

PROTOCOLO: DETERMINAÇÃO DA FORÇA FERMENTATIVA EM MEIO TAMPONADO

1. OBJETIVO

Avaliar a vitalidade de células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) através da medição da taxa de produção de CO₂ durante fermentação de sacarose em meio tamponado, eliminando variações causadas por queda de pH.

2. PRINCÍPIO DO MÉTODO

Células vitalizadas apresentam maior capacidade de fermentar sacarose, produzindo etanol e CO₂. A medição do volume de CO₂ liberado em tempo determinado, em condições padronizadas de pH, reflete diretamente a **atividade metabólica e vitalidade fermentativa** das células.

O uso de tampão fosfato estabiliza o pH durante o ensaio, permitindo:

- Tempos de ensaio prolongados (30-60 min)
 - Maior precisão e reprodutibilidade
 - Eliminação de interferências por acidificação do meio
-

3. MATERIAIS E REAGENTES

3.1 Equipamentos:

- Centrífuga (mínimo 4.000 rpm)
- Balança analítica (precisão 0,001 g)
- **Banho-maria com controle de temperatura (34°C)**
- **Frasco de Mariotte 2L** (reservatório de água)
- **Proveta graduada 250 mL** (medição de volume deslocado)
- Frascos Erlenmeyer de 250 mL (ou kitassato)
- Rolhas de borracha perfuradas (vedação)
- Tubos de vidro e mangueiras de silicone
- **Presilha** (pinça para mangueira)
- pHmetro
- Cronômetro

3.2 Reagentes:

- **Sacarose P.A.**
- **K₂HPO₄** (fosfato de potássio dibásico)
- **KH₂PO₄** (fosfato de potássio monobásico)
- **Água destilada ou deionizada**

3.3 Soluções:

Solução tampão fosfato 0,1 M (pH 6,0-6,5):

- K₂HPO₄: 11,6 g/L
- KH₂PO₄: 4,5 g/L
- Ajustar pH para 6,0-6,5 se necessário
- Autoclavar ou esterilizar por filtração

Meio de teste:

- Sacarose: **20 g/L**
- Tampão fosfato: **0,1 M, pH 6,0-6,5**
- Volume: **100 mL por amostra**

4. PROCEDIMENTO

4.1 Preparo da Amostra de Células:

1. Coletar amostra representativa do creme de levedura ou suspensão celular
2. Homogeneizar bem a amostra
3. Centrifugar a **4.500 rpm por 5 minutos**
4. Descartar o sobrenadante
5. Pesar **1,0 g de massa úmida** (células centrifugadas)

Nota: Realizar em **triplicata** para cada amostra/tratamento.

4.2 Determinação do Teor de Matéria Seca (MS):

Em paralelo, determinar o teor de matéria seca:

1. Pesar 1-2 g de massa úmida em cadinho previamente tarado
2. Secar em estufa a 105°C até peso constante (~24h)
3. Calcular **% MS = (massa seca / massa úmida) × 100**

Valor típico esperado: 25-35% MS

4.3 Montagem do Sistema de Medição de CO₂:

Sistema proposto:

Erlenmeyer (fermentação, 34°C)

↓ (mangueira)

Frasco Mariotte (2L, cheio de água, vedado)

↓ (mangueira com presilha)

Proveta 250 mL (coleta água deslocada)

A Figura 1 mostra esquematicamente o sistema utilizado para a determinação da força fermentativa.

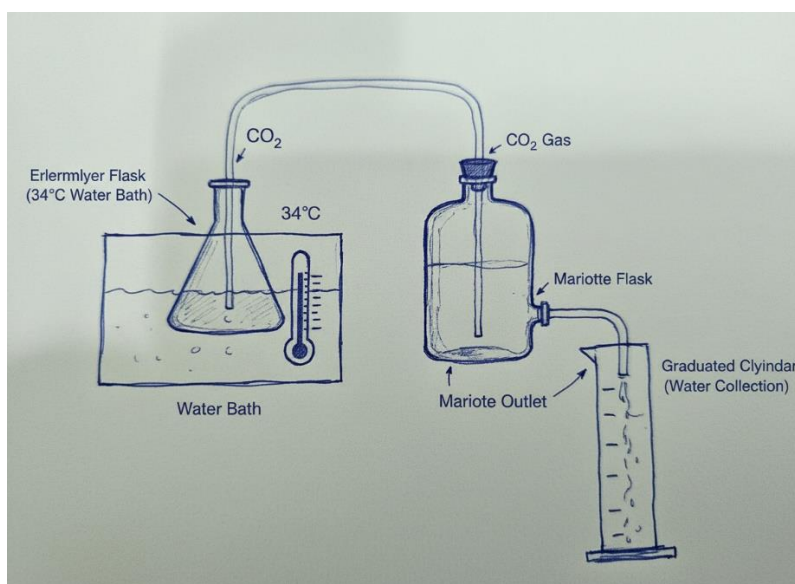


Figura 1. Sistema para a determinação da força fermentativa

Passo a passo da montagem:

1. Preparar o Frasco de Mariotte:

- Conectar tubo de saída do frasco de Mariotte à mangueira de silicone
- Colocar **presilha fechada** na mangueira (evita saída de água durante montagem)
- Encher completamente o frasco de Mariotte (2L) com água destilada
- Fechar com rolha de borracha com um furo para permitir a entrada de dióxido de carbono proveniente do frasco erlenmayer.

1. Preparar o Erlenmeyer de fermentação:

- Transferir **1,0 g de massa úmida** para Erlenmeyer de 250 mL utilizando o meio de fermentação contido no Erlenmeyer para garantir que toda a massa de célula foi transferida.
- Adicionar **100 mL de meio de teste** (20 g/L sacarose em tampão pH 6,0-6,5)
- Homogeneizar suavemente
- Fechar com rolha vedada contendo um furo para a saída de dióxido de carbono

1. Conectar o sistema:

- Conectar mangueira da **saída do Erlenmeyer à entrada do Mariotte**
- Verificar que todas as conexões estão bem vedadas
- Posicionar mangueira de saída do Mariotte sobre a proveta de 250 mL
- **Sistema deve estar totalmente vedado antes de iniciar**

4.4 Incubação e Medição:

Preparação:

1. Colocar o Erlenmeyer no **banho-maria a 34°C**
2. Aguardar **2-3 minutos** para estabilização térmica
3. Verificar que o sistema está vedado

Zeragem do sistema:

4. **Remover a presilha** da mangueira
5. **Aguardar** a água cair do Mariotte até formar vácuo (cessa o fluxo)
6. **Descartar a água** da proveta (volume morto do sistema)
7. **Posicionar proveta limpa** sob a mangueira
8. **Iniciar cronômetro (t_0)** quando começar a borbulhar CO_2

Durante o teste:

9. CO_2 produzido entra no Mariotte e desloca água
10. Água sai pela mangueira e cai na proveta
11. Medir o volume de água deslocada nos tempos:
 - **30 minutos** (medição rápida)
 - **60 minutos** (medição padrão recomendada)

Observação: O volume de água deslocada corresponde ao volume de CO_2 produzido.

4.5 Leitura Final:

1. Anotar o **volume de água** (em mL) na proveta = **volume de CO₂**
2. Medir **pH final** do meio (verificar eficácia do tampão)
3. Anotar temperatura (deve estar em 34°C)
4. Descartar conteúdo apropriadamente

5. CÁLCULOS

5.1 Força Fermentativa (FF):

$$FF = V_{CO_2} / (MS \times t)$$

Onde:

- **FF** = Força fermentativa (mL CO₂ / g MS × h)
- **V_{CO₂}** = Volume de CO₂ liberado (mL)
- **MS** = Massa seca de células (g)
- **t** = Tempo de ensaio (h)

5.2 Exemplo de Cálculo:

Dados:

- Volume CO₂ em 60 min = 180 mL
- Massa úmida = 1,0 g
- Teor MS = 30%
- MS = 1,0 × 0,30 = 0,3 g
- Tempo = 60 min = 1,0 h

Cálculo:

$$FF = 180 / (0,3 \times 1,0) = \mathbf{600 \text{ mL CO}_2 / (g \text{ MS} \times h)}$$

6. INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

6.1 Valores de Referência Orientativos:

Volume CO ₂ (60 min)	FF	Classificação	Observação
> 180 mL	> 600	Excelente	Células altamente vitalizadas
150-180 mL	500-600	Muito Boa	Células em ótimo estado fisiológico
120-150 mL	400-500	Boa	Células em bom estado
90-120 mL	300-400	Adequada	Células funcionais
< 90 mL	< 300	Baixa	Regeneração necessária

Nota: Valores calculados para 0,3 g MS em 60 min. Ajustar conforme experiência de cada processo.

6.2 Aplicações:

- Comparar FF **antes e depois** de tratamentos regenerativos (ex: aeração)
- Monitorar FF ao longo de ciclos fermentativos com reciclo
- Avaliar impacto de diferentes matérias-primas na vitalidade
- Estabelecer valores mínimos aceitáveis para cada processo

Ganho esperado após regeneração aeróbica: até **40%** de aumento na FF

7. CONTROLE DE QUALIDADE

7.1 Brancos e Controles:

- **Branco:** meio de teste sem células (verificar produção espontânea de CO₂ - deve ser zero)
- **Controle positivo:** células frescas de inóculo conhecido (estabelecer referência)

7.2 Precisão:

- Realizar **triplicatas** para cada amostra/tratamento
- Calcular média e desvio padrão

- **Desvio padrão aceitável: < 10% da média**

7.3 Validação do Tampão:

- Medir pH inicial e final do meio
- **ΔpH deve ser < 0,5 unidades** para validar eficácia do tampão
- Se $\Delta\text{pH} > 0,5$: aumentar concentração do tampão ou reduzir tempo de ensaio

7.4 Validação do Sistema de Medição:

- Verificar vedação antes de cada ensaio
- Confirmar que não há vazamentos de CO_2
- Checar formação adequada de vácuo no Mariotte

8. OBSERVAÇÕES E CUIDADOS

- ⚠ **Vedação perfeita:** Garantir vedação completa em todas as conexões (rolhas, mangueiras) para evitar escape de CO_2
 - ⚠ **Temperatura constante:** Manter banho-maria rigorosamente a 34°C durante todo o ensaio
 - ⚠ **Zeragem adequada:** Descartar completamente a primeira água que cai na proveta após remover a presilha
 - ⚠ **Homogeneização inicial:** Células devem estar bem dispersas no meio antes de fechar o sistema
 - ⚠ **Sem aeração:** Evitar aeração da suspensão durante o teste (fermentação anaeróbica)
 - ⚠ **Limpeza rigorosa:** Lavar todo material com água destilada antes do uso
 - ⚠ **Posição da proveta:** Manter a boca da proveta abaixo do nível de saída do Mariotte
-

9. VANTAGENS DO MÉTODO COM TAMPÃO

Aspecto	Sem Tampão	Com Tampão Fosfato
Tempo máximo viável	20-30 min (queda pH)	60-120 min (pH estável)
Reprodutibilidade	Moderada	Alta
Precisão	Boa	Excelente
Sensibilidade	Limitada	Elevada
Discriminação entre tratamentos	Baixa	Alta
Custo	Baixo	Ligeiramente maior
Aplicação	Rotina rápida	Estudos detalhados

10. REGISTRO DE DADOS

Sugestão de planilha de registro:

Data	Amostra	Massa Úmida (g)	% MS	M S (g)	Tempo (min)	Vol. CO ₂ (mL)	FF	pH in	pH fim

Cálculos automáticos sugeridos:

- $MS (g) = \text{Massa úmida} \times (\% MS / 100)$
- $\text{Tempo (h)} = \text{Tempo (min)} / 60$
- $FF = \text{Vol. CO}_2 / (MS \times \text{Tempo em h})$
- Média FF (triplicatas)
- Desvio padrão

- Coeficiente de variação (%)
-

11. REFERÊNCIAS TÉCNICAS

- Método adaptado de Pierce (1970) com modificações
 - Método adaptado do CT-Copersucar com modificações
-

12. NOTAS FINAIS

Este protocolo foi desenvolvido especificamente para avaliar o impacto de **tratamentos regenerativos** (aeração sem substrato) na vitalidade de células de levedura recicladas em processos industriais de produção de etanol.

A metodologia permite discriminar com alta precisão diferenças de vitalidade entre células tratadas e não tratadas, sendo particularmente útil para validar estratégias alternativas ao tratamento ácido convencional.

Desenvolvido por: Silvio Roberto Andrietta

Aplicação: Avaliação de vitalidade celular em processos fermentativos industriais
