



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional - CTDR
Departamento de Tecnologia Sucroalcooleira-DTS



TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES AO MOSTO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE O RENDIMENTO DE ETANOL

ISABELLE FERNANDA PEREIRA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Solange Maria de Vasconcelos.

João Pessoa-PB

2020



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional - CTDR
Departamento de Tecnologia Sucroalcooleira–DTS



**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES AO
MOSTO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE O
RENDIMENTO DE ETANOL**

Aluno(a): ISABELLE FERNANDA PEREIRA

Trabalho de Conclusão do Curso de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para a obtenção do grau de Tecnólogo em Produção Sucroalcooleira.

Orientadora: Prof. Dra. Solange Maria de Vasconcelos.

João Pessoa, PB

2020

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P436a Pereira, Isabelle Fernanda.

Análise da influência da adição de nutrientes ao mosto de melão de cana-de-açúcar sobre o rendimento de etanol /Isabelle Fernanda Pereira. - João Pessoa, 2020.

42 f. : il.

Orientação: Solange Maria de Vasconcelos.

Monografia (Graduação) - UFPB/CTDR.

1. Melão. 2. Fermentação. 3. Etanol. 4. Rendimento. I. Vasconcelos, Solange Maria de. II. Título.

UFPB/BC

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE NUTRIENTES AO MOSTO DE MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR SOBRE O RENDIMENTO DE ETANOL

TCC aprovado em 26/03/20 como requisito para a conclusão do curso de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira da Universidade Federal da Paraíba.

BANCA EXAMINADORA:

Solange Maria de Vasconcelos

Prof.^a. Dr.^a. Solange Maria de Vasconcelos - (UFPB – Orientadora)

Kelson Carvalho Lopes

Prof. Dr. Kelson Carvalho Lopes - (UFPB – Membro interno)

Laís Campos Teixeira Carvalho Gonçalves

Prof.^a. Dr.^a. Laís Campos Teixeira Carvalho Gonçalves - (UFPB – Membro Interno)

Dedico este trabalho a Deus e aos meus familiares!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus em sua trindade por ter me concedido o dom da vida e posso dizer que até aqui me ajudou o Senhor.

Agradeço a meu pai, aos meus irmãos e amigos pelo apoio e em especial a minha mãe Lenilda que sempre me incentivou, sofreu, alegrou-se por mim, quando todos estavam dormindo era ela que ia me buscar todos os dias, não importava o tempo.

Agradeço ao meu noivo Jailton Márcio, por todo incentivo, companheirismo, paciência e ajuda. Te amo!

Ao casal José Nilton e Ana Paula, pela amizade, ajuda e apoio.

Quero agradecer a Usina Monte Alegre pelos materiais cedidos para o meu trabalho experimental. Agradeço a gerente industrial Dr^a Marlene Oliveira pela liberação dos materiais, por sempre receber de braços abertos professores e alunos do curso de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira. Agradeço a encarregada do laboratório Zilma Alvez pela amizade, confiança, ajuda e conhecimento. Agradeço ao encarregados Sr. Paulo pela oportunidade de conhecer seu setor e de me ajudar a crescer em conhecimento como profissional. Agradeço em especial aos meus companheiros de trabalho do laboratório de etanol que sempre contribuíram para o meio desenvolvimento profissional.

Agradeço a minha orientadora Prof.^a. Dr^a. Solange Maria de Vasconcelos pela sua paciência, seu tempo e conhecimento dentro e fora da sala de aula.

Quero agradecer a todos os professores que passaram seus conhecimentos e pela compreensão.

Agradeço a todos quem fazem parte do CTDR. Em especial aos técnicos dos laboratórios à Diego, Zé Carlos, Claudinha, Ana Débora e ao técnico administrativo Leonardo e ao senhor Marcos, obrigada por tudo!

Por fim, agradeço a todos os amigos e companheiros de jornada acadêmica, por todas as ajudas, incentivos e por todos os momentos alegres. Não irei citar nomes, para não esquecer de ninguém. Amo vocês!

RESUMO

A busca por combustíveis de fontes renováveis que sejam sustentáveis e eficientes tem se elevado com o passar dos anos. Ao se observar o processo histórico de produção do etanol, é necessário evidenciar sua importância como combustível – considerado o combustível limpo e do futuro. O Brasil é o país pioneiro no desenvolvimento de tecnologia para produção deste biocombustível e atualmente, é o segundo maior produtor mundial. Sendo no caso do Brasil, as principais matérias-primas utilizadas para a obtenção do etanol, o caldo da cana-de-açúcar e o melaço. O melaço é um subproduto da produção de açúcar, em sua composição apresenta abundância em açúcares, algumas vezes se faz necessária a sua suplementação, especialmente com sais de nitrogênio e fósforo. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência dos nutrientes a base de nitrogênio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e de fósforo (KH_2PO_4) sobre o rendimento de etanol obtido da fermentação, usando como mosto o melaço de cana-de-açúcar. Antes do processo fermentativo propriamente dito, foi realizada uma etapa de tratamento do melaço e de preparação do inóculo, este correspondendo a 10% de volume total de mosto. O inóculo foi submetido a 30 °C e 200 rpm. Foram realizados 5 ensaios fermentativo, todos em duplicata, em frascos de Erlenmeyer com um volume final de mosto de 150 mL, na temperatura a de 30 °C, pH 4,5, agitação de 100 rpm, em incubadora shaker (LUCCA 223), utilizando 10% inóculo (%m/v), sendo o agente fermentativo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Safale US-05). O final da fermentação foi determinado quando o °Brix manteve-se constante após três leituras consecutivas. O processo finalizou após de 22 horas de fermentação. Os teores alcoólicos dos experimentos 1 a 5, ficaram entre 6,05 – 6,40 °GL. O rendimento do etanol oriundo dos açúcares variou de 0,17 a 0,20 $\text{g}_{\text{etanol}}/\text{g}_{\text{glicose}}$, sendo o maior rendimento obtido quando se utilizou o nutriente KH_2PO_4 a uma concentração de 0,34 g/L. A adição do $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e a adição conjunta $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 , praticamente não apresentaram efeito sobre o rendimento de etanol, quando comparados ao mosto sem adição de nutrientes. Já a eficiência da fermentação (relação entre o rendimento prático e o teórico máximo) variou entre 33,42 e 39,31%.

Palavras-chave: Melaço, nutrientes, fermentação, etanol, rendimento.

ABSTRACT

The search for fuels from renewable sources that are sustainable and efficient has increased over the years. When observing the historical process of ethanol production, it is necessary to highlight its importance as a fuel - considered the clean and future fuel. Brazil is the pioneer country in the development of technology for the production of this biofuel and is currently the second largest producer in the world. In the case of Brazil, the main raw materials used to obtain ethanol, sugarcane juice and molasses. Molasses is a by-product of sugar production, in its composition it has an abundance of sugars, sometimes supplementation is necessary, especially with nitrogen and phosphorus salts. The present work aims to evaluate the influence of nutrients based on nitrogen ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) and phosphorus (KH_2PO_4) on the ethanol yield obtained from fermentation, using sugarcane molasses as must. Before the fermentation process itself, a step was taken to treat molasses and prepare the inoculum, corresponding to 10% of the total volume of must. The inoculum was subjected to 30 °C and 200 rpm. Five fermentative tests were carried out, all in duplicate, in Erlenmeyer flasks with a final volume of must of 150 mL, at a temperature of 30 °C, pH 4.5, shaking at 100 rpm, in a shaker incubator (LUCCA 223), using 10% inoculum (%m/v), the fermenting agent being the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Safale US-05). The end of the fermentation was determined when the °Brix remained constant after three consecutive readings. The process ended after 22 hours of fermentation. The alcoholic levels of experiments 1 to 5, were between 6.05 - 6.40 ° GL. The yield of ethanol from sugars ranged from 0.17 to 0.20 g_{ethanol}/ g_{glucose}, the highest yield being obtained when the nutrient KH_2PO_4 was used at a concentration of 0.34 g/L. The addition of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and the combined addition $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and KH_2PO_4 , had virtually no effect on ethanol yield, when compared to wort without added nutrients. The fermentation efficiency (ratio between practical and maximum theoretical yield) varied between 33.42 and 39.31%.

Keywords: Molasses, nutrients, fermentation, ethanol, yield.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Perfil da produção de etanol.	16
Figura 2- Fluxograma da produção do melaço destinado a fermentação a partir da produção de açúcar.....	19
Figura 3- Processos fermentativos realizados em incubadora shaker.	27
Figura 4- Processo de destilação do vinho sistema de destilação fracionada.....	28
Figura 5- Curva de calibração para determinação de açúcares redutores.....	29
Figura 6- Processo de verificação de teor alcoólico no ebulliômetro	29
Figura 7- Redução do teor de sólidos dissolvidos (°Brix) em função do tempo de fermentação (Ensaio 1 a 5).	31
Figura 8- Rendimento de etanol em relação ao consumo de açúcares redutores.	34
Figura 9- Eficiência dos processos fermentativos.	36
Figura 10- Concentração de etanol após destilação.....	38

LISTA DE TABELA

Tabela 1- Planejamento da adição de nutrientes ao mosto de melaço.	26
Tabela 2 - Acompanhamento do decaimento dos sólidos solúveis dissolvidos (°Brix) durante o processo fermentativo.....	30
Tabela 3 - Concentrações de açúcares redutores no início e no final da fermentação.	32
Tabela 4 - Massa de açúcares redutores.	32
Tabela 5 - Teor alcoólico determinado ao final da fermentação.	33
Tabela 6 - Teor alcoólico do destilado.	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Objetivo	14
1.1.1 Objetivo Geral	14
1.1.2 Objetivos Específicos.....	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Produção de Etanol no Brasil	15
2.2 Fermentação Alcoólica	17
2.3 Matérias-primas utilizadas para obtenção de etanol por via fermentativa	17
2.3.1 Melaço	18
2.4 Fatores que interferem no processo fermentativo.....	19
2.4.1 Agente de fermentação	20
2.4.2 Nutrição mineral e orgânica	20
2.4.3 Temperatura	21
2.4.4 pH	21
2.4.5 Contaminação bacteriana	22
2.4.6 Subprodutos da fermentação	22
2.5 Rendimento e Eficiência.....	23
2.6 Destilação	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Melaço (Substrato)	25
3.2 Teor de Sólidos Dissolvidos (°Brix) do melaço	25
3.3 Linhagem de levedura	25
3.4 Tratamento de Melaço	25
3.5 Preparo do inóculo.....	26
3.6 Experimentos Fermentativos	26
3.7 Destilação	27

3.8 Metodologia Analítica	28
3.8.1 Determinação de Açúcares Redutores	28
3.8.2 Determinação da Graduação Alcoólica.....	29
3.8.3 Correção do pH.....	30
3.8.4 Teor alcoólico do destilado	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Determinação do teor de sólidos dissolvidos (°Brix)	30
4.2 Concentração de Açúcares Redutores	31
4.3 Rendimento e eficiência	33
5 CONCLUSÃO.....	39
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se observado uma crescente demanda por combustíveis e associado a isto, há preocupações com o aquecimento global. Diante deste cenário, a busca por combustíveis de fontes renováveis que sejam sustentáveis e eficientes tem se elevado. Dentre estes, o etanol está garantindo seu espaço para substituir os combustíveis fósseis esgotáveis, pois é economicamente viável, sendo o Brasil, o país pioneiro no desenvolvimento de tecnologia para produção deste biocombustível e atualmente, é o segundo maior produtor mundial (BAYENS *et al.*, 2015 *apud* ZAVITOSKI, 2016).

A principal matéria-prima para a produção do etanol nos Estados Unidos é o milho, já no Brasil, o etanol é principalmente produzido a partir do caldo da cana-de-açúcar e do melaço. Somando a produção do etanol desses dois países, eles produzem cerca de 89% da produção global (LIMA, RICKE, *et al.*, 2012 *apud* DUDEK, 2017).

Numa indústria sucroalcooleira, no processo de fabricação de açúcar, o melaço é o principal subproduto. A cada tonelada de cana processada são produzidos cerca de 40 a 60 kg do melaço. O Brasil utiliza o melaço na fabricação de etanol, por este apresentar uma taxa alta de açúcares totais e outros componentes. Mas, a sua qualidade está diretamente relacionada ao processo de fabricação do açúcar e da própria matéria-prima, a cana-de-açúcar. O melaço também pode ser designado para outros processos como matéria-prima para a produção de rações, levedura prensada destinada à panificação, produção de proteínas, antibióticos, entre outros (MUTTON, *et al.*, 2012).

No Brasil, a produção de etanol é feita quase que exclusivamente através de fermentação do mosto de caldo de cana-de-açúcar ou melaço, ou ainda pela mistura destes dois componentes, sendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o agente fermentativo mais utilizado (SILVA *et al.*, 2008).

Entretanto, para o crescimento e o desenvolvimento dos microrganismos seja de qual for o tipo, é necessário que o substrato (mosto) supra as demandas nutricionais e que seja viável economicamente.

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a influência dos nutrientes a base de nitrogênio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ e de fósforo (KH_2PO_4) sobre o rendimento de etanol obtido da fermentação, usando como mosto o melaço de cana-de-açúcar.

1.1 Objetivo

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da adição dos nutrientes a base de nitrogênio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e de fósforo KH_2PO_4 ao mosto de melaço de cana-de-açúcar, sobre o rendimento de etanol.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da adição de nutrientes a base de nitrogênio e fósforo sobre a produção de etanol a partir do melaço de cana-de-açúcar, variando as concentrações destes;
- Realizar a fermentação utilizando uma linhagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae*;
- Acompanhar o processo fermentativo, ao longo do tempo, através da redução do teor de sólidos dissolvidos (°Brix);
- Determinar a concentração de açúcares redutores no início e final da fermentação;
- Determinar os rendimentos de etanol e eficiências dos ensaios fermentativos;
- Destilar o vinho obtido para determinação do teor alcoólico;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de Etanol no Brasil

Historicamente, a produção de etanol no Brasil surge na época das Capitanias, quando havia a produção de aguardente a partir de resíduos da produção do açúcar. Até o final do século XIX, quando começaram a produção industrial de álcool etílico, a partir do melaço proveniente da indústria açucareira, que expandiu sua capacidade de produção, o único álcool elaborado no Brasil foi o das bebidas destiladas: a cachaça. O etanol era muito usado, no século XX para finalidade doméstica e em pequenas indústrias farmacêuticas (ZANARDI; COSTA JUNIOR, 2016).

Como combustível, no Brasil, o etanol vem sendo utilizado desde a década de 1920, quando a Usina Serra Grande, localizada em Alagoas elaborou o carburante para motores do Ciclo Otto, que era uma mistura de 79,5% de etanol anidro, 20% de éter e 0,5% de óleo de mamona refinado. Entretanto, foi apenas em 1931, através do decreto nº 19.717, que o Governo Federal oficializou o etanol como combustível e estabeleceu a obrigatoriedade de 5% de etanol à gasolina (VASCONCELOS, 2012).

Durante o período da Segunda Guerra Mundial, em meio a tantos acontecimentos, a exportação de açúcar para a Europa declinou, acarretando a redução da importação de petróleo, tornando natural até 1945, o uso de gasolina e óleo diesel. Neste momento da conjuntura mundial e brasileira, iniciaram-se ações de valorização da indústria alcooleira (ZANARDI; COSTA JUNIOR, 2016)

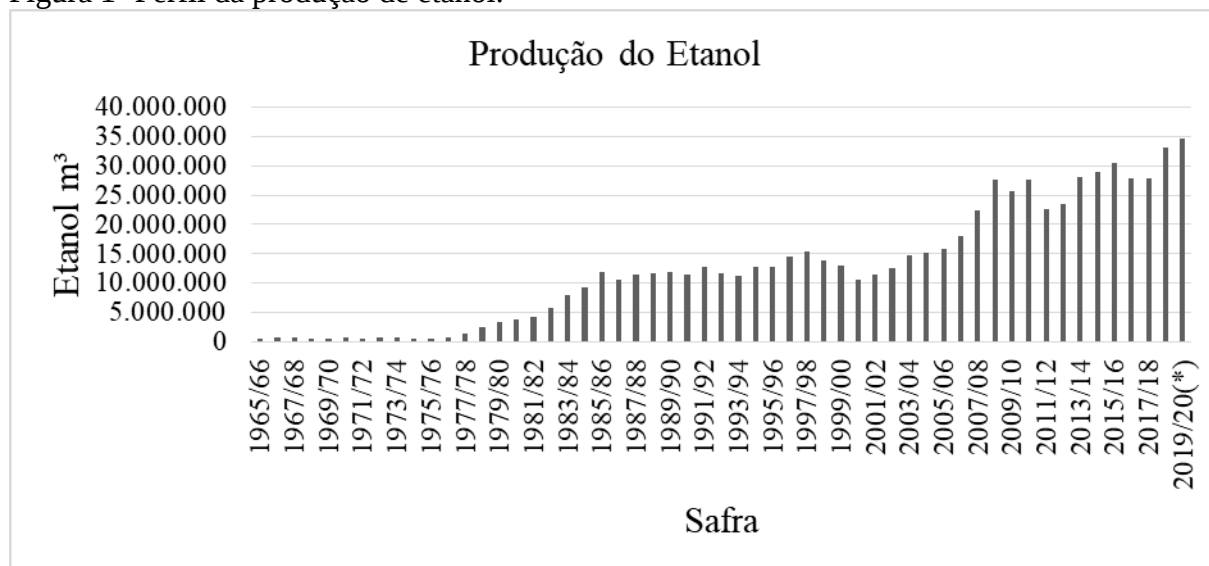
Ao se observar o processo histórico de produção do etanol, é necessário evidenciar sua importância como combustível – considerado o combustível limpo e do futuro. Em 14 de novembro de 1975, por força do decreto nº 76.593 foi implementado o Proálcool como ação brasileira ao primeiro choque do petróleo (1973), e intensificado no segundo choque (1979) (ZANARDI; COSTA JUNIOR, 2016). Inicialmente, o Proálcool teve como objetivo aumentar a produção de etanol e diminuir a importação de petróleo. Como incentivo, a instituição governamental oferecia financiamento para a expansão da capacidade de produção do parque sucroalcooleiro nacional, modernização e ampliação de destilarias anexas existentes, implantação de destilarias autônomas. Posterior ao desenvolvimento do programa, se aumentou a mistura de álcool anidro à gasolina (BRAY; FERREIRA; RUAS, 2000; VASCONCELOS, 2012). Depois, na segunda fase do Proálcool, a finalidade era a utilização do etanol hidratado em automóveis (SHIKIDA; BACHA, 1999).

O programa se consolidou e o etanol tornou-se um dos mais significativos combustíveis líquidos de biomassa do mundo, sendo ultrapassado, em volume de etanol, apenas em 2005 pelo os Estados Unidos da América (EUA) (VASCONCELOS, 2012; LEITE *et al.*, 2009). Entretanto, em 1986 devido à redução do financiamento, liberado pelo governo, e subsídios para o aumento das usinas, a queda do preço do petróleo e o acréscimo no preço (mundial) do açúcar, houve uma redução na produção de etanol. Mesmo assim, a produção manteve-se maior que antes da implementação do programa (ZANARDI; COSTA JUNIOR, 2016).

Antes do Proálcool, a produção de etanol no Brasil era de cerca de 600 milhões de litros (safra 1974/75), e com o seu surgimento chegou na safra de 1985/86, a aproximadamente 12 bilhões de litros, a qual se manteve estável até a safra de 1995/96. A produção da cana-de-açúcar avançou de 74,5 milhões de toneladas na safra de 1974/75 para 602,7 milhões na safra de 2009/2010 (VASCONCELOS, 2012).

Através da Figura 1 é possível observar o perfil da produção de etanol ao longo das diferentes safras, onde a partir da safra 2006/2007 essa produção vem se elevando, alcançando na safra 2019/2020, até o último boletim do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, uma produção da ordem de 35 bilhões de litros de etanol total.

Figura 1- Perfil da produção de etanol.



Fonte: Autor, 2020.

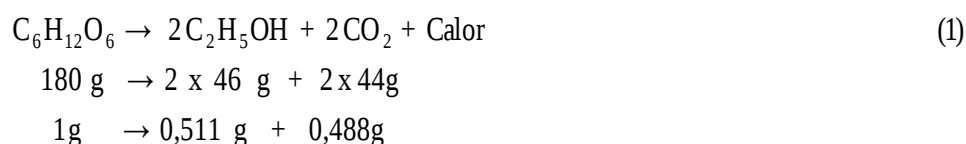
Adaptado de MAPA, 2013; MAPA, 2015; MAPA (Secretária de Política Agrícola), 2020.

(*) Valores atualizados em 13/02/2020.

Há diferentes processos para obtenção do etanol, como por exemplo, a via sintética, através de hidrocarbonetos não saturados, de gases de petróleo e da hulha, e através da via fermentativa que, no caso do Brasil é a mais importante e utilizada, devido à variedade de matérias-primas disponíveis (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

2.2 Fermentação Alcoólica

A fermentação alcoólica é o processo de transformação de açúcar em etanol e CO₂ por ação das leveduras num processo anaeróbio, cuja reação geral está representada abaixo (Equação 1), também conhecida por Equação de Gay Lussac, sendo utilizada com frequência como base de cálculo para quantificar o rendimento da fermentação (SILVA; JESUS; COUTO, 2000).



O processo fermentativo é dividido em três partes: o preparo do substrato, a fermentação e a destilação (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

No caso do processo descontínuo, a fermentação possui três fases diferentes: i) a fase preliminar – *fase lag*, inicia com o contato da levedura com o mosto, provocando uma intensa proliferação das leveduras, sendo facilitada pela aeração do mosto; ii) a fase principal e de maior duração, na qual acontece uma intensa liberação de CO₂, acontece o acréscimo de etanol e a diminuição do °Brix; iii) na fase complementar acontece a diminuição da intensidade do CO₂, e da densidade do vinho e finaliza a concentração do açúcar (REGULY, 1998; SOUSA; MONTEIRO, 2011).

2.3 Matérias-primas utilizadas para obtenção de etanol por via fermentativa

As matérias-primas utilizadas para a produção de etanol, via fermentação, são de origem agrícola. Para ser considerada matéria-prima para a produção de etanol, deve conter glicose, frutose sacarose, amido, celulose, etc. Qualquer produto que contenha açúcar ou outro carboidrato se torna em matéria-prima para a obtenção do etanol. Vários países usam as matérias-primas diversificadas para a produção de etanol, como por exemplo, os Estados Unidos, que utilizam o milho, o Canadá e a China, que fazem uso do milho e do trigo e no

caso do Brasil, a cana-de-açúcar (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001; VASCONCELOS, 2012).

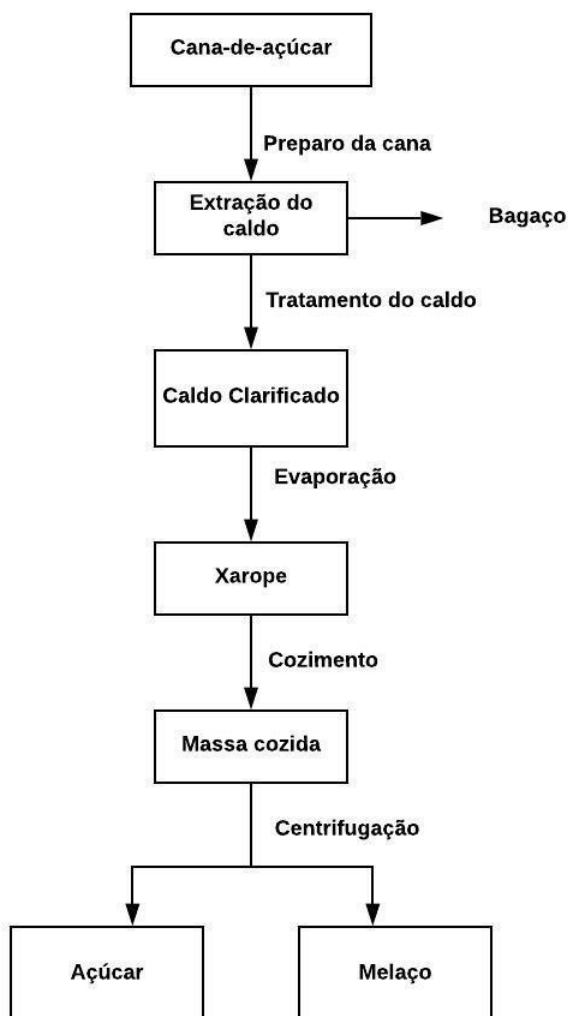
A partir da utilização dessas matérias-primas, no sentido de aumentar a produção de etanol, relacionada ao propósito de diminuir os impactos ambientais ocasionados pelo uso dos combustíveis fósseis, deu-se uma corrida em todo o mundo pelo desenvolvimento de pesquisas relacionadas ao uso de subprodutos da agroindústria. Dependendo da matéria-prima utilizada e das etapas de processamento, o etanol passou a ser chamado de primeira, segunda e terceira geração. As mais utilizadas no Brasil para a produção de etanol são a cana-de-açúcar e o melaço, subproduto do processo de fabricação do açúcar. A matéria-prima, utilizada na fermentação, pode ser: açucarada (cana-de-açúcar, beterraba, melaço, etc.); amilácea (milho, arroz, mandioca, etc.) e, celulósica (madeira, resíduos agrícolas, etc.) (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

2.3.1 Melaço

O melaço de cana-de-açúcar é um líquido denso, de cor parda escura, rico em açúcares, que contém uma pequena quantidade de água, sendo obtido do processo de fabricação do açúcar, após centrifugação da massa cozida (Figura 2). Apesar de em sua composição apresentar abundância em açúcares, algumas vezes se faz necessária a suplementação, especialmente com nutrientes como sais de nitrogênio e fósforo (VASCONCELOS, 2012).

Segundo Lima, Basso e Amorim (2001), de modo geral a composição do melaço depende do processo de produção do açúcar, apesar disso, pode-se reconhecer que o mesmo apresenta, até 62% de açúcares, 20% de água, 8% de cinzas, 3% de matérias nitrogenadas e 7% de outros que pode considerar como gomas e ácidos. Na porcentagem de açúcares especificam-se 32% de sacarose, 14% de dextrose e 16% de levulose. Portanto é incorreto informar que o melaço conta com 50% de açúcares fermentescíveis.

Figura 2- Fluxograma da produção do melaço destinado a fermentação a partir da produção de açúcar.



Fonte: Autor, 2020.

2.4 Fatores que interferem no processo fermentativo

Existem vários fatores que interferem na fermentação, entre os quais estão os fatores físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e microbiológicos (espécie, linhagem e concentração da levedura, contaminação bacteriana) que agem diretamente no rendimento da fermentação, isto é, na eficácia da transformação de açúcar em etanol (CARDOSO, 2006). Conforme Lima, Basso e Amorim (2001), o declínio na eficácia da fermentação é gerado por uma mudança da estequiometria do processo, proporcionando a maior formação de produtos secundários e biomassa.

2.4.1 Agente de fermentação

Os microrganismos mais importantes na produção do etanol por fermentação são as leveduras. Na fermentação alcoólica, a levedura utilizada é a *Saccharomyces cerevisiae*, desta foram escolhidas várias derivações: *Saccharomyces ellipsoideus*, *S. carlsbergensis* e *S. uvarum*. Cada tipo citado possui suas próprias características, condicionada por meio do processo fermentativo desenvolvido. A execução do processo fermentativo é grandemente afetada pelo tipo de levedura que o realiza. As fermentações começam com uma linhagem específica de levedura, com grupos puros fornecidas por empresas especializadas, elas são isoladas ou obtidas através de uma qualificação genética (LIMA; BASSO; AMORIM; 2001).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um microrganismo heterotrófico, unicelular, facultativo e se multiplica por brotamento. Entre os vários microrganismos produtores de etanol, permanece como a principal espécie e se evidencia como uma excelente produtora de etanol. Esta levedura se torna a mais adequada devido a sua capacidade fermentativa, de converter os açúcares rapidamente em álcool, tolerância a variações de temperatura e atividade celular em ambiente ácido (ZANARDI; COSTA JUNIOR, 2016).

Esta espécie é essencial para o processo industrial por causa da tolerância elevada ao álcool e outros inibidores e a capacidade de crescer rapidamente exposto as condições anaeróbias. Nos dias atuais, diversas ferramentas e técnicas estão sendo utilizadas com finalidade na fermentação, com intuito de melhorar o desempenho fermentativo e as linhagens existentes em lugares específicos de processos de fermentação industrial, especialmente pesquisas alicerçadas em imobilização de células (MUSSATTO; FERNANDES; MILAGRES, 2007).

2.4.2 Nutrição mineral e orgânica

Segundo Camili e Cabello (2007), os nutrientes são necessários para o bom desenvolvimento da fermentação, afetando a velocidade e a multiplicação da levedura. A concentração adequada de nutrientes do mosto é de suma importância, pois se presentes em quantidades insuficientes ou exageradas, podem interferir de forma negativa sobre o processo fermentativo.

As leveduras necessitam de uma fonte de carbono preparada que ofereça a energia química e a estrutura carbônica de suas estruturas celulares, formadas de carbono, oxigênio e hidrogênio. Algumas vitaminas são obrigatórias, como tiamina e ácido pantotênico. Ainda, o meio deve oferecer nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês,

cobre, ferro, cobalto, iodo entre outros elementos. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* usa o nitrogênio de forma amoniacal (NH_4^+), amídica (ureia) ou amínica (na forma de aminoácidos), não possui característica de metabolismo para o aproveitamento do nitrato e com baixa capacidade de usar as proteínas do meio. O fósforo é absorvido na forma de íon H_2PO_4^- , forma em pH 4,5, assim, o enxofre pode ser associado ao sulfato, sulfito ou tiosulfato (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

2.4.3 Temperatura

As temperaturas entre 26 °C e 35 °C contribuem para a produção industrial de álcool, entretanto, em alguns casos a temperatura nas destilarias ficam elevadas, atingindo 38°C. Quando a temperatura sobe, a velocidade da fermentação sofre alteração, aumentando, e expõe o produto a uma contaminação bacteriana e a levedura fica mais sensível à toxicidade do álcool. E, também, é necessário manter o controle da temperatura no processo industrial para que aconteça a de etanol em dornas abertas (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Sobre a temperatura, Ribeiro (2006), sugere que a temperatura ideal para a multiplicação das leveduras situa-se entre 28° a 30° C.

Temperaturas mais baixa diminuem a atividade do fermento, enquanto as mais elevadas favorecem o desenvolvimento de bactérias indesejáveis, provocando o enfraquecimento das leveduras.

Durante o processo de fermentação, a temperatura deve ser sempre mantida, pois uma pequena variação pode ocasionar perdas durante o processo, como por exemplo, inibição da levedura, onde o açúcar ficará na dorna, local onde ocorre a fermentação (FERMENTEC, 1978 *apud* SOUSA; MONTEIRO, 2011).

2.4.4 pH

O pH tem influência marcante nas fermentações industriais, devido à sua importância no controle de contaminação bacteriana, ao seu efeito sobre o crescimento de leveduras, às taxas de fermentação e à formação de subprodutos (VASCONCELOS, 2012). Para Chiaradia e Pasta (2004), o potencial hidrogeniônico ou mesmo pH, é um valor que determina o grau de acidez ou basicidade em um meio. O pH nas fermentações precisa estar entre 4 e 5. No processo fermentativo com o reuso da levedura é necessário fazer o seu tratamento com ácido sulfúrico em pH de 2,0 e 3,2 em média por uma hora com objetivo de reduzir a carga

microbiana a fermentação tem início com valores de pH baixos, concluindo com valores de 3,5 e 4,0 (LIMA, BASSO E AMORIM, 2001).

2.4.5 Contaminação bacteriana

O processo de fermentação pode sofrer contaminação bacteriana se não acontecer em condições completa de assepsia. Altas temperaturas de fermentação contribuem para a contaminação, ela está relacionada ao aumento da formação de ácido láctico, sendo considerado como o principal responsável por acidente de fermentação alcoólico (LIMA, BASSO E AMORIM, 2001).

Os gêneros de bactérias, que prejudicam o processo de fermentação, são denominadas como homofermentativas. As que são responsáveis pela formação de ácido láctico em maior quantidade e as heterofermentativas, que produzem além do ácido láctico, como também outros ácidos orgânicos, como por exemplo, acético e fórmico (FERMENTEC, 1978 *apud* SOUSA; MONTEIRO, 2011).

2.4.6 Subprodutos da fermentação

No processo fermentativo alcoólico não há apenas a formação de etanol, mas também são produzidos biomassa e outros subprodutos. Entretanto essa produção é muito menor se comparada com a produção do etanol e gás carbônicos. O principal produto da fermentação é o etanol, que em condições normais o teor alcoólico chega por volta de 12% a 14% v/v. Já o segundo é o gás carbônico que seu rendimento de 0,4 a 0,5 gramas de CO₂ por gramas de açúcar degradado consumido (BARRE *et al.*, 2004).

Dos componente orgânicos secundários, encontrado em maior proporção na fermentação alcoólica está o glicerol, que origina-se em razão de condições de estresse, para proteger e restaurar danos as estruturas moleculares. Os demais subprodutos são produzidos em menores quantidades, tais como álcoois superiores e ácidos orgânicos. Consequentemente, a produção desses subprodutos e o crescimento celular da levedura, afetarão diretamente na produção de etanol (BAI; ANDERSON; MOO-YOUNG; *et al.*, 2008 *apud* CRUZ, 2015).

A produção do glicerol no processo fermentativo ocorre sobre interferência linhagens existente no meio, do pH, da concentração da sacarose e da temperatura. Em geral, quanto maiores os valores destes fatores, maior será a produção de glicerol (GUTIERREZ, 1991).

Já as causas fisiológicas que acarretam a levedura a produzir e excretar o ácido succínico até então são questionáveis; consideram-se que sua formação se deve a um meio

fermentativo inapropriado, pois não há evidência de necessidade metabólica desse ácido pela levedura, na proporção em que é produzido. Dentre os demais ácidos orgânicos, o ácido succínico tem a maior concentração no processo fermentativo alcoólico. A presença do ácido succínico aparenta confirmar as leveduras maior competitividade com as bactérias contaminantes, o que é notado durante uma fermentação alcoólica (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Nas destilarias a presença de álcoois superiores no processo de fermentação alcoólica é indesejável pois dificulta a obtenção do etanol puro.

Denominam-se álcoois superiores os que possuem em sua estrutura mais de dois átomos de carbono, do mesmo modo que álcool isobutílico, propanol, o álcool isoamílico, álcool isobutílico, butanol e entre outros. Esses são semelhantes e subprodutos da fermentação alcoólica (PATIL, KOOLWAL, BUTALA *et al*; 2002 *apud* SILVA, 2019).

Há vários parâmetros considerados que podem levar à formação de álcoois superiores, tais como, pH, variedade da levedura, concentrações de açúcares, temperatura, nível de aeração, dentre outros (BARRE, *et al*, 2004).

A formação de álcoois superiores nas leveduras ocorrem através da descarboxilação de cetoácidos intermediários da biossíntese de aminoácidos seguida de redução de aldeídos pela desidrogenase alcoólica (WEBB; INGRAHAM, 1963 *et al*; *apud* NOVA, 2008).

2.5 Rendimento e Eficiência

O rendimento em gramas de etanol por gramas de substrato consumido, $Y_{P/S}$ e a eficiência do processo fermentativo são calculados através das Equações 2 e 3, respectivamente.

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (2)$$

$$\text{Eficiência (\%)} = \frac{Y_{P/S}}{0,511} \times 100\% \quad (3)$$

Onde:

$Y_{P/S}$ = rendimento de produto em substrato ($g_{\text{etanol}}/g_{\text{glicose}}$)

S = concentração de substrato (g/L)

P = concentração de produto (g/L)

0,511 = Valor estequiométrico - Equação geral da fermentação ou equação de Gay Lussac (Equação 1 – item 2.2).

2.6 Destilação

A destilação é uma operação física unitária que busca a separação de componentes de uma mistura, conforme a volatilidade relativa dos componentes, esse procedimento é efetivado através da ebulição e condensação parciais da mistura que se quer separar e/ou purificar. Os vapores produzidos são normalmente mais ricos nos componentes mais voláteis do que o líquido, possibilitando assim a separação de frações enriquecidas nos componentes desejados (BARRETO; COELHO, 2011).

Quando se trata de uma substância única, o líquido destilado tem a mesma composição do líquido inicial. Entretanto, quando se trata de um conjunto de líquidos imiscíveis, o destilado encerra o líquido que tem ponto de ebulição mais baixo (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

No caso do etanol, obtido por processo fermentativo, ao final do processo os meios açucarados passam a denominar-se vinhos, com uma composição variável, porém, finaliza-se em substâncias gasosas, sólidas e líquidas. A água e o etanol são os líquidos essenciais em porcentagens variantes, respectivamente, em 88 a 93% e 12 a 7% nos vinhos comuns. Os álcoois amílico, isoamílico, propílico, butílico, isobutílico, aldeídos, ácidos, furfural, ésteres e ácidos orgânicos são líquidos de pequena importância em relação ao volume, entretanto, são elementos que afetam a qualidade dos destilados especialmente, no caso das aguardentes – impurezas voláteis. A glicerina também se forma durante a fermentação. Assim, a partir desse material impuro e heterogêneo, o etanol é separado através da destilação (em grau de pureza e concentração variáveis). É importante evidenciar que, quanto à maneira de condução, a destilação pode ser classificada em intermitente – realizadas em alambiques e se limita a pequenas destilarias de cachaça, e contínua – acontece em toda a produção de álcool (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Tecnologia Sucroalcooleira e de Microbiologia do Centro de Tecnologia e Desenvolvimento Regional da UFPB.

3.1 Melaço (Substrato)

O melaço com aproximadamente 70 °Brix, utilizado nos experimentos fermentativos, foi cedido pela Usina Monte Alegre, sendo obtido da produção referente à safra 2018/2019.

3.2 Teor de Sólidos Dissolvidos (°Brix) do melaço

A determinação do Brix consiste na medida do índice de refração das soluções, e sua conversão a sólidos solúveis totais (°Brix), através de refratômetro. O melaço ao chegar ao laboratório de Tecnologia Sucroalcooleira teve o seu °Brix verificado em refratômetro com escala de 0 a 95 °Brix (NOVA DR 500), sendo diluído em seguida, de forma a atender à condição da fermentação.

3.3 Linhagem de levedura

A linhagem de levedura utilizada no processo fermentativo foi a *Saccharomyces cerevisiae* (Safale US-05).

3.4 Tratamento de Melaço

O melaço já diluído nas concentrações adequadas para o preparo do inóculo e da fermentação, foi submetido a uma etapa de tratamento, com o objetivo de remoção das partículas sólidas minerais e de redução da carga microbiana, que porventura estivessem presentes.

Essa etapa consistiu em uma filtração, usando papel de filtro, ajuste do pH médio inicial de 5,40 até atingir o pH final de 4,5, com solução de ácido sulfúrico (H_2SO_4 3 mol L⁻¹) e, em seguida foi submetido a um aquecimento de 65 °C, em banho-maria, por 40 min, sendo essas condições de temperatura e tempo já utilizadas anteriormente por Azevêdo (2017).

3.5 Preparo do inóculo

Antes do processo fermentativo propriamente dito, foi realizada a etapa de preparação do inóculo, correspondente a 10% de volume total de mosto (150 mL).

Nessa etapa, foi realizada a multiplicação, adaptação e ativação das células de levedura, partindo-se de 1,5 g de levedura seca e 15 mL de melaço a 5 °Brix (10% de levedura em %m/v). O inóculo foi submetido a 30 °C e 200 rpm.

3.6 Experimentos Fermentativos

No desenvolvimento dos processos fermentativos utilizou-se como mosto, o melaço, diluído a 15 °Brix, sem adição de nutrientes e com adição, conforme dados apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Planejamento da adição de nutrientes ao mosto de melaço.

Experimento	Fonte de Nitrogênio (g/L)	Fonte de Fósforo (g/L)
1	0,00	0,00
2	1,20	0,00
3	0,00	0,34
4	1,20	0,34
5	0,60	0,17

Fonte: Autor, 2020

Todas as fermentações foram realizadas em duplicata, em frascos de Erlenmeyer com um volume final de mosto de 150 mL, na temperatura a de 30 °C, pH 4,5, agitação de 100 rpm, em incubadora shaker - LUCCA 223 – (FIG. 3).

Figura 3- Processos fermentativos realizados em incubadora shaker.



Fonte: Autor, 2020.

O processo fermentativo foi monitorado pela leitura do °Brix em refratômetro digital Nova DR500. O final da fermentação foi determinado quando o °Brix manteve-se constante após três leituras consecutivas.

No início da fermentação e ao final do processo, filtraram-se 5mL da amostra para análise de açúcares redutores presentes no substrato e no produto.

O vinho obtido ao final fermentação foi centrifugado em centrífuga de bancada (NOVA/Ni-1811) com uma rotação de 4000 rpm/3 min.

3.7 Destilação

Uma fração de 60 mL do vinho foi centrifugada e em seguida destilada em um sistema de destilação fracionada, utilizando a manta de aquecimento (DIAGTECH/HM-1000), com temperatura de 78 à 80 °C, como mostra a Figura 4.

Foram coletados 10 mL do destilado, para medição da sua graduação alcoólica em °GL.

Figura 4- Processo de destilação do vinho
sistema de destilação fracionada.



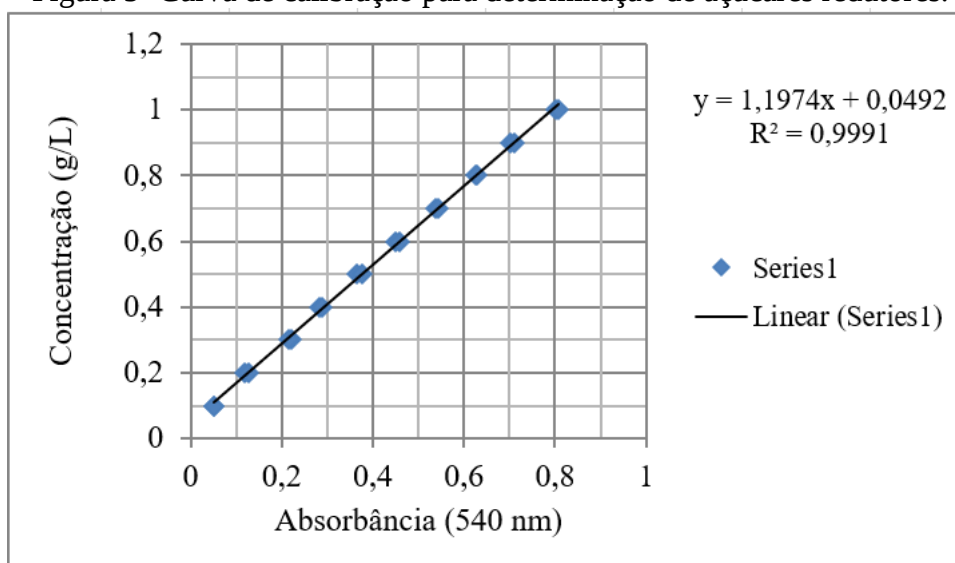
Fonte: Autor, 2020.

3.8 Metodologia Analítica

3.8.1 Determinação de Açúcares Redutores

Para quantificar os açúcares redutores presente no mosto, foram retirados 2 mL de amostra de cada ensaio experimental, no início da fermentação e no final. Foi preciso diluir as amostras de forma que os valores de absorbância se mantivessem dentro da faixa da curva de calibração previamente construída (FIG.5). Retiraram-se 2 mL da amostra à qual foram adicionados 8 mL de água destilada. Dessa diluição coletou-se 1 mL e adicionou-se 1mL de DNS (Ácido 3,5 – Dinitrosalicílico). Essa mistura foi aquecida a 100 °C por 5 minutos em banho termostático (LOGEN/LSRE-52CS-BA). Logo após foi resfriada em banho de gelo e adicionados 2 mL de água destilada. Em seguida foi homogeneizada e submetida à leitura no espectrofotômetro (EDUTECH/EEQ-9005) a 540 nm.

Figura 5- Curva de calibração para determinação de açúcares redutores.



Fonte: Autor, 2020.

3.8.2 Determinação da Graduação Alcoólica

A determinação do teor alcoólico, expresso em percentagem v/v de etanol foi pelo método ebuliométrico. Ao final fermentação foram retirados 50 mL de vinho, sendo submetido à centrifugação, em centrífuga de bancada (NOVA/NI-1811) com uma rotação de 4000 rpm/3min. O sobrenadante foi transferido para o ebuliômetro previamente calibrado, para a determinação do teor alcoólico (°GL).

Figura 6- Processo de verificação de teor alcoólico no ebuliômetro.



Fonte: Autor, 2020.

3.8.3 Correção do pH

O pH ideal para *Saccharomyces cerevisiae* produzir o etanol é em torno de 4,5. Para tanto, o pH médio inicial de 5,40 foi aferido e ajustado para 4,5, para reduzir o pH utilizou-se a solução ácido sulfúrico (H_2SO_4 3 mol L^{-1}).

3.8.4 Teor alcoólico do destilado

Para quantificar o teor alcoólico do destilado, foi utilizado densímetro digital (KYOTO ELECTRONICS/DA-130N).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação do teor de sólidos dissolvidos (°Brix)

O teor de sólidos dissolvidos, expressos em °Brix, foi acompanhado ao longo do tempo, para cada um dos ensaios fermentativos (ensaios 1 a 5), sendo o processo encerrado após a observação da constância, em três leituras consecutivas dos valores de °Brix no processo de fermentação, para cada um dos ensaios. Os dados referentes aos valores médios do °Brix, acompanhados dos seus desvios padrões, estão apresentados na Tabela 2.

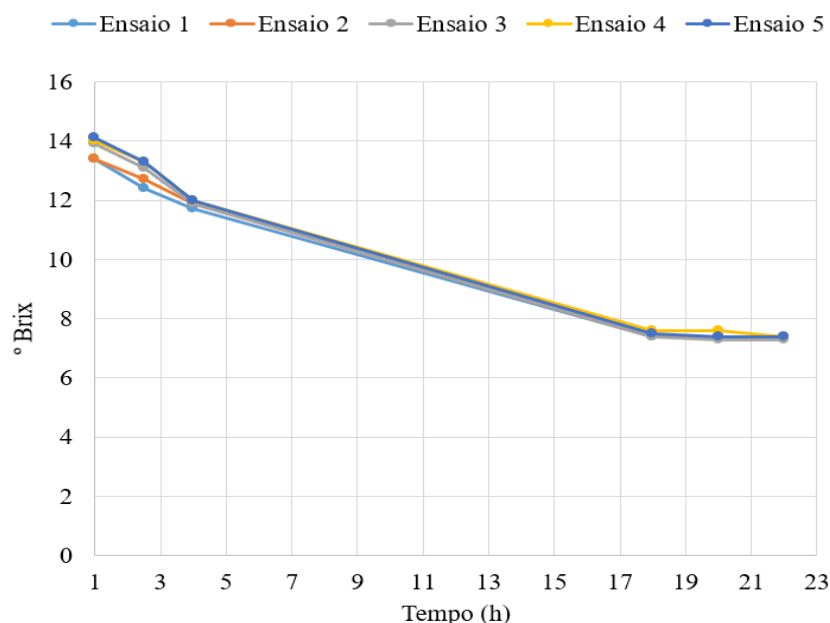
Tabela 2 - Acompanhamento do decaimento dos sólidos solúveis dissolvidos (°Brix) durante o processo fermentativo.

Tempo (h)	Sólidos solúveis dissolvidos (°Brix)				
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 4	Ensaio 5
1	13,40 ± 0,10	13,35 ± 0,05	13,90 ± 0,00	14,00 ± 0,00	14,05 ± 0,05
2,5	12,40 ± 0,10	12,65 ± 0,05	13,10 ± 0,10	13,30 ± 0,00	13,25 ± 0,05
4	11,65 ± 0,05	11,90 ± 0,10	11,85 ± 0,05	11,95 ± 0,05	12,00 ± 0,00
18	7,40 ± 0,10	7,40 ± 0,00	7,35 ± 0,05	7,60 ± 0,00	7,45 ± 0,05
20	7,35 ± 0,05	7,40 ± 0,00	7,30 ± 0,00	7,55 ± 0,05	7,40 ± 0,00
22	7,35 ± 0,05	7,40 ± 0,00	7,30 ± 0,00	7,40 ± 0,00	7,40 ± 0,00

Fonte: Autor, 2020.

Através da Figura 7, observa-se que o °Brix médio manteve-se constante a partir de 18 horas de fermentação, ficando em torno de 7,3 a 7,4 °Brix para todos os ensaios, o que corresponde uma redução do teor de sólidos dissolvidos entre 44,57 e 47,48%, indicando assim, a presença de um quantidade significativa de açúcar remanescente no vinho.

Figura 7- Redução do teor de sólidos dissolvidos (°Brix) em função do tempo de fermentação (Ensaio 1 a 5).



Fonte: Autor, 2020

Segundo Lima, Basso e Amorim (2001), o processo fermentativo pode ser inibido não apenas pelos seus próprios produtos como o etanol, mas também devido à presença de diferentes substâncias que podem estar presentes no mosto, como potássio e cálcio que podem se apresentar em quantidades excessivas, provocando efeitos negativos à fermentação. No caso do melaço, sabe-se que de modo geral, a sua composição depende da variedade de cana-de-açúcar utilizada e do processo de produção do açúcar, pois neste caso, a sulfitação do caldo de cana visando a sua clarificação para a produção de açúcar, pode resultar em melaços com elevados teores de sulfito, podendo acarretar efeitos tóxicos à levedura.

Stupiello (1974) *apud* Santos (2008), ao realizar análise de composição química no caldo de cana-de-açúcar e melaço, verificou que o melaço chegou a apresentar 1,05% de CaO, 3,80% de K₂O e, ainda, 8,5% de cinzas. Reguly (1998) relata que os melaços podem apresentar de 3,5 a 4,8% de K₂O e, de 0,2 a 0,4% de CaO.

Santos (2008), em mostos de melaço a 15 °Brix, verificou 0,06% CaO e 0,519% de K₂O.

4.2 Concentração de Açúcares Redutores

As concentrações de açúcares redutores no início e no final da fermentação foram determinadas através do método DNS (Ácido 3,5 – Dinitrosalicílico), descrito no Item 3.5.1.

Na Tabela 3 estão apresentados os valores médios das concentrações com os seus respectivos desvios padrões, bem como os coeficientes de variação (CV%).

Tabela 3 - Concentrações de açúcares redutores no início e no final da fermentação.

Ensaio	Início Fermentação		Final Fermentação	
	Concentração (g/L)	*CV (%)	Concentração (g/L)	CV (%)
1	156,31 ± 0,30	0,19	61,57 ± 0,45	0,73
2	155,27 ± 6,74	4,34	64,71 ± 1,20	1,85
3	162,30 ± 2,39	1,48	87,61 ± 1,05	1,20
4	162,00 ± 10,78	6,65	79,98 ± 0,30	0,37
5	176,52 ± 2,84	1,61	86,27 ± 0,00	0,00

Fonte: Autor, 2020

*CV (%) = Desvio padrão/Média

As concentrações foram multiplicadas pelo volume reacional, no início e final da fermentação, de forma a se obter a massa de açúcar redutor, e consequentemente foi possível calcular a massa consumida ao final do processo fermentativo (Tabela 4).

Tabela 4 - Massa de açúcares redutores.

Ensaio	Massa inicial de açúcares redutores (g)	Massa final açúcares redutores (g)	Massa de açúcar consumida (g)
1	23,45 ± 0,04	8,56 ± 0,06	14,89 ± 0,11
2	23,29 ± 1,01	9,00 ± 0,17	14,29 ± 1,18
3	24,35 ± 0,36	12,18 ± 0,15	12,17 ± 0,21
4	24,30 ± 1,62	11,12 ± 0,04	13,18 ± 1,57
5	26,48 ± 0,43	11,99 ± 0,00	14,49 ± 0,43

Fonte: Autor, 2020

Em relação ao consumo de açúcares redutores, ao final do processo fermentativo, houve variação de 49,98% (ensaio 3) a 63,50% (ensaios 1), ou seja, restando ainda em torno de 50 a 36,5% de açúcar no vinho final. Resultados, que estão de acordo com aqueles observados para o teor de sólidos dissolvidos (Item 4.1).

Segundo Cruz (2015), é importante que o açúcar final ou residual seja minimizado, afinal não se pretende que a fermentação termine ainda havendo matéria-prima a ser

consumida, pois deste modo traz prejuízos para a indústria, e esse açúcar pode agregar-se ao efluente do processo, causando problemas ambientais e no processo de destilação.

4.3 Rendimento e eficiência

Para o cálculo do rendimento de etanol utilizou-se a Equação 2 (Item 2.5). Para a determinação de etanol produzido, em massa, foi verificado o teor alcoólico de vinho delevedurado, e levou-se em consideração a massa específica teórica do etanol. Na Tabela 5, estão expressos os dados referentes ao teor alcoólico determinado ao final de cada ensaio fermentativo.

Tabela 5 - Teor alcoólico determinado ao final da fermentação.

Ensaio	Teor alcoólico (°GL)	(*)Volume de etanol (mL)	Massa etanol (g)
1	6,40 ± 0,10	3,20 ± 0,05	2,54 ± 0,04
2	6,30 ± 0,00	3,15 ± 0,00	2,50 ± 0,00
3	6,15 ± 0,05	3,08 ± 0,03	2,44 ± 0,02
4	6,05 ± 0,05	3,03 ± 0,02	2,40 ± 0,02
5	6,25 ± 0,05	3,13 ± 0,02	2,48 ± 0,02

Fonte: Autor, 2020.

(*) Volume de Etanol em 50 mL de vinho

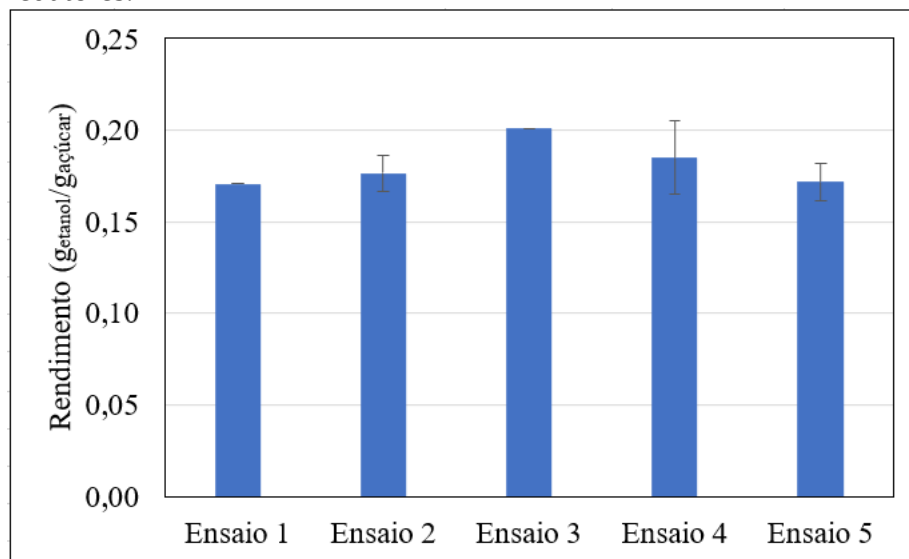
Massa específica etanol (teórica) = 0,7947 g/mL (REGULY, 1998).

Como relatado no item 2.6, de acordo com Lima, Basso e Amorim (2001), a água e o etanol são os principais componentes nos vinhos comuns, em porcentagens variantes, entre 88 a 93% e 12 a 7%, respectivamente. Percebe-se, portanto, que os teores alcoólicos ao final dos ensaios fermentativos 1 a 5, ficaram entre 6,05 – 6,40 °GL, esses resultados mostram que estão fora do mínimo que a literatura descreve. Essas concentrações baixas de etanol, podem ser justificada devido ao fato de não ter ocorrido um grande consumo de açúcar.

As leveduras não se reproduzem quando a concentração de etanol ultrapassa valores de 13,7% v/v, pois as enzimas glicolíticas das mesmas são inibidas em concentrações de etanol em torno, ou acima de 12% v/v (LUONG, 1985; MILLAR *et al.*, 1982 *apud* SILVA *et al.*, 2008). Assim, é possível presumir que não houve inibição da levedura devido à concentração de etanol.

Utilizando os dados de massa de etanol (Tabela 5) e de açúcar consumido (Tabela 4), empregou-se a Equação 2 (Item 2.5) para calcular o rendimento de etanol, cujos resultados estão apresentados na Figura 8.

Figura 8- Rendimento de etanol em relação ao consumo de açúcares redutores.



Fonte: Autor, 2020

Observa-se através da Figura 8 que o rendimento em etanol, variou entre 0,17 e 0,20 g etanol/g açúcar.

Comparando os ensaios 1 (sem adição de nutrientes) e 2 (com adição de 1,20 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), observa-se que a adição deste nutriente, aumentou em apenas 5,88% o rendimento em etanol. Por outro lado, ao se comparar o ensaio 3 (adição de 0,34 g/L de KH_2PO_4) com o ensaio 1, verifica-se que o rendimento em etanol teve um aumento de 17,65%, o que sugere que a adição de fosfato de potássio, apresentou um melhor efeito sobre o processo fermentativo, que a adição de sulfato de amônio.

Já os ensaios 4 (1,20 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,34 g/L de KH_2PO_4) e 5 (0,60 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e 0,17 g/L de KH_2PO_4), nos quais houve adição de nutrientes em diferentes concentrações, praticamente não houve diferença quando comparados ao ensaio 1 (sem adição de nutrientes) e quando comparados ao ensaio 2. Já quando comparados ao ensaio 3 (adição de 0,34 g/L de KH_2PO_4), houve uma queda no rendimento entre 10 e 15%. Através destes resultados, há uma indicação que, para as condições aplicadas neste estudo e para o melaço utilizado na composição do mosto fermentativo, a interação entre os dois nutrientes não causou um efeito positivo sobre o processo fermentativo, em termos de rendimento de etanol.

Lima, Basso e Amorim (2001), relataram que as concentrações de nutrientes minerais no mosto para se obter adequada fermentação alcoólica, estão nas faixas de 50 - 150 mg/L para NH_4^+ e de 60 – 560 mg/L para fósforo.

Stupiello e Horii (1981) *apud* Santos (2008), sugerem que os mostos de fermentação alcoólica devem conter níveis mais elevados de nitrogênio que de fósforo, sendo da ordem de 300 – 350 ppm de nitrogênio total. Já Vasconcelos (1987) *apud* Santos (2008) destaca que a dose de nitrogênio que maximiza a eficiência de fermentação é da ordem de 0,11 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ por litro de mosto (com concentração inicial de 15 °Brix).

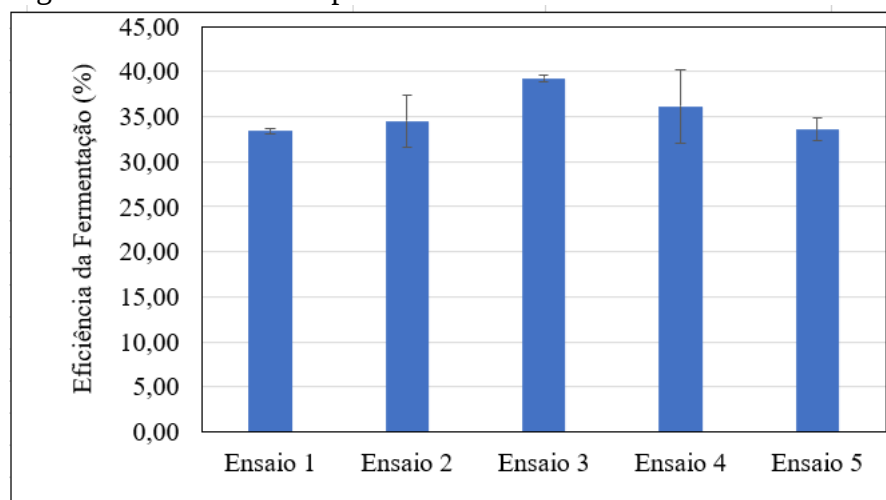
Silva *et al.* (2008) realizaram um estudo sobre a fermentação alcoólica de caldo de cana-de-açúcar, no qual aplicaram um planejamento experimental fatorial, com vistas a verificar a influência do °Brix, e dos nutrientes N e P sobre o rendimento e produtividade de etanol. As faixas de concentrações de nutrientes estudadas foram de 0,1 a 1,1 g/L de N e de 0,002 – 0,24 g/L de P. No qual verificaram que, nas condições estudadas, a concentração de fósforo foi estatisticamente significativa para o rendimento e produtividade.

Neste trabalho, a concentração máxima de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1,20 g/L) foi uma referência à média empregada por Silva *et al.* (2008), enquanto para o KH_2PO_4 (0,34 g/L), foi um pouco maior que a média, da faixa de concentração relatadas por Lima, Basso e Amorim (2001), para o fósforo.

Embora, se tenha utilizado uma menor concentração de fonte de fósforo quando comparada à fonte de nitrogênio, os resultados obtidos sugerem que o fósforo teve uma melhor influência sobre o rendimento de etanol, que a fonte de nitrogênio. Estes resultados sugerem, que para uma melhor conclusão, quanto à adição de nutrientes, seria necessário uma análise de composição química do melaço, pois Stupiello (1974) *apud* Santos (2008), verificou um maior percentual de matéria nitrogenada (8,00%) no melaço quando comparado à fonte de fósforo, que foi de 0,15%.

Conforme mencionado pelo Item (2.2), o rendimento teórico máximo de etanol, dado pela estequiometria é de 0,511 g_{etanol}/g_{glicose}. Para determinar a eficiência do processo fermentativo, que é a relação entre o rendimento real de etanol em relação ao teórico máximo, foi utilizada a Equação 3 (Item 2.5). Os dados de eficiência estão apresentados na Figura 9.

Figura 9– Eficiência dos processos fermentativos.



Fonte: Autor, 2020

Através da Figura 9, observa-se que os ensaios fermentativos apresentaram eficiências entre 33,42 e 39,31%. Estes resultados ficaram abaixo dos relatados pela literatura, que em condições ótimas de processo, as eficiências podem variar de 85 a 95% (LIMA, BASSO, AMORIM, 2001).

Tais resultados sugerem, que o processo fermentativo requer um rigoroso controle de seus parâmetros, tais como um melhor controle do inóculo, assim como da composição química do mosto e do vinho, pois sabe-se que podem ser gerados produtos secundários capazes de inibir o processo fermentativo, tais como o glicerol e ácidos orgânicos (acético, succínico, láctico). No caso deste trabalho, foi verificado o pH no início e final da fermentação, onde percebeu-se pouca variação de pH entre o início da fermentação (pH 4,5) e o final, que neste caso variou entre pH 4,0 e 3,8.

4.4 Concentração de etanol após destilação

O vinho delevedurado foi submetido à destilação fracionada, sendo obtidas concentrações médias de etanol da ordem de 33,40 a 36,75 °GL (Tabela 6).

Tabela 6 - Teor alcoólico do destilado.

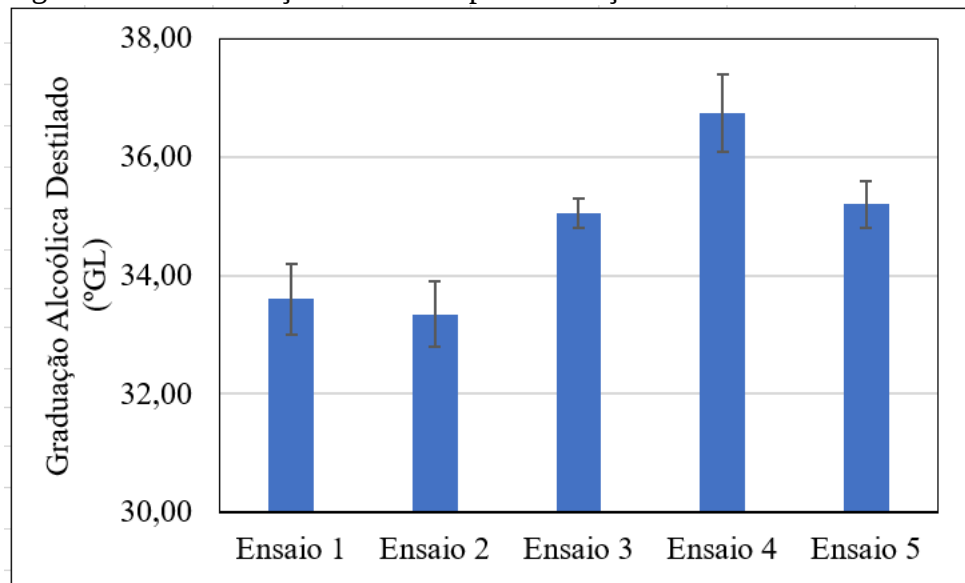
Ensaio	Teor alcoólico (°GL)	Média do teor alcoólico (°GL)	Desvio padrão
1	34,20	33,60	0,60
	33,00		
2	33,90	33,35	0,55
	32,80		
3	34,80	35,05	0,25
	35,30		
4	37,40	36,75	0,65
	36,10		
5	34,80	35,20	0,40
	35,60		

Fonte: Autor, 2020.

A Figura 10 apresenta as médias das concentrações alcoólicas. O ensaio 3, 4 e 5 apresentaram concentrações um pouco maiores que os ensaios 1 e 2, mas não foram tão significativos. Porém, as concentrações ficaram muito abaixo que o mínimo permitido pela legislação em relação ao etanol hidratado. De acordo com ANP (2011) o etanol hidratado combustível deve apresentar concentração entre 95,1 a 96,0 °GL. Entretanto, esse resultado era esperado, visto que, em processos fermentativos bem controlados, a graduação alcoólica do vinho de levedurado pode chegar a 12 °GL, e como visto anteriormente, as concentrações obtidas nos ensaios 1 a 5, foram bem abaixo disto.

Deve-se considerar, ainda que a destilação foi realizada com equipamento simples de destilação no laboratório, não podendo ser comparado com uma coluna de destilação complexa, podendo ainda ocorrer o arraste de água.

Figura 10- Concentração de etanol após destilação.



Fonte: Autor, 2020

5 CONCLUSÃO

Neste estudo sobre a adição de nutrientes ao mosto de melaço de cana-de-açúcar, embora tenha se alcançado baixos rendimentos de etanol, há um indicativo de que nas condições aplicadas, o fosfato de potássio apresente uma influência positiva sobre o rendimento de etanol. Ainda assim, estudos futuros podem ser realizados para um melhor controle do processo fermentativo, com vistas a aumentar o rendimento, através de uma análise detalhada do inóculo, da composição química do mosto e, da identificação e quantificação da formação de possíveis subprodutos.

Sob o ponto de vista industrial, mesmo sabendo que pode haver uma grande variação na matéria-prima que entra no processo, é importante que sejam realizadas análises de composição química destas matérias-primas, seja caldo de cana-de-açúcar ou melaço, com uma certa frequência, de forma a se dosar melhor os nutrientes adicionados ao mosto, pois como visto neste estudo inicial, mesmo com a adição dos nutrientes, em concentrações diferentes, não houve grandes diferenças no rendimento em etanol. Assim, um melhor controle na adição desses nutrientes, poderá causar uma redução de custos na produção.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível. **Resolução ANP Nº 7, De 9.2.2011 - Dou 10.2.2011 – Retificada Dou 14.4.2011.** Disponível em:<
<http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2011/fevereiro&item=ranp-7--2011>>- Acesso: 10.02.2020

AZEVEDO, M. R. L. **Avaliação do potencial de sorgo sacarino para a produção de etanol com comparação com a cana-de-açúcar.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Paraíba, 2017.

BARRE, P.; BLONDIN, B.; DEQUIN, S.; FEUILLAT, M.; SABLAYROLLES, J.M.; BASSO, L. C., **Fisiologia e ecologia microbiana**, I Whorkshop Tecnológico sobre Produção de Etanol, Projeto Programa de Pesquisa em Políticas Públicas, ESALQ/USP, 2004.

BARRETO, T. V.; COELHO, A. C. D. Destilação. In: SANTOS, F.; BORÉM, A.; CALDAS, C. (Ed.). **Cana-de-açúcar. Bioenergia, Açúcar e Etanol – Tecnologia e Perspectivas.** Viçosa, MG: Editora Universidade Federal de Viçosa, 2011.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário estatístico de agroenergia 2012: statistical yearbook of agrienergy.** Brasília: MAPA/ACS, 2013. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/pasta-anuario-estatistico-da-agroenergia/anuario-estatistico-da-agroenergia-2012.pdf> > - Acesso: 24.02.2020

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário estatístico de agroenergia 2014: statistical yearbook of agrienergy.** Brasília: MAPA/ACS, 2015. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/agroenergia/pasta-anuario-estatistico-da-agroenergia/anuario-estatistico-da-agroenergia-2014.pdf> > - Acesso: 24.02.2020

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Anuário estatístico de agroenergia 2019: statistical yearbook of agrienergy.** Brasília: MAPA/ACS, 2020. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/5237-anuario-estatistico-2019#Se%C3%A7%C3%A3o%204> > - Acesso: 24.02.2020

BRAY, S. C.; FERREIRA, E. R.; RUAS, D. G. **As políticas da agroindústria canavieira e o PROÁLCOOL no Brasil.** Marília: Unesp Marília, 2000. p. 104.

CAMILI, E. A.; CABELLO, C. **Produção de Etanol de Manipueira Tratada com Processo de Flotação.** Revista Raízes e Amidos Tropicais, v.3, n.1, 2007.

CARDOSO, M. das G. (Ed.). **Produção de Aguardente de Cana.** 2.ed. Lavras: UFLA, 2006.

CHIARADIA, A.; PASTA, M. A. C. **Minimanual de Pesquisa: Química.** Uberlândia: Claranto, 2004. 516 p.

CRUZ, M. L.. **Avaliações das Condições de Processo na Resistência da Levedura ao Teor Final de Etanol na Fermentação Alcoólica.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal

de Uberlândia. Uberlândia, MG. 2015. Disponível em: <
<http://repositorio.ufu.br/bitstream/123456789/15238/1/AvaliacaoCondicoesProcesso.pdf>>-
 Acesso em 09/03/2020.

DUDEK, D. N. **Delação parcial do fator de transcrição ace1 para otimização da produção de celulasas por *Trichoderma reesei* rut-c30.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Cascavel, 2017. Disponível em:
 <http://tede.unioeste.br/bitstream/tede/2954/5/Debora_Dudek2017.pdf> - Acesso em 05/03/2020.

GUTIERREZ, L. E.; **Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* durante fermentação alcoólica.** Anais da Escola Superior da Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, n.48, p 55-69, 1991.

LEITE, G. H. P.; CRUSCIOL, C. A. C.; SILVA, M. A.; VENTURINI FILHO, W. G. **Maturadores e qualidade tecnológica da cana-de-açúcar: variedade rb855453 em início de safra.** Revista Bragantia, v.68, n., p.781-787, 2009.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. Produção de Etanol. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial – Processos fermentativos e enzimáticos.** São Paulo: Blucher, 2001.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. M. Enzimas: **Poderosa ferramenta na indústria.** Ciência Hoje, São Paulo, v. 41 (242), p. 28-33, 2007.

MUTTON, M.J.R.; MISSIMA, J.O.D.; SILVANO, N.; DOS SANTOS, R.F.P.; COSTA, G.H.G. **Qualidade tecnológica do melaço produzido com cana de açúcar bisada.** Ciência & Tecnologia: Fatec-JB, Jaboticabal, v. 4, 2012.

NOVA, M. X. V. **Análises das Leveduras do Mosto da Fermentação Alcoólica de Alambiques Artesanais Produtores de Cachaça em Pernambuco.** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. Recife, PE, 2008. Disponível em <
https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/1413/1/arquivo1536_1.pdf > Acesso em 09/03/2020.

REGULY, C. J. **Biotecnologia dos processos fermentativos.** V.2. Ed. Universitária, UFPel. 1998.

RIBEIRO, E.J, **Apresentação Dia Nacional do profissional da Química e II Escola da Química,** 2006.

SANTOS, A. M. **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Alagoas. Maceió, 2008.

SHIKIDA, P. F.; BACHA, C. J. Evolução da agroindústria canavieira brasileira de 1975 a 1995. **Revista Brasileira de Economia,** v. 53, n.1, p. 69-90, mar. 1999.

SILVA, J. S. S.; JESUS, J. C.; COUTO, S. M. **Noções sobre Fermentação e produção de álcool na fazenda,** 2000.

SILVA, J. A.; DAMASCENO, B. P. G. L.; SILVA, F. L. H.; MADRUGA, M. S.; SANTANA, D. P. **Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica.** Quim. Nova, v. 31, nº.5, 1073-1077, 2008.

SILVA, R. dos S. **Avaliação Técnica da Utilização do Óleo Fúsel, Subproduto da Produção de Etanol da Cana-De-Açúcar: Revisão.** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, PB, 2019. Disponível em: < <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/16030/1/RSS10102019.pdf> > Acesso em 09/03/2020.

SOUSA, J. L. U; MONTEIRO, R. A. B. **Fatores interferentes na fermentação alcoólica para a produção de etanol.** FAZU em Revista, Uberaba, n.8, p.100-107, 2011.

VASCONCELOS, J. N. Fermentação Etanólica. In: CALDAS, C.; BORÉM, A.; SANTOS, F. (Ed.). **Cana-de-açúcar: Bioenergia, Açúcar e Etanol: tecnologias e Perspectivas.** 2. ed. Viçosa, MG, 2012.

ZANARDI, M.S; COSTA JUNIOR, E. F. **Tecnologia e perspectiva da produção de etanol no Brasil.** Revista Liberato, v.17, n.27, p.01-118, jan./jun.2016.

ZAVITOSKI, B. Z. **Efeitos da adição de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* de culturas estoques ao creme de levedura industrial durante fermentações sucessivas de melaço.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 2016. Disponível em: < https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/144437/zavitoski_bz_me_araiq_par.pdf?sequence=3 > -Acessado:04/03/2020.