



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

RENAN ATANÁZIO DOS SANTOS

**ESTUDO DOS PARÂMETROS REACIONAIS NA FORMAÇÃO DE ÁLCOOL
ISOAMÍLICO E ISOBUTANOL EM MICRODESTILARIA**

Recife

2024

RENAN ATANÁZIO DOS SANTOS

**ESTUDO DOS PARÂMETROS REACIONAIS NA FORMAÇÃO DE ÁLCOOL
ISOAMÍLICO E ISOBUTANOL EM MICRODESTILARIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Engenharia Química.

Área de concentração: Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Yeda Medeiros Bastos de Almeida.

Coorientadores: Prof^a Dra. Samara Alvachian Cardoso Andrade.

Prof^o. Dr. Celso Silva Caldas.

Recife

2024

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Santos, Renan Atanazio dos.

Estudo dos parâmetros reacionais na formação de Álcool Isoamílico e Isobutanol em microdestilaria / Renan Atanazio dos Santos. - Recife, 2024.
116f.: il.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2024.

Orientação: Yeda Medeiros Bastos de Almeida.

Coorientação: Celso Silva Caldas.

Coorientação: Samara Alvachian Cardoso Andrade.

Inclui referências e apêndice.

1. Álcool isoamílico; 2. Fermentação; 3. Isobutanol; 4. Microdestilaria; 5. Óleo fúsel. I. Almeida, Yeda Medeiros Bastos de. II. Caldas, Celso Silva. III. Andrade, Samara Alvachian Cardoso. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

RENAN ATANAZIO DOS SANTOS

**ESTUDO DOS PARÂMETROS REACIONAIS NA FORMAÇÃO DE ÁLCOOL
ISOAMÍLICO E ISOBUTANOL EM MICRODESTILARIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Tecnologia e Geociências, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química. Área de concentração: Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovado em: 03 / 12 / 2024.

BANCA EXAMINADORA

Participação por Videoconferência

Prof. Dr. Alan John Duarte de Freitas (Examinador Externo)
Instituto Federal de Alagoas

Participação por Videoconferência

Profa. Dra. Andrelina Maria Pinheiro Santos (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Participação por Videoconferência

Profa. Dra. Eliane Bezerra de Moraes Medeiros (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Participação por Videoconferência

Profa. Dra. Glória Maria Vinhas (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Participação por Videoconferência

Prof. Dr. Nelson Medeiros de Lima Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pela força, sabedoria e perseverança que me concedeu durante toda a jornada acadêmica. Sem Sua presença e orientação, não teria sido possível alcançar este objetivo.

À minha família, meu porto seguro, que sempre esteve ao meu lado, apoiando e incentivando em todos os momentos. Agradeço especialmente aos meus pais, Lourdes e Renato, pelo amor incondicional, pelos valores e pela educação que me proporcionaram, fundamentais para a construção do meu caráter e trajetória.

À minha esposa, Glaize Martins, cuja paciência, amor e apoio foram essenciais durante todo esse processo. Sua compreensão e incentivo contínuo me deram forças para seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus filhos, Davi e Raul, que são minha maior fonte de inspiração e alegria. A energia e o amor proporcionados por eles me motivaram a dar o melhor de mim a cada dia.

À minha orientadora, professora Dra. Yeda Medeiros, minha gratidão eterna pela orientação, paciência e dedicação. Sua expertise e conselhos foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por acreditar no meu potencial e me guiar com tanta sabedoria.

Aos meus coorientadores, professora Dra. Samara Andrade e professor Dr. Celso Caldas, pelos grandes ensinamentos, os quais foram a base para o desenvolvimento deste trabalho. Suas contribuições foram imprescindíveis para a realização desta tese.

À toda equipe dos laboratórios do departamento de Química do Instituto Federal de Alagoas – Campus Maceió, por todo suporte técnico e apoio prestados.

Enfim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho. A todos, meu sincero e profundo agradecimento.

RESUMO

A indústria da cana-de-açúcar brasileira destaca-se mundialmente pela matéria-prima utilizada na produção de etanol e pelo aproveitamento dos resíduos gerados nesse processo. Um dos poucos subprodutos que ainda não é reaproveitado pela própria indústria é o óleo fúsel, uma mistura de álcoois superiores formados durante a fermentação, sendo seus principais componentes o álcool isoamílico e o isobutanol. Embora a presença desses álcoois no mosto fermentado seja prejudicial ao processo de destilação e à qualidade do etanol, eles têm vasta aplicação na indústria da química fina. A quantidade e a qualidade do óleo fúsel produzido dependem, entre outros fatores, da matéria-prima e das condições de fermentação. Estima-se que na safra 2022/2023 a produção média de óleo fúsel a partir de melaço tenha alcançado 72,28 milhões de litros, considerando uma média de 2,5 L para cada 1000 L de etanol produzido. Esse alto volume de produção, aliado ao baixo valor de venda e ao elevado teor de álcool isoamílico, justifica o crescente interesse em pesquisas sobre o aproveitamento desse subproduto. Diante desse contexto, este trabalho teve como objetivo investigar o efeito dos parâmetros reacionais pH, suplementação e refrigeração na formação de álcool isoamílico e isobutanol durante a fermentação de mosto de melaço em uma microdestilaria, sem comprometer a produção de etanol. As fermentações foram realizadas em batelada alimentada com mosto a 25 °Brix e 25% v/v de fermento comercial seco, com duração de 10 h. Foi utilizado um planejamento fatorial 2^3 para avaliar os efeitos dos fatores estudados e suas interações sobre as variáveis resposta: eficiência de fermentação (η_f), eficiência de processo (η_p), produtividade em etanol (PE), fator de conversão substrato em células ($Y_{x/s}$), produção de álcool isoamílico (A), produção de isobutanol (B) e razão A/B entre esses álcoois. Para a análise estatística dos dados, foram aplicados a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparação das médias. Os resultados indicaram um bom desempenho do processo fermentativo nas diferentes condições de fermentação, com destaque para as condições 3, 4 e 5. As interações entre os fatores avaliados influenciaram significativamente a formação de álcool isoamílico e isobutanol, além da razão A/B entre esses compostos.

Palavras-chave: Álcool Isoamílico. Fermentação. Isobutanol. Microdestilaria. Óleo Fúsel.

ABSTRACT

The Brazilian sugarcane industry stands out globally for its raw material used in ethanol production and the utilization of by-products generated in this process. One of the few by-products not yet reused by the industry itself is fusel oil, a mixture of higher alcohols formed during fermentation, with isoamyl alcohol and isobutanol as its main components. Although the presence of these alcohols in the fermented mash negatively affects the distillation process and ethanol quality, they have extensive applications in the fine chemical industry. The quantity and quality of fusel oil produced depend, among other factors, on the raw material and fermentation conditions. It is estimated that in the 2022/2023 harvest, the average production of fusel oil from molasses reached 72.28 million liters, considering an average of 2.5 L per 1000 L of ethanol produced. This high production volume, combined with its low market value and high isoamyl alcohol content, justifies the growing interest in research on the utilization of this by-product. Given this context, this study aimed to investigate the effect of the reaction parameters pH, supplementation, and refrigeration on isoamyl alcohol and isobutanol formation during molasses mash fermentation in a microdistillery, without compromising ethanol production. Fermentations were conducted in fed-batch mode with a 25 °Brix mash and 25% v/v of commercial dry yeast for 10 hours. A 2³ factorial design was used to evaluate the effects of the studied factors and their interactions on the response variables: fermentation efficiency (η_f), process efficiency (η_p), ethanol productivity (PE), substrate-to-cell conversion factor ($Y_{x/s}$), isoamyl alcohol production (A), isobutanol production (B), and the A/B ratio between these alcohols. For statistical data analysis, analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test were applied for mean comparison. The results indicated good fermentation process performance under different conditions, with emphasis on conditions 3, 4, and 5. The interactions between the evaluated factors significantly influenced the formation of isoamyl alcohol and isobutanol, as well as the A/B ratio between these compounds.

Key words: Fermentation. Fusel Oil. Isoamyl Alcohol. Isobutanol. Micro Distillery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fluxograma do processo de produção de etanol.....	18
Figura 2 –	Configuração típica para produção de etanol hidratado no Brasil.....	19
Figura 3 –	Vias de formação de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica	32
Figura 4 –	Distribuição temporal da produção científica internacional sobre o óleo fúsel e os álcoois superiores que o compõem	34
Figura 5 –	Microdestilaria de etanol	36
Figura 6 –	Fluxograma da microdestilaria	38
Figura 7 –	Multiplicação do fermento comercial para uso nos testes iniciais	39
Figura 8 –	Consumo de açúcar (°Brix) com o tempo de fermentação para as quatro diferentes condições do 2º Teste	58
Figura 9 –	Eficiência de fermentação $n_f(\%)$ dos ensaios realizados no 3º teste	64
Figura 10 –	Eficiência de processo $n_p(\%)$ dos ensaios realizados no 3º teste	65
Figura 11 –	Produtividade em etanol (PE), em g/L.h, dos ensaios realizados no 3º teste	65
Figura 12 –	Superfície de resposta para o fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$, em g células/g A_{TR}) em função do pH e suplementação (a), pH e refrigeração (b) e suplementação e refrigeração (c)	70
Figura 13 –	Superfície de resposta para o álcool isoamílico (A, em g/L) em função do pH e refrigeração (a) e suplementação e refrigeração (b)	75
Figura 14 –	Superfície de resposta para o isobutanol (B, em g/L) em função do pH e refrigeração (a) e suplementação e refrigeração (b)	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Rendimento de óleo fúsel a partir de diferentes matérias-primas	28
Tabela 2 –	Concentração (fração mássica) de álcool isoamílico e isobutanol no vinho fermentado	28
Tabela 3 –	Concentração dos álcoois majoritários na composição do óleo fúsel de usinas de açúcar e etanol	30
Tabela 4 –	Condições experimentais do 1º teste de fermentação com fermento comercial.....	41
Tabela 5 –	Condições experimentais do 2º teste de fermentação com fermento industrial.....	42
Tabela 6 –	Condições experimentais do 3º teste de fermentação com fermento comercial e industrial.....	43
Tabela 7 –	Procedimento para obtenção da curva padrão de açúcares redutores	48
Tabela 8 –	Preparo das soluções para construção da curva padrão de etanol	49
Tabela 9 –	Níveis reais e codificados das variáveis independentes utilizadas no delineamento experimental	52
Tabela 10 –	Análise microbiológica do fermento ativado no teste inicial de ativação do fermento	53
Tabela 11 –	Acompanhamento da fermentação com o fermento ativado no teste inicial de ativação do fermento	53
Tabela 12 –	Estudo da ativação do fermento variando a massa de fermento seco e suplementação com sulfato de amônio	55
Tabela 13 –	Acompanhamento dos testes de ativação do fermento comercial	56
Tabela 14 –	Variação do °Brix das fermentações no 1º Teste de fermentação com fermento comercial.....	57
Tabela 15 –	Variação do °Brix e do pH das fermentações no 2º Teste de fermentação com fermento industrial	58
Tabela 16 –	Variação da concentração de sólidos totais dissolvidos (°Brix) nos ensaios realizados no 3º teste de fermentação com fermento comercial e industrial.....	60
Tabela 17 –	Análises microbiológicas dos fermentos utilizados	61

Tabela 18 – Concentração de açúcares redutores totais (ART), em g/L, nos ensaios realizados no 3º teste	61
Tabela 19 – Concentração de etanol, em g/L, nos ensaios realizados no 3º teste	62
Tabela 20 – Massa celular, em g/L, nos ensaios realizados no 3º teste.....	63
Tabela 21 – ANOVA do planejamento fatorial para as respostas $Y_{X/S}$, η_f , η_p e PE	67
Tabela 22 – Efeitos das variáveis independentes sobre as respostas $Y_{X/S}$, η_f , η_p e PE	67
Tabela 23 – Resultados do planejamento fatorial 2^3 para as respostas $Y_{X/S}$, η_f , η_p e PE	68
Tabela 24 – Parâmetros de desempenho do processo fermentativo reportados na literatura	73
Tabela 25 – ANOVA do planejamento fatorial para as respostas A, B e A/B	74
Tabela 26 – Efeitos das variáveis independentes sobre as respostas A, B e A/B	75
Tabela 27 – Álcool isoamílico e isobutanol produzidos nas diferentes condições de fermentação adotadas.....	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	ASPECTOS GERAIS SOBRE A PRODUÇÃO DE ETANOL.....	17
2.1.1	Matérias-Primas para Produção de Etanol	17
2.1.2	Processo Industrial de Produção de Etanol	18
2.2	ASPECTOS GERAIS SOBRE O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	20
2.2.1	Leveduras Empregadas na Fermentação	20
2.2.2	Fatores que Interferem no Processo de Fermentação	22
2.2.2.1	Temperatura.....	22
2.2.2.2	pH do Meio	22
2.2.2.3	Concentração de Substrato	23
2.2.2.4	Teor de Etanol.....	23
2.2.2.5	Quantidade de Inóculo	24
2.2.3	Parâmetros Cinéticos da Fermentação.....	24
2.2.4	Tipos de Processos Fermentativos	25
2.3	ÓLEO FÚSEL	26
2.3.1	Definição e Aplicação	26
2.3.2	Formação e Composição do Óleo Fúsel.....	27
2.3.2.1	Composição do Óleo Fúsel	28
2.3.2.2	Formação dos Álcoois Superiores que Compõem o Óleo Fúsel	31
2.4	PROSPECCÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA	33
3	MATERIAS E MÉTODOS	36
3.1	MICRODESTILARIA.....	36
3.2	MELAÇO	38
3.3	INÓCULO E MEIO DE FERMENTAÇÃO	38
3.4	TESTES PRELIMINARES (<i>START-UP</i> DA MICRODESTILARIA)	40
3.4.1	1º Teste de Fermentação com Fermento Comercial	41
3.4.2	2º Teste de Fermentação com Fermento Industrial	41
3.4.3	3º Teste de Fermentação com Fermento Comercial e Industrial	42

3.5	FATORES REACIONAIS E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO DOS EXPERIMENTOS FINAIS.....	43
3.6	PARÂMETROS DE DESEMPENHO DO PROCESSO FERMENTATIVO	44
3.7	METODOLOGIA ANALÍTICA.....	45
3.7.1	Sólidos Solúveis Totais (°Brix).....	45
3.7.2	pH	46
3.7.3	Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Redutores Totais (ART)	46
3.7.3.1	Preparo da Solução de Reagente DNS	46
3.7.3.2	Determinação de Açúcares Redutores (AR)	46
3.7.3.3	Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART)	47
3.7.3.4	Curva Padrão de Glicose	47
3.7.4	Determinação da Concentração de Etanol	48
3.7.4.1	Preparo da Solução de Dicromato de Potássio	48
3.7.4.2	Procedimento Analítico.....	49
3.7.4.3	Curva Padrão de Dicromato de Potássio	49
3.7.5	Análises Microbiológicas.....	50
3.7.5.1	Determinação Espectrofotométrica da Massa Celular	50
3.7.5.2	Viabilidade Celular, Brotamento e Razão de Infecção	50
3.8	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	51
3.9	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1	TESTES DE ATIVAÇÃO DO FERMENTO	53
4.2	1º TESTE DE FERMENTAÇÃO COM FERMENTO COMERCIAL	56
4.3	2º TESTE DE FERMENTAÇÃO COM FERMENTO INDUSTRIAL	57
4.4	3º TESTE - AVALIAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO NA MICRODESTILARIA	59
4.5	EXPERIMENTOS FINAIS.....	66
4.5.1	Parâmetros de Desempenho do Processo Fermentativo	66
4.5.2	Produção de Álcool Isoamílico e Isobutanol.....	74
4.5.3	Análise Conjunta dos Resultados de Álcool Isoamílico Produzido (A), Isobutanol Produzido (B) e Razão A/B.....	77
5	CONCLUSÃO	81
6	RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	82

REFERÊNCIAS	83
APÊNDICE A – PROSPECCÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA.....	97

1 INTRODUÇÃO

A indústria sucroenergética brasileira desempenha um papel de destaque mundial devido à matéria-prima utilizada para produção do etanol, combustível renovável que no Brasil é derivado, praticamente na sua totalidade, da cana-de-açúcar, especialmente do caldo de cana e do melaço, amplamente utilizado na fermentação alcoólica (Ribeiro; Reis 2009; Steinle, 2013). Para o país, o setor sucroenergético possui grande relevância econômica, representando aproximadamente 2,28% do PIB brasileiro e contribuindo significativamente para a geração de empregos (De Lima; Maistro; Dos Santos, 2022). Apesar dos desafios enfrentados, como condições climáticas adversas e questões políticas, a projeção de produção para a safra 2029/2030 é de 45,9 bilhões de litros de etanol (FIESP, 2020).

No contexto mundial, a busca por novas tecnologias que aumentem a eficiência e lucratividade da indústria é crescente, com destaque para a valorização de subprodutos. No cenário brasileiro, a indústria sucroenergética destaca-se por sua capacidade de aproveitar subprodutos do processo de produção de açúcar e etanol, muitos deles com vasta utilização e alto valor agregado, como o bagaço, a torta de filtro e a levedura seca, enquanto outros, como a vinhaça e o óleo fúsel, ainda enfrentam desafios em sua reutilização (Friedrichsen et al., 2022). Este último, composto principalmente por álcool isoamílico e isobutanol, ainda não possui amplo reaproveitamento industrial, sendo vendido a preços reduzidos para a indústria química (Tavares, 2023).

A presença do óleo fúsel no mosto fermentado impacta negativamente a destilação e a qualidade do etanol (Batista et al., 2012; Bessa, 2012; Mayer, 2014). Estudos relatam o desenvolvimento de leveduras mutantes capazes de reduzir a formação de óleo fúsel; no entanto, a produção de etanol também foi reduzida, indicando desafios na manutenção da eficiência de fermentação (Patil; Koolwal; Butala, 2002).

Diante desse cenário, pesquisas têm se dedicado ao aproveitamento do óleo fúsel, tornando-o objeto de interesse devido às suas diversas aplicações potenciais, como combustível misturado ao diesel, precursor de reações de esterificação e

matéria-prima para a indústria química (Akçay; Ozer, 2019; Vilas Bôas, 2018; Da Silveira, 2016).

A recuperação dos álcoois superiores presentes no óleo fúsel oferece oportunidades para a produção de produtos de alto valor agregado, como biosolventes, extratores, aromatizantes, medicamentos e plastificantes (Güvenç et al., 2007; Montoya et al., 2016), principalmente em países onde há a produção em larga escala (Montoya et al., 2016).

A maioria das indústrias que buscam recuperar álcoois superiores do óleo fúsel opta pelo processo de destilação para separar álcool isoamílico e isobutanol (Ferreira; Meirelles; Batista, 2013; Ramos Alves, 2021). Entretanto, é importante notar que a recuperação do isobutanol demanda o emprego adicional de uma ou mais colunas de destilação, resultando em um aumento significativo no consumo de energia.

A literatura relata estudos sobre o mecanismo de formação dos álcoois superiores que constituem o óleo fúsel em diferentes meios de fermentação (Luo et al., 2013; Yuan et al., 2016). Além disso, a interferência de fatores reacionais na produção desses álcoois tem sido investigada, resultando em variações quantitativas desses compostos. Diferenças na composição de álcoois superiores são observadas, indicando a possibilidade de formação de álcool isoamílico e isobutanol em proporções distintas, dependendo das condições de fermentação e do tipo de matéria-prima utilizada (Yoshizawa, 1965, 1966; Pollard; Kieser; Beech, 1966; Cachot; Müller; Pons, 1991; Vidal et al., 2013; Luo et al., 2013). Em particular, Patil, Koolwal e Butala (2002) destacam que a composição do óleo fúsel exhibe variações significativas, especialmente em relação ao teor de álcool isoamílico, que pode variar até 45%.

Vale destacar que os estudos reportados na literatura (Beltran et al., 2008; Garde-Cerdan et al., 2008; Silva et al., 2009; Cortes; Blanco, 2011; Moreno-Perez et al., 2013; Vidal et al., 2013; Stribny et al., 2015; Li et al., 2019; Zhong et al., 2019) são realizados, quase na sua totalidade, com meios de fermentação para produção de bebidas e outros meios sintéticos diferentes do melaço de cana-de-açúcar, em escala de laboratório e em condições otimizadas, não representando as condições das usinas brasileiras. A aplicação dessas pesquisas na indústria é desafiadora devido à inviabilidade de testes em grande escala. Nesse contexto, a utilização de uma

microdestilaria que simula o processo industrial em pequena escala apresenta-se como uma alternativa viável, minimizando custos com matéria-prima e produtos.

O mercado brasileiro de óleo fúsel carece de informações consolidadas sobre preço, utilização e destino do subproduto. Os poucos trabalhos que divulgam informações sobre valor comercial do óleo fúsel relatam que este depende da concentração de álcool isoamílico (Ferreira, 2012) e que o preço gira em torno de 30% do valor do etanol anidro (Brandão, 2010). Relatos adicionais variam os preços, situando-se entre R\$ 0,15 e R\$ 0,50 por litro de óleo fúsel (Azania, 2003; Ferreira, 2012; Cruz, Izadora; Cruz, Izacláudia; Andrade, 2016). Informações de usinas em operação em Alagoas detalham um preço médio de R\$ 0,35/L para o óleo fúsel, destacando a ausência de um controle de qualidade rigoroso, sendo realizada apenas a medição da densidade para verificar a quantidade de água presente (CAETÉ S/A, 2020).

A produção média de óleo fúsel a partir do melaço da cana-de-açúcar é de 2,5 L para cada 1000 L de etanol produzido (Da Silveira, 2016), sendo o álcool isoamílico o principal componente presente em sua composição e de maior valor comercial (Azania, 2003; Eustácio et al., 2018). As indústrias, no entanto, não informam o volume de produção nem o exato destino dado para o óleo fúsel, tornando as informações sobre o subproduto escassas (Da Silveira, 2016).

Com base na produção de etanol da safra 2022/2023, que atingiu 28,91 bilhões de litros (UNICA, 2023), é possível estimar que a produção de óleo fúsel foi de 72,28 milhões de litros. Levando em conta a estimativa de produção de 41,857 bilhões de litros de etanol para a safra 2029/2030, a produção de óleo fúsel poderá chegar a 114,75 milhões de litros desse subproduto (FIESP, 2020). Esse elevado volume de produção associado ao baixo preço de venda e ao seu elevado teor de álcool isoamílico justificam o atual interesse no desenvolvimento de pesquisas com o óleo fúsel.

Diante do contexto apresentado, o presente trabalho teve como objetivo investigar os parâmetros reacionais pH, refrigeração e suplementação na formação de álcool isoamílico e isobutanol durante a fermentação de mosto de melaço de cana-

de-açúcar em uma microdestilaria, sem comprometer a produção de etanol, tendo como objetivos específicos:

- Fazer uma prospecção científica e tecnológica para traçar um panorama nacional e internacional de trabalhos científicos e de patentes dedicados ao estudo da formação, aproveitamento e aplicação do óleo fúsel e dos álcoois isoamílico e isobutílico, constatando a relevância e originalidade do trabalho proposto;
- Adaptar a microdestilaria para os experimentos fermentativos desejados e treinar sua operação através do *software* específico da planta;
- Estudar em que condições de operação da microdestilaria são conseguidos maiores produtividade e eficiências de processo e de fermentação do mosto de melaço de cana-de-açúcar utilizando levedura comercial;
- Avaliar a formação de álcool isoamílico (A) e de isobutanol (B) na fermentação de mosto de melaço de cana-de-açúcar em uma microdestilaria;
- Avaliar a interferência dos fatores reacionais pH, refrigeração e suplementação do mosto com sulfato de amônio na formação de álcool isoamílico e isobutanol;
- Correlacionar a formação de álcool isoamílico e isobutanol com as diferentes condições de fermentação usadas na microdestilaria;
- Avaliar em que condição se obtém a maior razão A/B e se essa condição interfere na eficiência de fermentação alcoólica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O levantamento bibliográfico foi conduzido com foco na ideia principal do trabalho, que consiste na avaliação de fatores reacionais envolvidos na formação do óleo fúsel durante a fermentação alcoólica do mosto de melaço de cana-de-açúcar.

2.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE A PRODUÇÃO DE ETANOL

Serão tratados aspectos da produção de etanol, tais como matérias-primas utilizadas e processo industrial de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar. Será dada maior ênfase à etapa de fermentação do processo de produção de etanol, procurando explorar tópicos como leveduras empregadas na fermentação alcoólica, fatores que interferem no processo de fermentação, parâmetros cinéticos importantes para a análise de processos fermentativos e tipos de processos fermentativos.

2.1.1 Matérias-Primas para Produção de Etanol

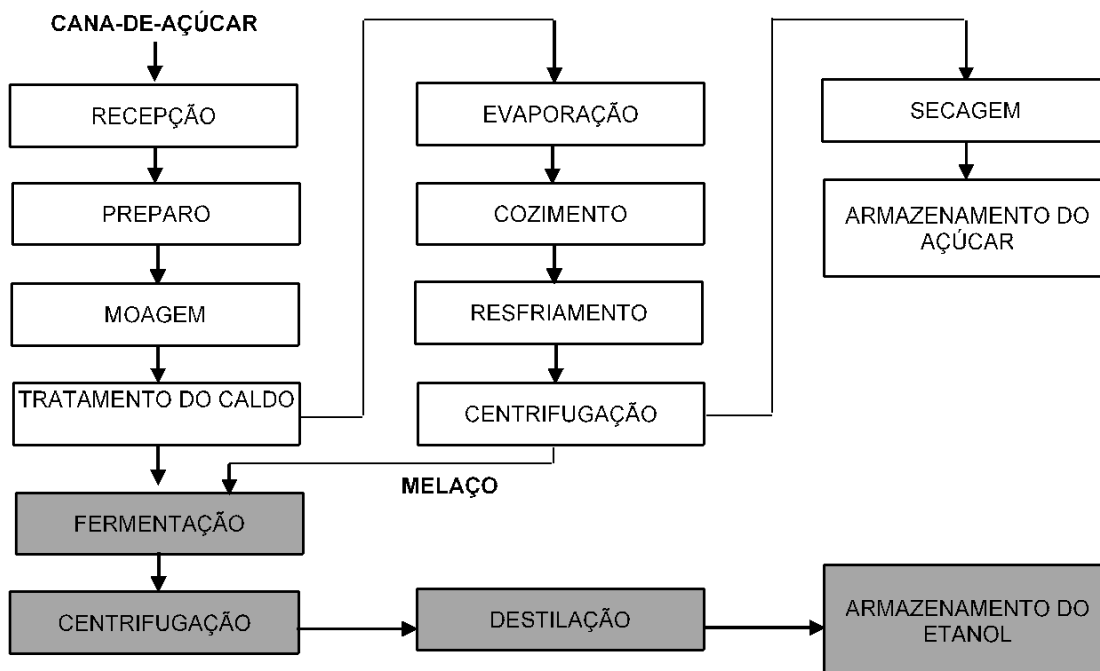
Qualquer produto que contenha uma quantidade considerável de carboidratos constitui-se em matéria-prima para obtenção de etanol. De acordo com o tipo de carboidratos presentes podem ser classificadas em três tipos: açucaradas, amiláceas e celulósicas. O etanol ainda pode ser classificado como de primeira geração, quando é produzido a partir de biomassa contendo açúcar na sua composição, como cana-de-açúcar, beterraba e sorgo sacarino, ou de biomassa amilácea como milho, trigo e cevada. Por sua vez, o biocombustível é classificado como de segunda geração quando se utiliza como matéria-prima biomassa lenhocelulósica, tais como madeira, palha, gramíneas e resíduos ou subprodutos agrícolas. Existe também o etanol de terceira geração que utiliza microrganismos como as microalgas como substrato para a fermentação (Zabed *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2020; Wenzel, 2023).

A adoção de determinada matéria-prima para a produção de etanol depende de uma série de fatores, dentre eles os custos de produção e o rendimento industrial em etanol. No Brasil, as matérias-primas utilizadas para a produção de etanol em larga escala são o caldo de cana-de-açúcar e o melaço, subproduto da fabricação de açúcar (Caldas; Borén; Santos, 2012; Camargos *et al.*, 2021).

2.1.2 Processo Industrial de Produção de Etanol

O processo industrial de produção de açúcar e etanol das usinas brasileiras envolve uma série de etapas básicas, conforme o fluxograma apresentado na Figura 1.

Figura 1 – Fluxograma do processo de produção de etanol



Fonte: O Autor (2020).

As principais etapas da produção de etanol na indústria são a fermentação e a destilação. Na etapa de fermentação são recebidos o caldo clarificado, proveniente da etapa de tratamento do caldo, e o melaço ou mel final, proveniente da etapa de centrifugação, quando ele é separado dos cristais de sacarose. Tanto o caldo clarificado quanto o melaço são utilizados para a produção do mosto, mistura pronta para ser fermentada (Wenzel, 2023).

O processo de fermentação mais utilizado pelas destilarias brasileiras é a batelada-alimentada com reciclo das leveduras do vinho (*Melle-Boinot*) (Caldas; Borén; Santos, 2012). O mosto é adicionado nas dornas de fermentação com as leveduras, que consomem os açúcares, produzindo principalmente etanol e CO₂. Além desses dois compostos, diversos outros subprodutos são gerados através de rotas secundárias, dentre eles os álcoois superiores, principalmente álcool isoamílico e isobutanol (White; Zainasheff, 2022).

vinhaça, um produto de fundo com concentração de etanol muito baixa (Santos *et al.*, 2021).

A flegma é então transferida para a seção de retificação, colunas B e B1 (Figura 2). Essas colunas concentram o etanol da flegma, obtendo etanol hidratado dentro dos padrões de qualidade pela corrente de topo. A corrente líquida que deixa a base da coluna B é esgotada na coluna B1, e a corrente obtida na base da coluna B1 é denominada flegmaça, composta basicamente por água (Santos *et al.*, 2021).

Ainda na Figura 2, o óleo fúsel é retirado próximo à base da coluna B, e é encaminhado para um decantador, onde há adição de água na proporção aproximada de 1,5 kg de água para 1 kg de óleo fúsel, com a formação de duas fases. No fundo do decantador, a fase aquosa, contendo grande quantidade de etanol, retorna às colunas de destilação, e no topo do decantador, a fase orgânica, rica em álcool isoamílico e outros álcoois superiores, é separada e armazenada. Essa retirada de óleo fúsel é indispensável para o bom funcionamento da coluna de destilação e obtenção de etanol hidratado dentro das especificações (Batista *et al.*, 2012; Bessa, 2012; Ferreira, 2012; Santos *et al.*, 2021).

2.2 ASPECTOS GERAIS SOBRE O PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação alcoólica é um processo bioquímico complexo que envolve diversas etapas de transformação dos açúcares fermentescíveis pela ação de microrganismos, como leveduras ou bactérias. Dentre esses microrganismos, as leveduras apresentam uma maior aplicação tecnológica, por proporcionarem maiores rendimentos (Bai; Anderson; Moo-Young, 2008; Kuno, 2022).

2.2.1 Leveduras Empregadas na Fermentação

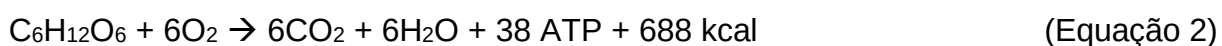
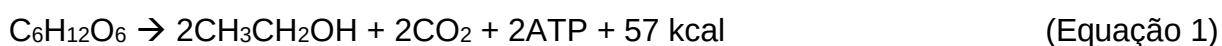
A levedura empregada na fermentação depende, entre outros fatores, do tipo de substrato ou matéria-prima utilizada, do teor de etanol desejado no produto, da duração da fermentação e das propriedades do produto final (Ostrowski *et al.*, 2006; Wenzel, 2023). No processo industrial de produção de etanol de cana-de-açúcar, a levedura mais utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*, devido suas características vantajosas, como alta capacidade de transformar açúcares em etanol, capacidade de sobrevivência em ambientes com acidez mais elevada, osmotolerância, capacidade

de tolerar teores elevados de etanol e capacidade de suportar variações de temperatura (Lima *et al.*, 2001; Andrietta *et al.*, 2007; Wenzel, 2023).

Até a década de 1980, praticamente todas as usinas utilizavam a levedura de panificação para dar partida ao processo industrial de produção de etanol combustível (Amorim *et al.*, 2004). Não havia, nessa época, um processo confiável de seleção das leveduras, sendo muito difícil diferenciar uma cepa de outra. Com o desenvolvimento da técnica de cariotipagem, que diferencia as leveduras pelo tamanho de seus cromossomos, as leveduras puderam ser identificadas e diferenciadas, o que tornou possível acompanhar qual cepa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* permanece até o final do processo de fermentação (Furlani, 2014).

A célula de levedura possui compartimentos diferenciados para a atividade metabólica, sendo que a fermentação alcoólica (glicólise anaeróbia) ocorre no citoplasma, enquanto a oxidação total do açúcar (respiração) se dá na mitocôndria (Amorim *et al.*, 1996; Lima, 2019).

Na glicólise ocorre a quebra da molécula de glicose até ácido pirúvico, através de uma série de reações catalisadas por enzimas específicas, que se situam na parede celular e no interior da célula. A equação de Gay-Lussac para a fermentação (Equação 1) simplifica essas reações. Na presença de oxigênio, há um deslocamento reacional de parte do ácido pirúvico para o Ciclo de Krebs (Equação 2), onde será oxidado enzimaticamente a dióxido de carbono e água (Amorim *et al.*, 1996; Lima, 2019).



A reação global da glicólise demonstra que 1 mol de glicose (180 g) produz 2 mols de etanol (92 g), 2 moles de dióxido de carbono (88 g) e 57 kcal de energia. Assim, o rendimento teórico ($Y_{P/S}$) para a produção de etanol é de 0,511 g/g. Na prática, esse valor não é observado devido à utilização de parte da glicose para produção de glicerol e álcoois superiores, essenciais para síntese de material celular e manutenção da levedura (Steckelberg, 2001; Lima, 2019).

2.2.2 Fatores que Interferem no Processo de Fermentação

A fermentação alcoólica é um processo que depende de diversos fatores, sendo alguns deles destacados a seguir.

2.2.2.1 Temperatura

Na indústria, a temperatura do mosto é um fator crítico, e as leveduras na fermentação são microrganismos mesófilos, desenvolvendo-se melhor em temperaturas moderadas.

De acordo com Lima (2001), as temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam-se entre 26 e 35 °C. Temperaturas mais elevadas aumentam a velocidade de fermentação, mas favorecem a contaminação bacteriana e tornam a levedura mais sensível à toxidez do etanol, além de permitirem maior perda de etanol por evaporação em dornas abertas. Para os autores, tais aspectos justificam o controle da temperatura no processo industrial.

Para Steckelberg (2001) as temperaturas elevadas ocorrem devido às condições climáticas e operacionais sob as quais as usinas brasileiras trabalham. Se a temperatura for baixa (abaixo de 26 °C), a fermentação não desenvolve devido ao choque térmico, o que é resolvido alimentando-se a dorna com mosto mais quente, já o mosto quente (acima de 29 °C), pode acarretar um superaquecimento nas dornas em fermentação, propiciando um aumento da temperatura do vinho e consequentemente uma diminuição no rendimento (Amorim *et al.*, 1996; Lima, 2019).

2.2.2.2 pH do Meio

O pH é um fator significativo para as fermentações industriais, devido à sua importância tanto no controle da contaminação bacteriana quanto ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos (Amorim *et al.*, 1996; Lima, 2019).

Os valores de pH dos mostos industriais geralmente encontram-se na faixa de 4,5 a 5,5 com uma boa capacidade tamponante, especialmente os preparados com melaço, mas as leveduras mantêm uma homeostase de forma quase independente dos valores de pH do meio, por isso toleram o tratamento ácido após a centrifugação (Amorim *et al.*, 1996, Lima, 2019). Fermentações conduzidas em meios mais ácidos

resultam em maiores rendimentos em etanol, reduzindo o crescimento do fermento e a contaminação bacteriana. Entretanto, fermentações alcoólicas podem ocorrer em níveis mais elevados de pH, especialmente em substratos de alto poder tampão, como os melaços, em pH 5,8/5,9 (Lima *et al.*, 2001; Lima, 2019).

2.2.2.3 Concentração de Substrato

A concentração de açúcares pode afetar tanto o crescimento das leveduras quanto a produção de etanol (Steinle, 2013). O aumento da concentração de açúcares no mosto fermentativo promove aumento da velocidade de fermentação, da produtividade e, dentro de certos limites, acarreta menor crescimento do fermento. Entretanto, concentrações elevadas de açúcar podem inibir a fermentação devido ao aumento da pressão osmótica e da alta toxicidade do etanol para as leveduras (Lima *et al.*, 2001; Lima, 2019). Steinle (2013) também cita a possibilidade de fermentações incompletas, com formação de subprodutos indesejados, podendo reduzir consideravelmente a eficiência de fermentação. Assim, dependendo do processo de fermentação, existe uma faixa de concentração considerada ideal. Nas destilarias brasileiras a concentração dos mostos de melaço situa-se entre 15 e 25 °Brix (Lima *et al.*, 2001; Lima, 2019).

Caldas, Borén e Santos (2012) afirmam que o controle da adição de açúcares pela adoção de um perfil de alimentação adequado é importante para controlar ou mesmo minimizar os efeitos inibitórios sobre a levedura, além de reduzir o tempo de fermentação promovendo um aumento da eficiência fermentativa.

2.2.2.4 Teor de Etanol

O aumento do teor de etanol do mosto em fermentação inibe o desenvolvimento da própria levedura. Deve-se ter em conta que o teor de etanol depende de alguns aspectos, tais como composição do meio, concentração inicial de açúcares, natureza da cepa e método de condução do processo (batelada ou contínuo) (Steckelberg, 2001; Ostrowski *et al.*, 2006). Segundo Oliveira (2011), na maioria das leveduras, a concentração máxima de etanol que permite o crescimento é de 10% (p/v).

2.2.2.5 Quantidade de Inóculo

A concentração de inóculo deve ser adequada à concentração de açúcares do mosto para que não haja falta de células para consumir o substrato oferecido (Ferrari, 2013).

Maiores concentrações iniciais de inóculo na dorna ocasionam menor crescimento da própria levedura e permitem fermentações mais rápidas, com maior produtividade e com maior controle sobre as bactérias contaminantes. Por outro lado, teores elevados de levedura exige mais energia de manutenção, isto é, maior consumo de açúcar para manter as células vivas. Como consequência, há diminuição da viabilidade do fermento, devido à maior competição pelos nutrientes do meio, por isso, existe uma concentração ótima de levedura na dorna, dependendo das condições do processo industrial (Cachot; Müller; Pons, 1991; Lima *et al.*, 2001, Lima, 2019).

Para Amorim, Basso e Alves (1989), a recirculação das células de levedura permite a manutenção da alta concentração celular e a maior eficiência decorrente de um menor consumo de açúcar utilizado para a formação de células.

2.2.3 Parâmetros Cinéticos da Fermentação

Em uma fermentação alcoólica, diversos parâmetros podem ser medidos para acompanhar a evolução do processo. Alguns desses parâmetros incluem a variação da concentração de células, substrato e etanol com o tempo. O estudo desses parâmetros possibilita a determinação de velocidades médias de transformações durante o processo (Gretschmann, 2009).

Dentre os parâmetros que possibilitam a análise da produção de células e produção da substância desejada como o etanol, Copersucar (1987) destaca que os fatores de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) e de substrato em produto ($Y_{P/S}$), também são muito importantes no estudo de processos fermentativos, visto que a partir destes parâmetros é possível determinar o rendimento da fermentação.

2.2.4 Tipos de Processos Fermentativos

Existem três tipos básicos de processos fermentativos para a obtenção de etanol adotados pelas usinas brasileiras: batelada, batelada alimentada e contínuo (Tosetto, 2008; Lima, 2019).

O processo de produção de etanol mais antigo no Brasil é a fermentação em bateladas sem recirculação do fermento. Neste tipo de processo são utilizadas várias dornas de fermentação que são cheias e fermentadas uma a uma. Após o término da fermentação, espera-se a decantação do fermento. Esse processo é ainda utilizado para a produção de aguardente, porém é desvantajoso para a produção de etanol em relação aos outros processos (Amorim *et al.*, 1996; Amorim; Basso; Alves, 1989; Lima, 2019).

Devido ao menor rendimento obtido no processo de bateladas, avanços foram introduzidos com o surgimento do processo de fermentação em batelada alimentada com reciclo de células, também chamado de *Melle-Boinot*, cuja principal característica é o reaproveitamento das leveduras. Nesse processo o mosto é alimentado à dorna de fermentação gradualmente e, após o término da fermentação, o mosto fermentado é centrifugado para recuperação do fermento que é reutilizado após tratamento com água e ácido (Amorim; Basso; Alves 1989; Lima, 2019). Desde então, esse é o processo mais usado nas destilarias brasileiras, pois com o aproveitamento do fermento em várias fermentações, obtém-se um maior rendimento.

A fermentação contínua caracteriza-se por possuir alimentação contínua à vazão constante, sendo o volume da reação mantido constante através da retirada contínua de mosto fermentado. É um processo ininterrupto onde se pode operar por longos períodos. Nesse processo, o mosto mais o inóculo são injetados de forma contínua na primeira dorna de fermentação, passando para as demais dornas continuamente até chegar à última dorna, onde a concentração de açúcares estará menor (Amorim; Basso; Alves, 1989; Teixeira; Fonseca; Vicente, 2007; Lima, 2019).

Cereda (2001) defendeu o uso de processos descontínuos e contínuos com recirculação de células, para o caso particular da produção industrial de etanol, pois a reciclagem do fermento aumenta a concentração de levedura no mosto em fermentação, aumentando a produtividade do processo.

Segundo Amorim e Lopes (2013), as usinas de açúcar e etanol brasileiras, em sua maioria (85%) utilizam o sistema de batelada alimentada com recirculação do fermento. As dornas de fermentação variam de $0,5 \times 10^6$ a 3×10^6 L, nas quais o fermento ocupa cerca de 10 a 15% do volume do vinho.

2.3 ÓLEO FÚSEL

Nesta seção, são apresentados aspectos relevantes sobre o óleo fúsel, abordando sua aplicação, formação, e composição, buscando destacar os álcoois superiores predominantes e os fatores reacionais que interferem na sua formação.

2.3.1 Definição e Aplicação

O termo “óleo fúsel” refere-se à mistura de álcoois superiores, predominantemente de cadeia longa que vão de C3 a C5, formados durante a fermentação alcoólica de carboidratos (Patil; Koolwal; Butala, 2002; Jacques; Lyons; Kelsall, 2003; Ferreira; Meirelles; Batista, 2013; Sánchez *et al.*, 2016). Na literatura pode-se encontrar outras designações, como “óleo de fúsel” ou “óleo de cana” (Azania, 2003; Mayer, 2014). A origem do termo vem da palavra alemã *finkel*, que está relacionada a coisas ruins ou inferiores, e que passou a ser associada a produtos indesejados na fermentação alcoólica (Patil; Koolwal; Butala, 2002).

Na indústria sucroenergética, o óleo fúsel é um líquido viscoso, de cor amarelada ou marrom escuro, com odor forte e desagradável (Calam *et al.*, 2015; Mayer, 2014), formado durante a fermentação do mosto de caldo de cana ou de melaço e obtido durante o processo de destilação na coluna retificadora, geralmente em uma região intermediária onde a concentração de etanol está entre 40 e 47% (Patil; Koolwal; Butala, 2002; Jacques; Lyons; Kelsall, 2003; Garcia, 2008; Mayer, 2014). Sua remoção é indispensável para evitar seu acúmulo, manter o funcionamento adequado da coluna de destilação e obter etanol hidratado dentro das especificações de mercado (Batista *et al.*, 2012; BESSA, 2012).

Embora seu potencial seja subaproveitado pelas usinas brasileiras, relatos na literatura indicam seu uso como antiespumante na fabricação de açúcar em usinas turcas e como combustível para suprir a demanda energética em destilarias húngaras (Küçük; Ceylan, 1998; Dörmö *et al.*, 2004). No Brasil, seu destino muitas vezes é a

venda a baixo valor comercial para indústrias químicas, trazendo pouco benefício econômico ao setor sucroenergético (Perez; Cardoso; Franco, 2001; Azania, 2003; Bi, *et al.*, 2008; Yilmaztekin; Erten; Cabaroglu, 2009; Oliveira, 2017; CAETÉ S/A, 2020). Alternativamente, estudos sugerem seu potencial como matéria-prima em diversas indústrias, como alimentos, cosméticos e bioprodutos (Vilas Bôas, 2018; Azania *et al.*, 2010; Ferreira; Meirelles; Batista, 2013). Também há relatos do uso direto deste subproduto como aditivo ao diesel e gasolina (Patil; Koolwal; Butala, 2002; Akcay; Ozer, 2019) e como herbicida no controle de plantas daninhas (Azania *et al.*, 2008, 2010; Pizzo *et al.*, 2010).

Vilas Bôas (2018) sugeriu em seus estudos que o óleo fúsel tem potencial como matéria-prima abundante e de baixo custo, como precursor de ésteres para indústria de alimentos e cosméticos, sendo esta alternativa bastante atrativa sob o ponto de vista técnico-econômico. Azania *et al.* (2010) relataram que o óleo fúsel é explorado por indústrias químicas, que o utilizam como fonte de matéria-prima, principalmente, quanto à extração do álcool isoamílico, que por sua vez é utilizado também na extração de compostos farmacológicos. Ferreira, Meirelles e Batista (2013) expuseram a utilização do subproduto nos processos de esterificação para obtenção de flavorizantes.

Outras aplicações para o óleo fúsel são reportadas na literatura, tais como produção de plastificante para policloreto de vinila (Küçük; Ceylan, 1998) e melhorador de cetano em mistura com óleo diesel (Leão, 2002). No entanto, seu principal uso é como fonte de álcool isoamílico, que apresenta valor agregado muito superior ao etanol (Ferreira; Meirelles; Batista, 2013) e tem sido utilizado para a fabricação de bioprodutos com a vantagem de ser ambientalmente seguro, renovável e, em alguns casos biodegradáveis (Montoya *et al.*, 2016).

2.3.2 Formação e Composição do Óleo Fúsel

Patil, Koolwal e Butala (2002) narraram que a quantidade de óleo fúsel formado durante a fermentação depende, entre outros fatores, da matéria-prima utilizada para preparação do mosto. A Tabela 1 mostra dados de produção de óleo fúsel a partir de diferentes matérias-primas, indicando que sua produção varia de 1 a 11 L para cada

1000 L de etanol formado (Sánchez *et al.*, 2016). Em relação ao melaço, a média de produção é de 2,5 L do óleo para cada 1000 L de etanol (Da Silveira, 2016).

Tabela 1 – Rendimento de óleo fúsel a partir de diferentes matérias-primas

Matéria-prima	Rendimento em % v/v de etanol
Melaço de cana-de-açúcar	0,1 a 0,5
Caldo de cana-de-açúcar evaporado	0,1 a 0,2
Malte de milho	0,25 a 0,3
Milho	0,4 a 0,5
Trigo	0,2 a 0,3
Batata	0,5 a 1,1

Fonte: Patil, Koolwal e Butala (2002).

2.3.2.1 Composição do Óleo Fúsel

Durante a fermentação alcoólica, as leveduras produzem diversos produtos secundários, com destaque para os álcoois superiores, tais como o álcool isoamílico (3-metil-1-butanol), o álcool amílico ativo (2-metil-1-butanol) e o isobutanol (2-metil-1-propanol), que compõem a maior parcela desses produtos (Valero *et al.*, 2002; Patil; Koolwal; Butala, 2002; Eustácio *et al.*, 2018).

A Tabela 2 reúne dados reportados na literatura sobre a concentração do álcool isoamílico e do isobutanol no vinho fermentado, evidenciando variações entre diferentes matérias-primas utilizadas no preparo do mosto. As análises foram feitas por cromatografia gasosa.

Tabela 2 – Concentração (fração mássica) de álcool isoamílico e isobutanol no vinho fermentado

Autor	Tipo de Mosto	Álcool Isoamílico (A)	Isobutanol (B)	Razão A/B
Bessa (2012) ^a	Caldo de Cana	$2,439 \times 10^{-4}$	$7,270 \times 10^{-5}$	3,4
Bessa (2012) ^b	Melaço	$2,783 \times 10^{-4}$	$3,258 \times 10^{-5}$	8,5
Gutierrez (1993)	Sintético	$3,503 \times 10^{-4}$	$9,300 \times 10^{-5}$	3,8

Fonte: O Autor (2020).

^a Usina Santa Adélia

^b Usina São Domingos

Os dados apresentados por Bessa (2012) correspondem a amostras de vinho provenientes de uma destilaria que utiliza mosto de caldo de cana (Usina Santa Adélia) e de uma usina de açúcar e álcool com destilaria anexa que utiliza mosto de

melaço (Usina São Domingos). Essas amostras refletem fermentações realizadas em condições industriais de processo, não incluindo informações sobre concentrações de açúcar, fermento, temperatura e pH nos trabalhos. Por outro lado, os dados fornecidos por Gutierrez (1993) foram derivados da análise de vinho proveniente da fermentação de mosto sintético contendo 16% de sacarose, inoculado com levedura de panificação e processo conduzido a 34 °C e pH 4,0.

Ao analisar os dados da Tabela 2, observa-se uma variação na concentração do álcool isoamílico e do isobutanol entre as diferentes fontes. Destaca-se uma maior razão entre esses álcoois para o vinho proveniente de mosto de melaço (Usina São Domingos), o que confirma que o tipo de matéria-prima utilizada para o preparo do mosto tem influência na composição dos álcoois superiores (Patil; Koolwal; Butala, 2002).

Bessa (2012) ressalta que, entre os compostos secundários analisados em seu estudo, o álcool isoamílico apresentou a maior concentração em todos os mostos fermentados. Esses resultados estão em consonância com as observações de Patil, Koolwal e Butala (2002) e Perez, Cardoso e Franco (2001), que apontam que as concentrações dos álcoois superiores que compõem o óleo fúsel variam entre as usinas de açúcar e álcool, porém o álcool isoamílico e o isobutanol sempre se apresentam em maior quantidade.

Conforme discutido no item 2.1.2, os álcoois superiores formados durante a fermentação seguem junto com o mosto fermentado para o processo de destilação e são extraídos na coluna de retificação de etanol. De acordo com Patil, Koolwal e Butala (2002) a composição do óleo fúsel pode ser convenientemente reportada como:

- LBF (*Low Boiling Point*): Fração do óleo fúsel com ponto de ebulição abaixo de 132 °C a 1 atm de pressão;
- HBF (*High Boiling Point*): Fração do óleo fúsel com ponto de ebulição acima de 132 °C a 1 atm de pressão.

A fração LBF constitui a maior parte do óleo fúsel (95 – 98%) e o álcool amílico (isoamílico + amílico ativo) é seu maior constituinte.

A Tabela 3 reúne informações sobre as concentrações dos álcoois majoritários na composição do óleo fúsel proveniente de usinas de açúcar e etanol e destilarias reportadas por diferentes autores. Todas as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa e a maioria coletada em usinas e destilarias do estado de São Paulo, com exceção das analisadas por Montoya *et al.* (2016) que foram coletadas em usinas colombianas.

Tabela 3 – Concentração dos álcoois majoritários na composição do óleo fúsel de usinas de açúcar e etanol

Autor	Álcool Isoamílico - A (g/L)	Isobutanol - B (g/L)	Etanol (g/L)	Razão A/B
Perez, Cardoso e Franco (2001)	390,00	158,00	28,40	2,5
Azania (2003)	232,15	67,93	92,31	3,4
Azania (2008)	498,96	82,61	114,09	6,0
Bessa (2012) ^a	417,40	79,60	191,10	5,2
Bessa (2012) ^b	563,00	77,50	102,30	7,3
Montoya <i>et al.</i> (2016) ^c	722,23	56,40	31,30	12,8
Vilas Bôas (2018)	649,80	78,60	92,20	8,3

Fonte: O Autor (2020).

^a Usina Santa Adélia

^b Usina São Domingos

^c Média de amostras de quatro usinas colombianas

Ao analisar os dados da Tabela 3, observa-se uma ampla variação na composição do álcool isoamílico e do isobutanol, evidenciando que a composição do óleo fúsel é variável e que o álcool isoamílico é predominante. Patil, Koolwal e Butala (2002) descreveram essa variação na concentração dos componentes do óleo fúsel, destacando que isso ocorre principalmente em relação ao álcool amílico (isoamílico + amílico ativo), que pode chegar a 45%. Além disso, ao avaliar a razão A/B entre o álcool isoamílico (A) e o isobutanol (B), nota-se uma considerável variação, sugerindo a necessidade de investigação dos fatores reacionais que podem influenciar nessa relação.

O valor mais elevado apresentado por Montoya *et al.* (2016) pode ser atribuído a particularidades no processo de destilação ou de extração e recuperação de óleo

fúsel adotado pelas usinas colombianas; no entanto, os autores não fornecem detalhes sobre essas etapas.

2.3.2.2 Formação dos Álcoois Superiores que Compõem o Óleo Fúsel

O mecanismo de formação dos álcoois superiores que compõem o óleo fúsel foi inicialmente proposto por Ehrlich em 1907, após sua investigação sobre aminoácidos, onde observou semelhanças estruturais entre a isoleucina e o álcool amílico ativo, assim como entre a leucina e o álcool isoamílico. Ehrlich investigou se os álcoois superiores eram derivados dos aminoácidos, e ao suplementar células em fermentação com leucina e isoleucina, observou um aumento na produção desses álcoois. Assim, assumiu que os aminoácidos eram convertidos em álcoois superiores pela ação de enzimas, porém não demonstrou quais enzimas e intermediários estavam envolvidos (Dickinson *et al.*, 1997; Hazelwood *et al.*, 2008).

Em 1911, Neubauer e Fromherz propuseram um esquema metabólico modificado, que constitui o mecanismo de Erlich atualmente aceito. Esse mecanismo sugere a formação de um cetoácido como primeiro intermediário, que posteriormente pode ser descarboxilado em um aldeído e então reduzido ao álcool superior. Dessa maneira, o isobutanol (2-metil-1-propanol) é produzido a partir da valina, o álcool isoamílico (3-metil-1-butanol) a partir da leucina e o álcool amílico ativo (2-metil-1-butanol) da isoleucina (Jacques; Lyons; Kelsall, 2003).

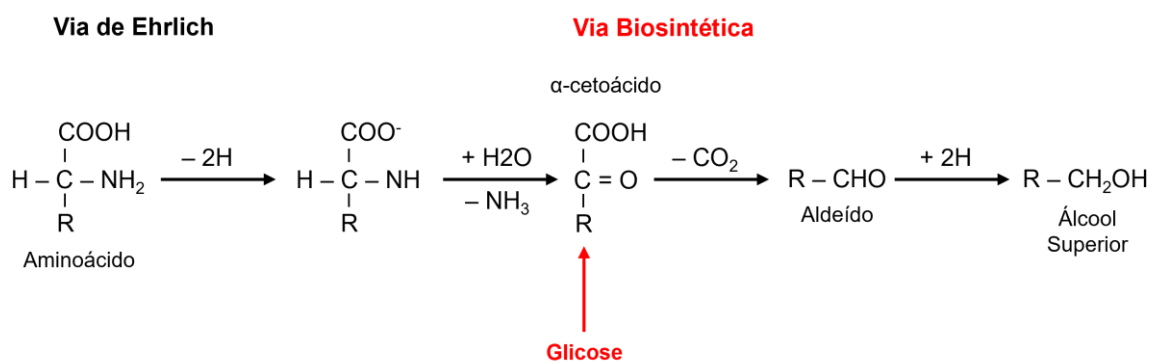
Algumas questões foram levantadas em relação à aceitação desse mecanismo (Dickinson *et al.*, 1997; Ter Schure *et al.*, 1998; Jacques; Lyons; Kelsall, 2003; Hazelwood *et al.*, 2008). Dickinson *et al.* (1997) expõem algumas razões, tais como o fato de o caminho proposto não explicar todos os produtos formados e enzimas envolvidas e que alguns álcoois superiores não correspondem a nenhum aminoácido conhecido. Os autores também relatam que, em meios complexos, a cinética da utilização de aminoácidos no cultivo de microrganismos não coincide com a formação de álcoois superiores.

Apesar dos questionamentos levantados e da vasta literatura sobre o mecanismo de formação de álcoois superiores durante a fermentação (Castor; Guymon, 1952; Yamada; Yoshizawa; Sasaki, 1958; Yoshizawa, 1965; Äyräpää, 1971; Dickinson *et al.*, 1997; Ter Shure *et al.*, 1998; Hazelwood *et al.*, 2008; Montoya *et al.*,

2016; Gonzalez; Morales, 2017; Yuan *et al.*, 2016), o mecanismo mais aceito até o momento é ainda o proposto por Ehrlich em 1907 e modificado por Neubauer e Fromherz em 1911 (Hazelwood *et al.*, 2008).

Dickinson, Harrison e Hewlins (1998) estudaram o catabolismo da valina em isobutanol e observaram que houve a formação de álcool isoamílico, fato que indica uma mistura de vias catabólica e biosintética para esses aminoácidos. Patil, Koolwal e Butala (2002) citam duas vias de formação de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica, a via catabólica (via ou mecanismo de Ehrlich) e a via biosintética ou via do piruvato derivada do metabolismo de carboidratos (Figura 3).

Figura 3 – Vias de formação de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica



Fonte: Adaptado de Fermentec (2019).

2.3.2.2.1 Fatores que Interferem na Formação do Óleo Fúsel

A proporção dos componentes do óleo fúsel pode variar conforme a matéria-prima e o processo de obtenção do etanol. Patil, Koolwal e Butala (2002) relataram que a quantidade e qualidade do óleo fúsel formado durante a produção de etanol dependem não apenas da matéria-prima, mas também do método de preparo do mosto, das condições em que ocorre a fermentação e do método de remoção do óleo fúsel no processo de destilação.

Em relação às condições da fermentação alcoólica, diversos fatores têm sido estudados, como temperatura (Pollard; Kieser; Beech, 1966; Ough; Guymon; Crowell, 1966; Gutierrez, 1993; Valero *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2013), pH (Yoshizawa, 1965; Pollard; Kieser; Beech, 1966; Gutierrez, 1993; Luo *et al.*, 2013), aeração (Yoshizawa, 1965), suplementação com compostos nitrogenados (Yoshizawa, 1965; Äyräpää, 1968, 1971; Gutierrez, 1993; Luo *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017), tipo

de fermento (Äyräpää, 1968; Valero *et al.*, 2002; Klosowski *et al.*, 2015), concentração de açúcar (Gutierrez, 1993), concentração de fermento (Cachot; Müller; Pons, 1991; Luo *et al.*, 2013), concentração de dióxido de enxofre (Pollard; Kieser; Beech, 1966; Garde-Cerdán *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2013) e modo de operação do processo (Cachot; Müller; Pons, 1991).

A maioria dos estudos sobre esses fatores tem sido direcionada para a produção de álcoois superiores em bebidas alcoólicas, utilizando meios sintéticos ou matérias-primas diversas, como uva, maçã, cupuaçu e arroz. No entanto, poucos trabalhos têm explorado o uso de melaço ou caldo de cana-de-açúcar como matéria-prima. Cachot, Müller e Pons (1991) investigaram a interferência de parâmetros como taxa de inóculo, concentração de melaço e modo de operação na cinética de compostos voláteis durante a fermentação por *Saccharomyces cerevisiae*. Gutierrez (1988), por sua vez, avaliou o efeito da adição de sulfito sobre a produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana-de-açúcar.

Gutierrez (1993) também conduziu estudos sobre a produção de álcoois superiores por diferentes linhagens de *Saccharomyces* em variadas condições de temperatura, concentração de sacarose, pH e fonte de nitrogênio. No entanto, é importante ressaltar que esses experimentos foram realizados em condições de laboratório controladas, utilizando meio sintético, o que difere das condições encontradas na indústria sucroenergética. Além disso, o autor não determinou o teor de etanol, não mencionou o tempo de fermentação e não calculou as eficiências de fermentação e produtividade, impossibilitando qualquer análise em relação à interferência dos fatores estudados na produção de etanol.

2.4 PROSPECCÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

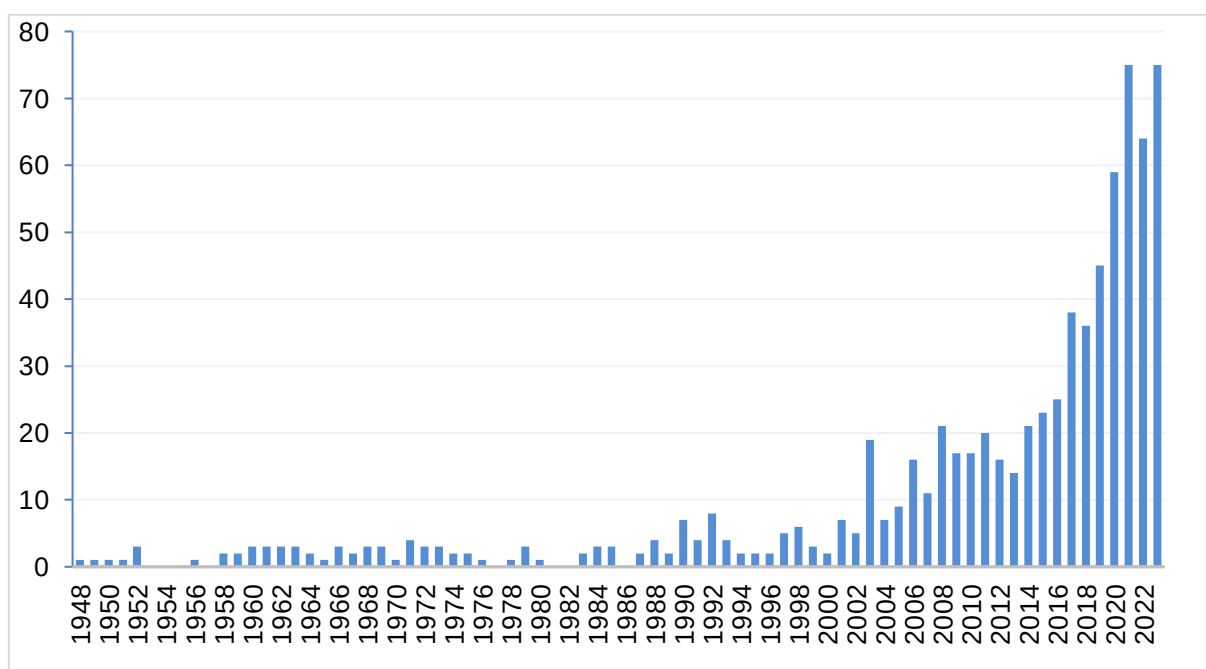
Nesta seção, é apresentada uma breve visão geral das tendências e avanços na área relacionada ao óleo fúsel e seus principais constituintes, revelados por meio da prospecção científica e tecnológica. Detalhes completos da metodologia, resultados e discussões adicionais estão disponíveis no Apêndice A.

A análise da produção científica internacional focada no óleo fúsel e seus constituintes, especialmente o álcool isoamílico e o isobutanol, revelou uma tendência crescente ao longo das décadas. Desde os primeiros registros encontrados nas bases

de dados consultadas, nas décadas de 40 e 50, especialmente relacionados à destilados, até o notável aumento no número de publicações nas últimas décadas, observa-se um interesse contínuo nessa área.

A Figura 4 apresenta um panorama do número de publicações desde 1948, destacando um aumento expressivo a partir dos anos 2000. Esse crescimento evidencia a relevância dos estudos sobre o óleo fúsel e seus componentes na comunidade científica global.

Figura 4 – Distribuição temporal da produção científica internacional sobre o óleo fúsel e os álcoois superiores que o compõem



Fonte: O Autor (2024)

A análise dos artigos revelou uma ampla diversidade de estudos neste campo, abrangendo desde o desenvolvimento de métodos de análise até a investigação dos mecanismos de formação dos álcoois superiores, além das potenciais aplicações do óleo fúsel (Paško, *et al.*, 2024; Gonzalez; Morales, 2017; Azania *et al.*, 2008).

Além disso, a análise por década revela padrões interessantes. Por exemplo, o aumento significativo nas publicações a partir dos anos 2000 sugere um interesse renovado na aplicação do óleo fúsel, evidenciado por propostas de uso na produção de ésteres e na agricultura (Nemestothy *et al.*, 2008; Bi *et al.*, 2008, 2009; Azania *et al.*, 2008). Também é notável o destaque dado às últimas décadas, com um aumento

significativo nas publicações, indicando uma tendência de crescimento contínuo em pesquisas nessa área.

A distribuição geográfica das publicações (Figura 2 do Apêndice A) mostra uma participação diversificada de países, com destaque para China, Espanha e Brasil. A ascensão da China como um importante centro de pesquisa nesse campo, especialmente em matérias-primas e produtos locais, reflete o crescente papel do país na comunidade científica global.

No cenário brasileiro, apesar de uma contribuição significativa, especialmente na aplicação do óleo fúsel proveniente da indústria sucroenergética, há espaço para maior desenvolvimento, especialmente em áreas como a formação de álcoois superiores durante a fermentação.

Paralelamente, a prospecção de patentes revelou um aumento significativo no número de inovações tecnológicas relacionadas ao óleo fúsel, com destaque para tecnologias de fermentação e produção de produtos químicos derivados. Essas descobertas patenteadas estão alinhadas com as tendências identificadas nos artigos científicos, indicando um interesse renovado na aplicação prática do óleo fúsel em diversas indústrias.

3 MATERIAS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Processos Industriais (LAPIND) do curso de Química Industrial do Instituto Federal de Alagoas (IFAL) – campus Penedo. As análises foram realizadas nos laboratórios de Química Analítica Instrumental (LAQINS) e Microbiologia (LAMBIO) do mesmo campus, bem como no Laboratório de Química Analítica da Coordenação de Química do IFAL - campus Maceió.

3.1 MICRODESTILARIA

Para a condução dos experimentos fermentativos, foi empregada uma microdestilaria de produção de etanol instalada no Laboratório de Processos Industriais (LAPIND) do curso de Química Industrial do Instituto Federal de Alagoas – campus Penedo.

A microdestilaria, desenvolvida pelo Senai/AL (Figura 5), é um equipamento em escala reduzida que simula as operações de uma planta industrial de fabricação de etanol, permitindo a realização de experimentos técnicos e científicos de forma avançada e econômica.

Figura 5 – Microdestilaria de etanol



Fonte: Acervo próprio (2019).

O processo fermentativo é conduzido em uma sequência de etapas que envolvem os diferentes componentes da microdestilaria (Figura 6).

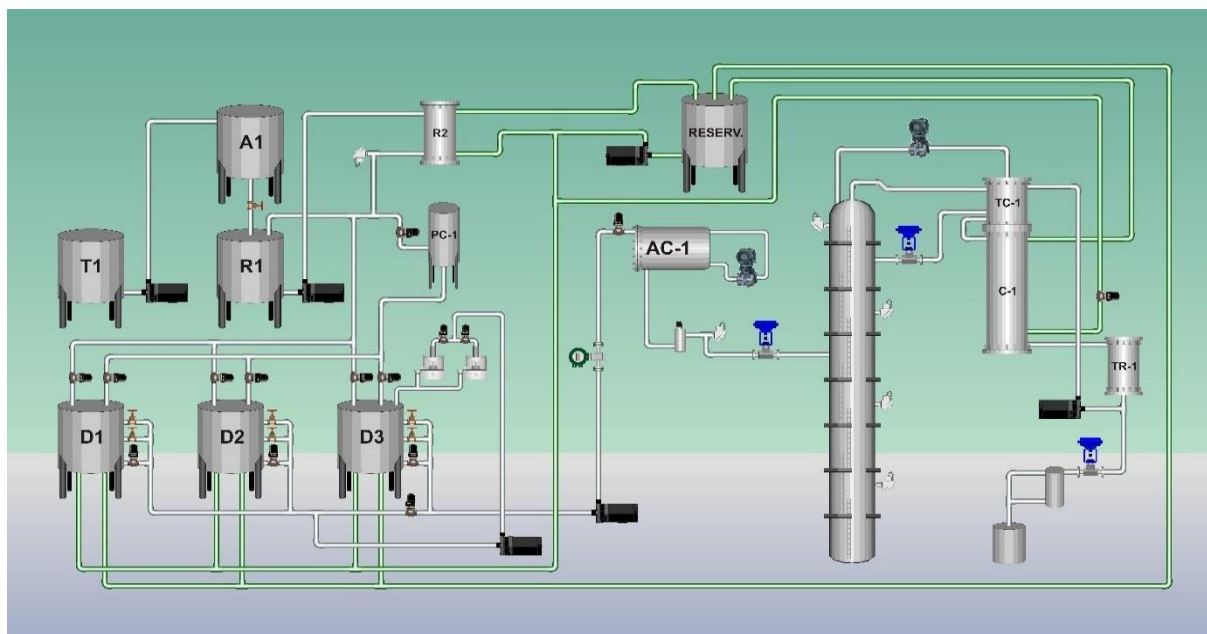
Primeiramente, o mosto é preparado em um tanque específico (T1), onde é feita a mistura de água e melaço. Em seguida, o mosto é transferido para um tanque de aquecimento e esterilização (A1), onde é aquecido e esterilizado para eliminar microrganismos indesejados que possam interferir na fermentação.

Após a esterilização, o mosto é resfriado em um trocador de calor (R2) até atingir a temperatura ideal para a fermentação. Em seguida, é armazenado temporariamente em um tanque reservatório (R1) antes de ser introduzido nas dornas de fermentação (D1, D2 e D3).

No tanque para o pé-de-cuba (PC1), é feito o preparo do fermento para posterior inoculação nas dornas de fermentação.

Cada dorna possui uma capacidade de 65 litros e está equipada com serpentina de refrigeração, chave de segurança de nível e medidor de temperatura. O reservatório R1 também pode ser utilizado como dorna de fermentação, se necessário.

Figura 6 – Fluxograma da microdestilaria



Fonte: Acervo próprio (2019).

T1: Tanque de preparo de mosto
 A1: Tanque de aquecimento e esterilização de mosto
 R1: Tanque reservatório de mosto
 R2: Trocador de calor
 PC1: Tanque para preparo de fermento (pé-de-cuba)
 D1, D2 e D3: Dornas de fermentação
 AC1: Tanque acumulador de vinho

3.2 MELAÇO

O melaço utilizado na pesquisa, tanto no preparo do inóculo quanto nas fermentações, foi coletado em parceria com usinas produtoras de açúcar e etanol em Alagoas e armazenado em tambores de plástico até o momento do preparo do mosto.

3.3 INÓCULO E MEIO DE FERMENTAÇÃO

No processo fermentativo foi utilizada levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial (*Fleischmann*), comercializada na forma de fermento em pó seco. Também foi utilizado fermento industrial cedido por uma usina da região de Penedo/AL.

O fermento industrial foi empregado apenas no 2º teste inicial, e não precisou passar por etapa de preparo, pois já estava pronto para a inoculação das fermentações.

Para o fermento comercial, foi necessário preparar o inóculo (propagação) até se obter o volume necessário para as fermentações, no 1º e 3º teste. A metodologia

de preparo do inóculo a partir do fermento comercial seco passou por algumas modificações e ajustes no decorrer da pesquisa, visando o bom desempenho das fermentações.

Para o 1º e 3º testes, realizou-se a propagação do fermento comercial adotando a seguinte metodologia: 200 g de fermento comercial foram pesados em um Becker de 1 L e hidratados com água morna (Figura 7). Essa mistura foi inoculada em 10 L de mosto a 10 °Brix, em um recipiente de 20 L, mantido em agitação (Figura 7). O °Brix da fermentação foi monitorado a cada 30 min., até que reduzisse pela metade (5 °Brix). Paralelamente, mais 10 L de mosto a 12 °Brix foram preparados e adicionados ao pé de cuba em filete. A fermentação foi acompanhada até que o valor do °Brix atingisse a metade novamente. Esse procedimento foi repetido, dobrando o volume de mosto, até se obter o volume de fermento desejado. Esse inóculo não passou por análise microbiológica.

Figura 7 – Multiplicação do fermento comercial para uso nos testes iniciais



Fonte: Acervo próprio (2020).

Após os testes de fermentação na microdestilaria (1º, 2º e 3º testes), decidiu-se usar exclusivamente fermento comercial (*Fleischmann*) para garantir a padronização e comparabilidade dos resultados entre os experimentos. A escolha foi

motivada pela impossibilidade de comparar consistentemente os resultados ao utilizar fermento industrial, devido à necessidade de coleta em momentos variados na usina e sua suscetibilidade a mutações ao longo do tempo.

Assim, optou-se por realizar apenas uma ativação do fermento seco em mosto a 5°Brix, evitando problemas com a etapa de propagação do fermento.

Foram realizados testes com diferentes condições de ativação do fermento, procurando obter um inóculo com parâmetros microbiológicos semelhantes aos adotados por usinas de etanol, tais como:

- Concentração de leveduras no inóculo: 1×10^9 a $1,8 \times 10^9$ cél./mL
- Concentração de leveduras no mosto fermentado: 5×10^8 a 8×10^8 cél./mL
- Viabilidade celular: 70 a 100%
- Brotamento: 10 a 30%
- Razão de infecção: 0,0 a 5,0%

Também buscou-se ativar o fermento de modo que, após a inoculação, promovesse uma fermentação completa, em um tempo similar ao praticado nas usinas, geralmente em torno de 8h a 10h. Para isso, realizou-se a ativação do fermento em mosto de melaço a 5° Brix de concentração, conduzindo alguns testes em escala de laboratório para definir a melhor condição de ativação.

O mosto utilizado nas fermentações finais foi elaborado por diluição do melaço com água até a concentração desejada. O pH desse foi corrigido com ácido sulfúrico (H_2SO_4). Nenhuma esterilização foi realizada.

3.4 TESTES PRELIMINARES (*START-UP* DA MICRODESTILARIA)

Foram realizados testes experimentais com o objetivo de iniciar a operação da microdestilaria, e para avaliar as capacidades e limitações do equipamento em relação à etapa de fermentação do mosto em etanol. Também buscou-se identificar possíveis necessidades de adaptações na planta e avaliar o desempenho dos fermentos comercial e industrial.

Na etapa inicial, foram realizados dois testes experimentais, cada um com duração de 20 horas, durante os quais o °Brix foi monitorado a cada hora. Em cada

teste, foram realizadas quatro fermentações, sendo conduzidas nas dornas D1, D2, D3 e no reservatório R1 (Figura 6), cada uma sob condições de processo distintas, envolvendo variações na concentração de substrato, concentração de fermento e tipo de fermento utilizado. Após os dois testes iniciais, um terceiro teste foi realizado buscando alcançar um desempenho da fermentação mais satisfatório. Os limites inferiores e superiores para a concentração de açúcar (°Brix) e para a concentração de fermento (% v/v) foram estabelecidos com base na literatura (Lima *et al.*, 2001) e na prática industrial.

3.4.1 1º Teste de Fermentação com Fermento Comercial

O 1º teste experimental foi conduzido em batelada simples utilizando apenas fermento comercial (FC), devido à indisponibilidade de fermento industrial (FI) na época, pois as usinas estavam no período de entressafra. Foi necessário multiplicar o fermento previamente para alcançar o volume de 40 L, suficiente para alimentar as dornas de fermentação, conforme metodologia descrita na seção 3.3.

Os experimentos deste teste foram conduzidos em dois níveis de concentração de açúcar (14 °Brix e 22 °Brix) e de fermento (15% e 25% v/v), resultando em quatro diferentes condições de fermentação (Tabela 4).

Tabela 4 – Condições experimentais do 1º teste de fermentação com fermento comercial

Condição	Concentração de açúcar (°Brix)	Concentração de Fermento (% v/v)
C1FC	22	15
C2FC	14	25
C3FC	14	15
C4FC	22	25

Fonte: O Autor (2020).

C1FC: 22 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C2FC:** 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial; **C3FC:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C4FC:** 22 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial.

3.4.2 2º Teste de Fermentação com Fermento Industrial

No 2º teste experimental, alterou-se o modo de condução do processo para batelada alimentada, com um tempo de alimentação do mosto à dorna de 10 minutos.

Além disso, houve um ajuste em um dos níveis de concentração de açúcar, que passou de 22 °Brix para 25 °Brix, para refletir práticas observadas em algumas usinas da região. O fermento utilizado foi o industrial fornecido por uma usina de Penedo/AL em operação na época.

Os experimentos deste teste foram conduzidos em dois níveis de concentração de açúcar (14 °Brix e 25 °Brix) e de fermento (15% e 25% v/v), resultando em quatro diferentes condições de fermentação (Tabela 5).

Tabela 5 – Condições experimentais do 2º teste de fermentação com fermento industrial

Condição	Concentração de açúcar (°Brix)	Concentração de Fermento (% v/v)
C1FI	14	25
C2FI	25	15
C3FI	14	15
C4FI	25	25

Fonte: O Autor (2020).

C1FI: 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial; **C2FI:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C3FI:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C4FI:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial.

Considerando o volume útil de cada dorna de fermentação (40 L), quando o nível de concentração de fermento foi 15%, 6 L foram de fermento e 34 L de mosto. Da mesma forma acontece quando o nível foi 25%, ou seja, 10 L foram de fermento e 30 L de mosto.

3.4.3 3º Teste de Fermentação com Fermento Comercial e Industrial

Para investigar ainda mais as condições ideais de fermentação na microdestilaria, foram realizados novos experimentos em batelada alimentada, adotando um tempo de alimentação de 1 horas para simular o procedimento utilizado nas usinas de produção de etanol. O objetivo principal foi determinar as melhores condições de fermentação, em termos de concentração de substrato e concentração de fermento, para cada tipo de fermento utilizado.

Os experimentos foram conduzidos com os mesmos níveis de concentração de substrato e fermento utilizados no 2º teste, porém com os fermentos comercial e industrial (Tabela 6). Durante os experimentos, foram coletadas amostras iniciais e

finais do mosto em fermentação para análise dos teores de açúcares redutores totais (ART em g/L), etanol (g/L) e massa celular (g/L). Esses dados possibilitaram o cálculo das eficiências de fermentação (n_f) e de processo (n_p), além da produtividade em etanol (PE).

Tabela 6 – Condições experimentais do 3º teste de fermentação com fermento comercial e industrial

Condição	Concentração de açúcar (°Brix)	Concentração de Fermento (% v/v)
C1FI	14	25
C1FC	14	25
C2FI	25	15
C2FC	25	15
C3FI	14	15
C3FC	14	15
C4FI	25	25
C4FC	25	25

Fonte: Autoria própria (2020).

C1FI: 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial; **C2FI:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C3FI:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C4FI:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial. **C1FC:** 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial; **C2FC:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C3FC:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C4FC:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial.

Os resultados obtidos foram utilizados como parâmetro para os experimentos subsequentes, uma vez que o objetivo principal deste trabalho foi avaliar os fatores que influenciam na formação de álcoois superiores, sem comprometer a produção de etanol.

3.5 FATORES REACIONAIS E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO DOS EXPERIMENTOS FINAIS

Com base na literatura consultada (Yoshizawa, 1965, 1966; Pollard; Kieser; Beech, 1966; Ough; Guymon; Crowell, 1966; Äyräpää, 1968, 1971; Cachot; Müller; Pons, 1991; Gutierrez, 1993; Aragon; Atienza; Climent, 1998; Valero *et al.*, 2002; Garde-Cerdan *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2013; Vidal *et al.*, 2013; Kłosowski *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2017), bem como nas condições de operação da microdestilaria e das possibilidades práticas de aplicação no processo industrial de produção de etanol, foram escolhidos os seguintes fatores reacionais para serem analisados:

- pH do mosto;
- Refrigeração das dornas de fermentação;
- Suplementação com sulfato de amônio.

As fermentações dos experimentos finais foram conduzidas em triplicata na microdestilaria, em dornas de fermentação com capacidade de 60 L, equipadas com serpentina de refrigeração.

A condição de fermentação adotada para esses experimentos, em termos de contração de açúcar e de fermento, foi a C4FC (25 °Brix e 25% v/v de fermento comercial), com base nos resultados obtidos no 3º teste de fermentação. Inicialmente, foram transferidos 10 L de inóculo para cada dorna e, posteriormente, alimentados 30 L de mosto com concentração de 25 °Brix, em um tempo de alimentação de 1 hora.

Os experimentos foram conduzidos à temperatura ambiente e a refrigeração, quando necessária, foi feita através da circulação de água fria. As fermentações foram conduzidas durante 10 horas, com monitoramento de Brix, pH e temperatura a cada hora.

Foram coletadas amostras no início e no final das fermentações, sendo estas centrifugadas e o sobrenadante armazenado em geladeira para análise posterior.

3.6 PARÂMETROS DE DESEMPENHO DO PROCESSO FERMENTATIVO

Para avaliar o desempenho das fermentações, foram calculados os parâmetros eficiências de fermentação (η_f) e de processo (η_p), a produtividade em etanol (PE) e o fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$).

A eficiência de fermentação (η_f , em %) foi calculada considerando o rendimento teórico proveniente da Equação de Gay-Lussac, de 0,511 g_{etanol}/g_{ART} (100%), conforme Equação 3, onde ΔE é o etanol produzido (concentração de etanol final – concentração de etanol inicial) e ΔS é o açúcar consumido (ART inicial – ART final), ambos em g/L.

$$\eta_f (\%) = \frac{\Delta E}{(\Delta S \times 0,511)} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

A eficiência de processo (η_p , em %) foi calculada com base na concentração inicial de açúcar (ART inicial), conforme Equação 4.

$$\eta_p (\%) = \frac{\Delta E}{(0,511 \times \text{ART}_{\text{inicial}})} \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

A produtividade em etanol (PE, em $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{L.h}$), foi calculada com a Equação 5, considerando o tempo de fermentação (t) de 10 h.

$$\text{PE} \left(\frac{\text{g}_{\text{etanol}}}{\text{L.h}} \right) = \frac{\Delta E}{t} \quad (\text{Equação 5})$$

O fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$, em $\text{g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{ATR}}$), foi calculado com a Equação 6, onde ΔX são as células produzidas (concentração celular final – concentração celular inicial), em g/L.

$$Y_{X/S} \left(\frac{\text{g}_{\text{células}}}{\text{g}_{\text{ATR}}} \right) = \frac{\Delta X}{\Delta S} \quad (\text{Equação 6})$$

3.7 METODOLOGIA ANALÍTICA

Nesta seção serão abordadas as metodologias analíticas utilizadas nos testes de fermentação e nos experimentos finais.

3.7.1 Sólidos Solúveis Totais (°Brix)

A determinação dos sólidos solúveis totais (°Brix) foi realizada por refratometria com refratômetro digital portátil, marca HANNA HI 96801, com compensação automática de temperatura e faixa de medição de 0 a 85 °Brix.

O acompanhamento do consumo de substrato pelo °Brix é muito utilizado, visto que pode ser determinado através de um método muito prático e por se tratar de um parâmetro que apresenta correlação linear com as concentrações de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART). Essas medições no mosto serviram apenas como um parâmetro de acompanhamento da evolução das fermentações, pois vários compostos, como ácidos e álcoois, podem causar interferência no índice de refração e, portanto, nos resultados das leituras.

3.7.2 pH

Para medição de pH utilizou-se pHmetro de bancada digital PHTER PHS-3B, com controle de temperatura e previamente ajustado nas soluções padrão pH 4,0 e pH 7,0.

3.7.3 Açúcares Redutores (AR) e Açúcares Redutores Totais (ART)

Os teores de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) do mosto nos testes iniciais foram determinados pelo método espectrofotométrico do ácido 3-5-dinitrossalicílico (DNS), descrito por Miller (1959), utilizando espectrofotômetro *Novainstruments* Serie 2000. Esse método se baseia na oxidação do grupo aldeído do açúcar a um grupo carboxílico com a formação do composto 3-amino-5-nitrosalicílico de coloração avermelhada com forte absorção em 540 nm de comprimento de onda (Maldonade; Carvalho; Ferreira, 2013).

Essa metodologia foi empregada exclusivamente para análise das amostras dos testes de fermentação (1º, 2º e 3º testes). Para análise das amostras das fermentações finais, foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), conforme metodologia descrita na seção 3.8.

3.7.3.1 Preparo da Solução de Reagente DNS

O reagente DNS foi preparado dissolvendo 1,0 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico à temperatura ambiente em 20 mL de NaOH 2 N e 50 mL de água destilada em um béquer de 500 mL. Após a completa dissolução do DNS, adicionou-se 30 g de sal de Rochelle (tartarato duplo de sódio e potássio - $C_4H_4KNaO_6 \cdot 4H_2O$). A solução foi dissolvida, transferida para um balão volumétrico de 100 mL e o volume foi completado com água destilada. Em seguida, a solução foi armazenada em um frasco escuro e mantida refrigerada.

3.7.3.2 Determinação de Açúcares Redutores (AR)

Para a determinação de AR, foram transferidos 250 µL da amostra diluída, 500 µL de água destilada e 250 µL de solução de DNS para um tubo de ensaio com tampa. O tubo foi levado a um banho fervente e mantido por 5 minutos para permitir a reação entre a glicose e o DNS. Após esse período, o tubo foi resfriado em um banho de gelo.

Após o resfriamento, foram adicionados 4 mL de água destilada ao tubo e as leituras de absorbância foram feitas em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. Utilizou-se uma curva padrão para calcular a concentração de açúcares redutores (AR), em g/L.

3.7.3.3 Determinação de Açúcares Redutores Totais (ART)

Para a determinação dos açúcares redutores totais (ART), antes de realizar a análise pelo método do DNS, a amostra passou por um processo de hidrólise ácida com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1,5 M e posterior neutralização com hidróxido de sódio (NaOH) 40%. Foram transferidos 1,0 mL da amostra para tubos de ensaio com tampa e adicionados 4 mL de H_2SO_4 1,5 M. Os tubos foram fechados e levados a um banho fervente, mantidos por 30 minutos para hidrolisar os polissacarídeos e outros açúcares não-redutores, com agitação a cada 5 minutos. Após esse período, os tubos foram resfriados e as amostras neutralizadas com NaOH 40%, utilizando fenolftaleína 1,0% como indicador. A solução tornou-se incolor ao gotear H_2SO_4 1,5 M, foi filtrada e o volume foi completado para 25 mL.

Após a hidrólise, seguiu-se o procedimento conforme a metodologia para AR para obter o ART, observando-se a diluição feita com a amostra.

3.7.3.4 Curva Padrão de Glicose

Foi preparada uma solução padrão de glicose 1,0 g/L, fez-se as diluições conforme a Tabela 7 e procedeu-se com a metodologia descrita no item 3.7.3.2.

Foi preparada uma solução padrão de glicose a uma concentração de 1,0 g/L. Em seguida, realizaram-se as diluições conforme descrito na Tabela 7 e seguiu-se com a metodologia descrita no item 3.7.3.2.

Tabela 7 – Procedimento para obtenção da curva padrão de açúcares redutores

Tubo	Concentração (g/L)	V_{Amostra Padrão} (μL)	V_{Água} (μL)	V_{DNS} (μL)	ABS
1	0,0	0	750	250	-
2	0,2	50	700	250	-
3	0,4	100	650	250	-
4	0,6	150	600	250	-
5	0,8	200	550	250	-
6	1,0	250	500	250	-

Fonte: O Autor (2020)

As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm. Para calibrar o espectrofotômetro, foi necessário realizar uma leitura com um branco, substituindo o volume da amostra por água destilada na reação de DNS. A partir dos dados de absorbância, foi possível obter a equação de uma reta utilizando o *software Excel*, o que permitiu calcular as concentrações de AR e ART em g/L.

3.7.4 Determinação da Concentração de Etanol

A concentração de etanol das amostras dos testes de fermentação (1º, 2º e 3º testes) foi determinada por espectrofotometria através de oxidação com dicromato de potássio. Esse método baseia-se na oxidação de uma mistura hidroalcóolica a ácido acético, pela reação com dicromato de potássio em meio ácido. A solução adquire tonalidade verde proporcional à concentração de etanol na amostra, possibilitando a leitura a 600 nm (Steckelberg, 2001).

3.7.4.1 Preparo da Solução de Dicromato de Potássio

Para preparar 1 L de solução, foram transferidos 33,678 g de dicromato de potássio para um erlenmeyer de 2 L contendo 500 mL de água destilada. Em seguida, o conjunto foi colocado em banho de água gelada e adicionados lentamente 325 mL de H₂SO₄ concentrado. A solução resultante foi transferida para um balão de 1 L e o volume foi completado com água destilada. A solução foi armazenada em frasco de vidro de tonalidade escura.

3.7.4.2 Procedimento Analítico

Para a utilização deste método, foi necessária a destilação prévia das amostras. Foram destilados 10 mL de amostra, recolhendo o destilado em erlenmeyer com 20mL água destilada e em banho de gelo. Após a destilação, o volume do erlenmeyer foi transferido para balão volumétrico de 100 mL e completado com água destilada.

A reação com o dicromato foi realizada adicionando 2 mL do destilado e 2 mL de solução de dicromato em um tubo de ensaio com tampa. O tubo foi levado para banho-maria a 60 °C por 30 minutos. Em seguida, o tubo foi resfriado e a leitura foi feita em espectrofotômetro a 600 nm. O branco foi feito substituindo a amostra por água destilada. Os valores de absorbância obtidos foram convertidos em concentração de etanol, em g/L, utilizando uma curva padrão.

3.7.4.3 Curva Padrão de Dicromato de Potássio

A curva padrão de dicromato foi obtida através da leitura de absorbância de amostras de etanol com concentrações conhecidas (10, 20, 40, 60, 80 e 100 g/L). Para preparar soluções de concentrações conhecidas, foi pesada uma massa de etanol em um balão volumétrico com 5 mL de água destilada e ajustada a concentração para g/L. Foram preparadas soluções nas concentrações de 10 a 100 g/L, utilizando balão de 25 mL, conforme a Tabela 8.

Tabela 8 – Preparo das soluções para construção da curva padrão de etanol

Concentração Desejada (g/L)	Massa Etanol (g/25 mL)	Massa Etanol Corrigida (massa etanol * fator^a)	Concentração Etanol (g/L)
10	0,25	0,2318	9,27
20	0,55	0,5099	20,39
40	1,10	1,0197	40,79
60	1,60	1,4832	59,33
80	2,15	1,9931	79,72
100	2,70	2,5029	100,12

Fonte: O Autor (2020).

^a Fator de correção da massa de etanol (0,927).

Após o preparo das amostras de concentrações padrão, os dados foram tabulados no *software Excel* e utilizados para gerar um gráfico, a partir do qual foi obtida a equação da reta para a curva padrão.

Para análise das amostras das fermentações finais, foi utilizada a cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID), conforme metodologia descrita na seção 3.8.

3.7.5 Análises Microbiológicas

3.7.5.1 Determinação Espectrofotométrica da Massa Celular

A concentração celular foi determinada por espectrofotometria. Após as amostras serem diluídas na proporção 1:50, as leituras de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 600 nm. O valor de absorbância foi então convertido em concentração de massa celular, em g/L, utilizando uma curva padrão que relaciona a absorbância com a concentração celular em termos de massa seca.

Para a construção da curva de peso seco, amostras de 10 mL foram coletadas durante a fase exponencial de crescimento celular em ensaios preliminares. Essas amostras foram centrifugadas e posteriormente secadas em estufa até atingirem peso constante. Foram preparadas amostras de concentração celular conhecidas e, a partir das leituras de absorbância dessas amostras, foram construídas as curvas de peso seco, estabelecendo a relação entre a absorbância e a concentração celular em g/L.

3.7.5.2 Viabilidade Celular, Brotamento e Razão de Infecção

A viabilidade celular, brotamento e razão de infecção foram estimados por microscopia óptica, utilizando uma objetiva de 40x e coloração celular com uma solução de azul de metileno a 0,01%. A contagem foi realizada com o auxílio de uma câmara *Neubauer*. Este método consiste em misturar a amostra devidamente diluída com a solução corante. As células viáveis permanecem incolores, enquanto as células inviáveis ou mortas são coradas.

A viabilidade celular, em %, foi calculada utilizando a seguinte expressão:

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células vivas}}{\text{n}^\circ \text{ total de células}} \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

O brotamento, em %, foi calculada pela seguinte expressão:

$$\text{Brotamento (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células vivas em brotamento}}{\text{n}^\circ \text{ de células vivas}} \times 100 \quad (\text{Equação 8})$$

A razão de infecção, em %, foi calculada pela seguinte expressão:

$$\text{Razão de Infecção (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de bastonetes vivos}}{\text{n}^\circ \text{ de células vivas}} \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

3.8 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

As análises cromatográficas das amostras dos experimentos finais foram realizadas no laboratório de Química Analítica da Coordenadoria de Química do Instituto Federal de Alagoas – Campos Maceió, equipado com um HPLC e um CG-FID.

As concentrações de açúcares redutores totais (ART) foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em um cromatógrafo SHIMADZU LC-20AT, equipado com detector de índice de refração (RID) e uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm). As temperaturas do forno e do detector foram mantidas em 65 °C e 50 °C, respectivamente. Uma solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 5 mM foi utilizada como fase móvel na vazão de 0,6 mL/min. e o volume de injeção da amostra foi de 25 µL.

As concentrações de etanol, álcool isoamílico (A) e isobutanol (B) foram determinadas por cromatografia gasosa (GC) utilizando um cromatógrafo SHIMADZU QP2010S, equipado com detector de ionização de chama (FID). Foi utilizada uma coluna Sh-Rtx-2330 (Restek), com 30 m de comprimento, diâmetro interno de 0,32 mm e 0,20 µm de filme. O gás de arraste (N₂/ar) foi mantido a uma vazão de 1,30 mL/min., e o volume de injeção foi de 1 µL, utilizando um sistema de injeção "*split*" na razão de 1:50. O programa de temperatura utilizado foi: 50 °C por 2 min., uma rampa de aquecimento de 50 °C a 190 °C a uma taxa de 10 °C/min., seguido de uma manutenção a 190 °C por 5 min., e uma segunda rampa de aquecimento de 190 °C a 230 °C a uma taxa de 20 °C/min., mantendo a temperatura final por 7 min. A temperatura do injetor e do detector foi mantida a 250 °C.

3.9 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi empregado um planejamento fatorial 2^3 (total de 8 experimentos) tendo as seguintes variáveis independentes: pH, suplementação do mosto com sulfato de amônio e refrigeração da dorna, e como variáveis dependentes: eficiência de fermentação (n_f , em %), eficiência de processo (n_p , em %), produtividade em etanol (PE, em g/L.h), fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$, em g células/g ATR), álcool isoamílico produzido (A, em g/L), isobutanol produzido (B, em g/L) e razão A/B. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em ordem aleatória.

Os dados obtidos para álcool isoamílico produzido (A, em g/L), isobutanol produzido (B, em g/L) e razão A/B, foram ajustados ao polinômio da Equação 10, onde Y representa a variável resposta, β_i e β_{ij} são os coeficientes de regressão, e PH, R e S são as variáveis independentes pH, refrigeração e suplementação, respectivamente.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 PH + \beta_2 R + \beta_3 S + \beta_{1,2} PH * R + \beta_{1,3} PH * S + \beta_{2,3} R * S + \beta_{1,2,3} PH * R * S \quad (\text{Equação 10})$$

A Tabela 9 apresenta os níveis reais e codificados das variáveis independentes utilizadas no delineamento experimental.

Tabela 9 – Níveis reais e codificados das variáveis independentes utilizadas no delineamento experimental

Variáveis Independentes	Níveis	
	-1	1
pH	3,5	5,0
Suplementação (g/L)	0,0	1,0
Refrigeração	sem	com

Fonte: O Autor (2022).

Para a análise estatística dos dados, foram empregados a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para a comparação entre as médias. O nível de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 TESTES DE ATIVAÇÃO DO FERMENTO

Para avaliar a eficácia do método de ativação e adaptação do fermento, realizou-se um teste inicial adicionando 1,5 g de fermento em erlenmeyer com 25 mL de mosto de melaço a 5 °Brix, sem suplementação, e deixando em estufa a 32°C por 10 horas. Após esse período, realizou-se a contagem em câmara Neubauer, resultando nos dados apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 – Análise microbiológica do fermento ativado no teste inicial de ativação do fermento

Concentração celular	8,05 x 10 ⁸ cél./mL
Viabilidade celular	77,8%
Brotamento	1,9%
Razão de infecção	1,2%

Fonte: O Autor (2022).

O brotamento e a concentração celular ficaram abaixo das praticadas pelas usinas (10 a 30%, e 1x10⁹ a 1,8x10⁹ cél./mL, respectivamente), provavelmente devido à falta de suplementação, enquanto a viabilidade e a razão de infecção se mostraram adequadas.

Após a ativação do fermento, o mesmo foi alimentado com o mosto de melaço a 25°Brix (75mL por 25 min) e fez-se o acompanhamento da fermentação até Brix constante (Tabela 11).

Tabela 11 – Acompanhamento da fermentação com o fermento ativado no teste inicial de ativação do fermento

Tempo de Fermentação	Brix
0h	19,0
1h	17,7
2h	16,9
4h	13,0
5h	11,5
6h	10,1
7h	9,0
8h	8,8

Fonte: O Autor (2022).

Após 8h de fermentação verificou-se a estagnação do Brix, evidenciando que a fermentação ocorreu em um tempo similar ao praticado nas usinas.

Procurando aumentar a concentração celular do inóculo (fermento ativado), foram realizados novos testes variando a massa de fermento seco (1,5 g e 2,0 g) e utilizando suplementação com sulfato de amônio nas concentrações de 1,0 g/L e 2,0 g/L. Assim, foram realizados mais quatro experimentos, resultando nos dados apresentados na Tabela 12.

Os resultados demonstraram que a ativação do fermento na condição C1, com 2,0 g de fermento seco para 25 mL de mosto a 5° Brix e suplementação de 1,0 g/L de sulfato de amônio, foi a única condição que resultou em uma concentração celular dentro da faixa praticada pelas usinas (1×10^9 a $1,8 \times 10^9$ cél./mL). Nas demais condições, mesmo com o aumento da suplementação de sulfato de amônio de 1,0 g/L para 2,0 g/L, as concentrações ficaram abaixo desse intervalo. Além disso, observou-se que a condição C1 também resultou em aumento na viabilidade celular e no brotamento.

O acompanhamento dos testes de ativação do fermento (Tabela 13) mostrou que o Brix não teve alteração em torno de 1,5 a 2,0 h após a adição do fermento seco ao mosto, indicando que esse pode ser o momento ideal para iniciar a alimentação do mosto ao inóculo, durante os experimentos fermentativos subsequentes.

Tabela 12 – Estudo da ativação do fermento variando a massa de fermento seco e suplementação com sulfato de amônio

Início da Ativação (0h)				
Condição de Ativação do Fermento	Concentração Celular (cél./mL)	Viabilidade Celular (%)	Brotamento (%)	Razão de Infecção (%)
C1 2,0 g de fermento para 25 mL de mosto a 5 °Brix, suplementado com sulfato de amônio (1 g/L)	9,40x10 ⁸	76,5	0,8	0,4
C2 1,5 g de fermento para 25 mL de mosto a 5 °Brix, suplementado com sulfato de amônio (1 g/L)	7,00x10 ⁸	85,4	0,0	0,0
C3 2,0 g de fermento para 25 mL de mosto a 5 °Brix, suplementado com sulfato de amônio (2 g/L)	9,50x10 ⁸	78,6	0,9	0,9
C4 1,5 g de fermento para 25 mL de mosto a 5 °Brix, suplementado com sulfato de amônio (2 g/L)	7,60x10 ⁸	74,9	0,0	0,0 %
Final da Ativação (2,5 h)				
Condição de Ativação do Fermento	Concentração Celular (cél./mL)	Viabilidade Celular (%)	Brotamento (%)	Razão de Infecção (%)
C1 2,0 g de fermento para 25 mL de mosto a 5 °Brix, suplementado com sulfato de amônio (1 g/L)	1,29x10 ⁹	87,2	2,4	0,5
C2 1,5 g de fermento para 25 mL de mosto a 5 °Brix, suplementado com sulfato de amônio (1 g/L)	9,55x10 ⁸	75,8	0,0	0,0
C3 2,0 g de fermento para 25 mL de mosto a 5 °Brix, suplementado com sulfato de amônio (2 g/L)	9,55x10 ⁸	78,4	2,6	1,1
C4 1,5 g de fermento para 25 mL de mosto a 5 °Brix, suplementado com sulfato de amônio (2 g/L)	9,45x10 ⁸	95,0	0,5	0,0

Fonte: O Autor (2022).

Tabela 13 – Acompanhamento dos testes de ativação do fermento comercial

Condição de Ativação do Fermento	C1	C2	C3	C4
Tempo	°Brix	°Brix	°Brix	°Brix
0,0 h	5,7	6,4	6,2	5,8
0,5 h	4,0	4,4	4,2	3,9
1,0 h	3,9	3,7	3,3	3,4
1,5 h	3,9	3,7	3,1	3,0
2,0 h	3,9	3,7	3,3	3,2
2,5 h	3,7	3,7	3,4	3,3
3,0 h	3,4	3,7	3,4	3,3

Fonte: O Autor (2022).

C1: 2,0 g de fermento para 25 mL de mosto a 5° Brix, suplementado com sulfato de amônio (1 g/L); **C2:** 1,5 g de fermento para 25 mL de mosto a 5° Brix, suplementado com sulfato de amônio (1 g/L); **C3:** 2,0 g de fermento para 25 mL de mosto a 5° Brix, suplementado com sulfato de amônio (2 g/L); **C4:** 1,5 g de fermento para 25 mL de mosto a 5° Brix, suplementado com sulfato de amônio (2 g/L).

Considerando a melhor condição de ativação do fermento (C1), ficou definida uma inoculação do mosto de modo a se obter uma concentração de 20 g/L de fermento comercial seco na dorna de fermentação, nos experimentos subsequentes. Assim, o inóculo foi ativado suspendendo 800 g de *Saccharomyces cerevisiae* comercial seca (*Fleischmann*) em 10 L de mosto de melaço a 5 °Brix e suplementado com 1,0 g/L de sulfato de amônio. Esse procedimento resultou em inóculo com células suficientes para fornecer uma concentração entre 10^8 e 10^9 cél./mL, com viabilidade celular superior a 85%. Posteriormente o inóculo foi alimentado com 30 L de mosto.

4.2 1º TESTE DE FERMENTAÇÃO COM FERMENTO COMERCIAL

Durante o 1º teste de fermentação, foi observado um consumo muito baixo de açúcar no mosto ao longo das 20 horas de fermentação em todas as dornas, como indicado pela pequena variação no °Brix (Tabela 14). Esse fato pode ser atribuído a diversas possibilidades, como a inibição do fermento devido à alta concentração inicial de açúcar ou a problemas durante a multiplicação do fermento comercial para preparo do inóculo.

Tabela 14 – Variação do °Brix das fermentações no 1º Teste de fermentação com fermento comercial

Condição	°Brix inicial	°Brix final	Δ°Brix
C1FC	22	19,16	2,84
C2FC	14	11,93	2,07
C3FC	14	12,43	1,57
C4FC	22	17,33	4,67

Fonte: O Autor (2020).

C1FC: 22 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C2FC:** 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial; **C3FC:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C4FC:** 22 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial.

A rápida adição de todo o mosto ao fermento em batelada simples pode ter contribuído para a inibição inicial do fermento. Além disso, a observação microscópica de uma amostra de mosto fermentado revelou um elevado número de células mortas, sugerindo possíveis falhas durante o preparo do inóculo.

Os ensaios realizados com o fermento comercial propagado de acordo com o método utilizado no 1º teste não apresentaram resultados satisfatórios. No entanto, esses resultados indicam a necessidade de ajustes na operação da microdestilaria e nas metodologias de preparo do inóculo a partir do fermento comercial, visando melhorar a eficiência e a confiabilidade dos experimentos.

4.3 2º TESTE DE FERMENTAÇÃO COM FERMENTO INDUSTRIAL

No 2º teste de fermentação, observou-se uma redução significativa no °Brix ao longo do tempo em todas as condições testadas, indicando um consumo efetivo de açúcar pelas leveduras (Tabela 15). Além disso, constatou-se que houve pouca variação no pH durante as fermentações, sugerindo ausência de infecção bacteriana (Tabela 15).

Tabela 15 – Variação do °Brix e do pH das fermentações no 2º Teste de fermentação com fermento industrial

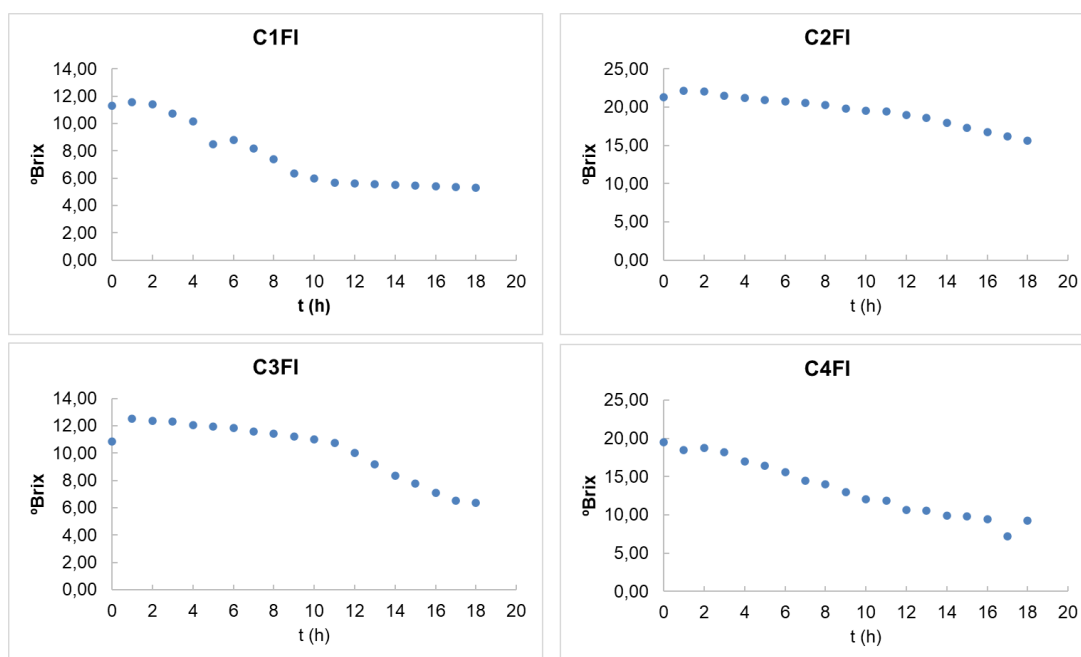
Condição	°Brix inicial	°Brix final	Δ °Brix	pH inicial	pH final
C1FI	14	5,31	8,69	4,5	4,2
C2FI	25	15,63	9,37	4,8	4,4
C3FI	14	6,36	7,64	4,8	4,1
C4FI	25	9,20	15,8	4,4	4,3

Fonte: O Autor (2020).

C1FI: 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial; **C2FI:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C3FI:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C4FI:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial.

A Figura 8 apresenta os perfis de consumo de açúcar ao longo do tempo para as diferentes condições do 2º teste. É possível observar que o decaimento do °Brix ao longo da fermentação é característico dos processos fermentativos, destacando a atuação das leveduras na conversão dos açúcares em álcool.

Figura 8 – Consumo de açúcar (°Brix) com o tempo de fermentação para as quatro diferentes condições do 2º Teste de fermentação com fermento industrial



Fonte: O Autor (2020).

C1FI: 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial; **C2FI:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C3FI:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C4FI:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial.

A condição C1FI, caracterizada por uma alta concentração de fermento industrial e baixa concentração de açúcar no mosto, demonstrou um rápido decaimento no °Brix desde as primeiras horas de fermentação. Isso sugere que, nessas condições, as leveduras não foram inibidas pela concentração de substrato e exigiram menos tempo de adaptação ao meio fermentativo.

Por outro lado, a condição C2FI, com alta concentração de açúcar e baixa concentração de fermento, apresentou um decaimento menos pronunciado no °Brix durante as primeiras horas de fermentação, indicando uma possível inibição inicial das leveduras pela alta concentração de substrato. Após cerca de 11 horas de fermentação, o decaimento no °Brix tornou-se mais intenso (Figura 8).

Similarmente, a condição C3FI também mostrou um decaimento mais acentuado no °Brix após aproximadamente 11 horas de fermentação, indicando uma adaptação mais tardia das leveduras ao meio fermentativo em comparação com a condição C2FI (Figura 8).

Por fim, a condição C4FI, apesar da alta concentração de substrato, apresentou um baixo tempo de adaptação das leveduras ao meio fermentativo. Isso pode ser atribuído à maior concentração de fermento utilizada nessa condição em comparação com a C1FI (Figura 8).

Os resultados do 2º teste destacaram a importância das condições de fermentação, tanto em relação à concentração de açúcar quanto à de fermento, além da qualidade do inóculo, para o bom desempenho do processo fermentativo, apontando para a necessidade de novos experimentos para avaliar as melhores condições de fermentação na microdestilaria e aprimorar a produção de etanol.

4.4 3º TESTE - AVALIAÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO NA MICRODESTILARIA

A Tabela 16 mostra a variação da concentração de açúcar para cada condição e tipo de fermento nos experimentos conduzidos no 3º teste de fermentação com fermento comercial e industrial.

Tabela 16 – Variação da concentração de sólidos totais dissolvidos (°Brix) nos ensaios realizados no 3º teste de fermentação com fermento comercial e industrial

Condição	Concentração de Açúcar (°Brix)		
	°Brix inicial	°Brix final	Δ °Brix
C1FI	14	5,08	8,92
C1FC	14	10,9	3,10
C2FI	25	13,27	11,73
C2FC	25	22,1	2,90
C3FI	14	5,56	8,44
C3FC	14	12,1	1,90
C4FI	25	8,94	16,06
C4FC	25	17,4	7,60

Fonte: O Autor (2020).

C1FI: 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial; **C2FI:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C3FI:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C4FI:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial. **C1FC:** 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial; **C2FC:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C3FC:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C4FC:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial.

A quantidade de açúcar consumido (Δ °Brix) pode ser analisada de duas formas: comparação entre os tipos de fermento e entre as quatro condições. Quanto aos tipos de fermento, percebe-se que em todas as condições o uso do fermento industrial assegurou o maior consumo de substrato. Ao verificar em qual condição esse consumo foi maior, constata-se que a condição C4FI apresentou o melhor resultado (Tabela 16).

O melhor desempenho do fermento industrial pode ser justificado por se tratar de uma levedura que já estava sendo utilizada nas fermentações da usina da região de Penedo/AL e, portanto, já estava adaptada ao meio de fermentação utilizado (mosto de melaço), além de ser um fermento tratado e suplementado com nutrientes pela usina. Já o fermento comercial foi multiplicado sem suplementação nutricional.

Na Tabela 17, são apresentadas as análises microbiológicas dos fermentos utilizados nos experimentos. A maior viabilidade celular e o baixo índice de infecção do fermento industrial corroboram as observações anteriores. Steckelberg (2001) destaca que a viabilidade celular é um aspecto importante no controle da fermentação alcoólica, influenciando diretamente o desempenho do processo fermentativo.

Tabela 17 – Análises microbiológicas dos fermentos utilizados

Tipo de Fermento	Viabilidade (%)	Brotamento (%)	Razão de Infecção (%)
Fermento Comercial	86,50	12,43	2,4
Fermento Industrial	93,85	5,74	0,82

Fonte: O Autor (2020).

Na Tabela 18 verifica-se a concentração de açúcares redutores totais (ART) nas condições pesquisadas.

Tabela 18 – Concentração de açúcares redutores totais (ART), em g/L, nos ensaios realizados no 3º teste

Condição	ART (g/L)		
	Inicial	Final	ΔS
C1FI	108,28	7,03	101,25
C1FC	108,28	21,57	86,70
C2FI	198,24	19,94	178,31
C2FC	198,24	45,48	152,76
C3FI	108,28	10,70	97,58
C3FC	108,28	19,82	88,45
C4FI	198,24	13,99	184,26
C4FC	198,24	32,65	165,59

Fonte: O Autor (2020).

C1FI: 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial; **C2FI:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C3FI:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C4FI:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial. **C1FC:** 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial; **C2FC:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C3FC:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C4FC:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial; **ART:** açúcares redutores totais; **ΔS :** açúcar consumido.

A análise de açúcar consumido (ΔS), em g/L, revelou que o fermento industrial possibilita um consumo maior de substrato, em comparação com o fermento comercial, fato evidenciado pela análise de Brix (Tabela 16). Entre as quatro condições testadas, o destaque é para a C4 com uma concentração inicial de açúcar de 198,24 g/L e 25% de fermento (Tabela 18).

Os resultados das determinações do teor de etanol, em g/L, estão apresentados na Tabela 19. Mais uma vez, destaca-se o desempenho superior do

fermento industrial, evidenciado pelos valores mais elevados de etanol produzido (ΔE) em todas as condições analisadas. Notavelmente, a condição C2FI (25 °Brix e 15% de fermento industrial) apresentou o maior teor de etanol, com 72,97 g/L.

Tabela 19 – Concentração de etanol, em g/L, nos ensaios realizados no 3º teste

Condição	ETANOL (g/L)		
	Inicial	Final	ΔE
C1FI	13,56	50,96	37,40
C1FC	5,93	32,34	26,41
C2FI	8,14	81,11	72,97
C2FC	3,56	37,90	34,34
C3FI	8,14	47,10	38,96
C3FC	3,56	33,23	29,68
C4FI	13,56	82,13	68,57
C4FC	5,93	59,79	53,87

Fonte: O Autor (2020).

C1FI: 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial; **C2FI:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C3FI:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C4FI:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial. **C1FC:** 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial; **C2FC:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C3FC:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C4FC:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial; ΔE : etanol produzido.

Além das análises mencionadas, também foi determinada a massa celular inicial e final de todos os experimentos por espectrofotometria, a partir de uma curva de peso seco. Os resultados estão apresentados na Tabela 20. Esses dados são cruciais para avaliar o comportamento do fermento durante a fermentação, especialmente para verificar a taxa de crescimento da população de leveduras. Para o fermento industrial, a condição que favoreceu o crescimento celular foi a C1FI, com 14 °Brix de concentração de substrato e 25% de fermento. Já para o fermento comercial, a condição que promoveu seu crescimento celular foi a C4FC, que apresentava 25 °Brix de concentração de açúcar e 25% de fermento.

Tabela 20 – Massa celular, em g/L, nos ensaios realizados no 3º teste

Condição	Massa Celular (g/L)		
	Inicial	Final	ΔX
C1FI	6,03	18,05	12,02
C1FC	5,62	8,44	2,82
C2FI	3,62	12,55	8,93
C2FC	3,37	10,00	6,63
C3FI	3,62	9,55	5,93
C3FC	3,37	7,44	4,07
C4FI	6,03	12,03	5,99
C4FC	5,62	13,06	7,44

Fonte: O Autor (2020).

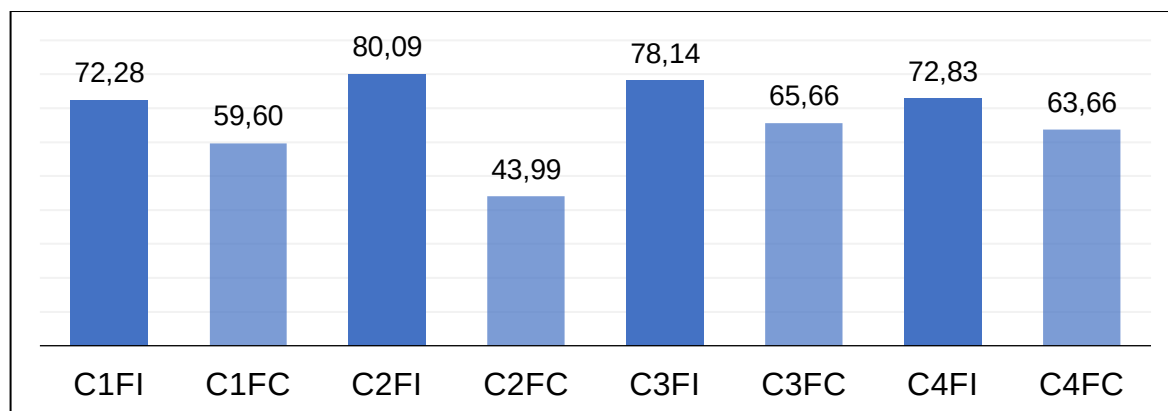
C1FI: 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial; **C2FI:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C3FI:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C4FI:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial. **C1FC:** 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial; **C2FC:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C3FC:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C4FC:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial; ΔX : massa celular formada.

A partir dos dados obtidos nas análises discutidas anteriormente, foi possível avaliar a eficiência de fermentação e de processo, bem como a produtividade em etanol de cada uma das condições pesquisadas.

De acordo com a Figura 9, o fermento industrial demonstrou melhor desempenho, especialmente na condição C2FI, na qual a eficiência de fermentação atingiu 80,09%. Essa eficiência foi calculada considerando apenas os açúcares efetivamente consumidos com base no rendimento teórico proveniente da Equação de Gay-Lussac (0,511 g etanol. 1g glicose⁻¹).

Cruz (2015) observa que, a partir da década de 70, com o início do Proálcool, as destilarias brasileiras alcançaram rendimentos fermentativos de 92-93%. A maior eficiência de fermentação obtida nos experimentos do 3º teste ainda é modesta, porém é válido considerar que para atingir uma eficiência nessa faixa, é necessário fazer suplementação nutricional do mosto, avaliar a viabilidade do fermento, controlar a contaminação bacteriana no processo e a qualidade da matéria-prima usada como substrato. Esses controles específicos não foram realizados nos primeiros experimentos na microdestilaria.

Figura 9 – Eficiência de fermentação n_f (%) dos ensaios realizados no 3º teste

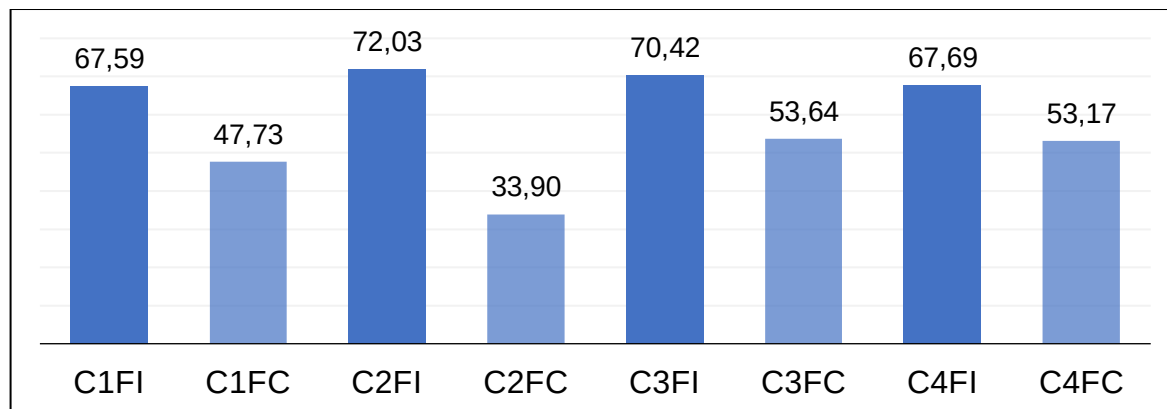


Fonte: O Autor (2020).

C1FI: 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial; **C2FI:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C3FI:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C4FI:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial. **C1FC:** 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial; **C2FC:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C3FC:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C4FC:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial.

A respeito da eficiência de processo, baseada na concentração inicial de açúcar adicionado, mais uma vez o fermento industrial demonstrou os melhores resultados em todas as condições. No entanto, a condição C2FI se destacou com uma eficiência de processo de 72,03% (Figura 10). Em um de seus experimentos, Cruz (2015) obteve uma eficiência de processo de 92,95%, superior à obtida neste trabalho, ao conduzir uma fermentação sob condições semelhantes: fermentação à 29 °C, 5 horas de enchimento do reator, concentração celular de 22,5 g/L e concentração de substrato de 180 g/L.

Figura 10 – Eficiência de processo $\eta_p(\%)$ dos ensaios realizados no 3º teste

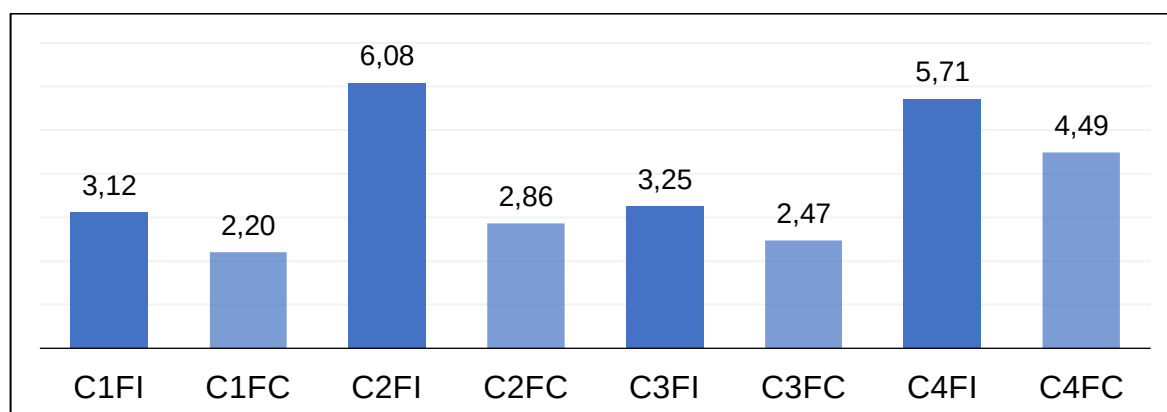


Fonte: O Autor (2020).

C1FI: 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial; **C2FI:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C3FI:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C4FI:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial. **C1FC:** 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial; **C2FC:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C3FC:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C4FC:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial.

O último parâmetro analisado foi a produtividade em relação ao etanol produzido por hora (Figura 11). Como já era esperado, o fermento industrial se destacou em todas as condições, porém foi na condição C2FI que ele alcançou a maior produtividade de 6,08 g_{etanol}/L.h. Cruz (2015) durante o mesmo experimento obteve uma produtividade de 8,55 g_{etanol}/L.h, superior à obtida neste trabalho.

Figura 11 – Produtividade em etanol (PE), em g/L.h, dos ensaios realizados no 3º teste



Fonte: O Autor (2020).

C1FI: 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial; **C2FI:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C3FI:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento industrial; **C4FI:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento industrial. **C1FC:** 14 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial; **C2FC:** 25 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C3FC:** 14 °Brix e 15% (v/v) de fermento comercial; **C4FC:** 25 °Brix e 25% (v/v) de fermento comercial.

Embora os resultados tenham demonstrado uma vantagem geral do fermento industrial ao longo dos testes realizados, optou-se por empregar exclusivamente o

fermento comercial nos experimentos finais. Essa decisão foi motivada pela necessidade de assegurar a padronização e a comparabilidade dos experimentos, aspectos fundamentais para uma análise precisa sobre a influência dos fatores pH, suplementação e refrigeração na produção de álcool isoamílico e isobutanol. Diante disso, a condição C4FC (25 °Brix e 25% de fermento comercial) foi identificada como a mais adequada para garantir o melhor desempenho dos experimentos finais com o fermento comercial.

4.5 EXPERIMENTOS FINAIS

4.5.1 Parâmetros de Desempenho do Processo Fermentativo

A avaliação da formação dos álcoois superiores deve ser realizada em condições de fermentação que proporcionem desempenhos comparáveis aos encontrados na indústria e na literatura científica. Assim, foram calculados alguns parâmetros que permitem avaliar o desempenho do processo fermentativo em relação ao microrganismo utilizado e ao produto de interesse das indústrias.

A Tabela 21 apresenta a análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial 2^3 para as respostas Y_{XS} , η_f , η_p e PE. Os resultados indicam que os tratamentos foram estatisticamente significativos ($F_{calc.} > F_{tab.}$), o que sugere a existência de diferenças significativas nas médias das condições de fermentação em relação a essas variáveis resposta. Os resultados indicam também que Y_{XS} apresentou uma falta de ajuste não significativa ($F_{calc.} < F_{tab.}$), significando que os dados se ajustaram adequadamente ao modelo proposto, ao contrário dos resultados obtidos para η_f , η_p e PE. Portanto, apenas as figuras geradas para Y_{XS} serão apresentadas.

Tabela 21 – ANOVA do planejamento fatorial para as respostas $Y_{X/S}$, η_f , η_p e PE

$Y_{X/S}$				
Fonte de variação	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Fcalc.	Ftab.
Tratamento	6	0,0205	68,33	3,34
Falta de ajuste	1	0,001	3,33	6,12
Erro	16	0,0003		
Total	23			
R^2	0,758			
η_f				
Fonte de variação	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Fcalc.	Ftab.
Tratamento	6	3291,30	112,64	3,34
Falta de ajuste	1	1056,69	36,16	6,12
Erro	16	29,22		
Total	23			
R^2	0,683			
η_p				
Fonte de variação	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Fcalc.	Ftab.
Tratamento	6	4532,78	178,31	3,34
Falta de ajuste	1	1414,57	55,65	6,12
Erro	16	25,42		
Total	23			
R^2	0,713			
PE				
Fonte de variação	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Fcalc.	Ftab.
Tratamento	6	10,060	71,86	3,34
Falta de ajuste	1	3,349	23,92	6,12
Erro	16	0,140		
Total	23			
R^2	0,643			

Fonte: O Autor (2023).

$Y_{X/S}$ ($g_{células}/g_{ATR}$): fator de conversão substrato em célula; η_f (%): eficiência de fermentação; η_p (%): eficiência de processo; PE ($g/L.h$): produtividade em etanol.

A Tabela 22 apresenta os efeitos sobre as respostas $Y_{X/S}$, η_f , η_p e PE.

Tabela 22 – Efeitos das variáveis independentes sobre as respostas $Y_{X/S}$, η_f , η_p e PE

Variáveis	$Y_{X/S}$		η_f		η_p		PE	
	Efeitos	valor-p	Efeitos	valor-p	Efeitos	valor-p	Efeitos	valor-p
Média	0,176	0,000	77,297	0,000	71,133	0,000	5,197	0,000
(1)pH(L)	0,029	0,001	2,870	1,300	7,224	0,003	0,174	0,272
(2)Sup. (L)	-0,008	0,312	12,551	0,000	11,757	0,000	0,265	0,102
(3)Ref. (L)	-0,009	0,221	5,064	0,036	5,232	0,022	0,104	0,504
1x2	-0,026	0,003	-3,297	0,155	1,172	0,577	0,412	0,016
1x3	0,036	0,000	-12,157	0,000	-15,262	0,000	-0,796	0,000
2x3	0,020	0,016	-14,089	0,000	-14,240	0,000	-0,873	0,000

Fonte: O Autor (2023).

$Y_{X/S}$ ($g_{células}/g_{ATR}$): fator de conversão substrato em célula; η_f (%): eficiência de fermentação; η_p (%): eficiência de processo; PE ($g/L.h$): Produtividade em etanol

As médias dos resultados obtidos nas diferentes condições de fermentação adotadas estão na Tabela 23.

Tabela 23 – Resultados do planejamento fatorial 2^3 para as respostas $Y_{X/S}$, η_f , η_p e PE

Condição de Fermentação	Variáveis Independentes						Resultados (média $\pm$ dp)			
	Valores Codificados			Valores Reais			$Y_{X/S}$ (g _{células} /g _{ATR})	η_f (%)	η_p (%)	PE (g/L.h)
	pH	Sup.	Ref.	pH	Sup. (g/L)	Ref.				
1	-1	-1	-1	3,5	0,0	sem	$0,21 \pm 0,02^a$	$45,65 \pm 5,19^c$	$35,68 \pm 3,30^d$	$3,92 \pm 0,14^d$
2	1	-1	-1	5,0	0,0	sem	$0,18 \pm 0,01^{a b}$	$77,24 \pm 2,49^{a b}$	$75,35 \pm 3,37^{a b c}$	$5,23 \pm 0,44^{b c}$
3	-1	1	-1	3,5	1,0	sem	$0,22 \pm 0,03^a$	$88,85 \pm 5,67^a$	$75,86 \pm 5,39^{a b}$	$5,40 \pm 0,43^{a b c}$
4	1	1	-1	5,0	1,0	sem	$0,11 \pm 0,00^c$	$87,31 \pm 5,10^a$	$87,17 \pm 5,06^a$	$6,03 \pm 0,09^{a b}$
5	-1	-1	1	3,5	0,0	com	$0,15 \pm 0,00^{b c}$	$90,23 \pm 5,93^a$	$88,77 \pm 5,77^a$	$6,44 \pm 0,16^a$
6	1	-1	1	5,0	0,0	com	$0,18 \pm 0,03^{a b}$	$70,97 \pm 7,32^b$	$61,21 \pm 6,26^c$	$4,66 \pm 0,51^{c d}$
7	-1	1	1	3,5	1,0	com	$0,18 \pm 0,01^{a b}$	$78,72 \pm 5,14^{a b}$	$69,76 \pm 5,04^{b c}$	$4,68 \pm 0,54^{c d}$
8	1	1	1	5,0	1,0	com	$0,17 \pm 0,03^{a b}$	$79,40 \pm 5,24^{a b}$	$75,25 \pm 5,34^{a b c}$	$5,21 \pm 0,37^{b c}$

Fonte: O Autor (2023).

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

 $Y_{X/S}$ (g_{células}/g_{ATR}): fator de conversão substrato em células; η_f (%): eficiência de fermentação; η_p (%): eficiência de processo; PE (g/L.h): produtividade em etanol.

Na Tabela 22 verifica-se que entre os efeitos principais, apenas o pH teve um efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) sobre o fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), consistente com estudos anteriores que relatam a influência do pH no metabolismo das leveduras e na absorção de nutrientes (Vidal *et al.*, 2013; Gutierrez, 1993). Ainda na Tabela 22 foram observadas interações significativas ($p < 0,05$) de segunda ordem entre pH e refrigeração (pH*Ref.), pH e suplementação (pH*Sup.) e entre suplementação e refrigeração (Sup.*Ref.) sobre essa mesma resposta, destacando a importância de considerar esses fatores em conjunto.

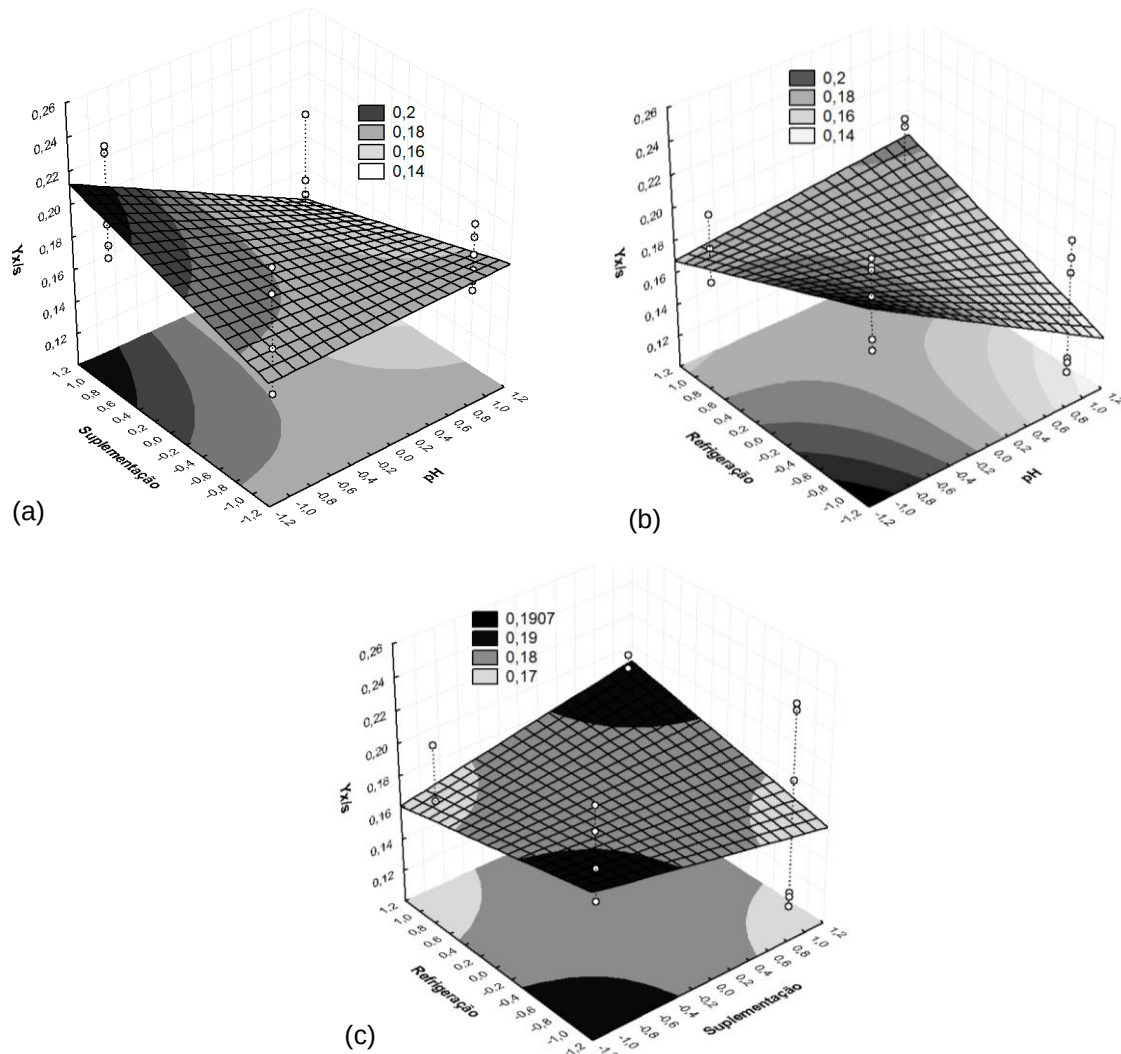
A superfície de resposta (Figura 12) ilustra como $Y_{X/S}$ é afetado por essas interações. Em níveis mais baixos de pH, o aumento na suplementação com sulfato de amônio melhorou $Y_{X/S}$ (Figura 12a), consistente com estudos que enfatizam o papel do pH na atividade enzimática associada à disponibilidade de nitrogênio para o crescimento celular (Liu *et al.*, 2017).

A Figura 12b revela que, na ausência de refrigeração, a conversão substrato-célula é otimizada em um nível baixo de pH. A refrigeração controla a temperatura da fermentação, mantendo a atividade enzimática e a viabilidade das leveduras em níveis ideais, otimizando o uso do substrato para a produção celular (Lainioti *et al.*, 2011).

A Figura 12c mostra que os maiores valores de $Y_{X/S}$ ocorrem com suplementação e com refrigeração, destacando a importância de equilibrar o suprimento de nutrientes e o controle de temperatura para maximizar o rendimento celular (Kłosowski *et al.*, 2015).

De forma geral, os resultados confirmam que a conversão substrato-célula é um processo multifatorial influenciado pelo controle de pH, suplementação de nutrientes e refrigeração, sendo crucial para a produtividade de biomassa em fermentações industriais.

Figura 12 – Superfície de resposta para o fator de conversão substrato em células ($Y_{X/S}$, em g células/g ATR) em função do pH e suplementação (a), pH e refrigeração (b) e suplementação e refrigeração (c)



Fonte: O Autor (2023).

Os valores de $Y_{X/S}$ obtidos (Tabela 23) estão alinhados com os relatados na literatura, indicando um crescimento eficaz das leveduras nas condições testadas (Colombi *et al.*, 2017; Pronk *et al.*, 1996). No entanto, na condição 4 (pH 5,0, com suplementação e com refrigeração), o $Y_{X/S}$ foi menor, possivelmente devido à priorização da produção de etanol pela levedura em detrimento do crescimento de biomassa, um fenômeno observado em fermentações com suplementação de nitrogênio (Pronk *et al.*, 1996).

Na literatura, os valores de $Y_{X/S}$ variam amplamente, de 0,03 a 0,28 g_{células}/g_{ATR} (Stroppa *et al.*, 2009; Alves, 1996), influenciados por diferenças nos materiais-prima, nas condições do processo e nas cepas de levedura. Em nossos experimentos, a condição 3 (pH 3,5, com suplementação e sem refrigeração) apresentou a maior produtividade de levedura ($0,22 \pm 0,03$ g_{células}/g_{ATR}), diferindo significativamente ($p < 0,05$) das condições 4 e 5.

Na Tabela 22, ao analisar os efeitos sobre a eficiência de fermentação (η_f), verifica-se que somente o efeito principal do pH e a interação de segunda ordem entre pH e suplementação (pH*Sup.) não tiveram efeito estatisticamente significativos para a eficiência de fermentação (η_f) ($p < 0,05$). Todos os outros fatores e interações foram significativos, indicando sua influência sobre η_f .

Para a eficiência de processo (η_p), a única interação que não foi significativa foi pH*Sup. (Tabela 22). Todos os outros efeitos principais e interações foram significativos ($p < 0,05$), indicando uma influência substancial no desempenho do processo. Esses resultados mostram que os fatores devem ser avaliados em conjunto, pois a resposta obtida ao variar um fator depende dos níveis dos outros.

De acordo com a Tabela 23, a condição de fermentação 1 (pH 3,5, sem suplementação, sem refrigeração) apresentou desempenho inferior em comparação com as outras condições, pois a eficiência de fermentação (η_f), a eficiência de processo (η_p) e a produtividade em etanol (PE) foram baixas. Por outro lado, as condições de fermentação 3, 4 e 5 apresentaram melhor desempenho, com a condição 5 (pH 3,5, sem suplementação, com refrigeração) alcançando o melhor desempenho geral do processo. Isso sugere que a combinação de fatores favorece tanto a fermentação quanto o processo produtivo de etanol.

A eficiência de fermentação variou de $45,65 \pm 5,19\%$ a $90,23 \pm 5,93\%$, com a condição 5 (pH 3,5, sem suplementação, com refrigeração) apresentando os melhores resultados. Isso é esperado, pois a refrigeração controla aumentos de temperatura que poderiam prejudicar a atividade das leveduras (Lima *et al.*, 2001). A literatura sugere que eficiências de fermentação acima de 90% são comuns quando as variáveis-chave estão bem controladas (Colombi *et al.*, 2017).

De forma semelhante, a eficiência de processo (η_p) também foi influenciada pelas condições de fermentação, atingindo valores de até $88,77 \pm 5,77\%$, consistentes com Gutiérrez (1993), que observou altas eficiências em fermentações com melaço de cana.

A produtividade em etanol (PE) foi significativamente afetada pelas interações de segunda ordem entre suplementação e refrigeração (Sup.*Ref.), pH e refrigeração (pH*Ref.), e pela interação (pH*Sup.), conforme apresentado na Tabela 22. Essas interações destacam a complexidade do processo de fermentação, onde os efeitos de uma variável dependem dos níveis das outras.

A maior produtividade em etanol foi observada em condições de pH baixo, sem suplementação e com refrigeração (condição 5), atingindo $6,44 \pm 0,16$ g/L·h (Tabela 23). Esse resultado pode ser atribuído a um melhor controle térmico, que previne a inibição das leveduras causada por altas temperaturas, conforme observado em estudos anteriores (Oliveira *et al.*, 1996). Os valores reportados neste estudo são consistentes com os encontrados por Cabral (2020), que observou produtividade variando de 4,27 a 6,03 g/L·h em fermentações de melaço.

A análise dos dados apresentados na Tabela 23 sugere consistência com os resultados descritos na literatura científica (Tabela 24). Além disso, os dados indicam que as condições de fermentação 3, 4 e 5 foram apropriadas, resultando em um desempenho satisfatório do processo de fermentação.

As diferenças nos resultados reportados na literatura (Tabela 24) se devem às diferentes condições adotadas pelos autores, incluindo a composição do mosto, tempo de fermentação e linhagem de levedura utilizada.

Tabela 24 – Parâmetros de desempenho do processo fermentativo reportados na literatura

Referência	Meio de Fermentação	Microrganismo	Temperatura	Tempo de Fermentação	n_f (%)	n_p (%)	PE (g/L.h)
Santos (2021)	Mosto sintético de açúcar de cana (160 g/L de açúcares)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1	30°C	72h	90,20	nr	nr
Cabral (2020)	Mosto de melaço não esterilizado (26°Brix)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1	30°C	24h	79,88	nr	4,27
Cruz <i>et al.</i> (2021)	Mosto de melaço + caldo de cana (270 g/L de açúcares)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y-904	32°C	24h	nr	92,80	4,27
Brandão <i>et al.</i> (2020)	Mosto sintético (250 g/L de açúcares)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> flocculante	28°C	12h	nr	82,58	9,6
Cerqueira (2013)	Mosto de caldo de cana estéril (25°Brix)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CAT-1	30°C	24h	92,73	nr	4,69

Fonte: O Autor (2023).

nr: não reportado.

 n_f (%): eficiência de fermentação; n_p (%): eficiência de processo; PE (g/L.h): produtividade em etanol.

4.5.2 Produção de Álcool Isoamílico e Isobutanol

A Tabela 25 apresenta a análise de variância (ANOVA) do planejamento fatorial 2^3 para as respostas produção de álcool isoamílico (A), produção de isobutanol (B) e razão A/B entre esses álcoois. Os resultados indicam que os tratamentos foram estatisticamente significativos ($F_{\text{calc.}} > F_{\text{tab.}}$), o que sugere a existência de diferenças significativas nas médias das condições de fermentação em relação a essas variáveis resposta. Os resultados indicam também que A e B apresentaram uma falta de ajuste não significativa ($F_{\text{calc.}} < F_{\text{tab.}}$), significando que os dados se ajustaram adequadamente ao modelo proposto, ao contrário dos resultados obtidos para a Razão A/B. Portanto, apenas as figuras geradas para A e B serão apresentadas.

Tabela 25 – ANOVA do planejamento fatorial para as respostas A, B e A/B

Álcool isoamílico (A) (g/L)				
Fonte de variação	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F _{calc.}	F _{tab.}
Tratamento	6	0,149	49,67	3,34
Falta de ajuste	1	0,000	0,000	6,12
Erro	16	0,003		
Total	23			
R ²	0,732			
Isobutanol (B) (g/L)				
Fonte de variação	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F _{calc.}	F _{tab.}
Tratamento	6	0,062	62	3,34
Falta de ajuste	1	0,001	1	6,12
Erro	16	0,001		
Total	23			
R ²	0,792			
Razão A/B				
Fonte de variação	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F _{calc.}	F _{tab.}
Tratamento	6	0,834	278	3,34
Falta de ajuste	1	0,145	48,33	6,12
Erro	16	0,003		
Total	23			
R ²	0,816			

Fonte: O Autor (2023).

A (g/L): produção de álcool isoamílico; B (g/L): produção de isobutanol; A/B: razão entre o álcool isoamílico e o isobutanol.

A Tabela 26 apresenta os efeitos sobre as respostas A, B e A/B.

Tabela 26 – Efeitos das variáveis independentes sobre as respostas A, B e A/B

Variáveis	A		B		A/B	
	Efeitos	valor-p	Efeitos	valor-p	Efeitos	valor-p
Média	0,254	0,000	0,138	0,000	1,883	0,000
(1)pH(L)	0,044	0,086	0,047	0,002	-0,296	0,000
(2)Sup. (L)	0,098	0,001	0,055	0,000	0,015	0,483
(3)Ref. (L)	-0,039	0,119	-0,037	0,008	0,191	0,000
1x2	0,032	0,199	0,019	0,150	0,055	0,020
1x3	-0,085	0,003	-0,044	0,003	-0,105	0,000
2x3	-0,062	0,020	-0,039	0,006	0,023	0,295

Fonte: O Autor (2023).

A (g/L): produção de álcool isoamílico; B (g/L): produção de isobutanol; A/B: razão entre o álcool isoamílico e o isobutanol.

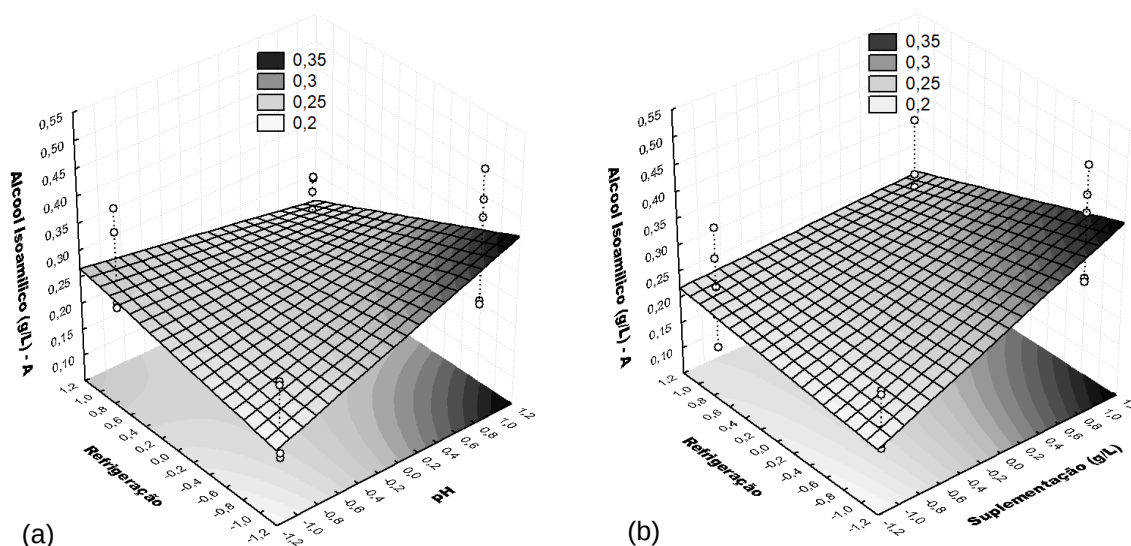
Na Tabela 26 pode-se observar que entre os efeitos principais, apenas a suplementação teve efeito significativo ($p < 0,05$) sobre A, porém os efeitos de interação de segunda ordem pH*Ref. e Sup.*Ref. também foram significativos ($p < 0,05$). Portanto, os fatores devem ser avaliados conjuntamente, pois a resposta obtida ao variar um fator depende dos níveis dos outros fatores.

A equação 11 representa o modelo de regressão para a produção de álcool isoamílico. Os gráficos correspondentes são apresentados nas Figuras. 13a e b.

$$\text{ISOAM. (A)} = 0,2548 + 0,0488 \text{ Sup.} - 0,0424 \text{ pH*Ref.} - 0,0310 \text{ Sup.*Ref.}$$

(Equação 11)

Figura 13 – Superfície de resposta para o álcool isoamílico (A, em g/L) em função do pH e refrigeração (a) e suplementação e refrigeração (b)



Fonte: O Autor (2023).

As interações pH*Ref. e Sup.*Ref. (Figuras 13a e b) mostram que, nas fermentações sem refrigeração, o aumento no pH e suplementação do mosto levou a uma maior produção de álcool isoamílico (A). Em contrapartida, uma diminuição no pH e na suplementação do mosto, mantendo-se sem refrigeração, resultou em uma menor produção de álcool isoamílico (A).

Para a interação Sup.*Ref. (Figura 13b), a suplementação do mosto aumentou a produção de álcool isoamílico (A) em ambas as condições de refrigeração, confirmando o efeito significativo da suplementação (Tabela 26).

Os efeitos significativos sobre a produção de isobutanol (B) podem ser visualizados na Tabela 26. Os efeitos principais pH, Suplementação e Refrigeração, foram significativos ($p < 0,05$), assim como os efeitos de interação de segunda ordem pH*Ref. e Sup.*Ref. Portanto, esses fatores devem ser avaliados em conjunto para uma compreensão abrangente.

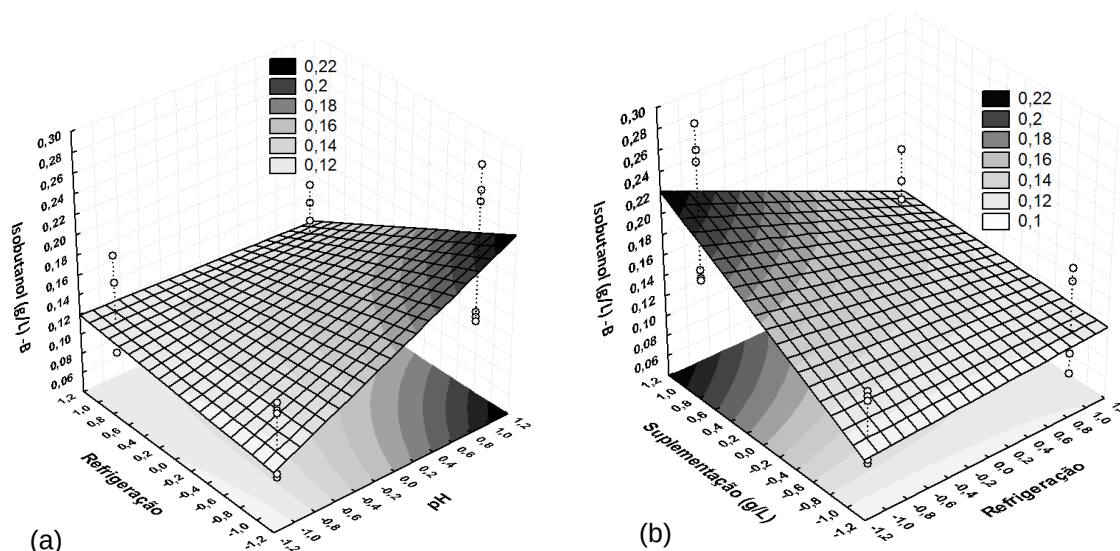
O modelo de regressão para a produção de isobutanol, considerando apenas os efeitos significativos, está representado na Equação 12. Os gráficos correspondentes são apresentados nas Figuras 14a e b.

$$\text{ISOBU. (B)} = -0,0222 + 0,03120 \text{ pH} + 0,0549 \text{ Sup.} + 0,1269 \text{ Ref.} - 0,02964 \text{ pH*Ref.} - 0,0394 \text{ Sup.*Ref.} \quad (\text{Equação 12})$$

A ANOVA do modelo de regressão da Equação 12 está apresentada na Tabela 25.

As Figuras 14a e b mostram que a produção de isobutanol (B) teve comportamento semelhante ao da produção de álcool isoamílico (A) (Figuras 13a e b), com efeitos de interação significativos entre pH*Ref. e Sup.*Ref. Especificamente, nas fermentações conduzidas sem refrigeração, o aumento no pH e suplementação do mosto resultou em uma maior produção de isobutanol (B). A suplementação e o aumento do pH elevaram a produção de isobutanol (B) em ambas as condições de refrigeração, confirmando os efeitos significativos desses fatores (Tabela 26). No entanto, a refrigeração do mosto resultou em um aumento menos acentuado na produção de isobutanol (B), destacando a importância desse efeito (Tabela 26).

Figura 14 – Superfície de resposta para o isobutanol (B, em g/L) em função do pH e refrigeração (a) e suplementação e refrigeração (b)



Fonte: O Autor (2023).

Conforme apresentado na Tabela 25, apenas os efeitos principais de pH e refrigeração foram significativos sobre razão A/B. Além disso, os efeitos de interação de segunda ordem pH*Ref. e pH*Sup. também foram significativos sobre essa resposta. Portanto, esses fatores devem ser avaliados conjuntamente para uma compreensão abrangente.

4.5.3 Análise Conjunta dos Resultados de Álcool Isoamílico Produzido (A), Isobutanol Produzido (B) e Razão A/B

Os resultados apresentados na Tabela 27 revelam diferenças significativas entre as diferentes condições de fermentação para as variáveis de resposta avaliadas: produção de álcool isoamílico (A), produção de isobutanol (B) e a razão A/B.

A condição de fermentação 4 (pH 5,0, com suplementação, sem refrigeração) resultou na maior produção de álcool isoamílico ($0,4372 \pm 0,0445$ g/L) e isobutanol ($0,2666 \pm 0,0180$ g/L). No entanto, essa condição também produziu a menor razão A/B ($1,64 \pm 0,06$), sugerindo que, embora a condição favoreça a produção geral de álcoois superiores, não promove de forma seletiva o aumento do álcool isoamílico em relação ao isobutanol.

Por outro lado, a condição de fermentação 5 (pH 3,5, sem suplementação, com refrigeração) apresentou a maior razão A/B ($2,26 \pm 0,09$), diferindo significativamente

de todas as outras condições ($p < 0,05$). Isso sugere que um pH mais baixo, combinado com refrigeração e sem suplementação, melhora seletivamente a produção de álcool isoamílico em relação ao isobutanol. A produção reduzida de isobutanol em condições ácidas pode ser atribuída a efeitos inibitórios sobre certas vias metabólicas, como sugerido por estudos sobre o metabolismo de leveduras (Sanchez *et al.*, 2017; Rollero *et al.*, 2015).

Apesar do fator de conversão substrato em células relativamente baixo ($Y_{X/S} = 0,15 \text{ g células/g ART}$) sob a condição 5, tanto a eficiência de fermentação (90,23%) quanto a produtividade em etanol (6,44 g/L.h) foram altas, alinhando-se com os padrões industriais para processos de fermentação de etanol.

A refrigeração provavelmente contribuiu para o aumento da razão A/B nas condições 5 e 7, ambas envolvendo fermentação com refrigeração. Embora a refrigeração tenda a reduzir a taxa metabólica geral das leveduras (Sanchez *et al.*, 2017), parece influenciar o equilíbrio das vias metabólicas, favorecendo a produção de álcool isoamílico em relação ao isobutanol. A interação pH*Ref. foi particularmente evidente, pois a refrigeração sozinha não aumentou consistentemente a razão A/B, mas, quando combinada com pH baixo, teve um efeito mais pronunciado.

Nas condições com suplementação (3, 4, 7 e 8), o sulfato de amônio também influenciou a produção de álcoois superiores, embora seu efeito fosse mais pronunciado quando combinado com níveis específicos de pH e refrigeração. Por exemplo, a condição 3 (pH 3,5, com suplementação, sem refrigeração) apresentou uma razão A/B relativamente alta de $1,93 \pm 0,06$, inferior à condição 5, mas ainda assim superior a outras condições. Isso sugere que, embora a suplementação contribua para o aumento da produção de álcoois superiores, seu efeito sobre a razão A/B depende do pH e da temperatura durante a fermentação.

Os resultados deste trabalho estão alinhados com estudos anteriores de Pons e Schutze (1994), e Cachot, Müller e Pons (1991), que demonstraram uma correlação positiva entre a formação de álcoois superiores e a produção de etanol. De fato, observa-se nos nossos resultados que as condições de fermentação que levaram a uma maior produção de etanol também resultaram em maior formação de álcool isoamílico e isobutanol.

A avaliação simultânea de pH, suplementação e refrigeração destaca a complexidade de suas interações na produção de álcool isoamílico e isobutanol, consistente com estudos anteriores (Sanchez *et al.*, 2017; Rollero *et al.*, 2015; Arshad *et al.*, 2008), que relatam a influência de múltiplos fatores na formação de álcoois superiores durante a fermentação. Esses resultados enfatizam a importância de avaliar esses fatores em conjunto. As interações observadas neste estudo demonstram que alcançar condições otimizadas para a produção de álcoois superiores requer um equilíbrio entre várias variáveis, não apenas para controlar a quantidade de álcoois produzidos, mas também suas proporções relativas.

Portanto, os resultados permitem uma melhor compreensão sobre as interações entre pH, suplementação e refrigeração na formação de álcool isoamílico e isobutanol, oferecendo orientações para o desenvolvimento de processos de fermentação mais eficientes.

Tabela 27 – Álcool isoamílico e isobutanol produzidos nas diferentes condições de fermentação adotadas

Condição de Fermentação	Variáveis Independentes						Resultados (média ± dp)		
	Valores Codificados			Valores Decodificados			Álcool Isoamílico (A) (g/L)	Isobutanol (B) (g/L)	Razão A/B
	pH	Sup.	Ref.	pH	Sup. (g/L)	Ref.			
1	-1	-1	-1	3,5	0,0	sem	0,1487 ± 0,0189 ^b	0,0811 ± 0,0113 ^b	1,84 ± 0,03 ^{c d}
2	1	-1	-1	5,0	0,0	sem	0,2406 ± 0,0040 ^b	0,1379 ± 0,0046 ^b	1,75 ± 0,03 ^{d e}
3	-1	1	-1	3,5	1,0	sem	0,2717 ± 0,0034 ^{a b}	0,1409 ± 0,0055 ^b	1,93 ± 0,06 ^c
4	1	1	-1	5,0	1,0	sem	0,4372 ± 0,0445 ^a	0,2666 ± 0,0180 ^a	1,64 ± 0,06 ^e
5	-1	-1	1	3,5	0,0	com	0,2514 ± 0,0746 ^b	0,1119 ± 0,0373 ^b	2,26 ± 0,09 ^a
6	1	-1	1	5,0	0,0	com	0,1831 ± 0,0873 ^b	0,1109 ± 0,0529 ^b	1,65 ± 0,02 ^e
7	-1	1	1	3,5	1,0	com	0,2598 ± 0,1047 ^b	0,1240 ± 0,0493 ^b	2,09 ± 0,04 ^b
8	1	1	1	5,0	1,0	com	0,2460 ± 0,0309 ^b	0,1297 ± 0,0198 ^b	1,90 ± 0,05 ^c

Fonte: O Autor (2023).

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem pelo teste de Tukey a um nível de significância de 5%.

5 CONCLUSÃO

O estudo realizado demonstrou a relevância científica e industrial da pesquisa, preenchendo lacunas na literatura ao fornecer novos dados sobre a fermentação de melaço de cana-de-açúcar e a formação de álcoois superiores.

As diferentes condições de fermentação influenciaram significativamente as variáveis resposta $Y_{X/S}$, η_f , η_p e PE, com destaque para as condições de 3, 4 e 5 que apresentaram melhor desempenho em termos de eficiência de fermentação e processo (η_f , η_p). O fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) foi satisfatório em todas as condições, indicando um bom desenvolvimento das leveduras.

Os resultados mostraram que o pH, a suplementação e a refrigeração tiveram impacto direto na formação dos álcoois superiores, especialmente na razão álcool isoamílico/isobutanol (A/B). A condição 5 (pH mais baixo, sem suplementação e com refrigeração) favoreceu a produção seletiva do álcool isoamílico, enquanto a condição 4 (pH mais alto, com suplementação e sem refrigeração) aumentou a produção de ambos os álcoois sem seletividade.

Essas descobertas ressaltam a importância do controle dos parâmetros fermentativos para otimizar a produção de álcoois superiores em processos industriais de produção de etanol. Além disso, reforçam a necessidade de estudos futuros para aprofundar as interações entre pH, suplementação e refrigeração, buscando processos fermentativos mais eficientes e controlados.

6 RECOMENDAÇÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigar o impacto de outras variáveis de fermentação, como temperatura, agitação/aeração e tempo de fermentação, para uma compreensão mais abrangente de seus efeitos na formação de álcoois superiores em condições industriais, contribuindo para a otimização da produção de etanol;
- Avaliar o efeito de diferentes fontes de nutrientes, incluindo formas alternativas de suplementação nitrogenada, sobre a formação de álcoois superiores e a eficiência do processo fermentativo.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. N.; AWAD, O. I.; TAO, H.; IBRAHIM, T. K.; MAMAT, R.; HAMMID, A. T. Performance and emissions of gasoline blended with fusel oil that a potential using as an octane enhancer. **Energy Sources Part A: Recovery Utilization and Environmental Effects**, v. 41, ed. 8, p. 931-947, 2019.
- ABE, F.; HORIKOSHI, K. **Screening yeast that produces high yield of isoamyl acetate by culturing yeast at specified pressure and temperature, selecting yeast that propagates under the conditions and comparing isoamyl alcohol production with reference strain**. Depositante: Dokuritsu Gyosei Hojin Kaiyo Kenkyu Kaih. JP2005124506-A; JP4175994-B2. Depósito: 24 out. 2003. Publicação: 19 mai. 2005.
- AKCAY, M.; OZER, S. Experimental investigation on performance and emission characteristics of a CI diesel engine fueled with fusel oil/diesel fuel blends. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects**. P. 1-16, 2019.
- ALVES, J. G. L. F. **Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae***. 1996, 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool - controle e monitoramento**. Piracicaba: Fermentec/Fealq/Esalq-USP, 1989.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; OLIVEIRA, A. J.; GODOY, A.; CHERUBIN, A. R.; LOPES, M. L. Identification and selection of yeast strains from alcoholic fermentations in Brazil by electrophoretic karyotyping. *In*: INTERNATIONAL CONGRESS ON YEASTS, 11, 2004, Rio de Janeiro, RJ. **Yeasts in science and technology**. v. 1. p. 51-51, 2004.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L. Ciência e tecnologia na seleção de leveduras para produção de etanol. *In*: SIMPÓSIO MICRORGANISMOS EM AGROENERGIA: da prospecção aos bioprocessos, 2013, Brasília. **Anais [...]**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, p. 42-59, 2013.
- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; GALLO, C. R.; ALCARDE, V. E.; GODOY, A. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: Fermentec/Fealq/Esalq-USP, 1996.
- ANDRIETTA, M. G. S. A.; ANDRIETTA, S. R.; STECKELBERG, C.; STUPIELLO, E. N. A. Bioethanol - Brazil, 30 years of Proálcool. **International Sugar Journal**, v. 109, n. 1299, p. 195-200, 2007. Disponível em: <http://hdl.handle.net/11449/69535>. Acesso em: 22 dez. 2019.
- AQUINO, Amanda Jordano. **Análise dos compostos flavorizantes da cana-de-açúcar e otimização da aplicação de extratos ricos em β -glicosídeos para liberação de aroma na produção de aguardente de cana**. 2013, 73 f. Dissertação

(Mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, São Paulo, 2013.

ARAGON, P.; ATIENZA, J.; CLIMENT, M. D. Influence of clarification, yeast type, and fermentation temperature on the organic acid and higher alcohols of malvasia and muscatel wines. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 49, n. 2, p. 211-219. 1998.

ARDEBILI, S. M. S.; SOLMAZ, H.; MOSTAFAEI, M. Optimization of fusel oil - gasoline blend ratio to enhance the performance and reduce emissions. **Applied Thermal Engineering**, v. 148, p. 1334-1345, 2019.

ARNOLD, F. R.; SANTOS, C. B. A concessão de patentes no Brasil: um estudo exploratório. **Programa de Apoio à Iniciação Científica**, v. 17, n.1, p. 101-115. 2016.

ARSHAD, M.; KHAN, Z. M.; KHALIL-UR-REHMAN, SHAH; F. A.; RAJOKA, M. I. Optimization of process variables for minimization of byproduct formation during fermentation of blackstrap molasses to ethanol at industrial scale. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 410-414, 2008.

ÄYRÄPÄÄ, T. Biosynthetic formation of higher alcohols by yeast. Dependence on the nitrogenous nutrient level of the medium. **Journal of The Institute of Brewing**, v. 77, n. 3, p. 266-276, 1971.

ÄYRÄPÄÄ, T. Formation of higher alcohols by various yeasts. **Journal of The Institute of Brewing**, v. 74, n. 2, p. 169-178, 1968.

AZANIA, A. A. P. M.; AZANIA, C. A. M.; MARQUES, M. O.; PAVANI, M. C. M. D.; FURTADO, D. E.; RODRIGUES, D. Aplicação de óleo fúsel isolado e em mistura com glifosato na pós-emergência tardia de plantas daninhas. **Planta Daninha**, v. 26, ed. 1, p. 231-236, 2008.

AZANIA, Andréa Aparecida de Padua Mathias. **Influência de subprodutos da indústria alcooleira nos atributos químicos do solo e em plantas de cana-de-açúcar, guaxuma e capim-braquiária**. 81 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, 2003.

AZANIA, C. A. M.; AZANIA, A. A. P. M.; PIZZO, I. V.; SCHIAVETTO, A. R. Resposta de plantas daninhas ao óleo fúsel aplicado em pós-emergência inicial e tardia. **Planta Daninha**, v. 28, ed. 3, p. 541-549, 2010.

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation. Technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.

BAIÃO DIAS, A. L.; DA CUNHA, G. N.; DOS SANTOS, P.; MEIRELES, M. A. A.; MARTÍNEZ, J. Fusel oil: Water adsorption and enzymatic synthesis of acetate esters in supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 142, p. 22-31, 2018.

BARRETO, A. J. B.; MENDES, D. **Aditivo para óleo diesel otimizador de combustão e redutor de poluentes nas emissões de motores veiculares e estacionários**. Nome do Titular: Instituto Nacional de Tecnologia (BR/RJ). PI 0602633-8. Depósito: 04 jul. 2006. Publicação: 26 fev. 2008.

BATISTA, F. R. M.; FOLLEGATTI-ROMERO, L. A.; BESSA, L. C. B. A.; MEIRELLES, A. J. A. Computational simulation applied to the investigation of industrial plants for bioethanol distillation. **Computers and Chemical Engineering**, v. 46, p. 1-16, 2012.

BELTRAN, G.; NOVO, M.; GUILLAMÓN, J. M.; MAS, A.; ROZÈS, N. Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 121, ed. 2, p. 169-177, 2008.

BESSA, L. C. B. A.; BATISTA, F. R. M.; MEIRELLES, A. J. A. Double-effect integration of multicomponent alcoholic distillation columns. **Energy**, v. 45, p. 603-6012, 2012.

BESSA, Larissa Castello Branco Almeida. **Integração térmica de colunas de destilação alcoólica multicomponente**. 2012, 191 f.. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2012.

BI, F.; ALI, A.; IQBAL, S.; ARMAN, M.; HASSAN, M. U. Chemical esterification of fusel oil alcohol for the production of flavor and fragrance esters. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 30, ed. 6, p. 919-923, 2008.

BI, F.; IQBAL, S.; ALI, A.; ARMAN, M.; HASSAN, M. U. Synthesis of isoamyl acetate of isoamyl alcohol obtained from fusel oil using immobilized candida antarctica lipase. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 31, ed. 3, p. 485-491, 2009.

BIZZARRI, P. S.; DURAO, A. S.; NASCIMENTI, J. F.; ALMEIDA; W. B. **Composição polimérica plastificante e uso da composição polimérica**. Nome do Titular: PHB Industrial S/A (BR/SP). PI 0418990-6. Depósito: 06 ago 2004. Publicação: 11 dez. 2007.

BRANDÃO, A. C. T.; DE RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J. Alcoholic fermentation with high sugar and cell concentration at moderate temperatures using flocculant yeasts. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 17, p.17-1725, 2020.

BRANDÃO, Maria Cláudia Rodrigues. **Desenvolvimento tecnológico da biomassa: síntese e avaliação de biocombustíveis de segunda geração e aditivos melhoradores de cetano**. 2010, 160 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, João Pessoa, 2010.

BRANDÃO, Maria Cláudia Rodrigues. **Novos nitratos orgânicos derivados de biomassa como potenciais fármacos cardiovasculares**. 2017, 209 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba João Pessoa, 2017.

BRANDÃO, R. L.; CASTRO, I. M.; GOMES, L.; COUTRIM, M. X.; VICENTE, M. A. **Isolation of *Saccharomyces cerevisiae* strains for production of e.g. white rum comprises production of isoamyl alcohol and e.g. acetate, giving good fermentation.** Depositante: Universidade Federal de Ouro Preto. BR200304436-A. Depósito: 14 fev. 2003. Publicação: 31 mai. 2005.

CABRAL, G. B. **Fermentação alcoólica de melaço com alta concentração de açúcar: efeito da esterilização do mosto e tratamento ácido da levedura.** 2020, Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2020.

CACHOT, T.; MÜLLER, M.; PONS, MARIE-NÖELLE. Kinetics of volatile metabolites during alcoholic fermentation of cane molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p.450-454, 1991.

CAETÉ S/A – Unidade Marituba. Comercialização de óleo fúsel. **[Correspondência]**. Destinatário: Renan Atanázio dos Santos pessoal. Penedo, 15 jan. 2020.

CALAM, A. Effects of the fusel oil usage in HCCI engine on combustion, performance and emission. **Fuel**, v. 262, 2020.

CALAM, A.; SOLMAZ, H.; UYUMAZ, A.; POLAT, S.; YILMAZ, E.; IÇINGUR, Y. Investigation of usability of the fusel oil in a single cylinder spark ignition engine. **Journal of the Energy Institute**, v. 88, p. 258-265, 2015.

CALDAS, C.; BORÉN, A.; SANTOS, F. **Cana-de-açúcar: bioenergia, açúcar e etanol - tecnologias e perspectivas.** 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2012. 637p.

CAMARGOS, C. V.; MORAES, V. D.; DE OLIVEIRA, L. M.; GUIDINI, C. Z.; RIBEIRO, E. J.; SANTOS, L. D. High gravity and very high gravity fermentation of sugarcane molasses by flocculating *Saccharomyces cerevisiae*: Experimental investigation and kinetic modeling. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, p. 807-821, 2021.

CANTO, C. A. F.; STELLE, J. P.; PEDRECA, M. G. D. **Formulação de filtro solar.** Depositante: Oxiteno S.A. Indústria e Comércio (BR/SP). BR 10 2016 025359 4. Depósito: 28 out. 2016. Publicação: 29 mai. 2018.

CARVALHO, J. A.; JUNIOR, J. V. Q. **Plastificantes primários de PVC derivados de óleos vegetais, processo de obtenção de plastificantes primários de PVC derivados de óleos vegetais e composição de PVC plastificado.** Depositante: Nexoleum Bioderivados Ltda., (BR/SP). PI 0705276-6. Depósito: 10 dez. 2007. Publicação: 11 ago. 2009.

CASTOR, J. G. B.; GUYMON, J. F. On the mechanism of formation of higher alcohols during alcoholic fermentation. **Science, New Series**, v. 115, n. 2980, p. 147-149, 1952.

CEREDA, Marney. Pascoli (coord.). **Série culturas de tuberosas amiláceas latino americanas.** São Paulo: Fundação Cargill, 2001. 4 v.

CERON, A. A.; VILAS BÔAS, R. N.; BIAGGIO, F. C.; DE CASTRO, R. F. Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass & Bioenergy**, v. 119, p. 166-172, 2018.

CERQUEIRA, D. P. **Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcar**. 2013, 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

COLOMBI, B. L.; ORTIZ, M. A.; ZANONI, P. R. S.; MAGALHÃES, W. L. E.; TAVARES, L. B. B. Efeito de compostos inibidores na bioconversão de glicose em etanol por levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Engevista**, v. 19, n. 2, p. 339-352, 2017.

CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA INDÚSTRIA (CNI). Propriedade intelectual: as mudanças na indústria e a nova agenda. Brasília: **CNI**, 2014. 90 p.

COOPERATIVA DE PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO LTDA (COPERSUCAR). **Fermentação**. São Paulo, 1987. 434 p.

CORTES, S.; BLANCO, P. Yeast strain effect on the concentration of major volatile compounds and sensory profile of wines from *Vitis vinifera* var. *Treixadura*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 27, ed. 4, p. 925-932, 2011.

COSTA, Gustavo Pires. **Caracterização dos compostos voláteis de espumantes Champenoise elaborados com leveduras e coadjuvantes imobilizados e na forma livre**. 2013, 77 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

CRUZ, IZADORA. S.; CRUZ, IZACLAUDIA S.; ANDRADE, I. C. B. O enfoque da sustentabilidade nas agroindústrias canavieiras em Sergipe: gestão dos resíduos sólidos. *In*: ENCONTRO INTERNACIONAL DE FORMAÇÃO DE PROFESSORES, 8; FÓRUM PERMANENTE DE INOVAÇÃO EDUCACIONAL, 9. Sergipe, 2016.

CRUZ, M. L.; DE RESENDE, M. M.; RIBEIRO, E. J. Improvement of ethanol production in fed-batch fermentation using a mixture of sugarcane juice and molasse under very high-gravity conditions. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, p. 617-625. 2021.

CRUZ, Mariana Lopes. **Avaliação das condições de processo na resistência da levedura ao teor final de etanol na fermentação alcoólica**. 2015, 86 f. Dissertação (Mestrado em Engenharias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

DA SILVEIRA, Evanildo. Resíduos Reciclados: Óleo fúsel e CO₂ gerados na fabricação de etanol podem ser aproveitados na produção de substâncias químicas de uso industrial. **Revista Pesquisa Fapesp**, ed. 240, p. 68-69, 2016. Disponível em: https://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2016/02/068-069_%C3%93leo-fusel_240.pdf. Acesso em: 02 jan. 2020.

DE LIMA, A. T.; MAISTRO, M. C. M.; DOS SANTOS, J. A. Setor sucroenergético: dinâmica produtiva e econômica do açúcar no Brasil. **Studies In Social Sciences Review**, v. 3, n. 1, p. 362-388, 2022. Disponível em:

<https://studiespublicacoes.com.br/ojs/index.php/sss/article/download/392/418>. Acesso em: 03 jul. 2023.

DICKINSON J. R.; LANTERMAN, M. M.; DANNER, D. J.; PEARSON, B. M.; SANZ, P.; HARRISON, S. J.; HEWLINS, M. J. E. A ^{13}C Nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 43, p. 26871-26878, 1997.

DICKINSON, J. R.; HARRISON, S. J.; HEWLINS, M. J. E. An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 40, p. 25751–25756, 1998.

DÖRMÖ, N.; BÉLAFI-BAKÓ, K.; BARTHA, L.; EHRENSTEIN, U.; GUBICZA, L. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 229-234, 2004.

EUSTÁCIO, R. S.; DA SILVA, L. F.; SOUZA, C.; MENDES, M. F.; NETO, M. R. F.; PEREIRA, C. S. S. Simulação do processo de destilação da mistura etanol-óleo fúsel utilizando o simulador de processos ProSimPlus. **Revista Teccen**, v. 11, n. 1, p. 61-67, 2018.

FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO (FIESP). **Outlook Fiesp 2029: projeções para o agronegócio brasileiro 2029**. Disponível em: <https://www.abtra.org.br/estudos-setoriais/outlook-fiesp-2029-projecoes-para-o-agronegocio-brasileiro/>. Acesso em: 02 jan. 2024.

FERMENTEC NEWS. **O que é o óleo fúsel e impacto na usina**. jun. 2019. Disponível em: <http://fermentecnews.com.br/2019/06/04/o-que-e-o-oleo-fusel/>. Acesso em: jan. 2020.

FERRARI, Fernanda Cristina dos Santos. **Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol em escala industrial**. 2013, 74 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2013.

FERREIRA, M. C.; MEIRELLES, A. J. A.; BATISTA, E. A. C. Study of the fusel oil distillation process. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, ed. 52, p. 2336–2351, 2013.

FERREIRA, Marcela Cravo. **Estudo do processo de destilação de óleo fúsel**. 2012, 202 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 2012.

FRIEDRICHSEN, J. S. A.; BRUNI, A. R. S.; da SILVA, G. A. R.; GOMES, E. S.; SILVA, J. F.; IENTZ, G. A. S.; BAETA, F. S.; PIACQUADIO, N. M.; BULLA, M. K.; Santos, O. O.. O uso adequado dos resíduos da agroindústria sucroalcooleira para o desenvolvimento de subprodutos: uma revisão. **Research, society and development**, v. 11, n. 13, p. e597111336082-e597111336082, 2022.

FURLANI, Juliana Maria Sampaio. **Influência de compostos fenólicos na fermentação de glicose a etanol por *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e *Saccharomyces cerevisiae* de panificação e identificação de seus produtos de bioconversão.** 2014, 162 f. Tese (Doutor em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2014.

GARCIA, Graciany. **Tratamento de caldo e tipos de fermentos sobre os componentes secundários e qualidade da cachaça de alambique.** 2016, 72 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

GARCIA, Vanderlei. **Subproduto de destilaria de óleo fúsel: caracterização da composição química e estudo da sua aplicação industrial.** 2008, 98 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia Mauá, Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, São Paulo, 2008.

GARDE-CERDAN, T.; MARSELLES-FONTANET, A. R.; ARIAS-GIL, M.; ANCÍN-AZPILICUETA, C.; MARTÍN-BELLOSO, O. Influence of SO₂ on the evolution of volatile compounds through alcoholic fermentation of must stabilized by pulsed electric fields. **European Food Research and Technology**, v. 227, ed. 2, p. 401-408, 2008.

GAREEV, G. A.; PERSHIN, N. S.; BOVT, V. V. **Fusel oil processing method.** Depositante: Gareev, G. A. RU2138476-C1. Depósito: 25 jun. 1998. Publicação: 27 set. 1999.

GONZALEZ, R.; MORALES, P. Wine secondary aroma: understanding yeast production of higher alcohols. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1449-1450, 2017.

GRETSMANN, A. S. Ajuste de curvas na produção de etanol num processo em batelada. In: ENCONTRO GAÚCHO DE EDUCAÇÃO MATEMÁTICA, 10, 2009, Ijuí. **Caderno de resumos [...]**. Ijuí: UNIJUÍ, 2009. Disponível em: http://www.projetos.unijui.edu.br/matematica/cd_egem/fscommand/CC/CC_61.pdf. Acesso em: 04 jan. 2019.

GUTIERREZ, Luiz Eduardo. Efeito da adição de sulfito sobre a produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica. **Anais [...]**. Piracicaba: ESALQ, n. 45 (parte 2), p. 359-368, 1988.

GUTIERREZ, Luiz Eduardo. Produção de álcoois superiores por linhagens de *Saccharomyces* durante a fermentação alcoólica. **Scientia Agricola**, v. 50, n. 3, p. 464-472, 1993.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; KAPUCU, H.; AYDOGAN, O.; MEHMETOGLU, U. Enzymatic esterification of isoamyl alcohol obtained from fusel oil: optimization by response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 778- 785, 2007.

HAZELWOOD, L. A.; DARAN, JEAN-MARC; VAN MARIS, A. J. A.; PRONK, J. T.; DICKINSON, J. R. The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of

research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3920, 2008.

HOFFMANN, H. A. P. **Processo de remoção azeotrópica de água a partir de ésteres autogerados por esterificação de óleos fúseis de cana-de-açúcar e similares**. Depositante: Hans Albrecht Paul Hoffmann (BR/SP). PI 0306043-8. Depósito: 17 dez. 2003. Publicação: 15 fev. 2005.

HUO, N.; WANG, Y.; LI, B.; WANG, R.; HOU, H.; WU, C.; ZHANG, Y.; ZHU, Z.; TANG, Z. **Enhancing alcohol content of alcoholic liquor and reducing content of isoamyl alcohol involves using high-yield ester-producing aroma yeast, using Bengal red selection medium and obtaining yeast after separation and purification**. Depositante: Universidade Agrícola de Shanxi. CN106753994-A. Depósito: 28 nov. 2016. Publicação: 31 mai. 2017.

JACQUES, K. A.; LYONS, T. P.; KELSALL, D. R. **The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries**. 4. ed. Nottingham University Press, 2003.

JACQUOT, R.; LABARRE, D.; ZANETTO, J. E.; JENTZER, O.; MARION, P.; DEROO S. **Composto ou composição de matéria à base de diéster(s) de ácido(s) dicarboxílico(s), processo de preparação de um composto ou de uma composição e uso de um composto ou de uma composição de matéria**. Depositante: Rhodia Operations (FR). PI 0816630-7. Depósito: 21 out. 2008. Publicação: 08 out. 2019.

KARAOSMANOGLU, F.; ISIGIGUR, A.; AKSOY, H. A. Methanol-unleaded gasoline blends containing fusel oil fraction as spark ignition engine fuel. **Energy Sources**, v. 19, ed. 6, p. 567-577, 1997.

KŁOSOWSKI, G.; MIKULSKI, D.; MACKO, D.; MIKLASZEWSKA, B.; KOTARSKA, K.; CZUPRYN´SKI, B. Influence of various yeast strains and selected starchy raw materials on production of higher alcohols during the alcoholic fermentation process. **European Food Research and Technology**, v. 240, p. 233-242, 2015.

KUNO, Masaru. **Introductory Science of Alcoholic Beverages: Beer, Wine, and Spirits**. CRC Press, 2022.

KÜÇÜK, Z.; CEYLAN, K. Potential utilization of fusel oil: a kinetic approach for production of fusel oil esters through chemical reaction. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 22, ed. 3, p. 289-300, 1998.

LAINIOTI, G. C.; KAPOLOS, J.; KOLIADIMA, A.; KARAIKAKIS, G. The study of the effect of fermentation temperature on the growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* yeast strain, in the presence or absence of support, by chromatographic techniques. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 34, n. 3, p. 195-208, 2011.

LEÃO, Regina Machado. **Álcool, energia verde**. São Paulo: IQUAL, 2002. 255 p.

LI, P.; GE, J.; GAO, Y.; EANG, J.; ZHANG, C.; XIAO, D. A seamless gene deletion method and its application for regulation of higher alcohols and ester in baijiu *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomed Research International**, 2019.

LI, R.; LI, Y.; TANG, J.; YANG, Q.; YANG, S.; XIA J. **New *Saccharomyces cerevisiae* Y19 strain capable of producing low amount of fusel oil**. Depositante: Jing Brand Co Ltd. CN103509724-A. Depósito: 22 out. 2013. Publicação: 15 jan. 2014.

LIMA, Urgel de Almeida (Org.). **Biotecnologia Industrial – Volume 3: Processos fermentativos e enzimáticos**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2019.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, p. 593, 2001.

LIU, P.; WANG, Y.; YE, D.; DUAN, L.; DUAN, C.; YAN, G. Effect of the addition of branched-chain amino acids to non-limited nitrogen synthetic grape must on volatile compounds and global gene expression during alcoholic fermentation. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 24, n. 2, p. 197-205, 2017.

LUO, H.; WANG, Y.; WANG, C.; YANG, X.; LI, D. Metabolic control of higher alcohols producing by *Saccharomyces cerevisiae* in mulberry wine brewing. **Advanced Materials Research**, v. 781-784, p. 1861-1865, 2013.

MALDONADE, I. R.; CARVALHO, P. G. B.; FERREIRA, N. A. Protocolo para determinação de açúcares totais em hortaliças pelo método de DNS. In: Comunicado Técnico Embrapa Hortaliças, Brasília - DF, 2013.

MARIANO, Thiago de Moraes. **Desenvolvimento de sensor baseado em polímeros molecularmente impressos para determinação de álcoois superiores em óleo fúsel**. 2016, 54 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, 2016.

MAYER, Flávio Dias. **Projeto, construção e pré-operação de um destilador de tecnologia híbrida para aplicação em uma microdestilaria**. 2014, 194 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

MEIRELLES, A. J. A.; BATISTA, F. R. M. **Sistema e processo para a produção de álcool hidratado de diferentes padrões de qualidade**. Depositante: Universidade Estadual de Campinas (BR/SP). BR 10 2012 028212 7. Depósito: 31 out. 2012. Publicação: 05 ago. 2014.

MEIRELLES, A. J. A.; OLIVEIRA, M. J.; BATISTA, E. A. C. **Sistema integrado para aumento da recuperação de etanol e coprodução de álcool isoamílico, processo integrado para aumento da recuperação de etanol e coprodução de álcool isoamílico e, produtos assim obtidos**. Depositante: Universidade Estadual de Campinas (BR/SP). BR 10 2014 025284 3. Depósito: 10 out. 2014. Publicação: 02 jan. 2018.

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

MISYUKOV, N. V.; BZHITSKII, V. A.; ANANIN, A. A.; ZHUKOV, Y. N.; YANKILEVICH, V. M. **Isoamyl alcohol production process involves supplementing fusel oil by alkali agent, rectifying on rectification installation, stripping head fraction until specified temperature, and distillation to give pure isoamyl alcohol**. Depositante: Nitrometan Stock Co. RU2196763-C1. Depósito: 21 mai 2001. Publicação: 20 jan. 2003.

MONTOYA, N.; DURÁN, J.; CÓRDOBA, F.; GIL, I.; TRUJILLO, C.; RODRÍGUEZ, G. Colombian fusel oil. **Ingeniería e Investigación**, v. 36, n. 2, p. 21-27, 2016.

MORENO-PEREZ, A.; VILA-LOPEZ, R.; FERNANDEZ-FERNANDEZ, J. I.; MARTÍNEZ-CUTILLAS, A.; GIL-MUÑOZ, R. Influence of cold pre-fermentation treatments on the major volatile compounds of three wine varieties. **Food Chemistry**, v. 139, ed. 1-4, p. 770-776, 2013.

NEMESTOTHY, N.; GUBICZA, L.; FEHER, E.; BÉLAFI-BAKÓ, K. Biotechnological utilization of fusel oil, a food industry by-product - a kinetic model on enzymatic esterification of i-amyl alcohol and oleic acid by *Candida antarctica* lipase B. **Food Technology and Biotechnology**, v. 46, ed. 1, p. 44-50, 2008.

OLIVEIRA, A. D.; GALLO, C. R.; ALCARDE, V. E.; GODOY, A.; AMORIM, H. V. Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar. 1996.

OLIVEIRA, Fernanda de. **Aproveitamento do farelo residual do processamento de fécula de mandioca na produção de bioetanol**. 2011, 84 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2011.

OLIVEIRA, M. J.; BATISTA, E. A. CALDAS; MEIRELLES, A. J. ALMEIDA. **Recovering isoamyl alcohol, ethanol, and butanol involves feeding fusel oil in a decanter, feeding water in decanter, forming biphasic system comprising aqueous phase and organic phase, and separating organic phase and aqueous phase**. Depositante: Universidade Estadual de Campinas. BR102014032357-A2. Depósito: 18 dez. 2014. Publicação: 21 jun. 2016.

OLIVEIRA, Magno José. **Produção de álcool isoamílico integrada à produção de etanol hidratado: otimização, integração energética e avaliação econômica do processo**. 2017, 189 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 2017.

OSTROWSKI, A. P; VARGAS, F.; PIZZINATTO, L. E.; ARAÚJO, J. H. B. de. Obtenção de álcool etílico a partir de amido de mandioca. In: MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA INTERDISCIPLINAR, 1., 2006, Camboriú. **Anais** [...]. Camboriú: Colégio Agrícola de Camboriú; UFSC, 2006. p. 1-21.

OUGH, C. S.; GUYMON, J. F.; CROWELL, E. A. Formation of higher alcohols during grape juice fermentations at various temperatures. **Journal of Food Science**, v. 31, n. 4, 1966.

PAŠKO, P. et al. Physicochemical and volatile compounds analysis of fruit wines fermented with *saccharomyces cerevisiae*: FTIR and microscopy study with focus on anti-inflammatory potential. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n.11, p. 5627, 2024.

PATIL, A. G.; KOOLWAL, S. M.; BUTALA, H. D. Fusel oil: composition, removal and potential utilization. **International Sugar Journal**, v. 104, p. 51-58, 2002.

PEREZ, E. R.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Análise dos álcoois, ésteres e compostos carbonílicos em amostras de óleo fúsel. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p.10-12, 2001.

PIZZO, I. V.; AZANIA, C. A. M.; AZANIA, A. A. P. M.; SCHIAVETTO, A. R. Seletividade e eficácia de controle de plantas daninhas pela associação entre óleo fúsel e herbicidas em cana-de-açúcar. **Planta Daninha**. v. 28, ed. 2, p. 347-357. 2010.

POLLARD, A.; KIESER, M. E.; BEECH, F. W. Factors influencing the flavour of cider: the effect of fermentation treatments on fuse1 oil production. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 29, n.2, p. 263-269, 1966.

PONS, MARIE-NOËLLE; SCHUTZE, S. On-line monitoring of volatile compounds in honey fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 78, n 6, p. 450-454, 1994.

PRONK, J. T.; YDE STEENSMA, H.; VAN DIJKEN, J. P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 12, n. 16, p. 1607-1633, 1996.

RAMOS ALVES, Douglas. **Projeto piloto de coluna de destilação para obtenção de álcool isoamílico a partir do óleo fúsel**. 2021, 77f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba, Uberaba, 2021.

RIBEIRO, E. J.; REIS, H. B. Influencia conjunta do pH, temperatura e concentração de sulfito em fermentação alcoólica de mostos de sacarose. *In*: Encontro interno, 9.; Seminário de Iniciação Científica, 13. **Anais [...]**. Uberlândia, MG: UFU, 2009. Disponível em: <https://ssl4799.websiteseuro.com/swge5/seg/cd2009/PDF/IC2009-0129.pdf>. Acesso em: 04 jan. 2019.

RIBEIRO, Mara Lucia Dias. **Qualidade da cachaça em função do tratamento do caldo e tipo de fermento**. 2016, 189 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2016.

ROLLER, S.; BLOEM, A.; CAMARASA, C.; SANCHEZ, I.; ORTIZ-JULIEN, A.; SABLAYROLLES, J. M.; DEQUIN, S.; MOURET, J. R. Combined effects of nutrients and temperature on the production of fermentative aromas by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 2291-2304, 2015.

ROUS, C. V.; SNOW, R.; KUNKEE, R. E. Reduction of higher alcohols by fermentation with a leucine-auxotrophic mutant of wine yeast. **Journal of the Institute of Brewing**. v.89, ed. 4, p. 274-278, 1983.

SÁNCHEZ, C. A.; SÁNCHEZ, O. A.; ORJUELA, A.; GIL, I. A.; RODRÍGUEZ, G. Vapor-liquid equilibrium for binary mixtures of acetates in the direct esterification of fusel oil. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 62, n. 1, p. 11-19, 2016.

SANCHEZ, N.; RUIZ, R. Y.; INFANTE, N.; COBO, M. Bioethanol production from cachaza as hydrogen feedstock: effect of ammonium sulfate during fermentation. **Energies**, v. 10, n. 12, p. 2112, 2017.

SANTOS, C. O. Diagnóstico e avaliação da influência de contaminantes selvagens durante etapas do processo produtivo do etanol. 2021, 86 f Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2021.

SANTOS, M. C.; ALBUQUERQUE, A. A.; SOLETTI, J. I.; MENEGETTI, S. M. P. Principais tecnologias para produção de etanol anidro no Brasil. **Revista Virtual de Química**, v. 13, p. 1228-1240, 2021.

SANTOS, J. P.; VENCESLAU, E. B.; ROSA, F.; ARMELIN, N. A.; SILVA, A. LUIS C. **Composição de coalescentes verdes**. Depositante: Oxiteno S.A. Indústria e Comércio (BR/SP). PI 1102427-5. Depósito: 26 mai. 2011. Publicação: 30 jul. 2013.

SILVA, H. J. T. D.; SANTOS, P. F. A.; NOGUEIRA JUNIOR, E. C.; VIAN, C. E. D. F. Aspectos técnicos e econômicos da produção de etanol de milho no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, v. 29, n. 4, p. 142-159, 2020.

SILVA, P. H. A.; SANTOS, J. O.; ARAÚJO, L. D.; FARIA, F. C.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, V. A.; VICENTE, M. A.; BRANDÃO, R. L. Avaliação cromatográfica de compostos voláteis de cachaças produzidas com leveduras de diferentes procedências. **Food Science and Technology**, v. 29, ed. 1, p. 100-106, 2009.

SONG, H; FU, C; TONG, A. **Method for simultaneously separating and purifying racemic optical amyl alcohol, optical active amyl alcohol and isoamyl alcohol from fusel oil or mixed amyl alcohol and its equipment**. Depositante: Universidade de Sichuan. CN1181026-C. Depósito: 28 ago. 2002. Publicação: 22 dez. 2004.

SOUZA, Magalhães Teixeira de. **Estudo sobre os efeitos da adubação nitrogenada e uso de herbicidas no cultivo da cana-de-açúcar, da adição de cereais e do tratamento térmico do caldo sobre a fermentação e a composição química da cachaça**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2013.

SPADARI, Laércio. **Influência da cepa de levedura na composição de vinhos espumantes elaborados pelo método tradicional**. 2013, 50 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, 2013.

STECKELBERG, Cláudia. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. 2001. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

STEINLE, Luiz Antônio. **Fatores que interferem na fermentação alcoólica**. 2013. Monografia (Pós-Graduação em Gestão do Setor Sucroenergético) - Centro de Ciências Agrária da Universidade Federal de São Carlos, Sertãozinho, 2013.

STRIBNY, J.; GAMERO, A.; PEREZ-TORRADO, R.; QUEROL, A. *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acid precursors. **International Journal of Food Microbiology**, v. 205, p. 41-46, 2015.

STROPPIA, C. T.; ALVES, J. G. L. F.; FIGUEIREDO, A. L. F. D.; CASTRO, C., C. Parâmetros cinéticos de linhagens de levedura isoladas de alambiques mineiros. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1978-1983, 2009.

SUMRUNRONNASAK, S.; REUBROYCHAROEN, P.; PIMPHA, N.; CHANLEK, N.; TANTAYANON, S. Hydrogen production by steam reforming of fusel oil using a CeCoO_x mixed-oxide catalyst. **Chemical Engineering & Technology**, 2019.

TAVARES, L. V. **Obtenção de acetato de isoamila a partir de óleo fúsel oriundo da destilação alcoólica em usinas sucroalcooleiras**. 2023, 80f. Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2023.

TEBAS, S. O. G.; BARANANO, A. G.; PINHEIRO, P. F.; JÚNIOR, V. L. Mild conditions in the transesterification reaction of babassu oil and purified fusel oil. **Chemical Engineering Communications**. 2020.

TEIXEIRA, J. A.; FONSECA, M. M.; VICENTE, A. A. Geometrias e Modos de Operação. In: Fonseca, M. M. (ed.). **Reactores Biológicos: Fundamentos e Aplicações**. Lisboa: LIDEL, 2007, cap. 2, p. 27-68.

TER SCHURE, E. G.; FLIKWEERT, M. T.; VAN DIJKEN, J. P.; PRONK, J. T.; VERRIPS, T. C. Pyruvate decarboxylase catalyzes decarboxylation of branched-chain 2-oxo acids but is not essential for fusel alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 4, p. 1303-1307, 1998.

TOSETTO, Gisele Mantei. **Comportamento de linhagens industriais de *Saccharomyces* frente a compostos inibitórios presentes no melaço de cana-de-açúcar na produção de bioetanol**. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, 2008.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR (UNICA). **Histórico de produção e moagem**. Disponível em: <http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php?idMn=31&tipoHistorico=2>. Acesso em: 10 jun. 2023.

VALERO, E.; MOYANO, L.; MEDINA, M.; ORTEGA, J. M. Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. **Food Chemistry**, v. 78, n. 1, p. 57-61, 2002.

VIDAL, E. E.; DE BILLERBECK, G. M.; SIMOES, D. A.; SCHULER, A.; FRANÇOIS, J. M.; MORAIS JR, M. A. Influence of nitrogen supply on the production of higher

alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaca fermentation. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 701-708, 2013.

VILAS BÔAS, Renata de Nazaré. **Óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres com propriedades aromáticas, emulsificantes e lubrificantes por biotransformação utilizando lipases imobilizadas**. 2018. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2018.

WENZEL, G. E. **Bioquímica experimental dos alimentos**. Digitaliza Conteúdo, 2023.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Levedura: guia prático para a fermentação de cerveja**. Editora Krater, 2022.

XU, Y.; CHEN, L.; WU, Q. **New high-yield ethanol and low-yield fusel oil yeast, which is classified as *Xygosaccharomyces bailii* BJY-6 strain deposited under CGMCC NO. 4745, for various wine brewing, wine distilling and wine preparing industries and food industry**. Depositante: Universidade de Jiangnan. CN102816706-B. Depósito: 12 mai. 2011. Publicação: 21 ago. 2013.

YAMADA, M.; YOSHIKAWA, K.; SASAKI, S. On the formation of higher alcohols in the fermentation by yeasts. **Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan**, v. 22, n.5, p. 314-316, 1958.

YILMAZTEKIN, M.; ERTEN, H.; CABAROGLU, T. Enhanced production of isoamyl acetate from beet molasses with addition of fusel oil by *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. **Food Chemistry**, v. 112, n. 2, p. 290-294, 2009.

YOSHIKAWA, K. On various factors affecting formation of isobutanol and isoamyl alcohol during alcoholic fermentation. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 30, n. 7, p. 634-641, 1966.

YOSHIKAWA, K. The formation of higher alcohols in the fermentation of amino acids by yeast. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 672-677, 1965.

YUAN, J.; CHEN, X.; MISHRA, P.; CHING, CHI-BUN. Metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced isoamyl alcohol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 464-474, 2016.

ZABED, H.; SAHU, J. N.; SUELY, A.; BOYCE, A. N.; FARUQ, G. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, p. 475-501, 2017.

ZHONG, X.; WANG, A.; ZHANG, Y.; WU, Z.; LI, B.; LOU, H.; HUANG, G.; WEN, H. Reducing higher alcohols by nitrogen compensation during fermentation of Chinese rice wine. **Food Science and Biotechnology**, 2019.

APÊNDICE A – PROSPECCÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA

PRODUÇÃO CIENTÍFICA NACIONAL E INTERNACIONAL

O levantamento da produção científica internacional foi realizado na Coleção Principal da *Web of Science* (WS) com o objetivo de identificar trabalhos que se dedicaram a estudos relacionados ao óleo fúsel e seus constituintes, principalmente o álcool isoamílico.

Inicialmente, atentou-se para a determinação dos campos de pesquisa que condicionaram a obtenção dos resultados. Através do recurso “Pesquisa Avançada” (*Advanced Search*) foi possível restringir o idioma para inglês e o tempo estipulado para o período entre 1945 e 2020. A busca foi realizada em todas as bases de dados internas (*All Databases*), sendo elas: Principal Coleção da *Web of Science*TM (*Web of Science*TM *Core Collection* [1945-presente]), *Derwent Innovations Index*SM (1963-presente), KCI - Base de dados de periódicos coreanos (1980-presente), *Russian Science Citation Index* (2005-presente) e *SciELO Citation Index* (1997-presente).

Após estabelecer esses requisitos, fez-se a seleção dos termos utilizados para a busca. A princípio, os termos foram escolhidos baseando-se na ideia principal da proposta de tese. Assim, foi possível fazer a combinação dos termos chegando na seguinte expressão booleana:

TI = (“*Fusel Oil*” OR “*Fusel Alcohol*” OR (“*Higher Alcohols*” AND (*Ferment** OR *Saccharomyces* OR *Yeast*)) OR (“*Isoamyl Alcohol*” AND (*Ferment** OR *Saccharomyces* OR *Yeast*)))

(1)

A busca utilizando a expressão acima retornou 199 artigos os quais tiveram seus títulos e resumos analisados, verificando-se quais os que realmente estavam alinhados com a área de interesse. Após essa análise inicial, o número de artigos reduziu para 35, os quais foram analisados integralmente.

Após a leitura dos artigos verificou-se alguns termos também muito utilizados para designar os compostos presentes no óleo fúsel, tais como “*Volatile Compounds*”, “*Volatile By-Products*”, “*Volatile Metabolites*”, “*Higher Chain Alcohols*” e “*3-Methyl-1-*

Butanol". Então elaborou-se uma nova expressão booleana com a inclusão desses novos termos, conforme abaixo.

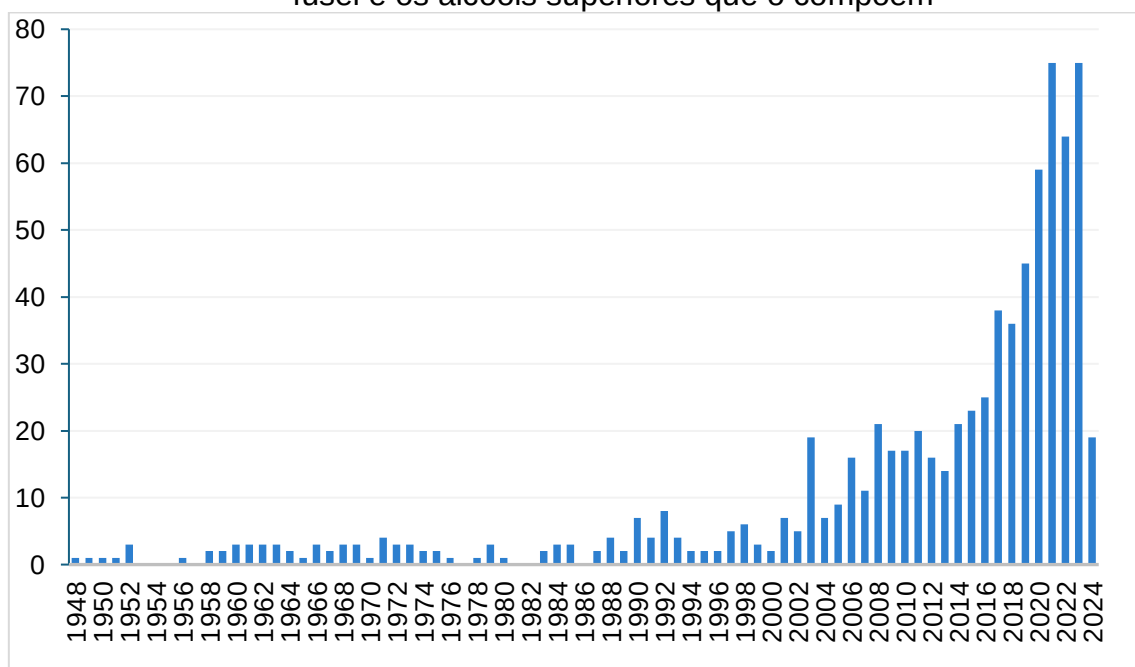
TI = ("Fusel Oil" OR "Fusel Alcohol" OR ("Higher Alcohols" AND (Ferment* OR Saccharomyces OR Yeast)) OR ("Isoamyl Alcohol" AND (Ferment* OR Saccharomyces OR Yeast)) OR ("3-Methyl-1-Butanol" AND (Ferment* OR Saccharomyces OR Yeast)) OR ("Volatile Compounds" AND (Ferment* OR Saccharomyces OR Yeast)) OR ("Volatile By-Products" AND (Ferment* OR Saccharomyces OR Yeast)) OR ("Volatile Metabolites" AND (Ferment* OR Saccharomyces OR Yeast)) OR ("Higher Chain Alcohols" AND (Ferment* OR Saccharomyces OR Yeast)))
(2)

A busca com a expressão acima retornou 490 artigos, os quais foram analisados para traçar um panorama da produção científica internacional na área de interesse.

Com base nessa pesquisa foi possível extrair informações relativas aos países de origem de cada publicação, à quantidade de publicações realizadas a cada ano e às instituições de ensino e pesquisa envolvidas na elaboração dos trabalhos. Constatou-se, por exemplo, que as 490 publicações encontradas se distribuem entre quatro diferentes bases de dados (*WOS*, *KJD*, *SCIELO* e *RSCI*), 3006 autores, e 285 instituições de pesquisa espalhadas pelo mundo.

A Figura 1 mostra o número de publicações sobre o óleo fúsel e os álcoois superiores que o compõem no período de 1948 até 2024.

Figura 1 – Distribuição temporal da produção científica internacional sobre o óleo fúsel e os álcoois superiores que o compõem



Fonte: O Autor (2024).

Fazendo uma análise década a década, percebe-se que as publicações aumentaram mais expressivamente a partir da primeira década deste século, quando o número de artigos duplicou em relação à década anterior. Foram publicados 114 artigos de 2000 a 2009, representando 23% do total de publicações. O destaque fica para a década atual, com a publicação de 258 artigos que representam 53% do total de trabalhos publicados na área. Vale ressaltar que o maior número de publicações ocorreu no ano de 2019, revelando a atualidade dos estudos relacionados ao óleo fúsel e seus constituintes.

A partir da leitura dos títulos e resumos dos artigos publicados fez-se a divisão em quatro grupos que possuem diferentes propostas de estudo (Tabela 1). O Grupo 1 reúne os artigos que tiveram por objetivo desenvolver métodos de análise de álcoois superiores ou que aplicaram algum método analítico para determinação, identificação e/ou acompanhamento dos álcoois superiores em diversos tipos de amostras, tais como vinho, suco de uva, bebidas destiladas e diferentes tipos de mosto fermentado. O Grupo 2 reúne os artigos que se dedicaram a estudar os mecanismos de formação dos álcoois superiores que compõem o óleo fúsel, bem como fatores que influenciam na formação desses álcoois e sua produção a partir de diferentes meios de fermentação. O Grupo 3 reúne os artigos cujo objetivo foi estudar possíveis aplicações

do óleo fúsel, bem como dos álcoois que o compõem, enquanto o Grupo 4 reúne os artigos que tiveram objetivos diversos e que não puderam ser classificados nos outros três grupos.

Tabela 1 - Distribuição dos artigos por grupo de acordo com seus objetivos

GRUPO	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	TOTAL
PERÍODO	nº de artigos	nº de artigos	nº de artigos	nº de artigos	
1940-1959	3	3	0	6	12
1960-1969	8	14	0	4	26
1970-1979	3	12	0	5	20
1980-1989	3	5	1	8	17
1990-1999	6	17	3	17	43
2000-2009	7	28	11	68	114
2010-2020	21	66	37	134	258

Fonte: O Autor. (2020).

A partir da pesquisa realizada foi possível verificar que os primeiros registros encontrados datam da década de 40 e início da década de 50 e relatam o óleo fúsel em destilados. A partir do início da década de 50 começaram a ser publicados artigos sobre o mecanismo de formação dos álcoois superiores que compõem o óleo fúsel, bem como desenvolvimento de métodos de determinação e identificação desses compostos em bebidas alcoólicas destiladas e sucos de uva.

Na década de 60 quadruplicou o número de artigos publicados na área de interesse, e foram publicados 26 artigos dos quais mais da metade (54%) se dedicaram a estudar o mecanismo de formação dos álcoois superiores que compõem o óleo fúsel, na sua maioria em bebidas fermentadas, principalmente o vinho. Nessa década foram identificados trabalhos que estudaram alguns fatores reacionais que podem afetar a formação do óleo fúsel durante a fermentação do suco de uva ou do crescimento celular em meio sintético, tais como a temperatura de fermentação e o tipo de levedura utilizada.

Nas décadas de 70 e 80 houve uma redução no número de artigos publicados, porém os trabalhos dedicados ao estudo do mecanismo de formação do óleo fúsel continuou maior em relação aos outros trabalhos. Dentre os trabalhos publicados nessas décadas foi identificado estudo sobre a redução dos álcoois superiores em vinho pelo uso de leveduras mutantes, desenvolvido por Rous, Snow e Kunkee (1983).

Na década de 90 o número de artigos publicados duplicou em relação às décadas anteriores. No início dessa década foi publicado um artigo que estudou a cinética da formação dos álcoois superiores em melaço de cana-de-açúcar (Cachot; Müller; Pons, 1991), também foram publicados os primeiros artigos sobre a aplicação do óleo fúsel na mistura com gasolina e para produção de ésteres (Karaosmanoglu; Isigigur; Aksoy, 1997; Küçük; Ceylan, 1998). Vale destacar que houve um aumento expressivo no número de publicações que tiveram objetivos diversos e que foram agrupados no Grupo 4 da Tabela 1.

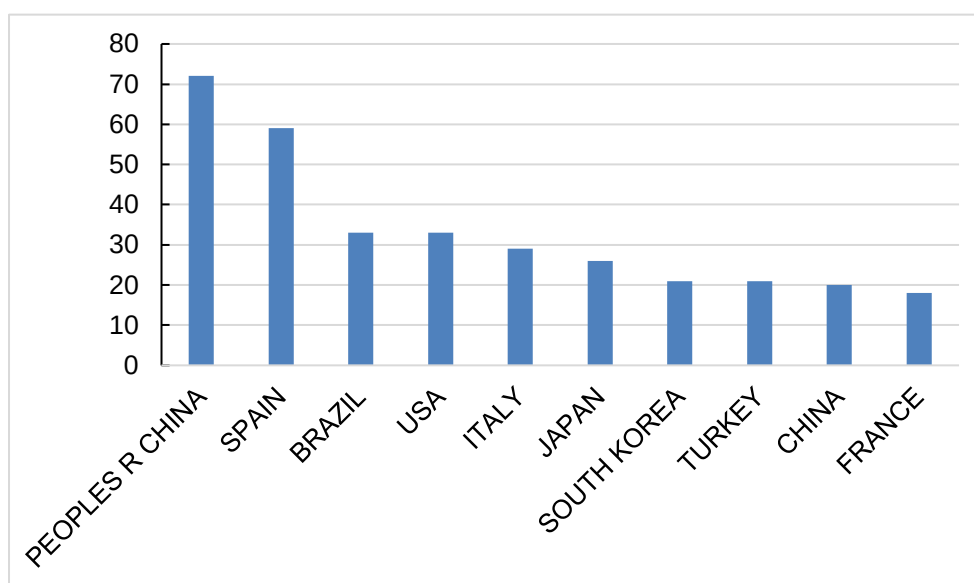
A partir dos anos 2000 o número de artigos publicados aumentou consideravelmente e os trabalhos dedicados à aplicação do óleo fúsel acompanhou esse crescimento, chegando a 11 publicações que representam quase 10% dos artigos publicados na década, dentre estes, propostas de aplicação para produção de ésteres, principalmente provenientes do álcool isoamílico (Nemestothy *et al.*, 2008; Bi *et al.*, 2008, 2009) e algumas propostas de aplicação na agricultura (Azania *et al.*, 2008). Destacam-se nessa década os artigos publicados por Patil, Koolwal e Butala (2002), que trata de uma revisão na literatura sobre a composição, remoção e potencial de utilização do óleo fúsel, com foco no óleo proveniente do melaço da cana-de-açúcar e cujos aspectos de utilização foram discutidos dentro do contexto indiano, e por Hazelwood *et al.* (2008), que trata de uma revisão na literatura sobre o mecanismo de formação dos álcoois superiores que compõem o óleo fúsel durante a fermentação.

Na década seguinte (2010-2019) o número de trabalhos publicados na área de aplicação desses subprodutos da fermentação continuou crescendo, chegando a 37 publicações das quais destacam-se propostas atuais de aplicação na produção de ésteres (Baião Dias *et al.*, 2018), na utilização como combustível misturado à gasolina e ao diesel (Abdalla *et al.*, 2019; Ardebili; Solmaz; Mostafaei, 2019; Akcay; Ozer, 2019) e até na produção de hidrogênio (Sumrunronnasak *et al.*, 2019).

No ano de 2020 foram identificados três artigos cujo objeto de estudo é o óleo fúsel ou os compostos voláteis que o compõem, sendo que um deles trata da aplicação do óleo fúsel, proveniente da indústria sucroenergética, como combustível (Calam, 2020).

A partir da pesquisa realizada também foi possível analisar a distribuição de artigos por país de origem da publicação (Figura 2) constatando-se que o Brasil aparece em terceiro lugar com 33 publicações, igualmente aos EUA e atrás da Espanha e da República da China que possuem 59 e 72 publicações, respectivamente. A Figura 2 mostra os 10 países que mais publicaram artigos na área de interesse.

Figura 2 – Distribuição por país de origem da produção científica internacional sobre o óleo fúsel e os álcoois superiores que o compõem



Fonte: O Autor (2020).

Os artigos de origem chinesa representam 14,7% dos trabalhos encontrados na pesquisa, sendo que 44,4% desses artigos foram publicados nos últimos dois anos. Vale ressaltar que os trabalhos publicados por esse país focam preponderantemente em matérias-primas e produtos de origem chinesa tais como sucos e bebidas fermentadas, principalmente com estudos sobre o mecanismo de formação dos álcoois superiores ou na determinação e identificação desses compostos. Quanto à aplicação, foram identificados 5 trabalhos com proposta de utilização do óleo fúsel como combustível misturado à gasolina, estudando o desempenho do motor e a potencialização da octanagem do combustível. Dentre os trabalhos com objetivos diversos, foram identificados artigos recentes com estudos sobre a redução dos álcoois superiores na fermentação de vinho de arroz (Zhong *et al.*, 2019) e modificação genética de leveduras para regular a produção desses álcoois (Li *et al.*, 2019).

As publicações de origem espanhola representam 12,0% dos trabalhos encontrados na pesquisa e focam predominantemente no vinho, com estudos sobre a formação e identificação dos compostos voláteis presentes na bebida e que compõem o óleo fúsel. Foram identificados artigos que avaliaram o efeito de alguns parâmetros, tais como espécie de levedura (Stribny *et al.*, 2015; Cortes; Blanco, 2011), pré-tratamento do vinho (Moreno-Perez *et al.*, 2013), concentração de SO₂ (Garde-Cerdan *et al.*, 2008) e temperatura de fermentação (Beltran *et al.*, 2008), todos realizados com vinho.

Em relação aos artigos de origem brasileira, esses representam 6,7% dos trabalhos encontrados na pesquisa, focam predominantemente na aplicação do óleo fúsel proveniente da indústria sucroenergética nacional, principalmente na produção de ésteres provenientes do álcool isoamílico (Tebas *et al.*, 2020; Vilas Bôas, 2018; Ceron *et al.*, 2018; Baião Dias *et al.*, 2018). Também foram identificados trabalhos com aplicação do óleo fúsel como herbicida (Azania *et al.*, 2008; 2010; Pizzo *et al.*, 2010). Em relação à estudos de fatores reacionais na formação dos álcoois superiores que compõem o óleo fúsel durante a fermentação, foram identificados artigos que estudaram a influência da suplementação e do tipo de levedura na formação dos álcoois superiores em cachaça (Vidal *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2009).

Ao avaliar a distribuição dos trabalhos científicos por instituição de ensino e pesquisa (Tabela 2), destacam-se: *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* – CSIC (Espanha) com 17 artigos colaborando com 3,5% do total de publicações, seguido pela *National University of Singapore* (Singapura) e *Universiti Malaysia Pahang* (Malásia), ambas com 10 artigos colaborando com 2,0% do total de publicações, cada.

Tabela 2 – Distribuição de artigos entre as 12 instituições de ensino e pesquisa que mais publicaram

Instituições	Registros	% do total de registros (490)
<i>Consejo Superior de Investigaciones Cientificas</i>	17	3,47
<i>National University of Singapore</i>	10	2,04
<i>Universiti Malaysia Pahang</i>	10	2,04
<i>INRAE</i>	9	1,84
<i>Instituto de Agroquímica y Tecnol. de los Alimentos Iata</i>	9	1,84
<i>Tianjin University Science Technology</i>	9	1,84
<i>University of Copenhagen</i>	9	1,84
<i>Ewha Womans University</i>	8	1,63
<i>Universidad de Cordoba</i>	8	1,63
<i>Gazi University</i>	7	1,43
<i>Sichuan University</i>	7	1,43
<i>Universidade Estadual de Campinas</i>	7	1,43

Fonte: O Autor (2020).

Em relação às instituições brasileiras, a Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) contribui com 7 artigos que representam 1,4% do total de publicações internacionais na área de interesse. A busca também apontou para a presença de outras instituições brasileiras além da Unicamp com duas ou mais publicações na área: Universidade de São Paulo, Universidade Federal de Lavras, Universidade Estadual Paulista, Instituto Agrônomo de Campinas, Universidade Federal de Ouro Preto, Universidade Federal de Pernambuco, Universidade Federal de Santa Maria, Universidade Federal de São Carlos e Universidade Federal de Viçosa. O número de publicações dessas instituições bem como a contribuição percentual em relação às publicações nacionais pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição de artigos entre as instituições brasileiras de ensino e pesquisa que tiveram duas ou mais publicações

Instituições	Registros	% do total de registros brasileiros (33)
Universidade Estadual de Campinas	7	21,21
Universidade de São Paulo	5	15,15
Universidade Federal de Lavras	5	15,15
Universidade Estadual Paulista	4	12,12
Instituto Agrônomo de Campinas	2	6,06
Universidade Federal de Ouro Preto	2	6,06
Universidade Federal de Pernambuco	2	6,06
Universidade Federal de Santa Maria	2	6,06
Universidade Federal de São Carlos	2	6,06
Universidade Federal de Viçosa	2	6,06

Fonte: O Autor (2020).

Para estabelecer um panorama da produção científica nacional a nível de mestrado e doutorado, foi feita uma busca na base de dados do Banco Digital de Teses e Dissertações (BDTD) no âmbito da plataforma de periódicos da CAPES. Foram identificados 31 registros alinhados com a área de interesse, sendo 12 teses e 19 dissertações.

Dentre os trabalhos identificados estão estudos de aplicação do óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres com propriedades aromáticas, emulsificantes e lubrificantes (Vilas Bôas, 2018), na formulação de nitratos orgânicos com potencialidade para atuar como pró-fármaco (Brandão, 2017), na produção de álcool isoamílico integrada à produção de etanol hidratado (Oliveira, 2017). Também foram identificados trabalhos que estudaram fatores reacionais sobre a formação dos compostos voláteis que compõem o óleo fúsel em cachaça (Garcia, 2016; Ribeiro, 2016; Souza, 2013) e em vinhos espumantes (Spadari, 2013), a separação dos álcoois superiores presentes no óleo fúsel e interferência desses compostos no processo de destilação (Mayer, 2014), desenvolvimento de sensor para determinação de álcoois superiores em óleo fúsel (Mariano, 2016) e análise desses compostos em aguardente de cana e espumantes (Aquino, 2013; Costa, 2013).

Ao analisar a distribuição das teses e dissertações por instituição de ensino e pesquisa (Tabela 4), verifica-se que a Universidade Estadual Paulista (UNESP) e a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) se destacam com 7 registros cada. Estas instituições juntas com a Universidade de São Paulo (USP) contribuem com 55% das publicações nacionais a nível de mestrado e doutorado. A Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), Universidade Federal de Viçosa (UFV) e Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) juntas contribuem com 26% das publicações. Essa expressiva contribuição dos estados de São Paulo e de Minas Gerais se justifica por se tratar de estados que estão entre os maiores produtores de etanol do Brasil. A Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) contribui com 13% das publicações, mais voltadas para vinhos e espumantes, fato justificado por se tratar de um estado grande produtor dessas bebidas. Já as instituições nordestinas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e Universidade Federal da Paraíba (UFPB) contribuem apenas com 6% do total de publicações, apesar de se tratar de uma região de expressiva produção de etanol, fato que aponta uma carência em desenvolvimento de pesquisas na área de interesse.

Tabela 4 – Distribuição das publicações nacionais a nível de mestrado e doutorado por instituição de ensino e pesquisa

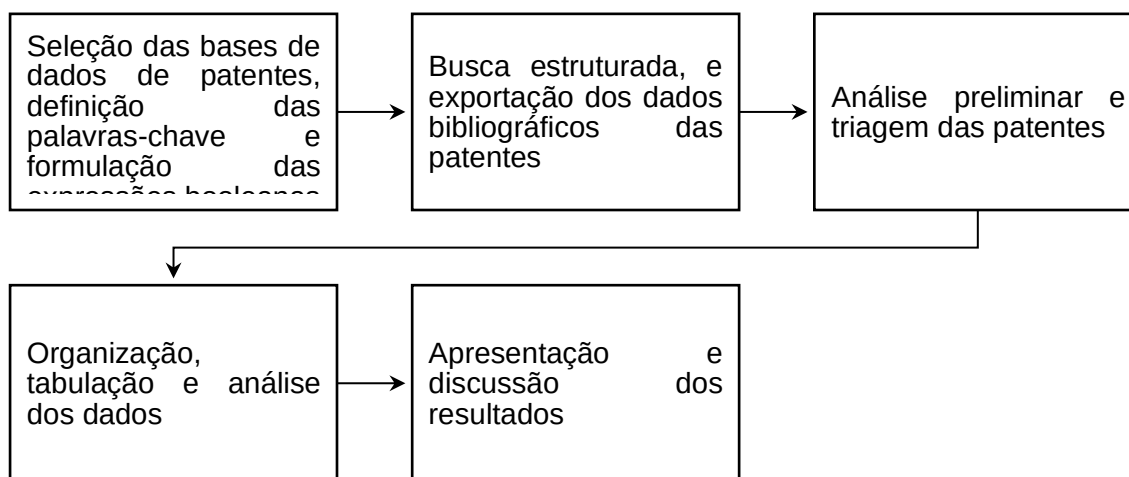
Instituição	nº de Registros
UNESP	7
UNICAMP	7
UFRGS	4
UFOP	4
UFV	3
USP	3
UFPE	1
UFMG	1
UFPB	1

Fonte: O Autor (2020).

PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DE PATENTES

As principais operações metodológicas aplicadas para a prospecção tecnológica de patentes na área de interesse deste trabalho podem ser observadas na Figura 3.

Figura 3 – Etapas metodológicas da prospecção realizada.



Fonte: O Autor (2020).

Inicialmente foi feita a imersão sobre a literatura que abrange o óleo fúsel e seus constituintes, principalmente o álcool isoamílico.

As bases de dados de patentes escolhidas para fazer o levantamento da produção tecnológica patenteada internacionalmente foram a base de dados da *Derwent Innovations IndexSM* (1963-presente) da plataforma da *Web of Science*, a base de dados da *Espacenet* do Escritório Europeu de Patentes (*European Patent*

Office - EPO), e a base de dados *Patentscope*[®] da *World Intellectual Property Organization* (WIPO).

A coleta de dados foi realizada no mês de março de 2020 e foi sistematizada em etapas, permitindo a prospecção tecnológica de patentes relacionadas ao óleo fúsel e seus constituintes, principalmente o álcool isoamílico.

A estratégia de busca de patentes foi estruturada com operadores booleanos “AND” e “OR” permitindo a formulação de expressões booleanas e maximizando as possibilidades de encontrar documentos de patentes mais alinhados com as tecnologias de interesse.

Na base de dados da *Derwent Innovations Index* da plataforma da *Web of Science* foi utilizada a opção de busca avançada (*advanced search*) no campo de busca título e no período todos os anos (1963-2020). Nessa base de dados foi inserida a expressão booleana (2) utilizada no levantamento bibliográfico.

Na base de dados *Espacenet* da EPO também foi utilizada a opção de busca avançada no campo de busca título e no período de todos os anos, porém foi preciso desmembrar a expressão booleana (2) em outras três expressões, devido à limitação de caracteres imposta pela plataforma. As expressões booleanas utilizadas nesta plataforma podem ser visualizadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Expressões booleanas utilizadas na *Espacenet*

	Expressão Booleana
1	ti all "Fúsel Oil" OR ti all "Fúsel Alcohol" OR (ti all "Higher Alcohols" AND (ti all "Ferment*" OR ti all "Saccharomyces" OR ti all "Yeast")) OR (ti all "Isoamyl Alcohol" AND (ti all "Ferment*" OR ti all "Saccharomyces" OR ti all "Yeast"))
2	(ti all "3-Methyl-1-Butanol" AND (ti all "Ferment*" OR ti all "Saccharomyces" OR ti all "Yeast")) OR (ti all "Volatile Compounds" AND (ti all "Ferment*" OR ti all "Saccharomyces" OR ti all "Yeast"))
3	(ti all "Volatile Metabolites" AND (ti all "Ferment*" OR ti all "Saccharomyces" OR ti all "Yeast")) OR (ti all "Higher Chain Alcohols" AND (ti all "Ferment*" OR ti all "Saccharomyces" OR ti all "Yeast"))

Fonte: O Autor (2020).

Na base de dados *Patentscope* da WIPO foi utilizada a opção de busca avançada nos títulos. No construtor de pesquisa foi inserida a expressão utilizada na base de dados *Derwent Innovations Index* com a substituição do “=” por “.”.

O levantamento da produção tecnológica patenteada no Brasil foi realizado na base de dados do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) na opção de busca avançada no campo de busca resumo. Devido às limitações de caracteres impostas pela plataforma foram utilizadas duas expressões booleanas com os termos traduzidos para a língua portuguesa conforme pode-se observar na Tabela 6.

Tabela 6 – Expressões booleanas utilizadas no INPI

	Expressão Booleana
1	(Óleo AND Fúsel) OR (Álcool AND Isoamílico) OR ((Álcoois AND Superiores) AND (Fermentação OR <i>Saccharomyces</i> OR Levedura)) OR ((Compostos AND Voláteis) AND (Fermentação OR <i>Saccharomyces</i> OR Levedura)) OR ((Subprodutos AND Voláteis) AND (Fermentação OR <i>Saccharomyces</i> OR Levedura))
2	((Metabólitos AND Voláteis) AND (Fermentação OR <i>Saccharomyces</i> OR Levedura)) OR ((Álcoois AND Cadeia AND Longa) AND (Fermentação OR <i>Saccharomyces</i> OR Levedura))

Fonte: O Autor (2020).

Após a pesquisa, os dados bibliográficos das patentes foram exportados para o *software Excel*. Foi realizada uma triagem para exclusão das patentes repetidas na mesma base e entre as demais bases de dados, levando-se em consideração a ordem da busca (*Derwent Innovations Index*, *Espacenet*, *Patentscope* e INPI), e das patentes desalinhadas com a área de interesse. Em seguida, os dados bibliográficos das patentes foram organizados, tabulados e analisados.

No levantamento da produção tecnológica nas bases retro mencionadas foram identificadas 490 patentes até o mês de março de 2020 (Tabela 7).

Tabela 7 - Número de patentes identificadas nas bases de dados pesquisadas

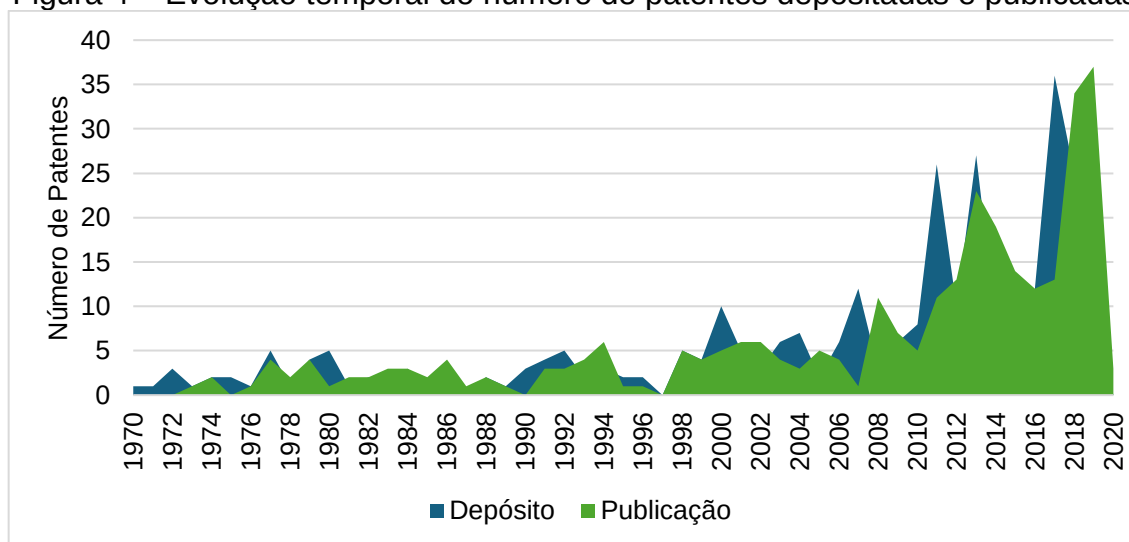
	<i>Derwent</i>	<i>Espacenet</i>	<i>Patentscope</i>	INPI
Nº de patentes identificadas	212	129	121	28
Nº de patentes após triagem	193	91	22	10

Fonte: O Autor (2020).

Após a leitura das informações básicas dos documentos de patentes, tais como títulos, autores e descrição, e baseando-se nos critérios de triagem estabelecidos, o número de patentes reduziu para um total de 316 (Tabela 7). A base de dados *Derwent Innovations Index* da plataforma da *Web of Science* aglutinou 61,08% das patentes selecionadas, enquanto *Espacenet*, *Patentscope* e INPI aglutinaram 28,80%, 6,96% e 3,16% respectivamente.

Na análise da evolução temporal do número de patentes depositadas e publicadas pôde-se observar que a primeira patente relacionada ao óleo fúsel foi depositada em 1894 e publicada em 1895, trata-se de uma tecnologia de melhoramento de aparelhos de destilação projetados para a fabricação de aguardente de uva pura e de uísques isentos de óleo fúsel. Depois desse registro só foram identificadas novas patentes no ano de 1905 e a partir de então o número de patentes continuou muito baixo e com expressivos espaços de tempo entre os novos registros. Só a partir de 1970 verifica-se depósito e publicação de patentes anual. A Figura 4 mostra a evolução do número de patentes depositadas e publicadas desde 1970 até o mês de março de 2020, quando a pesquisa foi realizada.

Figura 4 – Evolução temporal do número de patentes depositadas e publicadas



Fonte: O Autor (2020).

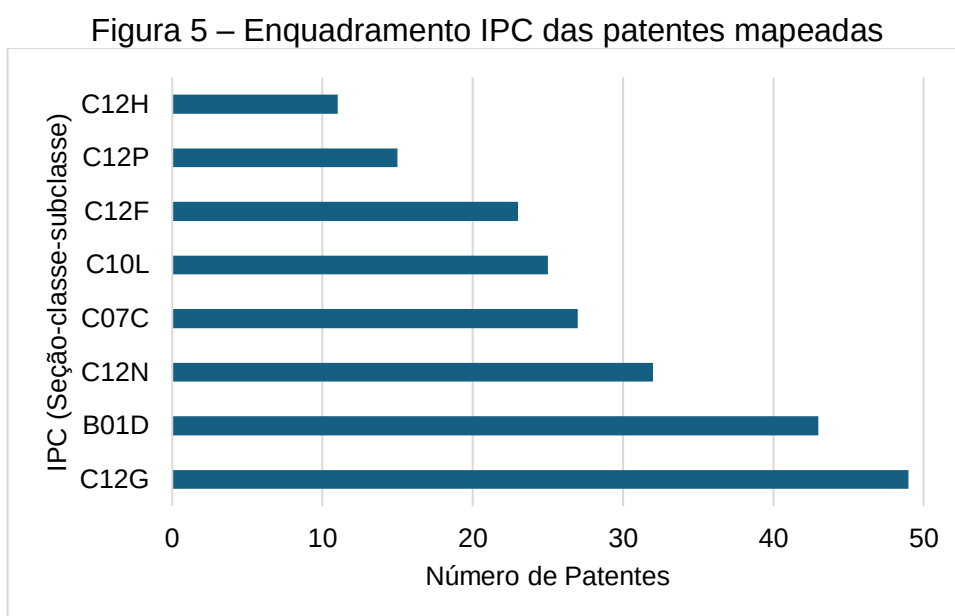
Observa-se pela Figura 4 um espaçamento entre os depósitos e as publicações das patentes, evidenciando-se a diferença temporal e o período demandado para análise dos depósitos das patentes. É possível observar um primeiro pico tecnológico mais expressivo nos anos 2000 e um acúmulo de patentes significativo na primeira

década deste século com o depósito de 60 patentes, correspondendo a 19% do total de patentes depositadas e identificadas nesta pesquisa, o dobro da década anterior. A partir de 2010 o número de patentes depositadas e publicadas foi intensificado, verificando-se um acúmulo de 171 patentes depositadas e 181 publicadas nesta última década, correspondendo a 54% e 57% do total de patentes identificadas, respectivamente. Em relação às patentes depositadas observa-se três picos tecnológicos nesta última década, o primeiro em 2011 com 26 patentes, o segundo em 2013 com 27 patentes e o terceiro em 2017 com 36 patentes. Já em relação às patentes publicadas observa-se dois picos neste mesmo período, o primeiro em 2013 com 23 patentes e o segundo em 2019 com 37 publicações, correspondendo a 12% do total de patentes publicadas.

Na análise da área tecnológica à que cada patente pertence, foi observado que a maioria (71,84%) foi enquadrada na seção “C” da classificação internacional de patentes (*International Patent Classification* - IPC), correspondente a “Química; Metalurgia”. Das 316 patentes identificadas, 141 foram enquadradas prioritariamente na classe C12 (bioquímica; cerveja; álcool; vinho; vinagre; microbiologia; enzimologia; engenharia genética ou de mutação) e 47 foram enquadradas na classe B01 (processos ou aparelhos físicos ou químicos em geral). Dentre as demais classes identificadas, as classes C10 (indústrias do petróleo, do gás ou do coque; gases técnicos contendo monóxido de carbono; combustíveis; lubrificantes; turfa) e C07 (química orgânica) foram as que enquadraram mais patentes com 28 registros cada.

Na Figura 5 é possível verificar os códigos de classificação IPC que apresentaram 10 ou mais patentes enquadradas. Pode-se observar que as subclasses que enquadraram mais patentes foram a C12G (vinho; sua preparação; bebidas alcoólicas; preparação de bebidas alcoólicas não contempladas nas subclasses C12C ou C12H) e a B01D (separação) que enquadraram 49 e 43 patentes cada, representando 15,51% e 13,61% do total de patentes identificadas, respectivamente. Dentre as demais subclasses que mais enquadraram patentes estão C12N (microrganismos ou enzimas; suas composições; propagação, conservação, ou manutenção de microrganismos; engenharia genética ou de mutações; meios de cultura), C07C (compostos acíclicos ou carbocíclicos), C10L (combustíveis não incluídos em outro local; gás natural; gás natural de sintético obtido por processos não abrangidos pelas subclasses C10G ou C10K; gás liquefeito de petróleo; uso de

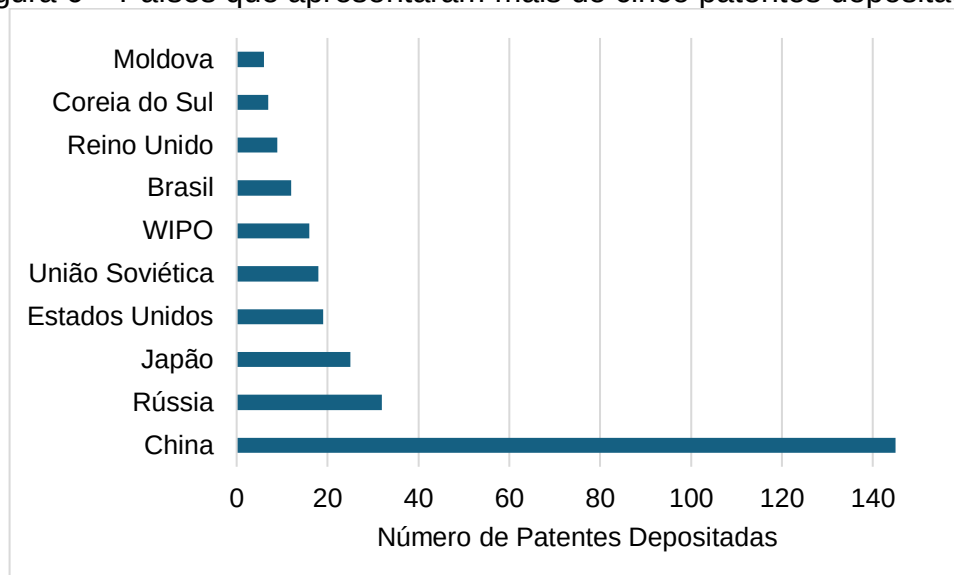
aditivos em combustíveis ou ao fogo; acendedores de fogo), C12F (recuperação de subprodutos de soluções fermentadas; álcool desnaturado; sua preparação), C12P (processos de fermentação ou processos que utilizem enzimas para sintetizar uma composição ou composto químico desejado ou para separar isômeros ópticos de uma mistura racêmica) e C12H (pasteurização, esterilização, preservação, purificação, clarificação ou envelhecimento de bebidas alcoólicas; métodos para alteração do teor de álcool de soluções fermentadas ou de bebidas alcoólicas).



Fonte: O Autor (2020).

Na análise dos países de origem do depósito das patentes, foi observado que a China ocupa a primeira colocação e se destaca no desenvolvimento de tecnologias associadas ao óleo fúsel e seus principais constituintes com 145 patentes, representando 45,89% das patentes mapeadas. Em segundo lugar está a Rússia com 10,13% das patentes mapeadas. Os demais países com cinco ou mais patentes somam juntos 11%. A Figura 6 mostra os países que apresentaram mais de cinco patentes depositadas, totalizando juntos 289 patentes, 91,46% do total.

Figura 6 – Países que apresentaram mais de cinco patentes depositadas.



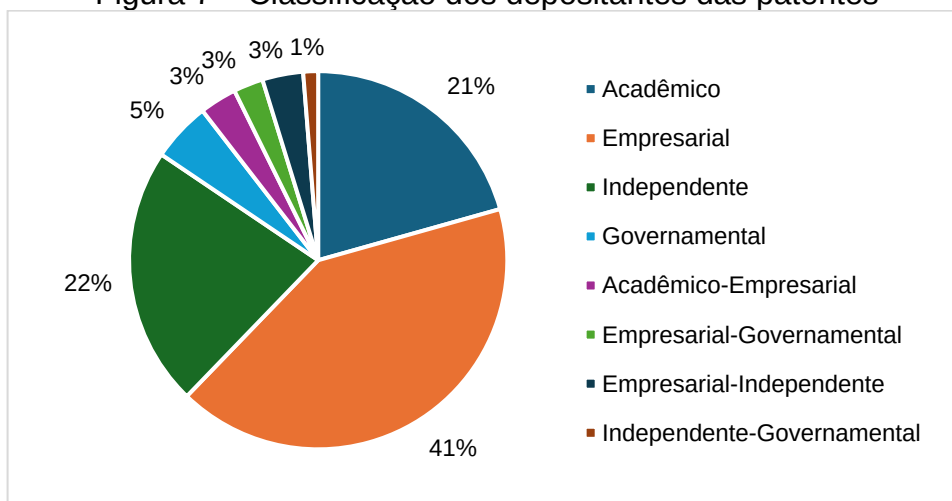
WIPO: World Intellectual Property Organization

Fonte: O Autor (2020).

O Brasil aparece na sétima colocação, responsável por apenas 12 patentes que correspondem a 3,80% do total. Essa contribuição pode ser considerada baixa em razão de se tratar de um grande produtor de óleo fúsel, porém a demora na análise dos processos de concessão de patentes pelo INPI pode ter uma contribuição expressiva para o fraco desempenho do país (Arnold; Santos, 2016). A Confederação Nacional da Indústria (CNI, 2014), atribui à morosidade do sistema nacional de patentes o desestímulo de potenciais inventores a buscarem a proteção patentária no Brasil.

Ao avaliar o perfil dos depositantes das tecnologias desenvolvidas na área de interesse desta pesquisa (Figura 7), pode-se observar que as empresas detêm a maior fatia da tecnologia com 41% das patentes. As universidades e instituições governamentais (institutos de tecnologia) possuem juntas 26% e os depositantes independentes (pessoa física) tem 22% das patentes.

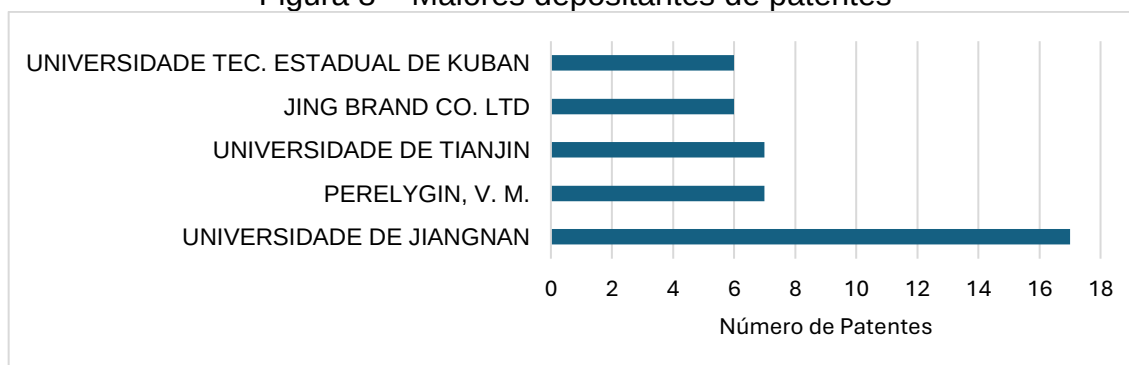
Figura 7 – Classificação dos depositantes das patentes



Fonte: O Autor (2020).

A Figura 8 mostra os depositantes que apresentaram mais de cinco patentes depositadas. A universidade chinesa de Jiangnan se destaca dos demais depositantes com 17 patentes, representando 5% do total de patentes mapeadas. Vale destacar também o depositante independente Perelygin com sete patentes depositadas.

Figura 8 – Maiores depositantes de patentes



Fonte: O Autor (2020).

A análise dos registros de patentes possibilitou identificar diferentes tecnologias na área de interesse deste trabalho. Dentre os publicados a partir dos anos 1999 estão o documento de patente de Gareev, Pershin e Bovt (1999) que apresenta uma tecnologia de recuperação e destilação de óleo fúsel para obtenção do álcool isoamílico; a patente de Misyukov *et al.* (2003) que descreve um método melhorado para produção de álcool isoamílico a partir do óleo fúsel originado na produção de etanol; e o documento de patente de Song, Fu e Tong (2004) que apresenta um método para separar e purificar simultaneamente álcool amílico óptico racêmico, álcool amílico óptico ativo e álcool isoamílico do óleo fúsel. Nessa mesma linha de

tecnologia foi identificada também a patente brasileira desenvolvida por pesquisadores da Unicamp e publicada em 2016 que descreve um método para recuperar álcool isoamílico, etanol e butanol do óleo fúsel.

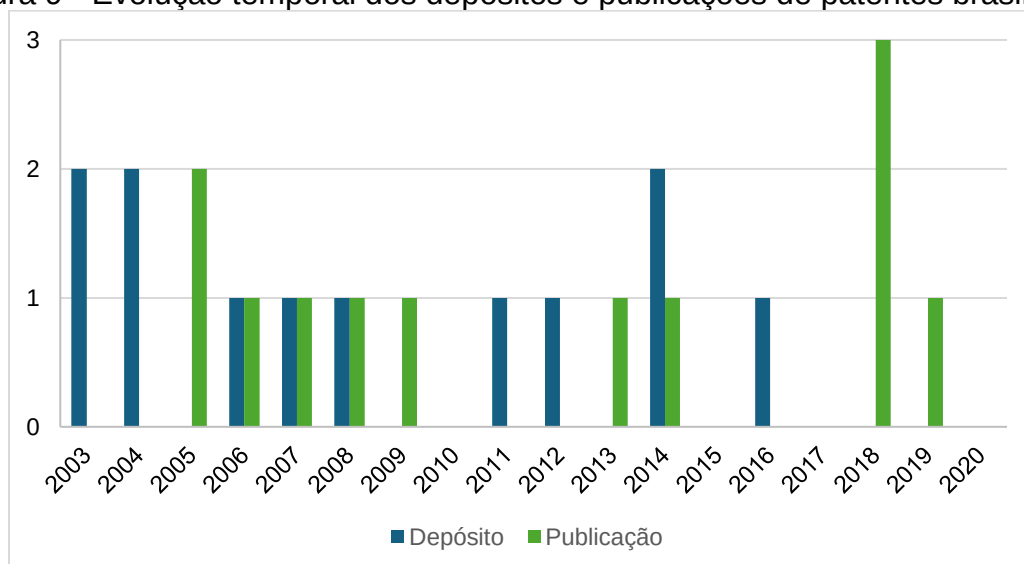
Nessa tecnologia o óleo fúsel é alimentado em um decantador e faz-se a adição de água ocorrendo a formação de um sistema bifásico (fase aquosa + fase orgânica), a fase orgânica é alimentada em uma coluna de destilação onde obtém-se o álcool isoamílico como produto de fundo, enquanto no topo é retirada uma mistura de metanol, etanol, propanol, butanol e água em óleo fúsel que é direcionada à novas colunas de destilação para separação e recuperação dos outros constituintes de interesse (Oliveira *et al.*, 2016).

Dentre as tecnologias voltadas à fermentação destacam-se o documento de patente de Abe e Horikoshi (2005) que descreve a utilização de uma cepa de levedura que produz 1,5 vezes mais álcool isoamílico e grandes quantidades de acetato de isoamila quando cultivada a uma pressão e temperatura de 10-100 MPa e 4-17 °C, respectivamente; e a patente de Xu, Chen e Wu (2013) que descreve uma nova cepa *Saccharomyces cerevisiae* com alto rendimento de etanol e baixo rendimento de óleo fúsel, útil para produção de cerveja e bebidas alcoólicas. O documento de patente de Li *et al.* (2014) descreve a utilização de uma nova cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Y19 capaz de produzir baixa quantidade de óleo fúsel. Esta levedura foi multiplicada em meio proveniente do arroz e utilizada na fermentação de mosto de sorgo sacarino. Já o documento de patente de Huo *et al.* (2017) apresenta um método para aumentar o teor alcoólico e reduzir o teor de álcool isoamílico utilizando um fermento selecionado da fermentação de vinagre.

A busca de patentes realizada no INPI retornou 28 registros que após análise para verificar o alinhamento com a área pretendida reduziu para 12.

Avaliando a distribuição temporal das patentes brasileiras (Figura 9) verifica-se que as primeiras patentes foram publicadas em 2003 e a partir de então não houve evolução significativa nos registros de patentes depositado anualmente na área. Pode-se observar também um maior espaço temporal entre os depósitos e as publicações nacionais em relação às internacionais, fato que ratifica as observações de Arnold e Santos (2016) e da Confederação Nacional da Indústria (CNI, 2014).

Figura 9 - Evolução temporal dos depósitos e publicações de patentes brasileiras



Fonte: O Autor (2020).

Analisando os registros encontrados foi possível verificar que as patentes brasileiras estão direcionadas, predominantemente à aplicação do óleo fúsel ou do álcool isoamílico (Hoffmann, 2005; Bizzarri *et al.*, 2007; Barreto; Mendes, 2008; Carvalho; Júnior, 2009; Santos *et al.*, 2013; Canto; Stelle; Pedreca, 2018; Jacquot *et al.*, 2019) e à recuperação destes através de processo de destilação (Meirelles; Batista, 2014; Meirelles; Oliveira; Batista, 2018; Oliveira *et al.*, 2016).

Em relação à formação de álcoois superiores na fermentação, foi encontrada apenas a patente de Brandão *et al.* (2005) que descreve um método de isolamento de *Saccharomyces cerevisiae* que produz elevados teores de álcoois superiores para utilização na fermentação de cachaça.

A baixa produção tecnológica brasileira em relação ao óleo fúsel e/ou dos álcoois superiores que o compõem, principalmente na área de formação destes durante a fermentação, apontam para a necessidade de intensificação das pesquisas que podem gerar tecnologias na área, principalmente considerando que o Brasil é um grande produtor de óleo fúsel.