

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E BIOPROCESSOS

MESTRADO PROFISSIONAL

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MOSTO COM
NUTRIENTES INORGÂNICOS EM PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
BIOETANOL**

DAVI GORLA MONTIEL

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Masarin

ARARAQUARA - SP

2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**AVALIAÇÃO DA SUPLEMENTAÇÃO DE MOSTO COM
NUTRIENTES INORGÂNICOS EM PROCESSO DE PRODUÇÃO DE
BIOETANOL**

DAVI GORLA MONTIEL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Masarin

ARARAQUARA - SP

2022

M791a Montiel, Davi Gorla.
Avaliação da suplementação de mosto com nutrientes inorgânicos em processo de produção de bioetanol / Davi Gorla Montiel. – Araraquara: [S.n.], 2022.
90 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais e Bioprocessos.

Orientador: Fernando Masarin.

1. Levedura. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Suplementação de mosto. 4. Nutrientes. 5. Fermentação etanólica. 6. Eficiência de fermentação. I. Masarin, Fernando, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação da suplementação de mosto com nutrientes inorgânicos em processo de produção de bioetanol

AUTOR: DAVI GORLA MONTIEL

ORIENTADOR: FERNANDO MASARIN

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, área: Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO MASARIN (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. GUILHERME PEIXOTO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. ELIAS DE SOUZA MONTEIRO FILHO (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia, Física e Matemática / Instituto de Química do Campus de Araraquara da Unesp

Araraquara, 01 de dezembro de 2022

Ter fé não é somente acreditar, mas antes de tudo compreender Deus como o Criador do Universo e a natureza humana como sendo o espírito que é imortal e sobrevive à carne para continuar seu processo incessante de evolução. A razão por outro lado é uma capacidade do espírito humano que nos permite analisar a realidade de forma racional e por isto faz de nós seres conscientes de nossas responsabilidades.

Solano Jacob

AGRADECIMENTOS

Gostaria de primeiramente agradecer a minha mãe Isabel Gorla, minha tia Célia Gorla, por doarem todas as condições necessárias para o meu processo de formação, suportando-me em todas as maneiras possíveis, dando-me confiança e carinho entre tantas outras coisas que ajudaram a tornar-me quem sou.

Agradeço minha namorada Amanda Belisário, por todo amor e carinho, que me fez superar todas as dificuldades estando sempre ao meu lado.

Agradecimento em especial ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Masarin, por ter me ajudado muito no meu mestrado, compartilhando o conhecimento, tendo paciência na orientação em todas as etapas deste trabalho e abrindo as portas dos laboratórios do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (FCF/UNESP), tornando este mestrado possível.

Agradeço aos técnicos do laboratório do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (Ana, Flávio e Adriana) por terem me ajudado muito nas análises de cromatografia e físico-química.

Agradeço imensamente à equipe de analistas do laboratório industrial da usina em estudo, que me ajudaram muito na composição das amostras do processo fermentativo para as análises de minerais e coleta de dados de processo, as quais foram imprescindíveis para o desenvolvimento da metodologia.

Agradeço ao Cláudio Andrade e toda equipe de cientistas do centro de pesquisa e desenvolvimento da Solenis - Paulínia, que colaboraram com as determinações analíticas dos laudos de minerais e metais, sempre em tempo hábil.

Agradeço com muito carinho o meu gerente de distrito Adriano Gomes, por acreditar no meu potencial e apoiar meu mestrado concomitante ao trabalho na Solenis.

Gostaria de agradecer ao gerente de aplicações Glauco Mello, pelos valiosos e proveitosos ensinamentos sobre o processo industrial de produção de bioetanol, em particular sobre os fundamentos da nutrição celular de leveduras, os quais foram base para elaboração deste mestrado.

Agradecimentos em especial à Marcelo Esteves, Creonildo Santos Lopes, Ricardo Godoi e Luciano Paulino que sempre apoiaram meu trabalho com sábios conselhos despertando meu interesse pelo setor de Biorrefino.

Agradeço os meus companheiros de trabalho, pelas conversas e sábios conselhos durante nossas infinitas viagens e visitas nas usinas espalhadas por este imenso Brasil.

Agradeço à empresa Solenis Especialidades Químicas Ltda, pela disponibilização dos nutrientes e apoio financeiro na compra dos kits de vitalidade e contaminação que somaram muito no desenvolvimento do trabalho.

Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (FCF/UNESP) e aos professores do curso de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional - EBB) pelo aperfeiçoamento profissional.

Agradecimento em especial à Dr. Maria Olivia Masiero, que disponibilizou seu tempo e sua atenção com os treinamentos das análises de vitalidade celular e com as análises estatísticas individuais da vitalidade de cada experimento, contribuindo assim com este trabalho de forma produtiva e despertando ainda mais meu interesse pela pesquisa e inovação.

Meu muito obrigado!

RESUMO

A escassez de nutrientes minerais nos mostos de produção industrial de bioetanol tem sido uma constante preocupação dentro da cadeia produtiva, por trazer sérios prejuízos ao processo de produção, como por exemplo, baixo rendimento fermentativo e insuficiência da conversão de açúcares em etanol comprometendo a vitalidade do fermento (células de *Saccharomyces cerevisiae*), as quais necessitam de cofatores enzimáticos para metabolizarem os açúcares de maneira efetiva. Dentro do âmbito deste contexto, o presente projeto avaliou e quantificou a concentração de íons minerais e metais tóxicos do processo fermentativo de uma Usina de etanol, por conseguinte, determinou-se o teor dos principais componentes presente na fermentação. Assim, foi verificado através de um balanço de minerais às necessidades do fermento a determinados elementos químicos. Desta forma, foi quantificado déficits de macronutrientes e micronutrientes minerais tornando-se mensurável os teores necessários para a respectiva suplementação. Através disso, foram realizados ensaios de fermentações em escala de laboratório com diferentes condições de sólidos solúveis em mosto (20, 24, 26 °Brix) que determinaram os principais parâmetros de produtividade em resposta à aplicação de dois nutrientes comerciais de forma combinada. Entre as condições avaliadas, os ensaios com mosto 24 e 26 ° Brix suplementados com a linha de nutrientes inorgânicos[®] Nitrofós, apresentaram melhores resultados aumentando em média 7 pontos percentuais da eficiência fermentativa em relação ao controle sem adição do produto. Além disso, as fermentações suplementadas com o produto apresentaram maiores níveis de vitalidade celular, indicando aumento do metabolismo redutor da glicose por meio da nutrição de *S.cerevisiae*.

Palavras-chave: Levedura; *Saccharomyces cerevisiae*; Suplementação de mosto; Nutrientes; Fermentação etanólica; Eficiência de fermentação.

ABSTRACT

The scarcity of mineral nutrients in musts for industrial bioethanol production has been a constant concern within the production chain, as it causes serious damage to the production process, such as low fermentation yield and insufficient conversion of sugars into ethanol, compromising the vitality of the yeast (*Saccharomyces cerevisiae* cells), which need enzymatic cofactors criteria to metabolize sugars effectively. Within scope of this context, this project evaluated and quantified the concentration of mineral ions and toxic metals in the fermentation process of an ethanol plant, therefore, the content of the main components present in the fermentation was determined. Therefore, it was verified through a balance of minerals as needed by yeasts for certain chemical elements. In this way, deficits of macronutrients and micronutrients were quantified, making the levels necessary for the respective supplementation measurable. Through this, laboratory scale fermentation tests were carried out with different conditions of the soluble solids in must (20, 24 e 26 °Brix) that determined the main productivity parameters in response to the application of two commercial nutrients in a combined way. Among the conditions evaluated, the tests with 24 and 26 °Brix supplemented with the line of inorganic nutrients [®]Nitrofós, presented better results, increasing in 7 percentage points the fermentative efficiency in relation to the control without product. Besides, fermentations supplemented with the product showed higher levels of cellular vitality, indicating an increase in glucose-reducing metabolism through nutrition of *S. cerevisiae*.

Keywords: Yeast; *Saccharomyces cerevisiae*; Must supplementation. Nutrients; Ethanol fermentation; Fermentative efficiency.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução da produção de veículos a etanol hidratado e sua participação nas vendas de veículos novos. Fonte: BNDES, 2008.	21
Figura 2. Distribuição de sacarose nos colmos.	23
Figura 3. Composição química e tecnológica da cana-de-açúcar.....	24
Figura 4. Reação estequiométrica da fermentação etanólica. Fonte: adaptado de VENTURA, 2007.	25
Figura 5. Via glicolítica e sequência de reações enzimáticas para fermentação etanólica. Fonte: LIMA, 2019.	26
Figura 6. Fases da fermentação. Fonte: HORII, 1990.	29
Figura 7. Exemplo simplificado de processo de produção de bioetanol operado em batelada alimentada (Melle-Boinot). Fonte: AMORIM, et al., 2011.....	30
Figura 8. Exemplo simplificado de processo de produção de bioetanol operado de forma contínua. Fonte: LOPES et al., 2016.	31
Figura 9. Fluxograma de decisão das principais etapas envolvidas no presente estudo.	40
Figura 10. Matriz Iônica para produção de bioetanol em escala industrial.....	43
Figura 11. Teste de interferente do método na placa de 96 poços.	51
Figura 12. Análise de viabilidade celular em câmara de Neubauer.	51
Figura 13. Catálogo de cores para comparativo da vitalidade celular.....	52
Figura 14. Contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC/placa) em placa contendo meio seletivo LIEVITO.	53
Figura 15. Diagnóstico Rápido da Contaminação Bacterina do Processo de Fermentação Etanólico (®KIT MC).	54
Figura 16. Concentração de macro e micronutrientes encontrados em mosto, fermento e vinho de processo industrial de produção de bioetanol: (a) nitrogênio amoniacal, (b) fósforo (c) magnésio, e (d) manganês, (e) zinco e (f) cobre.	58
Figura 17. Concentração de metais tóxicos para o fermento encontrados no mosto, fermento e vinho de processo industrial de produção de bioetanol: (a) ferro, (b) alumínio, (c) cálcio e (d) potássio.	61
Figura 18. Balanço de massa dos macros e micronutrientes da fermentação alcoólica (a) nitrogênio, (b) fósforo, (c) magnésio, (d) manganês, (e) zinco, (f) cobre. Legendas: Mínimo = matriz iônica; Saldo = real encontrado no balanço de minerais; Necessário = mínimo - saldo.	66
Figura 19. Suplementação realizada e necessária de cada íon para fermentação alcoólica	68

Figura 20. Perfil do consumo de açúcares e produção de etanol em fermentações com mosto de (a) 20°Brix (b) 24°Brix e (c) 26°Brix	69
Figura 21. Perfil da produção de glicerol e ácidos orgânicos em fermentações com 20° Brix (a) controle (b) nutrição; 24° Brix (c) controle (d) nutrição; 26° Brix (e) controle (f) nutrição. ..	73
Figura 22. Perfil do teor do fermento com diferentes condições de ° Brix do mosto (a) controle (b) nutrido.....	76
Figura 23. Perfil de pH em fermentação alcoólica com diferentes condições de °Brix do mosto (a) controle (b) nutrição.	77
Figura 24. Análise de vitalidade celular pelo método resazurina (a) início de fermentação (0 h) (b) final de fermentação (8 h). (C = fermentações controle; N = fermentações com nutrientes; CR = controle de reagente).	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparações de fermentações etanólicas operadas de forma contínua e batelada alimentada para produção de etanol no Brasil.....	32
Tabela 2. Concentração de nutrientes minerais no mosto para se obter adequada fermentação alcoólica.....	34
Tabela 3. Constituintes inorgânicos do fermento de processos industriais de produção de bioetanol.	37
Tabela 4. Composição química dos produtos utilizados como nutrientes.....	46
Tabela 5. Parâmetros fermentativos do processo industrial de bioetanol.....	64
Tabela 6. “Matriz iônica” para processo industrial de produção de etanol.	65
Tabela 7. Fluxos em processo industrial de produção de bioetanol	66
Tabela 8. Parâmetros fermentativos oriundos de fermentações realizadas em escala de laboratório com diferentes °Brix e adição de suplementação mineral.	71
Tabela 9. Teores de glicerol e ácidos orgânicos oriundos de fermentações realizadas em escala de laboratório com diferentes °Brix e adição de suplementação mineral	75
Tabela 10. Avaliação da viabilidade e vitalidade celular do fermento e nível de contaminação bacteriana.....	78
Tabela 11. Estimativa de custos e ganhos de etanol utilizando produto nutricional (®Nitrofós).	79

LISTA DE SIGLAS

AT	Açúcares Totais
ATR	Açúcares Teóricos Recuperáveis
ATP	Adenosina trifosfato
ADP	Adenosina difosfato
ART	Açúcares Redutores Totais
BRIX	Porcentagem em peso de sólidos solúveis em uma solução
CO₂	Dióxido de Carbono
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira
ICP-AES	Espectrometria de Emissão Atômica com plasma acoplado
NADH₂	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
PAC	Policloreto de Alumínio
PIB	Produto Interno Bruto
POL	Porcentagem em peso (p/p) de sacarose aparente
PUREZA	Porcentagem de sacarose nos sólidos solúveis
PCTS	Pagamento de cana por teor de sacarose
PROÁLCOOL	Programa Nacional do Alcool
TCH	Tonelada de cana-de-açúcar por hectare
VHG	Very Hight Gravity

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
2.	OBJETIVO	18
2.1.	Objetivos específicos.....	18
3.	REVISÃO DA LITERATURA	19
3.1.	A agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil	19
3.2.	Composição tecnológica da cana-de-açúcar.....	22
3.3.	Produção de etanol via fermentativa	25
3.3.1.	Processo industrial de produção de bioetanol	27
3.3.2.	Composição mineral do mosto de cana-de-açúcar	32
3.3.3.	Importância dos minerais para a fermentação etanólica	35
3.3.4.	Vitalidade Celular	38
4.	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1.	Determinação de minerais e metais tóxicos da planta industrial.....	40
4.2.	Cálculos da planta industrial de produção de bioetanol	41
4.3.	Matriz Iônica	42
4.3.1.	Cálculos para balanço de minerais no processo	43
4.3.2.	Dimensionamento da nutrição celular	44
4.4.	Ensaio experimental de fermentação alcoólica em laboratório	45
4.4.1.	Preparo do mosto com diferentes condições de grau °Brix.....	45
4.4.2.	Preparo do fermento	45
4.4.3.	Preparo de nutrientes inorgânicos	46
4.4.4.	Condução dos ensaios de fermentação etanólica	46
4.4.5.	Parâmetros da fermentação	47
4.5.	Procedimentos analíticos e microbiológicos	49
4.5.1.	Determinação dos metabólitos oriundos das fermentações etanólica	49
4.5.2.	Determinação do teor do levedo (fermento).....	49
4.5.3.	Determinação da vitalidade celular por método físico-químico	50
4.6.	Determinação da vitalidade celular por método de plaqueamento.....	52
4.7.	Determinação do nível de contaminação bacteriana	53
4.8.	Análise de custo-benefício da aplicação do produto nutricional (®Nitrofós).....	54
4.9.	Análise estatística	56
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57

5.1.	Avaliação da composição nutricional dos principais fluxos do processo industrial de produção de bioetanol.....	57
5.2.	Avaliação de indicadores de desempenho e suplementação mineral de processo industrial de produção de bioetanol.....	64
5.3.	Avaliação de fermentação etanólica em escala de laboratório em resposta à aplicação do produto nutricional (Nitrofós)	68
5.4.	Avaliação de custo-benefício	79
6.	CONCLUSÃO	80
7.	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICES	85

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços em programas de estudo de potenciais variedades de espécies de cana-de-açúcar e suas melhorias em riqueza de sacarose, pouco se sabe sobre o impacto da qualidade do caldo em termos de macro e micronutrientes no processo de fermentação etanólico em escala industrial. Destaca-se a interferência de numerosos parâmetros na formação do perfil iônico do caldo de cana. Entre eles: a variedade da cana, tipo de solo, adubação, condições edafoclimáticas, grau de maturidade da cana, tipo de colheita, conteúdo de pontas e palhas e pela utilização ou não de vinhaça para a irrigação (DE SOUZA et al., 2015).

A produção de bioetanol no Brasil é realizada por via fermentativa, na qual as leveduras, em geral a espécie *Saccharomyces cerevisiae*, em anaerobiose, convertem os açúcares em etanol e gás carbônico. No processo fermentativo, o substrato utilizado para produção de etanol é a sacarose proveniente do caldo de cana-de-açúcar, também conhecido como mosto. Basicamente, é constituído de uma mistura de melaço e caldos, com uma concentração de sólidos de aproximadamente 18 °Brix. A concentração é definida até um certo valor, pois se a concentração for muito elevada pode inibir o processo de conversão e conseqüentemente não ser convertido todo açúcar em etanol e gás carbônico ao final da fermentação (AMORIM; LEÃO, 2005).

Pelo fato de haver inconstância na qualidade das matérias-primas disponíveis ao longo da safra, ou seja, composição química e tecnológica muito variável, principalmente em seus teores de sacarose, conhecer a disponibilidade de minerais no mosto é de fundamental importância para que a fermentação alcoólica opere de forma eficiente. Os íons minerais exercem forte influência na composição de estruturas vitais e catálise enzimática realizada pelas células de *S. cerevisiae* (fermento) durante a glicólise, desta forma, tanto o crescimento celular quanto a formação do etanol são influenciados pelas condições que o meio oferece (AMORIM; LEÃO, 2005).

A nutrição mineral é um fator decisivo para a manutenção da atividade fisiológica do fermento durante todo o processo de produção de etanol (durante todo o período de safra). Todavia, quantidades excessivas desses íons podem ser tóxicas e causar danos às funções das células de *S. cerevisiae* (fermento). Por exemplo, em níveis elevados alguns sais como potássio, cálcio e magnésio presentes no melaço e/ou caldo de cana-de-açúcar podem causar estresse osmótico das células de *S. cerevisiae* e comprometerem o desempenho do processo fermentativo (BASSO et al., 2011).

Pesquisas atuais objetivam melhorar a eficiência do processo fermentativo (aprimorar o processo de conversão do substrato em bioetanol) e reduzir os custos de produção. O

rendimento da fermentação é sensível a diversos fatores, alguns estimulantes e outros inibidores, como o excesso de ácidos orgânicos, tempo de fermentação, temperaturas elevadas nas dornas, ausência de vitaminas e minerais no mosto, qualidade da cepa da célula de *S. cerevisae*, viabilidade e vitalidade celular, dentre outros. Desta forma, muitos desses fatores vêm sendo constantemente estudados para o melhoramento do processo fermentativo, resultando em maior competitividade econômica. Nas últimas décadas, tendências dos mercados internacionais impulsionaram a indústria sucroenergética brasileira a direcionar o caldo de cana para produção de açúcar, devido à alta demanda do mercado internacional e as exigências de qualidade do produto, fez com que as Usinas se adequassem as especificações exigidas dentro dos programas de qualidade. Tendo em vista a importância do mercado de bioetanol no presente cenário, a suplementação do caldo com melaço tornou-se um meio para viabilizar a produtividade das plantas industriais, produzindo açúcar e aproveitando o melaço (subproduto do processo de produção de açúcar) para a produção de bioetanol (BASSO et al., 2011).

Atualmente, algumas Usinas do cenário sucroenergético brasileiro, vem recorrendo à tecnologia de fermentações do tipo VHG (Very High Gravity), isto é, processos fermentativos com altas concentrações de açúcares, e por consequência, altas concentrações de etanol. Esta tecnologia consiste em elevar a concentração de açúcares nas dornas fermentativas sem afetar a viabilidade das células de *S. cerevisae* (fermento), mantendo-se o rendimento de produção, dessa forma, produzem mais etanol em menos tempo e com o mesmo volume útil de fermentação. Essa tecnologia também possui vantagens técnicas, econômicas e ambientais, pois permite reduzir o volume de vinhaça e diminuir o consumo de água e energia. A dificuldade encontrada para a aplicação imediata desta tecnologia é manter a viabilidade/vitalidade das células de *S. cerevisae* (fermento industrial) nestas condições (MONTEIRO, 2016).

Santos (2008) estudou a influência da complementação com 3 formulações de diferentes nutrientes inorgânicos (A, B e C) no mosto de caldo de cana a 14°Brix e mosto de melaço a 15°Brix de processo de fermentação etanólico operado em batelada, e concluiu que a complementação com os nutrientes A, B e C foram benéficos dentro das condições das matérias-primas analisadas. Ainda segundo o autor, foi determinado as concentrações ideais de aplicação para cada nutriente a partir das respectivas formulações em função dos parâmetros nutricionais adequados para mostos industriais reportados por Amorim (1977) nas duas condições diferentes de matéria-prima analisadas. Na comparação dos 3 nutrientes comerciais para mosto de caldo a 14°Brix conclui-se que a dosagem de 1 g de B/Litro de mosto foi a que maior contribuiu para aumento da eficiência fermentativa, aumentando em 4,75 pontos

percentuais a mais em comparação ao controle, sem nutrientes. Para mosto de melaço a 15°Brix concluiu que o nutriente C apresentou melhor desempenho sob dosagens de 0,30 g de C/Litro de mosto aumentando em 2 pontos percentuais a eficiência fermentativa.

No estudo realizado por De Souza et al. (2014) foi avaliada a influência do rendimento de fermentação pela composição mineral do caldo de cana-de-açúcar de 3 estados do nordeste brasileiro (Maranhão, Paraíba e Pernambuco). Nas análises de minerais, foram encontrados elevados coeficientes de variação para todos os minerais analisados (cálcio, cobre, ferro, magnésio, manganês, zinco, fósforo, potássio e nitrogênio) indicando alta variabilidade de composição. Ainda visto neste estudo, as fermentações em laboratório suplementadas com magnésio apresentaram maior rendimento de etanol ($0,45 \text{ g.g}^{-1}$) propondo que o monitoramento da concentração de Mg^{2+} no mosto seja a questão mais importante para o controle industrial do processo de fermentação de bioetanol.

Monteiro (2016) estudou os efeitos da suplementação de compostos nitrogenados em mostos de cana-de-açúcar com alta concentração de açúcares e concluiu que a linhagem CAT-1 apresentou melhor produção de etanol a 30 °Brix suplementado com ureia, em que foram obtidos valores da ordem de 17 % (volume/volume em °GL sem comprometer a viabilidade celular em comparação com a levedura PE-2, a qual obteve valores de 15,8% de teor alcoólico em vinho levedurado, com as mesmas condições de níveis de açúcares.

Dentro do âmbito do conceito apresentado, existe uma grande dificuldade do setor sucroenergético conhecerem a composição mineral do substrato, pelo fato de não haver equipamentos e materiais necessários para quantificarem o perfil iônico dos meios. Somente as análises de nitrogênio amoniacal (NH_4^+) e fósforo (P_2O_5) são usualmente realizadas pelos laboratórios industriais, desprezando-se a quantificação e a influência de outros íons à necessidade fisiológicas do fermento, bem como aos seus fatores estressantes.

2. OBJETIVO

O objetivo geral do presente trabalho foi verificar a necessidade nutricional do fermento em relação aos principais íons minerais em processo de bioetanol industrial e avaliar a suplementação destes em fermentação etanólica de mosto de cana-de-açúcar e fermento (ambos oriundos de processo industrial) em escala de laboratório.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar os teores de minerais e metais tóxicos nos principais fluxos (mosto, fermento e vinho) do processo industrial de produção de bioetanol;
- Realizar um balanço de massa dos componentes quantificados anteriormente;
- Verificar a necessidade nutricional do fermento do processo dos componentes quantificados anteriormente;
- Estabelecer as quantidades ideais dos nutrientes a serem suplementados em mosto de processo industrial de produção de bioetanol;
- Avaliar ensaio fermentativo de etanol em escala de laboratório com mosto de processo industrial com diferentes graus °Brix em resposta à suplementação do produto nutricional;
- Avaliar o potencial de uso do produto nutricional em processo industrial de produção de bioetanol;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. A agroindústria da cana-de-açúcar no Brasil

A cana-de-açúcar é cultivada no Brasil desde 1532, trazida por Martim Afonso, o primeiro colonizador português, com a intenção de implantar engenhos que produziam açúcar como os existentes à época no arquipélago dos Açores em Portugal. Durante quase dois séculos de cultivo, essa espécie promoveu o importante ciclo da economia canavieira no Brasil. O Recôncavo Baiano e Pernambuco foram os estados pioneiros na implantação de engenhos produtores de açúcar na época, se estendendo pela costa brasileira até o Sudeste, associada, em princípio à decadência da lavoura cafeeira (BNDES, 2008).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, seguido por Índia, China e Tailândia. Dentre esses países o Brasil é o que possui o maior índice de produtividade, produzindo em média 81 toneladas de cana por hectare de terra (TCH), em seguida, vem a Índia que produz em torno de 70 TCH. Atualmente, o cultivo da cana alcança quase todos estados brasileiros ocupando cerca de 10,1 milhões de hectares da superfície agrícola do país, é a terceira cultura mais importante em áreas cultiváveis, ficando atrás somente da soja e do milho (UNICA, 2022).

A região de maior produção é a Sudeste, com cerca de 90% da produção nacional, sendo o estado de São Paulo responsável por 54,5% da produção dessa fatia de mercado, devido a fatores como uma adequada infraestrutura de transportes, proximidade com os mercados consumidores, características socioeconômicas e climáticas favoráveis, base de desenvolvimento científico e tecnológico, dentre outros fatores contribuintes para que o estado se tornasse um polo de referência nacional em termos de produção de açúcar, biocombustíveis e energia (UNICA, 2022).

No início da década de 70, a produtividade média atingida pelos canaviais foi de 49 tonelada de cana por hectare (TCH) e um rendimento médio de 87 kg de açúcar total recuperável (ATR)/tonelada de cana-de-açúcar. Atualmente, devido as pesquisas biotecnológicas e programas de melhoramento genético das variedades de espécie de cana-de-açúcar, a produtividade média atual dos canaviais brasileiros atinge um montante de 81 TCH com rendimento médio de 142 kg de ATR/tonelada de cana (UDOP, 2022).

O Brasil é o país do mundo que detém as melhores condições para a agricultura canavieira. A primeira vantagem é a incorporação de novas áreas de cultivo da agricultura de energia sem competição com a agricultura de alimentos. No Brasil, existe grande disponibilidade de terras com pastagens degradadas, possibilitando recuperá-las com rotações

de cultura e introduzir a cana-de-açúcar aumentando a fertilidade do solo, em relação ao que existia originalmente. O segundo aspecto vantajoso é a possibilidade de múltiplos cultivos dentro do ano agrícola (GOLDENBERG et al., 2008).

No Brasil existem aproximadamente 380 Usinas em funcionamento dentro desse sistema de produção, que envolve Usinas com as mais diversas capacidades de moagem, variando de 600 mil a 7 milhões de toneladas de cana-de-açúcar processadas anualmente no país. Existem poucas destilarias autônomas, isto é, que produzem etanol somente (cerca de 35% do total), a grande maioria das Usinas são produtoras de açúcar com destilarias anexas (cerca de 60% do total). As Usinas brasileiras trabalham com cerca de 80% de cana-de-açúcar proveniente de terras próprias e arrendadas, os 20% restantes são fornecidos por pequenos produtores contando com grande suporte tecnológico das Usinas (BNDES, 2008).

O setor canavieiro no Brasil gerou aproximadamente 712 mil empregos diretos no ano de 2019, que engloba profissionais de uma ampla gama de áreas, desde o campo até a indústria, como por exemplo, agricultores especializados, engenheiros, biólogos, químicos, técnicos, dentre outros. O valor bruto movimentado pela cadeia produtiva sucroenergética supera US\$ 100 bilhões, com um produto interno bruto (PIB) de aproximadamente US\$ 40 bilhões (montante equivalente a 2% no PIB brasileiro). Além disso, recolhe em média R\$ 12 bilhões em impostos e taxas (UNICA, 2022).

De acordo com o levantamento realizado pela UNICA (2022), a colheita de cana-de-açúcar, realizada na safra 2021/2022, foi de aproximadamente 600 milhões de toneladas. A produção de açúcar atingiu 35 milhões de toneladas, decréscimo de 15% ao produzido na safra 2020/2021, que atingiu uma produção de 41 milhões de toneladas. Essa redução está vinculada com as condições de estiagem e alguns episódios de geada nos estados de Mato Grosso do Sul e Paraná. A produção de etanol total (anidro e hidratado) foi de 26,6 bilhões de litros, representando um decréscimo de 10% em relação ao exercício anterior.

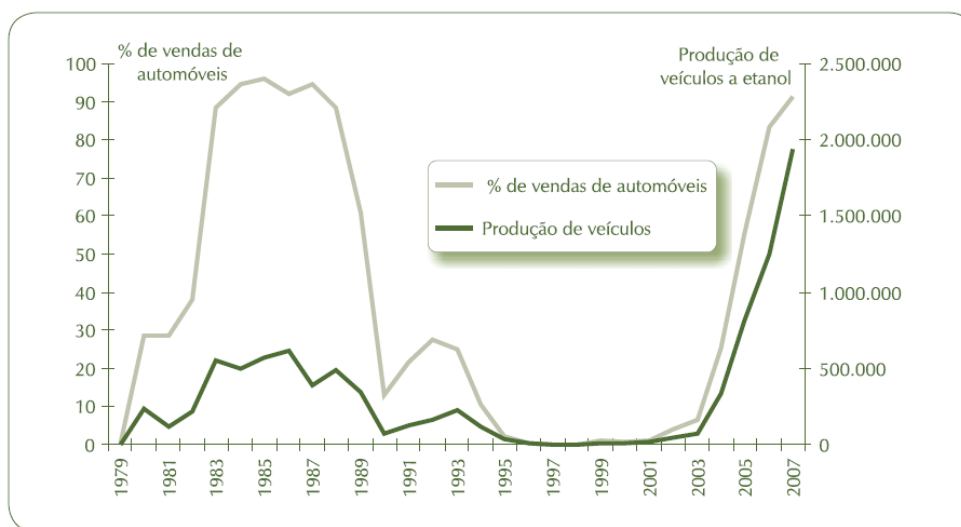
A produção de etanol anidro, também utilizada na mistura com a gasolina, que tem por objetivo aumentar a eficiência de detonação (octanagem), alcançou 10,6 bilhões de litros, demanda continuou favorável influenciada pelo aumento do consumo de gasolina em detrimento ao etanol hidratado. A produção nacional de etanol hidratado alcançou 16 bilhões de litros, representando um decréscimo de 20,8% em relação ao exercício anterior (UNICA, 2022).

O Brasil possui destaque mundial no setor sucroenergético, representando um mercado em constante expansão na produção de bioetanol. Em termos de produção de etanol o Brasil é um dos líderes. O principal indicador econômico dessa liderança refere-se a seus custos de

produção, muito inferiores aos que existem nos demais países. Ao lado desse indicador convém salientar o fato de ser um biocombustível de grande importância para sustentabilidade (GOLDENBERG et al., 2008).

Após a primeira crise do petróleo, em meados da década de 70, o etanol começou a ter maior importância econômica para o país, sendo criado em 1975, o Programa Nacional do Alcool (PROÁLCOOL). Com o propósito de utilizar a tecnologia já existente de produção de etanol carburante a partir da cana-de-açúcar, este programa deu impulso para o desenvolvimento do setor sucroenergético no país. A partir deste momento houve uma grande expansão tecnológica, modernização e consolidação do setor (RIBEIRO, 2008).

Na Figura 1, é possível observar (apesar do estancamento das vendas de veículos a etanol hidratado durante os anos 1990) que a demanda desse biocombustível se manteve praticamente constante em função do uso da mistura com gasolina, mantendo-se em operação as unidades produtoras em níveis relativamente estáveis até o começo dos anos 2000, quando se iniciou o novo ciclo de crescimento (BNDES, 2008).



Fonte: Anfavea (2008).

Figura 1. Evolução da produção de veículos a etanol hidratado e sua participação nas vendas de veículos novos. **Fonte:** BNDES, 2008.

Com o fim do programa PROÁLCOOL em meados na década de 1980, com a redução dos preços do petróleo e aumento do preço do açúcar nos mercados internacionais tornou o etanol pouco competitivo. A crise do etanol no Brasil em 1989 resultou na aquisição dos consumidores por automóvel a gasolina devido à possibilidade de um novo desabastecimento. Este cenário se alterou nacionalmente somente a partir de 2003, com a criação dos veículos

flex-fuel e devido a questões econômicas, políticas e ambientais, foi retomada a importância do etanol na matriz brasileira de combustíveis (VENTORIM, 2008).

3.2. Composição tecnológica da cana-de-açúcar

A composição químico-tecnológica da cana-de-açúcar varia entre países, regiões e nos distintos anos em uma mesma zona, essa inconstância pode ser atribuída e influenciada por diversos fatores, tais como: condições climáticas, tipos de variedades, tratamentos culturais empregados, estágios de maturação, dentre outros. A cana-de-açúcar possui ciclo perene, sofrendo influência de variações climáticas durante o ano inteiro, sendo necessário para se atingir alta produção de sacarose, temperatura e umidade adequadas para seu crescimento na fase vegetativa, seguida de restrição hídrica para favorecimento do acúmulo de sacarose no colmo na fase de colheita (FISHER, 2019).

A cana-de-açúcar é uma planta de ciclo fotossintético C_4 , isto é, possui taxa fotossintética constante, a relação de metabolismo se comparado com plantas C_3 , propicia à espécie tolerância a variações de temperaturas e estresse hídrico, as quais fecham parcialmente seus estômatos dando continuidade no processo de fotossíntese, seguem absorvendo o dióxido de carbono (CO_2) e diminuindo a perda de água na transpiração estomática, além de estocar o CO_2 no parênquima foliar distribuindo de forma rápida os fotoassimilados (TAIZ; ZIEGER, 2013).

A cana-de-açúcar é composta, essencialmente, de duas partes, uma subterrânea formada pelos rizomas e raízes e outra aérea, formada pelos colmos, folhas e flores. O colmo pode ser considerado a parte mais importante para o processo industrial, pois nesta região acumula-se a maior parte da sacarose contida nas células em todos os estágios de desenvolvimento da planta. Pode ser observado através da Figura 2, a composição de sacarose nos colmos, na base da planta (D) há maior concentração de sacarose, enquanto no topo há menores concentrações (PARAZZI et al., 2017).

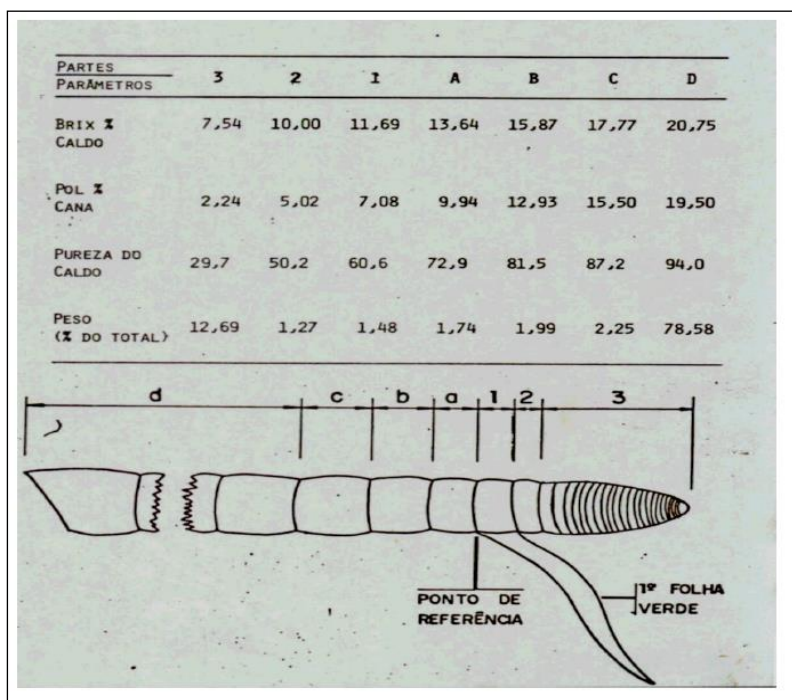


Figura 2. Distribuição de sacarose nos colmos.

Fonte: PARAZZI et al., 2017.

Os principais parâmetros de análise da qualidade da cana-de-açúcar são definidos em pré-colheita (maturação) e pós-colheita no laboratório de Pagamento de Cana por Teor de Sacarose (PCTS). A primeira definição é atribuída ao uso racional de potenciais variedades para maximizar o rendimento de sacarose no canavial. Já a segunda, é atribuída a qualidade da matéria-prima (remuneração) que adentra nas Usinas. As principais análises de qualidade da cana-de-açúcar são: a determinação dos teores de sacarose aparente no caldo de cana (Pol % Cana), pureza do caldo (Pol % Brix), determinação de açúcares redutores no caldo (AR % caldo), açúcares teóricos recuperáveis (ATR) e teor de fibra da cana-de-açúcar (Fibra % cana). Essas análises são procedimentos de rotina dentro do laboratório industrial anexo PCTS que irão determinar a qualidade da matéria-prima. Nesse contexto, a cana-de-açúcar dos fornecedores recebidas nas Usinas, são pagas pela sua qualidade e pelo teor de sacarose aparente (RIPOLI; RIPOLI, 2004).

Sob o ponto de vista tecnológico a cana-de-açúcar é constituída de caldo e fibra. O caldo que se extrai da cana-de-açúcar é matéria-prima para a indústria açucareira, e apresenta composição variável em todos os seus constituintes. O teor de fibra da cana varia entre 8-14% e o teor de caldo entre 84-91%. Desta composição do caldo, 75-82% é água e o restante substâncias sólidas dissolvidas, cerca de 18-25% (Figura 3). O percentual em massa de sacarose oscila de 10-16%, dependendo de sua origem. Altos teores de AR indicam uma cana-de-açúcar “verde” e baixos teores “madura”. O caldo conserva os nutrientes da cana-de-açúcar que lhe

deu origem, entre eles os minerais (de 1,5-4,5%) como ferro, cálcio, potássio, sódio, fósforo, magnésio e cloro e os materiais orgânicos (não-açúcares) como proteínas (0,5-0,6%), amido (0,001-0,1%), ceras e graxos (0,05- 0,15%) e corantes (3-5%) (FRANÇOSO, 2013).

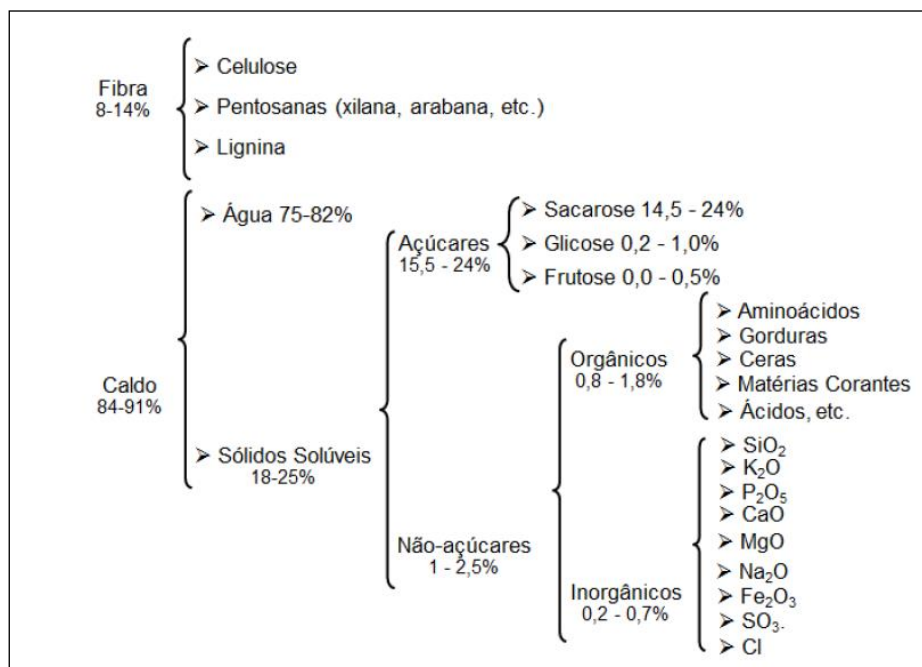


Figura 3. Composição química e tecnológica da cana-de-açúcar.

Fonte: FRANÇOSO, 2013 (Adaptado).

Após o período de maturação, os colmos são cortados e transportados por caminhões até a unidade de processamento, onde serão moídos para extração do caldo que servirá de matéria-prima para obtenção de açúcar ou para a fermentação alcoólica. O caldo utilizado para produção do açúcar é o caldo primário, ou seja, resultante do esmagamento no primeiro terno da moenda, este caldo é separado do restante e possui elevados teores de sacarose. No contexto de produção de etanol, o caldo utilizado é o caldo denominado “misto” (mistura de caldo do segundo terno da moenda e água de embebição do bagaço de cana-de-açúcar). Esse caldo possui menores teores de sacarose e baixos teores de sólidos solúveis em comparação ao caldo primário. Para produção de etanol, esse caldo inicialmente é peneirado e tratado quimicamente para coagulação, floculação e precipitação das impurezas, que são eliminadas por decantação. Uma vez tratado, o caldo é evaporado para ajustar sua concentração de açúcares e aquecido a fim de combater a proliferação de bactérias e leveduras, e eventualmente, é misturado com o melaço, dando origem ao mosto, substrato açucarado que está pronto para ser fermentado (FRANÇOSO, 2013; DE SOUZA, 2016).

3.3. Produção de etanol via fermentativa

O conceito aplicado para definir o significado de fermentação varia de acordo com o uso informal até o mais científico, quando se diz, por exemplo, que o pão fermentou, o leite azedou, grãos e frutas estragaram (definição informal, uso geral). No entanto, existem outras definições para classificar a fermentação, pode-se dizer também que é qualquer processo microbiano (pequena ou grande escala) que ocorra com ou sem a presença de oxigênio (condições aeróbia ou anaeróbia) (TORTORA et al., 2012).

A equação global e de parcial oxidação e fermentação de um açúcar simples (glicose) foi determinado pela primeira vez por Gay-Lussac em 1815, a qual foi denominada de reação estequiométrica da fermentação etanólica ou rendimento teórico (Figura 4). A reação estequiométrica, expressa o balanço de massa simplificado da fermentação etanólica, no qual 1 mol de glicose (180 g) fermentados em uma condição perfeita, isto é, sem a formação de nenhum outro subproduto, serão formados 2 moles de etanol (92 g), 2 moles de dióxido de carbono (88 g) e adenosina trifosfato (ATP). Isso corresponde ao rendimento teórico ($Y_{P/S}$), que é de 0,511 grama de etanol por grama de glicose consumida pelo microrganismo (LIMA et al., 2001).

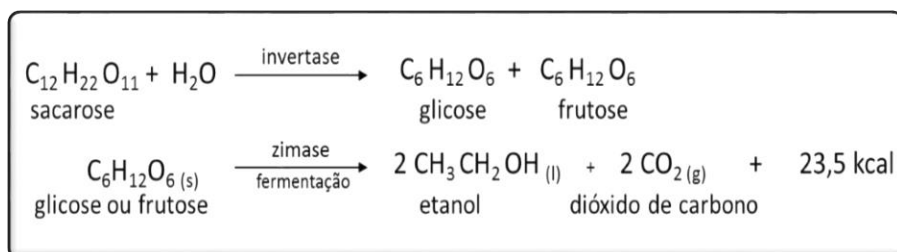


Figura 4. Reação estequiométrica da fermentação etanólica. **Fonte:** adaptado de VENTURA, 2007.

Após 5 décadas, em 1863, *Pasteur* demonstrou a natureza microbiológica anaeróbia da fermentação etanólica. Nas primeiras décadas do século XX, pesquisas culminaram com a elucidação das reações enzimáticas responsáveis pela transformação química de açúcar em etanol e CO_2 no interior da célula da levedura. No caso da fermentação etanólica industrial, o microrganismo utilizado é a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Os produtos do seu metabolismo vão depender das condições ambientais em que a levedura se encontra (LIMA, et al., 2001).

A fermentação em condição anaeróbia ocorre em duas fases principais: a glicólise e a redução do ácido pirúvico. A fermentação se inicia com a ativação da glicose, que recebe dois grupos fosfato fornecidos pelo ATP, que se transforma em adenosina difosfato (ADP). Após

Doze reações em sequência ordenadas presidem a transformação do açúcar em etanol e CO₂, cada uma catalisada por uma enzima específica. Essas enzimas são afetadas por inúmeros fatores (inibidores, nutrientes, vitaminas, produtos do próprio metabolismo, pH, dentre outros) alguns estimulando e outros reprimindo a ação enzimática no citoplasma, afetando o desempenho do processo fermentativo. Na função enzimática, os minerais têm grande importância por serem cofatores catalíticos dessas enzimas, funcionando como ativador ou estabilizador da função enzimática e estrutural das células de levedura. Dessa forma, na ausência deles a enzima é inativa (LIMA, 2019).

O objetivo primordial da levedura ao metabolizar anaerobicamente o açúcar é a sua sobrevivência, ou seja, gerar energia (ATP) para realizar uma série de reações de biossíntese e fisiológicas para produção de biomassa, ou seja, devido a sua reprodução ser por brotamento, nesse momento ela se multiplica para perpetuação de sua espécie. Além de fornecer energia, os açúcares fornecem carbonos para construção do material celular. Etanol, glicerol, ácidos e álcoois superiores são produtos rejeitados por elas, considerados subprodutos desse processo de luta por sobrevivência (AMORIM; LEÃO, 2005).

De todo etanol produzido mundialmente, aproximadamente 80% são obtidos por via fermentativa, os outros 20% por síntese química do etileno derivado do petróleo. A produção do etanol é uma das mais imediatas e importantes aplicações da biomassa através de novas pesquisas e desenvolvimento da biotecnologia, principalmente nas áreas de enzimas, fermentação e microrganismos geneticamente modificados (VENTURA, 2007).

3.3.1. Processo industrial de produção de bioetanol

Atualmente, as principais cepas de *S. cerevisiae* utilizadas no processo fermentativo industrial são: CAT1, PE2, FT858L e Fermel (selecionadas pela Fermentec), BG1 e SA1 (selecionados pelo Centro de Tecnologia Canavieira, CTC). Durante anos, essas cepas têm demonstrado maior capacidade de dominância e persistência em fermentações industriais, correspondendo em aproximadamente 70% das destilarias brasileiras (LOPES et al., 2016).

As fermentações se iniciam com um determinado tipo de *S. cerevisiae*, a maioria delas com linhagens selecionadas por instituições especializadas, que tem por objetivo escolher as linhagens que são capazes de sobreviver sob diferentes condições de estresses durante inúmeros ciclos fermentativos. Através de ferramentas integradas de biologia molecular, programas de sequenciamento genético de DNA recombinante e fermentação industrial essas cepas vêm sendo constantemente estudadas para que no futuro sejam modificadas geneticamente e usadas. Milhões de dólares estão sendo investidos em todo o mundo em pesquisa e desenvolvimento de

novas cepas de levedura, no entanto, sem investigar sua capacidade de tolerar condições estressantes semelhantes às que ocorrem nas destilarias brasileiras. Diante disso, as cepas CAT1 e PE2 podem ser consideradas entre as melhores candidatas à expressão gênica de importância industrial devido a sua boa tolerância aos diferentes tipos de estresses no ambiente fermentativo (AMORIM et al., 2011).

A multiplicação do fermento é realizada no início da safra até que se atinja a população ideal para condução do processo. Em geral, o início da multiplicação do fermento ocorre nas cubas de tratamento, onde são dosados nutrientes ricos em nitrogênio, fósforo e outros micronutrientes para a suplementação do fermento (células de leveduras), nessa etapa inicial a fermentação ocorre em condição de aerobiose, a oxigenação é um fator de extrema importância para garantir a reprodução/multiplicação do fermento. Os mostos usados nesta etapa têm a finalidade de atuar como substrato com o objetivo da reprodução celular, desta forma, o mosto é adicionado em uma faixa de concentração de 6-10°Brix, sendo aquecido a 35°C para garantir maior velocidade na reprodução celular e aumento da viabilidade celular (STECKELBERG, 2011).

O processo fermentativo inicia-se quando o inóculo é colocado em contato com o mosto. A partir deste momento o novo fluído passa a ser chamado de vinho levedurado ou vinho bruto, isto é, uma mistura de mosto e fermento. A fermentação ocorre em biorreatores denominados de dornas de fermentação, as quais têm capacidade que variam de 200-2000 m³, são constituídas de aço-carbono e na maioria das Usinas são todas fechadas com largas tubulações na parte superior que conduzem o CO₂ para colunas de recuperação, com o objetivo de recuperar o etanol contido no gás de arraste por meio de colunas de água (lavagem) e posteriormente destilação para retirada do etanol nele presente (LIMA, 2019).

Na etapa de fermentação, os mostos contêm cerca de 18-22% (massa/massa) de açúcares redutores totais (ART), enquanto as suspensões do fermento representam cerca de 25-30% do volume total da dorna de fermentação. A concentração das células deve estar por volta de 10⁹ células/mL no início da fermentação e cerca de 80% de viabilidade celular ao final. Essa elevada massa celular dentro dos fermentadores, é responsável por um curto tempo de fermentação que varia de 6-10 h, convertendo cerca de 90% desse açúcar dentro das dornas (BASSO et al., 2011).

Lima et al. (2001) reportam que a fermentação ocorra em 3 etapas distintas: fase preliminar, tumultuosa e final (Figura 6). Na fase preliminar, a que se denomina fase Lag, é caracterizada pela adaptação do fermento ao substrato (mosto), pequenas elevações de temperatura e pouco desprendimento de CO₂. A fase tumultuosa, corresponde ao momento mais intenso da fermentação. É caracterizada pelo desprendimento volumoso de CO₂, temperaturas

mais altas, aumento dos teores alcoólicos e acidez no vinho. Nesta etapa, o mosto adicionado junto ao fermento sofre o processo de recirculação passando por trocadores de calor através de bombeamento para realizar a troca térmica e manter estável a temperatura das dornas de fermentação. Dessa maneira, há maior agitação do meio e ativação do metabolismo celular gerando maior quantidade de espumas. A fase final é caracterizada pela diminuição da intensidade do desprendimento de CO_2 , pequenas concentrações de açúcar residual, teor alcoólico elevado, aumento do glicerol e ácidos orgânicos.

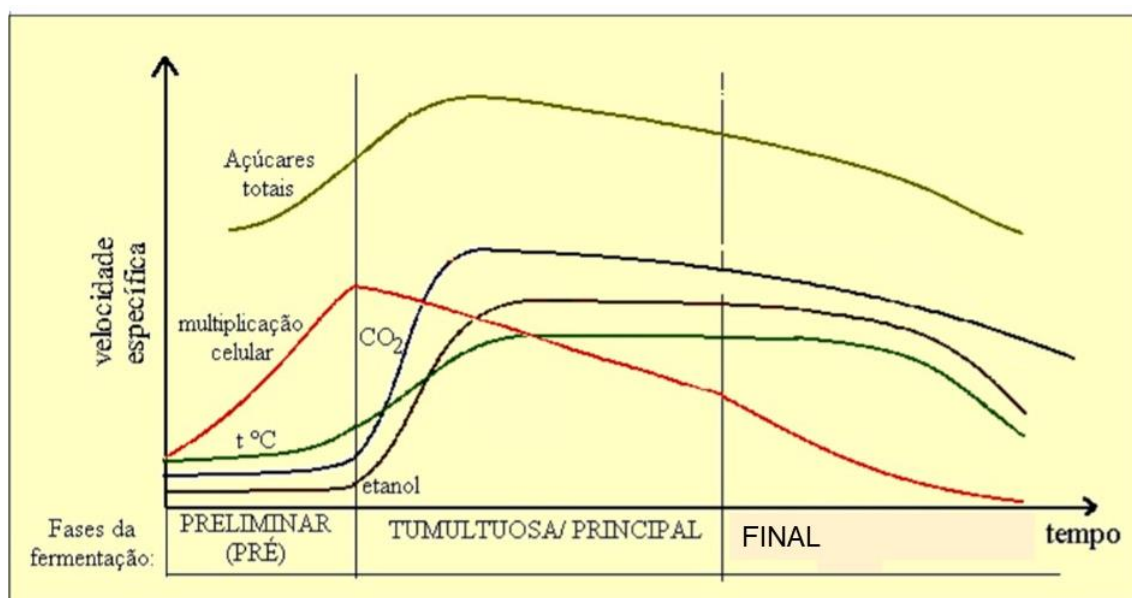


Figura 6. Fases da fermentação. **Fonte:** STUPIELLO; HORII, 1990.

Em 83% das destilarias brasileiras o processo fermentativo é conduzido pelo método Melle-Boinot (Figura 7), também denominado de batelada alimentada, e apenas 17% são processos de fermentação operados de forma contínua, em ambos é utilizado o reciclo do fermento, cuja característica é a recuperação do mesmo ao final de cada ciclo fermentativo, mediante a centrifugação do vinho e separação do creme (fermento concentrado). A cada início de ciclo, o fermento concentrado é submetido a um tratamento. Desta forma, o fermento concentrado é enviado a um biorreator (cuba) sob agitação permanecendo por 2-3 h, e hidratadas com água em proporções relativas, ácido sulfúrico para correção do pH, que pode variar entre 2-3, além de outros produtos como antimicrobianos, nutrientes e controladores de espuma. Após completo tratamento, o fermento concentrado tratado é transferido para a dorna, na qual inicia-se uma nova fermentação após realimentação com novo mosto (LOPES et al., 2016).

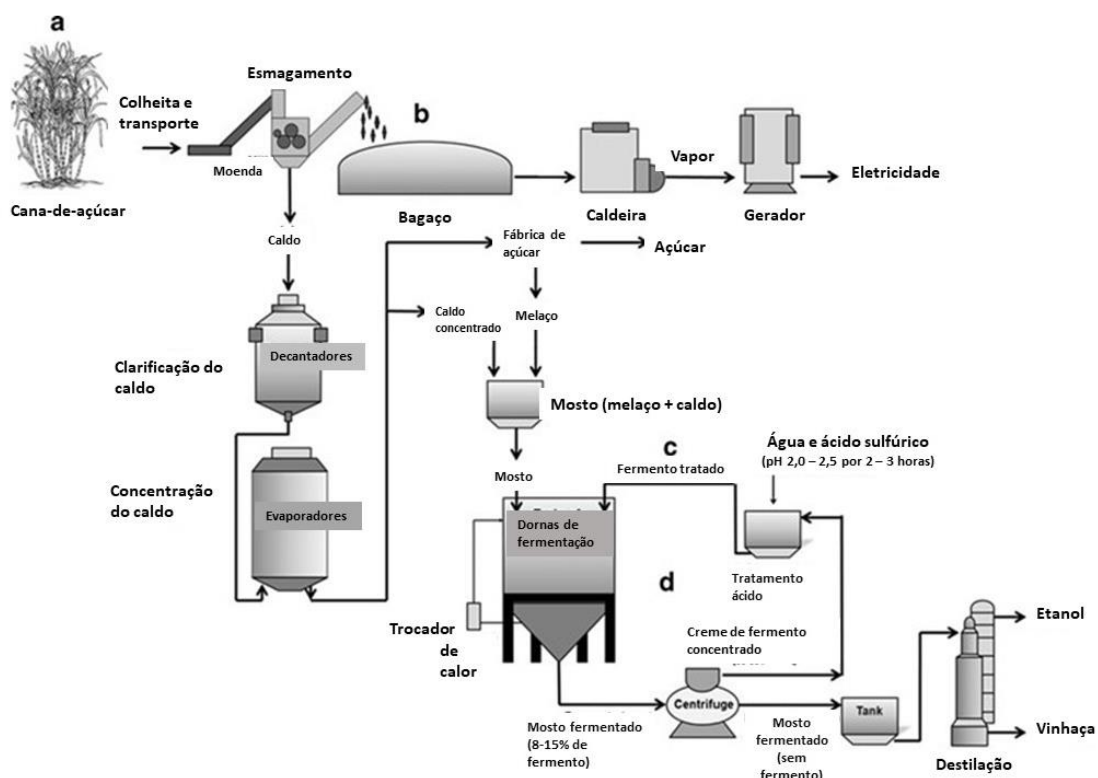


Figura 7. Exemplo simplificado de processo de produção de bioetanol operado em batelada alimentada (Melle-Boinot). **Fonte:** AMORIM, et al., 2011.

Os processos de fermentação operado de forma contínua correspondem a adição de mosto e fermento em vazão contínua e simultânea (Figura 8). Esse processo, no geral, possui de 4-5 dornas interligadas umas às outras, e dispostas em série como se fosse uma única. As dornas são denominadas de forma crescente: dorna primária, secundária, terciária, quaternária e dorna final. As primeiras dornas recebem a alimentação com mosto e as demais trabalham como se fossem de fermentação final. O vinho também é retirado de forma contínua, cuja vazão de saída é igual à de entrada, por seguinte encaminhado para centrifugação e destilação (LIMA, 2019).

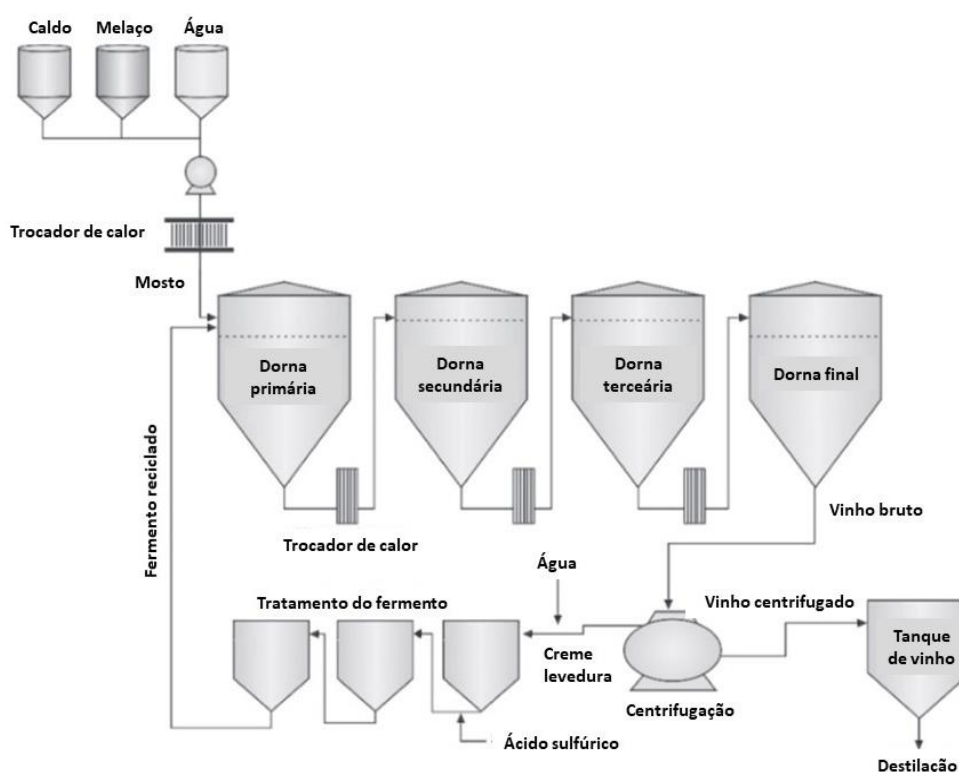


Figura 8. Exemplo simplificado de processo de produção de bioetanol operado de forma contínua. **Fonte:** LOPES et al., 2016.

Lopes et al. (2016) relatam que apesar de processos de fermentação operado em batelada alimentada apresentarem maiores custos de implantação com equipamentos como dornas e trocadores de calor, esse processo possui melhor resultados do que fermentações operadas de forma contínua (Tabela 1). Um estudo realizado durante oito anos consecutivos com 62 destilarias (51 bateladas e 11 contínuas) mostraram que os processos operados em batelada alimentada atingiram maiores rendimentos de fermentação. Além disso, observou-se menor nível de contaminação bacteriana no vinho e menores consumos com produtos químicos em comparação com os processos operados de forma contínua.

Tabela 1. Comparações de fermentações etanólicas operadas de forma contínua e batelada alimentada para produção de etanol no Brasil.

Características	Contínua	Batelada
Eficiência da fermentação (%)	87-89,5	88,9-92,5
Contaminação bacteriana do vinho (bastonetes.mL ⁻¹)	8,5-9,9 x 10 ⁷	2,0-3,9 x 10 ⁷
Consumo de ácido sulfúrico (g.L ⁻¹)	8- 4	6-7
Consumo de antibióticos (mg.L ⁻¹)	5,7-13	3,8-8,0
Consumo de antiespumantes (mg.L ⁻¹)	0,45-0,75	0,45-0,70

Fonte: Adaptado de LOPES *et. al* 2016.

Godoy (2006) considera que as principais vantagens dos processos operados em batelada em comparação aos operados de forma contínua são: menor risco de contaminação bacteriana, flexibilidade de operações e manutenções, facilidade de assepsia nas dornas (biorreatores); elevado rendimento de fermentação. Por outro lado, o processo operado em batelada apresenta como desvantagem maior custo de manutenção de equipamentos.

O controle global das condições de fermentação é fundamental para atingir máxima eficiência, ambos sistemas de fermentação devem ser conduzidos visando maiores rendimentos. Dentre essas variadas condições, é importante destacar que o fermento está susceptível à fatores estressantes durante a fermentação etanólica, como por exemplo, altas concentrações de etanol, elevados teores de açúcares, pH muito ácido, deficiência mineral, concentração de sais, elevada pressão osmótica, dentre outros, todos intensificados pela prática de reciclagem do fermento. No entanto, o fermento tem mecanismos de resposta à determinados fatores estressantes às condições industriais que são expostas. A trealose e glicogênio são carboidratos de reserva para energia adicional, bem como osmorreguladores da membrana plasmática quando exposta à elevados teores alcoólicos e mudanças drásticas de temperaturas. A combinação de ácido succínico com etanol possui efeito antimicrobiano, enquanto glicerol é um regulador de choques osmóticos (GODOY, 2006; LOPES *et. al.*, 2016).

3.3.2. Composição mineral do mosto de cana-de-açúcar

As destilarias brasileiras apresentam diferenças entre elas em termos de processos de fermentação e composição dos mostos. Destilarias anexas a fábrica de açúcar geralmente fermentam mosto de melaço diluído com água ou uma mistura de caldo de cana-de-açúcar e melaço, enquanto destilarias autônomas fermentam apenas caldos. A matéria-prima para a produção de etanol é chamada de mosto de alimentação (VARIZE *et al.*, 2019).

O melaço é um subproduto oriundo da fabricação de açúcar, contém sacarose como maior componente (30-40%, volume/volume) é rico em outros nutrientes incluindo vitaminas e minerais. É um líquido denso e viscoso, de cor marrom opaco e contém baixo percentual de água. Possui variadas denominações, em função da região de produção, como mel esgotado, mel pobre, mel final, mel residual ou simplesmente melaço. Possui densidade de $1,5 \text{ g.mL}^{-1}$. Em geral, o melaço não pode ser processado diretamente, devendo ser diluído com água de boa qualidade e/ou caldo de cana-de-açúcar para preparação do mosto. Apesar de sua riqueza em açúcares é deficiente em alguns componentes nutricionais, sendo algumas vezes necessária a suplementação balanceada com nutrientes inorgânicos, como sais de fosfato, sulfato de amônio e outros micronutrientes (PROCÓPIO et al., 2012).

Portanto, o mosto nada mais é que uma solução açucarada cuja concentração foi ajustada de forma a facilitar a sua fermentação. Basicamente é constituído de uma mistura de méis e caldo, com uma concentração de sólidos solúveis de aproximadamente 19°Brix. Desta forma, a concentração de açúcares do mosto deve ser compatível com a natureza e composição da matéria-prima, com o tipo de cepa de *S. cerevisiae* utilizada e forma do processo de condução da fermentação. Para possibilitar um bom desempenho fermentativo o mosto deve estar com faixa de pH ajustada entre 4,5-5 e temperatura de 32°C, pois nessas condições irão favorecer as atividades metabólicas do fermento (COSTA, 2006).

Na composição dos mostos, predomina a água, em torno de 75% (Água = 100 – Brix), se considerarmos mosto com 25°Brix, por exemplo. Nos 25% restantes, é que estão os elementos que vão ser determinantes ao processo de fermentação, tais como a quantidade de etanol a ser produzida, a acidez gerada nas dornas de fermentação, a quantidade de biomassa gerada (células de levedura que se reproduzem durante a etapa de fermentação), dentre outros parâmetros importantes para uma fermentação de alto rendimento (UDEH; KGATLA, 2013).

De acordo com Walford (1996) os minerais presentes no caldo consistem em componentes dissolvidos em água que se apresentam na forma de íons, com exceção de alguns minerais de sílica que se apresentam na forma de sólidos insolúveis. Os íons minerais estão em concentrações mais baixas no caldo, porém em maiores concentrações no melaço. Em ambos podemos encontrar, fósforo, magnésio, enxofre, cálcio, potássio, zinco, manganês, cobre, cobalto, ferro, alumínio, dentre outros elementos em menores concentrações. Esses compostos inorgânicos atuam como cofatores para importantes enzimas glicolítica e são responsáveis pelo metabolismo da *S. cerevisiae*.

A composição mineral dos substratos de cana-de-açúcar varia amplamente, dependendo da proporção de melaço utilizada para formular o mosto, variedade e maturidade da cana-de-

açúcar, solo, clima e processamento do caldo de cana-de-açúcar. A Tabela 2 indica as necessidades de nutrientes para o processo fermentativo, mas que eventualmente não precisam ser adicionados aos mostos, pois estão presentes nos substratos em teores satisfatórios. Entretanto, podem ocorrer deficiências e excessos que necessitem de correção (LIMA, 2019; BASSO et al., 2011).

Tabela 2. Concentração de nutrientes minerais no mosto para se obter adequada fermentação alcoólica.

Nutriente mineral	Concentração (mg.L ⁻¹)
NH ₄ ⁺	40-5900
P	62-560
K ⁺	700-800
Ca ⁺⁺	120
Mg ⁺⁺	70-200
SO ₄ ⁻	7-280
Na ⁺	200
Co ⁺⁺	10
Zn ⁺⁺	0,5-10
Cu ⁺⁺	7
Mn ⁺⁺	10-33
Fe ⁺⁺	0,2
Al ³⁺	< 10

Fonte: Adaptado de LIMA, 2019.

A faixa de concentração de alguns minerais, mostrados na Tabela 2, revelam que alguns nutrientes como o nitrogênio, fósforo, magnésio, enxofre, zinco e manganês podem apresentar uma faixa ampla. Essas variações podem ter consequências para o metabolismo da *S. cerevisiae* e, conseqüentemente, na produção de etanol (DE SOUZA, 2016).

A concentração de nutrientes é um dos fatores mais importantes para controle do processo fermentativo. Se presentes em quantidades inadequadas, maiores ou menores que as necessárias, os nutrientes podem conceder reflexos negativos sobre o desempenho do processo fermentativo. O fermento necessita de mosto que contenha fontes de carbono, como glicose e frutose, além disso deve conter matrizes de vitaminas, minerais e fonte de nitrogênio. Destaca-se que, como o mosto contém em partes quantidades adequadas desses minerais, é sempre conveniente determinar a composição média dos mostos para que a complementação seja a mais adequada ao processo fermentativo (PROCÓPIO et al., 2012).

Dentre esses parâmetros que influenciam a formação do perfil iônico dos mostos de fermentação, é importante destacar a utilização da vinhaça para fertirrigação de canaviais, essa prática é comumente adotada entre a maioria das Usinas produtoras de açúcar-etanol devido ser

um resíduo do processo agroindustrial. De maneira geral, a vinhaça é rica em teores de nitrato, potássio e matéria orgânica e aplicada para suprimir as necessidades de água durante os períodos de plantio e por ter capacidade de alteração das características químicas do solo, favorecendo a disponibilidade desses elementos para as plantas. Dentro deste contexto, a composição mineral do mosto pode ser correlacionada com a origem do canavial, proveniente ou não de fertirrigação com a vinhaça (DA SILVA et al., 2007).

3.3.3.Importância dos minerais para a fermentação etanólica

Para produtores de bioetanol que procuram melhorar o rendimento do processo, a suplementação mineral é de grande importância, todavia, a mesma só pode ser realizada quando se tem um entendimento sobre a influência dos minerais sobre a fisiologia do fermento (WALKER et al., 2000).

Íons minerais atuam como cofatores para importantes enzimas glicolíticas e como moduladores de estresse do fermento. Além de seus êxitos sobre as enzimas, os minerais podem ter efeitos na estabilidade e dinâmica das membranas celulares, levando a ações sobre permeabilidade celular e sistemas de sinalização. Ocasionalmente, a biodisponibilidade de certos minerais-chave pode ser limitante e isso pode afetar adversamente o processo fermentativo (WALKER et al., 2000)

A nutrição mineral nos processos fermentativos, é realizada basicamente de nitrogênio nas formas amoniacal (NH_4), amídica (uréia), ou amínica (aminoácidos), a *S. cerevisae* não metaboliza nitrogênio na forma de nitratos e proteínas. O fósforo é absorvido na forma de íon H_2PO_4^- , potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, enxofre entre outros em baixas quantidades. A nutrição orgânica exige uma fonte de carbono elaborada (glicose ou outro açúcar) que forneça energia química para suas atividades celulares além de algumas vitaminas como as tiaminas e ácidos pantotênicos (LIMA, 2019).

O nitrogênio é parte fundamental dos aminoácidos que formam as proteínas, enzimas e ácidos nucleicos do fermento. Se houver deficiência desse nutriente no meio fermentativo, ocorrerá inativação dos transportadores ativos de sacarose na membrana celular e impedimento da síntese proteica, acarretando decréscimo na produção de biomassa e diminuição do rendimento fermentativo. A suplementação com sulfato de amônio ou com a ureia tem sido requerida pela indústria sucroenergética por representarem fonte de nitrogênio mais econômica (JERONIMO et al., 2008).

O fósforo é fundamental para o metabolismo energético, integra moléculas informacionais (DNA/RNA) e estruturais (membrana fosfolipídica). Tem como principal

função a síntese de ácidos nucleicos e produção de ATP. Se houver insuficiência desse elemento no processo fermentativo, ocorrerá diminuição no brotamento celular fazendo com que o fermento não se multiplique, impactando seu crescimento. Neste contexto, a falta desse íon incapacitará os processos de transformação e transferência de energia química para o metabolismo do fermento (PEREIRA, 2007).

O magnésio é o segundo cátion mais abundante nos microrganismos, portanto é denominado como um macronutriente, ou seja, um elemento exigido em elevada quantidade pela célula. Essa alta demanda é consequência de seu importante papel de cofator de mais de 300 enzimas da via glicolítica, participando de várias funções bioquímicas e fisiológicas do fermento, dentre elas, ativação enzimática, manutenção da integridade e permeabilidade da membrana celular e regulador da pressão osmótica da célula. Portanto, a biodisponibilidade de íons Mg^{++} no meio é de fundamental importância para uma fermentação eficiente (DE SOUZA et al., 2014).

O zinco é requerido em pequenas quantidades pela *S. cerevisiae*, portanto é denominado de micronutriente. Sua função estabilizadora da estrutura quaternária das enzimas da via glicolítica faz com que esse elemento tenha importante papel de catalisador enzimático e na produtividade de etanol, sendo essencial para atividade da enzima álcool desidrogenase. Deficiências de zinco diminui a atividade fermentativa e impedem a síntese proteica. Por outro lado, a alta concentração de íons de zinco em um substrato pode ser tóxica, uma vez que o zinco afeta a permeabilidade das membranas ao potássio, causando uma diminuição na multiplicação do fermento e na atividade fermentativa (STEHLIK-TOMAS et al., 2004).

O cobre é um cátion divalente vital em células de *S. cerevisiae*. Este micronutriente atua como cofator para atividade de muitas enzimas da via glicolítica, das quais aquelas envolvidas em reações que necessitem de transferência de elétrons, tais como citocromo c-oxidase, lactase e Cu, Zn-superóxido dismutase. O manganês tem um papel importante no metabolismo de *S. cerevisiae* como parte de algumas enzimas, como a piruvato carboxilase (STEHLIK-TOMAS et al., 2004).

O fermento requer uma vasta gama de minerais para seu crescimento e suas funções metabólicas. A nutrição mineral da célula de *S. cerevisiae* é muito importante para garantir o sucesso da fermentação, especialmente na produção de etanol (WALKER et al., 2000). Na Tabela 3 são mostrados os principais constituintes minerais do fermento de processo de etanol (AIBA et al., 1973; REED; NAGODAWITHANA, 1991; SANTOS, 2008).

Tabela 3. Constituintes inorgânicos do fermento de processos industriais de produção de bioetanol.

Elementos (grama por 100 g, base seca)	AIBA et al. (1973)	REED; NAGODAWITHANA (1991)
Fósforo	0,8-2,6	1,35
Enxofre	0,01-0,24	0,39
Potássio	1,0-4,0	2,1
Magnésio	0,1-0,5	0,165
Sódio	0,01-0,1	0,012
Cálcio	0,1-0,3	0,075
Ferro	0,01-0,5	0,002
Zinco	-	0,017
Cobre	0,002-0,01	0,0008
Manganês	0,0005-0,007	0,000002
Molibdênio	0,0001-0,0002	0,00004

Fonte: SANTOS, 2008.

Varize et al. (2019) avaliaram a suplementação de mosto de melaço e xarope de cana-de-açúcar com nitrogênio amínico e seu impacto sobre a viabilidade e crescimento do fermento (CAT1). Os resultados revelados no estudo apontam que a suplementação de 200 mg.L⁻¹ de nitrogênio amínico proveniente de alguns aminoácidos, em mostos de melaço e xarope de cana-de-açúcar, pode favorecer ou depreciar o crescimento e viabilidade da linhagem CAT1 em fermentações simulando as condições industriais brasileiras, com reciclo do fermento. A suplementação com histidina se mostrou a mais promissora para o aumento da tolerância da linhagem industrial (CAT1).

Silva et al. (2006) avaliaram a influência do nitrogênio, fósforo e °Brix na produção de metabólitos secundários contaminantes totais (MSCT), ou seja, substâncias orgânicas voláteis (aldeído, acetonas, acetatos de etila, metanol) e álcoois superiores (n-propanol, iso-butanol, n-butanol) presentes no etanol (produto já destilado). Por meio de metodologia de planejamento fatorial e análise de superfície de resposta foi proposto um modelo probabilístico estatisticamente significativo para a fermentação etanólica. Os resultados revelaram que o fósforo e o nitrogênio, mesmo sem efeitos individuais, apresentaram interações entre si diminuindo a produção de MSCT, o que melhora a qualidade do etanol.

No estudo desenvolvido por Ferreira (2015) foi constatado que a suplementação mineral em caldos de cana-de-açúcar com íons Mg e Cu aumentaram o rendimento fermentativo em comparação com meio sem suplementação. O rendimento fermentativo de uma fermentação de caldo de cana-de-açúcar suplementada com cobre foi de (0,50 g.g⁻¹), suplementada com magnésio (0,47 g.g⁻¹) e o ensaio controle (sem adição de nutrientes) (0,42 g.g⁻¹). Ainda em seu

estudo foi avaliado o efeito desses dois minerais sobre o metabolismo de *S. cerevisiae*, constatando que o magnésio atua no direcionamento metabólico da levedura para um metabolismo redutivo ou fermentativo, inibindo o crescimento do fermento.

De Souza et al. (2015) realizaram suplementações de meios sintéticos com 10 diferentes formulações de componentes minerais, sempre com excesso de um mineral. A cepa de *S. cerevisiae* industrial JP1 foi utilizada nos procedimentos fermentativos, essa linhagem é a mais utilizada nas destilarias do nordeste brasileiro. Os meios suplementados com magnésio apresentaram o maior rendimento ($0,45 \text{ g.g}^{-1}$), enquanto os meios suplementados com cobre resultaram em menor rendimento ($0,35 \text{ g.g}^{-1}$). De acordo com seus resultados, o magnésio é o principal responsável pelo aumento da produção de etanol.

Pulingudla et al. (2011) investigaram o efeito da suplementação de alguns nutrientes em mosto contendo melaço, com uma concentração final de sólidos solúveis de 340 g.L^{-1} . Diferentes concentrações de ureia e sulfatos de magnésio foram adicionadas como suplemento atingindo teores de etanol de 12,1% (volume/volume) e 77,8% de eficiência fermentativa quando comparado com fermentação não suplementada, teor de etanol de 9,8% (volume/volume) e 63% de eficiência fermentativa.

Amorim e Leão (2005) advertem que, muitas vezes o aproveitamento de minerais pelo fermento depende de propriedades específicas, como valência e forma molecular (orgânica e inorgânica) e interações com outros elementos presentes, ou adicionados no meio. A concentração de nutrientes no mosto é um dos fatores mais importantes para uma boa fermentação. Se presentes em quantidades inadequadas, maiores ou menores que as necessárias, podem resultar em reflexos negativos no desempenho da fermentação etanólica

3.3.4. Vitalidade Celular

Apesar do interesse das indústrias brasileiras produtoras de bioetanol nos diferentes aspectos do controle de qualidade do fermento, tais como presença de contaminantes microbianos, viabilidade celular e floculação, são escassas às empresas de biotecnologia que realizam a quantificação da vitalidade celular em processos industriais de produção de bioetanol. Essa técnica é muito difundida no setor cervejeiro, pois o processo de fabricação é exigente quanto ao controle da qualidade da cerveja e da fisiologia do fermento. Um processo de fermentação otimizado exige um fermento viável e metabolicamente ativo. Consequentemente, quanto maior o número de células viáveis e metabolicamente ativas, maior será o rendimento fermentativo e produção de etanol. Portanto, os ensaios de viabilidade e

vitalidade do fermento são extremamente essenciais para avaliar a qualidade do fermento e garantir um reaproveitamento adequado do mesmo (SUHRE, 2014).

Atualmente, dentro do setor sucroenergético, a empresa Lievito-Biotecnologia promove a inovação de métodos de controle da qualidade do fermento, promovendo a técnica de vitalidade celular através da comercialização do [®]*Multikit Vital-Yan* e validação do ensaio da resazurina. Com o *Multikit Vital-Yan*, é possível quantificar o metabolismo ativo do fermento (vitalidade celular). O *Multikit*, conta com um sistema de análise de resultados, sendo possível aferir a viabilidade e vitalidade do fermento.

4. MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 9 apresenta um resumo das etapas realizadas no presente estudo. Os detalhes de cada etapa são descritos na sequência abaixo.

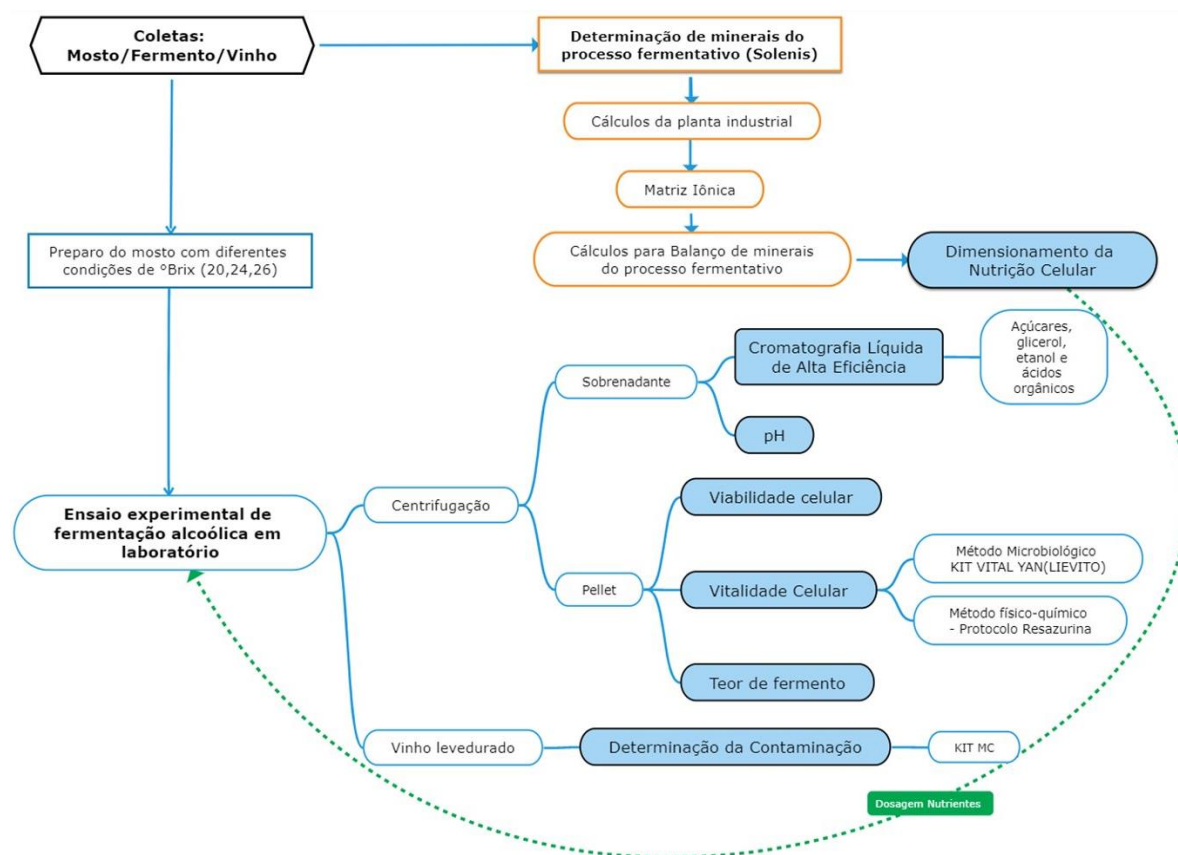


Figura 9. Fluxograma de decisão das principais etapas envolvidas no presente estudo.

4.1. Determinação de minerais e metais tóxicos da planta industrial

A amostragem para as análises de minerais foi conduzida em batelada em sistema de coleta de amostras compostas e devidamente acondicionadas sob congelamento a -20°C . A composição e a homogeneização das amostras foram realizadas uma vez por turno no laboratório da Usina, com volume coletado de 10 mL por turno, totalizando 30 mL por dia (3 turnos). As amostras foram sobrepostas no mesmo frasco até um volume máximo de 500 mL, totalizando 15 dias de composições. Foram fornecidos recipientes adequados com tampas de tal forma a garantir a qualidade das amostras até o laboratório de análise da empresa Solenis Especialidades Químicas-Ltda.

Os pontos de amostragem para as análises de minerais (N, P, Mg^{2+} , Mn, Zn, Cu) e metais tóxicos (Fe, Al^{3+} , Ca, K) foram: Mosto a ser fermentado, fermento tratado e vinho centrifugado. Os minerais foram classificados em dois grupos: os macronutrientes (N, P, Mg^{2+}) e os

micronutrientes (Mn, Zn, Cu), essa divisão, se dá função da necessidade do fermento à determinados elementos em maiores e menores quantidades.

As amostras de mosto, fermento tratado e vinho centrifugado da unidade industrial em estudo foram analisadas quanto à composição mineral pela empresa Solenis, no centro de pesquisa e desenvolvimento, *Paulínia Technical Center* (PTC) (Apêndice I). As quantificações dos minerais e metais pesados, foram realizadas durante o período de 6 meses da safra/21. O método utilizado para quantificação dos minerais foi por espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES), Método 6010 C EPA-600/4-87-032. Todas as análises de minerais e metais realizadas pela técnica de espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-AES) culminaram na determinação dos compostos em seu estado elementar, ou seja, sem carga, portanto, a determinação de cada um deles foi quantificada de forma total.

Este método descreve determinações multi-elementares usando sistemas ópticos sequenciais ou simultâneos e visualização axial ou radial do plasma. O instrumento mede espectros de emissão característicos por espectrometria óptica. As amostras são nebulizadas e o aerossol resultante é transportado para a tocha de plasma. Os espectros de emissão específicos do elemento são produzidos por um plasma acoplado indutivamente por radiofrequência. Os espectros são dispersos por um espectrômetro de grade, e as intensidades das linhas de emissão são monitoradas por dispositivos fotossensíveis (JONES et al., 1987).

4.2. Cálculos da planta industrial de produção de bioetanol

Para realizar o balanço de minerais, foi necessário conhecermos as principais condições e cálculos da planta industrial, como a produção de etanol total (Equação 1), a quantidade de açúcares necessário para atingir a produção de etanol estipulada (Equação 2) e o teor de fermento produzido (Equação 3). Estes fatores levaram a uma definição da “matriz iônica” a qual foi determinante para a complementação e/ou suplementação do mosto em planta industrial

- **Cálculo para produção de Etanol Total**

$$ETANOL\ TOTAL = ETANOL_{hidratado} * 0,95557 + ETANOL_{anidro} * 0,99576 \frac{m^3}{dia} \quad (1)$$

Onde:

Etanol Hidratado para Etanol Total: multiplicar por 0,95557

Etanol Anidro para Etanol Total: multiplicar por 0,99576

- **Cálculo do teor de açúcares totais (AT) necessário**

A quantidade de AT necessária para a fermentação (ton.h^{-1})

$$AT_{\text{necessária}} = \frac{\left(\text{ETANOL TOTAL} * 0,78923 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \right)}{\left(\frac{\text{REND}_{\text{ferm}}}{100} * Y_{\frac{P}{S}} \right) * 24} \frac{\text{ton}}{\text{h}} \quad (2)$$

Onde:

REND_{ferm} = rendimento da fermentação (%) (dados usina);

$Y_{\frac{P}{S}}$ = coeficiente de rendimento teórico de substrato (AT) a produto (etanol) = 0,4550 (ton.ton^{-1});

Massa específica de Etanol = 0,78923 (kg.L^{-1});

- **Teor do fermento produzido**

A produção do fermento (células de leveduras) nas dornas de fermentação pode ser conhecida através do estudo cinético da fermentação, sendo o coeficiente de rendimento de AT em massa seca pode ser da ordem de:

$Y_{\frac{X}{S}}$ = coeficiente de rendimento de substrato (AT) em biomassa = 0,030 ton AT/ton (base seca).

Portanto,

$$C_{\text{él prod}} = AT_{\text{neces}} * Y_{\frac{X}{S}} \frac{\text{ton}}{\text{h}} \quad (3)$$

4.3. Matriz Iônica

Olbrich (2006) determinou as quantidades mínimas de cada íon (% em base seca no fermento produzido) expressado em forma de uma matriz iônica necessária para produção de células de fermento nas dornas de fermentação, conforme Figura 10.

MATRIZ IÔNICA DA PLANTA INDUSTRIAL

Base Iônica NITROGÊNIO	1,50	% Massa Seca
Base Iônica FÓSFORO	2,00	% Massa Seca
Base Iônica MAGNÉSIO	1,00	% Massa Seca
Base Iônica MANGANÊS	0,50	% Massa Seca
Base Iônica ZINCO	0,17	% Massa Seca
Base Iônica COBRE	0,05	% Massa Seca

Figura 10. Matriz Iônica para produção de bioetanol em escala industrial.

Fonte: Adaptado de Olbrich, 2006.

Através do estudo desenvolvido por Olbrich (2006), podemos calcular por meio da quantidade do fermento produzido nas dornas, a quantidade de massa seca mínima de cada íon que a fermentação necessita. Assim tem-se, pela Equação 4 a matriz iônica, ou seja, as quantidades mínimas esperadas dos principais íons que serão determinantes para o balanço de massa.

Exemplo: Nitrogênio

N_{min} : quantidade mínima de Nitrogênio nas dornas (kg.h^{-1});

$Céls_{prod}$: massa de fermento produzido nas dornas (ton.h^{-1});

$N\%_{matriz}$: Nitrogênio matriz iônica da planta industrial (% em base seca);

Portanto,

$$N_{min} = Céls_{prod} * \left(\frac{N\%_{matriz}}{100} \right) * 1000 \frac{\text{kg}}{\text{h}} \quad (4)$$

4.3.1. Cálculos para balanço de minerais no processo

A partir dos resultados obtidos das determinações analíticas dos minerais no vinho delevurado, leite de leveduras e mosto, foram calculados os seguintes parâmetros:

- **Balanço Global da planta industrial**

A Equação 5 foi aplicada para determinar o balanço de massa dos principais fluxos da fermentação, considerando as vazões volumétricas de entrada (mosto), de recirculação (fermento ou leite de levedura) e saída (vinho delevurado), esses dados foram coletados na indústria.

$$SALDO = Mosv + LeiLevv - VinDelv \quad (5)$$

Onde:

Mos_v : Vazão volumétrica de mosto ($m^3.h^{-1}$);

$LeiLev_v$: Vazão volumétrica de leite de leveduras ($m^3.h^{-1}$);

$VinDel_v$: Vazão volumétrica de vinho delevurado ($m^3.h^{-1}$);

- **Balanço por componente**

A Equação 6 foi aplicada para todos os elementos químicos para verificar o balanço por componentes minerais e o saldo de minerais da fermentação etanólica.

Exemplo: Nitrogênio

$$Ns = (Mos_v * N_{mosto}) + (LeiLev_v * N_{Leilev}) - (VinDel_v * N_{VinDel}) / 1000 \frac{kg}{h} \quad (6)$$

Onde:

N_{mosto} = Nitrogênio no mosto (ppm);

N_{LeiLev} = Nitrogênio no leite de leveduras (ppm);

N_{Vindel} = Nitrogênio no vinho delevurado (ppm);

} **Minerais Solenis**

N_s = saldo de nitrogênio na fermentação expressado em ($kg.h^{-1}$)

4.3.2. Dimensionamento da nutrição celular

- **Nutrição Necessária:** A Equação 7 foi aplicada para todos os elementos químicos para identificar a necessidade de minerais da fermentação, com base na matriz iônica e no saldo de nutrientes encontrado.

Ex: Nitrogênio

$$N_{nec}: N_{min} - N_s \quad (7)$$

Onde:

N_{nec} : Nitrogênio necessário ($kg.h^{-1}$);

N_{min} : Nitrogênio mínimo ($kg.h^{-1}$);

N_s : Nitrogênio em saldo ($kg.h^{-1}$);

4.4. Ensaio experimental de fermentação alcoólica em laboratório

Os ensaios de fermentação alcoólica foram realizados nos laboratórios do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia (FCF)-UNESP.

4.4.1. Preparo do mosto com diferentes condições de grau °Brix

O mosto e o melaço industrial de cana-de-açúcar proveniente da Usina em estudo, foram coletados mediante autorização da empresa, seguindo os protocolos de segurança. O ponto de coleta do mosto foi definido após ele passar pelo sistema de resfriamento de placas (trocadores de calor), no anel de alimentação das dornas de fermentação. O melaço foi coletado na saída dos tanques de armazenamento de mel final. Um volume total de 3 L de mosto com 18° Brix foi acondicionado em frasco apropriado, levado ao laboratório da Usina e distribuído em 3 diferentes béqueres de 1 L. As amostras de mosto foram preparadas em 3 diferentes condições para a condução dos ensaios experimentais (20°, 24° e 26° Brix). O preparo das diferentes soluções, foi realizado com o auxílio de um refratômetro digital (ATAGO modelo SMART - 1), agitador magnético (FISATOM) e uma pipeta tipo *Pasteur*. O melaço com 80 °Brix foi adicionado nos respectivos béqueres já contendo o mosto industrial, tendo em vista obter as 3 diferentes condições de sólidos solúveis, selecionadas para os experimentos fermentativos. Após essa etapa, os mostos com diferentes concentrações foram separados e acondicionados em frascos de 500 mL sob refrigeração de 5°C. Essas 3 condições de diferentes °Brix do mosto foram selecionadas com base nas concentrações comumente praticadas em fermentações industriais que utilizam o melaço para composição do mosto a ser fermentado.

4.4.2. Preparo do fermento

Para os ensaios fermentativos foi utilizado o fermento (*Saccharomyces Cerevisae* comercial) provenientes da mesma Usina. O fermento foi coletado na saída das centrífugas separadoras do processo industrial sob a forma de creme concentrado 75% (massa/volume). A amostra de creme concentrado, foi diluída com água tratada do processo industrial até atingir a concentração de 33,3% (m/v) de teor de fermento diluído, conforme condição operacional de trabalho do setor de pré-tratamento de fermento. Após a dissolução parcial do creme de leveduras, a suspensão de células foi transferida para frascos de 500 mL e acondicionada em refrigerador sob temperatura de 5°C, por 2 dias.

4.4.3. Preparo de nutrientes inorgânicos

Dois produtos de aplicação comercial, formulados em diferentes combinações e concentrações de macros e micronutrientes foram fornecidos pela empresa Solenis Especialidades Químicas-LTDA (Tabela 4).

Tabela 4. Composição química dos produtos utilizados como nutrientes

Composição (g.kg⁻¹)	Nitrofós Macro	Nitrofós Micro
Nitrogênio	221,13	-
Fósforo	282,24	-
Magnésio	10,08	9,0
Manganês	15,02	15,5
Zinco	3,15	10
Cobre	-	25

A formulação dos nutrientes comerciais ([®]Nitrofós Macro e [®]Nitrofós Micro) apresenta-se na forma líquida, no entanto, foram aplicados na condição original do produto e sem diluições. Para todos os experimentos foram adicionados 20 µL de cada nutriente sob volume de mosto fermentado (200 mL) resultando em dosagens de 100 ppm. A escolha desta concentração foi baseada em relatórios industriais de Usinas da região Sudeste do Brasil. As concentrações dos principais íons (N, P, Mg, Mn, Zn, Cu) que compõem mosto e fermento do mês de junho/2021 foram tomadas como parâmetro para suplementação com os nutrientes inorgânicos. Os cálculos mássicos de suplementação de cada íon podem ser visualizados no Apêndice II.

4.4.4. Condução dos ensaios de fermentação etanólica

Os ensaios de fermentação foram conduzidos em modo batelada com fermento na concentração de 33,3% (massa/volume) e mosto industrial (20, 24 e 26° Brix) em frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL na proporção de 60 mL de fermento para 140 mL de mosto, totalizando 200 mL de volume total. Os experimentos foram divididos em 3 bateladas de fermentação, cada uma correspondente a diferentes condições de °Brix de mosto (20, 24 e 26). Para cada condição estabelecida, foi realizado um ensaio chamado de “controle” apenas com o mosto correspondente, sem nenhuma suplementação para efeito comparativo. Todas as fermentações foram conduzidas em triplicata.

Para realizar os ensaios de fermentação o fermento foi previamente submetido à um tratamento com solução de ácido sulfúrico 1N para ajuste de pH = 2,8 em laboratório com auxílio do agitador magnético para completa homogeneização por 5 min. a 28 °C, conforme

prática utilizada nas fermentações em escala industrial. Após correção do pH, foi transferido com proveta volumétrica uma alíquota de 60 mL da suspensão do fermento para os 6 frascos identificados (3 controles) e (3 nutridos). Após adicionar o fermento nos respectivos frascos, foi transferido uma alíquota de 20 µL de ambos os nutrientes (Macro/Micro) para os ensaios nutridos e homogeneizados por 2 min. Por fim, o mosto foi adicionado e as fermentações foram incubadas por 8 h a 32 °C sob agitação orbital de 200 rpm em Shaker (™AMEREX-GYROMAX modelo 737R).

Amostras de 5 mL foram retiradas no início da fermentação (tempo zero) e a cada 2 h, durante período de 8 h de fermentação. O volume coletado foi vertido em tubos de centrifuga, tipo ®Falcon. Após essa etapa, foram levadas ao banho maria à 100°C por 5 min para inativação do fermento. As frações coletadas foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi acondicionado em tubos tipo ®Eppendorf de 2 mL e determinando o pH (potenciômetro modelo ®Tecnal) e os teores de açúcares, etanol, glicerol e ácidos orgânicos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (item 4.5.1). Após coleta do sobrenadante, o *pellet* de células precipitadas foi ressuspensão em água destilada e novamente centrifugado, repetindo-se o processo três vezes com o descarte do sobrenadante. Após etapa de lavagem do *pellet*, as células precipitadas foram ressuspensas no mesmo volume inicial, adequadamente diluídas e analisadas quanto ao teor de levedo por espectrofotometria (item 4.5.2).

4.4.5. Parâmetros da fermentação

O desempenho das fermentações etanólica foi avaliado através dos parâmetros fermentativos, como se segue: fator de conversão de substrato em produto ou rendimento (g.g⁻¹), eficiência de fermentação (%), produtividade volumétrica (g.L⁻¹.h⁻¹) e produção de etanol batelada (g.L⁻¹). Desta forma, a partir dos resultados obtidos das determinações analíticas das fermentações iniciais (tempo zero) e finais (8 h), foram realizados os cálculos dos parâmetros fermentativos, utilizando as Equações 8 a 12. Os cálculos desses parâmetros foram aplicados para todas as fermentações com diferentes condições de °Brix do mosto de ambos os grupos, controle e nutrido.

- **Açúcar consumido (S)**

$$S = S_0 - S_f \quad (8)$$

Onde:

S = Açúcar consumido (g.L⁻¹)

S_f = Concentração final de açúcares (g.L⁻¹)

S_0 = Concentração inicial de açúcares (g.L^{-1})

- **Etanol produzido (P)**

$$P = P_f - P_i \quad (9)$$

Onde:

P = Etanol produzido (g.L^{-1})

P_f = Concentração final de etanol (g.L^{-1})

P_i = Concentração inicial de etanol (g.L^{-1})

- **Fator de conversão de substrato em produto ou rendimento ($Y_{P/S}$)**

$$Y_{P/S} = \frac{P}{S} \quad (10)$$

Onde:

P = Etanol produzido (g.L^{-1})

S = Açúcar consumido (g.L^{-1})

$Y_{P/S}$ = Rendimento ou fator de conversão do substrato em etanol (g.g^{-1})

- **Eficiência da fermentação**

Calculado com base no rendimento teórico proveniente da Equação de Gay-Lussac (1 g de glicose é convertida em 0,511 g de etanol)

$$Ef = \left(\frac{Y_{P/S}}{0,511} \right) * 100\% \quad (11)$$

Onde:

Ef = Eficiência da fermentação (%)

$Y_{P/S}$ = Fator de conversão do substrato em etanol ou rendimento (g.g^{-1})

- **Produtividade volumétrica**

$$PR = \frac{CE}{t} \quad (12)$$

Onde:

CE = Concentração de etanol (g.L^{-1})

PR = Produtividade volumétrica de etanol ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

t = Tempo de fermentação (h)

4.5. Procedimentos analíticos e microbiológicos

4.5.1. Determinação dos metabólitos oriundos das fermentações etanólica

Os teores de açúcares, ácidos orgânicos, glicerol e etanol foram determinados nos sobrenadantes das fermentações (item 4.4.4) devidamente diluídas e filtradas em membrana de $0,45\ \mu\text{m}$. A quantificação foi realizada por CLAE (SHIMADZU modelo NEXERA XR). Para a determinação dos ácidos orgânicos foi utilizada a coluna HPX-87H ($300 \times 7,8\ \text{mm}$) da BIO-RAD Aminex com as seguintes condições: temperatura de forno de 60°C : eluente composto de ácido sulfúrico 5 mM com fluxo de $0,6\ \text{mL.min}^{-1}$: volume de amostra de $20\ \mu\text{L}$: detector de índice de refração (SHIMADZU, modelo RID-20A) a 60°C . Para a determinação de glicose, frutose, sacarose, glicerol e etanol, foi utilizada a coluna Shodex KS-802 ($300 \times 8\ \text{mm}$) da WATERS com as seguintes condições: temperatura de forno de 30°C : eluente composto por água ultrapura com um fluxo de $1\ \text{mL.min}^{-1}$: volume de amostra de $20\ \mu\text{L}$: detector de índice de refração (SHIMADZU, modelo RID-20A) a 30°C . Para as determinações os padrões analíticos de sacarose, glicose, frutose, ácido succínico, ácido lático, ácido acético, glicerol e etanol ([®]*Sigma*) foram secos sob pentóxido de fósforo e vácuo e diluídos em diferentes concentrações para a elaboração das respectivas curvas analíticas (Apêndices III e IV).

4.5.2. Determinação do teor do levedo (fermento)

Foi utilizado espectrofotômetro (marca Thermo Scientific modelo Genesys 10S-UV-Vis) através da técnica de turbidimetria (espalhamento de luz a $600\ \text{nm}$ para leituras da densidade ótica). Para isso foram utilizadas alíquotas de fermento lavadas e ressuspensas em volume inicial de centrifugação (item 4.4.4). A suspensão obtida, foi homogeneizada em *vortex* e devidamente diluída com água destilada na proporção de 1:99. Após etapa de diluição, as amostras foram analisadas em espectrofotômetro e correlacionadas com curva analítica de concentração de levedo (g.L^{-1}) versus espalhamento de luz determinada por massa seca (Apêndice V) (SILVA, 2020).

4.5.3. Determinação da vitalidade celular por método físico-químico

Este é um protocolo elaborado e validado pela empresa *LIEVITO* - Biotecnologia. O ensaio consiste em avaliar por método semiquantitativo a vitalidade do fermento, utilizando um reagente de cor, a resazurina. O ensaio da vitalidade celular utilizando-se a resazurina, é um método físico-químico que se baseia na capacidade das células vivas de reduzir o reagente resazurina azul ($C_{12}H_6NNaO_4$) em resorufina rosa, este ensaio é um indicador oxidação-redução na avaliação de moléculas redutoras por células metabolicamente ativas. Sendo assim, quanto mais metabolicamente ativo o fermento, maior será a produção de moléculas redutoras e, portanto, uma maior alteração colorimétrica (proporcional a vitalidade da levedura). No início e final de cada fermentação com mosto de 24°brix este protocolo foi aplicado para determinar a vitalidade e viabilidade do fermento.

- **Preparo da solução tampão PBS:** Foi pesado os seguintes componentes para preparo da solução tampão PBS: 8,0 g de NaCl; 0,2 g de KCl; 1,189 g de Na_2HPO_4 anidro; 0,2 g de KH_2PO_4 . Após pesagem, os componentes foram transferidos para um frasco de 1 L, avolumado com água destilada, homogeneizados até completa dissolução. Em seguida, o frasco foi autoclavado.
- **Preparo da solução estoque de Resazurina (10x) $1mg.mL^{-1}$ (massa/volume):** Para o preparo da solução estoque, foi pesado 5 mg do reagente resazurina e solubilizado em 5 mL de PBS estéril. A validade é de 2 anos, conservado a $-20\text{ }^{\circ}C$.
- **Preparo da solução trabalho de Resazurina (10x) $0,1\text{ }mg.mL^{-1}$ (massa/volume):** Foi aplicado o cálculo $C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$ para volume desejado. A solução de trabalho deve ser mantida ao abrigo de luz a $4\text{ }^{\circ}C$ por 30 dias.
- **Preparo da amostra do fermento:** No início e final de cada fermentação, foi amostrado um volume de 10 mL do vinho levedado e transferido para tubos de centrifuga, tipo *Falcon* devidamente identificados. Após amostragem, os tubos foram centrifugados a 5.000 rpm por 3 min. O sobrenadante foi descartado e 1 mL do *pellet* de leveduras foi ressuspenso em 9 mL de solução salina estéril de NaCl 0,9% (massa/volume) em tubo *Falcon* (células 10^{-1}).
- **Realização do Ensaio:** O ensaio iniciou-se após homogeneização completa da amostra do fermento e 1 mL da suspensão de células do tubo (10^{-1}) para *Eppendorf* de 1,5 mL. Deste modo, seguiu-se com as etapas de lavagem das células, utilizando centrifugação a 5.000 rpm por 1 min. Antes de descartar o sobrenadante foi realizado o teste de interferente do método através da adição de 90 μL do sobrenadante do *Eppendorf* e 10 μL da solução trabalho do

reagente de cor resazurina na placa de 96 poços. Observou-se a coloração do teste e o sobrenadante excedente do [®]Eppendorf foi descartado. Se a coloração do teste resultar em cor rosa/laranja deve-se proceder com etapas sucessivas de lavagem até a coloração tornar-se azul (Figura 11).

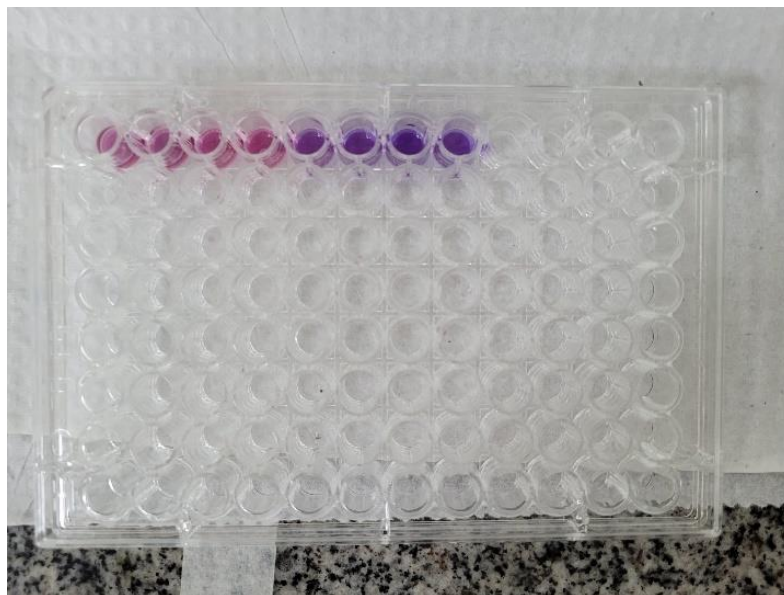


Figura 11. Teste de interferente do método na placa de 96 poços.

Após completo o teste de interferente do método (lavagem de células), foi transferido uma alíquota de 100 μL da suspensão de leveduras do [®]Eppendorf de lavagem para outro [®]Eppendorf contendo 900 μL de NaCl (10^{-2}). Após homogeneização, foi adicionado 15 μL do corante azul de metileno (0,2%, massa/volume) e 15 μL da suspensão de células em outro [®]Eppendorf e homogeneizado com ação do micropipetador a suspensão célula-corante (dil.2x). Consequente, foi adicionado 10 μL da suspensão célula-corante em Câmara de Neubauer e realizado a contagem em microscópio óptico (aumento de 40x) das células totais (células vivas e mortas) e de células mortas nos campos destacados em vermelho, conforme a Figura 12.

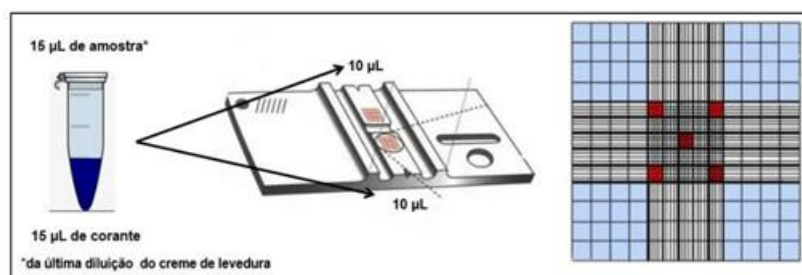


Figura 12. Análise de viabilidade celular em câmara de Neubauer.

Fonte: Adaptado de LIEVITO

Como resultado, foi realizado o cálculo da viabilidade celular da suspensão de células (Equação 13).

$$\text{Viabilidade celular}(\%) = \frac{\text{célsvivas}}{\text{célstotais}} * 100\% \quad (13)$$

Como resultado, foi realizado o cálculo da concentração celular da suspensão de células (Equação 14).

$$\text{Concentração celular (célst.mL}^{-1}\text{)} = \text{célstotais} * 5.10^4 * 2 * 10 \quad (14)$$

Após determinar a viabilidade e a concentração de células, foi aplicado um ajuste da concentração celular para 1×10^8 células.mL⁻¹ ($C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2$). Em seguida adicionou-se 90 µL de suspensão de células 1×10^8 e 10 µL da solução trabalho do reagente resazurina na placa de 96 poços. A placa foi embrulhada em papel alumínio e armazenada sob temperatura de 25°C durante 3 h sob abrigo de luz. Após tempo de espera a coloração foi checada de forma visual e correlacionada com a vitalidade celular, seguindo o gabarito de cores (Figura 13).



Figura 13. Catálogo de cores para comparativo da vitalidade celular.

Fonte: Adaptado de LIEVITO

4.6. Determinação da vitalidade celular por método de plaqueamento

O presente *kit* é um produto patenteado (patente nº BR 10 2015 005368-1 A2) e comercializado pela empresa LIEVITO-Biotecnologia. A presente invenção se refere a uma composição de meio de cultura sólido contendo corantes específicos que permitem identificar e monitorar leveduras inoculadas (*starters*) durante o processo de fermentação com base na diferença entre a coloração de colônias de leveduras. O [®]*Multikit*, conta com um sistema de análise de resultados (planilha fechada), sendo possível aferir a viabilidade e vitalidade do fermento. Neste projeto, a utilização do *kit* consistiu em avaliar por método quantitativo a vitalidade celular do fermento submetido ou não à adição de nutrientes inorgânico comerciais, como método complementar à análise de viabilidade celular e vitalidade celular pelo método

da resazurina. No início e final de cada fermentação contendo mosto com 24° Brix este protocolo foi aplicado para quantificar a vitalidade celular.

- **Plaqueamento da amostra no meio seletivo *LIEVITO*:** O procedimento analítico foi realizado sob condições assépticas (câmara de fluxo laminar) com todos os materiais devidamente autoclavados. O ensaio foi realizado a partir do tubo [®]*Falcon* contendo suspensão de células (10^{-1}) utilizado no método físico-químico. Foi transferido 100 μL da suspensão de fermento do tubo (10^{-1}) para [®]*Eppendorf* contendo 900 μL de NaCl (10^{-2}). Segundo a metodologia do *kit*, o procedimento de diluição em série para o plaqueamento, é realizado a partir do tubo contendo células (10^{-2}). Neste sentido, a técnica de diluição seriada foi aplicada seguindo a proporção 1:10 (10^{-1}); 1:100 (10^{-2}); 1:1000 (10^{-3}); 1:10000 (10^{-4}). Em seguida, foi transferido 50 μL do [®]*Eppendorf* 10^{-4} para placa contendo o meio de cultivo e espalhado até total absorção utilizando alça de esfregaço. As placas foram incubadas e invertidas em câmara de germinação a 30°C durante 3 dias. Após período de incubação foi realizada a contagem das colônias, realizado os registros das imagens através de fotos e inserido os resultados na planilha *LIEVITO* para quantificação da vitalidade celular (Figura 14).



Figura 14. Contagem de Unidade Formadora de Colônia (UFC/placa) em placa contendo meio seletivo *LIEVITO*.

4.7. Determinação do nível de contaminação bacteriana

O nível de contaminação bacteriano foi quantificado através do [®]*KIT MC* (Diagnóstico Rápido da Contaminação Bacterina do Processo de Fermentação Etanólico) atualmente comercializado pela PROBAC do Brasil. O presente *kit* é um produto patenteado (patente

número INPI PI1102066) e foi validado pela metodologia de plaqueamento. A presente metodologia consiste na adição de diferentes volumes de amostra nos tubos do KIT (6 tubos de ensaio idênticos contendo uma solução de cor azul): controle sem adição de amostra (tubo 1), 30 µL de amostra (tubo 2), 60 µL de amostra (tubo 3), 90 µL de amostra (tubo 4), 210 µL de amostra (tubo 5) e 480 µL de amostra (tubo 6). Após a adição da amostra os tubos foram colocados em estufa durante 1 h a 30°C. Ao final, o primeiro tubo (sequência tubo1-6) que apresentou alteração visível de cor (comparado ao tubo controle, sem adição da amostra) foi comparado com um gabarito de cores, as quais mostram os valores equivalentes dos níveis de contaminação bacteriana (Figura 15). No início e final de cada fermentação com mosto 24°brix este protocolo foi aplicado para quantificar a contaminação bacteriana.

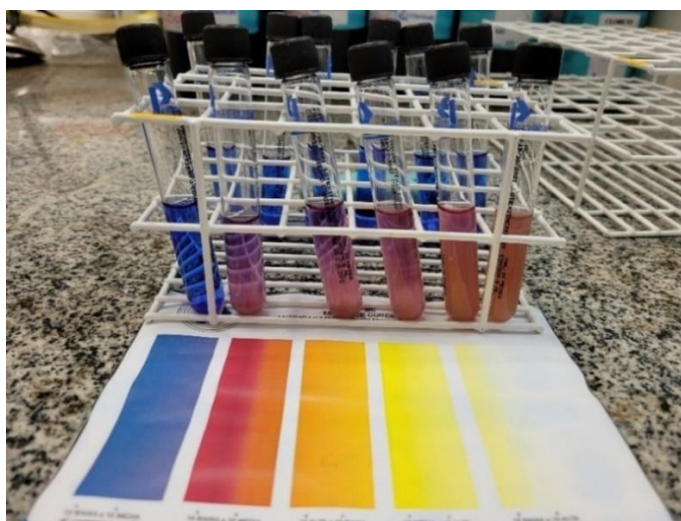


Figura 15. Diagnóstico Rápido da Contaminação Bacteriana do Processo de Fermentação Etanólico (®KIT MC).

4.8. Análise de custo-benefício da aplicação do produto nutricional (®Nitrofós)

Considerando as concentrações de etanol (produção batelada) obtidas nos ensaios fermentativos (24° Brix) foi possível calcular os teores alcoólicos em porcentagem (volume/volume) dos respectivos grupos, controle e nutrido (Equação 15).

$$EtOH (\%) = \frac{CE}{1000} * 100\% \quad (15)$$

Onde:

EtOH = Concentração de etanol (%);

CE = Concentração de etanol (g.L⁻¹);

Desse modo, com a porcentagem alcoólica calculada, foi possível estimar a produção de etanol de uma dorna de 370 m³ de volume útil (Equação 16) considerando os respectivos teores alcoólicos de cada grupo (controle e nutrido) e estimar a produção de etanol mensal (m³), considerando 12 dornas processadas por dia em um Usina produtora de etanol.

$$\text{Prod. Etanol mensal (m}^3\text{)} = \left(\frac{\text{Vol. dorna} * \text{EtOH (\%)}}{100} \right) * 12 * 30 \quad (16)$$

Onde:

Vol. Dorna = Volume de vinho na dorna (370 m³)

Etanol (%) = Teor alcoólico na dorna (volume/volume)

12 = nº de dornas processadas no dia;

30 = nº de dias do mês;

Considerando o preço de venda do etanol praticado pela Usina em R\$ 2,805 (Cenpea, 2022) multiplicado pela produção de etanol mensal (Equação 16) foi possível estimar os valores de etanol mensal (R\$/mês) para os respectivos grupos, controle e nutrido.

Considerando as dosagens dos produtos praticadas nos ensaios fermentativos (100 ppm) em função do volume de dorna foi calculada a quantidade em quilogramas de cada um dos produtos aplicados em cada dorna. Por fim, considerando o preço médio dos produtos de R\$ 6,02 e as mesmas 12 dornas processadas no dia, foi possível estimar os custos com os produtos em um mês (Equação 17).

$$\text{Custo nutrientes (R\$/mês)} = \left(\frac{\text{Vol. dorna} * \text{DN}}{1000} \right) * 12 * 30 * 6,02 \quad (17)$$

Onde:

DN = Dosagem de nutrientes (100 ppm);

Vol. Dorna = Volume de vinho na dorna (370 m³);

12 = nº de dornas processadas no dia;

30 = nº de dias do mês

A estimativa do custo-benefício consistiu em comparar a diferença dos valores da produção de etanol mensal entre os grupos controle e nutrido, descontando-se o custo dos nutrientes (R\$/mês) do ensaio nutrido resultando no ganho mensal (R\$/mês) (Equação 18).

$$\mathbf{Ganho\ (R\$/m\acute{e}s)} = (VE_{(controle)} - VE_{(nutrido)}) - \text{CustoNutri} \quad \mathbf{(18)}$$

Onde:

$VE_{(controle)}$ = Valor de Etanol mensal sem nutrientes (R\$/mês);

$VE_{(nutrido)}$ = Valor de Etanol mensal com nutrientes (R\$/mês);

Custo Nutri = Custo mensal dos nutrientes (R\$/mês).

4.9. Análise estatística

Todas as determinações analíticas foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos para rendimento, eficiência e produtividade, produção batelada, acidez orgânica, viabilidade e vitalidade foram submetidos à análise pelo teste de *Tukey* a um nível de significância de $p \leq 0,05$ usando software MINITAB.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da composição nutricional dos principais fluxos do processo industrial de produção de bioetanol

Para melhor compreensão do processo industrial de produção de bioetanol foram realizadas as análises dos minerais e metais tóxicos nos principais fluxos do processo fermentativo em estudo. Desse modo, essas análises, contribuem para o entendimento da composição iônica no fluxo de entrada (mosto), fluxo de recirculação (levedo ou fermento) e o fluxo de saída (vinho centrifugado) do processo fermentativo em estudo.

Ao decorrer dos meses de março/junho de 2021, foram encontrados níveis entre 18-70 ppm de nitrogênio amoniacal no mosto, o qual apresentou valores muito inferiores do recomendado por Amorim e Leão (2005), os quais recomendam concentrações entre 100-300 ppm de nitrogênio no mosto para uma fermentação eficiente. Durante este mesmo período, quantidades similares às de nitrogênio do mosto foram verificadas no vinho centrifugado, isso demonstra que houve deficiência da assimilação desse mineral pelo fermento (células de *S. cerevisiae*), sendo expurgado em grande parte do sistema fermentativo e enviados para a operação de destilação. Nos meses de julho/setembro de 2021, teores entre 100-200 ppm de nitrogênio no mosto foram encontradas, evidenciando índices favoráveis para uma fermentação eficiente e sendo expurgado em menores quantidades no vinho, fato que demonstra uma maior assimilação desse mineral pelo fermento. Neste sentido, os íons amônio reciclados no fermento apareceram em maiores níveis a partir do mês de maio. Esses resultados podem ser confirmados através da Figura 16 (a), a qual apresenta os níveis de nitrogênio no mosto, fermento e vinho centrifugado (analisadas durante um período de 6 meses de safra).

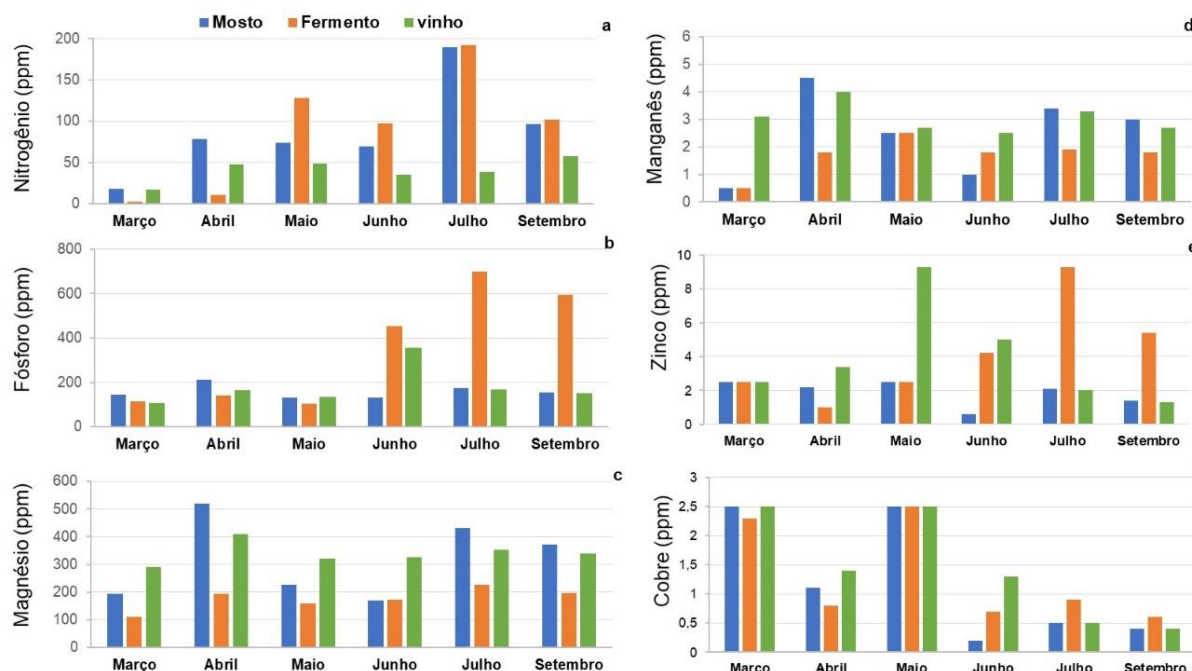


Figura 16. Concentração de macro e micronutrientes encontrados em mosto, fermento e vinho de processo industrial de produção de bioetanol: (a) nitrogênio amoniacal, (b) fósforo (c) magnésio, e (d) manganês, (e) zinco e (f) cobre.

Os resultados encontrados para nitrogênio durante o período de estudo, são muito inferiores ao registrado por De Souza et al. (2015), cujo trabalho identificou concentrações que variam entre 266-420 ppm de nitrogênio em amostras de mostos de 3 diferentes estados da região nordeste do Brasil. Sendo assim, a composição de nitrogênio do mosto pode variar amplamente durante os meses de safra e em diferentes regiões geográficas do território brasileiro, essa variabilidade, pode ser atribuída à proporção de melaço e caldo de cana utilizado para formular o substrato fermentativo em função do objetivo pretendido pela fábrica (produção de açúcar ou etanol), bem como as diferentes condições de solo e clima no Brasil.

O fósforo é considerado um macronutriente de extrema importância para via glicolítica (metabolismo de conversão de açúcar em etanol pelo fermento), as quais dependem deste elemento para realizar o metabolismo energético e produção de ATP. Durante os 6 meses de safra, não houve deficiência de fósforo total no mosto, o qual apresentou níveis entre 130-200 ppm. Esses resultados, corroboram com o estudo realizado por Amorim e Leão (2005), que reportaram níveis de concentração entre 50-250 ppm de fósforo no mosto, níveis excelentes para fermentações industriais.

O fluxo de recirculação do fermento apresentou maiores concentrações de fósforo a partir do mês de junho, cujo valores são maiores do que os encontrados no mosto, esse fato pode ser atribuído a maior concentração de fermento e maior disponibilidade dos açúcares totais (AT) no meio fermentativo. Desse modo, o nível de fósforo presente no fermento reciclou em maiores

proporções do que nos meses anteriores, inferindo sua importância, não só para a eficiência da conversão de açúcar em etanol, como também para a multiplicação do fermento. Os teores de fósforo no mosto, fermento e vinho podem ser observadas na Figura 16 (b).

Os resultados para os teores de magnésio no mosto foram entre 170-500 ppm durante o período analisado, o que corrobora com os parâmetros recomendados por Lima (2019), que afirma que níveis de magnésio entre 70-200 ppm são suficientes para se obter uma fermentação alcoólica eficiente. Porém, nos meses de março, julho e setembro houve ápices de nível de íons Mg^{2+} , demonstrando valores muito acima dos recomendados. O teor deste elemento presente no fluxo de recirculação é cerca da metade do encontrado no mosto. Esses resultados podem ser observados através da Figura 16 (c), o qual apresenta valores entre 300-400 ppm de magnésio no vinho centrifugado. Convém ressaltar, ainda, que o magnésio e outros compostos presente no vinho centrifugado são perdidos, sendo enviados ao processo de destilação.

O teor de manganês no mosto ao longo do período de 6 meses de safra foi entre 0,5-4 ppm. Os resultados obtidos por este estudo corroboram com apresentado por Santos (2008), que registrou teores entre 2-3 ppm de manganês em mostos industriais. Os valores encontrados para esse elemento, não são concordantes com os recomendados por Lima (2019), o qual afirma que níveis entre 10-33 ppm são ideais para se obter uma fermentação de alta performance. No fermento, este elemento foi encontrado em baixas quantidades, principalmente durante o mês de março. No vinho centrifugado mostrou valores entre 3-4 ppm, sendo expurgados praticamente em totalidade do sistema fermentativo. Os resultados desse elemento, podem ser visualizados na Figura 16 (d).

O nível de zinco encontrado no mosto ao longo do período de 6 meses de safra atingiu níveis entre 0,6-2,5 ppm. Os valores encontrados para esse elemento, estão de acordo com os valores recomendados por Lima (2019), o qual afirma que entre 0,5- 10 ppm de zinco no mosto são ideais para uma fermentação saudável. Todavia, levando em consideração o trabalho realizado por Santos (2008) o qual encontrou valores entre 3,6-4,4 ppm de zinco em mostos de melaço industrial, os resultados apresentados neste estudo estariam bem próximos. No entanto, no fluxo de saída do processo fermentativo, este elemento aparece em quantidades similares às encontras no mosto. Esses resultados, podem ser visualizados na Figura 16 (e).

A Figura 16 (f) demonstra os resultados obtidos para concentrações de cobre no mosto, fermento e vinho do processo fermentativo do presente estudo. Ao longo dos 6 meses de safra, o nível de cobre encontrado no mosto variou entre 0,4-2,5 ppm. Esses valores, estão muito abaixo dos apontados por Lima (2019), o qual afirma que um nível de 7 ppm de cobre no mosto é ideal para uma fermentação saudável. Durante todo o período de safra, as concentrações deste

micronutriente encontradas no fluxo de saída, foram muito similares às encontradas no mosto, indicando baixa assimilação pelo fermento e déficit deste elemento via fluxo de alimentação e reciclo.

Com base dos resultados experimentais obtidos por Stehlik-Thomas et al. (2004), os autores concluíram que a suplementação com $0,1 \text{ g.L}^{-1}$ de cada um dos micronutrientes (CuSO_4 , MnSO_4 e ZnSO_4) em substratos formulados com melaço industrial de cana-de-açúcar, contribuem para aumento do rendimento e velocidade da fermentação alcoólica em condições anaeróbias.

Uma análise dos resultados obtidos por este estudo pode classificar de acordo com os parâmetros da literatura que a composição nutricional do mosto industrial está diretamente correlacionada com a eficiência da fermentação alcoólica, bem como a presença de determinados elementos tóxicos ao fermento, que podem interferir negativamente no processo fermentativo, ocasionando problemas na cadeia produtiva. O fermento responde aos efeitos deletérios do estresse, desenvolvendo rapidamente respostas moleculares com o intuito de reparar os danos e de se proteger contra exposições adicionais.

O ferro é essencial para o fermento, porém em grandes quantidades pode ser tóxico. Por este motivo, a incorporação do ferro pelo fermento é bem regulada através dos mecanismos de transporte e armazenamento (STEHLIK -TOMAS et al., 2004). Neste sentido, o presente estudo avaliou a concentração dos teores de íons ferro total no mosto, fermento e vinho. Através da Figura 17 (a) pode ser observado teores entre 5-15 ppm de ferro no mosto durante o período de safra. Esses valores, são muito superiores do proposto por Lima (2019), o qual relata que teores de 0,2 ppm seriam suficientes para que as atividades fermentativas do fermento operem de maneira regular, portanto, há presença em excesso desse metal. Este fato que pode ser confirmado através do estudo registrado por De Souza et al (2014) que verificaram que a suplementação com íons Fe^{3+} em meios de cultivo sintético acarretam redução do rendimento de etanol em comparação com meio enriquecido com Mg^{2+} , além disso segundo o autor, essa redução pode ser explicada pela indução do estresse oxidativo do fermento. Neste período analisado, o presente estudo detectou quantidades entre 3-8 ppm deste metal no fermento e níveis de 8-20 ppm no fluxo de saída do sistema fermentativo.

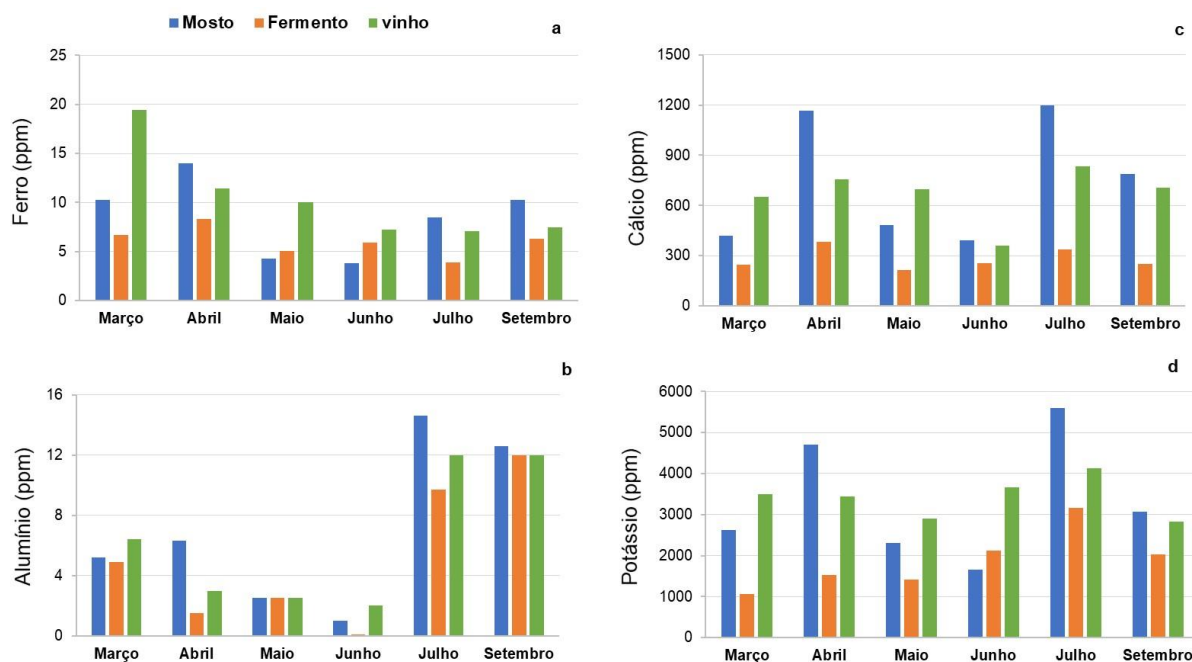


Figura 17. Concentração de metais tóxicos para o fermento encontrados no mosto, fermento e vinho de processo industrial de produção de bioetanol: **(a)** ferro, **(b)** alumínio, **(c)** cálcio e **(d)** potássio.

Recentemente, o alumínio foi identificado como elemento estressante do fermento em processo industrial de bioetanol, causando redução simultânea da viabilidade celular, além de níveis de glicogênio e trealose intracelular quando presente em excesso (PULIGUNDLA et al., 2011). A presença deste metal está correlacionada com a qualidade da água utilizada no tratamento do fermento, pois geralmente é utilizado policloreto de alumínio (PAC) nas estações de tratamento de água para remoção de sujidades, porém, se dosado em altas concentrações, resultará em residual de alumínio na água que irá diluir o fermento, prejudicando o processo fermentativo.

Conforme apresentado pela Figura 17 (b), maiores concentrações de íons de Al^{3+} no mosto foram identificadas nos meses de julho e setembro, 14 e 12 ppm, respectivamente, entretanto, durante os meses de março/junho de 2021 foram verificadas menores quantidades no mosto. No entanto, neste caso concentrações proporcionais foram encontradas no vinho centrifugado e fermento durante todo o período analisado, sinalizando pouca assimilação deste metal pelo fermento, contudo reciclando-o em concentrações similares. Mediante trabalho realizado por Lima (2019) que afirma que níveis menores que 10 ppm de alumínio em mosto seriam parâmetros ideais para fermentação, pode-se afirmar que houve presença em excesso deste elemento no mosto somente nos últimos dois meses de avaliação.

Os níveis necessários de cálcio para o desenvolvimento do fermento são muito baixos, porém é necessário em fermentações por desempenhar um papel de proteção celular ao estresse

causado pela elevada concentração de etanol (WALKER et al., 2000). No período avaliado, foi registrado teores de íons Ca^+ no mosto entre 400-1200 ppm ao longo dos meses de safra, mediante a isso, foram encontrados valores 10 vezes maiores do que o recomendado por Lima (2019) que descreve que níveis de 120 ppm de cálcio em mosto já são suficientes para condução de processos fermentativos. Esses resultados podem ser consultados através da Figura 17 (c), a qual apresentou níveis de cálcio de 200 e 600 ppm no fermento reciclado e no vinho, respectivamente. Esses resultados podem ser atribuídos a condução do processo de tratamento de caldo da Usina, na etapa da correção do pH do caldo (calagem) onde é adicionado hidróxido de cálcio que eventualmente é dosado em excesso interferindo no pH do mosto e consequentemente no processo de produção de etanol, pois íons divalentes ligam-se na parede celular das células de *S. cerevisiae* resultando em sua floculação.

Segundo Amorim e Leão (2005) cálcio, alumínio são elementos em que se pode inferir menor importância ao processo fermentativo, pois estes íons inibem a atividade da enzima invertase caso tenham elevadas concentrações (causando toxicidade às células de *S. cerevisiae*) resultando em perda substancial do rendimento do processo fermentativo. O cálcio pode ser encontrado no mosto com variações entre 150-2000 mg.L^{-1} e o alumínio com variações entre 5-240 mg.L^{-1} . Além disso, segundo estes mesmos autores, quanto menor o teor de cálcio no mosto melhor a resposta da fermentação, pois este metal pode provocar aumento do índice de floculação do fermento resultando em sérios problemas operacionais de máquinas e equipamentos, como por exemplo, entupimento de bicos de centrífugas e trocadores de calor.

Na Figura 17 (d) é apresentado os níveis potássio no mosto (2000-5000 ppm). Nos meses de abril e junho, houve maiores teores deste mineral no mosto, fato que pode ser explicado pela proporção de melaço e caldo de cana, bem como fator matéria-prima. Em geral usinas de açúcar-álcool praticam a fertirrigação dos canaviais com uso da vinhaça, esse resíduo é reaproveitado devido sua riqueza em minerais como o potássio, cálcio, magnésio, nitrogênio e fósforo (FISHER, 2018). Portanto, infere-se uma correlação dessas quantidades excessivas de potássio encontradas no mosto à área de colheita do canavial deste período, gerando melaço e mosto mais concentrados com potássio. Os valores encontrados no mosto estão muito acima dos recomendados por Lima (2019), que são entre 700-800 ppm de potássio.

Sabe-se que o melaço é rico em potássio, e dificilmente trabalha-se sob os níveis ideais no processo industrial, quando se utilizam mostos constituídos por caldo de cana e melaço, ou por melaço e água. No entanto, se os níveis desse elemento ultrapassar 2000 mg.L^{-1} , acarreta estresse ao fermento culminado em desvio da rota metabólica principal, ou seja, aumentando a formação de glicerol e consequentemente diminuindo a produção de etanol. Se a usina processar

apenas caldo de cana-de-açúcar sem adição do melaço, o efeito pode ser contrário, e até mesmo, apresentar deficiência de potássio. Portanto, a necessidade de um controle minucioso de potássio para ter uma maior estabilidade no rendimento do processo fermentativo industrial (AMORIM; LEÃO, 2005).

Todos os elementos avaliados apresentam diferenças substanciais de concentração ao longo dos períodos mensais estudados. Os nutrientes com maiores níveis no mosto foram o potássio (média de 3328,9 ppm), seguido pelo cálcio (média de 742,0 ppm) e magnésio (média de 318,6 ppm). Todavia, os nutrientes com os menores níveis foram o cobre (média de 1,2 ppm), o zinco (média de 1,9 ppm) e o manganês (2,5 ppm). A análise da composição mineral do mosto revelou que houve grande variação para todos os minerais analisados (coeficiente de variação (CV) cima de 10%), essa variação quantitativa está relacionada com a disponibilidade nutricional oriunda do mosto de alimentação da fábrica que varia ao longo dos meses do processo fermentativo.

Como no caso do mosto também foi constatado uma alta variabilidade dos dados de nutrientes em estudo (coeficiente de variação cima de 10%) no fermento. O elemento químico com maior nível no fermento foi o potássio (média de 1885,7 ppm), seguido pelo fósforo (média de 350,9 ppm) e o cálcio (média de 281,4 ppm). Quanto aos elementos que aparecem em menores quantidades, destacam-se os micronutrientes: manganês, cobre e zinco. Os resultados evidenciam que grande parte dos íons estão sendo “purgados” para as colunas de destilação. O potássio se destaca como elemento químico de maior teor no vinho (média de 3410,6 ppm), seguido pelo cálcio (média 667,4 ppm) e magnésio (média de 340,2 ppm).

Guinard e Lewis (1993) propuseram que os íons de cálcio atuam como cofatores na capacidade de ligação de proteínas em células de *S. cerevisiae* desempenhando papel importante na aglomeração celular. O magnésio e o cálcio são conhecidos como antagonistas bioquímicos e competem por locais de ligação celular, podendo ser possível controlar a aglomeração alterando as razões de concentração de Mg/Ca disponível para as células de *S. cerevisiae*. Ainda segundo estes mesmos autores, houve correlação positiva significativa ($R^2=0,957$; $p<0,05$) entre os níveis de cálcio em parede celular e valor de sedimentação em amostras de células de *S. cerevisiae* comerciais.

Atualmente, o entendimento da composição mineral do processo fermentativo industrial é mensurado através de íons encontrados nos mostos e correlacionados com parâmetros da literatura, porém, é de extrema importância quantificar também, os minerais presentes no fermento e no vinho centrifugado e dessa forma determinar através de um balanço de massa a

quantidade minimamente esperada, o real encontrado e se existe necessidade de complementação desses elementos para obtenção de bons resultados.

Os especialistas em fermentação já constataram o grande impacto da qualidade da matéria-prima na produção de etanol e, nos últimos anos, a evolução nessa área foi significativa, embora ainda não tenha atingido níveis adequados. As análises de minerais e a nutrição de células de *S. cerevisiae* levou a inúmeras constatações que antes passavam despercebidas nas indústrias. Atualmente, por exemplo, sabe-se que sem fósforo, a fermentação etanólica não é eficiente. A amônia, por exemplo, é necessária para ativá-la; se faltar zinco, as células de *S. cerevisiae* produzem aldeído acético; alumínio e cálcio são elementos tóxicos; a concentração de nitrogênio deve ser bem dosada, se há pouco, o tempo do processo aumenta e o rendimento cai; se for demasiada, as células de *S. cerevisiae* se multiplicarão demais, desviando açúcares para produção de biomassa em detrimento a fabricação de etanol (AMORIM; LEÃO, 2005).

5.2. Avaliação de indicadores de desempenho e suplementação mineral de processo industrial de produção de bioetanol

A Tabela 5 apresenta os parâmetros fermentativos da safra de 2021 de um processo industrial de produção de bioetanol.

Tabela 5. Parâmetros fermentativos do processo industrial de bioetanol

Período Safra (2021)	Produção de etanol total (m ³ .dia ⁻¹)	Eficiência da fermentação (%)	AT necessária (ton.h ⁻¹).	Levedo produzido (ton.h ⁻¹)
Março	355,27	87,31	29,74	0,89
Abril	472,30	88,35	39,07	1,17
Maio	566,05	88,75	46,61	1,40
Junho	604,98	90,45	48,88	1,47
Julho	694,57	91,25	55,62	1,67
Setembro	688,78	94,30	53,38	1,60

$Y_{\frac{P}{S}}$ = Fator de conversão de substrato (açúcar total, AT) em produto (etanol) = 0,4550 (ton. ton⁻¹, base seca).

$Y_{\frac{X}{S}}$ = Fator de conversão de substrato (açúcar total, AT) em biomassa (fermento) = 0,030 (ton. ton⁻¹, base seca).

Massa específica etanol = 0,79 (kg. L⁻¹).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5, pode-se dizer, que a produção de etanol e a eficiência da fermentação foram aumentando continuamente ao longo dos meses de safra. Esse ganho de produção de etanol está correlacionado com a disponibilidade gradual de AT do mosto, bem como, o aumento gradual da massa celular do fermento nas dornas de fermentação ao longo do tempo. Considerando esses fatos, durante os 3 primeiros meses de

safra, a eficiência da fermentação atingiu média de 88,11%, somente a partir do mês de junho, a eficiência da fermentação atingiu níveis satisfatórios conforme recomendado por Lopes et al. (2016) (Tabela 1).

Outro aspecto que foi abordado para mitigar a diferença desses indicadores de desempenho durante a safra, foi a análise da composição mineral do processo fermentativo em resposta à eficiência da fermentação. Para correlacionar esses dados, foi realizado uma avaliação da necessidade de suplementação mineral no processo industrial de produção de bioetanol. Através dos resultados obtidos das análises de minerais e dos fluxos médios mensais, foi possível calcular a quantidade minimamente esperada (matriz iônica), fazer o balanço de massa (saldo) e dimensionar a necessidade da suplementação dos macros e micronutrientes.

Estes fatores levaram a definição da “matriz iônica” a qual foi determinante para diagnosticar se há necessidade de complementação e/ou suplementação mineral no processo industrial de produção de etanol (Tabela 6).

Tabela 6. “Matriz iônica” para processo industrial de produção de etanol.

Base iônica	Porcentagem mássica	Minerais mínimos (kg.h ⁻¹)					
		Março	Abril	Maio	Junho	Julho	Setembro
Nitrogênio	1,50	13,40	17,60	21,00	22,00	25,00	24,00
Fósforo	2,00	17,85	23,45	28,00	29,35	33,40	32,00
Magnésio	1,00	8,90	11,70	14,00	14,70	16,70	16,00
Manganês	0,50	4,50	5,90	8,00	7,30	8,35	8,00
Zinco	0,17	1,50	2,00	2,40	2,50	2,85	2,70
Cobre	0,05	0,50	0,60	0,70	0,70	0,80	0,80

De acordo com os dados apresentados na Tabela 6, para garantir que o fermento opere com alta performance, os teores de nitrogênio nos fluxos mássicos de entrada devem permanecer entre 13,4-25,0 kg.h⁻¹ durante o período da safra (variando-se de acordo com a quantidade do fermento produzido (% massa/massa). Os teores de fósforo, magnésio, manganês, zinco e cobre entre 17,8-33,4, 8,9-16,7, 4,5-8,3, 1,5-2,8 e 0,5-0,8 kg.h⁻¹, respectivamente. Portanto, as respectivas faixas de fluxos mássicos apresentadas pela “matriz iônica”, evidenciam quantidades minimamente esperadas para que o fermento tenha alto desempenho metabólico e fermentativo.

De posse dos dados oriundos do processo fermentativo (Tabela 7) e dos resultados dos teores dos minerais (Figura 16), tornou-se possível realizar o cálculo de fluxo mássico (Equação 6) das quantidades reais de cada componente iônico do processo fermentativo. Além disso, é possível verificar as quantidades necessárias desses componentes (Equação 7), ou seja, o

dimensionamento das principais deficiências e excessos desses minerais em relação ao fermento (Figura 18).

Tabela 7. Fluxos em processo industrial de produção de bioetanol

Período Safra (2021)	Fluxo médio ($\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$)		
	Mosto	Levedo	Vinho
Março	155,35	57,45	188,00
Abril	208,45	77,10	254,30
Maio	251,65	93,10	304,60
Junho	228,70	72,20	261,20
Julho	305,15	113,00	369,00
Setembro	301,00	105,00	323,60

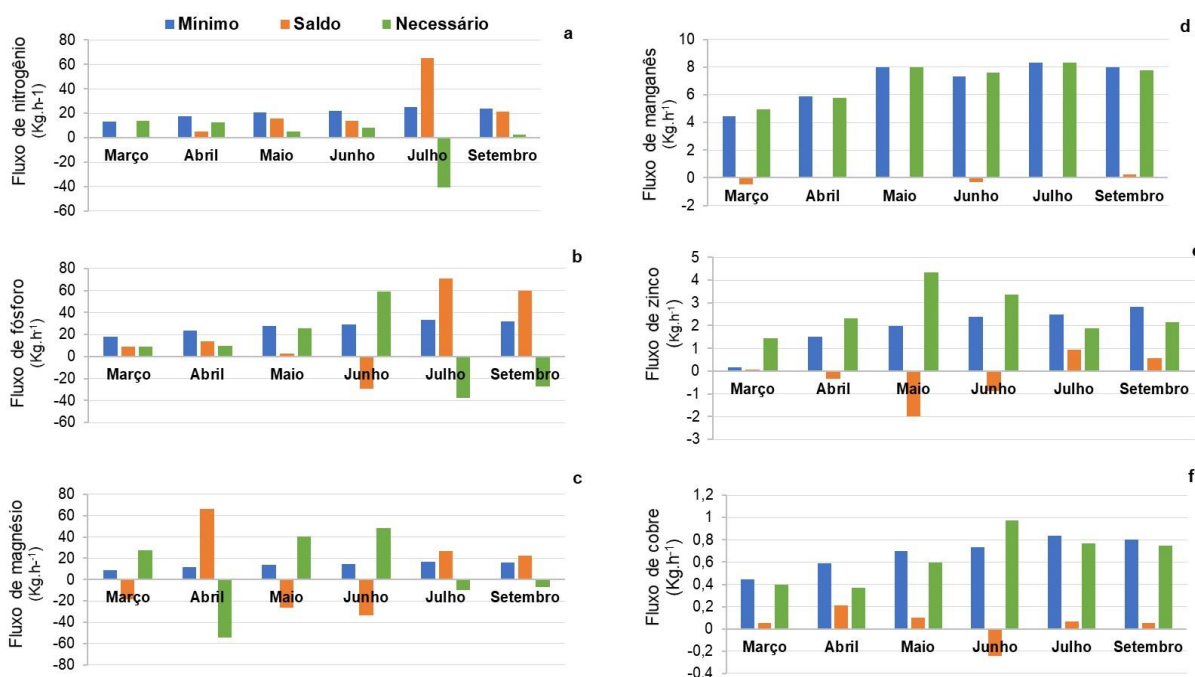


Figura 18. Balanço de massa dos macros e micronutrientes da fermentação alcoólica (a) nitrogênio, (b) fósforo, (c) magnésio, (d) manganês, (e) zinco, (f) cobre. **Legendas:** Mínimo = matriz iônica; Saldo = real encontrado no balanço de minerais; Necessário = mínimo - saldo.

O dimensionamento da nutrição celular evidencia um déficit em todos os macros e micronutrientes monitorados no período de março-junho, com ressalva do magnésio, que no mês de abril apresentou excesso (superávit) (Figura 18 c). Desta forma, neste período inicial da safra, se faz necessário a suplementação do mosto com todos os íons (N, P, Mg, Mn, Zn e Cu) para que se inicie a fermentação com quantidades mínimas desses minerais, conforme base iônica necessária. Portanto, nos meses de março-junho o nitrogênio, fósforo e magnésio devem ser suplementados nas seguintes quantidades: 5,3-13,7, 8,7-58,8 e 27,2-48,5 ($\text{kg} \cdot \text{h}^{-1}$),

respectivamente. Durante este período, a composição mineral do mosto pode ser correlacionada com a qualidade da cana-de-açúcar colhida, a qual é classificada como cana-precoce, ou seja, a fisiologia vegetal da planta não atingiu um estágio de maturação adequado resultando em menores teores de açúcar (em seus colmos) e de minerais disponíveis no caldo extraído, principalmente magnésio, o qual apresentou ser o elemento com maiores necessidades de correção, seguido de fósforo e nitrogênio. Nos meses de julho-setembro não houve necessidade de complementação com macronutrientes (N, P e Mg), os quais apresentaram teores elevados, podendo também correlacionar este período com os estágios avançados de maturação da planta, visto que há maior disponibilidade de matérias-primas ricas em sacarose e altos teores de macronutrientes. Nestes dois últimos meses, dentre os micronutrientes avaliados, o manganês foi o mineral que apresentou maior necessidade de correção para suprir as necessidades básicas do fermento (Figura 18 d).

Menezes (2012) identificou a interferência de aspectos físico-químicos presentes no caldo de cana-de-açúcar que afetam a capacidade fermentativa do fermento. Neste estudo o autor concluiu que o tipo de solo no qual a cana-de-açúcar é cultivada, a qual está relacionada à variação composição mineral do caldo, interfere substancialmente na qualidade do processo fermentativo quando comparado à variedade genética da cana-de-açúcar.

Em relação aos micronutrientes Mn, Zn e Cu, evidenciaram déficit durante todo período analisado. O manganês, zinco e cobre devem ser suplementados entre 4,9-8,3, 1,5-4,3 e 1,0 (kg.h^{-1}), respectivamente. Portanto, com os parâmetros oriundos do processo industrial, a “matriz iônica” e o balanço de minerais (Figura 18) foi possível dimensionar à necessidade de suplementação de micros e macronutrientes durante todo o período de safra.

Infelizmente, os minerais são negligenciados como um fator determinante para o desempenho do processo fermentativo. O fermento requer uma vasta gama de minerais para seu desenvolvimento e funções metabólicas. A nutrição mineral do fermento é, portanto, muito importante para garantir o sucesso da fermentação, particularmente no processo de produção de bioetanol (WALKER, 2000).

Tomando como ponto central as concentrações de minerais presentes no mosto e fermento no mês de junho/21 (Apêndice II) foi possível calcular a massa total (kg) de cada íon dentro de uma dorna de fermentação de 370 m^3 de volume útil, o que corresponde a 280 m^3 de mosto + 90 m^3 de fermento. Mediante a isso, a quantidade dos minerais mínimos (matriz iônica - jun/21) foi ajustada para massa (kg) e multiplicado pelo tempo de fermentação, considerando 8 h de alimentação dessa mesma dorna, desse modo, foi possível conhecer a quantidade necessária de suplementação em kg de uma dorna. Levando em conta a massa total de minerais na dorna

(mosto e fermento) e a quantidade necessária para suplementação (matriz iônica - jun/21), foi possível calcular a porcentagem de suplementação necessária para as dornas de fermentação e equipará-la com a porcentagem realizada nos ensaios de laboratório (Figura 19).

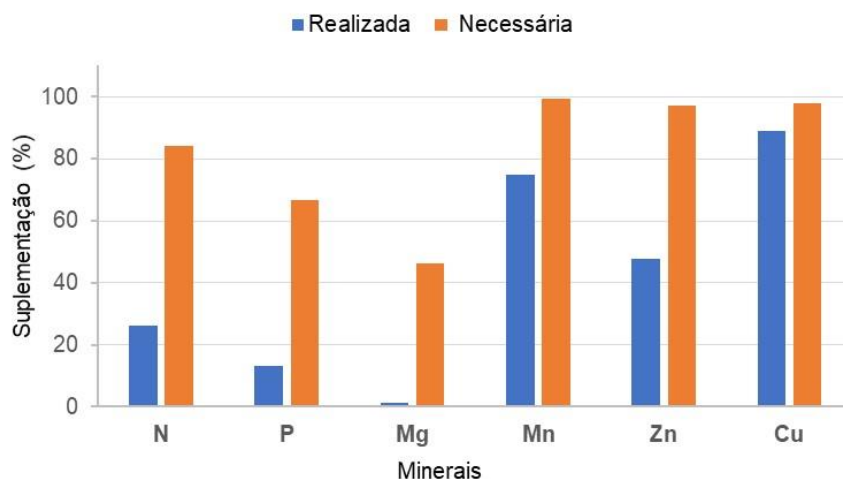


Figura 19. Suplementação realizada e necessária de cada íon para fermentação alcoólica

Os macronutrientes (N, P, Mg) não foram suplementados de acordo com a necessidade devido as quantidades já pré-determinadas de todos os macros e micronutrientes do produto nutricional, ou seja, se fosse realizada a suplementação aumentando a dosagem do produto, poderia ultrapassar o limite necessário de Mn e Cu, podendo acarretar excesso desses micronutrientes e prejudicando o fermento.

5.3. Avaliação de fermentação etanólica em escala de laboratório em resposta à aplicação do produto nutricional (Nitrofós)

A partir dos ensaios de fermentação (20, 24 e 26° Brix de mosto) foram determinados os principais metabólitos da fermentação etanólica. As fermentações consideradas controle foram utilizadas como referência para efeito comparativo em resposta as fermentações com suplementação de nutrientes. É conveniente salientar, que para todos os ensaios fermentativos as bateladas iniciaram com pequenas concentrações de ácidos orgânicos, glicerol e etanol no tempo zero, pois foi utilizado fermento industrial como inóculo aos ensaios experimentais, o qual detém quantia significativa desses metabólitos incorporados ao fermento (creme de levedura) que é reciclado.

De acordo com a Figura 20, o perfil fermentativo dos AT (sacarose, glicose e frutose) e da produção de etanol foram muitos semelhantes em todos os ensaios fermentativos com mosto industrial (20, 24 e 26° Brix), porém a concentrações iniciais de açúcar e finais de etanol foram diferentes, isso é explicado, devido ao fato do mosto utilizado, possuir diferentes faixas de

concentração de açúcares totais. Na figura 20a é possível observar a concentração de AT inicial nas amostras suplementadas e controle apresentaram média de $135,5 \text{ g.L}^{-1}$ e a concentração de AT residual média de $4,5 \text{ g.L}^{-1}$, após atingir 8 h de fermentação, não sendo detectado glicose e frutose ao final da batelada (apenas sacarose), indicando que praticamente todo o açúcar foi convertido em etanol. A taxa de produção de etanol foi maior nas primeiras 4 h da batelada e após este tempo a produção se manteve estável, fato que corrobora com a taxa de consumo dos açúcares que fora maior nas primeiras 4 h de fermentação. Nas fermentações com 20° Brix controle, a média de produção de etanol foi de $73,2 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto nas fermentações suplementadas a concentração média de etanol atingiu níveis de $76,3 \text{ g.L}^{-1}$ (ambas ao final da batelada, 8 h). Entretanto, ao analisar o perfil fermentativo dos dois grupos, observa-se que não houve maior metabolização dos açúcares pelo fermento submetido à adição de nutrientes, mas sim um discreto aumento da produção de etanol.

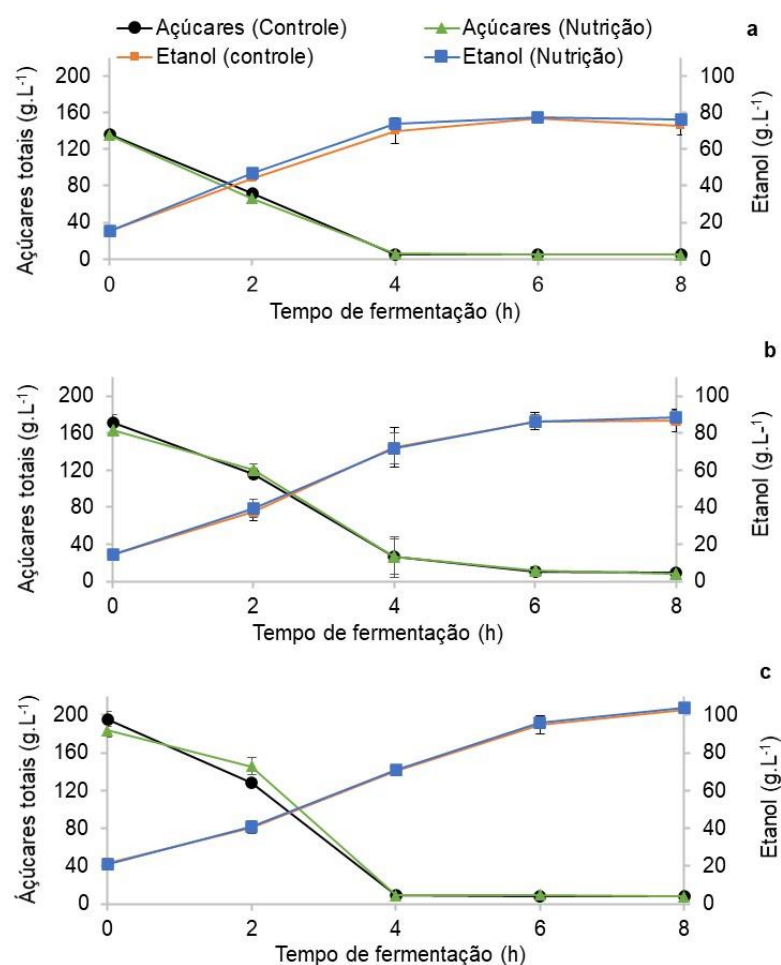


Figura 20. Perfil do consumo de açúcares e produção de etanol em fermentações com mosto de (a) 20°Brix (b) 24°Brix e (c) 26°Brix

*As linhas de erros correspondem ao desvio padrão amostral. Barra de erro sobreposta significa que o erro é menor que o tamanho do símbolo. Os resultados representam a média de 3 réplicas biológicas para grupo controle e nutrição para (a;c) e 6 réplicas biológicas para grupos controle e nutrição (b).

A cinética da fermentação com mosto industrial com 24° Brix (Figura 20b) apresentou desvio padrão amostral maior no tempo de 4 h (ambos os grupos comparativos controle e nutrição) quando comparado aos ensaios fermentativos com 20 e 26 ° Brix (Figuras 20ac). O aumento do desvio padrão resultou devido ao ensaio experimental ter sido conduzido em dois períodos distintos com diferentes amostras de fermento e mosto industrial. Desta forma, no primeiro período, o consumo de açúcares manifestou um perfil semelhante ao ensaio com 20° Brix, apresentando em média concentrações de 6,2 g.L⁻¹ de AT ao atingir 4 h de fermentação. Porém, o ensaio do segundo período apresentou menor velocidade fermentativa no tempo de 4 h, permanecendo ainda 46,2 g.L⁻¹ de AT para serem consumidos. No entanto, a partir do tempo de 6 h, o perfil fermentativo recuperou a velocidade de fermentação resultando em teores de 8,7 g.L⁻¹ de AT ao final da fermentação tornando-se muito semelhante ao ensaio do primeiro período experimental que apresentou média de 6,7 g.L⁻¹.

No ensaio experimental com mosto contendo 24° Brix, a concentração de AT inicial nas amostras suplementadas e controle apresentaram média de 165,5 g.L⁻¹. Ao final da batelada concentrações de 8,7 g.L⁻¹ foram conferidas, contendo traços de sacarose como açúcares residuais. Desse modo, o perfil fermentativo de ambos os grupos, indica tendência crescente de produção de etanol durante as 6 h atingindo-se um patamar máximo de produção de etanol após este tempo de fermentação. O ensaio controle resultou em uma concentração de etanol média de 86,7 g.L⁻¹, enquanto no ensaio suplementado com nutrientes o etanol atingiu concentração de 88,7 g.L⁻¹ (ambos ao final da batelada).

No ensaio experimental com mosto contendo 26° Brix (Figura 20c) o consumo dos açúcares e a produção de etanol foram semelhantes ao longo do tempo entre os grupos (controle e nutrição). O fermento quando submetido à fermentação de mosto com altas concentrações de açúcares não sofreram impactos de pressão osmótica e/ou inibição pelo produto (Figura 20c), pois a cinética da fermentação revelou rápida conversão dos AT em etanol.

Cerqueira (2013) reportou ensaios fermentativos que corroboram com os resultados obtidos no presente trabalho. Foram realizadas fermentações com mosto industrial com elevadas concentrações de açúcar e suplementados com sulfato de amônio em 3 diferentes faixas de sólidos solúveis (25, 30 e 35 °Brix). Em seu estudo, o autor constatou que os valores de etanol foram superiores nas fermentações suplementadas (30 e 35 °Brix) atingindo teores acima de 16% (v/v) para a linhagem CAT1. Com 25 de Brix, somente o primeiro ciclo fermentativo apresentou aumento em álcool. O autor relatou que ensaios fermentativos com altas concentrações de açúcar (25° Brix, suplementado e controle) não apresentaram maior produção de etanol (batelada) ao longo de 6 ciclos fermentativos, exceto no primeiro o qual

apresentou 11,1% (v/v) e 9,8% (v/v), respectivamente. Além disso, também foram mostradas diferenças no consumo de nitrogênio dos respectivos ensaios; controle (média de 100 ppm) e suplementado (média de 40 ppm).

A Tabela 8 apresenta os parâmetros fermentativos para os ensaios fermentativos mostrados na Figura 20. As fermentações “controle” foram utilizadas como referência para determinação da eficácia do produto nutricional. As comparações estatísticas foram determinadas entre os grupos (controle e nutrição) para cada ensaio fermentativo. Foi assumido como hipótese nula a similaridade das médias e hipótese alternativa que as médias se diferem, a um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$, Teste de Tukey).

Tabela 8. Parâmetros fermentativos oriundos de fermentações realizadas em escala de laboratório com diferentes °Brix e adição de suplementação mineral.

Ensaio Fermentativo (°Brix)	Grupos	Rendimento (g.g ⁻¹)	Eficiência (%)	Produtividade volumétrica (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Prod. batelada (g.L ⁻¹)
20	Controle*	0,46 ± 0,03 ^a	90,80 ± 5,70 ^a	9,40 ± 0,50 ^a	73,20 ± 4,20 ^a
	Nutrição*	0,47 ± 0,02 ^a	91,60 ± 3,80 ^a	9,50 ± 0,30 ^a	76,30 ± 2,30 ^a
24	Controle [#]	0,45 ± 0,02 ^a	87,30 ± 3,20 ^a	10,80 ± 0,75 ^a	86,70 ± 6,00 ^a
	Nutrição [#]	0,48 ± 0,02 ^b	94,40 ± 4,60 ^b	11,10 ± 0,40 ^b	88,70 ± 3,50 ^a
26	Controle*	0,43 ± 0,02 ^a	85,00 ± 3,20 ^a	12,80 ± 0,30 ^a	102,70 ± 2,10 ^a
	Nutrição*	0,47 ± 0,01 ^b	92,00 ± 2,50 ^b	13,00 ± 0,10 ^a	103,80 ± 0,60 ^a

*valores para n=3; # valores para n=6; [±] desvio padrão amostral. Média com a mesma letra na coluna (controle e nutrição) indica que não diferem entre si pelo Teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Em relação ao ensaio fermentativo com mosto 20° Brix (grupo controle e nutrição), não houve diferença estatística para os seguintes parâmetros fermentativos: rendimento, eficiência, produtividade e produção batelada. No entanto, para os ensaios contendo mosto com 24 e 26° Brix foi verificada diferença significativa do rendimento e da eficiência dos grupos controle e nutrição. Desta forma, foi verificado um aumento de 6,3 e 8,5% nos rendimentos das fermentações contendo mosto com 24 e 26° Brix, respectivamente, para grupo com nutrição em relação respectivo controle.

Os valores médios de produtividade volumétrica apresentaram diferença estatística apenas no ensaio fermentativo contendo mosto com 24° Brix, essa diferença é observada entre o grupo controle (10,80 g.L⁻¹.h⁻¹) e nutrição (11,10 g.L⁻¹.h⁻¹) evidenciando maior taxa de produção em etanol ao decorrer do ciclo fermentativo (2,7% de aumento no ensaio com adição de nutriente). Nos demais ensaios, não foi verificada diferença significativa para a produtividade volumétrica. A produção batelada de etanol (g.L⁻¹) não revelou diferença significativa entre os grupos controle e nutrição em todos os ensaios de fermentação.

Os ensaios fermentativos contendo mosto com 24 e 26° Brix com suplementação mineral apresentaram 9,6 e 7,0 pontos percentuais, respectivamente, na eficiência fermentativa quando comparado ao respectivo grupo controle. Esses resultados corroboram com o trabalho de Souza et al. (2014), o qual reportou diminuição de 10 pontos percentuais na eficiência de ensaio fermentativo com mosto de cana-de-açúcar com deficiência mineral.

Os dados de rendimentos para os ensaios experimentais em estudo foram inferiores ao máximo teórico ($0,511 \text{ g.g}^{-1}$) (Tabela 8) e semelhantes ao valor médio reportado por Lima et al. (2001) ($0,46 \text{ g.g}^{-1}$ correspondendo a 90% de eficiência), corroborando com o presente estudo.

Diversos fatores podem afetar o rendimento da fermentação. Esses fatores, são de ordem física (temperatura e pressão osmótica), química (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos) e microbiológica (espécie, linhagem e concentração do fermento, além do nível da contaminação bacteriana). Normalmente, a diminuição dos rendimentos fermentativos decorre de uma alteração no metabolismo da levedura, levando à maior formação de produtos secundários (especialmente glicerol e ácidos orgânicos) e de biomassa (AMORIM; LEÃO, 2005).

Foi possível verificar que todos os ensaios fermentativos em estudo mostraram a formação dos seguintes subprodutos: glicerol e ácidos orgânicos (ácido lático, ácido acético e ácido succínico). O glicerol e o ácido succínico são produzidos pelo próprio fermento, enquanto os ácidos lático e acético são produtos oriundos do metabolismo de bactérias. No presente estudo, foi constatado em todos os ensaios fermentativos semelhança no perfil da produção de glicerol e de ácidos orgânicos em função do tempo. As curvas corroboraram entre si, ou seja, quanto maior a formação de ácidos orgânicos maior a formação de glicerol. Os resultados dos teores dos subprodutos utilizando mosto industrial com diferentes concentrações de açúcares são apresentados na Figura 21.

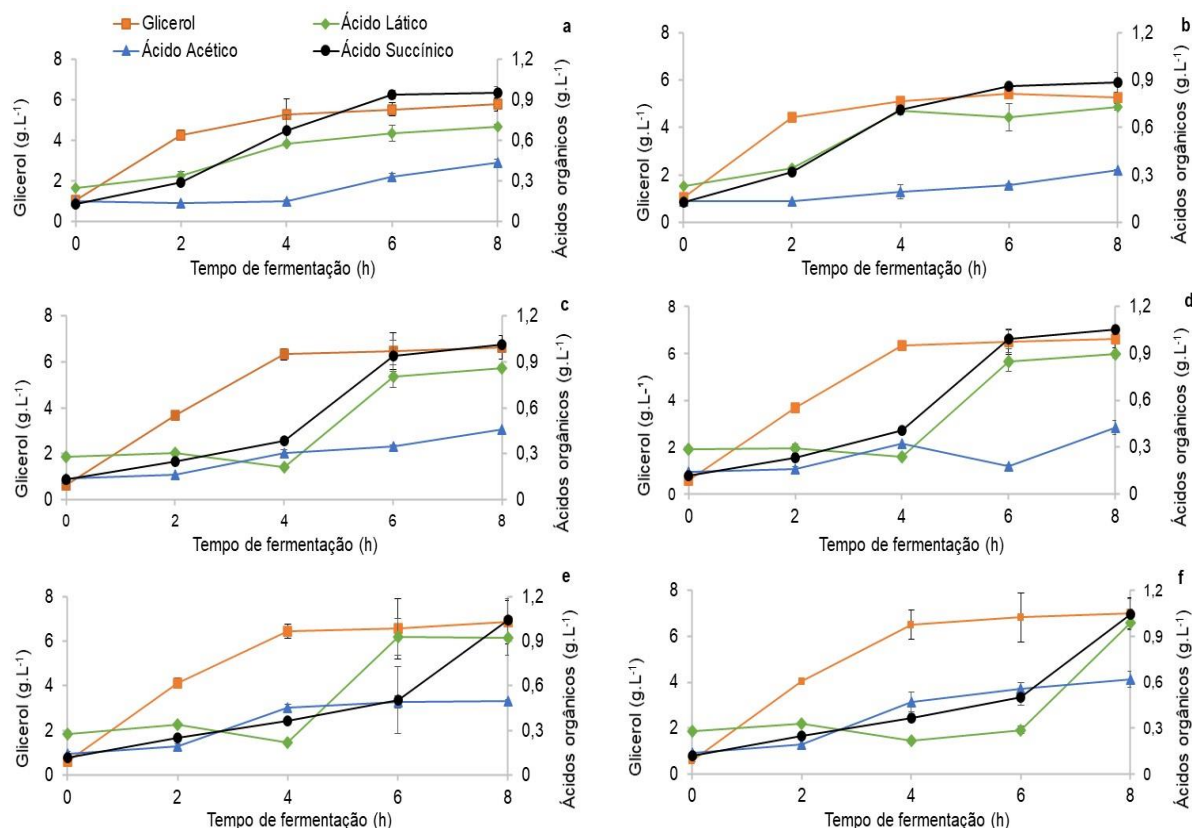


Figura 21. Perfil da produção de glicerol e ácidos orgânicos em fermentações com 20° Brix (a) controle (b) nutrição; 24° Brix (c) controle (d) nutrição; 26° Brix (e) controle (f) nutrição.

*As barras de erros correspondem ao desvio padrão amostral. Barra de erro sobreposta significa que o erro é menor que o tamanho do símbolo.

No ensaio fermentativo contendo mosto com 20° Brix, foi verificado aumento de 90% da produção de glicerol após 4 h de fermentação (aproximadamente 1,0 g.L⁻¹ no início e 5,4 g.L⁻¹ após 4 h da fermentação) para ambos os grupos, controle e nutrido. O presente nível de glicerol (5-6 g.L⁻¹) corrobora com resultados de fermentações com mosto e fermento industriais, o aumento do teor de glicerol ocorreu durante as primeiras 4 h de fermentação, todavia, após esse tempo o glicerol atingiu um patamar da ordem de 5,5-6,0 g.L⁻¹ (Figura 21ab).

O ácido succínico, assim como o glicerol, é um subproduto do metabolismo do fermento que funciona como um antibiótico natural contra presença de agentes competidores, como por exemplo as bactérias lácticas e acéticas (LOPES *et al.*, 2016). Este ácido orgânico apresentou a maior quantidade (dentre os ácidos analisados), aproximadamente 1,0 g.L⁻¹ ao final da fermentação. Estes resultados, estão de acordo com o trabalho de Basso et al. (2011) o qual mencionaram, que o ácido succínico produzido pelo fermento está relacionado com a produção de glicerol, portanto, o aumento de ácido succínico é acompanhado pelo aumento de glicerol. O ácido lático mostrou um perfil fermentativo similar ao ácido succínico (para ambos os

ensaios, controle e nutrido), entretanto, os teores de ácido lático foram um pouco menores quando comparado ao ácido succínico. O ácido acético apresentou o menor teor entre os ácidos analisados, para ambos os ensaios, controle e nutrido, atingindo-se o patamar de 0,3-0,4 g.L⁻¹. Todavia, foi conferido um aumento do ácido acético ao longo da fermentação. O aumento de ácido lático e acético indicam que a fermento (o qual é utilizado) está contaminado com bactérias, o que é comum nos processos industriais (SÁ, 2012).

No caso do ensaio fermentativo contendo mosto industrial com 24° Brix, o perfil da formação de subprodutos apresentou semelhança com o ensaio anterior de 20° Brix, ou seja, aumento ao longo do tempo de fermentação. No entanto, foi constatado um ligeiro aumento do teor de glicerol atingindo-se um patamar de 6,2 g.L⁻¹ ao final da fermentação (Figura 21c). Pode-se atribuir esse aumento ao maior °Brix inicial, ou seja, maior concentração de açúcares no mosto. O glicerol, apresentou perfil exponencial de crescimento, nas primeiras 4 h de fermentação, houve um aumento de 95 % de seu teor (considerando o valor de 0,65 g.L⁻¹ no ponto inicial da fermentação e 6,30 g.L⁻¹ em 4 h. O perfil de formação do glicerol entre os grupos controle e nutrido foram semelhantes (Figura 21cd). O ácido succínico, apresentou maior nível dentre os ácidos presentes, atingindo um patamar de 1,0 g.L⁻¹, seguido pelo ácido lático e acético. O perfil de subprodutos oriundos dos ensaios fermentativos contendo mosto industrial com 26° Brix, apresentaram tendência de crescimento ao longo do tempo de fermentação (Figura 21ef). O glicerol, apresentou perfil exponencial de crescimento, houve um aumento de 92 % de seu teor (considerando o valor de 0,6 g.L⁻¹ no ponto inicial da fermentação e 6,50 g.L⁻¹ em 4 h). Após 4 h de fermentação, a formação do glicerol entrou em fase estacionária, atingindo um patamar máximo de 7,0 g.L⁻¹. Em comparação com os ensaios anteriores, houve maior produção de glicerol devido ao maior °Brix do mosto. Não houve diferença no perfil de formação do glicerol entre os grupos, controle e nutrido. O perfil dos teores de ácido succínico, ácido lático e acético ao longo da fermentação contendo mosto com 26° Brix foram semelhantes a com 24°Brix (Figura 21cd).

A Tabela 9, apresenta os teores médios dos ácidos orgânicos e glicerol nos ensaios fermentativos com diferentes °Brix. As comparações estatísticas foram determinadas entre os grupos controle e nutrido para cada ensaio fermentativo com 95% de nível de confiança ($\alpha = 0,05$). Os teores de glicerol, ácido succínico, ácido lático e ácido acético nos diferentes ensaios fermentativos variaram entre 4,4-7,0; 0,9-1,0; 0,7-1,0; 0,3-0,6 g.L⁻¹ respectivamente, valores semelhantes aos reportados em processos industriais de produção de bioetanol (SÁ, 2012). Esses teores de subprodutos corroboram com o estudo realizado por Basso et al. (1996) que afirmam que em fermentações entre 85-92% de eficiência são encontradas proporções de 3,0-

6,0 g de glicerol; 0,3-1,2 g de ácido succínico; 0,1-0,7 g de ácido acético à cada 100 g de glicose metabolizada.

Tabela 9. Teores de glicerol e ácidos orgânicos oriundos de fermentações realizadas em escala de laboratório com diferentes °Brix e adição de suplementação mineral

Ensaio Fermentativo (°Brix)	Grupos *	Glicerol (g.L ⁻¹)	Ácido Lático (g.L ⁻¹)	Ácido Acético (g.L ⁻¹)	Ácido Succínico (g.L ⁻¹)
20	Controle	5,80 ± 0,33 ^a	0,70 ± 0,01 ^a	0,44 ± 0,02 ^a	0,90 ± 0,06 ^a
	Nutrição	5,30 ± 0,22 ^a	0,73 ± 0,02 ^a	0,33 ± 0,00 ^b	0,95 ± 0,04 ^a
24	Controle	6,63 ± 0,51 ^a	0,87 ± 0,02 ^a	0,46 ± 0,00 ^a	1,00 ± 0,01 ^a
	Nutrição	6,63 ± 0,38 ^a	0,89 ± 0,02 ^a	0,43 ± 0,04 ^a	1,00 ± 0,03 ^a
26	Controle	6,86 ± 0,97 ^a	1,00 ± 0,10 ^a	0,50 ± 0,01 ^a	0,90 ± 0,20 ^a
	Nutrição	7,00 ± 0,68 ^a	1,00 ± 0,01 ^a	0,62 ± 0,05 ^a	1,00 ± 0,10 ^a

*valores para n=3. Média com a mesma letra na coluna indica que não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

No entanto, não se constatou diferenças significativas da produção de ácidos orgânicos entre os grupos comparativos (controle e nutrição), com exceção do ácido acético contendo mosto com 20° Brix. Desta forma, os resultados confirmam que o desvio do metabolismo da conversão de açúcares à ácidos orgânicos não interferiram na avaliação da adição dos macros e micronutrientes nos ensaios fermentativos do presente estudo, pois foram muitos semelhantes. A produção de ácidos orgânicos seria considerada um interferente, caso houvesse discrepância nas concentrações entre os grupos analisados, sinalizando uma possível causa para menores rendimentos fermentativos.

A Figura 22 apresenta o comportamento do crescimento celular do fermento industrial (*S. cerevisiae*) submetida aos ensaios fermentativos com 3 diferentes °Brix de mosto. Todos os ensaios fermentativos (controle, Figura 22a) resultaram em uma densidade ótica do fermento entre 15-20 g.L⁻¹ ao longo do tempo de fermentação (8 h). Desta forma, a concentração celular se manteve estável ao longo das fermentações. Desse modo, em concordância com Amorim et al. (2011) é preciso controlar a população de leveduras, porque células em multiplicação excessiva acabam por desviar açúcar para a formação de biomassa e não para a produção de álcool como desejável. Considerando os desvios padrões não é possível afirmar que houve diferenças nos valores de densidade ótica do fermento entre os ensaios com diferentes °Brix.

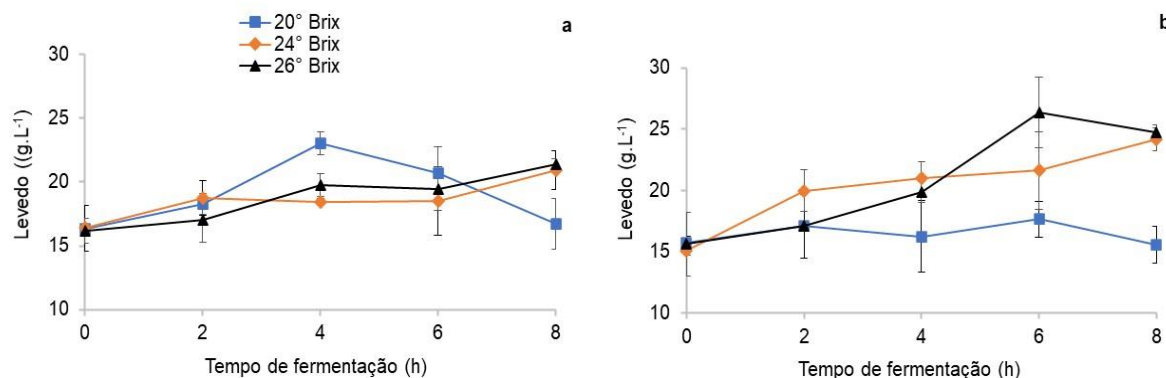


Figura 22. Perfil do teor do fermento com diferentes condições de ° Brix do mosto **(a)** controle **(b)** nutrido.

Os ensaios fermentativos com adição de meio nutricional (Figura 22b) resultaram em uma densidade ótica do fermento entre 15-25 g.L⁻¹ ao longo do tempo de fermentação (8 h). Entretanto, todos os ensaios fermentativos não culminaram em crescimento celular mantendo-se estável no patamar de 15 g.L⁻¹.

Durante a fermentação o fermento acidifica o meio através da expulsão de H⁺ pela proteína de membrana (H⁺-ATPase) que é majoritariamente codificada pelo gene Pma1 (SINGLER et al., 1983). O perfil de pH em função do tempo de fermentação foi determinado em todos os ensaios fermentativos. Em todas as fermentações houve diminuição do pH (Figura 23ab). Porém, essa diminuição foi mais intensa nos ensaios fermentativos contendo mosto com 26° Brix, corroborando com o maior nível de açúcares no mosto. Também não foram observadas diferenças nos valores de pH nos ensaios fermentativos controle e nutrido. Segundo Schmidell et al. (2007), com o aumento da concentração de CO₂, bem como à produção de ácidos orgânicos, na fase anaeróbica do metabolismo do fermento, há a diminuição do pH no processo de produção de bioetanol. Segundo Costa (2006) esses resultados são considerados coerentes com perfil de pH de processo industrial, que está na faixa de 4 a 5 e os resultados obtidos são considerados parâmetros ideias para o metabolismo do fermento.

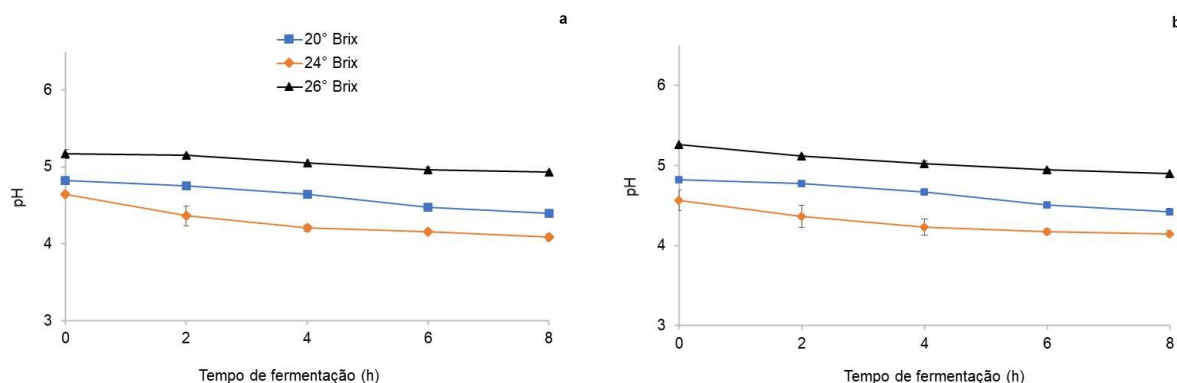


Figura 23. Perfil de pH em fermentação alcoólica com diferentes condições de °Brix do mosto (a) controle (b) nutrição.

*As barras de erros correspondem ao desvio padrão amostral. Barra de erro sobreposta significa que o erro é menor que o tamanho do símbolo.

A avaliação da viabilidade e vitalidade celular do fermento foi realizada apenas para o ensaio contendo mosto com 24° Brix, essa escolha foi atribuída devido aos valores superiores de rendimento apresentados com a adição de nutrientes nesta condição de mosto. Essa técnica está correlacionada com o estado metabólico do fermento viável, podendo variar de muito ativa para sem nenhuma atividade fisiológica. O método foi realizado no início (0 h) e final da fermentação (8 h). A mensuração da vitalidade celular foi realizada por dois métodos diferentes: resazurina e *Multikit Vital-Yan* (por meio de contagem de unidade formadora de colônia, UFC).

Os dados obtidos pelo método de resazurina evidenciaram alterações metabólicas no fermento submetido à adição de nutrientes (Figuras 24b).

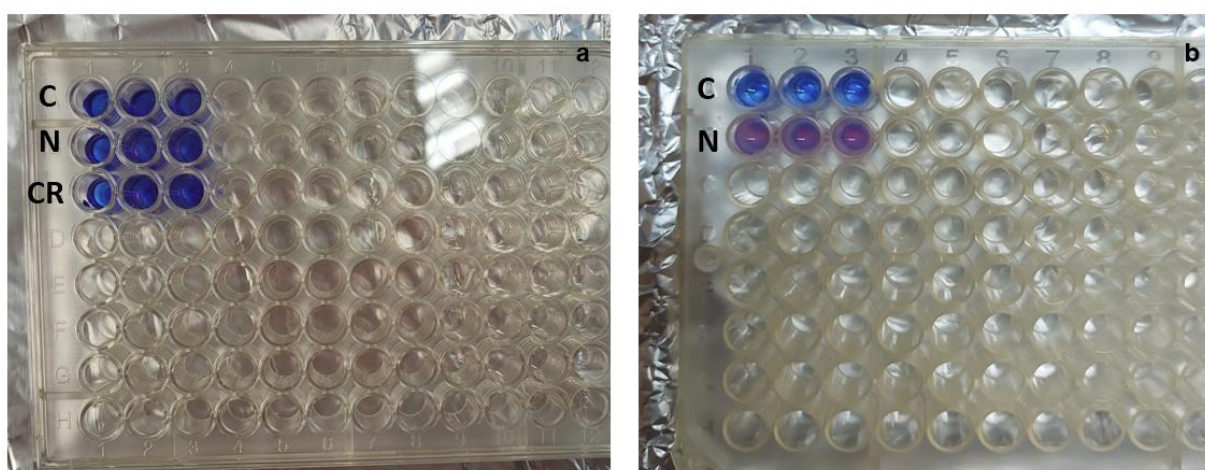


Figura 24. Análise de vitalidade celular pelo método resazurina (a) início de fermentação (0 h) (b) final de fermentação (8 h). (C = fermentações controle; N = fermentações com nutrientes; CR = controle de reagente).

O resultado do ensaio de resazurina ao final da fermentação (8 h) do ensaio fermentativo com adição de nutrientes foi moderado (50-70%), enquanto para os outros ensaios (controle, tempos 0 h e 8 h e com adição de nutrientes, tempo 0 h) foi considerado baixo ($\leq 50\%$) (Figura 13). No início da fermentação (0 h) não foi constatado alteração colorimétrica da redução da resazurina para ambos os grupos controle e com adição de nutrientes, o que sugere baixa atividade metabólica do fermento no início dos ensaios fermentativos. Os resultados dos ensaios fermentativos controle e com adição de nutrientes pelo método da resazurina corroboram com os resultados pelo método de plaqueamento, ambos indicando acréscimo da vitalidade celular do fermento submetido a dosagens de nutrientes quando comparado com o controle sem adição de nutrientes (Tabela 10).

Tabela 10. Avaliação da viabilidade e vitalidade celular do fermento e nível de contaminação bacteriana.

Mosto 24° brix	Viabilidade (%)	Vitalidade (%)	Contaminação bacteriana (cél.s.mL ⁻¹)
Controle (0h) *	76,70 $\pm$ 0,44 ^a	56,60 $\pm$ 9,00 ^a	10 ⁶ baixa
Controle (8h) *	76,15 $\pm$ 6,98 ^a	55,30 $\pm$ 20,70 ^a	10 ⁶ baixa
Nutriente (8h) *	79,30 $\pm$ 4,46 ^a	76,60 $\pm$ 11,95 ^a	10 ⁶ baixa

*valores para n=3. Média com a mesma letra na coluna indica que não diferem entre si pelo teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

As análises de viabilidade e vitalidade são essenciais para garantir um processo fermentativo adequado. No início do ensaio fermentativo (controle 0 h) a vitalidade apresentou nível de 56,6%, parâmetro considerado abaixo do normal devido as células do fermento ainda não terem contato com o substrato fermentativo. Porém, ao avaliar os resultados obtidos no tempo de 8 h de fermentação, a vitalidade celular do ensaio controle, permaneceu com atividade metabólica de 55,3%, ou seja, no mesmo patamar do início da fermentação. Em contrapartida, a fermentação contendo adição de nutrientes, apresentaram perfil metabólico considerado moderado, com valores 76,6% ao final do ensaio fermentativo. No entanto, os resultados de vitalidade celular do fermento não apresentaram diferenças significativas ao realizar o teste de Tukey, devido ao elevado desvio amostral.

Os níveis da viabilidade celular e da contaminação bacteriana finalizaram com os mesmos valores do início dos ensaios fermentativos, o que sugere que a dosagem do nutriente ajuda a manter o número de células viáveis ao longo do processo fermentativo (Tabela 10). Este trabalho demonstrou que o ensaio de resazurina possui um grande potencial para ser aplicado na avaliação da vitalidade celular do fermento em processos industriais de bioetanol. Neste

estudo, o ensaio foi desenvolvido e padronizado com sucesso, mostrando-se sensível tanto quanto ao método de resazurina e de plaqueamento. Contudo para sinalizar possíveis melhorias deste ensaio, é interessante ser replicado em fermentações com diversos tipos de estresse, como elevada contaminação bacteriana, floculação e temperatura nas dornas fermentativas. Os resultados apresentados neste trabalho buscaram avaliar o efeito da adição de nutrientes inorgânicos sobre fermentações com diferentes concentrações de açúcares, bem como, verificar as condições metabólicas do fermento por meio de ensaios de vitalidade celular.

5.4. Avaliação de custo-benefício

Os dados apresentados na (Tabela 11) são estimativas que foram calculadas com base nos resultados de produção batelada de etanol (g.L^{-1}) oriundas dos experimentos fermentativos em laboratório com mosto de 24° Brix (vide Tabela 8). Como demonstrado nos ensaios, a adição do produto nutricional ([®]Nitrofós) foi fator determinante para melhor desempenho fermentativo e conseqüentemente maior produção de etanol batelada. Deste modo, o grupo nutrido computou ganhos de 266 m^3 de etanol/mês a mais que o grupo controle, resultando em valor mensal de aproximadamente R\$ 749.252,00. De acordo com o valor estimado e descontando o custo mensal do produto, o ganho mensal apresentado é de aproximadamente R\$ 586.879,20 por mês.

Tabela 11. Estimativa de custos e ganhos de etanol utilizando produto nutricional ([®]Nitrofós).

Mosto 24° Brix	Prod. etanol mensal (m^3)	Valor etanol mensal (R\$)	Custo produto mensal (R\$)	Ganho mensal (R\$)
Controle	11.548,80	32.394.384,00	-	-
Nutrido	11.815,20	33.141.636,00	160.372,80	586.879,20

Entretanto, os cálculos apresentados na Tabela 11 consideraram uma produção de etanol estável, desprezando fatores instáveis do processo de produção de etanol, como por exemplo: concentração de açúcares, vazão de alimentação, tipo de substrato a ser fermentado, contaminação etc. Como quaisquer análises de custo-benefício de uma aplicação, é possível calcular um valor mensal em ganhos e consumo de produtos, porém, é importante destacar que um processo de produção tem inúmeras variáveis que podem influenciar no desempenho do produto, conforme foi descrito neste estudo. Portanto, vale ressaltar que o produto apresentou potencial para melhorar o processo fermentativo, aumentando a produção de etanol e estimando vantagens de valor agregado.

6. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos pode-se concluir:

- A reposta dos teores de minerais e metais tóxicos apresenta-se como uma ferramenta capaz de auxiliar na tomada de decisões no processo fermentativo de bioetanol industrial;
- Foi evidenciado déficits de macronutrientes nos 4 primeiros meses de safra e micronutrientes durante todo o período de safra da fermentação industrial avaliada no presente estudo;
- O balanço de minerais identificou à necessidade de suplementação do mosto na fermentação industrial em estudo;
- Os ensaios fermentativos contendo mosto com 24 e 26 °Brix suplementados com nutrientes, apresentaram maiores desempenhos fermentativos;
- A produção de ácidos orgânicos não foi interferente nos ensaios fermentativos suplementados com nutrientes;
- A vitalidade celular do fermento suplementado com nutrientes apresentou-se ligeiramente maior ao término da fermentação;
- Há potencial de uso do produto nutricional (®Nitrofós) em processo de produção de bioetanol;
- Recomenda-se aplicar o produto nutricional (®Nitrofós) em planta piloto e/ou industrial para realizar nova estimativa de custos;

7. REFERÊNCIAS

- AMORIM, H. V. et al. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267–1275, 2011.
- AMORIM, H.V.; LEÃO, R. M. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba. Editora: Fermentec - Ltda, 2005. p. 448.
- BNDES, 2008. **Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável/organização BNDES e CGEE**. 316 p. Rio de Janeiro, 2008.
- BASSO, L. C. et al. Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation. In: BERNARDES, M. A. D. S. (Ed.). **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**. Rijeka, Croatia: InTech, 2011. p. 85–100.
- CERQUEIRA, D. P. **Fermentação alcoólica de mosto com alta concentração de açúcar**. Piracicaba, 2013. 66 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Ciência e Tecnologia de Alimentos - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / ESALQ – USP. Piracicaba, 2013.
- COSTA, V. M. **Perfil de metabólitos excretados por Lactobacillus isolados de processo industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D(-) e L(+) do ácido láctico**. Piracicaba, 2006. 64 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Ciências e Tecnologia de Alimentos Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / ESALQ – USP. Piracicaba, 2006.
- JONES, C. L., et al., "An Interlaboratory Study of Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy Method 6010 and Digestion Method 3050," EPA-600/4-87-032, U.S. Environmental Protection Agency, Las Vegas, NV, 1987.
- DA SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Use of stillage and its impact on soil properties and groundwater. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, 2007.
- DE SOUZA, R. B. et al. Mineral Composition of the Sugarcane Juice and Its Influence on the Ethanol Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 209–222, 2015.
- DE SOUZA, R. B. **Análise fisiológica e transcriptômica de *Saccharomyces cerevisiae* em resposta celular à composição mineral da cana de açúcar**. Recife, 2016. 72 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Biotecnologia), Universidade Federal de Pernambuco – UFPE. Recife, 2016.
- FERREIRA, D. S. **Efeito da suplementação mineral com magnésio e cobre no comportamento fisiológico de *Saccharomyces cerevisiae***. Recife, 2015. 37 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco - UFPE. Recife, 2016.
- FERRARI, F. C. DOS SANTOS. **Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol em escala industrial**. Jaboticabal, 2013. 57p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária), Universidade Estadual Paulista –

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, 2013.

FISCHER, F. J. A. **Resposta de cultivares de cana-de-açúcar a lâminas de irrigação via gotejamento subsuperficial**. Tese (doutorado em Agronomia – Ciência do Solo), Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2018.

FRANÇOSO, I. L. T. **Efeito da enzima α -amilase na etapa de clarificação do caldo**. Piracicaba, 2016. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, 2013.

GODOY, A. **Fermentação contínua x fermentação batelada**. In: ENCONTROS FERMENTEC – REUNIÃO ANUAL, 27. São Pedro, 2006.

GOLDENBERG, J.; NIGRO, F.E.B.; COELHO, S.T. **Bioenergia no estado de São Paulo: situação atual, perspectivas, barreiras e propostas** – São Paulo: Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 152 p., 2008.

GUINARD, J.; LEWIS, M. J. Study of the phenomenon of agglomeration in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. **Journal of the Institute of Brewing and Distilling**, v. 99, s/n, p. 487 – 503, 1993.

JERONIMO, E. M. et al. Addition of proteic nitrogen during alcoholic fermentation for the production of cachaça. **Scientia Agricola**, v. 65, n. 2, p. 161–168, 2008.

LIMA, U. D. A. **Biotecnologia Industrial - Vol. 3: Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo. Editora: Edgar Blucher Ltda, 2019. 760 p., 2ª Edição.

LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v. 3. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, 2001.

LOPES, M. L. et al. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 64–76, 2016.

MONTEIRO, B. M. DOS S. **Produção de etanol combustível: efeitos da suplementação nitrogenada na fermentação de mosto de caldo de cana com alta concentração de açúcar**. Piracicaba, 2016. 137p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / ESALQ – USP, 2016.

MORAES, J. **Desenvolvimento e padronização de ensaio de resazurina para avaliar a vitalidade de leveduras no contexto microcervejeiro**. Porto Alegre, 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Departamento de Biociências, 2017.

MENEZES, J. A. S. **Aspectos físicos e químicos do caldo de cana que afetam a capacidade fermentativa das células de levedura**. Recife, 2012. 55p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Pernambuco, 2012.

OLBRICH, H. The Molasses. Berlin, Germany: **Biotechnologie-Kempe GmbH** (2006) v. 3.

PARAZZI, C.; PAPIN, L.; BELLUCO, A. E. DE S. Hidrólise enzimática do amido do caldo da

cana-de-açúcar na fermentação etanólica. **Revista Ciência, Tecnologia & Ambiente**, v. 5, n. 1, p. 15–22, 2017.

PEREIRA, A. F. **Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho**. Viçosa, 2007. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa - MG, 2007.

PROCÓPIO, S. DE O. et al. **Cana-de-açúcar: Bioenergia, Açúcar e Etanol - Tecnologias e Perspectivas**. 407 – 461 p. Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, 2012.

PULIGUNDLA, P. et al. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: A research update. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 9, p. 1133–1144, 2011.

RIBEIRO, E. J. **Fermentação Alcoólica**. Uberaba, 2010. Apostila do Módulo II. Processamento na Indústria Sucroalcooleira. FAZU. RIBEIRO, F. A. M. **Álcool e açúcar: uma via de mão dupla**. In: ROSSAFA, L. A. (Coord.). Álcool combustível – série indústria em perspectiva. Brasília: Instituto Evaldo Lodi, p. 48- 57, 2008.

RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C. **Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente**. Piracicaba, 2004. Barros & Marques Ed. Eletrônica, 302 p. 2004.

SÁ, C. B. C DE. **Caracterização de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e *Zymomonas mobilis* para aplicação na produção de bioetanol**. 72 p. Recife, 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade Federal de Pernambuco – Centro de Ciências Biológicas, Biotecnologia Industrial. Recife, 2012.

SANTOS, A. M. DOS. **Estudo da Influência da Complementação de Nutrientes no Mosto sobre o Processo de Fermentação Alcoólica em Batelada**. 77 p. Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Exatas. Instituto de Química. Maceió, 2008

SILVA, J. A. et al. Influência das variáveis nitrogênio, fósforo e °Brix na produção dos metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 695–698, 2006.

SILVA, T. P. DA. **Avaliação de antisséptico em bioprocessos de produção de etanol**. 59 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2020.

SIGLER, K. et al. 1983. Intracellular control of proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Folia microbiologica**, 28(5), pp.363–370, 1983.

SUHRE, T. **Controle de qualidade em microcervejarias: avaliação da viabilidade, vitalidade e contaminantes em leveduras cervejeiras**. 48p. Porto Alegre, 2014. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Departamento de Biociências, Porto Alegre, 2014.

SCHMIDELL, Willibaldo; BORZANI, Walter; LIMA, Urgel Almeida; Aquarone, Eugênio.

Biotecnologia Industrial; Editora Edgard Blucher LTDA; São Paulo, 2007, V.2, p.19.

STEHLIK-TOMAS, V. et al. Zinc, copper and manganese enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 42, n. 2, p. 115–120, 2004.

STECKELBERG, C. **Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 56 f., 2011.

STUPIELLO, J. P.; HORII, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum**, v4, n.17, p.43-46, 1990.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. Massachusetts: Sinauer Associates, 782p. (Eds.) (2013).

TORTORA, G. R.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 967p. 2012.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DA CANA DE AÇÚCAR – UNICA. **Histórico de produção e moagem 2020/2021**. Disponível em: < <http://www.unicadata.com.br/historico-de-producao-e-moagem.php> > Acesso em: 08 de janeiro, 2022.

UNIÃO NACIONAL DA BIOENERGIA – UDOP. **Dados de Mercado e produção brasileira**. Disponível em: < <https://www.udop.com.br/index.php?item=safra> > Acesso em: 17 de janeiro, 2022.

UDEH, H. O.; KGATLA, T. E. Role of magnesium íons on yeast performance during very high gravity fermentation. **Journal of Brewing and Distilling**, v. 4, n. 2, p. 19 – 45, Sept. 2013.

VARIZE, C. DE S. et al. Suplementação de aminoácidos na fermentação alcoólica de mostos de melaço e xarope de cana-de-açúcar empregando linhagem industrial CAT-1. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 7, n. 2, p. 265–280, 1 jul. 2019.

VENTORIM, F; MACHADO, G. **Álcool combustível na matriz energética brasileira**. In: ROSSAFA, L. A. (Coord.). **Álcool combustível – série indústria em perspectiva**. Brasília: Instituto Evaldo Lodi, p. 58-67, 2008.

VENTURA, R. **Quantificação do ácido láctico na fermentação etanólica como parâmetro de monitoramento do processo**. 2007. 97 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

WALKER, G. M. et al. Yeast-metal interactions: impact on brewing and distilling fermentations. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, p. 678–687, 2000.

APÊNDICES

Apêndice I. Laudo de análise de minerais da empresa Solenis (Paulínia *Technical Center*).



Global Technology
Customer Analytical Services Laboratory

0000802342

NOME DE PROJETO: P-20211021-010
DATA DE REVISÃO: 26-Oct-2021
REMETENTE: Davi Gorla Montiel
ID. REMETENTE: A741165
NÚMERO LWR: PTC21-1081
PROGRAMA RD: 351306

INFORMAÇÃO DO SISTEMA

		GENERAL PROCESS			
		883398	883399	883400	883401
ID. SISTEMA:		01-Oct-2021	01-Oct-2021	01-Oct-2021	01-Oct-2021
NÚMERO DA AMOSTRA:		Mosto	Fermento	Vinho	Água diluição
DATA DA AMOSTRA:					
NOME DA AMOSTRA:					
AMOSTRA PT:					
ELEMENTO	UNIDADES				
Alcalinidade Hidróxida (as CaCO ₃)	ppm				< 3
Alcalinidade Total	ppm				33.0
Alumínio	ppm	14.6	12.0	12.0	< 0.1
Cádmio Total	ppm	< 0.1	< 0.1	< 0.1	
Cálcio Total	ppm	789.1	249.3	706.3	
Chumbo Total	ppm	< 0.1	< 0.1	< 0.1	
Cobre Total	ppm	0.4	0.6	0.4	
Dureza de Cálcio (as CaCO ₃)	ppm				10.0
Dureza Total (as CaCO ₃)	ppm				17.0
FAN	ppm	96.6	102.2	57.4	
Ferro Total	ppm	10.3	6.3	7.5	< 0.1
Fosfato, Total	ppm				< 1.0
Fósforo	ppm	153.6	593.7	151.5	
Magnésio Total	ppm	372.0	195.9	339.6	
Manganês Total	ppm	3.0	1.8	2.7	
Níquel Total	ppm	< 0.1	< 0.1	< 0.1	
pH					5.28
Potássio Total	ppm	3075.2	2020.2	2822.0	
Silica Total (as SiO ₂)	ppm	179.1	94.7	150.8	24.3
Sódio Total	ppm	92.5	149.9	105.1	
Sulfito (as SO ₃)	ppm				26.0
Zinco Total	ppm	1.4	5.4	1.3	

Apêndice II. Cálculo de massa dos minerais presentes no mosto, fermento e nutrientes para suplementação de fermentação em laboratório.

• **Concentração de minerais presentes no mosto/fermento (mg.L⁻¹)**

Jun/21	N	P	Mg	Mn	Zn	Cu
Minerais Mosto	69,2	133,0	169,7	1,0	0,6	0,2
Minerais Fermento	97,6	455,2	171,8	1,8	4,2	0,7

• **Conversão dos minerais presentes no mosto/fermento para (g.L⁻¹):**

$$N \text{ mosto} = \frac{69,2}{1000} \rightarrow N \text{ mosto} = 0,0692 \text{ g.L}^{-1}$$

• **Concentração de minerais presentes no mosto e fermento (g.L⁻¹)**

Minerais (g.L⁻¹)	N	P	Mg	Mn	Zn	Cu
Mosto	0,0692	0,1330	0,1697	0,0010	0,0006	0,0002
Fermento	0,0976	0,4552	0,1718	0,0018	0,0042	0,0007

• **Cálculo da massa dos minerais presentes no mosto/fermento**

Considerando volume de mosto de 140 mL e volume de fermento de 60 mL utilizado nas fermentações em laboratório, tem-se:

$$\begin{array}{ccc} 0,0692 \text{ g.L de N mosto} & \times & 1000 \text{ mL de mosto} \\ y & & 140 \text{ mL de mosto} \end{array}$$

$$y = 0,0097 \text{ g de Nitrogênio no mosto}$$

Aplicando esse cálculo para todos os minerais presentes no mosto e fermento, tem-se a concentração mássica (g) dos principais íons:

Minerais (g)	N	P	Mg	Mn	Zn	Cu
Mosto	0,0097	0,0186	0,0238	0,0001	0,0001	0,000028
Fermento	0,0059	0,0273	0,0103	0,0001	0,0003	0,000042
Total	0,0156	0,0459	0,0341	0,0002	0,0003	0,000070

- **Cálculo de massa dos minerais presentes nos nutrientes (Nitrofós Macro e Nitrofós Micro)**

Suplementando a fermentação com 0,025 g de Nitrofós Macro e 0,023 g de Nitrofós Micro, obtém-se uma quantidade total de cada íon presente nos nutrientes:

Quantidade de Nitrogênio no nutriente (Nitrofós Macro) (Tabela 4).

$$\begin{array}{rcl} 221,13 \text{ g de N} & \times & 1000 \text{ g de nutriente Nitrofós Macro} \\ x & & 0,025 \text{ g de nutriente Nitrofós Macro} \end{array}$$

$$x = 0,0055 \text{ g de N}$$

Aplicando esse cálculo para todos os minerais presentes em cada um dos nutrientes, tem-se a concentração mássica (g) suplementada:

Minerais (g)	N	P	Mg	Mn	Zn	Cu
Nitrofós Macro	0,0055	0,0071	0,0003	0,0004	0,0001	
Nitrofós Micro			0,0002	0,0004	0,0002	0,0006
Total	0,0055	0,0071	0,0005	0,0008	0,0003	0,0006

- **Suplementação**

Somando as concentrações mássicas totais (mosto, fermento e nutrientes), obtém-se a quantidade total de minerais em fermentação:

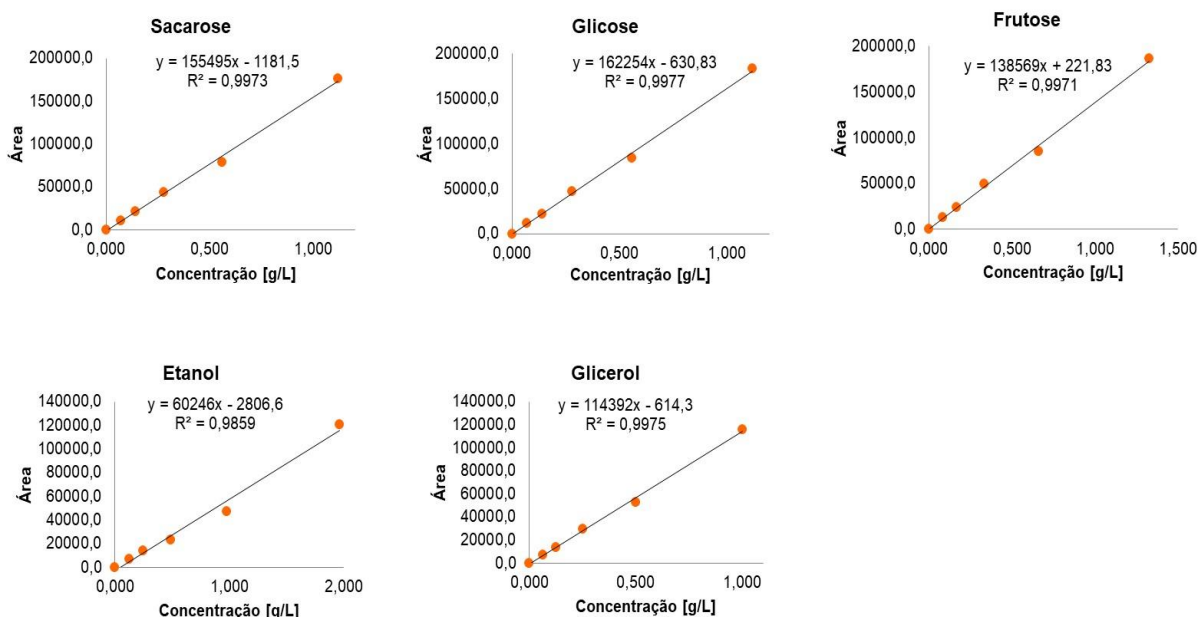
Minerais	N	P	Mg	Mn	Zn	Cu
Mosto/fermento (g)	0,0156	0,0459	0,0341	0,0002	0,0003	0,0001
Nutrientes (g)	0,0055	0,0071	0,0005	0,0008	0,0003	0,0006
Total Minerais (g)	0,0211	0,0530	0,0345	0,0010	0,0006	0,0007

- **Cálculo em % de suplementação de nutrientes adicionados:**

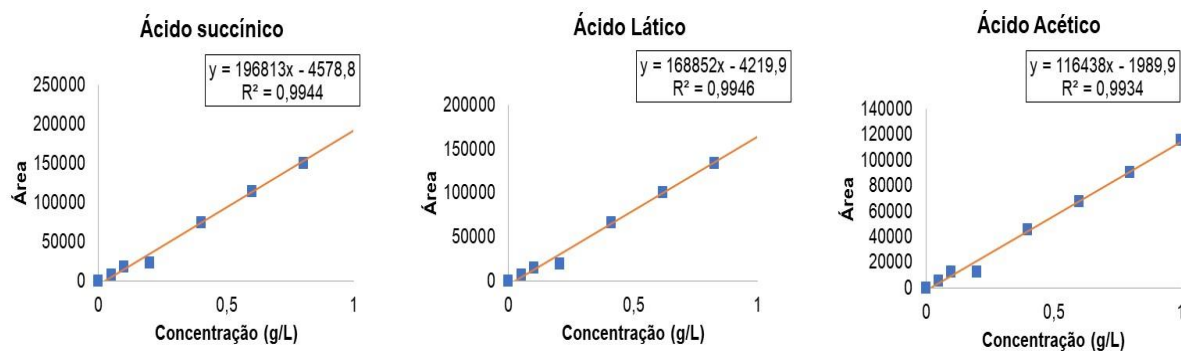
$$N (\%) = \frac{0,0055 \times 100}{0,0211} \rightarrow N = 26,23\%$$

N (%) = 26,23	Mn (%) = 74,70
P (%) = 13,32	Zn (%) = 47,90
Mg (%) = 1,33	Cu (%) = 89,15

Apêndice III. Curvas analíticas para determinação dos teores de sacarose, glicose, frutose, glicerol e etanol em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna Shodex KS-802 da marca Waters.



Apêndice IV. Curvas analíticas para determinação dos teores de ácido láctico, ácido acético, ácido succínico em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando coluna HPX - 87 H da marca Aminex.



Apêndice V. Curva analítica de calibração da concentração celular (g.L^{-1}) de *Saccharomyces cerevisiae* versus espalhamento de luz a 600 nm (SILVA, 2020).

