

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE**  
**SORGO E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS**  
**ALIMENTÍCIOS E BEBIDAS**

**Vitor Teixeira**

Tecnólogo em biocombustíveis

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE  
SORGO E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS  
ALIMENTÍCIOS E BEBIDAS**

**Discente: Dr. Vitor Teixeira**

**Orientadora: Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia Agropecuária.

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| T266a | <p>Teixeira, Vitor</p> <p>Avaliação DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE SORGO E<br/>CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS ALIMENTÍCIOS E<br/>BEBIDAS<br/>Avaliação DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE SORGO E<br/>CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS ALIMENTÍCIOS E BEBIDAS / Vitor<br/>Teixeira. -- Jaboticabal, 2021</p> <p>107 p. : il., tabs.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de<br/>Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientadora: Márcia Justino Rossini Mutton</p> <p>1. Sorghum bicolor L. Moench. 2. Etefom. 3. Fermentação alcoólica. 4.<br/>Saccharomyces cerevisiae. 5. Fermentação acética. I. Título.</p> |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE SORGO E  
CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS ALIMENTÍCIOS E BEBIDAS

AUTOR: VÍTOR TEIXEIRA

ORIENTADORA: MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MICROBIOLOGIA  
AGROPECUÁRIA, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MÁRCIA JUSTINO ROSSINI MUTTON (Participação Virtual)  
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. SANDRA REGINA CECCATO ANTONINI (Participação Virtual)  
Departamento de Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural-UFSCar / Araras/SP

Prof. Dr. ROBERTO ALVES DE OLIVEIRA (Participação Virtual)  
Departamento de Engenharia Rural / FCAV / UNESP - Jaboticabal-SP

Profa. Dra. JULIANA PELEGRINI ROVIERO (Participação Virtual)  
ETEC / Guariba/SP

Prof. Dr. WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO (Participação Virtual)  
Departamento de Horticultura / UNESP/ Câmpus de Botucatu

Jaboticabal, 12 de maio de 2021

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**VITOR TEIXEIRA** – Nasceu aos 23 de setembro de 1993, na cidade de Novo Horizonte, estado de São Paulo. Em janeiro de 2011 ingressou no curso Superior em Tecnologia em Biocombustíveis na Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal – “Nilo de Stéfani”, Campus de Jaboticabal, recebendo o título de Tecnólogo em Biocombustíveis em 2014. A partir de abril de 2012 passou a integrar aos grupos de pesquisa “Processos Biotecnológicos aplicados à Agroindústria” e “Fisiologia e Manejo Sustentável da cana-de-açúcar”, participando de diversos projetos. Em agosto de 2014 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da FCAV-UNESP Jaboticabal, SP, obtendo o título de Mestre em dezembro de 2016. Em agosto de 2017 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agropecuária da FCAV-UNESP Jaboticabal – SP. Em novembro de 2018 a maio de 2019 fez doutorado sanduíche no exterior como parte do projeto de pesquisa no Audubon Sugar Institute da Louisiana State University sob orientação da Profa. Dra. Gillian Eggleston, obtendo o título de Doutor em Microbiologia Agropecuária em maio de 2021.

“Crescer custa, demora, esfolia, mas compensa. É uma vitória secreta, sem testemunhas. O adversário somos nós mesmos.”

Martha Medeiros

A minha mãe, Nair Bartolomeu Teixeira, por todo carinho, apoio, incentivo e ajuda nas horas mais difíceis.

Dedico.

A minha família e amigos, por serem sempre tão presentes em minha caminhada profissional e pessoal.

Ofereço.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Microbiologia Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP) pela oportunidade de realizar o curso de doutorado;

A Profa. Dra. Márcia Justino Rossini Mutton pela oportunidade de orientação e ensinamentos para minha vida profissional e pessoal, assim como o Prof. Dr. Miguel Ângelo Mutton;

A Profa. Dra. Gillian Eggleston por ter aceitado a orientação no doutorado sanduíche, junto a Profa. Dra. Giovanna Aita, por todo apoio estrutural e profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, assim como a FAPESP pelo financiamento do projeto (2017/11474-4).

A equipe do Laboratório de Tecnologia do Açúcar e do Alcool da FCAV/UNESP e do Audubon Sugar Institute da LSUAgCenter, por toda ajuda e amizade durante o curso.

Aos membros da banca examinadora, pela participação, disponibilidade e considerações;

A Nexsteppe pela disposição do genótipo Malibu J53 e todo auxílio no acompanhamento da cultura;

A Usina São Martinho pela colaboração nas análises cromatográficas dos destilados;

A Aline Ferreira Silva, por ser meu braço direito ao longo de todo o curso, assim como a Gabriela Ribeiro Bruno, Nayara Roncoleta e todos os moradores da República Antro do HV, aos quais serei eternamente grato pela amizade, conselhos e momentos que passamos juntos;

A todos que de uma maneira ou de outra, contribuíram para a concretização desse estudo.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMO.....                                                                                                                          | v  |
| ABSTRACT. ....                                                                                                                       | vi |
| CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....                                                                                               | 1  |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                  | 1  |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                                                       | 3  |
| 2.1. Sorgo.....                                                                                                                      | 3  |
| 2.2. Sorgo granífero.....                                                                                                            | 4  |
| 2.3. Sorgo sacarino .....                                                                                                            | 4  |
| 2.4. Fitorregulador .....                                                                                                            | 6  |
| 2.5. Processo fermentativo.....                                                                                                      | 7  |
| 2.6. Leveduras.....                                                                                                                  | 10 |
| 2.7. Processamento do sorgo sacarino em larga escala .....                                                                           | 11 |
| 3. REFERÊNCIAS .....                                                                                                                 | 13 |
| CAPÍTULO 2 – Uso de fitorregulador no cultivo do sorgo sacarino e a interação com diferentes leveduras para produção de etanol ..... | 17 |
| RESUMO.....                                                                                                                          | 17 |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                  | 18 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                                                          | 19 |
| 2.1. Delineamento experimental.....                                                                                                  | 19 |
| 2.2. Instalação e condução do projeto.....                                                                                           | 20 |
| 2.3. Avaliação da matéria-prima e características químico-tecnológica do caldo extraído .....                                        | 22 |
| 2.4. Processamento dos colmos.....                                                                                                   | 23 |
| 2.4.1. Extração do caldo.....                                                                                                        | 23 |
| 2.4.2. Clarificação do caldo e preparo do mosto .....                                                                                | 24 |

|                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.4.3. Processo fermentativo .....                                                                 | 24 |
| 2.4.3.1. Adaptação dos inóculos .....                                                              | 24 |
| 2.4.3.2. Fermentação .....                                                                         | 25 |
| 2.4.4. Tratamento enzimático .....                                                                 | 25 |
| 2.4.5. Vinho .....                                                                                 | 26 |
| 2.4.6. Análise dos destilados .....                                                                | 26 |
| 2.5. Análise dos resultados .....                                                                  | 27 |
| 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....                                                                    | 27 |
| 3.1. Avaliação da matéria-prima e características químico-tecnológica do caldo extraído .....      | 27 |
| 3.2. Processamento dos colmos .....                                                                | 41 |
| 3.2.1. Caldo extraído .....                                                                        | 41 |
| 3.2.2. Caldo clarificado .....                                                                     | 45 |
| 3.2.3. Mosto .....                                                                                 | 48 |
| 3.2.4. Processo fermentativo .....                                                                 | 49 |
| 3.2.5. Vinho .....                                                                                 | 55 |
| 3.2.6. Destilados .....                                                                            | 61 |
| 4. CONCLUSÕES .....                                                                                | 64 |
| 5. REFERÊNCIAS .....                                                                               | 64 |
| CAPÍTULO 3 – Produção de etanol e otimização do processo utilizando grãos de sorgo granífero ..... | 69 |
| RESUMO .....                                                                                       | 69 |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                | 70 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                        | 71 |
| 2.1. Coleta das amostras .....                                                                     | 71 |
| 2.2. Análise de resultados .....                                                                   | 71 |

|                                                                                                                             |                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.3.                                                                                                                        | Caracterizações dos farelos de grãos de sorgo granífero roxo e branco .....                   | 71 |
| 2.4.                                                                                                                        | Tratamento enzimático dos farelos de grãos de sorgo granífero roxo e branco<br>72             |    |
| 2.5.                                                                                                                        | Processo fermentativo dos farelos .....                                                       | 74 |
| 2.5.1.                                                                                                                      | Identificação e isolamento da levedura .....                                                  | 74 |
| 2.5.2.                                                                                                                      | Multiplicação e preparo da solução estoque de levedura.....                                   | 74 |
| 2.5.3.                                                                                                                      | Fermentação alcoólica dos farelos .....                                                       | 75 |
| 3.                                                                                                                          | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                   | 76 |
| 3.1.                                                                                                                        | Caracterização dos farelos de grãos de sorgo granífero roxo e branco .....                    | 76 |
| 3.2.                                                                                                                        | Tratamento enzimático dos farelos.....                                                        | 78 |
| 3.3.                                                                                                                        | Fermentação alcoólica dos farelos .....                                                       | 84 |
| 4.                                                                                                                          | CONCLUSÕES .....                                                                              | 88 |
| 5.                                                                                                                          | REFERÊNCIAS .....                                                                             | 88 |
| CAPÍTULO 4 – Sorgo sacarino como matéria-prima com alto potencial para produção<br>de xarope, vinagre, vodca e uísque ..... |                                                                                               | 90 |
| RESUMO.....                                                                                                                 |                                                                                               | 90 |
| 1.                                                                                                                          | INTRODUÇÃO .....                                                                              | 90 |
| 2.                                                                                                                          | MATERIAL E MÉTODOS .....                                                                      | 91 |
| 2.1.                                                                                                                        | Coleta das amostras.....                                                                      | 91 |
| 2.2.                                                                                                                        | Caracterizações físico-químicas dos xaropes .....                                             | 93 |
| 2.3.                                                                                                                        | Caracterizações físico-químicas dos vinhos, vodca e uísque .....                              | 96 |
| 2.4.                                                                                                                        | Caracterizações físico-químicas dos vinagres de sorgo sacarino e vinagres<br>comerciais ..... | 96 |
| 3.                                                                                                                          | RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                                   | 97 |
| 3.1.                                                                                                                        | Caracterização do xarope de sorgo sacarino .....                                              | 97 |
| 3.2.                                                                                                                        | Caracterização do vinho, vodca e uísque de sorgo sacarino .....                               | 98 |

|                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.3. Caracterização dos vinagres de sorgo sacarino e comparação com outros vinagres comerciais..... | 100 |
| 4. CONCLUSÕES .....                                                                                 | 105 |
| 5. REFERÊNCIAS .....                                                                                | 105 |

## AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE SORGO E CARACTERIZAÇÃO DOS PRODUTOS ALIMENTÍCIOS E BEBIDAS

**RESUMO** – O cultivo da cultura do sorgo vem crescendo de modo significativo, objetivando o uso desta planta para a produção de etanol combustível e alguns alimentos (xarope, bebidas alcoólicas e vinagre). Sendo assim, a presente pesquisa foi separada em três partes, a primeira teve como objetivo: I) Avaliar o desempenho do sorgo sacarino (Malibu J53) com e sem o uso de fitorregulador etefom no cultivo da matéria-prima, utilizando-se duas estirpes de leveduras (PEDRA-2 e FT-858L) no processo fermentativo para determinar o potencial de produção de etanol combustível e a interação entre o regulador vegetal e os inóculos (Capítulo 2). Neste estudo, foi observado que a aplicação do etefom não restringiu a formação da panícula, apenas retardou o crescimento, resultando em uma panícula 20 centímetros menor e diminuição da massa úmida em  $6,8 \text{ t.ha}^{-1}$ , com pequeno acréscimo no acúmulo de açúcares. Dentre as leveduras utilizadas no processo fermentativo, a PE-2 apresentou maior adequação ao mosto de sorgo sacarino e ao uso do etefom. Com relação a produtividade de etanol, o uso do etefom resultou em redução da produtividade de etanol em  $711,92 \text{ L.ha}^{-1}$ , embora não significativa, com produtividade de até  $5387,26$  litros de etanol.ha<sup>-1</sup>. Conclui-se que o uso do etefom no cultivo do sorgo sacarino Malibu J53 não favorece uma melhor qualidade químico-tecnológica do caldo e aumento na produção de etanol, com melhor desempenho fermentativo para a levedura PE-2. A segunda parte, teve como objetivo: II) Avaliação e viabilização do processo enzimático e fermentativo, em escala laboratorial, objetivando o uso de grãos de sorgo granífero (branco e roxo) como matéria-prima para produção de etanol (Capítulo 3). De acordo com o tratamento enzimático realizado, a hidrólise do amido foi quase total na primeira etapa com o tratamento físico e uso do TSC ( $\alpha$ -amilase). Durante o processo fermentativo, foram obtidas as concentrações de etanol de 5,28% para o farelo roxo e 6,98% para o farelo branco. Conclui-se que os farelos roxo e branco de sorgo granífero apresentam elevado potencial para aplicabilidade para processos fermentativos e o tratamento físico (temperatura) e a enzima  $\alpha$ -amilase apresentam potencial para ser utilizados para os farelos. A terceira parte, teve como objetivo: III) Avaliação e caracterização físico-química de produtos alimentícios oriundos de uma biorrefinaria exclusiva de sorgo sacarino, a qual produziu xarope, vodca, uísque e vinagres de sorgo sacarino (claro e escuro), realizado na Heckemeyer Biorefinery nos EUA (Capítulo 4). O xarope de sorgo sacarino apresenta concentração total de 48,07% de açúcares, além disso, elevada concentração de antioxidantes comparado a outros xaropes comerciais. Foram observados para a vodca e uísque a concentração de etanol de 46,67% e 48,61%, respectivamente. Ambos os vinagres produzidos de sorgo sacarino (claro e escuro) destacam-se comparados a outros vinagres comerciais de diferentes matérias-primas, decorrente a elevada concentração de antioxidantes e corantes fenólicos. Sendo assim, conclui-se que o xarope e vinagre produzidos destacam-se perante produtos comerciais com elevada concentração de antioxidantes e a necessidade de mais estudos para comparar a vodca e uísque de sorgo sacarino com outros destilados.

**Palavras-chave:** *Sorghum bicolor* L. Moench, Etefom, Fermentação alcoólica, *Saccharomyces cerevisiae*, Fermentação acética.

## EVALUATION OF ETHANOL PRODUCTION USING SORGHUM AND CHARACTERIZATION OF FOOD AND BEVERAGE PRODUCTS

**ABSTRACT** – The cultivation of the sorghum crop has been growing significantly, aiming at the use of this plant for the production of fuel ethanol and some foods (syrup, alcoholic beverages, and vinegar). Therefore, the present research was separated into three parts, the first part has the goal: I) Evaluate the performance of sweet sorghum (Malibu J53) with and without the use of phytohormone etefom in the cultivation of the raw material, using two yeasts (PEDRA-2 and FT-858L) in the fermentation process to determine the potential for fuel ethanol production and the interaction between the plant regulator and the yeast (Chapter 2). In this study, it was observed that the application of etefom did not restrict panicle formation, it only retarded growth, resulting in a 20 cm smaller panicle and a decrease in wet mass of 6.8 t.ha<sup>-1</sup>, with a small increase in the accumulation of sugars. Among the yeasts used in the fermentation process, PE-2 was more suitable for sweet sorghum broth and for the use of etefom. Regarding ethanol productivity, the use of etefom resulted in a reduction in ethanol production of 711.92 L.ha<sup>-1</sup>, although not significant, with a productivity of up to 5387.26 liters of ethanol.ha<sup>-1</sup>. It is concluded that the use of etefom in the cultivation of sweet sorghum Malibu J53 does not favor a better chemical-technological quality of the juice and not increase in ethanol production, with better fermentation performance for the PE-2 yeast. The second part has the goal: II) Evaluation and viabilization of the enzymatic and fermentation process, on a laboratory scale, aiming the use of grain sorghum (white and purple) as raw material for ethanol production (Chapter 3). According to the enzymatic treatment performed, starch hydrolysis was almost complete in the first stage with the physical treatment and use of TSC ( $\alpha$ -amylase). During the fermentation process, had ethanol concentrations of 5.28% for purple flour and 6.98% for white flour. It is concluded that the purple and white flours from grain sorghum have a high potential for applicability for fermentation processes and the physical treatment (temperature) and the enzyme  $\alpha$ -amylase have the potential to be used for the flours. The third part has the goal: III) Evaluation and physico-chemical characterization of food products from an exclusive sweet sorghum biorefinery, which produced syrup, vodka, whiskey, and vinegar (light and dark), held at Heckemeyer Biorefinery in the USA (Chapter 4). The syrup has a total concentration of 48.07% of sugars and a high concentration of antioxidants compared to other commercial syrups. The ethanol concentration of 46.67% and 48.61%, respectively, was observed for vodka and whiskey. Both vinegar produced from sweet sorghum (light and dark) stand out compared to other commercial vinegar from different raw materials, due to the high concentration of antioxidants and phenolic dyes. Therefore, it is concluded that the syrup and vinegar produced stand out in relation to commercial products with a high concentration of antioxidants and had observed the necessity of further studies to compare vodka and whiskey from sweet sorghum with other spirits.

**Keywords:** *Sorghum bicolor* L. Moench; Etefom; Alcoholic fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*; Acetic fermentation.

## CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

### 1. INTRODUÇÃO

A cultura do sorgo vem crescendo de modo significativo em diferentes países, sendo estes classificados em cinco genótipos: granífero, forrageiro, sacarino, biomassa e vassoura. O cultivo do sorgo sacarino vem sendo realizado para ser utilizado como matéria-prima para produção de diversos produtos, tal como bioetanol combustível e alguns alimentos (xarope, bebidas alcoólicas e vinagre). Esta cultura é semelhante à cana-de-açúcar, apresentando ciclo anual. Pertence à família *Poaceae*, originária do continente africano, sendo cultivada em inúmeras regiões do planeta (Kolling, 2012). Apresenta colmos com capacidade de armazenar açúcares, com teores de sólidos solúveis totais na faixa de 16 a 23% apresentando elevada produtividade agrícola, chegando até 70 t.ha<sup>-1</sup> (EMBRAPA, 2012; Umakanth et al., 2019).

Para a produção de etanol combustível, essa cultura vem sendo estudada principalmente no Brasil, a qual pode ser implementada em áreas de reforma de canaviais, ampliando em 30 dias o período de safra, sem a necessidade da expansão de novas áreas, considerando a principal região produtora (sudeste). A cultura é totalmente mecanizável, empregando os mesmos equipamentos utilizados para a cana-de-açúcar, do preparo de solo, colheita e processamento. O fornecimento de matéria-prima de qualidade poderá ser incrementado, entre os meses de janeiro e abril, quando a disponibilidade de etanol sofre redução significativa em função do período da entressafra. Segundo Ratnavathi et al. (2010), a cultura pode apresentar rendimentos de etanol de 3 a 6 mil L.ha<sup>-1</sup>.

A produção de biomassa e o armazenamento de açúcares fermentescíveis nos colmos do sorgo estão diretamente relacionados ao rendimento dos produtos. Neste sentido, a melhoria dessas características pode destacar o uso do sorgo sacarino, assim como uma maior competitividade com outras matérias-primas. Esta cultura possui como comportamento fisiológico a formação da inflorescência e/ou grãos que armazenam os carboidratos produzidos pela planta que poderiam ser acumulados nos

colmos e transformados em etanol na indústria (Fortes et al., 2016). Espera-se que o uso de fitorreguladores no cultivo dos colmos possa inibir o florescimento e a produção de grãos, possibilitando aumento da produtividade em  $L\cdot ha^{-1}$ .

O sorgo sacarino apresenta algumas características químico-tecnológicas similares a cana-de-açúcar, as quais podemos ponderar a utilização de ambas as matérias-primas em uma tecnologia de processamento similar. Entretanto, deve-se destacar que com alguns parâmetros diferentes possam resultam em interferências no processamento e consequentemente nos rendimentos industriais. Sendo assim, há a necessidade de mais estudos da cadeia produtiva para o processamento do sorgo sacarino, tal como a escolha da estirpe de levedura a ser utilizada no processo fermentativo, com o objetivo de produtividade máxima desta cultura.

Além disso, dentre os possíveis genótipos encontrados para o sorgo, o do tipo granífero vêm ganhando destaque. Esta matéria-prima vem sendo utilizada como substituto do milho em rações animais, principalmente para aves e suínos (Coelho et al., 2002). Outra forma de utilizar os grãos é para produção de farinhas. Sendo estas, com elevada concentração de compostos amiláceos. O amido é um carboidrato composto principalmente por glicose com ligações glicosídicas. Através de um tratamento enzimático, estas farinhas ricas em açúcares poderiam ser utilizadas como matéria-prima para processos fermentativos e/ou suplementação de açúcares junto ao processamento de outras culturas, tal como o sorgo sacarino. Em estudos apresentados por Cole et al. (2019), estas farinhas apresentam elevado potencial de uso.

Ao mesmo tempo, esse potencial de produção do sorgo sacarino e granífero criou o cenário para a introdução destas culturas como matéria-prima para produção de farinhas, alimentos e bebidas alcoólicas, tais como adoçante líquido comercial (xarope), uísque, vodka e vinagre, todos com alto potencial de produção em altos volumes pelas modernas práticas agrícolas e de processamento. Além disso, estes produtos alimentícios apresentam-se com maior potencial lucrativo para as destilarias, melhor qualidade de ingredientes nutracêuticos, que estão associados a prevenção ao envelhecimento, câncer, doenças neurodegenerativas e doenças cardiovasculares (Eggleston et al., 2020; Pelofske 2017; Singleton et al., 1999).

Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi dividido em três:

I) Avaliar o desempenho do sorgo sacarino (Malibu J53) com e sem o uso de fitorregulador no cultivo da matéria-prima, utilizando-se duas estirpes de leveduras (PEDRA-2 e FT-858L) no processo fermentativo para determinar o potencial de produção de etanol combustível e a interação entre o regulador vegetal e os inóculos (Capítulo 2).

II) Avaliação e viabilização do processo enzimático e fermentativo, em escala laboratorial, objetivando o uso de grãos de sorgo granífero (branco e roxo) como matéria-prima para produção de etanol (Capítulo 3).

III) Avaliação e caracterização físico-química de produtos alimentícios oriundos de uma biorrefinaria exclusiva de sorgo sacarino, a qual produziu xarope, vodca, uísque e vinagres de sorgo sacarino (claro e escuro), realizado na Heckemeyer Biorefinery nos EUA (Capítulo 4).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Sorgo**

O sorgo é planta da família *Poaceae*, do gênero *Sorghum*, e da espécie *Sorghum bicolor* (L.) Moench. É originária da África, provavelmente da região da Etiópia e do Sudão. Foi inicialmente difundida na África, depois Ásia e mais recentemente nas Américas, possui uma elevada atividade fotossintética por ser uma planta C4, com alta conversão de energia solar em energia química. No Brasil, a projeção de produção para a safra 2020/21 é de 2,6 milhões de toneladas produzidas, incremento de 5,4% em comparação a safra anterior (CONAB, 2021).

A planta é composta por caule do tipo colmo, dividido em nós, entrenós e folhas ao longo de toda a planta. Apresenta inflorescência, com formação da panícula e o fruto, o qual é uma cariopse ou grão seco, possuindo espécies anuais e espécies vivazes. A planta pode atingir de 1 a 4 metros de altura, tendo vários caules por pé (perfilhamento), em que cada um dos colmos apresenta inflorescência terminal. A flor é constituída por espiga séssil, fértil, acompanhada por duas espiguetas estéreis pedunculadas, característica do gênero (Diniz, 2010). Existem diferentes tipos de sorgo, sendo estes sacarino, granífero, forrageiro, vassoura e biomassa (Ribas, 2007).

## **2.2. Sorgo granífero**

O sorgo granífero possui grande importância econômica no Brasil, sendo utilizado como substituto do milho em rações animais, principalmente para aves e suínos, proporcionando, redução significativa nos custos de produção em virtude do preço do sorgo ser de 20% a 30% inferior ao do milho (Coelho et al., 2002).

O aumento na produção deste sorgo no Brasil ocorreu principalmente pelo aumento do consumo per capita de proteína animal (Castro, 2014). O grande impulso veio do aumento do consumo da carne de frango, acarretando assim crescimento no consumo de rações balanceadas, tornando o sorgo muito valorizado pelas indústrias de rações (Coelho et al., 2002).

Outra forma de utilizar os grãos de sorgo é por meio da produção de farinha, que pode substituir parcialmente a farinha de trigo na confecção de vários produtos. Sendo estas, com elevada concentração de compostos amiláceos. O amido é um carboidrato composto principalmente por glicose com ligações glicosídicas. Através de um tratamento enzimático, estas farinhas ricas em açúcares poderiam ser utilizadas como matéria-prima para processos fermentativos e/ou suplementação de açúcares junto ao processamento de outras culturas, tal como o sorgo sacarino. Em estudos apresentados por Cole et al. (2019), estas farinhas apresentam elevado potencial de uso.

## **2.3. Sorgo sacarino**

O sorgo sacarino se caracteriza por apresentar ciclo fenológico curto (90 a 120 dias) quando alcança maturação fisiológica, sendo capaz de produzir teores de açúcares próximos aos de cana-de-açúcar em uma escala de tempo menor (Silveira et al., 2011). O ponto de maturação é variável dependendo da variedade utilizada, algumas apresentam parâmetros ótimos de processamento entre 118 a 135 dias após a semeadura, como apresentado nos estudos de Freita et al. (2014).

O sorgo sacarino destaca-se por ser uma cultura que apresenta comportamento rústico, bem adaptado a ambientes extremos de estresses abióticos, tais como temperatura do ar e umidade do solo (Uribe e Ticianeli, 2014). Pode ser cultivada em diversas regiões do mundo, pois possui baixo custo de implantação, propaga-se através de sementes e permite o uso de colheita mecanizada (Borém et

al., 2014). Apresenta caule compostos por nós, entrenós ou internódios, que sustentam as folhas e inflorescências. A altura da planta é variável dependendo do genótipo considerado, correlacionado ao número e comprimento dos entrenós, gerando inflorescência terminal tipo panícula, que é rica em amido. A panícula produz grãos (sementes), o fruto é uma cariopse ou grão seco (Diniz. 2010; Magalhães et al., 2010). Ao longo do desenvolvimento do sorgo sacarino, a planta apresenta determinadas etapas as quais são pertencentes ao seu ciclo fenológico. Para o sorgo sacarino, estes estágios fenológicos de desenvolvimento são: Emborrachamento ( $\pm$  60 d.a.s.), florescimento ( $\pm$  70 d.a.s.), grão leitoso ( $\pm$  85 d.a.s.), grão pastoso ( $\pm$  100 d.a.s.), grão farináceo ( $\pm$  115 d.a.s.), grão duro ( $\pm$  125 d.a.s.) e senescência ( $\pm$  135 d.a.s.) (Teixeira, 2017). Períodos estes que caracterizam o acúmulo de sólidos solúveis totais e respectivamente os açúcares nos colmos, ocorrendo a maior porcentagem máxima entre os estágios pastoso e farináceo.

Segundo May et al. (2012), dentre diferentes genótipos de sorgo sacarino, a composição do caldo extraído no ponto de maturação dos colmos a concentração de 15 a 19% de sólidos solúveis totais, composto por 8 a 13% de sacarose e 1 a 3% de açúcares redutores (0,5 a 2% de glicose e 0,5 a 1,5% de frutose). Sendo assim, a composição do caldo extraído pode apresentar concentração de açúcares totais entre 12% a 17%, resultando em uma pureza de 60 a 75%. Diferente da cana-de-açúcar, o sorgo sacarino apresenta uma menor porcentagem de sacarose e maior de glicose e amido (até 0,5%).

O amido, presente no caldo de sorgo sacarino e grãos, é um carboidrato composto por dois polissacarídeos: a amilose e a amilopectina. A amilose possui cadeia simples composta de ligações alfa-1,4. Já a amilopectina, além de ligações alfa-1,4 (linear), possui também ligações alfa-1,6 (ramificada). Com a utilização de enzimas, através de um tratamento adequado, o amido é degradado em cadeias menores de carboidratos, gerando maltose e glicose, os quais são fermentescíveis pela levedura para formação do etanol (Porto, 2011).

No Brasil, a cultura do sorgo sacarino vem se destacando como uma opção de matéria-prima para a produção de etanol, podendo ser cultivado em áreas que não são adequadas para a cana-de-açúcar ou plantio em áreas de reforma de canaviais devido ao seu ciclo curto e à sua capacidade produtiva (região centro-sul). Atualmente

há diversos genótipos disponíveis no mercado. Dentre eles, destaca-se o sorgo sacarino Malibu J53.

Este genótipo apresenta ciclo que possibilita colheita entre 90 e 120 dias, tolerante ao calor e seca e resistente as mudanças climáticas. Apresenta um elevado acúmulo de açúcares nos colmos, o qual resulta em baixo custo de produção de etanol por litro, período útil de industrialização de até 25 dias, e capacidade média para produção de etanol de 4.400 L.ha<sup>-1</sup> (Costa, 2017). Além disso, em estudos conduzidos por Lozano et al. (2018) avaliando este mesmo genótipo, apresenta potencial teórico positivo de incrementação da produção de etanol de até 500 litros por hectare quando associado o cultivo dos colmos com o uso de fitorregulador.

#### **2.4. Fitorregulador**

Os fitorreguladores, ou reguladores vegetais, são compostos de fontes naturais ou sintéticas, de composições similares a hormônios vegetais. Estes compostos atuam como sinalizador químico no controle do desenvolvimento da planta, acelerando a maturação de culturas, promovendo melhorias na qualidade da matéria-prima.

Segundo Han et al. (2011), alguns reguladores vegetais, tal como o etefom (ácido (2-cloroetil) fosfônico), precursor do etileno, apresentam potencial de utilização na cultura do sorgo sacarino. Estes são rotineiramente utilizados na cultura de cana-de-açúcar, objetivando a inibição do florescimento, com consequente elevação do teor de açúcares no início da safra.

Considerando o emprego do etefom na cultura do sorgo sacarino, este composto atuaria como sinalizadores químicos no controle do desenvolvimento fisiológico da planta, suplementando hormônios vegetais quando seus níveis endógenos estão baixos, para mudar o curso de desenvolvimento da planta, retardando o crescimento e consequentemente inibindo a formação da panícula.

Para a cultura do sorgo sacarino, o acúmulo de açúcares se inicia na fase reprodutiva, sendo que o florescimento, a formação e enchimento de grãos atuam como drenos do acúmulo de açúcares ocasionando diminuição deste teor (Caputo et al., 2005). Sendo assim, a inibição da formação da panícula poderia resultar em maior

acúmulo de açúcares nos colmos e conseqüentemente aumentar a produtividade de litros de etanol por hectare, podendo fazer parte do protocolo de produção da cultura.

Estudos realizados por Silva et al. (2016), avaliando o desponte manual das panículas em três genótipos (CV147, CV198 e BRS508), mostraram que ao inibir o florescimento da panícula de forma física, ocorre a formação de novos brotamentos laterais, que conseqüentemente consomem os açúcares, proporcionando uma matéria-prima com menores teores de Sólidos Solúveis Totais, ART e levando a menores rendimentos fermentativos.

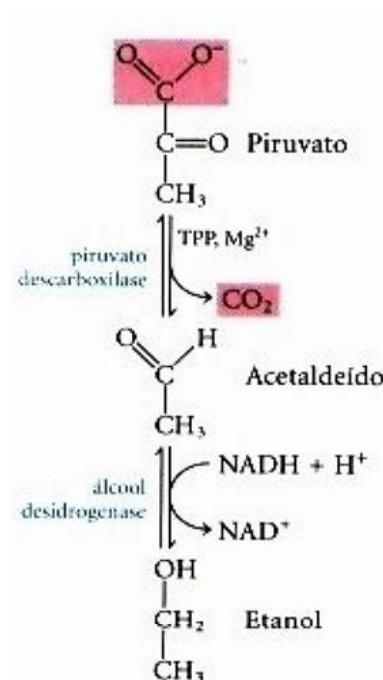
Contudo, em estudos conduzidos por Fortes et al. (2016) e Lozano et al. (2018), avaliando o uso de reguladores vegetais na cultura do sorgo, observaram incremento no Brix, teor de fibra, aumento na produtividade de colmos, aumento na produtividade de etanol e redução do acamamento dos colmos. Sendo assim, a avaliação do emprego de fitorregulador, pode proporcionar melhorias na qualidade e/ou produtividade e seus reflexos no processo fermentativo são imprescindíveis para maximização dos rendimentos agroindustriais.

## **2.5. Processo fermentativo**

Uma das principais etapas do processo produtivo do bioetanol é a fermentação alcoólica, mediada pelo gênero *Saccharomyces spp.* Esta ocorre através da oxidação anaeróbica parcial da glicose, pela ação das leveduras, resultando na formação de etanol, CO<sub>2</sub>, além de outros metabólitos, como glicerol, ácidos orgânicos e álcoois superiores (Nelson e Cox, 2014).

Resumidamente, o processo fermentativo ocorre com a oxidação da glicose (C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>) no citoplasma da levedura em 10 reações enzimáticas, resultando em 2 moléculas de ácido pirúvico (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>O<sub>3</sub>), 2 NADH<sup>+</sup>H<sup>+</sup> e 2 ATPs. Posteriormente, decorrente a levedura ser um microrganismo facultativo a produção do etanol ocorrerá em condições anaeróbicas ou sob o Efeito Crabtree, o qual é o responsável pela repressão do metabolismo respiratório da levedura através da elevada concentração de açúcares na solução, fazendo-a realizar o catabolismo da glicose por vias fermentativas, mesmo em condições aeróbicas. Sendo assim, o ácido pirúvico é então destinado a via fermentativa (Figura 1), que dependendo do organismo têm como acceptor final de elétrons o etanol, lactato, acetato, entre outros (Yokoya, 1995).

Na fermentação alcoólica a glicose é convertida em piruvato pela glicólise, e o piruvato é convertido em etanol e  $\text{CO}_2$  em um processo de dois passos. No primeiro passo, o piruvato sofre descarboxilação formando acetaldeído, catalisado pela piruvato descarboxilase. No segundo passo, por ação da álcool desidrogenase, o acetaldeído é reduzido a etanol com o NADH fornecendo poder redutor (Nelson e Cox, 2014).



**Figura 01.** Representação do processo fermentativo sob condições anaeróbicas para produção de etanol. (Fonte: Nelson e Cox (2014)).

Deve-se destacar que para que ocorra a fermentação, é imprescindível a padronização do caldo extraído quanto a determinadas condições físico-químicas, resultando no mosto. Essas adequações são: açúcares (16 - 18° Brix), pH (4,5), acidez titulável (1 a 2  $\text{g.L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), nutrientes e temperatura (28-32°C) (Lima, 2019) objetivando a maximização da eficiência fermentativa, resultando na produção de 10 a 12% (v.v<sup>-1</sup>) de etanol (Furlan, 2012).

Geralmente, utilizando-se caldo de cana, é padronizada a concentração de sólidos solúveis nos mostos de 16 a 18%, chegando até 22% (Furlan, 2012). A variação é decorrente da pureza de açúcares da solução a qual está sendo preparado o mosto.

A padronização da concentração dos açúcares diferente das recomendadas pode acarretar diferentes consequências: mosto muito diluído resulta em uma fermentação rápida e completa dos açúcares, porém com baixo teor alcoólico, alto crescimento de massa microbiana e favorecimento de multiplicação de microrganismos contaminantes presentes no meio. Quando utilizado mosto concentrado, este apresenta fermentações demoradas, alto teor alcoólico (o que pode chegar a inibir a atividade fermentativa), maior probabilidade de contaminação do processo devido ao maior tempo para metabolização dos açúcares, produção de outros compostos não desejáveis, por exemplo a de glicerol, e fermentações incompletas (perdas de açúcares).

O pH, outro parâmetro importante do mosto, é padronizado em 4,5 (podendo variar até 5,5) e monitorado ao longo do processo fermentativo. Este parâmetro é essencial para a padronização do pH ideal da levedura e consequentemente em condições desfavoráveis aos microrganismos contaminantes (Gibson et al., 2007).

A acidez total do mosto deve ser de até  $2 \text{ g.L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ , sendo esta concentração ideal para que não ocorra interferências negativas na fisiologia do microrganismo. Este parâmetro auxilia no controle de microrganismos contaminantes com alta sensibilidade a meios ácidos. Entretanto, o mosto ideal deve apresentar baixa acidez para que não ocorra “estresse” na levedura e que não crie condições para bactérias acidófilas (Lima, 2019).

As concentrações de nutrientes (macro e micronutrientes), são de suma importância, estes estão diretamente ligados a fisiologia das leveduras, afetando a multiplicação, crescimento celular, reações enzimáticas e eficiência fermentativa. Os teores recomendados de nutrientes são 50 a 150 ppm de Nitrogênio, 200 a 300 ppm de Fósforo, 700 a 1300 ppm de Potássio, 200 ppm de Magnésio, 1 a 5 ppm de Zinco e 1 a 5 ppm de Manganês. A falta ou excesso desses compostos pode prejudicar o processo fermentativo ou até inibir a fermentação alcoólica, além de acarretar maior produção de compostos secundários, tais como álcool amílico, isoamílico, propílico, butílico, dentre outros (Amorim et al., 1989).

A temperatura do mosto e do processo fermentativo, outro parâmetro importante, deve estar entre 28 a 32°C, sendo esta a faixa ideal da *Saccharomyces cerevisiae*. Este fator interfere diretamente sobre o metabolismo das leveduras,

estando relacionado também com a tolerância ao etanol e a composição da membrana celular das leveduras (Rose e Harrison, 1993).

Processos fermentativos conduzidos utilizando a cana-de-açúcar atualmente apresentam uma tecnologia consolidada através dos anos. Entretanto, para o sorgo sacarino, esta tecnologia não está consolidada, embora seja recomendável que se conheça bem a composição da matéria-prima, para que as adequações e ajustes possam ser realizadas, antecedendo à inoculação dos microrganismos fermentadores, tendo em vista que o que se pretende é obter maiores rendimentos e eficiências de processo.

Estudos conduzidos por Masson et al. (2015) e Gomes (2014), comparando o processamento de genótipos de sorgo sacarino com cana-de-açúcar, indicam que o sorgo sacarino apresenta características químico-tecnológicas semelhantes a cana. Entretanto, foram observados rendimentos inferiores de 6,13% e 9,9%, respectivamente, para o rendimento fermentativo e 0,99% e 0,6% do teor alcoólico, respectivamente. Estas diferenças evidenciam a necessidade de maiores estudos referentes ao processamento, correlacionando o microrganismo utilizado aos novos genótipos objetivando melhores eficiências e teor alcoólico, resultando em maior produtividade de etanol.

## **2.6. Leveduras**

*Saccharomyces cerevisiae* destaca-se como a espécie de levedura mais amplamente explorada comercialmente para a produção de etanol, principalmente por serem de fácil manejo e por converterem rapidamente açúcares em etanol, ácidos orgânicos e gás carbônico (Ward, 1991). É classificada filogeneticamente na ordem Saccharomycetales, pertencente à família Saccharomycetaceae e gênero *Saccharomyces*. São microrganismos unicelulares, ascomicéticos, anaeróbicos facultativos, apresentam crescimento vegetativo por brotamento, células globulosas, elipsóides ou alongadas de 3-8  $\mu\text{m}$  x 5-10  $\mu\text{m}$ , podendo aparecer individualmente ou em pequenos agrupamentos (Reis et al., 2017).

Diferentes estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* têm sido utilizadas nas usinas sucroalcooleiras, selecionadas especificamente por apresentarem desenvolvimento fisiológico ótimo quando inoculadas em mosto de cana-de-açúcar para a produção de

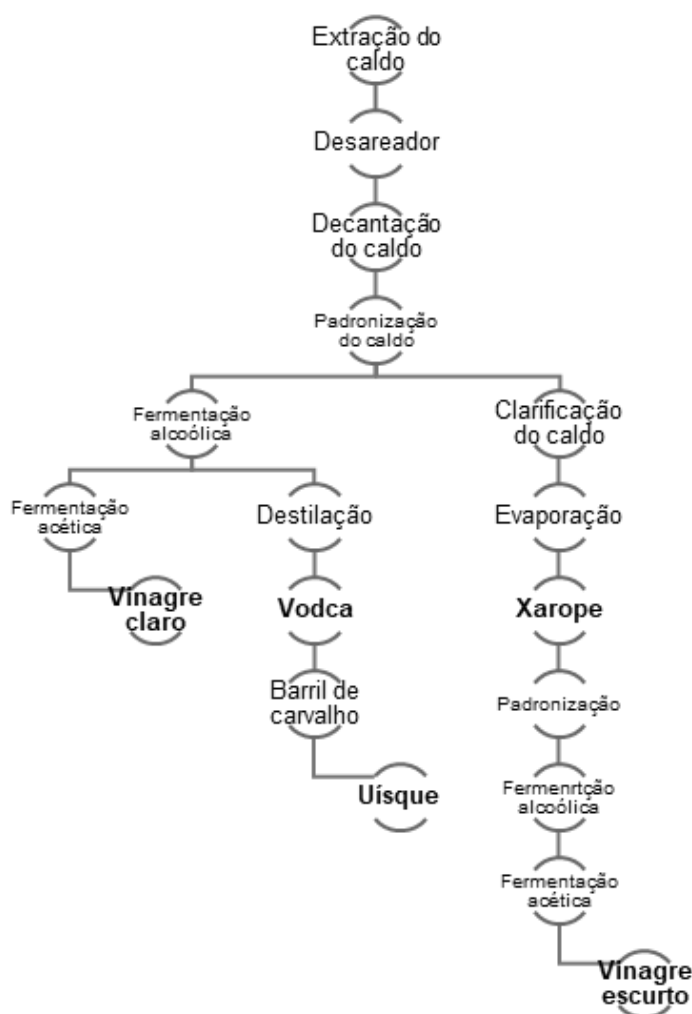
etanol. Dentre as diferentes leveduras selecionadas, destacam-se a PEDRA-2 e a FT-858L (LNF, 2020). Segundo Fermentec (2020) e LNF (2020), ambas apresentam alta eficiência fermentativa, alta adaptabilidade a diferentes mostos e elevada resistência a concentrações de ácidos. Apesar disso, estas ainda não foram amplamente estudadas quanto a fermentação em mosto de sorgo sacarino.

## **2.7. Processamento do sorgo sacarino em larga escala**

Heckemeyer Biorefinery é a primeira biorrefinaria em larga escala exclusiva de sorgo sacarino dos EUA e uma das pioneiras na produção de conhecimento técnico para o processamento desta matéria-prima. Está localizada na cidade de Sikeston, no estado de Missouri – EUA. Os genótipos selecionados de sorgo sacarino são cultivados na própria fazenda, sendo estes M81E, Honey Drop, Dale e KN Morris. A capacidade de processamento da fábrica é de 90 toneladas.hora.<sup>-1</sup>, com área de plantio de aproximadamente de 48,56 hectares, com produção de até 90.849,883 litros.dia<sup>-1</sup> de xarope à 80% Brix.

O processamento dos diferentes genótipos de sorgo sacarino ocorre em meados de agosto, de acordo com o período útil de industrialização (P.U.I.), o qual é determinado com o acúmulo de Sólidos Solúveis Totais (Brix). A colheita é realizada com uma colhedora de forragem, com padronização do tamanho dos pedaços de até 6,35cm.

Na safra de 2018, a Heckemeyer Biorefinery objetivou a colheita para a produção dos seguintes produtos derivados do sorgo sacarino: xarope, vodca, vinagre e uísque. O fluxograma da produção adotado pela biorrefinaria está representado na Figura 02.



**Figura 02.** Representação do fluxograma do processamento do sorgo sacarino na Heckemeyer Biorefinery, objetivando a produção de xarope, vodca, uísque e vinagres (claro e escuro). (Fonte: Arquivo pessoal)

Os estudos conduzidos por Eggleston et al. (2020) o xarope de sorgo sacarino contém elevada concentração de compostos antioxidantes fenólicos, incluindo os flavonoides. Por esta razão, esses produtos destacam-se quanto a qualidade, considerando-se os ingredientes nutraceuticos, em comparação com outros xaropes comerciais, de diferentes matérias-primas. Consequentemente, estes ingredientes permitem alegações de saúde e bem-estar para tal alimento específico, sendo que estes compostos estão associados a prevenção ao envelhecimento, câncer, doenças neurodegenerativas e doenças cardiovasculares (Pelofske, 2017). Sendo assim, acredita-se que decorrente da composição do xarope, espera-se uma alta concentração destes compostos em outros produtos derivados do sorgo sacarino.

Sendo assim, há a necessidade de uma melhor caracterização dos componentes presentes nos outros produtos para certificação de que derivados de sorgo sacarino serem mais nutritivos.

Na safra de 2018, além do cultivo dos genótipos de sorgo sacarino, foram cultivados na fazenda Heckemeyer dois genótipos de sorgo granífero, sendo estes os do tipo roxo e branco. O objetivo do plantio foi a produção dos grãos dos genótipos escolhidos afim de produzir farelo de grãos de sorgo para comercialização. Assim como, avaliar o potencial do uso dos mesmos como fonte de açúcar, através de um tratamento enzimático, para suplementação da fermentação alcoólica. Como já apresentado o potencial do uso do farelo roxo em estudos conduzidos por Cole et al. (2019).

### 3. REFERÊNCIAS

Amorim HV, Oliveira AJ, Zago EA, Basso LC, Gallo CR (1989) Processos de fermentação alcoólica, seu controle e monitoramento. Piracicaba: Fermentec/Cebtec/Esalq, 145p.

Borém A, Pimentel L, Parrella R (2014) Sorgo do plantio à colheita. Viçosa: Editora UFV, 275p.

Caputo MM, Silva MA, Rosseto R, Beacuclarir EGF (2005) O uso de maturadores químicos na cana-de-açúcar. **Pesquisa & Tecnologia**.

Castro FMR (2014) Potencial Agrônômico e Energético de Híbridos de Sorgo Biomassa. 80 f. Dissertação (Mestrado acadêmico) – UFV, Lavras.

Coelho AM, Cruz JC, Pereira Filho IA. (2002) Rendimento de milho no Brasil? Chegamos ao máximo? In: Simpósio rotação soja/milho no plantio direto. Piracicaba, São Paulo.

Cole MR, Eggleston G, Gaines DK, Heckemeyer M (2019) Development of an enzyme cocktail to bioconvert untapped starch in sweet sorghum processing by-products: Part I. **Industrial Crops and Products** 133:142–150.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento (2021) Acompanhamento da Safra Brasileira: Grãos. Brasília: Conab.

Costa P (2017) Híbridos de sorgo Etanol Malibu da NexSteppe apresentam alta performance em áreas comerciais. Disponível em:

<<https://www.grupocultivar.com.br/noticias/hibridos-de-sorgo-etanol-malibu-da-nexsteppe-apresentam-alta-performance-em-areas-comerciais>>. Acesso em: 20 fev. 2021.

Diniz GMM (2010) **Produção de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench): aspectos gerais**. 97 f. Dissertação (Mestrado em Melhoramentos Genético de Plantas) – UFRPE, Recife.

Eggleston G, Boue S, Bett-garber K, Verret C, Triplett A, Bechtel P (2020) Phenolic contents, antioxidant potential and associated colour in sweet sorghum syrups compared to other commercial syrup sweeteners. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 1–11.

EMBRAPA - Empresa brasileira de pesquisa agropecuária (2012) Inserção e expansão do sorgo sacarino para produção agroindustrial de etanol 1G âmbito do plano agrícola e pecuário 2013/14. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 120 p.

FERMENTEC (2020) Leveduras com habilidade melhorada que apresentam alta persistência e dominância. Disponível em: <<https://www.fermentec.com.br/capa.asp?p=259>>. Acesso em: 25 fev. 2021.

Fortes C, Carreira SAM, Donegá, M. (2016) Aplicação de etefom em sorgo sacarino (*Sorghum bicolor*) visando qualidade tecnológica da matéria-prima. In: ANAIS DO X CONGRESSO NACIONAL DA STAB, Anais. Disponível em: [http://www.stab.org.br/congresso\\_nacional\\_stab/ed\\_atual.html](http://www.stab.org.br/congresso_nacional_stab/ed_atual.html)

Freita LA de, Costa GHG, Masson I dos S, Ferreira OE, Mutton MA, Mutton MJR (2014) Chemico-technological parameters and maturation curves of sweet sorghum genotypes for bioethanol production. **African Journal of Agricultural Research** 9:3638–3644.

Furlan, RMC (2012) **Seleção de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico a partir da biodiversidade encontrada em destilarias brasileiras**. 126 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – USP, Piraciaba.

Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JPR, Powell CD, Smart KA (2007) Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiology Reviews** 31:535–569.

Gomes SCMP (2014) **Produção de etanol utilizando mix de sorgo sacarino e cana-de-açúcar em processo de maturação**. 51 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – UNESP, Jaboticabal.

Han LP, Wang X, Guo X, Rao MS, Steinberger Y, Cheng X, Xie GH (2011) Effects of plant growth regulators on growth, yield and lodging of sweet sorghum. **Research on Crops** 12:372–382.

Kolling DF (2012) **Determinação da localização de uma planta multi-produto no Estado do Mato Grosso com base na eficiência da produção de etanol**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) – UFRGS: Porto Alegre

Lima U de A (2019) *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos* (Volume 3). 2º ed. São Paulo: Clucher, 745 p.

LNF - Latino-americana (2020) *Leveduras selecionadas*. Disponível em: <[https://lnf.com.br/downloads/leveduras\\_selecionadas.pdf](https://lnf.com.br/downloads/leveduras_selecionadas.pdf)>. Acesso em: 25 fev. 2021.

Lozano E do V, Blanco LM, Alcantara GU, Nogueira LC, Ciaramello S, Costa GHG (2018) Effect of application of flowering inhibitor on sweet sorghum. **African Journal of Agricultural Research** 13:196–201.

Magalhães RT, Gonçalves LC, Borges I, Rodrigues JAS, Fonseca JF (2010) Produção e composição bromatológica de vinte e cinco genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 62:747–751.

Masson I dos S, Costa GHG, Roviero JP, Freita LA de, Mutton MA, Mutton MJR (2015) Produção de bioetanol a partir da fermentação de caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar. **Ciência Rural** 45:1695–1700.

May A, Durães FOM, Pereira Filho IA, Schaffert RE, Parrella RA da C (2012) Inserção e expansão do sorgo sacarino para produção agroindustrial de etanol 1G âmbito do plano agrícola e pecuário 2013/14. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 120 p.

Nelson DL, Cox MM (2014) *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed.

Pelofske E (2017) Formulating for beverage innovation. **Prepared Foods** 85–88.

Porto P de D (2011) *Tecnologia de fabricação de malte: uma revisão*. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia de alimentos) – UFRGS: Porto Alegre.

Ratnavathi CV, Suresh K, Kumar BSV, Pallavi M, Komala VV, Seetharama N (2010) Study on genotypic variation for ethanol production from sweet sorghum juice. **Biomass and Bioenergy** 34: 947–952

Reis VR, Antonangelo ATBF, Bassi APG, Colombi D, Ceccato-antonini SR (2017) Bioethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae* characterised by microsatellite and stress resistance. **Brazilian Journal of Microbiology** 48:268–274.

Ribas PM (2017) *Importância econômica Cultivo do Sorgo*. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 4 p.

Rose AH, Harrison JS (1993) *The Yeasts: Yeast Technology*. London: Academic Press. 620 p.

Silva AF, Ferreira OE, Costa GHG, Montijo NA, Mutton MA, Mutton MJR (2016) Technological quality of sweet sorghum processed without panicles for ethanol production. **Australian Journal of Crop Science** 10:1578–1582.

Silveira DC da, Fontes MM de, Silva BA, Dantas JP, Silveira DC da, Cavalcanti MT (2011) Caracterização físico-químico do melado de sorgo granífero sacarino [*Sorghum biolor* (L) Moench]. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável** 6:216–219.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-raventós RM (1999) Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology** 299:152–178.

Teixeira TPM (2017) Estudo da maturação e ponto de colheita em materiais de sorgo destinados à bioenergia. 73 f. Dissertação (Mestrado) – UFV, Lavras.

Umakanth AV, Kumar AA, Vermerris W, Tonapi VA (2019) Sweet Sorghum for Biofuel Industry. **Breeding Sorghum for Diverse End Uses**, p. 255–270.

Uribe RAM, Ticianeli LCS (2014) Influência do estande na produtividade de sorgo sacarino. **Diálogos e Ciência** 34:10–12.

WARD OP (1991) Biotecnología de la Fermentación. Zaragoza, Espanha: Acribia.

Yokoya F (1995) Fabricacao da aguardente de cana. Campinas: Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello.

## **CAPÍTULO 2 – Uso de fitorregulador no cultivo do sorgo sacarino e a interação com diferentes leveduras para produção de etanol**

**RESUMO** – O uso de fitorreguladores na cultura do sorgo sacarino apresentam potencial para ser utilizado na cultura do sorgo sacarino para inibir a formação da panícula, resultando em maior acúmulo de açúcares nos colmos e consequentemente o aumento do rendimento. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a produção de etanol combustível utilizando o genótipo Malibu J53 com e sem o uso de fitorregulador no cultivo da matéria-prima avaliando-se o cultivo, assim como a produção de bioetanol empregando-se duas estirpes de leveduras (PE-2 e FT-858L). Neste estudo, o genótipo sorgo sacarino Malibu J53 foi caracterizado quanto ao cultivo dos colmos, processamento, fermentação e composição do destilado final. De acordo com os resultados, a aplicação do etefom não restringiu a formação da panícula, apenas retardou o crescimento, resultando em uma panícula 20 centímetros menor e redução da produção de massa úmida em 6,8 t.ha<sup>-1</sup>, com pequeno acréscimo no acúmulo de açúcares. Dentre as leveduras utilizadas no processo fermentativo, a PE-2 apresentou maior adequação ao mosto de sorgo sacarino e ao uso do etefom. Entretanto, foi observado para a levedura FT-858L viabilidade celular inferior e reflexos negativos ao uso do regulador vegetal, com menor viabilidade dos brotos, menor metabolização de glicose e maior produção de ácidos e glicerol. Com relação a produtividade de etanol, o uso do etefom resultou em redução da produtividade de etanol em 711,92 L.ha<sup>-1</sup>, embora não significativa, com produtividade de até 5387,26 litros de etanol.ha<sup>-1</sup>. Conclui-se que o uso do fitorregulador etefom no cultivo do sorgo sacarino Malibu J53 não favorece uma melhor qualidade químico-tecnológica do caldo e aumento na produção de etanol, com melhor desempenho fermentativo para a levedura PE-2.

**Palavras-chave:** *Sorghum bicolor* L. Moench, Malibu J53, Etefom, Fermentação alcoólica, Bicombustíveis, Leveduras.

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com o preço do petróleo, o futuro esgotamento dos combustíveis fósseis e seu impacto negativo sobre o ambiente, tem impulsionado o desenvolvimento de novas tecnologias para produção de combustíveis alternativos, como o etanol (UNICA, 2021). Combustível de fonte renovável, com menores emissões de gases (CO<sub>2</sub>), o etanol é um ótimo substituto aos combustíveis derivados de origens fósseis.

Mundialmente as principais matérias-primas utilizadas para a produção desse combustível são o milho e a cana-de-açúcar. Com as perspectivas futuras de necessidade do etanol, será necessário o aumento da produção e uso de culturas complementares (Niphadkar et al., 2017). Dentre as possíveis matérias-primas, destaca-se o sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), que apresenta características agroindustriais economicamente promissoras. O sorgo sacarino, assemelha-se à cana-de-açúcar por armazenar açúcares nos colmos, com teores de sólidos solúveis na faixa de 16 a 23% apresentando elevada produtividade agrícola (Umakanth et al., 2019). Esta cultura possui como comportamento fisiológico a formação da inflorescência e/ou grãos que armazenam os carboidratos produzidos pela planta que poderiam ser acumulados nos colmos e transformados em etanol na indústria (Fortes et al., 2016).

Espera-se que o uso de fitorreguladores no cultivo dos colmos iniba o florescimento e a produção de grãos possibilitando aumento do rendimento em L.ha<sup>-1</sup>. Os fitorreguladores são compostos sintéticos que atuam como sinalizadores químicos no controle do desenvolvimento fisiológico da planta, suplementando hormônios vegetais quando seus níveis endógenos estão baixos para mudar o curso de desenvolvimento da planta (Han et al., 2011; Magalhães et al., 2010). Segundo Han et al. (2011), alguns reguladores vegetais, tal como o etefom, (ácido (2-cloroetil) fosfônico), utilizados na cultura de cana-de-açúcar em variedades e regiões que apresentam maior propensão a inflorescência, apresentam potencial a ser utilizado na cultura do sorgo sacarino para inibir a formação da panícula, resultando em um maior acúmulo de açúcares nos colmos e consequentemente o aumento do rendimento.

Dentre os híbridos disponíveis no mercado, o sorgo sacarino Malibu J53 destaca-se por apresentar características promissoras para a produção de etanol e do uso de fitorregulador para inibição da inflorescência (Lozano et al., 2018). Entretanto, os estudos apresentados são rendimentos teóricos. Sendo assim, o sorgo sacarino por apresentar características diferentes da cana-de-açúcar, tecnologia de processo consolidada, há a necessidade de mais estudos da cadeia produtiva, tal como a escolha da estirpe de levedura a ser utilizada no processo fermentativo.

Cabe mencionar que estes microrganismos apresentam desenvolvimento fisiológico ótimo quando inoculados em mosto de cana-de-açúcar, sendo um dos principais microrganismos utilizados nas destilarias as leveduras PEDRA-2 e a FT-858L (LNF, 2020). Masson et al. (2015) observaram redução na eficiência fermentativa de 7% em mosto de sorgo sacarino, comparado a mosto de cana-de-açúcar sem o uso do fitorregulador. Esta diferença, junto ao emprego de uma nova matéria-prima associada ao cultivo o fitorregulador, evidencia a necessidade de estudos referentes a leveduras adequadas para o processo fermentativo.

Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o cultivo e o processamento do sorgo sacarino Malibu J53 com e sem o uso de fitorregulador, utilizando-se duas estirpes de leveduras (PEDRA-2 e FT-858L) no processo fermentativo para determinar o potencial de produção de etanol combustível e a interação entre o regulador vegetal e os inóculos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Delineamento experimental**

No presente trabalho, foram utilizados três diferentes delineamentos ao longo da condução do experimento, embora em todas as etapas foram utilizadas 6 repetições. Sendo assim, os delineamentos experimentais foram:

- A avaliação do cultivo do sorgo sacarino e características químico-tecnológica do caldo extraído foram em blocos casualizados num esquema de parcelas subdivididas. Os tratamentos principais foram a aplicação do fitorregulador (com

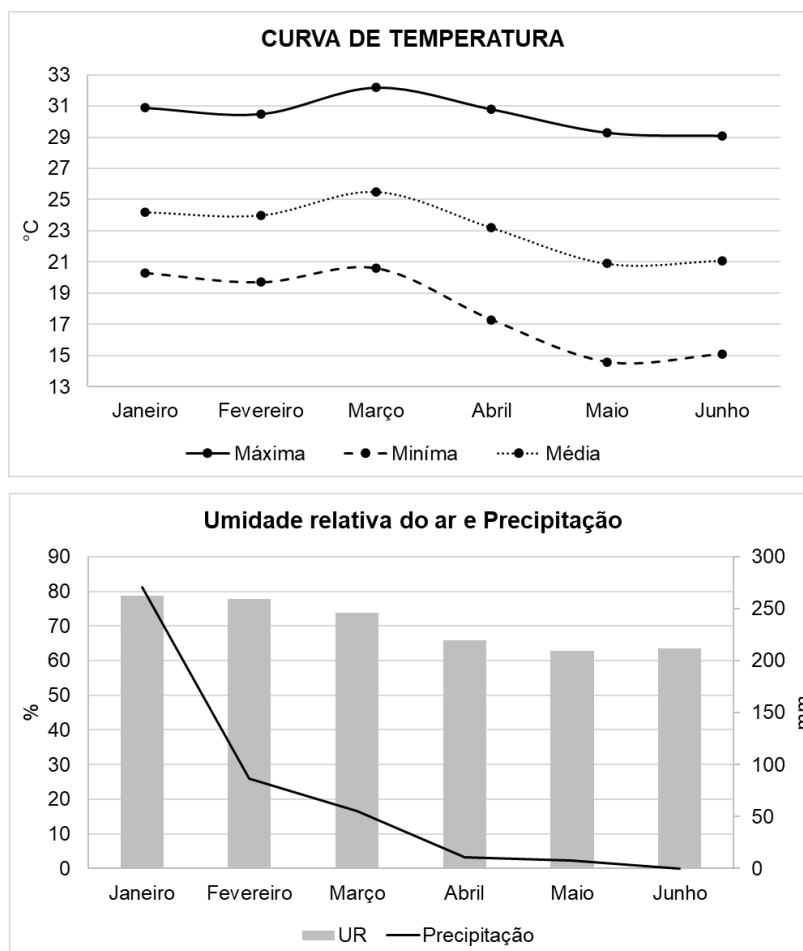
e sem etefom) e os secundários as épocas de amostragem (63, 77, 91, 105, 119 e 133 dias após a semeadura (d.a.s.)).

- O delineamento experimental do processamento dos colmos até o preparo do mosto foi o de blocos casualizados, avaliando a aplicação do fitorregulador (com e sem etefom).
- O delineamento experimental do processo fermentativo e etapas subsequentes foram em blocos casualizados num esquema de parcelas subdivididas. Os tratamentos principais foram a aplicação do fitorregulador (com e sem etefom) e os secundários duas cepas de leveduras empregadas no processo fermentativo (FT-858L e PE-2).

## **2.2. Instalação e condução do projeto**

O sorgo sacarino Malibu J53 foi cultivado na safra de 2018, na área experimental da FCAV/UNESP de Jaboticabal-SP do Departamento de Produção Vegetal-UNESP (21°14'30.5"S 48°17'53.6"O), sendo o processamento dos colmos realizado nos Laboratórios de Tecnologia do Açúcar e do Álcool. A área experimental é classificada como Latossolo vermelho-escuro, eutrófico, "A" moderado com textura argilosa e relevo predominantemente suave ondulado a ondulado, de acordo com a classificação de Andrioli e Centurion (1999). O clima característico da área é Cwa, segundo Köppen (1948), sendo que as condições climáticas observadas durante a realização do ensaio encontram-se na Figura 01.

Previamente ao plantio, a área continha palhada de sorgo que foi eliminada quimicamente utilizando Glifosato na dose de 4,8 L.ha<sup>-1</sup>. A cultura foi instalada no sistema de plantio direto realizado no dia 11 de janeiro de 2018, utilizando-se semeadora de 5 linhas, com a distribuição de 8 a 9 sementes por metro linear e espaçamento de 0,45 metros entre linhas, com profundidade de 2 a 3 cm, para obter estande de 130.000 a 145.000 plantas.ha<sup>-1</sup>. A partir da análise do solo (Tabela 01) realizado no Laboratório de Análise do Solo da FCAV, foram calculadas e realizadas a adubação de plantio que constituiu da aplicação de 8-28-16 Kg.ha<sup>-1</sup> de N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O, mais micronutrientes.



**Figura 01.** Curva de temperatura em °C (Máxima, média e mínima), umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) durante o período de cultivo do sorgo sacarino. Fonte: Estação agroclimatologia do Departamento de Ciências Exatas da FCAV/UNESP Jaboticabal – SP. Safra 2018.

**Tabela 01.** Características químicas do solo da área experimental, antes da implantação da cultura do sorgo. Jaboticabal – SP, safra 2018.

| Camada | pH                   | M.O.                  | P<br>(resina)          | S | Ca | Mg | K   | Al | H+Al<br>SMP               | SB   | CTC  | v   | m |
|--------|----------------------|-----------------------|------------------------|---|----|----|-----|----|---------------------------|------|------|-----|---|
| (cm)   | (CaCl <sub>2</sub> ) | (g.dm <sup>-3</sup> ) | (Mg.dm <sup>-3</sup> ) |   |    |    |     |    | (mmolc.dm <sup>-3</sup> ) |      |      | (%) |   |
| 0-25   | 5,7                  | 24                    | 16                     | 5 | 24 | 13 | 2,6 | 1  | 24                        | 40,3 | 64,0 | 63  | 2 |
| 25-50  | 5,4                  | 18                    | 10                     | 5 | 22 | 10 | 2,6 | 1  | 25                        | 34,3 | 59,5 | 58  | 2 |

M.O.- Matéria orgânica, P – Fósforo, S- Enxofre, Ca – Cálcio, K – Potássio, Al- Alumínio, H+Al- Acidez potencial, SB- Soma de bases, CTC-Capacidade de troca de cátions, V%- saturação por bases, m% saturação por alumínio.

A emergência das plantas ocorreu a partir do dia 16 de janeiro de 2018, sendo necessário realizar o replantio parcial em 22 de janeiro de 2018 para corrigir pequenas

falhas de germinação. Aos 34 dias após a semeadura (d.a.s.) foi realizada a adubação de cobertura aplicando-se 350 kg.ha<sup>-1</sup> da fórmula 8-28-16 de N-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O.

Aos 64 d.a.s., no estágio inicial de desenvolvimento das panículas e emissão da folha bandeira, foi realizada a aplicação do fitorregulador (etefom), 1,25 L.ha<sup>-1</sup> de Ethrel 720®, com pulverizador costal pressurizado a CO<sub>2</sub>, com pressão 30 psi (pound square inch), temperatura de 32°C, umidade de 55,5% e vento de 1,2 m.s<sup>-1</sup>. Durante o desenvolvimento do experimento, o tratamento fitossanitário foi priorizado, objetivando-se garantir a sanidade da cultura. Para controle de formigas e pragas que surgissem na área no período inicial de desenvolvimento da cultura, foram realizadas aplicações periódicas de inseticida Regente 800 WG. Para o controle da lagarta do cartucho e de pulgões, aplicou-se 250 mL.ha<sup>-1</sup> de Ampligo aos 20 e 57 d.a.s.. Realizou-se ao longo de todo o ciclo da cultura a capina manual, mantendo-se a cultura livre de plantas infestantes.

O processamento do sorgo sacarino ocorreu aos 105 d.a.s., período que foi estabelecido pelo acompanhamento da cultura, dentro do Período Útil de Industrialização (PUI).

### **2.3. Avaliação da matéria-prima e características químico-tecnológica do caldo extraído**

Durante o desenvolvimento do genótipo de sorgo sacarino Malibu J53, aos 63, 77, 91, 105, 119 e 133 d.a.s. foram avaliados 10 colmos por parcela, considerando-se os seguintes aspectos biométricos e químico-tecnológicos:

- Altura de planta (cm): distância do nível do solo à interseção da folha bandeira;
- Diâmetro da base do colmo (cm): medida da circunferência do terço inferior do colmo;
- Diâmetro da ponta do colmo (cm): medida da circunferência do terço superior do colmo;
- Tamanho da panícula (cm): Medida da distância entre o último nó e a ponta da panícula;
- Massa úmida (t.ha<sup>-1</sup>): Extrapolação do peso de 10 colmos para o estande avaliado em cada parcela;

- Massa seca ( $\text{t.ha}^{-1}$ ): Extrapolação do peso de 10 colmos para o estande avaliado em cada parcela;
- Teor de umidade da planta (%): Duas plantas foram coletadas, sendo posteriormente secas em estufa com circulação forçada de ar à  $65^{\circ}\text{C}$  por 48 horas, ou até peso constante;
- Sólidos Solúveis Totais do caldo (Brix - %) (CTC, 2009).
- Açúcares Redutores Totais do caldo (ART - %) (CTC, 2009).
- Açúcares Redutores do caldo (AR - %) (CTC, 2009).
- Acidez total do caldo ( $\text{g.L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ ) (CTC, 2009).
- pH (Leitura direta em pHmetro digital).
- Teor de amido do caldo ( $\text{ppm.Brix}^{-1}$ ) (CTC, 2009).

## **2.4. Processamento dos colmos**

### **2.4.1. Extração do caldo**

Após a colheita, foram removidas as folhas dos colmos, submetidos à extração do caldo em moenda de laboratório e os caldos filtrados através de uma membrana de nylon com porosidade de 60 mesh. Os caldos obtidos foram quantificados quanto aos teores de Sólidos Solúveis Totais, Acidez Total, Pureza (CTC, 2009), Teor de Amido (Solúvel, Insolúvel e Total) (Cole et al., 2016), Compostos Fenólicos Totais (CFT) (Singleton et al., 1999) e pH.

As concentrações dos açúcares (Glicose, Frutose, Sacarose) foram determinadas por HPLC utilizando o equipamento Thermo Scientific Dionex ICS 5000+, usando hidróxido de sódio 100mM (NaOH) e acetato de sódio 0-300mM (NaOAc) em 100mM de gradiente de NaOH ao longo de 10 minutos. Os eluentes foram preparados diluindo NaOAc de qualidade HPLC e solução de NaOH a 50% p.p.<sup>-1</sup> com água deionizada a 18 M $\Omega$ . Os compostos foram separados em coluna analítica da Thermo Scientific CarboPac PA 100 (250x2mm) e em coluna de proteção (50 x 2 mm) a  $30^{\circ}\text{C}$ . Caudal =  $0,4 \text{ mL.min}^{-1}$ . Volume de injeção de 10  $\mu\text{L}$ . A detecção foi realizada com célula detectora eletroquímica equipada com eletrodos de referência Au e Ag/AgCl. Um autoinjeter/amostrador automático refrigerado Dionex AS-AP foi usado para evitar a degradação de açúcares nas amostras enquanto se aguardava a

injeção na coluna. O software de cromatografia Thermo Scientific Chromeleon 7 foi usado para acumular várias amostras e padrões. Os açúcares foram identificados comparando os tempos de retenção com os padrões. Os açúcares totais são representados pela soma dos açúcares quantificados na presente metodologia descrita.

#### **2.4.2. Clarificação do caldo e preparo do mosto**

Os caldos extraídos dos sorgos foram submetidos ao ajuste de pH 6,0 (com adição de hidróxido de cálcio 6º Bé) e 16% de sólidos solúveis totais. Estes foram aquecidos até fervura, resfriados a 80°C e transferidos para sistema de decantação em provetas, com adição de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de polieletrólito aniônico comercial. Concluída a decantação, o caldo clarificado foi sifonado e quantificado quanto Sólidos Solúveis Totais, Acidez Total (CTC, 2009), Açúcares (Glicose, Frutose, Sacarose e Total) (Descrito no tópico 2.4.1.), Teor de Amido (Solúvel, Insolúvel e Total) (Cole et al., 2016), CFT (Singleton et al., 1999) e pH.

Os caldos clarificados foram padronizados a 16% Sólidos Solúveis Totais, pH 4,5 (adição de ácido sulfúrico) e temperatura a 32°C±1°C, originando o mosto. Estes foram quantificados quanto a Acidez Total (CTC, 2009), Açúcares (Glicose, Frutose, Sacarose e Total) (Descrito no tópico 2.4.1.) e CFT (Singleton et al., 1999).

#### **2.4.3. Processo fermentativo**

##### **2.4.3.1. Adaptação dos inóculos**

As cepas de leveduras PEDRA-2 (PE-2) e FT-858L foram obtidas de forma liofilizada. O processo de adaptação ocorreu todo de forma separada, iniciando com a inoculação de 200 gramas em erlenmeyer de 2 litros, contendo 500mL de solução de glicose a 0,5%, mantendo o frasco em shaker com agitação contínua (150 rpm) e temperatura controlada de 32°C, por 30 minutos. Posteriormente, foi acrescentado 1L de mosto de sorgo sacarino com a concentração de 2% de Sólidos Solúveis Totais, pH 4,5 (corrigido com ácido sulfúrico) e os frascos foram mantidos no shaker nas mesmas condições (32°C e 150 rpm).

Quando a concentração de sólidos solúveis apresentou valor  $\leq 1\%$ , o processo de adaptação foi fracionado em novos frascos, dobrando o volume de mosto (2L) na concentração de 4% de sólidos solúveis totais. Em seguida, novamente quando os sólidos solúveis totais das soluções apresentaram valor  $\leq 1\%$  foram acrescentados o dobro do volume e o dobro da concentração de Sólidos solúveis totais (8% e 12%).

#### **2.4.3.2. Fermentação**

O processo fermentativo foi conduzido utilizando-se o sistema de batelada alimentada fracionada, no qual, utilizando-se erlenmeyers de 500 mL, adicionando-se 125 mL de mosto e os inóculos, para adaptação das leveduras. Posteriormente, após meia hora da primeira alimentação, foram adicionados mais 125 mL de mosto, obtendo-se um volume total de 250 mL com concentração dos inóculos a  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Ambas leveduras, previamente a inoculação no mosto de sorgo sacarino, apresentavam-se com viabilidade média de 92,08% para a PEDRA-2 e 91,22% para a FT-858L. Os frascos utilizados para o processo fermentativo foram mantidos em shaker com agitação e temperatura controlada, 150 rpm e 32°C, respectivamente.

A fermentação foi finalizada quando o substrato apresentou valores de Sólidos Solúveis Totais  $\leq 1$ , com tempo médio de 15 horas. Previamente a inoculação, início da fermentação (40 minutos depois da segunda alimentação) e final do processo fermentativo, as leveduras foram avaliadas quanto a viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos (Lee et al., 1981).

#### **2.4.4. Tratamento enzimático**

Em virtude a elevada quantidade de compostos amiláceos na composição do sorgo sacarino foi realizado o tratamento enzimático com duas diferentes enzimas. A alfa-amilase (Termamyl 2x – Novozymes) foi utilizada no decantador durante o processo de clarificação na concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup>. As condições ideais para elevada eficiência enzimática desta enzima é em soluções de pH 6-7 e temperatura de 80°C (Novozymes, 2020a). Condições estas estabelecidas no presente estudo.

A segunda enzima empregada no presente estudo foi a beta-amilase (Amiloglucosidade - Novozymes), utilizada no processo fermentativo na concentração

de 2 mg.L<sup>-1</sup>. As condições ideais para elevada eficiência enzimática desta enzima é em soluções de pH 4,5 e temperatura de 60°C (Novozymes, 2020b).

#### **2.4.5. Vinho**

Posteriormente ao final da fermentação, o vinho foi centrifugado a 2.500g/5°C, durante 5 minutos, obtendo-se o vinho delevedurado. Este foi quantificado quanto ao teor de Açúcares Residuais (Glicose, Frutose, Sacarose e Total) (Descrito no tópico 2.4.1.), Acidez Total (CTC, 2009), CFT (Singleton et al., 1999), Teor de Glicerol (Fermentec, 2003), pH e calculado o Rendimento de Etanol (Fernandes, 2011).

Para determinação do Teor Alcoólico, os vinhos foram destilados em microdestilador de álcool modelo TE-012 Tecnal, utilizando-se 60 mL de vinho e recuperando 20 mL do destilado (concentrado 3 vezes). Posteriormente, os destilados foram submetidos a medição do teor alcoólico através da leitura direta em densímetro digital e os resultados foram divididos por 3 para conversão do valor referente a concentração no vinho.

A concentração de etanol (% v.v<sup>-1</sup>) foi obtida através de cromatografia líquida Agilent 1200, usando água deionizada de 18 MΩ como eluente durante 25 minutos. O composto foi separado na coluna analítica Bio-Rad Aminex HPX-87P (300 x 7,8 mm) e nas colunas de proteção de remoção de cinzas (30 x 4,6 mm) a 80°C. Caudal = 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. Volume de injeção = 20 µL. A detecção foi com um detector de índice de refração a 45°C. Um autoinjeter/amostrador automático refrigerado foi usado para evitar a degradação das amostras enquanto se aguardava a injeção na coluna. O software de cromatografia Agilent OpenLab foi usado para acumular várias amostras e padrões. O etanol foi quantificado pela comparação dos tempos de retenção com os padrões.

#### **2.4.6. Análise dos destilados**

Os vinhos foram destilados em microdestilador de álcool modelo TE-012 Tecnal, com um volume de 60 mL recuperando 20 mL do destilado (concentrado 3 vezes) e encaminhados para a Usina São Martinho (Pradópolis – SP), para a quantificação da concentração dos Aldeídos, Metanol, Isopropanol, n-Propanol,

Acetato de etila, iso-Butanol, n-Butanol, Acetaldeído, iso-Amílico, Álcoois superiores totais, Acetona, Ciclohexano, Benzeno e Crotonaldeído, expressos em mg.L<sup>-1</sup>.

Estes foram determinados por cromatógrafo gasoso utilizando o equipamento Agilent Technologies 7890A, coluna capilar Agilent 19091 V – 433, 30,0 m x 250 µm x 1,40 µm nominal. Um autoinjeter/amostrador automático foi usado, com injeção de 10µL de cada amostra com a rampa de temperatura de 60°C, 80°C e 200°C, empregando-se como gás de arraste ar sintético. O software de cromatografia Agilent OpenLab foi usado para acumular várias amostras e padrões. Os componentes foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com os padrões.

## **2.5. Análise dos resultados**

Os resultados foram submetidos a análise de variância pelo teste F e análise de regressão polinomial, as médias comparadas segundo o teste de Tukey (5%), utilizando o programa AgroEstat (Barbosa e Madonado Junior, 2015).

# **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

## **3.1. Avaliação da matéria-prima e características químico-tecnológica do caldo extraído**

Os resultados obtidos da avaliação do sorgo sacarino Malibu J53 com e sem utilização de fitorregulador no cultivo dos colmos e as características químico-tecnológicas dos caldos extraídos (63, 77, 91, 105, 119 e 133 d.a.s.) estão apresentados nas Tabelas 02 a 04 e Figuras 02 a 09.

De acordo com a análise de variância para a altura dos colmos, Tabela 02, os resultados apresentaram interação significativa entre o uso do fitorregulador no cultivo dos colmos do sorgo sacarino com as épocas de avaliação, o desdobramento está representado na Figura 02. O uso do fitorregulador no cultivo no sorgo sacarino apresentou interferência no desenvolvimento fisiológico da planta, com redução da altura dos colmos quando utilizado o etefom. O genótipo Malibu J53 na ausência deste regulador vegetal apresentou uma altura significativa superior (3,35 m) comparado

com a presença deste (2,90 m). Após os 90 d.a.s foi o período em que iniciou a estabilização do crescimento quando se aplicou etefom e, após 110 d.a.s. quando não se aplicou.

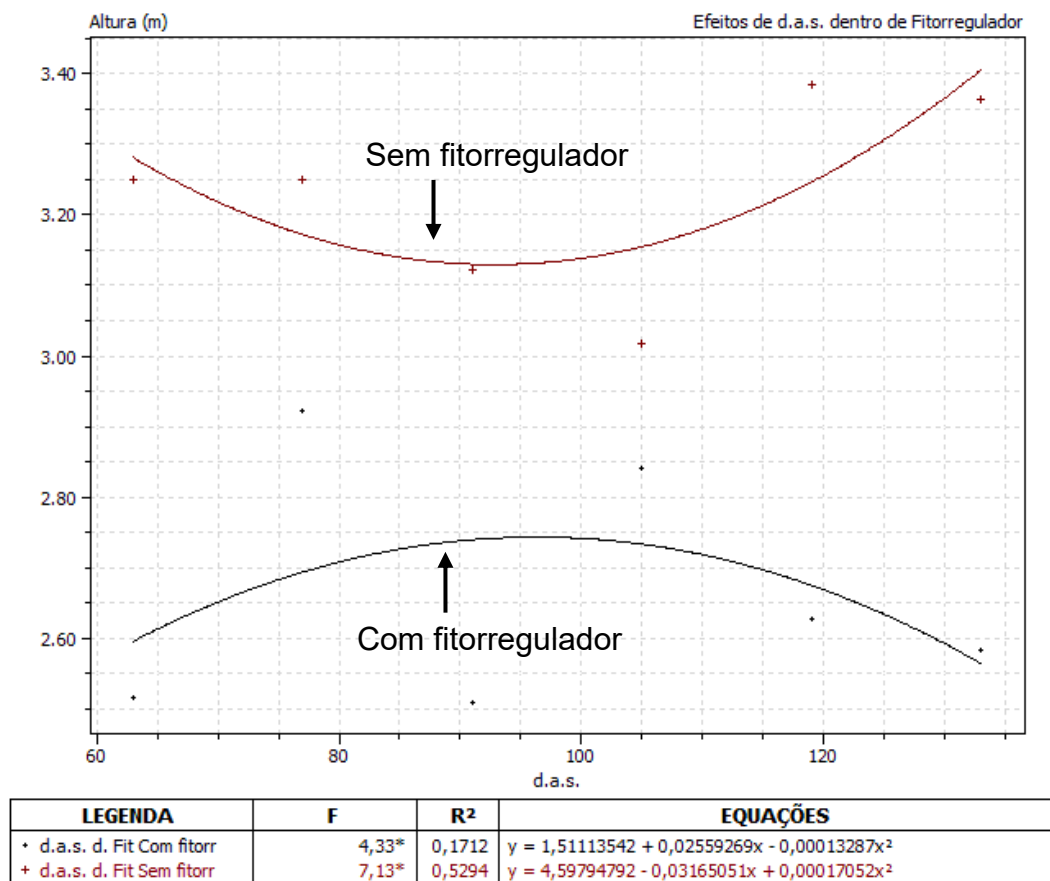
**Tabela 02.** Valores médios e resultados da análise de variância para Altura do Colmo, Diâmetro da Base, Diâmetro da Ponta e Tamanho da Panícula, para os tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

|                           | Altura (m) | D. Base (cm) | D. Ponta (cm) | Tamanho da Panícula (cm) |
|---------------------------|------------|--------------|---------------|--------------------------|
| <b>Sorgo Sacarino (S)</b> |            |              |               |                          |
| Com etefom                | 2,66B      | 1,89A        | 1,17A         | 13,44B                   |
| Sem etefom                | 3,23A      | 1,83A        | 0,94A         | 32,47A                   |
| Teste F                   | 242,02**   | 3,72ns       | 0,91ns        | 179,46**                 |
| CV                        | 5,21       | 7,81         | 9,57          | 26,24                    |
| DMS                       | 0,09       | 0,08         | 0,61          | 3,65                     |
| <b>Épocas (E)</b>         |            |              |               |                          |
| 63                        | 2,88AB     | 1,91AB       | 0,90AB        | 22,08AB                  |
| 77                        | 3,08A      | 1,79B        | 0,67B         | 24,08A                   |
| 91                        | 2,81B      | 1,77B        | 0,70B         | 16,75B                   |
| 105                       | 2,93AB     | 1,77B        | 2,54A         | 26,41A                   |
| 119                       | 3,00AB     | 2,07A        | 0,80AB        | 25,00A                   |
| 133                       | 2,97AB     | 1,86B        | 0,74B         | 23,41A                   |
| Teste F                   | 3,10*      | 5,63**       | 3,08*         | 5,45**                   |
| CV                        | 6,35       | 9,27         | 13,56         | 21,81                    |
| DMS                       | 0,22       | 0,20         | 1,74          | 6,05                     |
| Int. S x E                | 5,49**     | 2,28ns       | 0,62ns        | 6,93**                   |

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) e ns: não significativo ( $p > 0,05$ ).

Esse fato é decorrente da utilização do fitorregulador, o qual apresenta a alteração da morfologia da planta, o qual reduz, restringindo o crescimento da panícula e diminuindo o crescimento dos colmos, através do comprimento dos entrenós (Silva et al., 2016), resultando em plantas cerca de 45 cm menores. Em

estudos conduzidos por Lozano et al. (2018), o genótipo Malibu J53 também apresentou redução da altura dos colmos quando foi tratado com etefom.

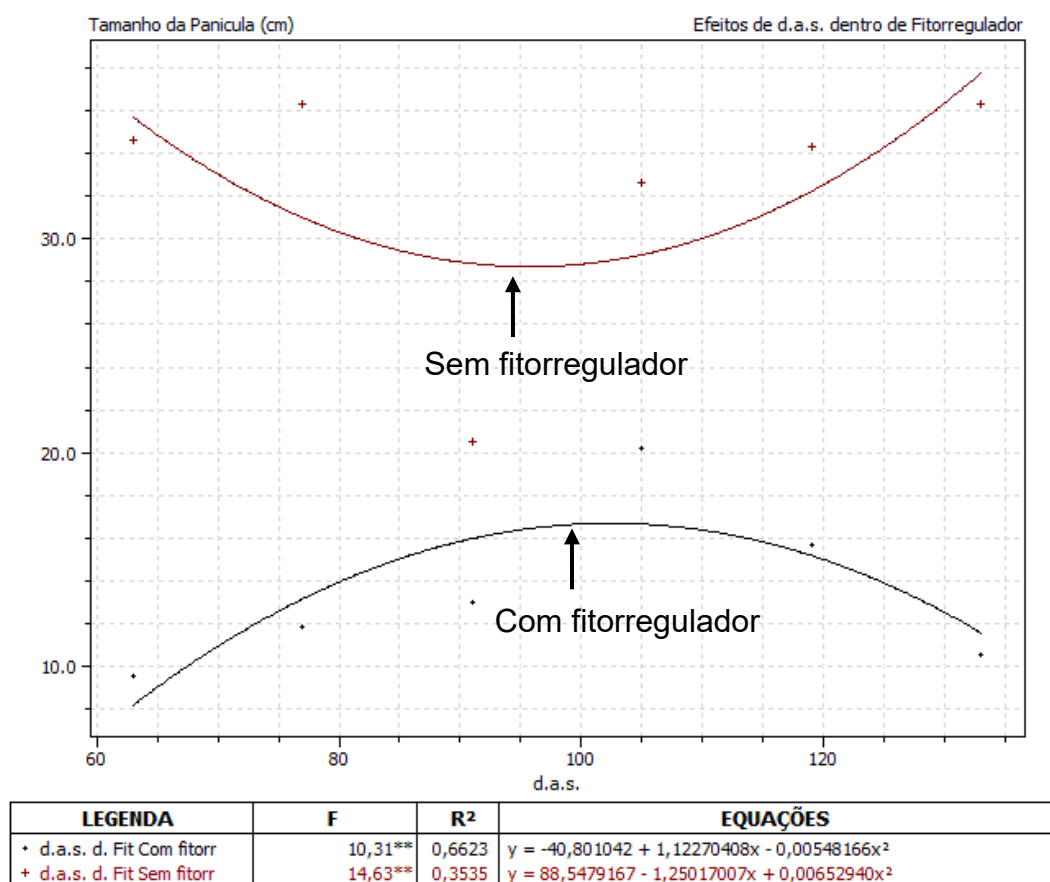


**Figura 02.** Regressão Polinomial para Altura de colmos em função das épocas de amostragem para os tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

Com relação aos diâmetros da base e da ponta dos colmos de sorgo sacarino Malibu J53 (Tabela 02), não foram observadas diferença significativa com relação ao uso ou não do fitorregulador. De modo semelhante, não exibiram interação entre as épocas de amostragem, com resultado médio de 1,86 e 1,05 centímetros para o diâmetro da base e da ponta, respectivamente. Entretanto, de acordo com as épocas de amostragem, foram determinadas diferenças significativas, os quais apresentavam com maiores diâmetros no período de 105 a 119 d.a.s.. Resultados estes similares aos de Martins (2017), avaliando o mesmo genótipo de sorgo sacarino, com média basal de até 1,95 cm e da ponta de até 0,95 cm, aos 110 d.a.s..

A redução dos valores obtidos para os diâmetros pode ser explicada pela emissão da panícula, pois a planta começa a entrar em estado de senescência e consequentemente perder água, em virtude disso, o diâmetro do colmo diminui (Nogueira et al., 2017). Segundo May et al. (2012), tal comportamento apresenta diversas interferências perante a redução no diâmetro, podendo ser associado ao aumento de perfilhos, que diminuem o diâmetro da base e consequentemente o da ponta. Sendo também, que o diâmetro de colmo reflete na produção de massa verde, que é uma característica importante correlacionada a produtividade. Entretanto, a redução do diâmetro pode tornar as plantas mais sensíveis ao acamamento e ao quebraimento, afetando negativamente a colheita da cultura.

A caracterização do tamanho da panícula, apresentado na Tabela 02, demonstra interação do uso do fitorregulador e as épocas de amostragem. O desdobramento do mesmo está representado na Figura 03. De acordo com os resultados apresentados, o uso do fitorregulador (na dose e época aplicada), não inibiu totalmente a formação da panícula. Todavia, o uso de fitorregulador no cultivo do sorgo sacarino apresentou redução no tamanho a ser formada de 36 para 16 centímetros. Quando utilizado o fitorregulador, o crescimento da panícula apresentou maior estabilidade, com o crescimento máximo entre 90 e 110 d.a.s.. Diferente do comportamento encontrado quando não utilizado o etefom, no qual não apresentou um crescimento constante decorrente da oscilação do tamanho das panículas. Em estudos conduzidos por Fortes et al. (2016) e Martins (2017), o emprego do etefom também retardou a formação de panícula e reduziu o seu tamanho, com resultados similares aos apresentados no presente estudo.



**Figura 03.** Regressão Polinomial para Comprimento da Panícula em função das épocas de amostragem para os tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

Os parâmetros da caracterização dos colmos do sorgo sacarino Malibu J53 quanto à massa úmida, massa seca e teor de umidade estão apresentados na Tabela 03. De acordo com a análise de variância para a massa úmida e seca, foi determinada interação significativa entre o uso do fitorregulador no cultivo dos colmos do sorgo sacarino com as épocas de avaliação, os desdobramentos estão representados nas Figura 04 e 05, respectivamente, na forma de regressão polinomial.

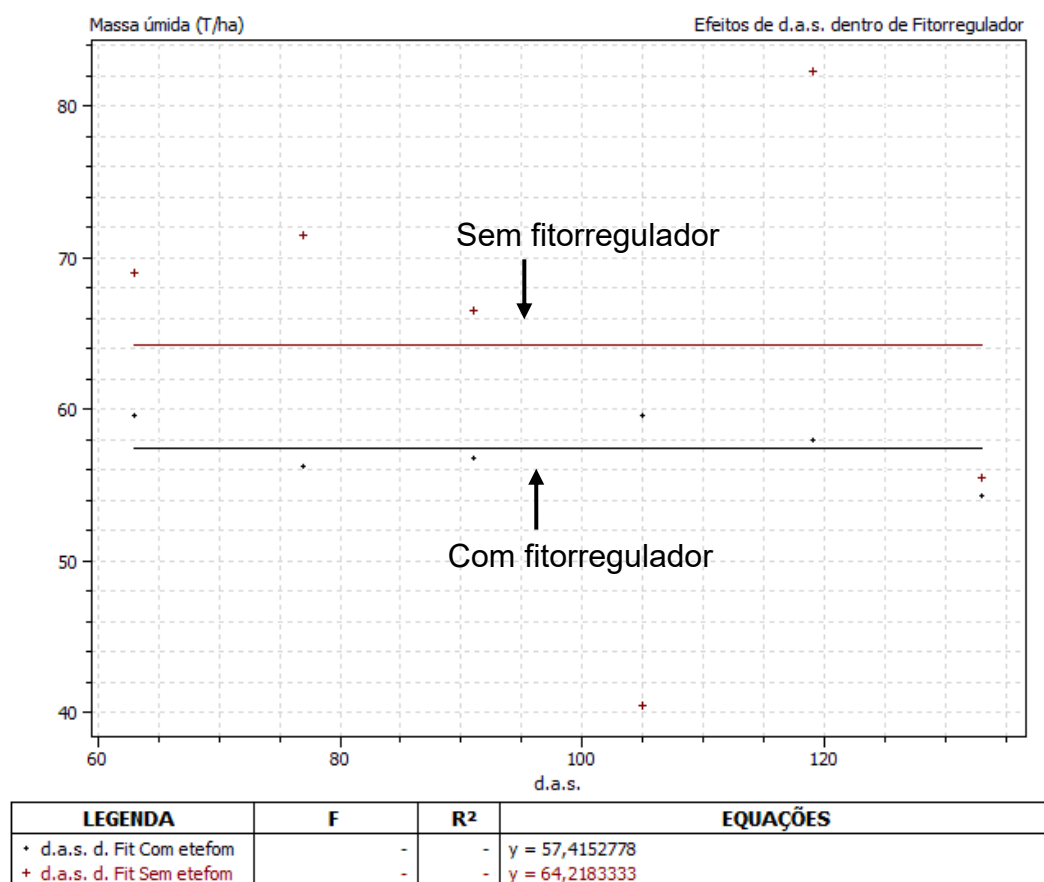
O desdobramento da interação dos tratamentos, através da regressão polinomial para a massa úmida (Figura 04), apresentaram comportamento constante dentre a regressão das épocas. Entretanto, a massa úmida foi significativamente superior em todas as épocas de amostragem para os colmos de sorgo sacarino sem o uso do fitorregulador, com resultado médio de 64 t.ha<sup>-1</sup>, resultado 9,38% menor quando foi utilizado o etefom, obtendo o maior acúmulo aos 119 d.a.s. (Tabela 03). Esta diferença pode ser associada a redução das dimensões (Altura, diâmetros da

base e ponta – Tabela 02) dos colmos quando utilizado o fitorregulador no cultivo do sorgo sacarino, que são correlacionados a quantidade de massa úmida (May et al., 2012).

**Tabela 03.** Valores médios e resultados da análise de variância para Massa Úmida, Massa Seca e Teor de Umidade, para os tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

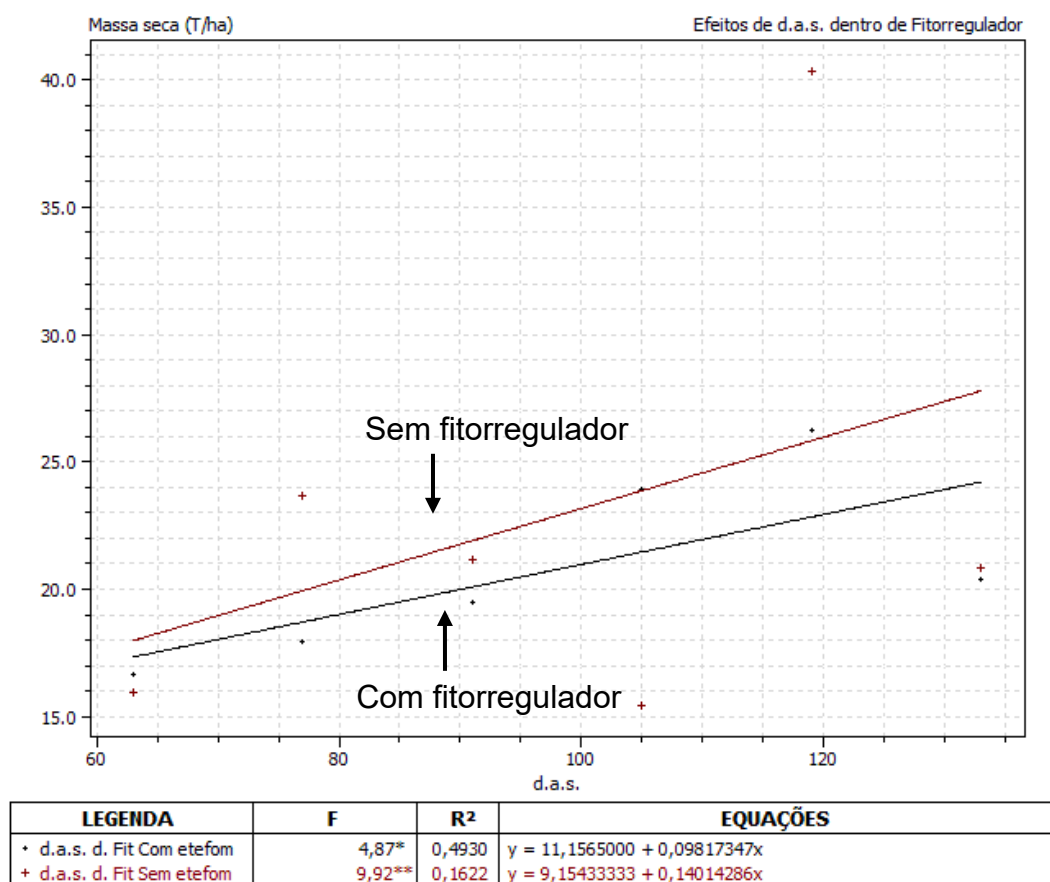
|                           | Massa úmida<br>(t.ha <sup>-1</sup> ) | Massa seca<br>(t.ha <sup>-1</sup> ) | Teor de<br>umidade (%) |
|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------|
| <b>Sorgo Sacarino (S)</b> |                                      |                                     |                        |
| Com etefom                | 57,41A                               | 22,88A                              | 63,52A                 |
| Sem etefom                | 64,21A                               | 20,77A                              | 64,25A                 |
| Teste F                   | 1,04ns                               | 0,87ns                              | 0,17ns                 |
| CV                        | 46,57                                | 43,94                               | 11,64                  |
| DMS                       | 17,16                                | 5,81                                | 4,50                   |
| <b>Épocas (E)</b>         |                                      |                                     |                        |
| 63                        | 64,27AB                              | 16,28B                              | 73,81A                 |
| 77                        | 63,87AB                              | 20,79B                              | 66,42AB                |
| 91                        | 61,66AB                              | 20,33B                              | 66,90AB                |
| 105                       | 50,05B                               | 19,68B                              | 60,97B                 |
| 119                       | 70,13A                               | 33,29A                              | 52,76C                 |
| 133                       | 54,89AB                              | 20,59B                              | 62,46B                 |
| Teste F                   | 2,43*                                | 10,10**                             | 13,89**                |
| CV                        | 26,35                                | 29,23                               | 10,24                  |
| DMS                       | 19,38                                | 7,72                                | 7,92                   |
| Int. S x E                | 2,56*                                | 4,10**                              | 0,50ns                 |

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) e ns: não significativo ( $p > 0,05$ ).



**Figura 04.** Regressão Polinomial para o teor de Massa Úmida em função das épocas de amostragem para os tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

Apesar dos resultados obtidos para a massa úmida (Figura 04), a regressão polinomial para a massa seca (Figura 05) dos colmos apresentaram comportamento diferente. De acordo com a regressão polinomial, ao longo do cultivo dos colmos, é observado acréscimo da massa seca, com resultado significativamente superior quando não utilizado o fitorregulador, chegando a 28 t.ha<sup>-1</sup>. Entretanto, assim como na massa úmida, o uso do etefom no cultivo dos colmos apresentou redução da massa seca de 14,28% decorrente da redução dos parâmetros biométricos da planta (altura dos colmos e diâmetros da base e ponta).



**Figura 05.** Regressão Polinomial para o teor de Massa Seca em função das épocas de amostragem para os tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

Para o parâmetro umidade dos colmos, os resultados médios apresentados na Tabela 03 não demonstraram diferença significativa com o uso do fitorregulador e interação com as épocas de amostragem, com umidade média de 63,89% de umidade. Com relação as épocas de amostragem, o genótipo apresentou redução significativa de 21,05% dos 63 d.a.s. até os 119 d.a.s. e posterior a isso ganho da umidade novamente. Esta redução deve-se ao estresse hídrico ao qual o sorgo sacarino foi submetido (Figura 01), e posteriormente a entrada da planta em seu período de senescência. A diminuição deste parâmetro também foi observada por Martins (2017) utilizando o mesmo genótipo, que observou um decréscimo de 23,08%.

As caracterizações químico-tecnológicas dos caldos dos colmos do sorgo sacarino Malibu J53 quanto à Sólidos Solúveis Totais (S.S.T.), Açúcares Redutores Totais (ART), Açúcares Redutores (AR), pH, Acidez Total e Teor de Amido estão apresentados na Tabela 04. De acordo com a análise de variância para o S.S.T., ART,

AR e Teor de Amido, estes obtiveram interação significativa entre o uso do fitorregulador no cultivo dos colmos do sorgo sacarino e as épocas de avaliação, os desdobramentos estão representados nas Figura 06 a 09, respectivamente, na forma de regressão polinomial.

**Tabela 04.** Valores médios do caldo extraído e resultados da análise de variância para Sólidos Solúveis Totais, ART, AR, pH, Acidez Total e Teor de Amido, para os tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

|                    | S.S.T.<br>(%) | ART (%)  | AR (%)   | pH      | Acidez Total<br>(g.L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) | Teor de Amido<br>(ppm.Brix <sup>-1</sup> ) |
|--------------------|---------------|----------|----------|---------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| Sorgo Sacarino (S) |               |          |          |         |                                                                     |                                            |
| Com etefom         | 17,84A        | 13,07A   | 0,71B    | 4,8A    | 2,34A                                                               | 205,05A                                    |
| Sem etefom         | 16,83B        | 12,41B   | 0,88A    | 4,8A    | 2,38A                                                               | 184,64B                                    |
| Teste F            | 17,74**       | 10,64*   | 17,78**  | 1,52ns  | 1,45ns                                                              | 12,93*                                     |
| CV                 | 5,86          | 6,69     | 20,86    | 2,75    | 16,41                                                               | 12,35                                      |
| DMS                | 0,61          | 0,51     | 0,10     | 0,08    | 0,22                                                                | 14,58                                      |
| Épocas (E)         |               |          |          |         |                                                                     |                                            |
| 63                 | 13,32D        | 8,47E    | 1,58A    | 5,0A    | 1,08C                                                               | 92,13D                                     |
| 77                 | 17,72B        | 12,16CD  | 1,19B    | 4,8BC   | 1,67B                                                               | 139,81C                                    |
| 91                 | 20,48A        | 17,13A   | 0,74C    | 4,9AB   | 2,01B                                                               | 273,33A                                    |
| 105                | 20,45A        | 14,56B   | 0,60C    | 4,7D    | 3,00A                                                               | 205,46B                                    |
| 119                | 16,95B        | 12,72C   | 0,36D    | 4,7D    | 2,89A                                                               | 221,64B                                    |
| 133                | 15,08C        | 11,39D   | 0,32D    | 4,7D    | 3,06A                                                               | 236,72AB                                   |
| Teste F            | 73,99**       | 143,74** | 140,74** | 23,59** | 65,98**                                                             | 47,46**                                    |
| CV                 | 6,66          | 6,64     | 18,02    | 1,61    | 15,32                                                               | 17,24                                      |
| DMS                | 1,39          | 1,02     | 0,17     | 0,09    | 0,42                                                                | 40,64                                      |
| Int. S x E         | 3,94**        | 7,71**   | 6,01**   | 2,04ns  | 1,25ns                                                              | 6,63**                                     |

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) e ns: não significativo ( $p > 0,05$ ).

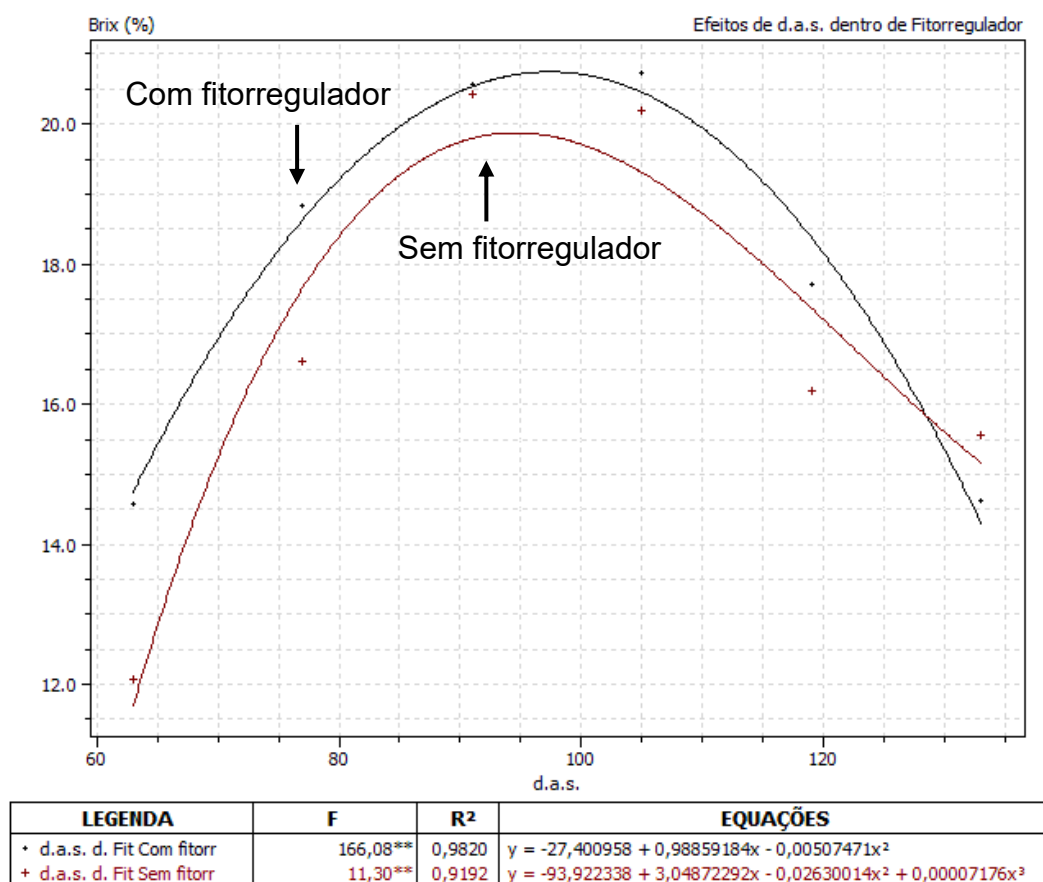
Ao longo do desenvolvimento do sorgo sacarino, a planta apresenta determinadas etapas as quais são pertencentes ao seu ciclo fenológico. Para o sorgo sacarino, estes estágios fenológicos de desenvolvimento são: Emborrachamento ( $\pm 60$  d.a.s.), florescimento ( $\pm 70$  d.a.s.), grão leitoso ( $\pm 85$  d.a.s.), grão pastoso ( $\pm 100$  d.a.s.), grão farináceo ( $\pm 115$  d.a.s.), grão duro ( $\pm 125$  d.a.s.) e senescência ( $\pm 135$  d.a.s.).

d.a.s.) (Teixeira, 2017). Períodos estes avaliados no presente estudo e representados nas respectivas épocas de amostragem.

De acordo com o desdobramento dos resultados obtidos para os Sólidos Solúveis Totais (Figura 06), o uso do fitorregulador no cultivo do sorgo sacarino Malibu J53 acarreta maior concentração destes fotoassimilados, sendo esta significativa. Para o período de avaliação, ambos tratamentos apresentaram maior acúmulo por volta dos 90 a 110 d.a.s. com média máxima de 20,8% e 20% com e sem uso do etefom, respectivamente. Sendo assim, através do uso do fitorregulador, decorrente da atividade de retardação da maturação, é observado um incremento de 0,8% dos sólidos solúveis totais.

Apesar dessa diferença, estes resultados estão dentro do esperado para um genótipo de sorgo sacarino, sendo que os resultados podem variar de 12 a 22% (EMBRAPA, 2015). Estudos conduzidos por Lozano et al. (2018) utilizando o genótipo Malibu J53 apresentam resultados similares considerando-se o acúmulo de açúcares, assim como a diferença com relação ao uso de fitorregulador no cultivo da matéria-prima.

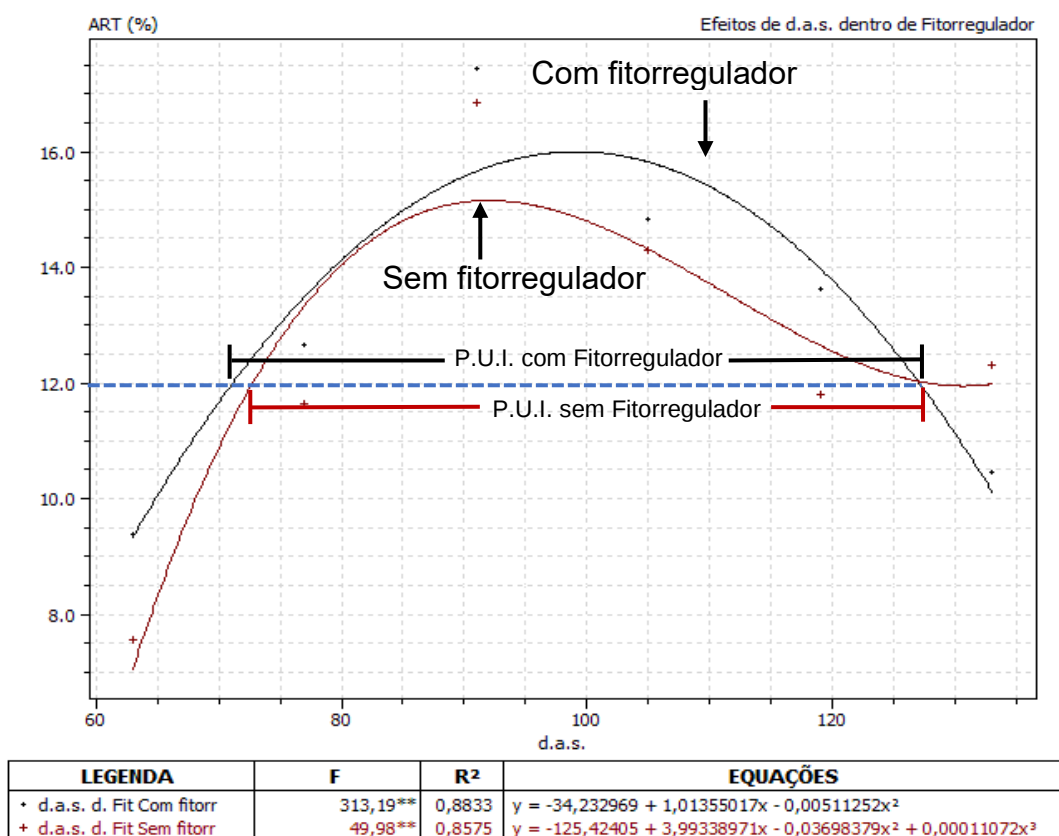
De acordo com os sólidos solúveis totais (Figura 06) dentre os estágios fenológico de sorgo sacarino, estabelecidos por Teixeira (2017), foi observado o máximo acúmulo entre os estágios fenológicos de grão leitoso, pastoso e farináceo (90 a 110 d.a.s.). Sendo observado para este genótipo, maior período em comparação ao genótipo BRS 511 (Teixeira, 2017). Sendo assim, o genótipo avaliado no presente estudo resulta em maior período para o processamento da matéria-prima



**Figura 06.** Regressão Polinomial para o teor de Sólidos Solúveis Totais (Brix) em função das épocas de amostragem para os tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

Para o parâmetro do ART do caldo (Tabela 04), o uso do fitorregulador no cultivo do sorgo sacarino Malibu J53 foi determinada uma interação com as épocas de amostragem (Figura 07). É observado um maior acúmulo de até 1% dos açúcares redutores totais quando utilizado o etefom. Schaffert e Parrella (2012) consideram valores mínimos de ART de 12% para se estabelecer o P.U.I. (período útil de industrialização) do sorgo sacarino. Assim, o genótipo avaliado sem fitorregulador apresentou um P.U.I. dos 75 aos 120 d.a.s. decorrente do acúmulo máximo. Entretanto, o uso do fitorregulador, além do maior acúmulo, apresentou um maior P.U.I., dos 73 a 125 d.a.s., aumentando em 7 dias o tempo para colheita/processamento para a matéria-prima em condições ideais. No presente estudo, foi observado concentração de ART maior, alcançando valores de 16% de ART, com uso do fitorregulador.

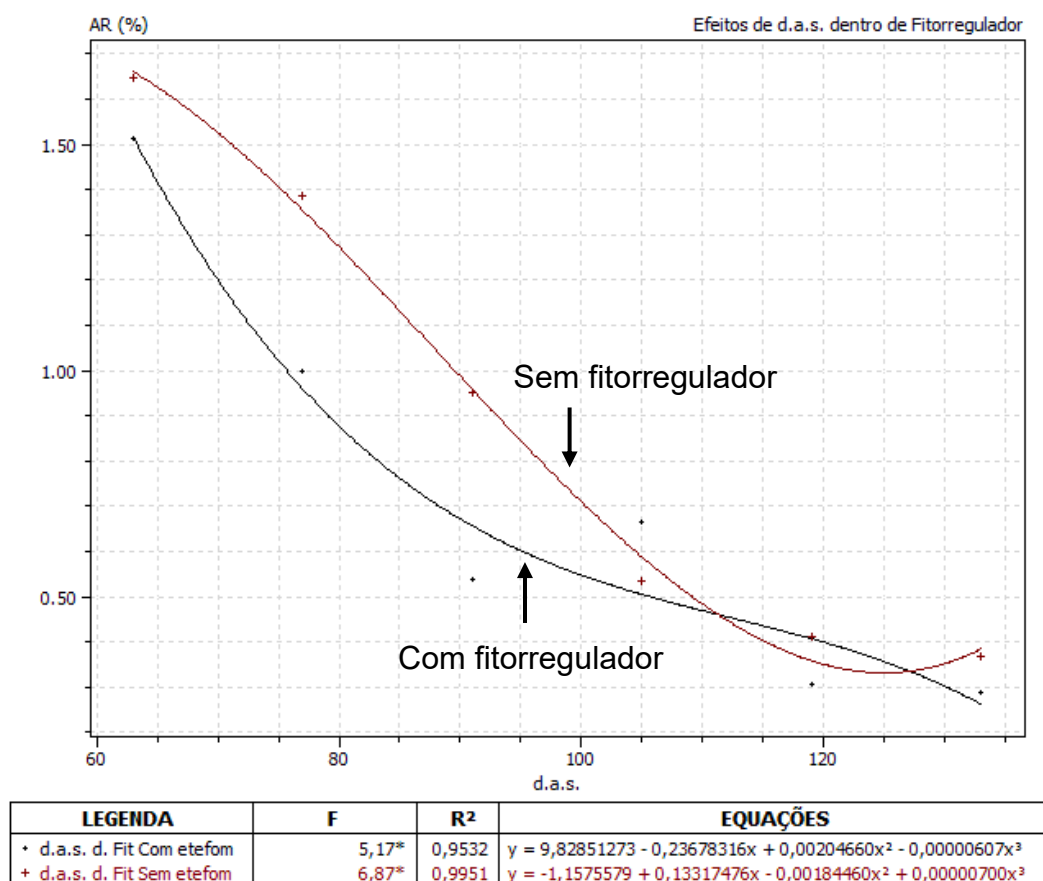
De acordo com o acúmulo dos Açúcares Redutores Totais (ART - Figura 06) dentre os estágios fenológico de sorgo sacarino avaliados, foi observado o máximo acúmulo entre os estágios fenológicos de grão leitoso, pastoso e farináceo (90 a 110 d.a.s.). Período este superior comparado ao apresentado por Teixeira (2017), além de maior concentração de açúcares no caldo extraído comparados ao genótipo BRS 511.



**Figura 07.** Regressão Polinomial para o teor dos Açúcares Redutores Totais (ART) em função das épocas de amostragem para os tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

Para o teor de açúcares redutores (AR) (Tabela 04), o desdobramento da interação entre o uso do fitorregulador e as épocas de amostragem está representado na Figura 08. Ambos os tratamentos avaliados demonstraram redução durante o período de avaliação, sendo que o caldo obtido dos colmos quando foi utilizado o fitorregulador apresentava menores concentrações. Entretanto, aos 105 d.a.s. verificou-se que para ambos os tratamentos foram equivalentes, apresentando concentração média de 0,5%. Segundo May et al. (2012), os valores indicados como

referência para sorgo sacarino é de 1 a 3% de AR. Os resultados obtidos neste estudo indicam concentração inferior. Este comportamento está relacionado ao acúmulo de fotoassimilados nos colmos, na forma de sacarose. Portanto é esperada a redução dos teores de AR ao longo das épocas, resultando em melhoria da qualidade químico-tecnológica do caldo.



**Figura 08.** Regressão Polinomial para o teor dos Açúcares Redutores (AR) em função das épocas de amostragem para os tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

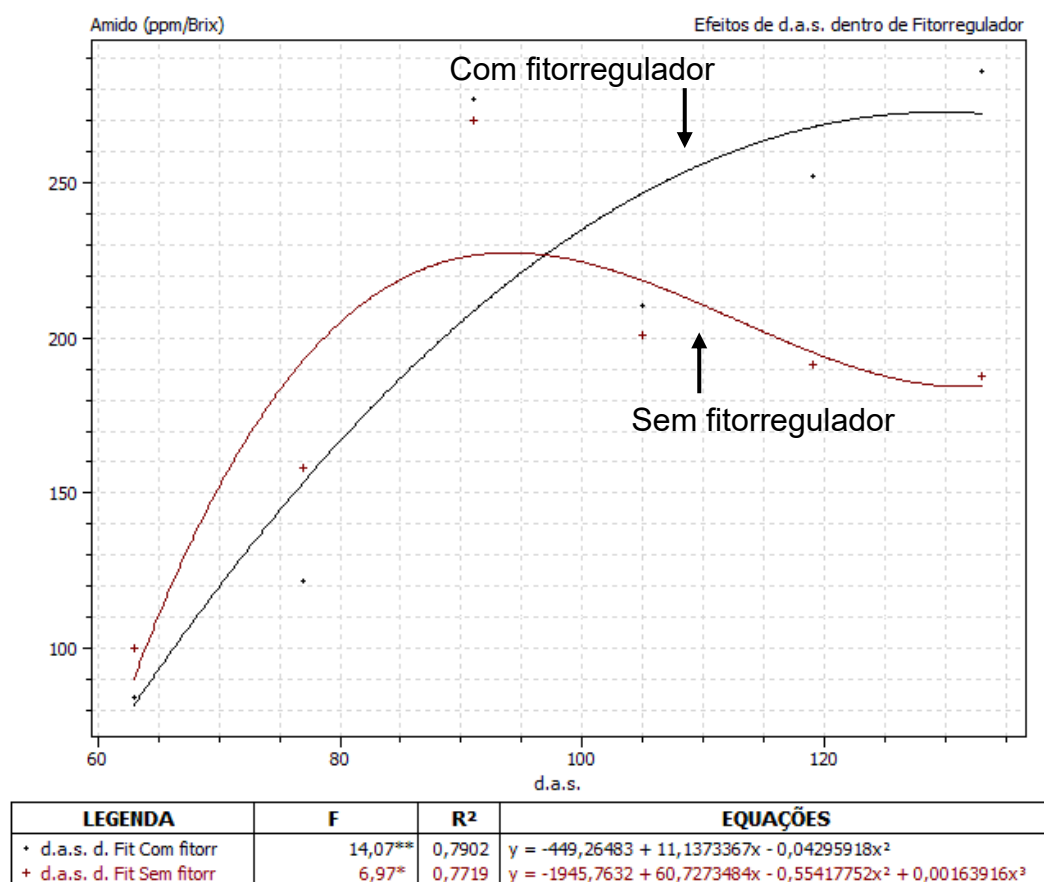
Avaliando-se o pH e a Acidez Total dos caldos (Tabela 04), estes não apresentaram diferença significativa com relação ao uso do fitorregulador no cultivo dos colmos, com resultado médio do pH de 4,8 e Acidez Total de 2,36 g.L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Já para as épocas de amostragem, ambos apresentaram diferença significativa, no qual é observado maior concentração de ácidos no caldo a partir dos 105 d.a.s.. Aos 63 d.a.s. o caldo obtido apresentava pH de 5,0 e Acidez Total de 1,08 g.L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, aos

105 d.a.s. é observado uma redução de 0,3 para o pH e acréscimo de  $1,92\text{g.L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$  para a Acidez Total.

Resultados semelhantes foram obtidos por Lingle et al. (2013), também observaram redução do pH e aumento da Acidez Total ao longo das épocas de colheita (90, 115 e 140 d.a.s.). Este comportamento pode ser associado a maior atividade metabólica apresentadas pela planta (emissão de brotos e panículas), decorrente da condição ideal para a ação de ácidos e enzimas reguladoras do crescimento, tal como o ácido indol acético (Taiz e Zeiger, 2010).

A maior concentração de ácidos no processamento dos colmos pode ser prejudicial para a fermentação alcoólica. Sendo que, para elevar o pH para 6 (condição necessária para a clarificação do caldo e neutralização de ácidos orgânicos) necessita-se de maiores concentrações de leite de cal ( $\text{CaCO}_3$ ), e o aumento de cálcio residual do processo de clarificação pode diminuir a eficiência fermentativa da levedura através da impermeabilização da parede celular, restringindo a metabolização dos compostos (Lingle et al., 2013).

O teor de amido (Tabela 04) apresentou interação quando se utilizou o fitorregulador e as épocas de amostragem, o desdobramento está representado através da Figura 09. De acordo com as concentrações observadas, quando se utilizou o etefom o acúmulo dos compostos amiláceos foi mais homogêneo e crescente durante o desenvolvimento da planta. Segundo os resultados obtidos, verifica-se maior estabilização da curva a partir dos 110 d.a.s.. Sem o uso do fitorregulador, a concentração máxima no teor de amido ocorreu aos 90 d.a.s., com resultado médio  $40 \text{ ppm.Brix}^{-1}$  inferior comparado a matéria-prima com fitorregulador (ao pico de acúmulo aos 120 d.a.s.) e sem estabilização da curva, a qual, posteriormente apresentou redução na concentração.



**Figura 09.** Regressão Polinomial para o teor de Amido em função das épocas de amostragem para os tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

### 3.2. Processamento dos colmos

#### 3.2.1. Caldo extraído

Os valores quantificados para os Teores de Sólidos Solúveis Totais, Pureza e Teor de Amido (Total, Solúvel e Insolúvel) estão apresentados na Tabela 05. O teor de Açúcares (Glicose, Frutose, Sacarose e Total) estão representados na Figura 10. Da sua análise verifica-se que não houve efeito da aplicação do fitorregulador para as características estudadas. Segundo May et al. (2012), o caldo obtido dos colmos do sorgo sacarino deve apresentar concentração de Sólidos Solúveis Totais entre 15 – 19%, Sacarose de 8 - 13%, 60 – 75% de Pureza, Açúcares Redutores entre 1 – 3% (Glicose de 0,5 - 2% e Frutose 0,5 – 1,5%) e Açúcares Totais entre 12% - 17%. De acordo com os resultados médios determinados, o uso ou não do fitorregulador, foram observados dados médios superiores, representando maior acúmulo de sólidos

solúveis e teor de açúcares, resultando em pureza do caldo de 11,73% superior aos sugeridos como ideais.

Os resultados para os açúcares redutores (glicose e frutose – Figura 10) acarretaram maior concentração quando foi utilizado o fitorregulador. Entretanto, quando avaliado a soma dos açúcares totais, as médias não apresentam diferença significativa, decorrente de uma menor porcentagem de sacarose quando utilizado o etefom no cultivo do sorgo sacarino.

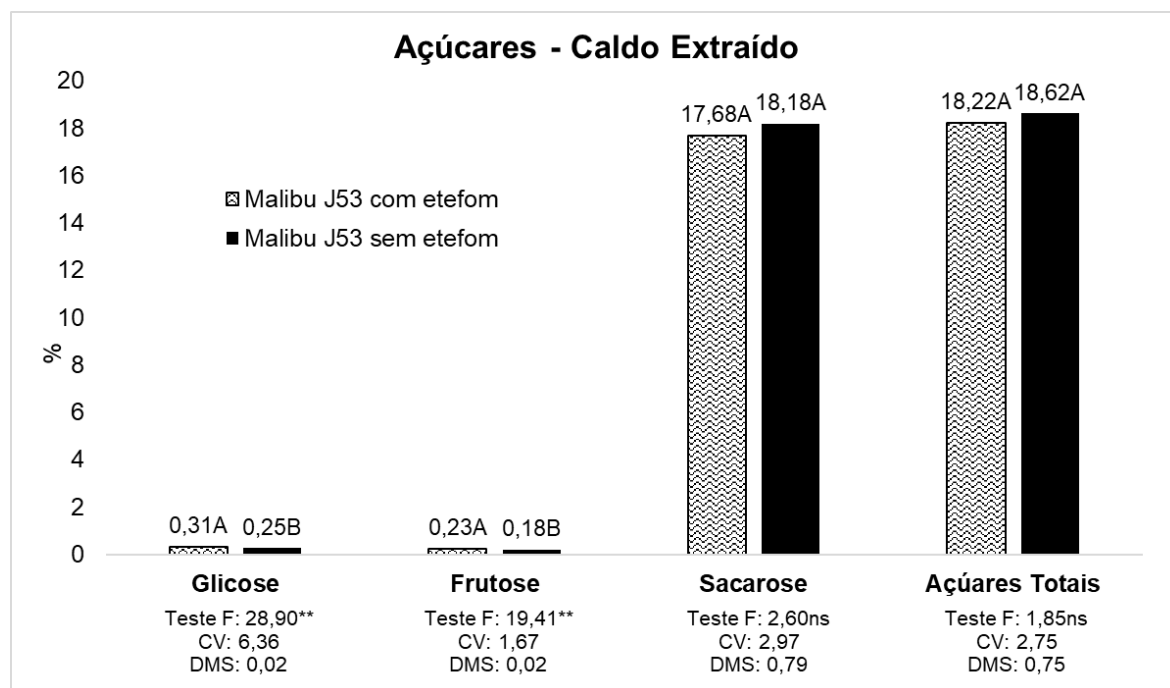
**Tabela 05.** Valores médios determinados para caldo extraído e resultados da análise de variância para Sólidos Solúveis Totais, Pureza e Teor de Amido, para os tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

| Sorgo Sacarino | S. S. T. (%) | Pureza (%) | Teor de Amido             |         |           |
|----------------|--------------|------------|---------------------------|---------|-----------|
|                |              |            | (ppm.Brix <sup>-1</sup> ) |         |           |
|                |              |            | Total                     | Solúvel | Insolúvel |
| Com etefom     | 20,53A       | 86,11A     | 14501A                    | 399A    | 14102A    |
| Sem etefom     | 20,81A       | 87,35A     | 13227A                    | 438A    | 12789A    |
| Teste F        | 1,84ns       | 0,69ns     | 1,36ns                    | 0,31ns  | 2,04ns    |
| CV             | 1,74         | 8,35       | 1,32                      | 6,26    | 1,29      |
| DMS            | 0,53         | 2,70       | 2471,55                   | 184,40  | 1830,14   |

ns: não significativo ( $p > 0,05$ ).

Considerando que os híbridos de sorgo sacarino são susceptíveis as condições edafoclimáticas, comparando com estudos conduzidos por Masson et al. (2015) e Silva et al. (2016), os quais foram desenvolvidos na mesma área experimental (híbridos CVSW80007, CV147, CV198 e BRS508), não foram determinados acúmulo de açúcares equivalente (Sólidos Solúveis Totais  $\leq 19,23\%$  e açúcares totais de 15,20%) como se quantificou no presente trabalho. O sorgo sacarino utilizado neste estudo apresentou maior acúmulo de açúcares nos colmos, com alta pureza, superior aos parâmetros encontrados em outros genótipos. Cole et al. (2017) avaliando diferentes genótipos de sorgos sacarinos (Dale, M81E, Theis e Top 76-6) em duas safras, verificaram concentrações médias máximas de açúcares e pureza de 13% e 80,6%, respectivamente. Resultados inferiores aos apresentados no presente

trabalho, o qual apresentou 18,62% de açúcares totais e pureza de 87,35% (Figura 10 e Tabela 05), apresentando maior potencial produtivo para o genótipo estudado.



**Figura 10.** Representação gráfica dos valores médios e resultados da análise de variância para os Teores de Açúcares (Sacarose, Glicose, Frutose e Totais) do caldo extraído. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

O teor de amido no caldo extraído (Tabela 05) não apresentou diferença significativa quando comparado aos tratamentos estudados, sendo os valores médios de 418,5 ppm.Brix<sup>-1</sup> para o amido solúvel, 13.445,5 ppm.Brix<sup>-1</sup> para o amido insolúvel e 13.864 ppm.Brix<sup>-1</sup> para o teor de amido total. Resultados de Eggleston et al. (2017) estudando diferentes genótipos de sorgo sacarino corroboram com os resultados aqui quantificados.

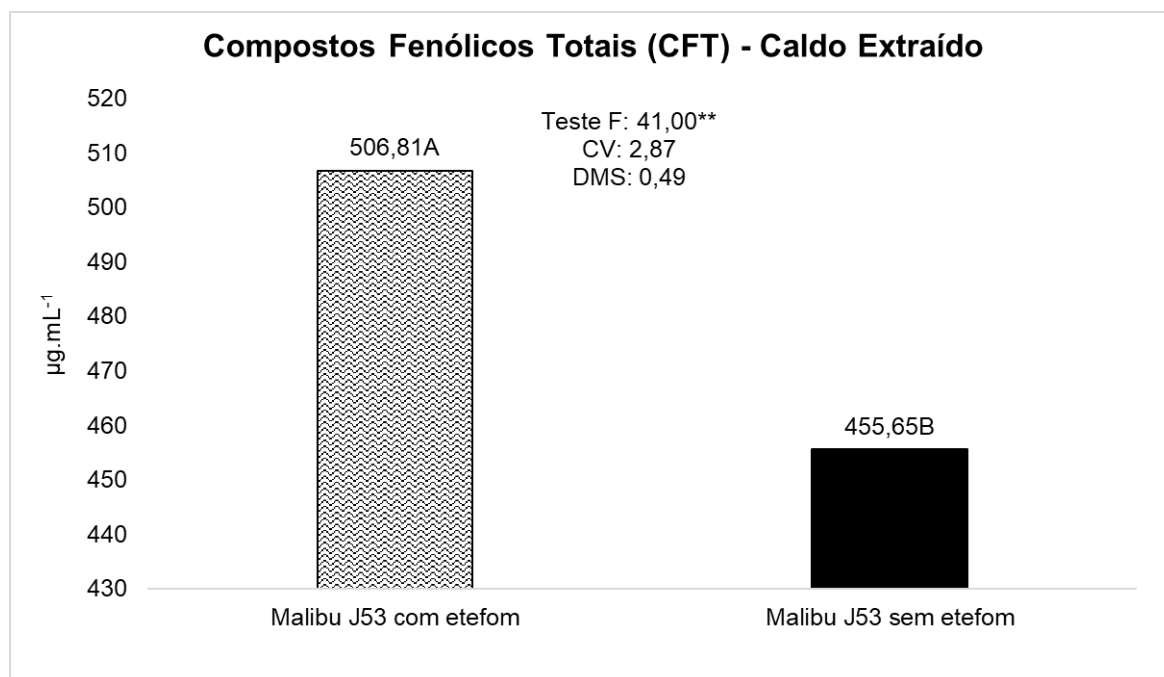
A determinação da concentração do pH e Acidez Total estão apresentados na Tabela 06. Ambos os teores presentes no caldo extraído, quando ao uso do fitorregulador não apontaram diferença significativa, com resultado médio do pH de 4,7 e acidez total de 2,99 g.L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Entretanto, é observado para os dados apresentados do sorgo sacarino Malibu J53 maior concentração de ácidos comparados aos estudos apresentados por Cole et al. (2017) (caldo extraído com pH de 5,3 a 5,5) e Silva et al. (2016) (pH 4,8 e acidez total de 1,6 g.L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

**Tabela 06.** Valores médios e resultados da análise de variância para pH e Acidez do caldo extraído, para os tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

| Sorgo Sacarino | pH     | Acidez Total<br>(g.L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) |
|----------------|--------|---------------------------------------------------------------------|
| Com etefom     | 4,7A   | 2,95A                                                               |
| Sem etefom     | 4,6A   | 3,02A                                                               |
| Teste F        | 4,00ns | 0,84ns                                                              |
| CV             | 1,22   | 4,04                                                                |
| DMS            | 0,08   | 0,21                                                                |

ns: não significativo (p> 0,05).

Os compostos fenólicos totais (CFT) nos caldos extraídos (Figura 11) apresentaram diferença significativa. A utilização do fitorregulador no cultivo do sorgo sacarino acarretou uma maior formação destes compostos, resultando em aumento de 10,09% (51,16 µg.mL<sup>-1</sup>). Este acúmulo pode ser associado ao comportamento fisiológico do sorgo sacarino, posteriormente a aplicação do etefom. Isto é, o fitorregulador não apresentou inibição da emissão da panícula no genótipo Malibu J53, retardando a formação da panícula e facilitou a ocorrência de brotação área lateral, além de novas panículas. Este resultado fisiológico explica a maior concentração de compostos fenólicos que foram determinados neste estudo, em comparação aos teores normalmente encontrados durante o crescimento da planta (May et al., 2012). A presença dos Compostos Fenólicos Totais é prejudicial ao inóculo do processo fermentativo, por apresentar efeito inibitório sobre a levedura fermentadora (Lima, 2019).



**Figura 11.** Representação gráfica dos valores médios e resultados da análise de variância para os Compostos Fenólicos Totais do caldo extraído. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

### 3.2.2. Caldo clarificado

Os resultados médios determinados para o teor de Sólidos Solúveis Totais, Açúcares (Glicose, Frutose, Sacarose e Total) e CFT estão apresentados na Tabela 07. Da sua análise verifica-se que não houve diferenças significativas, com concentração média de 19,74% Sólidos Solúveis Totais e total de açúcares de 15,88% (0,93% de glicose, 0,44% de frutose e 14,52% de sacarose).

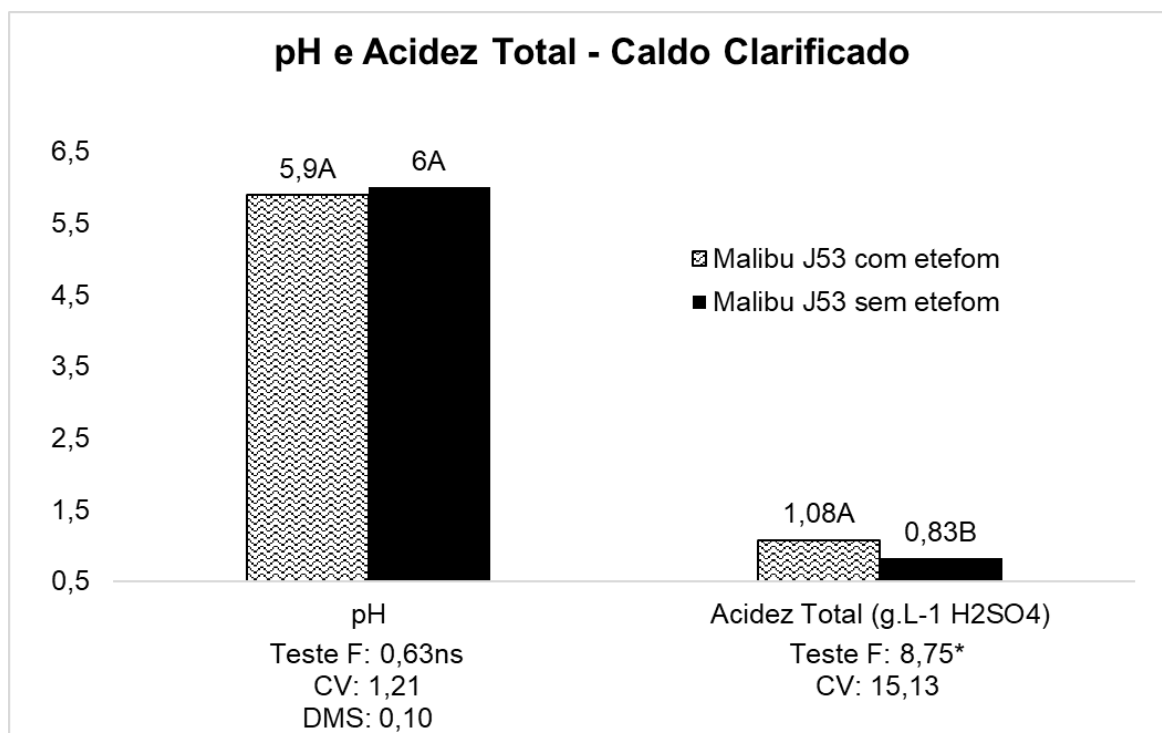
Os teores de Compostos Fenólicos Totais do caldo clarificado (Tabela 07) não apresentaram diferença significativa, comparando-se os tratamentos estudados, com concentração média de 347,86 µg.mL<sup>-1</sup>. Confrontando-se estes teores com os do caldo extraído, Figura 11, verifica-se que havia diferença significativa, sendo os maiores valores quando se utilizou o fitorregulador. Este resultado indica que o processo de clarificação empregado reduziu de modo significativo os teores de Compostos Fenólicos Totais do caldo extraído para o caldo clarificado, da ordem de 27,71%.

**Tabela 07.** Valores médios para caldo clarificado e resultados da análise de variância para Sólidos Solúveis Totais, Açúcares, pH, Acidez Total e Compostos Fenólicos Totais (CFT), para os tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

| Sorgo Sacarino | S. S. T. | Açúcares (%) |         |          |        | CFT                       |
|----------------|----------|--------------|---------|----------|--------|---------------------------|
|                | (%)      | Glicose      | Frutose | Sacarose | Total  | ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) |
| Com etefom     | 19,21A   | 0,90A        | 0,43A   | 14,13A   | 15,45A | 338,50A                   |
| Sem etefom     | 20,28A   | 0,95A        | 0,45A   | 14,91A   | 16,31A | 357,22A                   |
| Teste F        | 1,68ns   | 0,57ns       | 0,57ns  | 1,70ns   | 1,55ns | 0,47ns                    |
| CV             | 7,22     | 12,79        | 11,27   | 7,14     | 7,50   | 13,60                     |
| DMS            | 2,11     | 0,17         | 0,07    | 1,53     | 1,76   | 70,21                     |

ns: não significativo ( $p > 0,05$ ).

Da análise dos resultados obtidos, não foram observadas diferenças significativas para o pH do caldo clarificado (Figura 12), sendo os valores médios da ordem de 6, valor este padronizado no tratamento do caldo. Para o parâmetro Acidez Total do caldo clarificado (Figura 12), houve diferença significativa, entre os tratamentos estudados (Tabela 06). O caldo clarificado extraído de colmos tratados com uso de fitorregulador, apresentou redução de 63,39%, sendo superior em 72,51% em relação ao tratamento controle. A remoção destes ácidos é fundamental, uma vez que são inibidores e prejudiciais ao desenvolvimento das leveduras utilizadas no processo fermentativo (Lima, 2019). Redução esta resultante do processo de clarificação, através da adição de hidróxido de cálcio, neutralização e remoção dos ácidos presentes no caldo.



**Figura 12.** Representação gráfica dos valores médios para caldo clarificado e resultados da análise de variância para pH e Acidez Total. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

A determinação dos teores de amido total, solúvel e insolúvel nos caldos clarificados estão apresentados na Tabela 08, estando as concentrações abaixo do limite mínimo de detecção. Cabe destacar que este é o resultado da ação eficiente do processo de clarificação, favorecendo a atividade da enzima alfa-amilase, proporcionando a quebra e/ou remoção do polímero de glicose que compõe a molécula de amido.

**Tabela 08.** Valores médios para caldo clarificado e resultados da análise de variância para o Teor de Amido, quanto aos tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

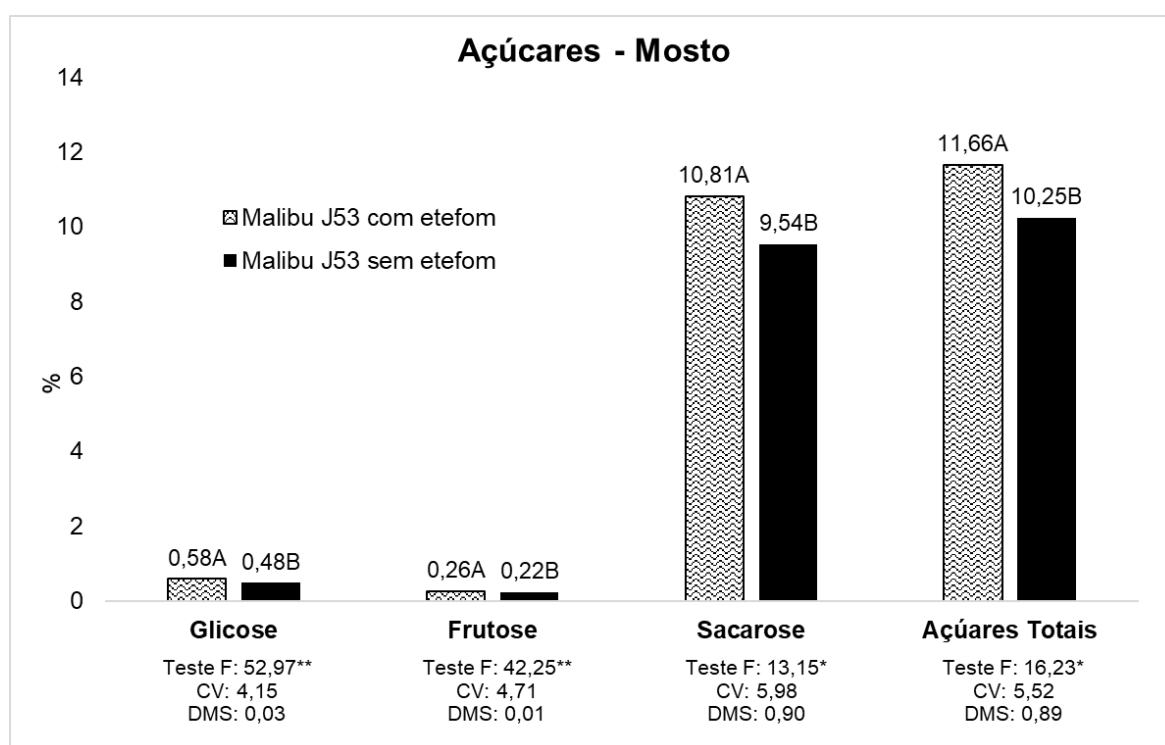
| Sorgo Sacarino | Teor de Amido (ppm.Brix <sup>-1</sup> ) |         |           |
|----------------|-----------------------------------------|---------|-----------|
|                | Total                                   | Solúvel | Insolúvel |
| Com etefom     | n.d.                                    | n.d.    | n.d.      |
| Sem etefom     | n.d.                                    | n.d.    | n.d.      |

n.d.: não detectável.

Em estudos conduzidos por Costa et al. (2018) comprovam a remoção do amido através do processo de clarificação. Relatos de Eggleston et al. (2017) apontam para a conversão do amido em açúcares no processo de clarificação do caldo de sorgo sacarino, corroborando com os resultados deste estudo, no qual parte do amido quantificado no caldo extraído (Tabela 05), foi convertido em oligossacarídeos e glicose no caldo clarificado. Pode-se avaliar a representação do aumento dos sólidos solúveis totais e da glicose em relação à concentração do caldo extraído (Figura 10).

### 3.2.3. Mosto

Os resultados da concentração dos Açúcares (Glicose, Frutose, Sacarose e Total) estão apresentados na Figura 13. Considerando-se o uso do fitorregulador observou-se diferença significativa para os teores dos açúcares estudados, assim como a soma dos mesmos, resultando em incrementos de 1,41% para açúcares totais quando se utilizou o etefom.



**Figura 13.** Representação gráfica dos valores médios de Açúcares (Glicose, Frutose, Sacarose e Total) no mosto e resultados da análise de variância. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

A caracterização dos mostos quanto a Acidez Total e CFT estão apresentados na Tabela 09. Não foi observado diferença significativa para Acidez Total e Compostos Fenólicos Totais para os tratamentos estudados. Com relação as concentrações em comparação ao caldo clarificado (Tabela 07 e Figura 12), ambos apresentaram diferença, confirmando o efeito benéfico do tratamento do caldo antecedendo ao preparo do mosto. Deve-se considerar ainda o incremento da Acidez Total resultante da adição do ácido sulfúrico para a adequação do pH a 4,5.

Com relação aos teores de compostos fenólicos totais constatou-se redução dos valores médios, inferior a  $500 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , provavelmente como resultado da diluição do mosto para 16% de Sólidos Solúveis Totais, sendo esta concentração de açúcares adequada para o preparo do mosto e realização do processo fermentativo (Ravaneli et al., 2011).

**Tabela 09.** Valores médios e resultados da análise de variância para a Acidez Total e CFT no mosto, quanto aos tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

| Sorgo Sacarino | Acidez Total<br>( $\text{g}.\text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$ ) | CFT<br>( $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ) |
|----------------|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Com etefom     | 2,28A                                                              | 286,53A                                 |
| Sem etefom     | 2,33A                                                              | 278,89A                                 |
| Teste F        | 0,17ns                                                             | 0,82ns                                  |
| CV             | 7,62                                                               | 5,17                                    |
| DMS            | 0,26                                                               | 21,73                                   |

ns: não significativo ( $p > 0,05$ ).

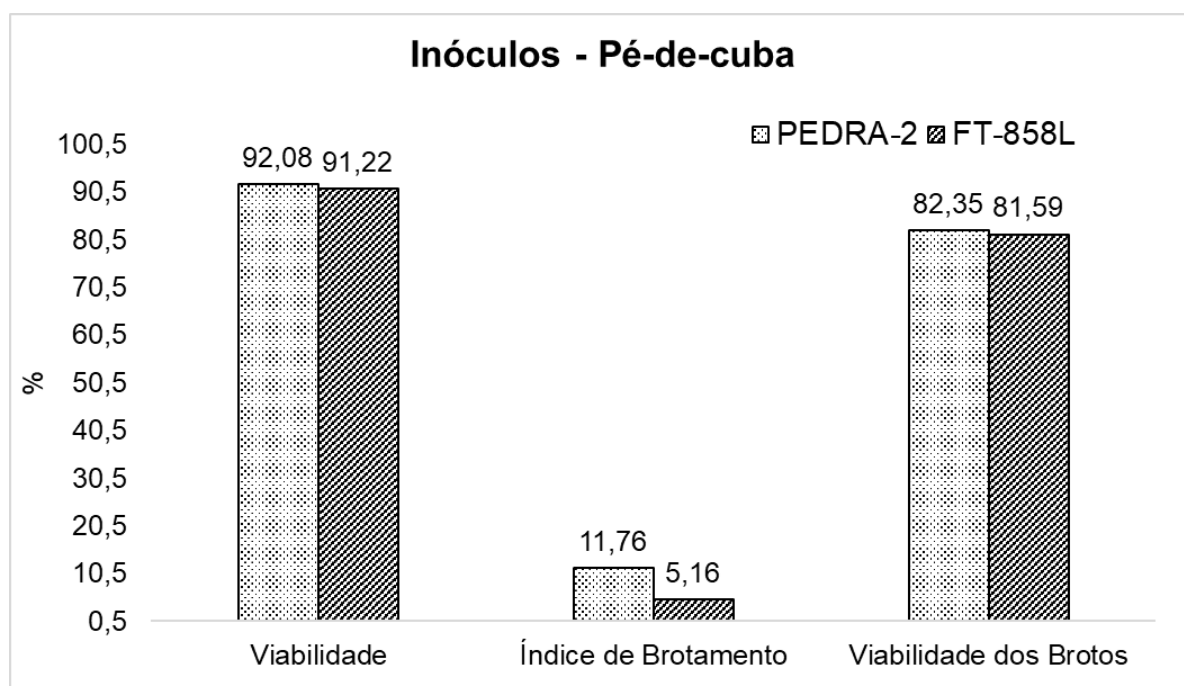
#### 3.2.4. Processo fermentativo

Antecedendo ao processo fermentativo, os inóculos foram submetidos a avaliação microbiológica determinando-se a viabilidade celular, índice de brotamento e viabilidade dos brotos das leveduras fermentadoras, estando os resultados apresentados na Figura 14.

De acordo com Amorim (2005), o inóculo deve apresentar viabilidade igual ou superior a 85% possibilitando obter a ação eficiente de elevados rendimentos fermentativos. Constatou-se para os resultados obtidos que as leveduras PEDRA-2 E

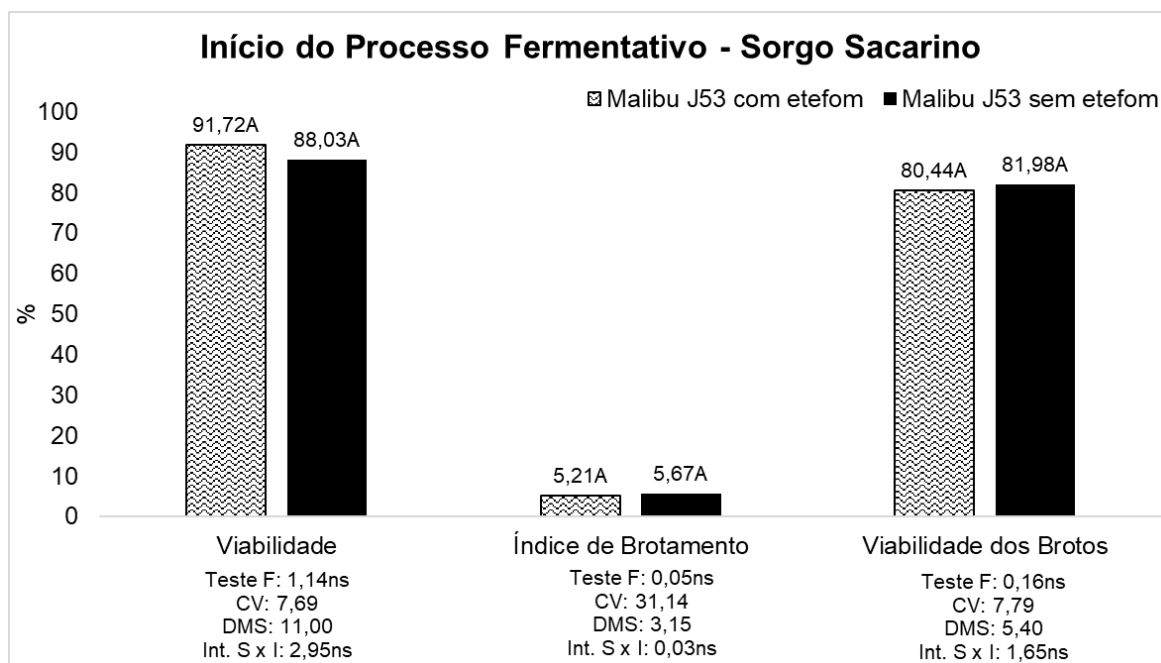
FT-858L (Figura 14) apresentaram viabilidade superiores, o que significa que estavam aptas para iniciar o processo fermentativo.

Analisando-se a Figura 14, verifica-se maior índice de brotamentos para a levedura PEDRA-2, o que pode favorecer uma melhor adequação deste inóculo ao mosto de sorgo. Segundo Fermentec (2020) e LNF (2020), ambas as leveduras apresentam alta eficiência fermentativa, alta adaptabilidade a diferentes mostos e elevada resistência a concentrações de ácidos.



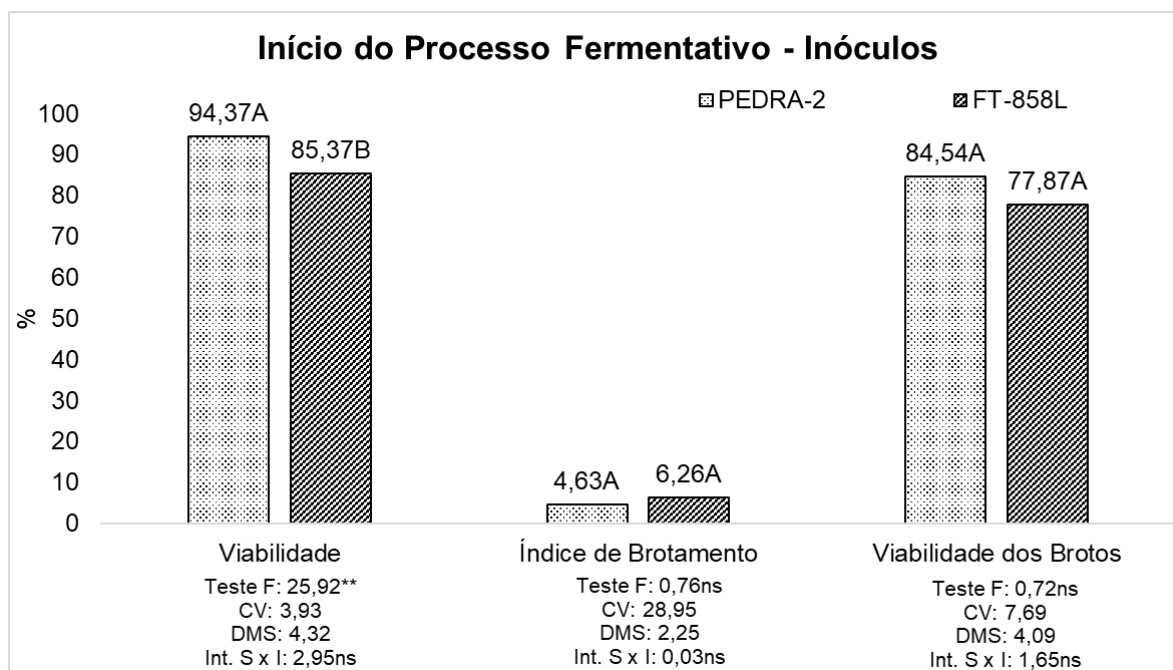
**Figura 14.** Representação gráfica das médias obtidas para Viabilidade de Células, Índice de Brotamento e Viabilidade de Brotos, para as leveduras PEDRA-2 e FT-858L. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

De acordo com a Figura 15 verifica-se que para o início do processo fermentativo não foram determinadas diferenças significativas para os tratamentos estudados (com e sem etefom). Os valores médios de viabilidade de células foi 89,88%; para índice de brotamento 5,44% e, para viabilidade dos brotos de 81,21%.



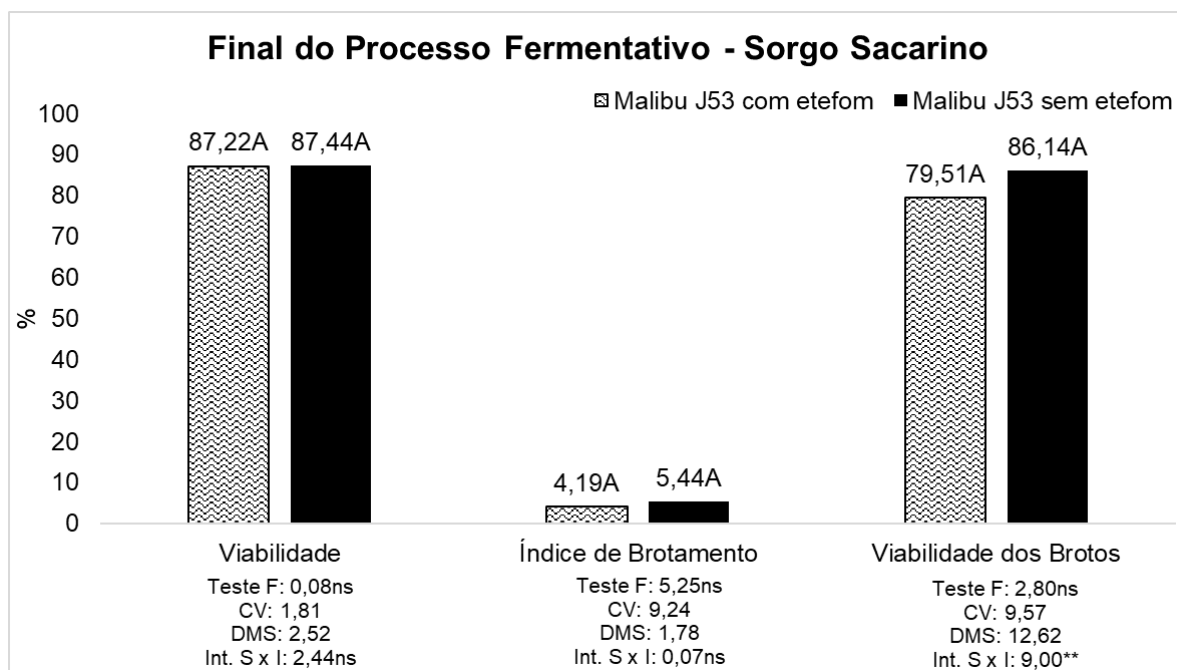
**Figura 15.** Representação gráfica dos valores médios e resultados da análise de variância ao início do processo fermentativo para Viabilidade de Células, Índice de Brotamento e Viabilidade de Brotos, com e sem etefom. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

Comparando-se as duas leveduras utilizadas, tem-se que no início do processo fermentativo (Figura 16), a levedura PEDRA-2 apresentou viabilidade celular 9% superior a FT-858L. Esta diferença significativa pode ser associada ao maior índice de brotamento da levedura PE-2 no início do processo (Figura 14), sendo que uma maior taxa de multiplicação acarreta maior porcentagem de células vivas ao processo. Quanto ao índice de brotamento e viabilidade dos mesmos, não foram observadas diferenças significativas. Estudos conduzidos por Santos et al. (2017) utilizando a levedura FT-858L em processo fermentativo com sorgo sacarino, ao início relataram viabilidade média de 75%. Com isso, apesar desta levedura apresentar uma alta adaptabilidade e bons rendimentos utilizados no processo fermentativo, podem apresentar comportamento diferentes quando empregadas com outras matérias-primas, tal como o sorgo sacarino.



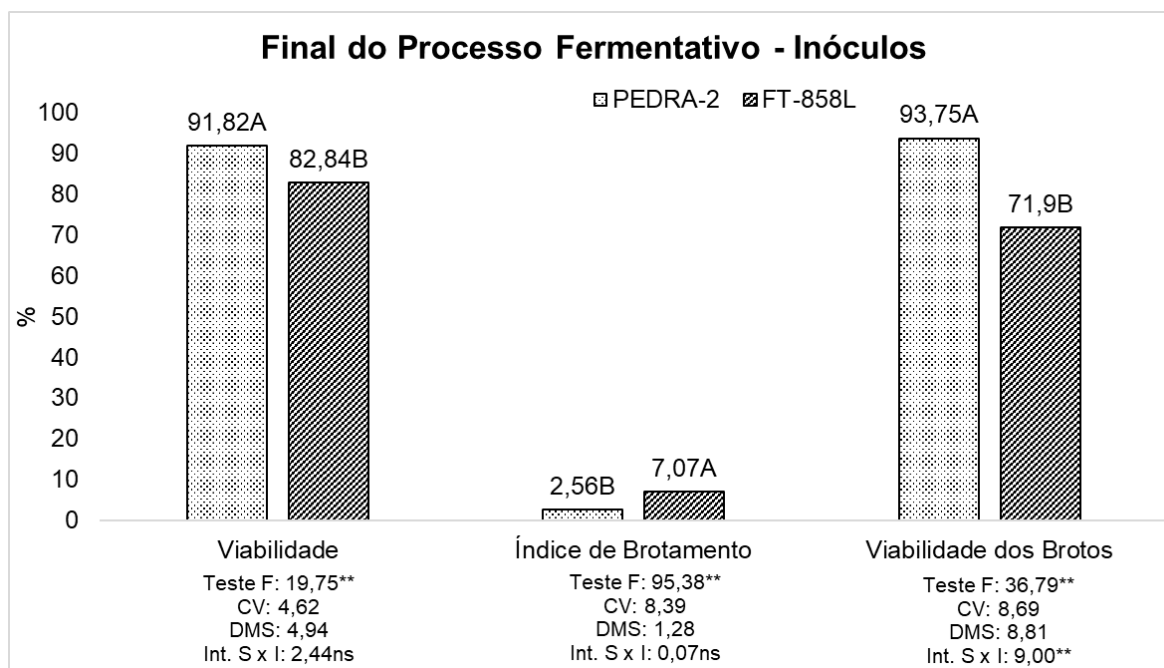
**Figura 16.** Representação gráfica dos valores médios e resultados da análise de variância ao início do processo fermentativo para Viabilidade de Células, Índice de Brotamento e Viabilidade de Brotos, para as leveduras PEDRA-2 e FT-858L. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

Ao final do processo fermentativo, determinou-se a viabilidade de células, índice de brotamento e viabilidade dos brotos, que estão apresentadas nas Figuras 17 e 18. De acordo com os resultados obtidos, não foram observadas diferenças significativas, considerando-se os tratamentos estudados. Os resultados médios foram de 87,33% para a viabilidade celular, índice de brotamento de 4,82%. Sendo assim, a utilização do etefom no cultivo dos colmos do sorgo sacarino Malibu J53 não resultou na presença de compostos que apresentam interações negativas ao inóculo utilizado no processo fermentativo. Entretanto, é observado interação quando avaliado a viabilidade dos brotos (Tabela 10).



**Figura 17.** Representação gráfica dos valores médios e resultados da análise de variância ao final do processo fermentativo para Viabilidade de Células, Índice de Brotamento e Viabilidade de Brotos, com e sem etefom. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

Com relação aos diferentes inóculos utilizados, ao final do processo fermentativo (Figura 18), a levedura PEDRA-2 apresentou viabilidade superior de 8,98% e taxa de multiplicação inferior (4,51%) em relação a FT-858L. Embora com viabilidade inferior, a levedura FT-858L apresenta resultados superiores aos apresentados por Santos et al. (2017) no qual também avaliou o desempenho em mosto de sorgo sacarino.



**Figura 18.** Representação gráfica dos valores médios e resultados da análise de variância ao final do processo fermentativo para Viabilidade de Células, Índice de Brotamento e Viabilidade de Brotos, para as leveduras PEDRA-2 e FT-858L. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

Os resultados do desdobramento da viabilidade dos brotos (%) ao final do processo fermentativo da interação entre uso de fitorregulador e os inóculos, para a viabilidade dos brotos (Tabela 10), indica menor viabilidade dos brotos para a levedura FT-858L, sendo este resultado significativamente inferior a essa levedura quando se utilizou o fitorregulador. Verifica-se que embora a levedura FT-858L tenha apresentado maior Índice de Brotamento (Figura 18), não foi observada viabilidade das células em níveis adequados, como se espera de uma levedura para o processo fermentativo.

Mendes (2019) avaliando o uso de fitorregulador e os reflexos no processo fermentativo (genótipos Malibu A1001 e 5010 utilizando a levedura PEDRA-2) observou resultados similares ao presente estudo. Masson (2013) avaliando a fermentação alcoólica de mosto do sorgo sacarino CVSW80007, utilizando a levedura FT-858L, observou viabilidade dos brotos similar ao presente estudo quando não utilizado o etefom. Sendo assim, acredita-se que a levedura PEDRA-2 apresenta melhor adaptação ao processo fermentativo empregando-se mosto preparado de

sorgo sacarino e a levedura FT-858L interferência negativa quando ao uso do fitorregulador.

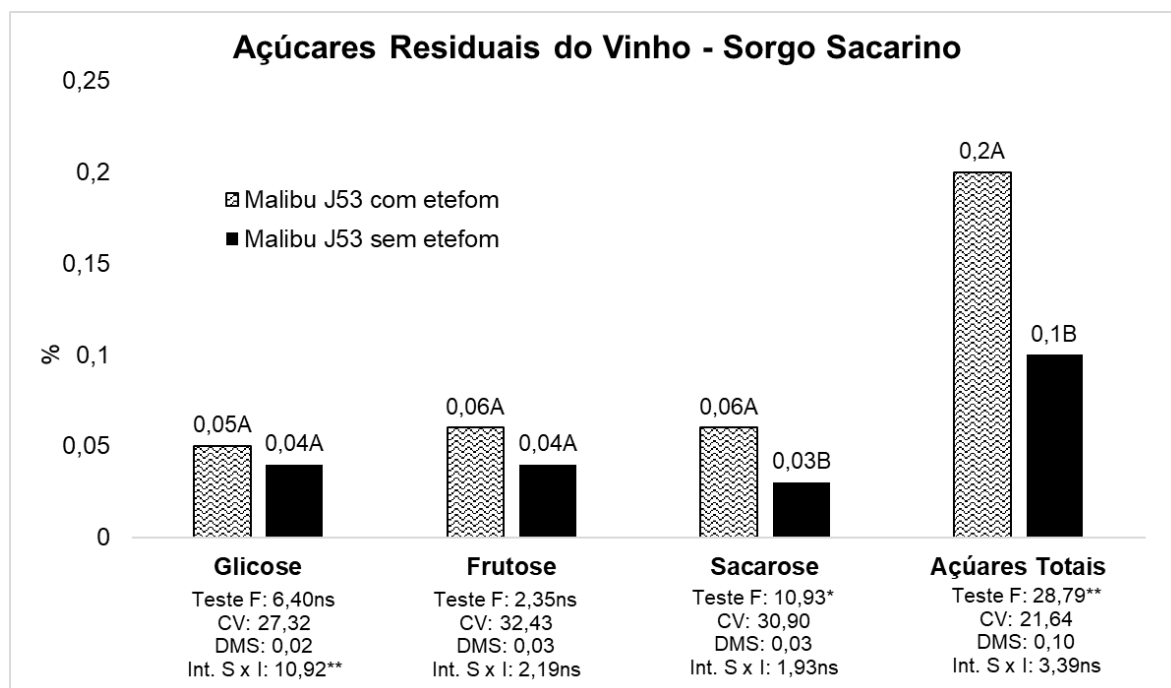
**Tabela 10.** Desdobramento da viabilidade dos brotos (%) ao final do processo fermentativo da interação entre uso de fitorregulador e os inóculos. Safra 2018. Jaboticabal – SP.

| Tratamentos | PEDRA-2 | FT-858L |
|-------------|---------|---------|
| Com etefom  | 95,83Aa | 63,18Bb |
| Sem etefom  | 91,66Aa | 80,63Aa |

Letras maiúsculas nas COLUNAS, letras minúsculas nas LINHAS

### 3.2.5. Vinho

Os vinhos foram quantificados quanto a concentração dos açúcares residuais, sendo que os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 19 e 20. Da análise da Figura 19 (com e sem etefom), observou-se diferença significativa para a porcentagem residual da sacarose e dos açúcares totais, com resultados significativamente inferiores, equivalentes a metade da concentração residual quando foi utilizado o etefom. Essa diferença significativa representa uma concentração de 0,1% dos açúcares residuais totais.



**Figura 19.** Representação gráfica dos valores médios dos Açúcares Residuais (Glicose, Frutose, Sacarose e Total) no vinho e resultados da análise de variância, com e sem etefom. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

Entretanto, a concentração residual de glicose apresentou interação quando se avalia os tratamentos estudados (Tabela 11). Verifica-se que o uso do fitorregulador não promoveu diferença significativa quanto a metabolização deste açúcar para a levedura PEDRA-2. Porém, para o inóculo FT-858L determinou-se maiores teores destes açúcares residuais, especialmente quando se utilizou o fitorregulador.

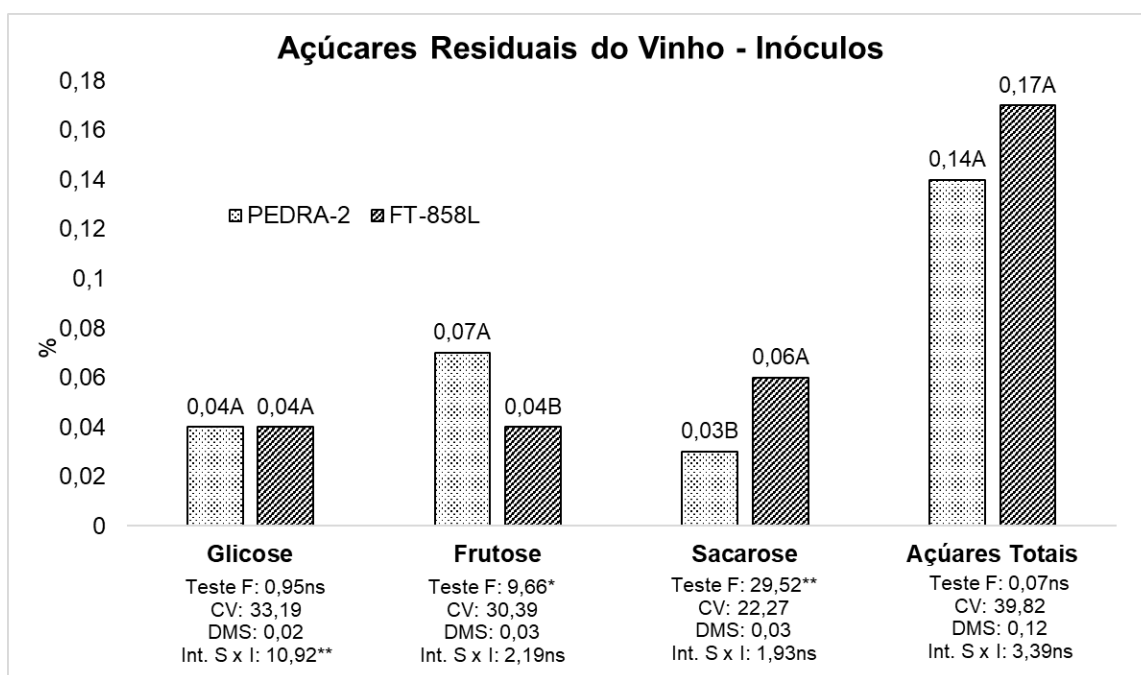
**Tabela 11.** Desdobramento da glicose residual (%) dos vinhos da interação entre uso de fitorregulador e os inóculos. Safra 2018. Jaboticabal – SP.

| Tratamentos | PEDRA-2 | FT-858L |
|-------------|---------|---------|
| Com etefom  | 0,03Aa  | 0,06Aa  |
| Sem etefom  | 0,05Aa  | 0,02Bb  |

Letras maiúsculas nas COLUNAS, letras minúsculas nas LINHAS

Os teores médios de açúcares apresentados pelas leveduras estudadas (Figura 20), não demonstraram diferença significativa, para teores de glicose e açúcares totais residuais. As diferenças foram quantificadas para concentrações de frutose e sacarose residual. Verifica-se ainda que a levedura PEDRA-2 pode ter

apresentado maior metabolização da sacarose, motivo pelo qual se detectou menor concentração ao final do processo fermentativo em comparação a levedura FT-858L. Para a concentração de frutose, tem-se comportamento inverso, com menor concentração residual para a levedura FT-858L. Deve-se destacar que embora essa diferença significativa tenha sido quantificada, estas representam cerca de 0,16%.



**Figura 20.** Representação gráfica dos valores médios dos Açúcares Residuais (Glicose, Frutose, Sacarose e Total) no vinho e resultados da análise de variância, para as leveduras PEDRA-2 e FT-858L. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

A concentração de etanol, teor alcoólico do vinho e o rendimento de etanol estão apresentados na Tabela 12. Da análise dos resultados obtidos, verifica-se que não apresentaram diferenças significativas para os tratamentos avaliados, ou seja, matéria-prima submetida ou não ao uso de fitorregulador e fermentação do mosto com emprego de duas leveduras. Os valores médios quantificados foram de 7,90% de teor alcoólico, composto por 4,59% de etanol, com rendimento de etanol de 5.031,30 L.ha<sup>-1</sup>. Embora tenha sido quantificada concentração significativa de açúcares por ocasião do cultivo da matéria-prima e preparo do mosto, com emprego do fitorregulador, este efeito benéfico não proporcionou maiores rendimentos no processo fermentativo.

Entretanto, quando a matéria-prima sem a aplicação do etefom no cultivo do sorgo sacarino foi processada, é notado rendimento médio 711,92 litros de etanol.ha<sup>-1</sup>

<sup>1</sup> superior. Esta diferença no rendimento está diretamente correlacionada à produtividade da cultura no campo, a qual sem a utilização do fitorregulador no cultivo dos colmos resultou em um maior acúmulo de massa úmida e seca (Figuras 04 e 05).

Em estudos conduzidos por Masson et al (2015) utilizando a mesma metodologia, com o sorgo sacarino CVSW80007 e a levedura FT-858L, apresentaram resultados cujo teor alcoólico foi de 6,33%, com concentração de açúcares residuais menores que os determinados neste estudo. Lozano et al. (2018) em cálculos teóricos sobre o rendimento de etanol, avaliando o uso do fitorregulador identificou potencial estimulado de aumento na produção de etanol. Entretanto, de acordo com os resultados práticos (Tabela 12), o uso do fitorregulador não apresentou diferença significativa.

Com relação a quantidade de etanol, em estudos conduzidos por May et al. (2012) avaliando 4 genótipos de sorgo sacarino (BRS 511, BRS 508, BRS 509 e BRS 506), obteve rendimento máxima de 4.352,51 L.ha<sup>-1</sup>. Neste contexto, destaca-se a rendimento de etanol, obtido neste estudo, utilizando o sorgo sacarino Malibu J53, que apresentou rendimento médio de 678,79 L.ha<sup>-1</sup> superior ao relatado pelos autores. O presente estudo demonstra maior potencial de produção do bioetanol para este genótipo estudado, com rendimentos em teor alcoólico equivalentes aos determinados quando se utiliza cana-de-açúcar como matéria-prima (Freita et al., 2017; Masson et al., 2015; Mutton et al., 2019). Cabe destacar ainda o tempo de cultivo do sorgo sacarino, que é bastante curto, possibilitando a colheita de colmos para produção de etanol com 105 dias após a semeadura. Esta característica é diferente da cana-de-açúcar, que apresenta um ciclo de 12 a 18 meses de cultivo, antecedendo à colheita dos colmos.

**Tabela 12.** Valores médios e resultados da análise de variância para a concentração de Etanol, Teor Alcoólico e Rendimento de Etanol, quanto aos tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

|                    | Etanol<br>(%v.v <sup>-1</sup> ) | Teor Alcoólico<br>(%v.v <sup>-1</sup> ) | Rendimento de Etanol<br>(L.ha <sup>-1</sup> ) |
|--------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Sorgo Sacarino (S) |                                 |                                         |                                               |
| Com etefom         | 4,59A                           | 7,90A                                   | 4675,34A                                      |
| Sem etefom         | 4,60A                           | 7,91A                                   | 5387,26A                                      |
| Teste F            | 0,01ns                          | 0,00ns                                  | 2,43ns                                        |
| CV                 | 6,99                            | 13,14                                   | 22,22                                         |
| DMS                | 0,33                            | 1,09                                    | 1017,11                                       |
| Inóculos (I)       |                                 |                                         |                                               |
| PEDRA-2            | 4,61A                           | 7,94A                                   | 4997,50A                                      |
| FT-858L            | 4,58A                           | 7,87A                                   | 5065,10A                                      |
| Teste F            | 0,09ns                          | 0,09ns                                  | 0,09ns                                        |
| CV                 | 5,29                            | 7,84                                    | 11,10                                         |
| DMS                | 0,22                            | 0,56                                    | 508,38                                        |
| Int. S x I         | 0,81ns                          | 1,50ns                                  | 0,13ns                                        |

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) e ns: não significativo ( $p > 0,05$ ).

A caracterização quanto ao teor de glicerol, pH, acidez total e compostos fenólicos totais estão apresentados na Tabela 13. A concentração de glicerol com relação ao uso do fitorregulador e os diferentes inóculos utilizados no processo fermentativo (Tabela 13) não apresentaram diferença significativa, entretanto estes obtiveram interação entre os tratamentos (Tabela 14).

**Tabela 13.** Valores médios e resultados da análise de variância para a concentração do Teor de Glicerol, pH, Acidez Total e Compostos Fenólicos Totais (CFT) no vinho, quanto aos tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

|                           | Glicerol (%) | pH      | Acidez Total<br>(g.L <sup>-1</sup> H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) | CFT<br>(µg.mL <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------|--------------|---------|---------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| <b>Sorgo Sacarino (S)</b> |              |         |                                                                     |                               |
| Com etefom                | 0,70A        | 3,6B    | 3,28A                                                               | 265,82A                       |
| Sem etefom                | 0,64A        | 3,7A    | 3,33A                                                               | 237,49A                       |
| Teste F                   | 3,28ns       | 9,76*   | 3,51ns                                                              | 3,07ns                        |
| CV                        | 10,35        | 3,36    | 2,27                                                                | 15,74                         |
| DMS                       | 0,07         | 0,13    | 0,07                                                                | 41,59                         |
| <b>Inóculos (I)</b>       |              |         |                                                                     |                               |
| PEDRA-2                   | 0,69A        | 3,6B    | 3,25B                                                               | 256,24A                       |
| FT-858L                   | 0,65A        | 3,8A    | 3,36A                                                               | 247,07A                       |
| Teste F                   | 2,22ns       | 76,22** | 12,38**                                                             | 1,82ns                        |
| CV                        | 11,37        | 1,58    | 2,43                                                                | 6,60                          |
| DMS                       | 0,06         | 0,05    | 0,07                                                                | 15,12                         |
| Int. S x I                | 7,35*        | 3,05ns  | 1,94ns                                                              | 1,69ns                        |

\*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade ( $p < 0,01$ ); \*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) e ns: não significativo ( $p > 0,05$ ).

De acordo com o desdobramento da interação do teor de glicerol (Tabela 14), a levedura FT-858L produziu maior quantidade deste composto quando foi utilizado o etefom no cultivo do sorgo sacarino. Resultados estes, superiores aos apresentados por Deesuth et al. (2015), que em estudos avaliando possíveis melhores condições para a produção de etanol utilizando sorgo sacarino, obteve resultados médios 6,17% inferiores para a concentração de glicerol.

**Tabela 14.** Desdobramento do teor de glicerol (%) dos vinhos da interação entre uso de fitorregulador e os inóculos. Safra 2018. Jaboticabal – SP.

| Tratamentos | PEDRA-2 | FT-858L |
|-------------|---------|---------|
| Com etefom  | 0,68Aa  | 0,72Aa  |
| Sem etefom  | 0,71Aa  | 0,58Bb  |

Letras maiúsculas nas COLUNAS, letras minúsculas nas LINHAS

Para o pH dos vinhos (Tabela 13), com relação ao uso do fitorregulador, foi observado diferença significativa, sendo 0,1 menor quando utilizado este produto no cultivo da cultura. Com relação aos diferentes inóculos utilizados, é observado uma diferença significativa reduzindo o pH em 0,2 quando foi utilizada a levedura PEDRA-2. Entretanto, quando avaliada a acidez total, não foi observado diferença significativa correlacionado ao uso do etefom, com dado médio de  $3,30 \text{ g.L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ . Com relação aos diferentes inóculos utilizados no processo fermentativo, é observada diferença significativa, com maior concentração de ácidos totais ao meio quando utilizada a levedura FT-858L.

Segundo Santos et al. (2017), a levedura FT-858L durante o processo fermentativo do mosto de sorgo sacarino apresenta maior tendência a produção de ácidos ao meio, o qual pode acarretar prejuízos ao inóculo. Sendo assim, acredita-se que pode ter ocorrido um estresse microbiológico decorrente ao uso do fitorregulador no cultivo do sorgo sacarino para a levedura FT-858L, assim como já apresentado a menor viabilidade celular (Figura 18), menor metabolização de glicose (Tabela 11), a maior produção de ácidos e glicerol (Tabela 13). Embora seja observado para o inóculo FT-858L rendimento de etanol equivalente a PE-2 (Tabela 12), essas interferências causadas pelo o fitorregulador poderiam prejudicar a reutilização do inóculo para os próximos processos fermentativos, metodologia usualmente adotada para a produção de etanol.

Para os compostos fenólicos totais presentes no vinho (Tabela 13), não foi verificado uma diferença significativa na concentração dentre os tratamentos avaliados, com resultados médios de  $251,65 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

### **3.2.6. Destilados**

De acordo com as concentrações determinadas para aldeídos, metanol, n-propanol, isopropanol e acetato de etila (Tabela 15), não foram observados efeitos significativos para os tratamentos principais e secundários estudados (Lima, 2019). O destilado resultante apresentou composição com as concentrações médias de  $50,66 \text{ mg.L}^{-1}$  de aldeídos,  $80,13 \text{ mg.L}^{-1}$  de n-Propanol;  $16,02 \text{ mg.L}^{-1}$  de metanol,  $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$  de isopropanol,  $24,90 \text{ mg.L}^{-1}$  de acetato de etila.

Entretanto, com relação as leveduras estudadas no processo fermentativo são observadas diferenças significativas. A levedura PEDRA-2 resultou em uma produção do n-Propanol 29,28% (27,49 mg.L<sup>-1</sup>) superior quando comparada à FT-858L. Este composto alcoólico é o principal constituinte dos Álcoois Superiores, conhecido também como óleo fúsel. A produção deste ocorre de forma natural em pequenas quantidades durante o processo fermentativo, apresentando interação e resultando em maior concentração quando a levedura está sendo exposta a elevadas temperaturas, baixo pH do mosto e o processamento de matérias-primas com maior quantidade de aminoácidos (Cardoso, 2013).

**Tabela 15.** Valores médios para componentes determinados do destilado e resultados da análise de variância para a concentração de Aldeídos, Metanol, Isopropanol, n-Propanol e Acetato de Etila, quanto aos tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

|                    | Aldeídos           | Metanol | Isopropanol | n-Propanol | Acetato de etila |
|--------------------|--------------------|---------|-------------|------------|------------------|
|                    | mg.L <sup>-1</sup> |         |             |            |                  |
| Sorgo Sacarino (S) |                    |         |             |            |                  |
| Com etefom         | 44,57A             | 16,21A  | 0,28A       | 83,53A     | 20,30A           |
| Sem etefom         | 56,74A             | 15,83A  | 0,32A       | 76,74A     | 29,50A           |
| Teste F            | 0,14ns             | 0,01ns  | 0,16ns      | 0,07ns     | 6,94ns           |
| CV                 | 90,06              | 35,1    | 43,42       | 44,66      | 19,84            |
| DMS                | 40,92              | 50,53   | 1,17        | 21,61      | 44,4             |
| Inóculos (I)       |                    |         |             |            |                  |
| PEDRA-2            | 56,26A             | 15,66A  | 0,36A       | 93,88A     | 28,29A           |
| FT-858L            | 45,05A             | 16,37A  | 0,23A       | 66,39B     | 21,51A           |
| Teste F            | 1,59ns             | 0,14ns  | 5,12ns      | 58,58*     | 3,22ns           |
| CV                 | 24,85              | 16,94   | 27,49       | 6,33       | 21,45            |
| DMS                | 38,27              | 8,25    | 0,25        | 15,44      | 16,24            |
| Int. S x I         | 0,71ns             | 0,24ns  | 10,25ns     | 3,68ns     | 4,74ns           |

\*significativo ao nível de 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ) e ns: não significativo ( $p > 0,05$ ).

As determinações da concentração de iso-Butanol, n-Butanol, acetaldeído, iso-Amílico e a soma dos álcoois superiores estão apresentados na Tabela 16. Para esses

álcoois não foram observadas diferenças significativas, considerando-se os tratamentos estudados. O destilado resultante apresentou composição com as concentrações médias de 193,1 mg.L<sup>-1</sup> de iso-Butanol, 14,11 mg.L<sup>-1</sup> de n-Butanol, 4 mg.L<sup>-1</sup> de acetaldeído, 254,42 mg.L<sup>-1</sup> de iso-Amílico e 542,08 mg.L<sup>-1</sup> de álcoois superiores totais.

Cabe destacar que embora a maior produção significativa do principal componente dos álcoois superiores (n-Propanol - Tabela 15) quando utilizada a levedura PEDRA-2, este não apresentou correlação ao aumento significativo dos álcoois superiores totais (Tabela 16). Já para as determinações da concentração de acetona, ciclohexano, benzeno e crotonaldeído dos destilados simples (Tabela 17), estes não apresentaram concentração na faixa de detecção do equipamento utilizado.

**Tabela 16.** Valores médios para componentes determinados do destilado e resultados da análise de variância para a concentração de Iso-butanol, n-Butanol, Acetaldeído, Iso-amílico e Álcoois Superiores Totais, quanto aos tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

|                    | iso-Butanol | n-Butanol | Acetaldeído<br>mg.L <sup>-1</sup> | iso-Amílico | Álcoois<br>Superiores Totais |
|--------------------|-------------|-----------|-----------------------------------|-------------|------------------------------|
| Sorgo Sacarino (S) |             |           |                                   |             |                              |
| Com etefom         | 190,99A     | 11,66A    | 3,44A                             | 240,77A     | 527,25A                      |
| Sem etefom         | 195,21A     | 16,57A    | 4,56A                             | 268,07A     | 556,92A                      |
| Teste F            | 0,11ns      | 17,46ns   | 0,10ns                            | 1,62ns      | 0,24ns                       |
| CV                 | 9,5         | 11,76     | 122,42                            | 11,93       | 15,87                        |
| DMS                | 164,85      | 14,92     | 44,02                             | 272,89      | 773,08                       |
| Inóculos (I)       |             |           |                                   |             |                              |
| PEDRA-2            | 209,69A     | 13,97A    | 4,55A                             | 255,88A     | 573,78A                      |
| FT-858L            | 176,52A     | 14,27A    | 3,45A                             | 252,96A     | 510,38A                      |
| Teste F            | 6,25ns      | 0,00ns    | 1,87ns                            | 0,01ns      | 2,52ns                       |
| CV                 | 9,71        | 69,64     | 28,42                             | 13,27       | 10,41                        |
| DMS                | 57,05       | 29,89     | 3,45                              | 102,68      | 171,61                       |
| Int. S x I         | 0,59ns      | 0,01ns    | 0,28ns                            | 0,46ns      | 0,00ns                       |

ns: não significativo (p> 0,05).

**Tabela 17.** Valores médios para componentes determinados do destilado e resultados da análise de variância para a concentração de Acetona, Ciclohexano, Benzeno e Crotonaldeído, quanto aos tratamentos estudados. Safra 2018. Jaboticabal, SP.

|                    | Acetona | Ciclohexano | Benzeno | Crotonaldeído |
|--------------------|---------|-------------|---------|---------------|
| mg.L <sup>-1</sup> |         |             |         |               |
| Sorgo Sacarino (S) |         |             |         |               |
| Com etefom         | n.d.    | n.d.        | n.d.    | n.d.          |
| Sem etefom         | n.d.    | n.d.        | n.d.    | n.d.          |
| Inóculos (I)       |         |             |         |               |
| PEDRA-2            | n.d.    | n.d.        | n.d.    | n.d.          |
| FT-858L            | n.d.    | n.d.        | n.d.    | n.d.          |

n.d.: não detectável.

#### 4. CONCLUSÕES

- Conclui-se que o uso do fitorregulador no cultivo do sorgo sacarino Malibu J53 apresentou redução no tamanho e massas (úmida e seca) dos colmos, com pequeno crescimento no acúmulo de açúcares;
- A aplicação do etefom não restringiu a formação da panícula, apenas tardou o crescimento, resultando em uma panícula de menor tamanho;
- O uso do fitorregulador não apresentou acréscimo significativo para a produção de etanol, além de interação negativa com a levedura FT-858L;
- A levedura PEDRA-2 apresentou melhor adaptabilidade para a fermentação alcoólica do mosto de sorgo sacarino;
- As composições dos destilados são similares para os tratamentos avaliados, exceto para o n-Propanol;

#### 5. REFERÊNCIAS

Amorim HV de (2005) Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia. Piracicaba: Fermentec.

Andrioli I, Centurion JF (1999) Levantamento detalhado dos solos da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO Anais. Jaboticabal: CBCS.

Barbosa JC, Madonado Junior W (2015) Experimentação Agronômica & AgroEstat - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos. Jaboticabal: FUNEP. 396 p.

Cardoso M das G (2013) Produção de aguardente de cana. 3o ed. Lavras: Editora UFLA. 340 p.

Cole MR, Eggleston G, Gilbert A, Chung YJ (2016) Development of an analytical method to measure insoluble and soluble starch in sugarcane and sweet sorghum products. **Food Chemistry** 190:50–59.

Cole MR, Eggleston G, Petrie E, Uchimiya SM, Dalley C (2017) Cultivar and maturity effects on the quality attributes and ethanol potential of sweet sorghum. **Biomass and Bioenergy** 96:183–192.

Costa GHG, Missima JO, Teixeira V Mutton MA, Mutton MJR (2018) Efeito da temperatura e do pH no tratamento do caldo de sorgo sacarino. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente** 11:53-69.

CTC – Centro de Tecnologia Canavieira (2009) Manual de métodos de análises para açúcar. Centro de Tecnologia Canavieira.

Deesuth O, Laopaiboon P, Klanrit P, Laopaiboon L (2015) Improvement of ethanol production from sweet sorghum juice under high gravity and very high gravity conditions: Effects of nutrient supplementation and aeration. **Industrial Crops and Products** 74:95–102.

Eggleston G, Wartelle L, Zatlokovicz J, Petrie E, Cole M, Cyr ES (2017) Processing Attributes and Performance of Sweet Sorghum Biomass for Large-Scale Biorefineries: A 1-Year Comparison of Commercial Hybrids and a Cultivar. **Sugar Tech** 20:336–346.

EMBRAPA - Empresa brasileira de pesquisa agropecuária (2015) Sorgo: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília: Embrapa Milho e Sorgo. 327 p.

Fermentec (2003) Métodos analíticos para o controle da produção de açúcar e álcool. 3. ed. Piracicaba: Fermentec.

Fermentec (2020) Leveduras com habilidade melhorada que apresentam alta persistência e dominância. Disponível em: <<https://www.fermentec.com.br/capa.asp?p=259>>. Acesso em: 25 fev. 2021.

Fernandes AC (2011) Cálculos na Agroindústria da Cana-de-Açúcar. 3a ed.

Freita CM de, Freita LA de, Tralli LF, Silva AF, Mendes FQ, Teixeira V, Mutton MJR (2017) Bioethanol production with different dosages of the commercial acrylamide polymer compared to a bioextract in clarifying sugarcane juice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 89:3093-3102.

Fortes C, Carreira SAM, Donegá, M. (2016) Aplicação de etefom em sorgo sacarino (*Sorghum bicolor*) visando qualidade tecnológica da matéria-prima. In: ANAIS DO X CONGRESSO NACIONAL DA STAB, Anais. Disponível em: [http://www.stab.org.br/congresso\\_nacional\\_stab/ed\\_atual.html](http://www.stab.org.br/congresso_nacional_stab/ed_atual.html)

Han LP, Wang X, Guo X, Rao MS, Steinberger Y, Cheng X, Xie GH (2011) Effects of plant growth regulators on growth, yield and lodging of sweet sorghum. **Research on Crops** 12:372–382.

Köppen W. (1948) Climatologia: con un estudio de los climas de la tierra. Mexico: Fondo de Cultura Económica, 478 p.

Lee SS, Robinson FM, Wang HY (1981) Rapid determination of yeast viability. Biotechnology and bioengineering symposium Anais v. 11.

Lima U de A (2019) Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos (Volume 3). 2º ed. São Paulo: Clucher, 745 p.

Lingle SE, Tew TL, Rukavina H, Boykin DL (2013) Post-harvest Changes in Sweet Sorghum II: pH, Acidity, Protein, Starch, and Mannitol. **Bioenergy Research** 6:178–187.

LNF - Latino-americana (2020) Leveduras selecionadas. Disponível em: <[https://lnf.com.br/downloads/leveduras\\_selecionadas.pdf](https://lnf.com.br/downloads/leveduras_selecionadas.pdf)>. Acesso em: 25 fev. 2021.

Lozano E do V, Blanco LM, Alcantara GU, Nogueira LC, Ciaramello S, Costa GHG (2018) Effect of application of flowering inhibitor on sweet sorghum. **African Journal of Agricultural Research** 13:196–201.

Magalhães RT, Gonçalves LC, Borges I, Rodrigues JAS, Fonseca JF (2010) Produção e composição bromatológica de vinte e cinco genótipos de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 62:747–751.

Martins KC (2017) Morfofisiológicos, produtividade agrícola e qualidade tecnológica de híbridos de sorgo com aplicação de inibidor de florescimento. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia agrônoma) – UNESP, Jaboticabal.

Masson I dos S (2013) Produção de bioetanol a partir da fermentação de caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar. 51 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – UNESP, Jaboticabal.

Masson I dos S, Costa GHG, Roviero JP, Freita LA de, Mutton MA, Mutton MJR (2015) Produção de bioetanol a partir da fermentação de caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar. **Ciência Rural** 45:1695–1700.

May A, Durães FOM, Pereira Filho IA, Schaffert RE, Parrella RA da C (2012) Inserção e expansão do sorgo sacarino para produção agroindustrial de etanol 1G âmbito do plano agrícola e pecuário 2013/14. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 120 p.

Mendes F Q (2019) APLICAÇÃO DE ETEFOM EM GENÓTIPOS DE SORGO SACARINO E SEUS REFLEXOS NA PRODUÇÃO DE BIOETANOL. 77 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agropecuária) – UNESP, Jaboticabal.

Mutton MJR, Ferrari FCS, Freita LA de, Freita CM de, Andrietta M da GS, Andrietta SR (2019) Interaction between the production of ethanol and glycerol in fed-batch bioreactors. **Brazilian Journal of Microbiology** 50:389–394.

Niphadkar S, Bagade P, Ahmed S (2017) Bioethanol production: insight into past, present and future perspectives. **Biofuels** 9:229–238.

Nogueira LC, Alcântara GU, Ciaramello S, Lozano E do V, Costa GHG (2017) O desenvolvimento de sorgo sacarino cultivado em latossolo amarelo distrófico. In: SINTOAGRO. Resumos.

Novozymes (2020a) Novozymes Termamyl® 2X. Disponível em: <<https://biosolutions.novozymes.com/en/grain-starch/products/liquefaction/termamyl-2x>>. Acesso em: 25 fev. 2021.

Novozymes (2020b) Novozymes Secura - The most robust beta amylase. Disponível em: <<https://biosolutions.novozymes.com/en/plant-protein/products/secura>>. Acesso em: 25 fev. 2021.

Ravaneli GC, Garcia DB, Madaleno LL, Mutton MA, Stupiello JP, Mutton MJR (2011) Spittlebug impacts on sugarcane quality and ethanol production. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira** 46:120–129.

Santos MDSM, Souza EF de, Amorim MG de, Ramos TCPM, Santos MN, Kurihara CH, Silva CJ da, Batistote M (2017) Análise da capacidade fermentativa de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* industriais em caldo de sorgo sacarino. In: VI SIMPÓSIO DE BIOQUÍMICA E BIOTECNOLOGIA 2017, Anais. Londrina: SBBD.

Schaffert R, Parrella RA da C (2012) Planejamento industrial. In: May A, Durães FOM, Pereira Filho IA, Schaffert RE, Parrella RA da C (Eds.). **Sistema Embrapa de produção agroindustrial de sorgo sacarino para bioetanol: Sistema BRS1G-Tecnologia Qualidade Embrapa**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, p. 85–92.

Silva AF, Ferreira OE, Costa GHG, Montijo NA, Mutton MA, Mutton MJR (2016) Technological quality of sweet sorghum processed without panicles for ethanol production. **Australian Journal of Crop Science** 10:1578–1582.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-raventós RM (1999) Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology** 299:152–178.

Taiz L, Zeiger E (2010) Plant Physiology. 5. ed. Porto Alegre: Artmed. 719 p.

Teixeira TPM (2017) Estudo da maturação e ponto de colheita em materiais de sorgo destinados à bioenergia. 73 f. Dissertação (Mestrado) – UFV, Lavras.

Umakanth AV, Kumar AA, Vermerris W, Tonapi VA (2019) Sweet Sorghum for Biofuel Industry. **Breeding Sorghum for Diverse End Uses**, p. 255–270.

UNICA, - União da indústria de cana-de-açúcar. **Acompanhamento da safra - Cana-de-açúcar**. Disponível em: <<http://unicadata.com.br/listagem.php?idMn=63>>. Acesso em: 25 fev. 2021.

### **CAPÍTULO 3 – Produção de etanol e otimização do processo utilizando grãos de sorgo granífero**

**RESUMO** - Os grãos de sorgo apresentam elevada concentração de compostos amiláceos, que através de processos enzimáticos, podem ser convertidos em açúcares e ser utilizados em processos fermentativos e/ou suplementação de açúcares. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi a avaliação e viabilização do processo enzimático e fermentativo, em escala laboratorial, objetivando o uso de grãos de sorgo granífero (branco e roxo) como matéria-prima para produção de etanol. Neste estudo, foi realizado a caracterização dos grãos, otimização do tratamento enzimático e a fermentação alcoólica. Foi observado elevada concentração de compostos amiláceos para os farelos roxo (45,56% superior) e branco. De acordo com o tratamento enzimático realizado, a hidrólise do amido e o aumento dos açúcares foram quase totais na primeira etapa com o tratamento físico e uso do TSC ( $\alpha$ -amilase), não sendo observado aumento significativo com o uso da segunda etapa do processo enzimático (Promozyme e Viscozyme). Foram obtidas concentração de açúcares de 4,84% para o farelo roxo e 4,05% para o farelo branco. Decorrente a formação de aglomerados de farelos, especialmente ao farelo roxo, o processo enzimático não foi totalmente realizado no tempo avaliado. Sendo assim, ao longo do processo fermentativo, ocasionou na disponibilização de mais açúcares ao meio, obtendo-se concentração de etanol 5,28% para o farelo roxo e 6,98% para o farelo branco. Sendo assim, conclui-se que os farelos roxo e branco de sorgo granífero apresentam elevado potencial para aplicabilidade para processos fermentativos e o tratamento físico (temperatura) e a enzima  $\alpha$ -amilase apresentam potencial para ser utilizados para os farelos roxo e branco de sorgo granífero.

**Palavras-chave:** Termamyl SC, Promozyme, Viscozyme, Hidrólise Enzimática, Fermentação alcoólica.

## 1. INTRODUÇÃO

O sorgo é planta da família *Poaceae*, do gênero *Sorghum*, e da espécie *Sorghum bicolor* (L.) Moench. É originária da África, provavelmente da região da Etiópia e do Sudão. Existem diferentes tipos de sorgo, sendo estes sacarino, granífero, forrageiro, vassoura e biomassa (Ribas, 2007). O sorgo granífero possui grande importância econômica no Brasil, sendo utilizado como substituto do milho em rações animais, principalmente para aves e suínos decorrente do valor ser inferior ao do milho (Coelho et al., 2002).

A planta é composta por caule do tipo colmo, dividido em nós, entrenós e folhas ao longo de toda a planta. Apresenta inflorescência, com formação da panícula e o fruto, o qual é uma cariopse ou grão seco, possuindo espécies anuais e espécies vivazes. Uma forma de utilizar os grãos de sorgo é por meio da produção de farinha, que pode substituir parcialmente a farinha de trigo na confecção de vários produtos. Sendo estas, com elevada concentração de compostos amiláceos.

O amido, presente nos grãos, é um carboidrato composto por dois polissacarídeos: a amilose e a amilopectina. A amilose possui cadeia simples composta de ligações alfa-1,4. Já a amilopectina, além de ligações alfa-1,4 (linear), possui também ligações alfa-1,6 (ramificada). Com a utilização de enzimas, através de um tratamento adequado, o amido é degradado em cadeias menores de carboidratos, gerando maltose e glicose, os quais são fermentescíveis pela levedura para formação do etanol (Porto, 2011).

Estas farinhas ricas em açúcares poderiam ser utilizadas como matéria-prima para processos fermentativos e/ou suplementação de açúcares junto ao processamento de outras culturas, tal como o sorgo sacarino. Em estudos apresentados por Cole et al. (2019), estas farinhas apresentam elevado potencial de uso. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi a avaliação e viabilização do processo enzimático e fermentativo, em escala laboratorial, objetivando o uso de grãos de sorgo granífero (branco e roxo) como matéria-prima para produção de etanol.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta das amostras**

Na safra de 2018, além do cultivo dos genótipos de sorgo sacarino, foram cultivados na fazenda Heckemeyer dois genótipos de sorgo granífero, sendo estes os do tipo roxo e branco. As sementes foram plantadas no dia 20 de maio de 2018 e colhidas no início de outubro, colhidas com uma colhedora John Deere 8840 grãos. As sementes foram acondicionadas e posteriormente limpas com um limpador de sementes Clipper M-2B (AT Ferrel & Co.) e moídas utilizando um moinho de facas rotativas (Meadows Mill), obtendo-se o farelo de grãos de sorgo granífero roxo e branco. Foram coletadas duas amostras de cada farelos separadamente no 16/12/2018 e encaminhados para o Audubon Sugar Institute – LSUAgCenter (St. Gabriel, LA – EUA) onde mantiveram-se armazenados a temperatura ambiente.

### **2.2. Análise de resultados**

O experimento foi conduzido em triplicata e os resultados obtidos expressos de acordo com média simples, dentre as repetições, com expressão do coeficiente de variação (CV).

### **2.3. Caracterizações dos farelos de grãos de sorgo granífero roxo e branco**

Os farelos obtidos foram analisados quanto a:

- Concentração de proteína ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ): A concentração de proteína nos diferentes farelos foram realizados de acordo com a metodologia descrita por He (2011). As leituras foram realizadas num espectrofotômetro UV-vis (Genesys 10S, ThermoScientific, Waltham, MA), com absorbância de 595nm. Uma curva padrão foi gerada utilizando seis níveis de concentrações (0, 1, 2, 4, 8 e  $16\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Todas as determinações foram realizadas em triplicata.
- Distribuição granulométrica das partículas ( $\mu\text{m}$ ): Os tamanhos das partículas foram mensurados utilizando o equipamento Mastersizer 3000 (Malvern Panalytical Ltd, Malvern - Inglaterra), com abrangência de partículas de  $0,01\mu\text{m}$

- 3500 $\mu$ m, com o software Mastersizer - v3.63. As amostras foram diluídas em Álcool Isopropílico (P.A.) e realizada a leitura das amostras em triplicata, com agitação e injeção constante.
- Teor de amido (Total, Insolúvel e Solúvel - ppm.Brix<sup>-1</sup>): A determinação do teor de amido total, insolúvel e solúvel foi medido de acordo com o novo método de pesquisa de amido do USDA (Cole et al., 2016). No qual, este é assistido pela quebra do amido através de temperatura e diferentes frequências de ultrassons, filtragem das amostras (0,45 $\mu$ m) desenvolvido para quantificação do amido total. Em contrapartida, é mensurado o amido solúvel, com leitura das amostras filtradas (0,45 $\mu$ m), no qual, através da subtração do amido total, é determinado o amido insolúvel. As leituras foram realizadas num espectrofotômetro UV-vis (Genesys 10S, ThermoScientific, Waltham, MA), com absorbância de 600nm. Uma curva padrão foi gerada utilizando oito níveis de amido de milho (0, 7, 15, 30, 60, 125, 250 e 500 ppm). Todas as determinações foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em ppm.Brix<sup>-1</sup>.

#### **2.4. Tratamento enzimático dos farelos de grãos de sorgo granífero roxo e branco**

Ambos os farelos dos grãos de sorgo granífero (roxo e branco) foram submetidos a um tratamento enzimático, em triplicata, adaptado de Cole et al. (2019). Foram preparadas 600mL de cada amostra, em Erlenmeyer de 2 litros, na concentração de 18% (peso seco.volume<sup>-1</sup>) utilizando uma solução tampão de acetato 0,1M, com pH de 5,5. Os frascos contendo as soluções foram esterilizados em uma autoclave (15 minutos, 121°C e pressão de 1 atm) e tratadas com um coquetel enzimático objetivando a quebra do amido e outros polímeros de açúcar em suas formas monoméricas fermentáveis. O tratamento enzimático ocorreu em duas etapas.

A primeira etapa, posterior a esterilização das amostras, os frascos foram mantidos em shaker em banho-maria por 30 minutos, temperatura de 80°C e 200rpm. Posteriormente, ocorreu a adição da enzima Termamyl SC (TSC) ( $\alpha$ -amilase) na concentração de 0,45mg.g de farelo<sup>-1</sup>, mantendo-se a solução por 90 minutos, nas mesmas condições. A segunda etapa do processo enzimático ocorreu com a adição

de 0,50mg.g de farelo<sup>-1</sup> da enzima Promozyme D6 (pululanase) e 0,105mg.g de farelo<sup>-1</sup> da Viscozyme L ( $\beta$ -glucanase e carboidrase), mantendo-se a solução por mais 90 minutos à 200rpm, entretanto na temperatura de 60°C. Durante o processo de hidrólise foram coletadas amostras com 15, 30, 45, 60 e 90 minutos para cada etapa do processo. Cabe ressaltar, que as concentrações e temperaturas ideais estavam de acordo com o recomendado para todas as enzimas utilizadas no presente estudo (Cole et al., 2019) e os sistemas de adição e coleta de amostras ocorreram em câmara de inoculação para evitar contaminação microbiana nas soluções.

As amostras obtidas durante o processo enzimático foram analisadas quanto à concentração de:

- Teor de amido (Total, Insolúvel e Solúvel - ppm.Brix<sup>-1</sup>): Descrito no item 2.3.
- Açúcares (Sacarose, glicose, maltose e frutose): As concentrações dos açúcares (Glicose, Frutose, Maltose e Sacarose) foram determinadas por HPLC utilizando o equipamento Thermo Scientific Dionex ICS 5000+, usando um hidróxido de sódio 100mM (NaOH) e acetato de sódio 0-300mM (NaOAc) em 100mM de gradiente de NaOH ao longo de 10 minutos. Os eluentes foram preparados diluindo NaOAc de qualidade HPLC e solução de NaOH a 50% p.p-1 com água deionizada a 18 M $\Omega$ . Os compostos foram separados em uma coluna analítica da Thermo Scientific CarboPac PA 100 (250x2mm) e em uma coluna de proteção (50 x 2 mm) a 30°C. Caudal = 0,4 mL.min<sup>-1</sup>. Volume de injeção de 10  $\mu$ L. A detecção foi realizada com uma célula detectora eletroquímica equipada com eletrodos de referência Au e Ag/AgCl. Um autoinjeter/amostrador automático refrigerado Dionex AS-AP foi usado para evitar a degradação de açúcares nas amostras enquanto se aguardava a injeção na coluna. O software de cromatografia Thermo Scientific Chromeleon 7 foi usado para acumular várias amostras e padrões. Os açúcares foram identificados comparando os tempos de retenção com os padrões.
- Etanol: A concentração de etanol foi obtida através de cromatografia líquida Agilent 1200, usando água deionizada de 18 M $\Omega$  como eluente durante 25 minutos. O composto foi separado na coluna analítica Bio-Rad Aminex HPX-87P (300 x 7,8 mm) e nas colunas de proteção de remoção de cinzas (30 x 4,6 mm) a 80°C. Caudal = 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. Volume de injeção = 20  $\mu$ L. A detecção

foi com um detector de índice de refração a 45°C. Um autoinjeter/amostrador automático refrigerado foi usado para evitar a degradação das amostras enquanto se aguardava a injeção na coluna. O software de cromatografia Agilent OpenLab foi usado para acumular várias amostras e padrões. O etanol foi identificado pela comparação dos tempos de retenção com os padrões.

## **2.5. Processo fermentativo dos farelos**

### **2.5.1. Identificação e isolamento da levedura**

A levedura selecionada para o processo fermentativo foi uma *Saccharomyces cerevisiae* comercial (High Spirits Turbo 24) obtida na forma liofilizada, sendo esta a mesma utilizada para a fermentação alcoólica da Heckemeyer Biorefinery.

O processo iniciou-se com a hidratação das células, utilizando 1 grama da levedura seca em 10mL de tampão de acetato 0,1 M (mantido a 30°C, 130 rpm, por 30 minutos). Em seguida, a solução foi avaliada quanto a presença de microrganismos contaminantes através de características fisiológicas, utilizando-se um microscópio de bancada. De acordo com a avaliação morfológica, foram determinadas a presença de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (o microrganismo de interesse) e bactérias (Cocos e Bastonete).

Com uma cultura impura, o isolamento da *Saccharomyces cerevisiae* foi realizado utilizando a técnica de plaqueamento por esgotamento em triplicata, utilizando placas de Petri com o meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA) (Difco, Sparks, MD - USA), inoculado a 30°C por 48 horas. Após o período de crescimento das colônias, foram identificadas duas diferentes cepas. De acordo com as características das colônias e auxílio do microscópio (aspecto morfológico dos microrganismos), foi possível identificar a levedura de interesse.

### **2.5.2. Multiplicação e preparo da solução estoque de levedura**

Foram coletadas 3 colônias e individualmente inoculadas em erlenmeyers de 250mL, contendo 100mL de PDB (30°C, 130 rpm, por 48 horas). Após às 48 horas, as soluções foram transferidas para erlenmeyers de 1L, contendo 200mL de PDB

(30°C, 130 rpm, por 48 horas). Posteriormente, o processo de multiplicação foi fracionado em novos frascos adicionando-se mais meio de cultura PDB (400mL, e 3 vezes de 600mL).

Durante todo o processo, foi realizada a avaliação da presença de microrganismos contaminantes como descrito anteriormente (item 2.5.1.) Quando detectado a presença, os frascos foram descartados. Cabe destacar, que os sistemas de inoculação e alimentação ocorreram em câmara de inoculação para evitar contaminação microbiana nas soluções, os meios de culturas e vidrarias foram esterilizados previamente a utilização dos mesmos, utilizando uma autoclave (15 minutos, 121°C e pressão de 1 atm).

O preparo da solução estoque iniciou-se com a recuperação da levedura através de centrifugação a 5000 rpm por 20 minutos e temperatura de 15°C. Toda a massa do inóculo obtida no processo de crescimento foi acondicionado em uma única garrafa de centrifuga. A massa celular acumulada no fundo da garrafa foi tratada três vezes com água deionizada, sendo esta ocorrendo com a adição de ~50mL de água esterilizada, agitação manual e centrifugação (nas mesmas condições previamente descritas), para remover todas as células mortas e compostos que pudessem ser prejudiciais ao fermento. Em seguida, a massa celular de levedura foi suspensa em 25mL de tampão de acetato 0,1M, obtendo-se a solução estoque de levedura.

A determinação das células viáveis da solução estoque de levedura foi realizada pelo método de plaqueamento, utilizando-se placas de Petri com o meio Plate Count Agar (PCA) (Difco, Sparks, MD - USA), com diluição seriada e em duplicata, inoculados a 30°C por 48 horas. Foi determinado que a solução estoque apresentava concentração de  $2,65 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

### **2.5.3. Fermentação alcoólica dos farelos**

Os substratos obtidos do processo enzimático foram submetidos a fermentação alcoólica. Utilizando-se o mesmo erlenmeyer da etapa anterior (Descrito no item 2.4.), a levedura em estoque (Descrito no item 2.5.2.) foi inoculada na concentração de  $10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, mantendo-se a triplicata. O processo fermentativo foi conduzido utilizando-se o sistema de batelada de única alimentação. Os frascos foram mantidos em shaker sob agitação e temperatura controlada, 130 rpm e 30°C, respectivamente. Durante

ambos os processos fermentativos realizados, foram coletadas amostras no tempo 0, 3, 6, 12, 24 e 48 horas, utilizando-se uma câmara de inoculação para evitar a contaminação microbiana. As amostras foram analisadas quanto as concentrações de:

- Açúcares (sacarose, glicose, maltose e frutose): Descrito no item 2.4.
- Etanol: Descrito no item 2.4.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Caracterização dos farelos de grãos de sorgo granífero roxo e branco

Os resultados da caracterização dos farelos dos grãos de sorgo granífero roxo e branco quanto ao teor de amido (Solúvel, Insolúvel e Total) estão apresentados na Tabela 01. De acordo com os dados médios obtidos, ambas as amostras apresentam uma concentração de amido insolúvel superior ao solúvel, este resultado era esperado decorrente ao tipo de amostra trabalhada. Dentre os diferentes farelos, é notado para o roxo uma maior concentração de amido, principalmente para a concentração do amido total (45,56% superior). Este resultado é de suma importância, sendo que o objetivo da hidrólise enzimática é disponibilizar os açúcares da composição do amido, a qual resultará em maior produtividade em etanol por farelo utilizado.

**Tabela 01.** Caracterização físico-química dos farelos roxo e branco de sorgo granífero quanto a concentração de Amido Solúvel, Insolúvel e Total. Médias simples calculadas dentre as repetições e expressão do coeficiente de variação (CV).

|               | Teor de Amido (ppm.Brix <sup>-1</sup> ) |                                     |                                 | CV (%) |
|---------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|--------|
|               | Solúvel (ppm.Brix <sup>-1</sup> )       | Insolúvel (ppm.Brix <sup>-1</sup> ) | Total (ppm.Brix <sup>-1</sup> ) |        |
| Farelo roxo   | 54.887,40                               | 1.362.398,70                        | 1.436.439,17                    | 10,09  |
| Farelo branco | 95.589,06                               | 654.354,33                          | 781.867,86                      | 10,35  |

A distribuição granulométrica das partículas dos farelos roxo e branco estão apresentados na Tabela 02. O farelo roxo apresentou um maior tamanho das partículas em todas as características determinadas, sendo estas as médias de 10%

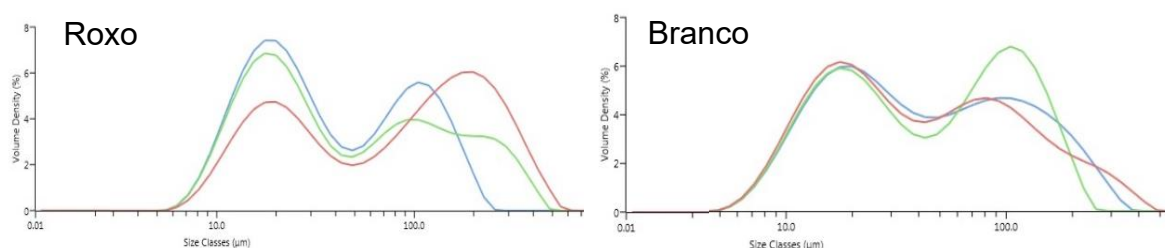
das partículas menores, média de 50% das partículas e média de 10% das maiores. Consequentemente, o tamanho médio das partículas foi 19,9 $\mu\text{m}$  superior, em comparação com a farelo branco.

Além da maior granulometria observado para o farelo roxo (Tabela 02), este farelo apresentou uma maior variação nos resultados, os quais foram realizados em triplicata, observado de acordo com os coeficientes de variação de cada resultado, mostrando uma maior diferença de tamanhos presentes na amostra em comparação com a farelo branco, representado na Figura 01. Sendo assim, os grãos brancos além de apresentar um tamanho médio inferior, obteve menor variação dentre os tamanhos.

**Tabela 02.** Caracterização físico dos farelos roxo e branco de sorgo granífero quanto a distribuição granulométrica das partículas. Médias simples calculadas dentre as repetições com expressão do coeficiente de variação (CV).

|               | Distribuição granulométrica das partículas |                   |                   |                   | CV (%) |
|---------------|--------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------|
|               | D 10%                                      | D 50%             | D 90%             | Média             |        |
|               | ( $\mu\text{m}$ )                          | ( $\mu\text{m}$ ) | ( $\mu\text{m}$ ) | ( $\mu\text{m}$ ) |        |
| Farelo roxo   | 12,6                                       | 52                | 215,7             | 86,2              | 38,02  |
| Farelo branco | 11,8                                       | 40                | 159,3             | 66,3              | 7,17   |

D 10%: 10% das partículas estavam até aquele tamanho; D 50%: 50% das partículas estavam até aquele tamanho; D 90%: 10% das partículas eram maiores do que este tamanho.



**Figura 01.** Representação gráfica da leitura em triplicata dos farelos roxo e branco quando a distribuição granulométrica das partículas ( $\mu\text{m}$ ).

A determinação da concentração de proteína nos farelos roxo e branco estão apresentados na Tabela 03. Para ambas as amostras, farelo de sorgo granífero roxo e branco, foram observados resultados próximos para a concentração de proteína, sendo estas de 590,71 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  e 595,99 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ , respectivamente. A proteína presente na composição do farelo pode resultar em inibição enzimática, decorrente a formar

ligações químicas com as enzimas, interferindo negativamente na atividade catalítica com o amido durante o processo de hidrólise, principalmente para a atividade enzimática da TSC ( $\alpha$ -amilase).

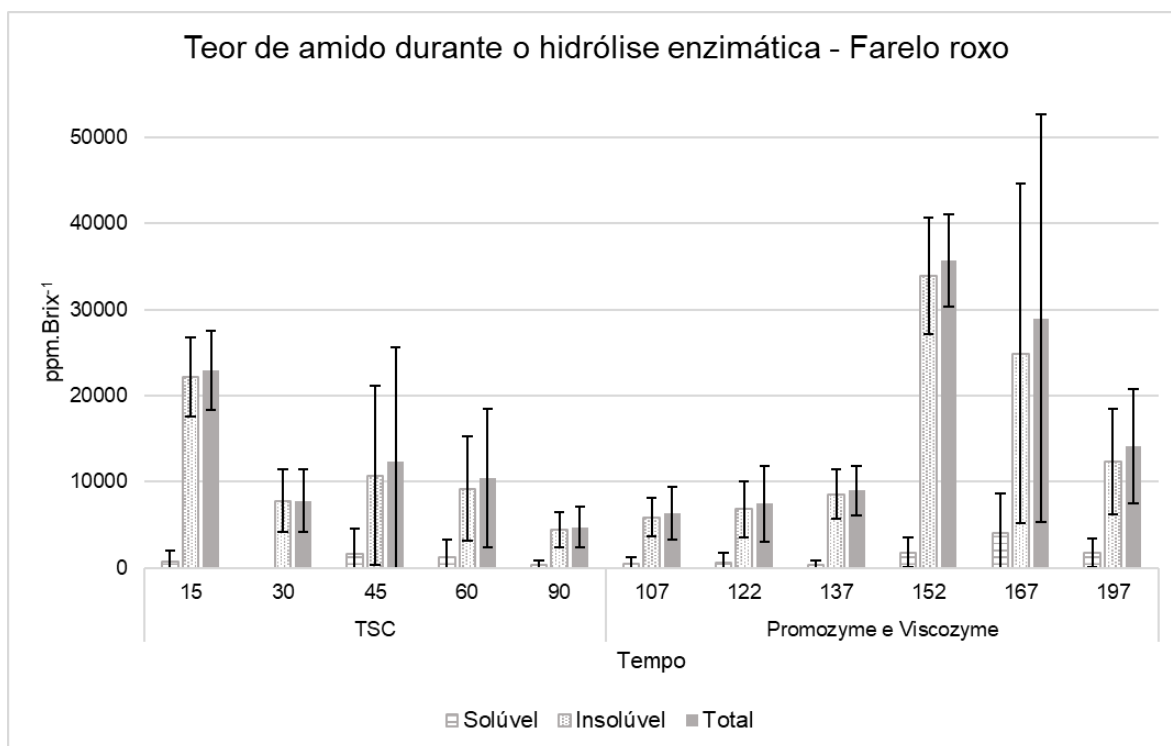
**Tabela 03.** Caracterização físico-química dos farelos roxo e branco de sorgo granífero quanto a concentração de proteína. Médias simples calculadas dentre as repetições, com expressão do coeficiente de variação (CV).

|               | Concentração de proteína<br>( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) | CV<br>(%) |
|---------------|-------------------------------------------------------|-----------|
| Farelo roxo   | 590,71                                                | 0,05      |
| Farelo branco | 595,99                                                | 1,23      |

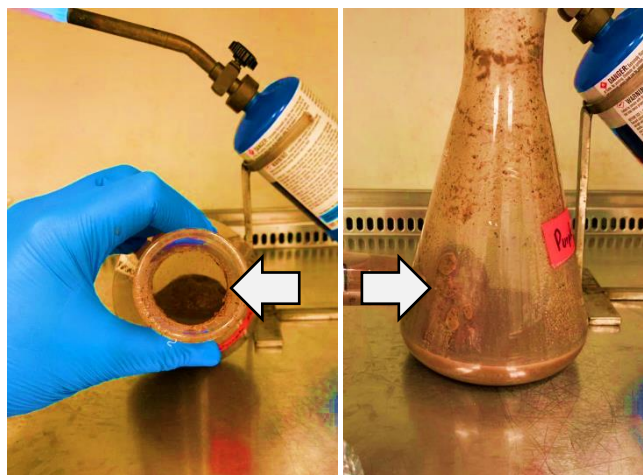
### 3.2. Tratamento enzimático dos farelos

Os resultados do processo de hidrólise do amido do farelo roxo quanto ao teor de amido, sendo estes solúvel, insolúvel e total, ao longo das duas etapas estão representados na Figura 02. De acordo com os dados médios obtidos, o processo de quebra do amido foi inconsistente, sendo esperado uma redução gradativa dos teores de amido ao longo do tempo de hidrólise em ambas as etapas. É possível observar uma grande variação entre os mesmos momentos da hidrólise, representado pelo erro padrão, calculado com o coeficiente de variação. Principalmente aos 152 minutos, já na segunda etapa, com a elevação da concentração e depois reduzindo novamente.

Essa variação dos resultados e elevação do erro padrão das médias é decorrente à formação de um aglomerado de farelo em todas as repetições submetidas a hidrólise enzimática do farelo roxo, como visível na Figura 03. Após iniciar o processo de hidrólise foi possível observar um grande aglomerado de farinha, com o passar do tempo este foi desmanchando. Decorrente a isso, a redução gradativa não foi possível de ser observada na Figura 02.



**Figura 02.** Representação gráfica do farelo roxo durante as duas etapas do processo de hidrólise enzimática quanto à concentração do Teor de Amido (Solúvel, Insolúvel e Total). Médias simples calculadas dentre as repetições, com expressão do coeficiente de variação.



**Figura 03.** Presença de um aglomerado de farelo no processo de hidrólise enzimática do farelo roxo.

Embora a variação dos compostos amiláceos foram prejudiciais a avaliação, de acordo com a determinação da concentração de açúcares (glicose, frutose, maltose, sacarose e total) e etanol, representados na Figura 04, foram eficientes para

avaliar o processo de hidrólise e a consistência do processo de degradação nos mesmos tempos do teor de amido.

Já é observado na primeira coleta do processo, tempo 0 (antes da adição das enzimas), a presença de açúcares no substrato. Isso significa que o processo físico antes do início da hidrólise, sendo este a esterilização das soluções, iniciou a quebra das moléculas de amido e disposição de açúcares na solução, com concentração dos açúcares totais de 1,26%.

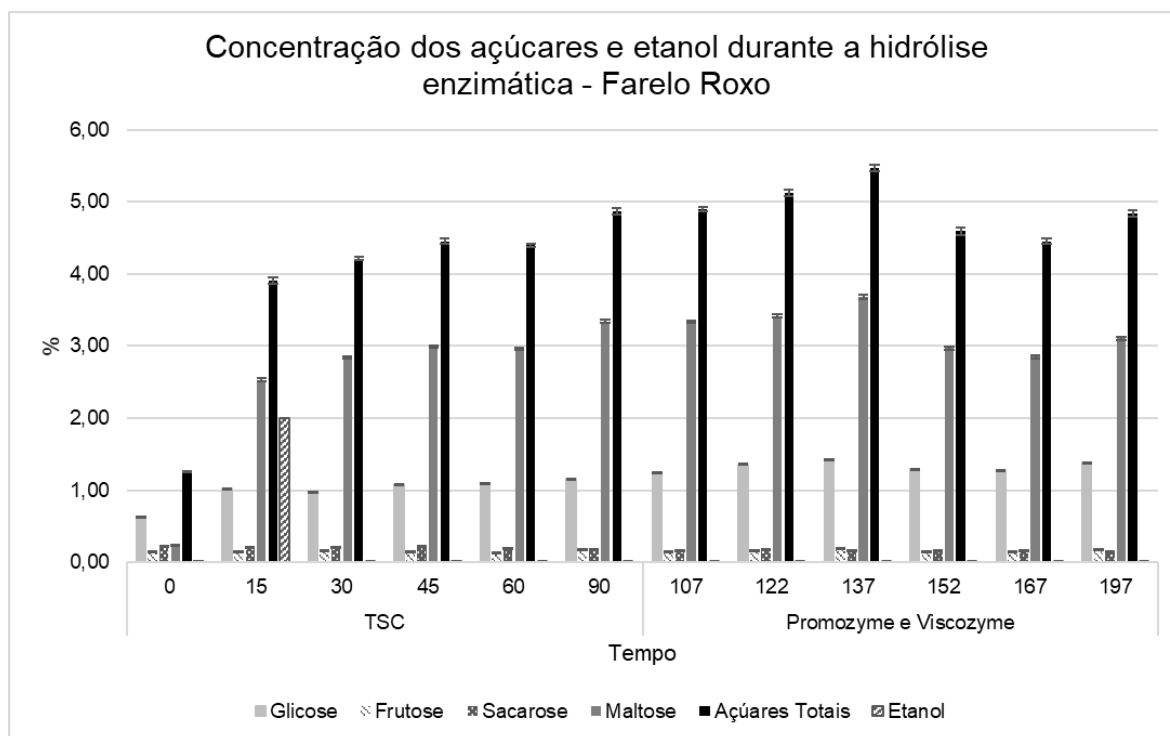
Após a inoculação da enzima  $\alpha$ -amilase (TSC), é possível observar a velocidade e eficiência enzimática para a quebrar da estrutura do amido e liberar os açúcares, sendo que em 15 minutos de hidrólise, a concentração total dos açúcares era de 3,90%, composto principalmente por maltose e glicose.

Posterior a isso, analisando todos os tempos amostrados e a concentração dos açúcares obtidos na primeira e na segunda etapa do coquetel enzimático, não ocorreu um grande incremento na concentração total de açúcares, principalmente quando utilizadas as enzimas Promozyme e Viscozyme. O pequeno aumento na concentração de açúcares provavelmente não compense o uso destas enzimas, sendo que, a principal ação enzimática detectável é a conversão de maltose para glicose. Essa conversão pode acelerar o processo fermentativo a ser realizado, sendo que glicose é um açúcar diretamente fermentescível. Entretanto, as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* apresentam capacidade de metabolização desses dissacarídeos compostos por duas moléculas de glicose (Madigan et al., 2016), o qual sem a segunda etapa no processo de hidrólise enzimático não acarretaria redução da produção de etanol.

Com relação a oscilação na concentração dos açúcares, principalmente aos 152 minutos de hidrólise (Figura 04), este fator está diretamente correlacionado ao teor de amido (Figura 02), o desprendimento de compostos amiláceos do aglomerado de farelo dilui a concentração de açúcares, o qual posteriormente é observado um incremento nos açúcares (197 minutos) pelo processo de hidrólise enzimática. Com isso, acredita-se que parte do amido da composição do farelo manteve-se aglomerado e tardou o processo enzimático.

De acordo com o processo de hidrólise enzimática da farinha de sorgo roxo do presente estudo, foi possível obter uma concentração de 4,84% de açúcares totais ao

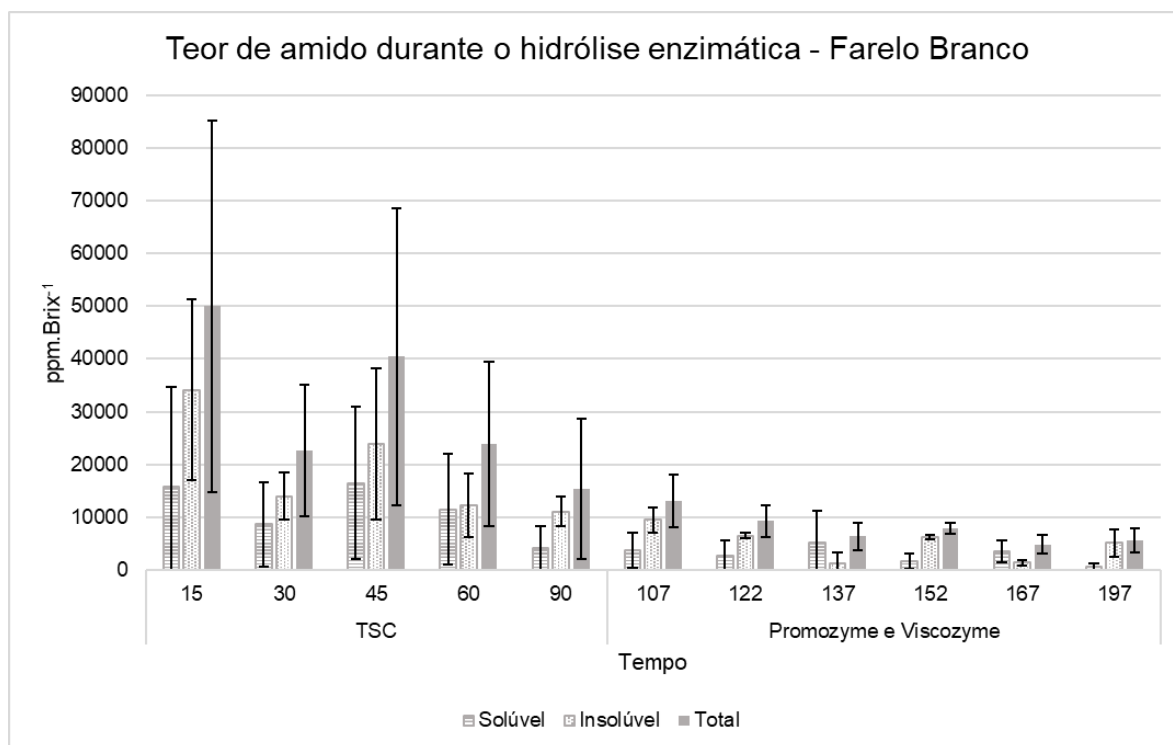
final, sendo 3,11% de maltose, seguido de 1,39% glicose e uma pequena concentração de frutose e sacarose. Não foi detectável uma concentração significativa de etanol ao longo do processo, certificando-se que não ocorreu contaminação microbiana.



**Figura 04.** Representação gráfica do farelo roxo durante as duas etapas do processo de hidrólise enzimática quanto à concentração de Açúcares (Glicose, Frutose, Sacarose, Maltose e Total) e Etanol. Médias simples calculadas dentre as repetições, com expressão do coeficiente de variação.

Os resultados do processo da hidrólise enzimática do farelo branco quanto ao teor de amido (Solúvel, Insolúvel e Total), ao longo das duas etapas estão representados na Figura 05. Diferente do farelo roxo, o farelo branco foi mais consistente com o que era esperado para o processo de hidrólise enzimática, ocorrendo uma redução gradativa dos teores de amido ao longo do tempo. Para a farinha branca é possível observar uma grande variação dos resultados nas primeiras amostras (até 90 minutos), mas após o término da hidrólise do TSC é possível constatar uma estabilização das concentrações. Este melhor comportamento representado na Figura 05 pode ser associado a melhor formação da solução a ser

hidrolisada, a qual não apresentou formação de aglomerados de farinha branca e um aspecto mais uniforme, resultando em dados médios mais consistentes.



**Figura 05.** Representação gráfica do farelo branco durante as duas etapas do processo de hidrólise enzimática quanto à concentração do Teor de Amido (Solúvel, Insolúvel e Total). Médias simples calculadas dentre as repetições, com expressão do coeficiente de variação.

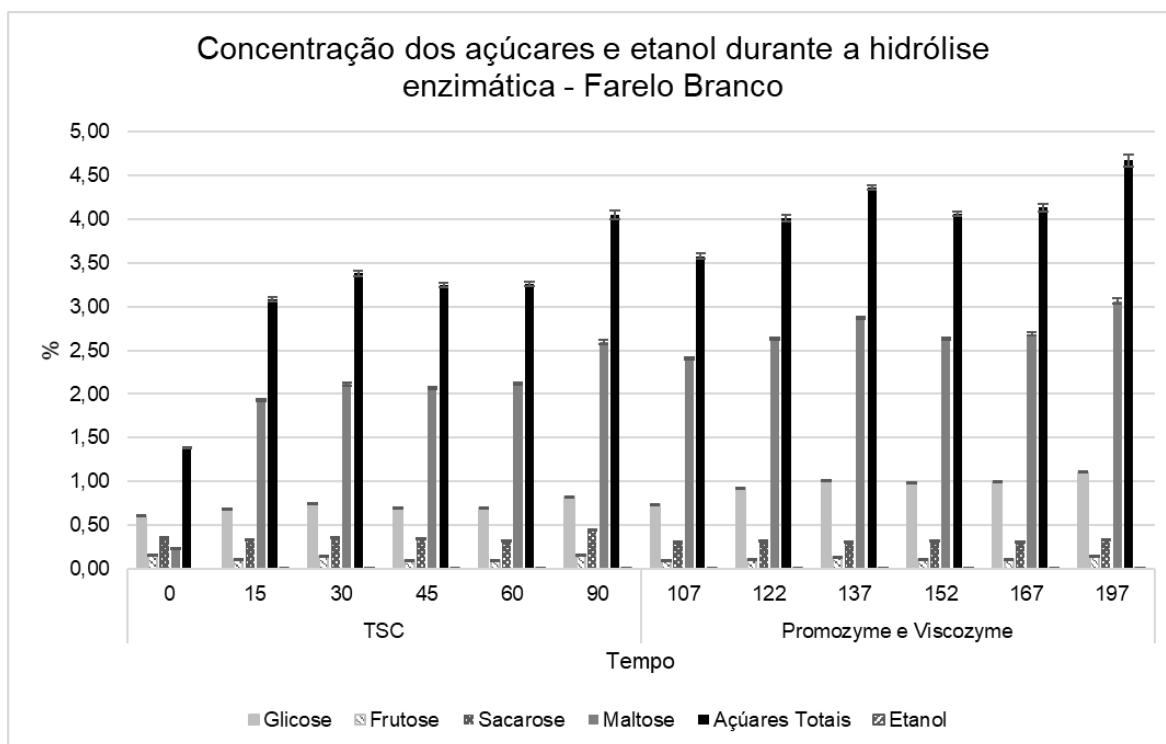
Para avaliar o processo de hidrólise enzimática do farelo branco, quanto a eficiência de cada etapa, o processo de degradação do amido deve ser associado as concentrações dos Açúcares (Glicose, Frutose, Sacarose, Maltose e Total) e Etanol, representados na Figura 06. O mesmo comportamento obtido na farinha roxa para o pré-processo é possível ser observado para farinha branca no tempo 0, com presença de açúcares de 1,39% de açúcares totais, composto principalmente por glicose (0,61%). Com isso, comprova-se que o processo físico auxilia na quebra da estrutura do amido para ambos os tipos de farinha, auxiliando as enzimas a terem acesso de forma eficiente aos compostos amiláceos. Após o início da hidrólise, quase todo o amido foi quebrado em açúcares, principalmente em maltose e glicose, na primeira etapa apenas com o uso da enzima amilase (TSC), com concentração total dos açúcares de 4,05% (90 minutos), contendo principalmente maltose e glicose. Além

disso, sem detecção de etanol durante todo o processo, o qual caracteriza o processo de hidrólise enzimática livre de contaminantes microbianos.

Comparando os resultados da análise do amido e dos açúcares (Figura 05 e 06), assim como os mesmos resultados obtidos para a farinha roxa, a hidrólise do amido e o aumento dos açúcares foram quase totais na primeira etapa com o uso do TSC ( $\alpha$ -amilase) e não foi observado aumento significativo com o uso da segunda etapa do processo enzimático, com o uso das enzimas Promozyme e Viscozyme. Resultados estes diferentes dos apresentados por Cole et al. (2019), o qual para obtenção de elevada concentração de açúcares foram necessárias as duas etapas, assim como a enzima SAN Extra L junto a segunda etapa.

Decorrente a isso, acredita-se que o tratamento físico, junto a um maior tempo de reação para a enzima TSC apresenta resultados eficientes para a conversão dos compostos amiláceos em açúcares. Outra sugestão para otimização do processo é a utilização de outra enzima para quebrar a maltose (em duas moléculas de glicose) utilizando uma enzima amiloglucosidase já associada a  $\alpha$ -amilase.

Correlacionando os diferentes comportamentos observados para os farelos, acredita-se que a formação dos aglomerados para o farelo roxo, decorreram da maior concentração de proteína (Tabela 03) e o tamanho de partícula (Tabela 02), sendo que as proteínas podem se comportar como inibidora enzimática e o tamanho maior das partículas, provavelmente dificultaram o processo de hidrólise enzimática. Cabe destacar, que ambas as soluções foram compostas nas mesmas concentrações (18%).



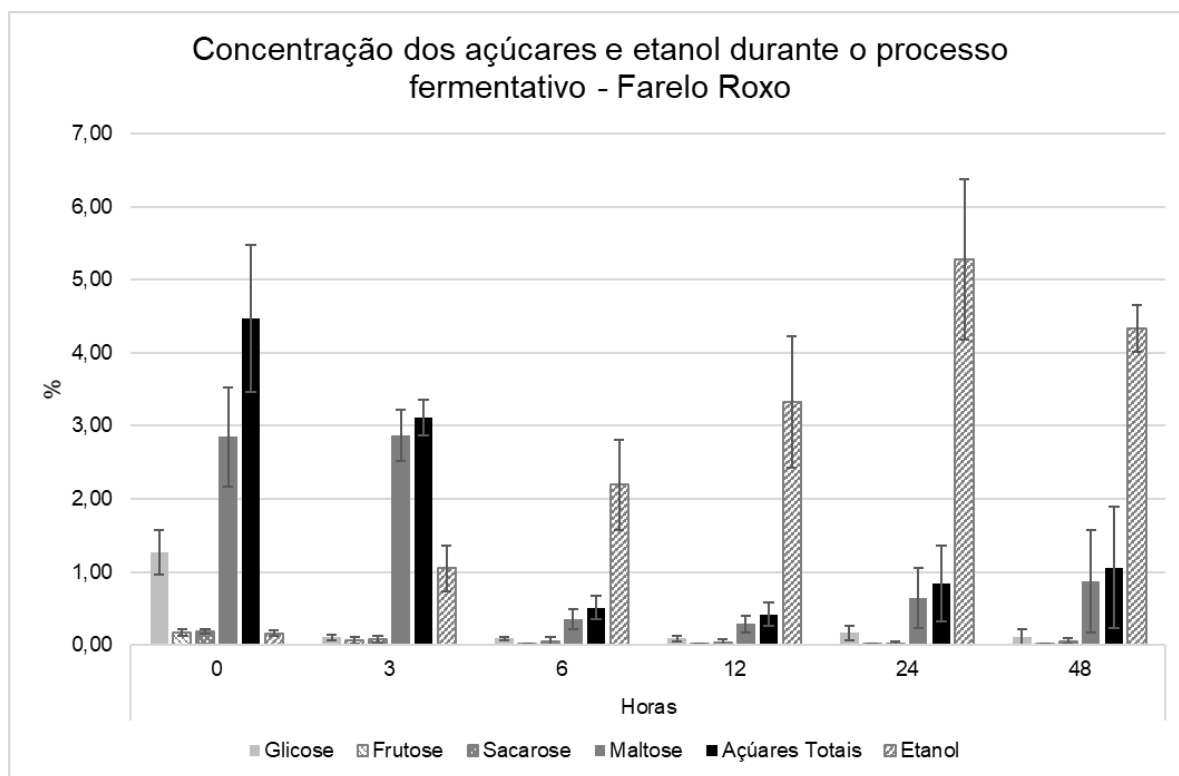
**Figura 06.** Representação gráfica do farelo branco durante as duas etapas do processo de hidrólise enzimática quanto à concentração de Açúcares (Glicose, Frutose, Sacarose, Maltose e Total) e Etanol. Médias simples calculadas dentre as repetições, com expressão do coeficiente de variação.

### 3.3. Fermentação alcoólica dos farelos

Os resultados do processo fermentativo dos farelos de sorgo granífero, roxo e branco estão apresentados nas Figuras 07 e 08, respectivamente. De acordo com os resultados da farinha roxa após o término da hidrólise enzimática (Figura 04) a solução continha 4,84% de açúcares totais, sendo esta similar previamente ao início do processo fermentativo (Figura 07) ao tempo zero, com 4,47% de açúcares totais, composto principalmente por maltose (2,85%) e glicose (1,27%).

Posterior a inoculação da levedura, iniciou-se a metabolização dos açúcares para a produção de etanol, após 3 horas de fermentação, a levedura já havia metabolizado praticamente toda a glicose, frutose e sacarose presentes na solução. Isso é decorrente do metabolismo do microrganismo fermentador, o qual apresenta maior preferência para metabolizar açúcares diretamente fermentescíveis (glicose e frutose) e a sacarose (Madigan et al., 2016), através da hidrólise desse dissacarídeo

em glicose e frutose, praticamente sem a metabolização da maltose. Ocorrendo redução de 1,36% dos açúcares totais e incremento de 1,05% de etanol.



**Figura 07.** Representação gráfica do farelo roxo durante o processo fermentativo quanto à concentração de Açúcares (Glicose, Frutose, Sacarose, Maltose e Total) e Etanol. Médias simples calculadas dentre as repetições, com expressão do coeficiente de variação.

Após 6 horas do início do processo fermentativo, a solução que continha praticamente apenas maltose de açúcar, é observado a redução na concentração deste açúcar neste período, resultando em um incremento de 1,14% de etanol e concentração de 0,51% de açúcares totais. Entretanto, com uma baixa concentração de açúcares às 6 horas de processo fermentativo, esperava-se uma estabilização da produção de etanol.

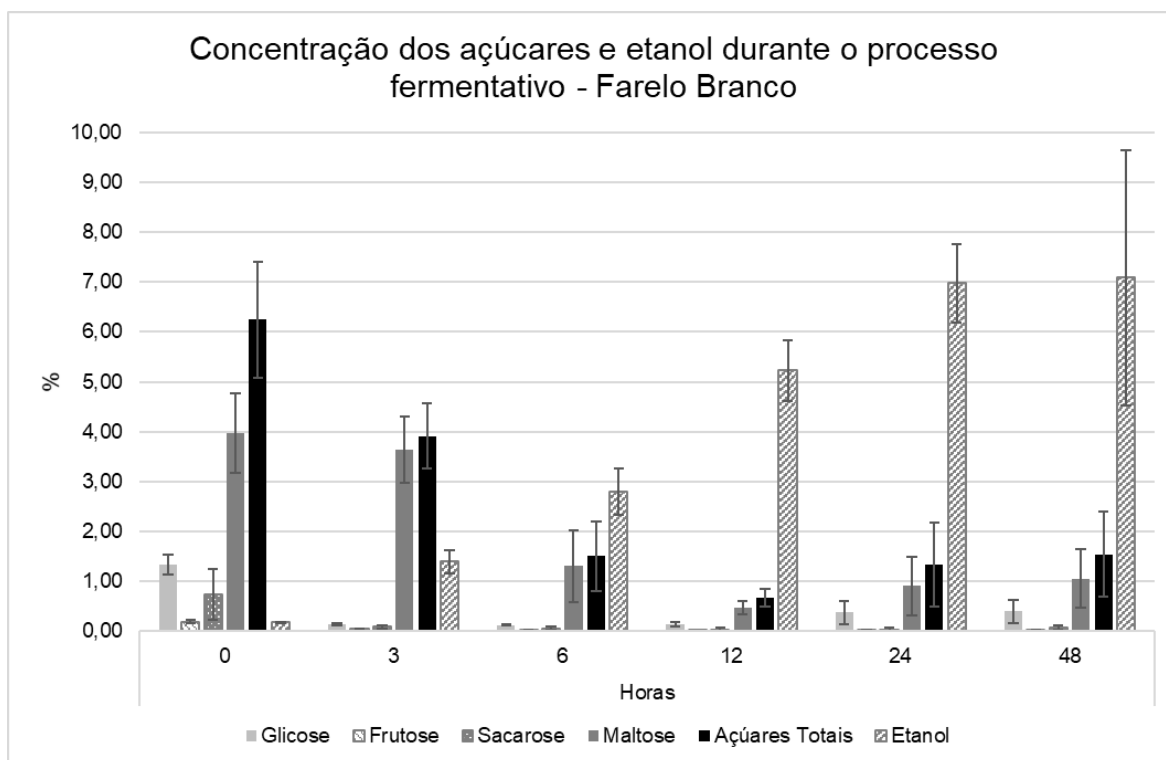
Todavia, de acordo com os resultados para 12, 24 e 48 horas do processo fermentativo do farelo roxo (Figura 07), é observado o aumento na concentração de etanol, obtendo-se 5,28% às 24 horas, posteriormente ocorrendo a redução. Assim como, às 24 e 48 horas, ocorreu incremento de açúcares e uma maior variação dos mesmos. De acordo com isso, acredita-se que assim como no processo de hidrólise

enzimática, durante o processo fermentativo, a presença de pequenos aglomerados de farelo interferiram a concentração e otimização do processo fermentativo. Continuando a hidrólise dos compostos amiláceos e a liberação de açúcares.

Entretanto, de acordo com a avaliação do presente estudo, acredita-se que o processo fermentativo do farelo roxo, atingiu o ápice da produção de etanol às 24 horas, o qual apresentava a maior concentração de etanol (5,28%) e baixa concentração de açúcares residuais totais (0,84%).

Os resultados do processo fermentativo do farelo branco estão representados na Figura 08. Diferente do farelo roxo, o farelo branco entre as etapas de hidrólise enzimática para o processo fermentativo, apresentou elevação na concentração dos açúcares totais, sendo estes de 4,67% (Figura 06) para 6,25% (Figura 08). Comportamento este que pode ser associado a uma falta de tempo para finalização da conversão do amido para os açúcares que foram determinados no presente estudo.

Durante o processo fermentativo, assim como no farelo roxo, com 3 horas posterior a inoculação da levedura, ocorreu a metabolização da glicose, frutose e sacarose, sem alteração significativa para a maltose. Com isso, é observado um incremento de 1,40% na concentração de etanol e redução de 2,33% dos açúcares totais.



**Figura 08.** Representação gráfica do farelo branco durante o processo fermentativo quanto à concentração de Açúcares (Glicose, Frutose, Sacarose, Maltose e Total) e Etanol. Médias simples calculadas dentre as repetições, com expressão do coeficiente de variação.

Posterior às 6 horas do processo fermentativo, assim como no farelo roxo há uma oscilação na concentração de açúcares e etanol, esperando-se uma estabilização do processo fermentativo às 12 horas, o qual apresentava uma baixa concentração de açúcares (0,66%) e 5,23% de etanol. Toda via, às 24 e 48 horas é observado um aumento na produção de etanol e incremento nos açúcares. Sendo assim, de acordo com os dados médios apresentados na Figura 08, acredita-se que o farelo branco durante o processo fermentativo atingiu o ápice da produção de etanol também às 24 horas, com concentração de etanol de 6,98% e açúcares residuais totais de 1,33%).

Sendo assim, comparando os dois farelos utilizados no presente estudo submetidos ao processo fermentativo, o farelo branco apresenta uma produção de etanol 1,70% superior ao farelo roxo, ambos com o processo fermentativo concluído em 24 horas. Além disso, de acordo com a presença de aglomerados de farelo roxo durante o tratamento enzimático (Figura 03) e a oscilação de açúcares durante o processo fermentativo para ambos os farelos (Figura 07 e 08), acredita-se a hidrólise

enzimática não foi eficiente para conversão total do amido para açúcares, principalmente para o farelo roxo.

Comparando-se os dados obtidos com a produção de etanol de milho, sendo que o processo do presente estudo foi adaptado desta matéria-prima. Os grãos de sorgo granífero apresentaram resultados satisfatórios, com concentração de açúcares e etanol similares aos encontrados quando utilizado o milho como matéria-prima para a produção de etanol (Barros, 2020; Farias et al., 2009).

#### 4. CONCLUSÕES

- Os farelos roxo e branco de sorgo granífero apresentam elevado potencial para aplicabilidade para processos fermentativos;
- O tratamento físico (temperatura) e a enzima  $\alpha$ -amilase apresentam potencial para ser utilizados para os farelos roxo e branco de sorgo granífero.

#### 5. REFERÊNCIAS

Barros TD (2020) Árvores do conhecimento – Agroenerdia: Milho. Disponível em: <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agroenergia/arvore/CONT000fbl23vn102wx5eo0sawqe3djg2152.html#:~:text=Para%20cada%20hectare%20de%20milho,de%207%2C5%20mil%20litros.>>. Acesso em: 23 nov. 2020.

Coelho AM, Cruz JC, Pereira Filho IA. (2002) Rendimento de milho no Brasil? Chegamos ao máximo? In: Simpósio rotação soja/milho no plantio direto. Piracicaba, São Paulo.

Cole MR, Eggleston G, Gaines DK, Heckemeyer M (2019) Development of an enzyme cocktail to bioconvert untapped starch in sweet sorghum processing by-products: Part I. **Industrial Crops and Products** 133:142–150.

Cole MR, Eggleston G, Gilbert A, Chung YJ (2016) Development of an analytical method to measure insoluble and soluble starch in sugarcane and sweet sorghum products. **Food Chemistry** 190:50–59.

Farias D, Margarites AC, Reinehr CO, Colla LM, Costa JAV, Bertolin TE (2009) Amylolytic potential of maize malt in the process of saccharification of the same cereal. **Ciência e Agrotecnologia** 33:855–862.

He F (2011) Bradford Protein Assay. Disponível em: <<http://www.bio-protocol.org/e45>>. Acesso em: 23 nov. 2020.

Madigan MT, Martinko JM, Bender KS, Buckley DH, Stahl DA (2016) Microbiologia de Brock. 14 ed. Porto Alegre: Artmed.

Porto P de D (2011) Tecnologia de fabricação de malte: uma revisão. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia de alimentos) – UFRGS: Porto Alegre.

Ribas PM (2017) Importância econômica Cultivo do Sorgo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 4 p.

## **CAPÍTULO 4 – Sorgo sacarino como matéria-prima com alto potencial para produção de xarope, vinagre, vodca e uísque**

**RESUMO** - O cultivo da cultura do sorgo sacarino vem crescendo de modo significativo, objetivando o uso desta planta para a produção de diversos produtos alimentícios (xarope, bebidas alcoólicas e vinagre). Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi a caracterização físico-química do xarope, vodca, uísque e vinagres de sorgo sacarino (claro e escuro) oriundos de biorrefinaria em larga escala. Neste estudo, foi realizada a determinação da composição dos produtos alimentícios produzidos em larga escala, tal como antioxidantes. O xarope de sorgo sacarino apresenta concentração total de 48,07% de açúcares, sendo estes 15,15% de sacarose, 18,64% de glicose e 14,28% de frutose, além disso, elevada concentração de antioxidantes comparado a outros xaropes comerciais. Foram observados para a vodca e uísque a concentração de etanol de 46,67% e 48,61%, respectivamente. Ambos os vinagres produzidos de sorgo sacarino (claro e escuro) destacam-se comparados a outros vinagres comerciais de diferentes matérias-primas, decorrente a elevada concentração de antioxidantes e corantes fenólicos. Sendo assim, conclui-se que o xarope e vinagre produzidos em larga escala pela Heckemeyer Biorefinery destacam-se perante produtos comerciais com elevada concentração de antioxidantes e a necessidade de mais estudos para comparar a vodca e uísque de sorgo sacarino com outros destilados.

**Palavras-cheve:** *Sorghum bicolor* L. Moench, Biorrefinaria, Fermentação alcoólica, Fermentação acética, Antioxidante.

### **1. INTRODUÇÃO**

O sorgo sacarino vem sendo cultivado em inúmeras regiões do planeta de modo significativo, tal como Estados Unidos, Austrália, China e Índia, objetivando a produção de diversos produtos, tal como bioetanol combustível e alguns alimentos (xarope, bebidas alcoólicas e vinagre). Pertence à família *Poaceae*, o sorgo sacarino

é originário do continente africano (Kolling, 2012), semelhante à cana-de-açúcar apresentando ciclo anual. Os colmos apresentam capacidade de armazenar açúcares, com teores de sólidos solúveis totais na faixa de 16 a 23% apresentando elevada produtividade agrícola, chegando até 70 t.ha<sup>-1</sup> (EMBRAPA, 2012; Umakanth et al., 2019).

De acordo com as características da matéria-prima e seu potencial, criou-se o cenário para a introdução desta matéria-prima como adoçante líquido comercial, uísque, vodka e vinagre, todos com alto potencial de produção em grandes volumes pelas modernas práticas agrícolas e de processamento. Além disso, estes produtos alimentícios apresentam-se com maior potencial lucrativo para as destilarias, melhor qualidade de ingredientes nutracêuticos, que estão associados a prevenção ao envelhecimento, câncer, doenças neurodegenerativas e doenças cardiovasculares (Eggleston et al., 2020; Pelofske, 2017; Singleton, 1999).

No entanto, dados técnicos significativos não estão disponíveis e devem ser desenvolvidos para o sorgo sacarino para comercializar efetivamente o produto. As lacunas de conhecimento incluem: medição de cor, conteúdo fenólico, avaliação de antioxidantes e análises de composição aproximada de alimentos. Sendo assim, o objetivo desta pesquisa foi a avaliação e caracterização físico-química de produtos alimentícios oriundos de uma biorrefinaria exclusiva de sorgo sacarino, o qual produziu xarope, vodka, uísque e vinagres de sorgo sacarino (claro e escuro), em grandes volumes.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Coleta das amostras**

Foram coletadas amostras ao longo das etapas do processamento do sorgo sacarino da Heckemeyer Biorefinery, assim como os produtos finais. A relação de amostras e quantidades estão apresentadas na Tabela 01. As amostras coletadas foram caracterizadas e os resultados apresentados como média simples, com expressão do coeficiente de variação (CV) dentre as repetições.

Estas amostras foram coletadas nos dias 24/09/2018 e 16/12/2018, mantidas a 4°C e encaminhados para o Audubon Sugar Institute – LSUAgCenter (St. Gabriel, LA – EUA) onde foram armazenados a -40°C. Além das amostras obtidas oriundas do processamento do sorgo sacarino, foram adquiridos vinagres comerciais em supermercados locais (New Orleans e Baton Rouge, LA - EUA) de diferentes matérias-primas para avaliação e comparação da composição dos mesmos com os de sorgo sacarino, sendo estes descritos na Tabela 02.

**Tabela 01.** Amostras coletas na Heckemeyer Biorefinery.

| <b>Amostras</b>              | <b>Quantidade</b> |
|------------------------------|-------------------|
| Xarope                       | 4                 |
| Vinho                        | 3                 |
| Vodca                        | 3                 |
| Uísque                       | 4                 |
| Vinagre claro <sup>a*</sup>  | 3                 |
| Vinagre escuro <sup>b*</sup> | 3                 |

<sup>a</sup>vinagre produzido com o caldo de sorgo sacarino; <sup>b</sup>vinagre produzido com xarope de sorgo sacarino; \*vinagres com sedimentos.

**Tabela 02.** Lista de vinagres comerciais coletados para o estudo e seus ingredientes principais.

| <b>Vinagre</b>  | <b>Quantidade</b> | <b>Fabricante</b> | <b>Principais ingredientes</b>                                    |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Vinho Tinto     | 1                 | Great Value       | Vinagre de vinho tinto, metabissulfito de potássio e 5% de acidez |
| Balsâmico       | 1                 | Alessi            | Vinagre de vinho tinto e mostos de uva                            |
| Cana-de-açúcar* | 1                 | Steens            | Vinagre de cana puro e 5% de acidez                               |
| Arroz           | 1                 | Nakano            | Vinagre de arroz e 4.2% de acidez                                 |
| Maça            | 1                 | Heinz             | Vinagre de maça                                                   |
| Malte           | 1                 | Heinz             | Vinagre de malte (cevada e milho)                                 |

\*Vinagre com sedimentos.

## 2.2. Caracterizações físico-químicas dos xaropes

Os xaropes de sorgo sacarino coletados na Heckemeyer Biorefinery foram caracterizados quanto a seguinte composição físico-químicas:

- Brix (% de sólidos solúveis totais): Foi determinado através de um refratômetro Bellingham e Stanley RFM340 + (Xylem Analytics, Farnborough, UK) com precisão de  $\pm 0,01\%$  Brix e os resultados expressos como uma média de triplicata.
- pH: Foi determinado utilizando um medidor de pH VWR Symphony B1OP (EUA) (Radnor, PA, EUA).
- Turbidez (NTU): As medições dos vinagres foram realizadas com um nefelômetro Hach modelo 2000N (Hach, Loveland, CO). Alguns vinagres apresentavam sedimento visual e, portanto, a turbidez foi medida duas vezes, uma antes da agitação e outra depois.
- Compostos Fenólicos Totais (CFT –  $\text{mg.L}^{-1}$ ): Os CFT dos vinagres foram determinados utilizando o método Folin-Ciocalteu com pequenas modificações, usando ácido gálico como padrão Singleton et al. (1999). O vinagre foi diluído 10 vezes com água deionizada. Em um tubo de microcentrífuga, foi pipetado 125  $\mu\text{L}$  das amostras e 625  $\mu\text{L}$  de reagente Folin-Ciocalteu (0,2N), agitados por 3 minutos a 300 rpm em um agitador orbital (ThermoScientific MaxQ 2000, Waltham, MA). Em seguida, 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 10% foram adicionados ao tubo e a mistura agitada novamente por 30 min a 300 rpm. A solução foi então adicionada a uma cubeta descartável e a absorção lida a 760nm num espectrofotômetro UV-vis (Genesys 10S, ThermoScientific, Waltham, MA). Uma curva padrão foi gerada usando sete níveis de ácido gálico (0, 25, 50, 100, 150, 200 e 250  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Todas as determinações foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (AGE) por grama de extrato.
- Determinação da atividade antioxidante (AER-DPPH - %): Foi determinada de acordo com o método DPPH de Brand-Williams et al. (1995) com algumas modificações por Boue et al. (2013). Os radicais DPPH têm um máximo de absorção a 517nm, que desaparece com a redução por um composto antioxidante. Os compostos antioxidantes ativos foram extraídos, dissolvendo

as amostras em mistura de metanol e água deionizada (70:30). O extrato sobrenadante foi utilizado no ensaio DPPH. A solução do radical DPPH, a uma concentração final de 0,1 mM em metanol foi preparada diariamente e foram adicionadas 190 µL a cada poço de uma placa de 96, seguido por 10 µL da amostra extraída diluída, ou metanol para o branco. A mistura foi incubada a 30°C por 60 min, e a absorbância realizada cada minuto com absorbância de 517nm. Foi utilizado um leitor de microplacas multimodo Biotek Synergy HTX (Winooski, VT). A porcentagem de inibição da atividade de eliminação de radicais (AER) foi calculada usando a seguinte equação:

$$\text{Eliminação (AER)} = 100 - 100 (A_s/A_o)$$

Onde  $A_o$  é a absorbância do branco e  $A_s$  é a absorbância da amostra extraída a 517nm. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

- ORAC (%): A capacidade antioxidante de cada amostra foi determinada utilizando o kit ORAC Zen-Bio (Research Triangle Park, NC) de acordo com o método de Huang et al. (2002). O ensaio mede a perda de fluorescência de fluoresceína ao longo do tempo (60 min) devido à formação de radicais peroxila pela quebra de AAPH (dicloridrato de 2,2-axobis-2-metil-propanimidamida). Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). Um análogo da vitamina E solúvel em água, serviu como um controle positivo inibindo a decadência da fluoresceína de uma maneira dependente da dose. Todas as determinações foram realizadas em triplicata usando um leitor de microplacas multimodo BioTek Synergy H1 ajustado a absorbância para 485nm de excitação e 528nm de emissão.
- Teor de amido (Total, Insolúvel e Solúvel - ppm.Brix<sup>-1</sup>): A determinação do teor de amido total, insolúvel e solúvel foi medido de acordo com o novo método de pesquisa de amido do USDA (Cole et al., 2016). No qual, este é assistido pela quebra do amido através de temperatura e diferentes frequências de ultrassons, filtragem das amostras (0,45µm) desenvolvido para quantificação do amido total. Em contrapartida, é mensurado o amido solúvel, com leitura das amostras filtradas (0,45µm), no qual, através da subtração do amido total, é determinado o amido insolúvel. As leituras foram realizadas num espectrofotômetro UV-vis (Genesys 10S, ThermoScientific, Waltham, MA), com

absorbância de 600nm. Uma curva padrão foi gerada utilizando oito níveis de amido de milho (0, 7, 15, 30, 60, 125, 250 e 500 ppm). Todas as determinações foram realizadas em triplicata, e os resultados foram expressos em ppm.Brix<sup>-1</sup>.

- Açúcares (%): As concentrações dos açúcares (Glicose, Frutose, Maltose e Sacarose) foram determinadas por HPLC utilizando o equipamento Thermo Scientific Dionex ICS 5000+, usando um hidróxido de sódio 100mM (NaOH) e acetato de sódio 0-300mM (NaOAc) em 100mM de gradiente de NaOH ao longo de 10 minutos. Os eluentes foram preparados diluindo NaOAc de qualidade HPLC e solução de NaOH a 50% p.p-1 com água deionizada a 18 MΩ. Os compostos foram separados em uma coluna analítica da Thermo Scientific CarboPac PA 100 (250x2mm) e em uma coluna de proteção (50 x 2 mm) a 30°C. Caudal = 0,4 mL.min<sup>-1</sup>. Volume de injeção de 10 µL. A detecção foi realizada com uma célula detectora eletroquímica equipada com eletrodos de referência Au e Ag/AgCl. Um autoinjeter/amostrador automático refrigerado Dionex AS-AP foi usado para evitar a degradação de açúcares nas amostras enquanto se aguardava a injeção na coluna. O software de cromatografia Thermo Scientific Chromeleon 7 foi usado para acumular várias amostras e padrões. Os açúcares foram identificados comparando os tempos de retenção com os padrões.
- Etanol (%): A concentração de etanol foi obtida através de cromatografia líquida Agilent 1200, usando água deionizada de 18 MΩ como eluente durante 25 minutos. O composto foi separado na coluna analítica Bio-Rad Aminex HPX-87P (300 x 7,8 mm) e nas colunas de proteção de remoção de cinzas (30 x 4,6 mm) a 80°C. Caudal = 0,8 mL.min<sup>-1</sup>. Volume de injeção = 20 µL. A detecção foi com um detector de índice de refração a 45°C. Um autoinjeter/amostrador automático refrigerado foi usado para evitar a degradação das amostras enquanto se aguardava a injeção na coluna. O software de cromatografia Agilent OpenLab foi usado para acumular várias amostras e padrões. O etanol foi identificado pela comparação dos tempos de retenção com os padrões.

### **2.3. Caracterizações físico-químicas dos vinhos, vodca e uísque**

Os vinhos e os destilados coletados na Heckemeyer Biorefinery foram caracterizados quando a seguinte composição físico-químicas:

- Brix (% de sólidos solúveis totais): Descrito no item 2.3.
- pH: Descrito no item 2.3.
- Turbidez: Descrito no item 2.3.
- Compostos Fenólicos Totais (C.F.T.): Descrito no item 2.3.
- Determinação da atividade antioxidante (ERA-DPPH): Descrito no item 2.3.
- ORAC: Descrito no item 2.3.
- Teor de Amido: Descrito no item 2.3.
- Açúcares (sacarose, glicose, maltose e frutose): Descrito no item 2.3.
- Etanol: Descrito no item 2.3.

### **2.4. Caracterizações físico-químicas dos vinagres de sorgo sacarino e vinagres comerciais**

Os vinagres foram coletados na Heckemeyer Biorefinery foram caracterizados quando a seguinte composição físico-químicas:

- Brix (% de sólidos solúveis totais): Descrito no item 2.3.
- pH: Descrito no item 2.3.
- Turbidez: Descrito no item 2.3.
- Compostos Fenólicos Totais (C.F.T.): Descrito no item 2.3.
- Determinação da atividade antioxidante (ERA-DPPH): Descrito no item 2.3.
- ORAC: Descrito no item 2.3.
- Densidade: Foi determinada utilizando uma balança de precisão, pesando-se 10 mL de vinagre e os resultados são expressos como a média das análises em duplicata.
- Cor (U.I.) e Indicador de cor (I.C.): A cor foi calculada de acordo com o método oficial ICUMSA GS2/3-9 (1994) para produtos de cana-de-açúcar, com pequenas modificações, com absorvância de 420nm. Amostras de vinagre (~ 5 mL) foram diluídas em tampão de ácido clorídrico (5 mL; pH 7,0) e filtradas (0,45 µm). A cor também foi mensurada em pH 4,0 e 9,0, ajustando com

soluções de HCl e NaOH, respectivamente. O Indicador de cor (I.C.) foi calculado de acordo com os valores da cor em pH 9,0 dividido pela cor em pH 4,0. Os resultados são expressos como a média de triplicata.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Caracterização do xarope de sorgo sacarino

A composição físico-química do xarope de sorgo sacarino quanto à Brix, pH, Turbidez, Açúcares e Etanol estão apresentados na Tabela 03. De acordo com os resultados obtidos, é observado uma concentração de 66,62% para Brix, e turbidez de 267,90 NTU, sendo estas inferiores em comparação a outros xaropes de sorgo sacarino e outros comerciais (Eggleston et al., 2020). Em sua composição, é constatada uma concentração total de 48,07% de açúcares, sendo estes 15,15% de sacarose, 18,64% de glicose e 14,28% de frutose, não detectando maltose. Entretanto, acredita-se que uma pequena quantidade de açúcares foi consumida por microrganismos contaminantes em contato com o xarope. Isto pode ser observado de acordo com o baixo pH (5,1) da solução e a presença de etanol na composição (0,11%) de um produto que não foi submetido a algum processo fermentativo.

**Tabela 03.** Caracterização físico-química do xarope de sorgo sacarino quanto ao Brix, pH, Turbidez, Açúcares (Sacarose, Maltose, Glicose e Frutose) e Etanol. Médias simples calculadas dentre as repetições, com expressão da variação ( $\pm$ ) de acordo com o coeficiente de variação (CV).

|        | Brix<br>(%) | pH   | Turbidez<br>(NTU) | Açúcares (%) |         |         |         | Etanol<br>(%) |
|--------|-------------|------|-------------------|--------------|---------|---------|---------|---------------|
|        |             |      |                   | Sacarose     | Maltose | Glicose | Frutose |               |
| Xarope | 66,62       | 5,1  | 267,9             | 15,15        | n.d.    | 18,64   | 14,28   | 0,11          |
| CV     | 0,21        | 0,19 | 3,75              | 1,13         |         | 0,96    | 2,33    | 8,61          |

n.d.: Não detectável.

As caracterizações físico-química do xarope de sorgo sacarino quanto à Teor de Amido (Total, Insolúvel e Solúvel), Compostos Fenólicos Totais (CFT), ORAC e AER-DPPH estão apresentados na Tabela 04. De acordo com os resultados dos CFT,

ORAC e AER-DPPH, é observado uma concentração média elevada dos mesmos no xarope, livre de compostos amiláceos.

**Tabela 04.** Caracterização físico-química do xarope de sorgo sacarino quanto ao Teor de Amido (Total, Insolúvel e Solúvel), Compostos Fenólicos Totais (CFT), ORAC e AER-DPPH. Médias simples calculadas dentre as repetições, com expressão da variação ( $\pm$ ) de acordo com o coeficiente de variação (CV).

|        | Teor de Amido (ppm.Brix <sup>-1</sup> ) |           |         | CFT                   | ORAC | AER   |
|--------|-----------------------------------------|-----------|---------|-----------------------|------|-------|
|        | Total                                   | Insolúvel | Solúvel | (mg.L <sup>-1</sup> ) | (%)  | (%)   |
| Xarope | n.d.                                    | n.d.      | n.d.    | 15,15                 | n.d. | 18,64 |
| CV     |                                         |           |         | 1,13                  |      | 0,96  |

n.d.: Não detectável.

Em estudos conduzidos por Eggleston et al. (2020), comparando diversos xaropes de sorgo sacarino com outros comerciais, apresentaram uma maior concentração destes compostos antioxidantes em xaropes produzidos de sorgo sacarino. Com isso, deve-se destacar a melhor qualidade de ingredientes nutracêuticos, que estão associados a prevenção ao envelhecimento, câncer, doenças neurodegenerativas e doenças cardiovasculares (Pelofske, 2017), caracterizando o xarope de sorgo sacarino mais saudável em comparação com outros comerciais de diferentes matérias-primas.

### 3.2. Caracterização do vinho, vodca e uísque de sorgo sacarino

As caracterizações físico-química do vinho e os destilados de sorgo sacarino (vodca e uísque), quanto ao pH, Turbidez, Compostos Fenólicos Totais (CFT), ORAC, AER-DPPH e Teor de Amido (Total, Solúvel e Insolúvel) estão apresentados na Tabela 05. As concentrações dos Açúcares (Sacarose, Maltose, Glicose e Frutose) e Etanol estão apresentados na Tabela 06.

**Tabela 05.** Caracterização físico-química das soluções alcoólicas (vinho, vodca e uísque) de sorgo sacarino quanto ao pH, Turbidez, Compostos Fenólicos Totais (CFT), ORAC, AER-DPPH e Teor de Amido (Total, Solúvel e Insolúvel). Médias simples calculadas dentre as repetições, com expressão da variação ( $\pm$ ) de acordo com o coeficiente de variação (CV).

|        | pH   | Turbidez<br>(NTU) | CFT<br>(mg.L <sup>-1</sup> ) | ORAC<br>(%) | AER<br>(%) | Teor de Amido (ppm.Brix <sup>-1</sup> ) |           |         |
|--------|------|-------------------|------------------------------|-------------|------------|-----------------------------------------|-----------|---------|
|        |      |                   |                              |             |            | Total                                   | Insolúvel | Solúvel |
| Vinho  | 3,7  | 2.939,58          | 403,7                        | 11,5        | 0,17       | n.d.                                    | n.d.      | n.d.    |
| CV     | 0,47 | 6,19              | 4,23                         | 25,07       | 173,21     |                                         |           |         |
| Vodca  | 3,8  | 0,33              | 4,47                         | 10,53       | 7,91       | n.d.                                    | n.d.      | n.d.    |
| CV     | 7,69 | 5,42              | 2,77                         | 30,77       | 23,74      |                                         |           |         |
| Uísque | 4,5  | 0,5               | 89,1                         | 14,0        | 16,20      | n.d.                                    | n.d.      | n.d.    |
| CV     | 2,91 | 15,49             | 1,14                         | 6,83        | 21,9       |                                         |           |         |

n.d.: Não detectável.

As amostras coletadas não foram através de um processo contínuo, sendo assim, nenhuma dessas amostras foi produzida diretamente de qualquer uma da outra. Portanto, os resultados apenas indicam tendências. A destilação do vinho removeu a água da solução, concentrando o etanol e a separação de compostos ácidos conforme indicado pelo valor de pH mais alto em comparação ao vinho (Tabela 04). Como esperado, as partículas turvas, açúcares e amidos (Tabelas 5 e 6) também foram drasticamente reduzidos decorrente a destilação do vinho, gerando uma solução alcoólica livres de açúcares residuais da fermentação alcoólica (glicose e frutose residual no vinho), teor de amido e elevada concentração de etanol (3,02% de etanol no vinho para 46,67% na vodca e 48,61% no uísque).

A vodca e uísque apresentaram valores de turbidez menores que 2,0 NTU (Tabela 05), o que indica que não há a propensão à formação de flocos de álcool no armazenamento (Eggleston e Triplett, 2017). A destilação, decorrente a separação dos compostos de acordo com o ponto de ebulição, também reduziu os compostos fenólicos totais. Posteriormente a produção do destilado e o acondicionamento em barris de carvalho, através do processo de lixiviação resultando em incremento na concentração destes compostos. Comportamento este observado já esperado. Esse processamento de lixiviação aumentou concomitantemente a concentração dos

antioxidantes no uísque (ORAC e AER-DPPH). Com isso, há a necessidade de mais estudos para comparar a vodca e uísque de sorgo sacarino com outros destilados.

**Tabela 06.** Caracterização físico-química das soluções alcoólicas (vinho, vodca e uísque) de sorgo sacarino quanto aos Açúcares (Sacarose, Maltose, Glicose e Frutose) e Etanol. Médias simples calculadas dentre as repetições, com expressão da variação ( $\pm$ ) de acordo com o coeficiente de variação (CV).

|        | Açúcares (%) |         |         |         | Etanol (%) |
|--------|--------------|---------|---------|---------|------------|
|        | Sacarose     | Maltose | Glicose | Frutose |            |
| Vinho  | n.d.         | n.d.    | 1,99    | 3,23    | 3,02       |
| CV     |              |         | 1,74    | 0,94    | 1,12       |
| Vodca  | n.d.         | n.d.    | n.d.    | n.d.    | 46,67      |
| CV     |              |         |         |         | 1,78       |
| Uísque | n.d.         | n.d.    | n.d.    | n.d.    | 48,61      |
| CV     |              |         |         |         | 0,39       |

n.d.: Não detectável.

### 3.3. Caracterização dos vinagres de sorgo sacarino e comparação com outros vinagres comerciais

A composição físico-química dos vinagres de sorgo sacarino quanto à Brix, Densidade, pH e Turbidez, comparadas aos vinagres comerciais comuns estão apresentados na Tabela 07. De acordo com os resultados, é observado uma grande variação para o Brix (3,27 a 28,60%) e densidade (1,002 a 1,135 g.mL<sup>-1</sup>). Os pHs variaram entre 2,62 a 4,06, com os dois vinagres de sorgo sacarino apresentaram valores de pH superiores, desse modo, essa característica pode afetar a preservação dos vinagres e as características do sabor ácido desse alimento.

Apenas o vinagre de cana-de-açúcar e os de sorgo sacarino continham sedimento na embalagem, o que obviamente aumentou os valores de turbidez após agitação. A turvação do vinagre de sorgo sacarino claro era maior do que o vinagre de sorgo sacarino escuro antes e depois da agitação. Esta diferença pode ter ocorrido porque o vinagre de sorgo sacarino claro foi produzido diretamente a partir do caldo extraído, enquanto o escuro foi produzido a partir de xarope diluído, o qual no sistema de produção adotado ocorre a clarificação do caldo antes da evaporação (Eggleston

et al., 2016). Sendo que, um dos objetivos do processo de clarificação é a remoção de partículas suspensas no caldo, consequentemente acarretando um vinagre de menor turbidez.

**Tabela 07.** Caracterização físico-química dos vinagres de sorgo sacarino (claro e escuro) e outros comerciais quanto ao à Brix, Densidade, pH e Turbidez.

| Vinagres               | Brix (%) | Densidade<br>(g.mL <sup>-1</sup> ) | pH   | Turbidez (NTU)  |                 |
|------------------------|----------|------------------------------------|------|-----------------|-----------------|
|                        |          |                                    |      | Sem<br>agitação | Com<br>agitação |
| Vinho Tinto            | 3,85     | 1,008                              | 2,62 | 0,72            | n.a.            |
| Balsâmico              | 28,60    | 1,103                              | 2,98 | 180,25          | n.a.            |
| Cana-de-açúcar*        | 11,57    | 1,135                              | 2,76 | 10,45           | 24,40           |
| Sorgo sacarino claro*  | 9,35     | 1,023                              | 3,61 | 26,97           | 885,17          |
| Sorgo sacarino escuro* | 10,86    | 1,027                              | 4,06 | 15,43           | 650,50          |
| Arroz                  | 3,27     | 1,002                              | 2,66 | 0,41            | n.a.            |
| Maça                   | 3,84     | 1,005                              | 3,08 | 0,95            | n.a.            |
| Malte                  | 4,51     | 1,007                              | 2,76 | 1,01            | n.a.            |

\*Vinagres com sedimentos; n.a.: não aplicável, pois o vinagre não continha sedimentos.

Os resultados para a cor dos vinagres em diferentes pHs e o indicador do valor de cor estão apresentados na Tabela 08. As cores foram determinadas em diferentes valores de pH para obter informações sobre o tipo de corantes presentes, incluindo compostos fenólicos. Isso também permitiu o cálculo do valor do indicador de cor (I.V.: proporção da cor em pH 9,0/pH 4,0) que é usado para distinguir corantes em produtos de cana-de-açúcar (Godshall, 1997) e sorgo sacarino (Eggleston et al. 2017; Eggleston et al., 2020). Para produtos de cana-de-açúcar, a intensidade da cor depende do pH da solução devido às mudanças na estrutura molecular e no equilíbrio de associação-dissociação, as mudanças não são lineares com a intensidade da cor mudando mais abruptamente na faixa de pH 6,0 a 8,0 (Deitz et al., 1959). Alguns corantes de cana-de-açúcar, entretanto, são sensíveis ao pH, enquanto outros não (Godshall, 1997). Corantes fenólicos em produtos de cana-de-açúcar normalmente têm cor muito mais alta em pH 9,0 do que pH 7,0 e 4,0, e resultados semelhantes

foram relatados para caldos extraídos e xaropes de sorgo (Eggleston et al., 2017; Eggleston et al., 2020).

Neste estudo, é observado uma alta variação nas cores dos vinagres comerciais (Tabela 08), o que reflete as variações de cor no mercado dos EUA. Por exemplo, em pH 4,0, as cores variaram de 2.999 a 17.9162 U.I., o que representa uma diferença de quase 60 vezes (Tabela 08). Para os vinagres produzidos de malte, cana-de-açúcar e sorgo sacarino é observado um indicador do valor de cor (I.V.)  $\leq 1,00$ , o que sugere que continham níveis baixos ou desprezíveis de corantes fenólicos. Em comparação, os vinagres de vinho tinto, balsâmico, sorgo sacarino claro, maçã e arroz, é observado valores I.V.  $\geq 1,00$ . Ou seja, isto sugere que estes vinagres contêm uma maior concentração de compostos fenólicos que também são nutrientes. O vinho tinto e o vinagre de sorgo sacarino claro obtiveram os maiores I.V., com 1,82 e 1,81, respectivamente, o que pode ser considerado altamente nutritivos dentre os avaliados no presente estudo. Embora o vinagre de sorgo sacarino escuro tenha uma cor muito alta em todos os valores de pH, seu I.V. foi de apenas 1,00, o que indica que a maioria dos corantes eram derivados do processo, isto é, caramelos.

**Tabela 08.** Caracterização físico-química dos vinagres de sorgo sacarino (claro e escuro) e outros comerciais quanto a cor em diferentes pHs (4, 7 e 9) e o indicador do valor de cor (I.V.).

| Vinagres              | Cor pH 4<br>(U.I.) | Cor pH 7<br>(U.I.) | Cor pH 9<br>(U.I.) | Indicador do<br>Valor de Cor<br>(I.V.) |
|-----------------------|--------------------|--------------------|--------------------|----------------------------------------|
| Vinho Tinto           | 17175              | 16900              | 31214              | 1,82                                   |
| Balsâmico             | 32131              | 36654              | 44451              | 1,38                                   |
| Cana-de-açúcar        | 31706              | 27755              | 29451              | 0,93                                   |
| Sorgo sacarino claro  | 13665              | 16622              | 24683              | 1,81                                   |
| Sorgo sacarino escuro | 179162             | 178734             | 178047             | 1,00                                   |
| Arroz                 | 2999               | 2120               | 3293               | 1,10                                   |
| Maça                  | 11052              | 12525              | 16154              | 1,46                                   |
| Malte                 | 53903              | 35064              | 38755              | 0,72                                   |

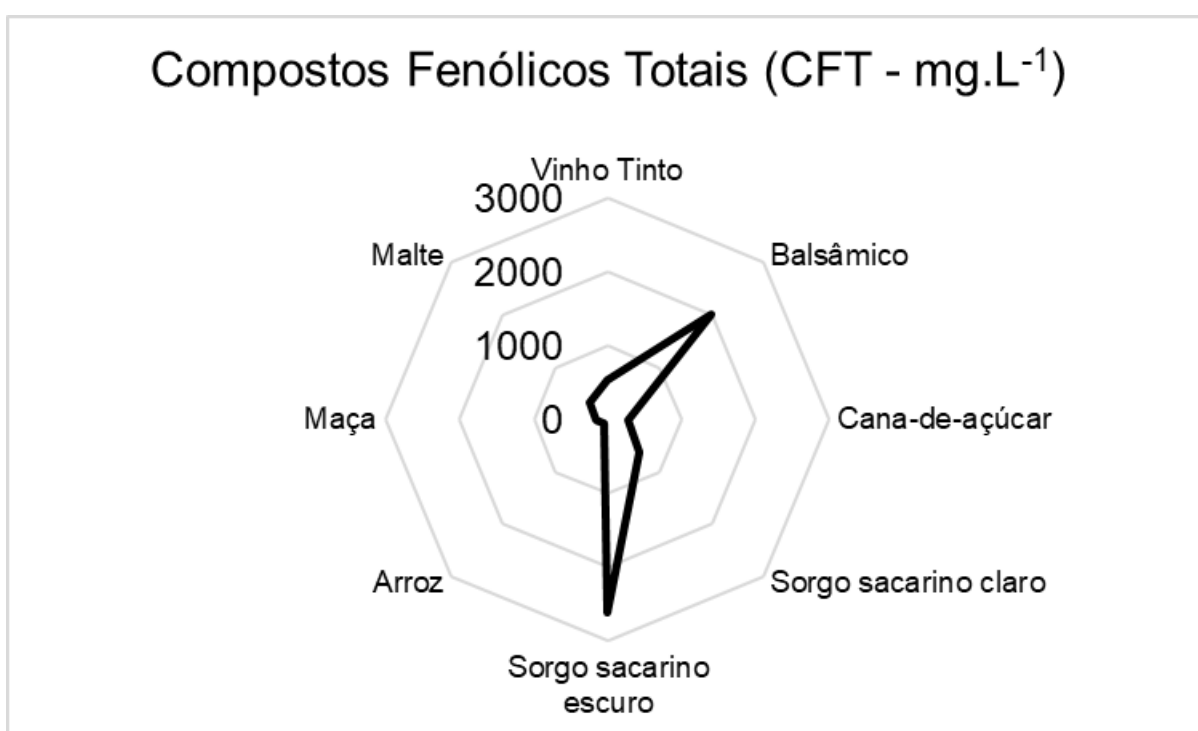
Os resultados para a concentração dos compostos fenólicos totais (CFT) dos vinagres de sorgo sacarino e os vinagres comerciais estão representados na Figura 01. Os compostos fenólicos das plantas, incluindo os flavonoides, são reconhecidos como fitonutrientes importantes devido aos inúmeros benefícios à saúde. Esses benefícios dietéticos dos fenóis estão ligados à sua forte atividade antioxidante e eliminação de radicais livres. Observe que os radicais livres no corpo estão associados ao envelhecimento, câncer, doenças neurodegenerativas e doenças cardiovasculares (Pelofske, 2017). Consequentemente, ingredientes nutracêuticos, como antioxidantes, permitem alegações de saúde e bem-estar para um alimento específico. Compostos fenólicos são frequentemente encontrados em frutas, vegetais e cereais (Balasundram et al., 2005). Além disso, em estudos conduzidos por Eggleston et al. (2020) recentemente demonstraram que xaropes de sorgo sacarino também são fontes ricas em antioxidantes fenólicos em comparação com outros xaropes alimentares comerciais.

Os resultados obtidos para os vinagres avaliados (Figura 01) demonstraram que o sorgo sacarino escuro e vinagres balsâmicos continham maiores concentrações de CFT, seguido pelos vinagres de sorgo sacarino claro e vinho tinto. Sendo assim, embora o vinagre de sorgo sacarino escuro tenha um baixo I.V. (Tabela 08), ainda contém quantidades consideráveis de compostos fenólicos. Resultado este esperado, sendo que este vinagre foi produzido a partir do xarope de sorgo sacarino, que apresenta elevadas concentrações de fenóis.

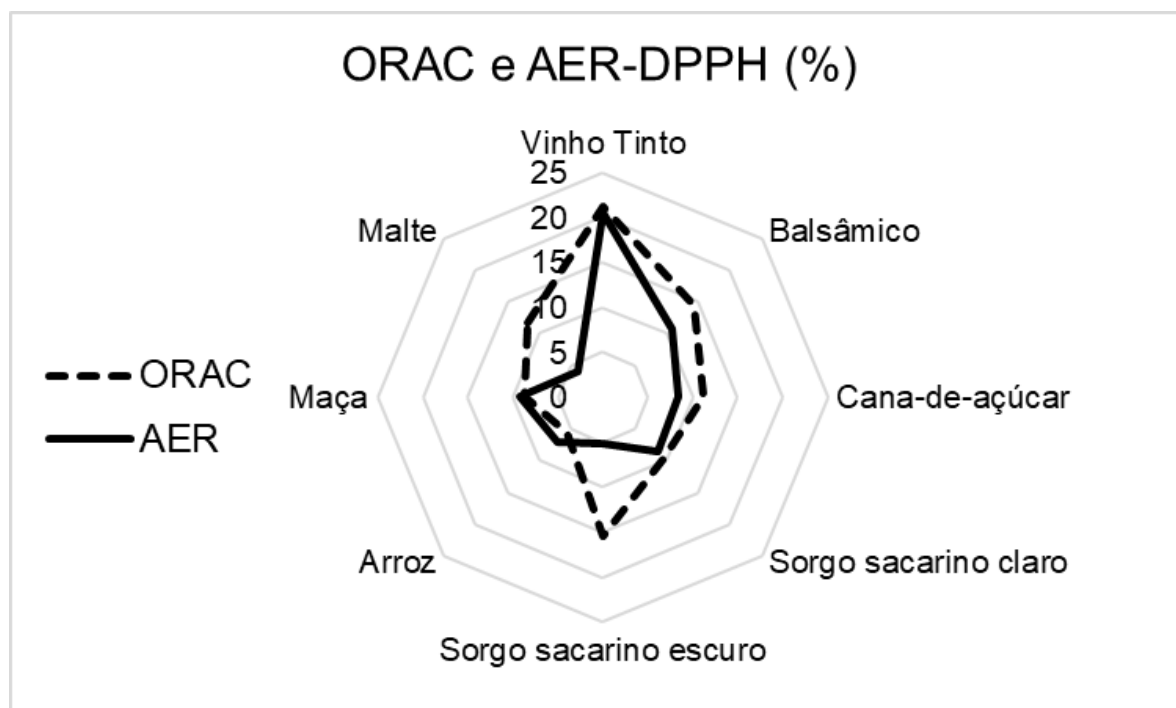
A produção de vinagre de sorgo sacarino a partir da fermentação de xarope diluído, em vez de diretamente do caldo extraído, apresenta alguns benefícios nutricionais a mais. Esses resultados também sugerem que os compostos fenólicos não são degradados durante os dois processos de fermentação (açúcar para etanol e depois etanol para ácido acético) envolvidos na produção de vinagre. No geral, ao contrário dos xaropes de sorgo sacarino, não houve uma correlação CFT e I.V. para a produção de vinagre.

A capacidade e a atividade antioxidante dos vinagres foram determinadas utilizando os métodos ORAC e AER-DPPH, respectivamente, e os resultados estão ilustrados na Figura 02. Uma relação polinomial positiva, mas fraca ( $R^2 = 0,635$ ;  $y = 0,92x^2 - 1,584x + 17,175$ ) existia entre os valores antioxidantes de ambos os métodos,

sugerindo que um ou ambos os métodos eram suscetíveis a vários parâmetros do vinagre. Os valores de antioxidantes ORAC foram mais bem correlacionados com os valores de TPC do que os valores de AER-DPPH, sugerindo que esse método de atividade antioxidante foi mais suscetível do que o método ORAC, principalmente para a cor do vinagre. No geral, as concentrações de antioxidantes dos vinagres de sorgo sacarino foram aceitáveis em comparação com os outros vinagres comerciais. Entretanto, é observado valores médios superiores da concentração de antioxidantes para o vinagre de vinho tinto.



**Figura 01.** Dados médios dos Compostos Fenólicos Totais (CFT) dos vinagres de sorgo sacarino (claro e escuro) e outros comerciais. Resultados expressos em mg.L<sup>-1</sup> que são equivalentes a mg de ácido gálico.L<sup>-1</sup>.



**Figura 02.** Dados médios da porcentagem de concentração e atividade antioxidante dos vinagres de sorgo sacarino (claro e escuro) e outros comerciais utilizando ORAC e AER-DPPH.

#### 4. CONCLUSÕES

- O xarope de sorgo sacarino apresenta elevada concentração de antioxidantes comparado a outros xaropes comerciais;
- Os vinagres de sorgo sacarino claro e escuro, produzidos em larga escala pela Heckemeyer Biorefinery, destacam-se perante a vinagres comerciais com elevada concentração de antioxidantes;
- Há a necessidade de mais estudos para comparar a vodca e uísque de sorgo sacarino com outros destilados.

#### 5. REFERÊNCIAS

Balasundram N, Al TY, Sambanthamurthi R, Sundram K, Samman S (2005) Antioxidant properties of palm fruit extracts. **Asia Pac J Clin Nutr** 4:319–324.

Boue SM, Shih BY, Burow ME, Eggleston G, Lingle S, Pan YB, Daigle K, Bhatnagar D (2013) Postharvest accumulation of resveratrol and piceatannol in sugarcane with enhanced antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 61:8412–8419.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1994) Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT. Food Science and Technology** 28:25–30.

Cole MR, Eggleston G, Gilbert A, Chung YJ (2016) Development of an analytical method to measure insoluble and soluble starch in sugarcane and sweet sorghum products. **Food Chemistry** 190:50–59.

Deitz V, Carpenter F, Rieger C, Rootare H (1959) The influence on pH on some properties of char liquors. Bone Char Research Project Tech. Report, v. 53.

Eggleston G, Boue S, Bett-garber K, Verret C, Triplett A, Bechtel P (2020) Phenolic contents, antioxidant potential and associated colour in sweet sorghum syrups compared to other commercial syrup sweeteners. **Journal of the Science of Food and Agriculture** 1–11.

Eggleston G, Heckemeyer M, Cyr ES, Wartelle L (2016) Case Study: Commercialization of Sweet Sorghum Juice Clarification for Large-Scale Syrup Manufacture. **Sugar Tech** 18:249–257.

Eggleston G, Triplett A (2017) Formation of Polyphenol-Denatured Protein Flocs in Alcohol Beverages Sweetened with Refined Cane Sugars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 65:9703–9714.

Eggleston G, Wartelle L, Zatlokovicz J, Petrie E, Cole M, Cyr ES (2017) Processing Attributes and Performance of Sweet Sorghum Biomass for Large-Scale Biorefineries: A 1-Year Comparison of Commercial Hybrids and a Cultivar. **Sugar Tech** 20:336–346.

EMBRAPA - Empresa brasileira de pesquisa agropecuária (2012) Inserção e expansão do sorgo sacarino para produção agroindustrial de etanol 1G âmbito do plano agrícola e pecuário 2013/14. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo. 120 p.

Godshall MA (1997) Color analysis. In: PROCEEDINGS OF THE SUGAR INDUSTRY TECHNOLOGISTS MEETING, Anais, Canada.

Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL (2002) High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 50:4437–4444.

ICUMSA - International commission for uniform methods of sugar analysis (1994) Method GS2/3-29 (1994) The Determination of Copper in Refined Sugar Products by a Colorimetric Method – Disponível em: <<https://www.icumsa.org/index.php?id=1065>>. Acesso em: 23 nov. 2020.

Kolling DF (2012) **Determinação da localização de uma planta multi-produto no Estado do Mato Grosso com base na eficiência da produção de etanol**. 74 f. Dissertação (Mestrado em Agronegócios) – UFRGS: Porto Alegre

Pelofske E (2017) Formulating for beverage innovation. **Prepared Foods** 85–88.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-raventós RM (1999) Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology** 299:152–178.

Umakanth AV, Kumar AA, Vermerris W, Tonapi VA (2019) Sweet Sorghum for Biofuel Industry. **Breeding Sorghum for Diverse End Uses**, p. 255–270.