contínuo aplicado à produção de etanol é uma abordagem industrial inovadora e eficiente para a fabricação desse biocombustível vital, diferentemente dos métodos tradicionais que empregam bateladas intermitentes. Segundo Viegas (2003), “basicamente, o processo de fermentação contínua é constituído de tanques agitados, ligados em série. Possui unidade separadora que permite o reciclo de células de leveduras, mantendo a concentração destas elevada, o que proporciona altas produtividades,” (VIEGAS, 2003 p.07).

A fermentação em batelada pode levar a baixo rendimento e produtividade quando o substrato é adicionado de uma só vez. Considerando que esse processo é comumente utilizado como base para comparações de produtividade na área, sua baixa eficiência estimula o surgimento de formas alternativas de produção (CARVALHO e SATO, 2001; SCHMIDELL e FACCIOTTI, 2001).

O processo contínuo pode ser mais vantajoso, pois otimiza diversas condições do sistema em batelada, como o aumento da produtividade volumétrica, menor produção de resíduos, maior uniformidade, redução de custos laboratoriais (uma vez alcançado o estado desejado do produto) e a diminuição do tempo de limpeza e sanitização dos reatores. “A maior desvantagem é que as fermentações contínuas são mais suscetíveis à contaminação bacteriana, por longos prazos de exposição” (CYSEWSKI e WILKIE 1978 e FACCIOTTI, 2001).

Dessa forma, o atual projeto se propõe a desenvolver e provar a eficiência de um método para a produção de etanol, tendo em base o método contínuo e realizando testes de adesão celular para aumentar a eficiência da fermentação.

2. METODOLOGIA

A seguir serão apresentados os materiais e métodos utilizados para a realização deste trabalho.

2.1. MATERIAIS

Para a realização dos testes, serão utilizados os materiais descritos na tabela 1.

Tabela 1: Materiais e suas respectivas marcas

Material	Fornecedor
Balança analítica	-
Estufa	-
Ultrasom	-
Espectrofotômetro	-
Incubadora	-
Espátulas	-
Béquer	-
Tubo de ensaio	-
Bastão de vidro	-
Frasco de vidro âmbar	-
Estante de tubo	-
Balão volumétrico	-
Pipeta automática	-
Pipeta graduada	-
Pipeta volumétrica	-
Pipeta pasteur	-
Papel de filtro	-
Picnômetro	-
Funil simples	-
Suporte universal	-
Argola	-
Jumpers	-
Placa de prototipação	-
Mídia biológica	-
Cano PVC	TIGRE
Caps PVC	TIGRE
Bomba peristáltica	3x5 mm 12V Robocore
Transistor	Robocore
Arduíno UNO	-
Balão de fundo redondo	-
Manta térmica	-
Condensador	-
Água mineral	-
Adesivo Plástico para PVC	TIGRE
Anel de vedação	TIGRE

A Bomba peristáltica (figura 1) foi utilizada para realizar a transferência da solução de sacarose de um reator para o outro sem que a mesma entre em contato com nenhuma parte do equipamento, com o fito de evitar contaminações. Para a realização da fermentação a bomba operou sob regime de 1s de operação para 11s em descanso.

Figura 1: Bomba peristáltica Robocore

Fonte: Robocore.

O Arduino possibilitou a programação e controle de fluxo da bomba peristáltica, utilizando-se da linguagem C++ como base para codificação.

Figura 2: Arduino UNO

Fonte: Raltronix.

Para a realização dos testes, serão utilizados os reagentes descritos na tabela 2.

Tabela 2: reagentes e suas respectivas fórmulas químicas.

Reagente	Fórmula Molecular
Sacarose	$C_{12}H_{22}O_{11}$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
Azul de Metileno	$C_{16}H_{18}N_3SCl$
Álcool Etilico Absoluto	C_2H_6O
Formaldeído	C_2H_6O
Cloreto de Sódio	NaCl
Cloreto de Potássio	KCl
Fosfato Dissódico	

Fosfato
Monopotássico

Na_2HPO_4
 KH_2HPO_4

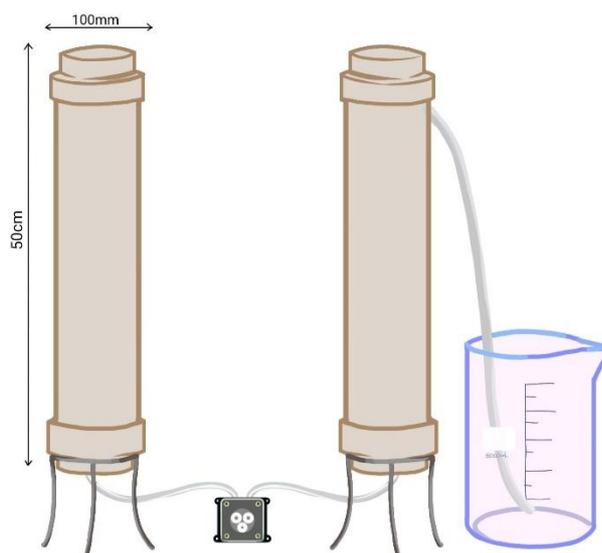
2.2. MÉTODOS

Teste de fluxo da bomba

O teste tem como objetivo analisar o fluxo da bomba – sendo realizado em diferentes tempos comandados pelo Arduino de 1 s, 5 s e 60 s – com o auxílio de um suporte para segurar a bomba peristáltica, conectado a duas mangueiras. A primeira auxilia na transferência da água contida em um bquer de 50 mL para a bomba, enquanto a segunda transfere da bomba para um segundo bquer onde a quantidade de água transferida foi medida para cada tempo.

Fermentação alcoólica

O sistema é composto por duas torres de PVC 100 mm x 50 cm contendo quatro caps de PVC 100 mm (figura 1), em que uma armazenará a solução de sacarose 16%, e a outra as leveduras junto às mídias biológicas (material poroso utilizado no projeto). Foi utilizada uma bomba peristáltica comandada por um Arduino para bombear o líquido de uma torre para a outra.

Figura 3: Montagem do sistema

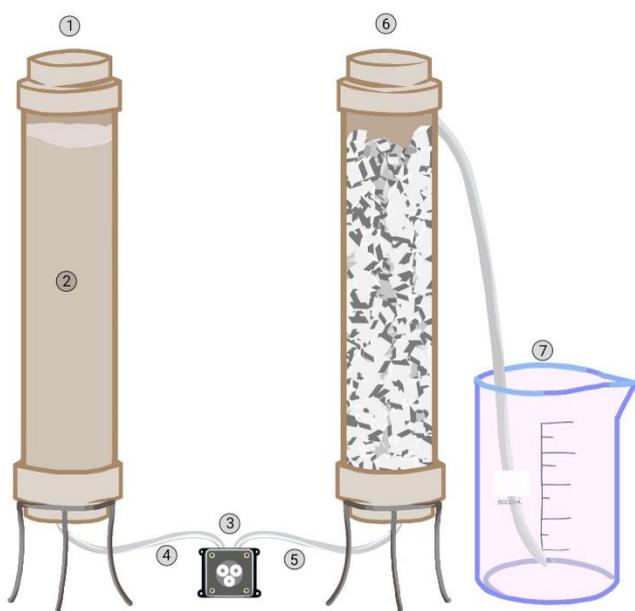
Fonte: Do próprio autor, 2023.

Inicialmente, foi preparada uma solução de 2,7 L composta 16% por sacarose e 1% por levedura, dissolvidas em água mineral. A mesma foi adicionada à coluna recheada por mídia para a fixação das leveduras. Após um período de 24 horas de fixação, a torre foi esvaziada, restando

somente os materiais porosos com as leveduras fixadas. Depois preparou-se 3,7 L de uma solução 16% sacarose e completou-se com 84% de água mineral.

A solução (2) partiu do reator (1) e passou pela bomba peristáltica (3), onde o líquido passou pelas mangueiras (4 e 5) e foi bombeado durante um período de 24 horas. Após o período, o líquido terminou no reator com as mídias biológicas (6), onde ocorreu a fermentação. Após o término da fermentação, a solução final foi finalmente depositada em um béquer (7) para análise do resultado, como mostrado na figura 4.

Figura 4: Montagem do sistema



Fonte: Do próprio autor, 2023.

Programação do Arduino

O Arduino foi programado para um fluxo de pulso que leva 24 horas de funcionamento, onde a bomba peristáltica bombeia 60 segundos para o enchimento das mangueiras, logo após ela descansa 30 segundos e funciona no ciclo contínuo de 1 s funcionando e 11 s de repouso, e só é desligado no término da fermentação. Essa programação foi criada para que a solução de sacarose levasse 24 horas para passar pelo tanque de fermentação.

Teste de Adesão celular

Neste experimento, realizou-se um teste de adesão celular para avaliar a eficiência da albumina (clara do ovo) na eficácia da fixação das células nas mídias biológicas. O teste foi conduzido com seis mídias biológicas em seis béqueres, sendo que três

deles foram inicialmente preenchidos com 20 mL de água mineral (amostra 1) e os outros três com 20 mL de clara de ovo (amostra 2). As soluções foram submetidas a ultrassom por 10 minutos, para eliminação de possíveis bolhas de ar nos poros das mídias biológicas, e logo após foram transferidas para 6 tubos de ensaio grande.

Posteriormente, retirou-se soluções de água mineral e clara de ovo, substituindo-as por 10 mL da solução feita a 16% de sacarose e 1% de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) a 100mL.

Esta mistura foi deixada na Incubadora a 30 °C por 24 horas. Após o período de incubação, preparou-se 1 L de solução tampão fosfato salino (PBS), o pH ideal para PBS é geralmente entre 7,2 e 7,4.

Retirou-se aproximadamente 89,2 mL da solução PBS e completou-se com formol no balão volumétrico de 100 mL até a marca do menisco, deixando-a descansar por 25 minutos. Em seguida, removendo solução de PBS+10,8% de formol e adicionado solução fresca de PBS para lavar as mídias biológicas.

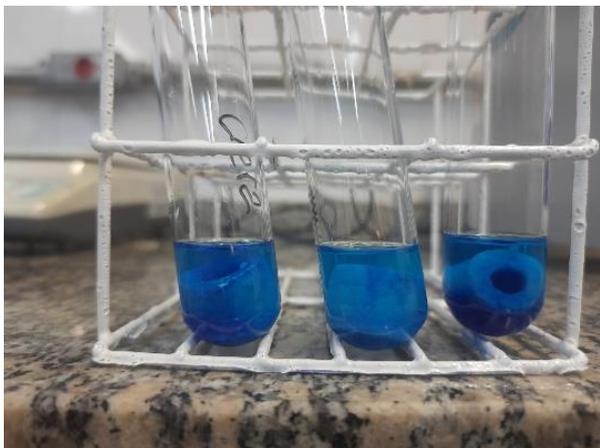
Para o teste de fixação do corante, preparou-se uma solução a 0,1% de azul de metileno em 200 mL com a concentração 0,0268 mol.L⁻¹. Após esvaziar o tubo contendo a solução de PBS, será adicionado 5 mL da solução de azul de metileno deixando-a em repouso por 25 minutos.

Em seguida, utilizando 5 mL de PBS para lavarmos três vezes cada mídias dos tubos, descartar a solução de azul de metileno e adicionar 5 mL de etanol (figura 5) e (figura 6).

Figura 5: Amostra 1



Fonte: Do próprio autor, 2023.

Figura 6: Amostra 2

Fonte: Do próprio autor, 2023.

Após as lavagens com PBS, foram deixadas descansar por 20 minutos, recolheu-se as amostras. Foi utilizada filtração simples para separar possíveis resquícios sólidos das soluções (Figura 7).

Figura 7: filtração simples

Fonte: Do próprio autor, 2023.

Com a solução filtrada, pipetou-se 500 μl das amostras para um balão de 10 mL e completou-se com etanol, com o auxílio de uma pipeta Pasteur foi pipetado 1 mL das amostras dos balões e foram transferidas para as cubetas para a leitura no espectrofotômetro (660 nm). O branco foi representado pelo etanol (álcool etílico) neste processo.

Os padrões de azul de metileno foram preparados em triplicata em balões volumétricos de 10 mL em concentrações de $2,68 \times 10^{-5}$; $5,36 \times 10^{-5}$; $8,04 \times 10^{-5}$, $10,74 \times 10^{-5}$, $13,4 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹ em quantidade suficiente de água destilada para completar o menisco, conforme a tabela 3 e figura 8.

Tabela 3: Volumes e concentrações.

Volumens adicionados aos balões		
Amostras	Azul de metileno ($26,8 \times 10^{-3}$ mol.L ⁻¹)	Concentração (mol.L ⁻¹)
Branco	-	-
1	100 μl	$2,68 \times 10^{-5}$
2	200 μl	$5,36 \times 10^{-5}$
3	300 μl	$8,04 \times 10^{-5}$
4	400 μl	$10,74 \times 10^{-5}$
5	500 μl	$13,4 \times 10^{-5}$

Figura 8: Soluções padrões

Fonte: Do próprio autor, 2023.

As soluções foram transferidas para cubetas de plástico. Logo após, fez-se a leitura dos padrões junto com branco a 660 nm no espectrofotômetro e a curva analítica foi obtida.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

• Teste de Fluxo da bomba

Após a realização do teste de fluxo da bomba peristáltica, os resultados indicaram um desempenho eficaz e consistente. A taxa de bombeamento permaneceu estável ao longo de todo o período do teste, mantendo-se dentro das especificações previamente estabelecidas.

A integridade das mangueiras Figura 4 (objeto 4 e 5) foi verificada durante o processo, e não foram observados vazamentos ou obstruções que pudessem afetar o fluxo contínuo do líquido. A bomba demonstrou eficiência ao transportar a solução do reator (1) para a torre com as mídias biológicas (6) da mesma figura, cumprindo assim o seu papel crucial no sistema.

Este resultado positivo no teste de fluxo da bomba contribui significativamente para a confiabilidade e estabilidade do sistema como um todo, assegurando um fornecimento contínuo da solução ao longo do processo.

É importante ressaltar que este teste faz parte de uma série de verificações de qualidade que visam garantir o funcionamento adequado do sistema e a obtenção de resultados consistentes nas etapas subsequentes do processo.

Figura 9: Montagem do teste de fluxo.

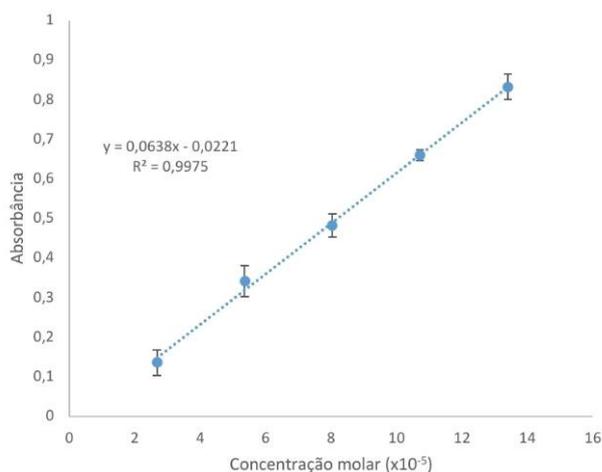


Fonte: Do próprio autor, 2023.

• Curva Analítica do Azul de Metileno

A curva analítica obtida pode ser observada na figura 11. A curva apresentou boa linearidade e valor de R^2 de 0,9975.

Figura 11: Curva analítica dos padrões.

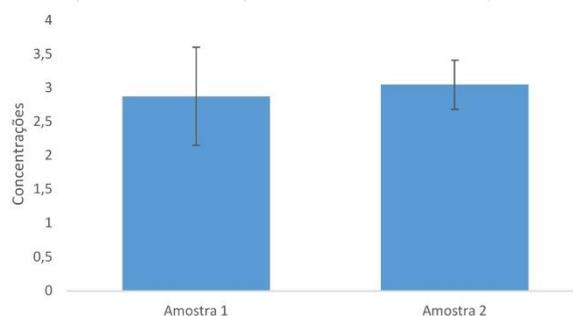


* n = 3

• Adesão celular

No ensaio de adesão celular utilizando as mídias previamente tratadas com albumina (clara de ovo) e sem albumina, os resultados indicaram que não há diferença significativa entre os dois conforme indica a figura 10. Desta forma, não há a necessidade de uso da albumina para o crescimento celular nas mídias.

Figura 10: Gráfico das concentrações de azul de metileno.



*O gráfico demonstra as concentrações de azul de metileno na amostra 1 (com a presença de albumina) e à amostra 2 (sem albumina).

• Fermentação do reator

A solução de sacarose que foi passada no fermentador por 24 horas apresentou uma densidade de $1,0317 \text{ g.cm}^{-3}$, indicando que ainda existe uma parcela de sacarose solubilizada na solução. Após a destilação completa da solução foi identificado uma densidade de $0,9979 \text{ g.cm}^{-3}$ que representa um volume de 0,22% de álcool na solução, a margem esperada sendo de pelo menos 80% de álcool. Considerando que o reator possui capacidade 3,7 L o volume do etanol produzido foi de apenas 8,14 mL. As hipóteses prováveis para um rendimento tão baixo foram a falta de um ambiente com a temperatura controlada, não ter havido tempo hábil para crescimento de um número suficiente de células de levedura e o baixo tempo de fermentação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se que a montagem do sistema foi bem-sucedida, porém os resultados da fermentação não foram satisfatórios devido à baixíssima concentração de etanol. O principal problema encontrado foi a falta do controle da temperatura dos reatores para uma temperatura mais confortável para as leveduras.

O teste de adesão apresentou resultados positivos, comprovando que o uso de albumina não afeta a fixação das leveduras, tendo 90% de confiança segundo o teste Q de Rejeição de dados analíticos.

Ao encerrarmos o teste de adesão celular, reconhecemos que os resultados obtidos apresentam desafios inesperados. A ineficácia da albumina como substrato para a adesão celular levanta questões cruciais e aponta para a necessidade de uma análise minuciosa na busca por alternativas de fixação celular.

É imperativo considerar variações nas condições experimentais, como concentração de albumina, tempo de incubação e características específicas das células em estudo. Além disso, explorar alternativas de substratos pode revelar-se crucial para otimizar a adesão celular e, conseqüentemente, o sucesso do experimento.

AGRADECIMENTOS

Prezados,

Gostaríamos de expressar nossas sinceras gratidões a todos que contribuíram para a realização deste trabalho. Este TCC representa não apenas o fim de uma etapa acadêmica, mas também a culminação de esforços, aprendizados e superações. Agradecemos profundamente aos nossos Professores Dr. Alexandre Barros, Prof. Dr. Fábio Rizzo e Prof.^a Bianca Oliveira, pela orientação valiosa, paciência e sabedoria compartilhada ao longo dessa jornada e aos demais professores que, de alguma forma, contribuíram para o nosso desenvolvimento acadêmico. Nossa gratidão se estende aos amigos e familiares que ofereceram apoio emocional e compreensão durante os desafios deste percurso. Agradecemos também aos colegas de classe, pois a troca de conhecimento foi fundamental para o enriquecimento deste trabalho. Cada revisão, feedback e discussão foram peças-chave na construção deste trabalho, e por isso, agradecemos a todos que dedicaram seu tempo e expertise.

REFERÊNCIAS

Arunkumar Pitchaimani, Tuyen Duong Thanh Nguyen, Mukund Koirala, Yuntao Zhang, Santosh Aryal, **Impact of cell adhesion and migration on nanoparticle uptake and cellular toxicity**, *Toxicology in Vitro* (2017), doi: 10.1016/j.tiv.2017.05.020

CARVALHO, J. C. M.; SATO, S. **Fermentação Descontínua Alimentada**. In: Schmidell, Willibaldo et al. *Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica*. São Paulo, p. 205-222, 2001.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Cana-de-açúcar**, Brasília, DF, v. 10, n. 4, p.39-41, 2023.

CRUZ, H. S. **Processos Industriais de Condução da Fermentação**. ESALQ/USP, 2016.

CYSEWSKI, G. R.; WILKIE, C. R. **Process design and economic studies of fermentation methods for the production of ethanol**. *Biotechnology and Bioengineering*. V. 20, 1978.

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA). **Renewables 2022; Analisis and Forecast to 2027**, 2022.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Universidade federal de Uberlândia. Uberlândia, 2010.

SCHMIDELL, W.; FACCIOTTI, M. C. R. **Biorreatores e processos fermentativos**. *Biotechnologia Industrial: Engenharia bioquímica*. São Paulo: Edgard Blucher, 2001.

VIDAL, F. MARIA. **Agroindústria – Etanol**. Caderno Setorial SETENE. Ceará, 2022.

VIEGAS, M. C. **Otimização de sistema de fermentação alcoólica contínua utilizando reatores tipo torre e leveduras com características floculantes**. Unicamp. Campinas, p.07, 2003.

APÊNDICE A – CÓDIGO UTILIZADO NOS TESTES DE FLUXO DA BOMBA PERISTÁLTICA

```
Int pinBomba = 8;
Int pinLED = 13;

Char leitura;

Void setup() {
  pinMode(pinBomba, OUTPUT);
  pinMode(pinLED, OUTPUT);
  digitalWrite(pinBomba, LOW);
  digitalWrite(pinLED, LOW);
  Serial.begin(9600);
}
Void loop() {
  While (Serial.available()) {
    Leitura = Serial.read();
    Serial.println(leitura);

    // Ligar a bomba por 60 segundos para encher as mangueiras
    If (leitura == 'A') {
      digitalWrite(pinBomba, HIGH);
      digitalWrite(pinLED, HIGH);
      delay(60000);
      digitalWrite(pinBomba, LOW);
      digitalWrite(pinLED, LOW);
    }
    // Ligar a bomba por 1 segundo para as medições
    Else if (leitura == 'B') {
      digitalWrite(pinBomba, HIGH);
      digitalWrite(pinLED, HIGH);
      delay(1000);
      digitalWrite(pinBomba, LOW);
      digitalWrite(pinLED, LOW);
    }
    // Ligar a bomba por 5 segundos para as medições
    Else if (leitura == 'C') {
      digitalWrite(pinBomba, HIGH);
      digitalWrite(pinLED, HIGH);
      delay(5000);
      digitalWrite(pinBomba, LOW);
      digitalWrite(pinLED, LOW);
    }
    // Ligar a bomba por 1 minuto para as medições
    Else if (leitura == 'D') {
      digitalWrite(pinBomba, HIGH);
      digitalWrite(pinLED, HIGH);
      delay(60000);
      digitalWrite(pinBomba, LOW);
      digitalWrite(pinLED, LOW);
    }
  }
}
```

```

    }
}
// Adicionar um tempo limite para as leituras do Serial
Delay(100);
}

```

APÊNDICE B – CÓDIGO UTILIZADO PARA O FUNCIONAMENTO DA BOMBA PERISTÁLTICA

Tudo após // são explicações do código e não são interpretados pelo Arduino.

```

// Definições das portas para conexão com o Arduino:
int pinBomba = 8; //Bomba ligada à porta 8
int pinLED = 13; //LED nativo na porta 13

char leitura;

void setup() {
// Parâmetros de inicialização do sistema: Bomba e LED desligados.
pinMode(pinBomba, OUTPUT);
pinMode(pinLED, OUTPUT);
digitalWrite(pinBomba, LOW);
digitalWrite(pinLED, LOW);

// Comandos de frequência única: liga a bomba por 60 segundos, para encher as mangueiras,
e entra em modo de espera por 30 segundos.
digitalWrite(pinBomba, HIGH);
digitalWrite(pinLED, HIGH);
delay(60000);
digitalWrite(pinBomba, LOW);
digitalWrite(pinLED, LOW);
delay(30000);
}

void loop() {
// Comandos de frequência indefinida: liga a bomba por 1 segundo e entra em modo de espera
por 11 segundos.
digitalWrite(pinBomba, HIGH);
digitalWrite(pinLED, HIGH);
delay(1000);
digitalWrite(pinBomba, LOW);
digitalWrite(pinLED, LOW);
delay(11000);
}

```