

DOI: <http://dx.doi.org/10.18265/1517-0306a2021id4847>

ARTIGO ORIGINAL

SUBMETIDO 21/08/2020

APROVADO 22/09/2021

PUBLICADO ON-LINE 29/09/2021

PUBLICADO Junho de 2022

EDITORES ASSOCIADOS

Manoel Barbosa Dantas, Gardênia  
Marinho Cordeiro

# Fermentação alcoólica: utilização de caldo clarificado por ozônio de diferentes etapas do processo da indústria sucroalcooleira

-  Luzidelson Baracho Ribeiro <sup>[1]</sup>
-  Flávio Luiz Honorato da Silva <sup>[2]</sup>
-  Marlene de Fátima Oliveira <sup>[3]</sup>
-  Jailson Alexandre Ribeiro Carvalho <sup>[4]</sup>
-  Andréa Farias de Almeida <sup>[5]</sup>
-  Sharline Florentino de Melo Santos <sup>[6]</sup>

[1] [luzidelsonribeiro@hotmail.com](mailto:luzidelsonribeiro@hotmail.com).  
Instituto Federal de Educação, Ciência e  
Tecnologia da Paraíba (IFPB), Campus Santa  
Rita, Brasil

[2] [flavioluizh@yahoo.com](mailto:flavioluizh@yahoo.com). Departamento  
de Engenharia Química / Universidade  
Federal da Paraíba (UFPB), Brasil

[3] [marleneoliveira@alegre.gso.com.br](mailto:marleneoliveira@alegre.gso.com.br).

[4] [jailsonalexandre@alegre.gso.com.br](mailto:jailsonalexandre@alegre.gso.com.br).  
Usina Monte Alegre, Brasil

[5] [andreaefalm@cbiotec.ufpb.br](mailto:andreaefalm@cbiotec.ufpb.br).  
Departamento de Biotecnologia /  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB),  
Brasil

[6] [sharline@ct.ufpb.br](mailto:sharline@ct.ufpb.br). Departamento de  
Engenharia Química / Universidade Federal  
da Paraíba (UFPB), Brasil

**RESUMO:** Este estudo teve por objetivo verificar a influência do processo de clarificação do caldo de cana por ozonização na fermentação alcoólica, usando mostos obtidos de diferentes etapas do processo industrial. Foram analisados mostos obtidos dos caldos misto, clarificado, evaporado e mel final, cedidos pela Usina Monte Alegre S/A, em diferentes dias de produção. As concentrações de leveduras e substrato utilizadas foram definidas a partir de um planejamento fatorial, com base na avaliação da superfície de resposta para produção de etanol, em que mostos com concentrações iniciais de substrato entre 13 e 20 °Brix e concentrações de leveduras entre 24 e 34 g L<sup>-1</sup> obtiveram os melhores desempenhos. As fermentações foram conduzidas sob temperatura de 32 °C e agitação orbital de 150 rpm, em um tempo de 12 horas. As produtividades em etanol [g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>] obtidas para os diferentes mostos foram: 2,9±0,81, 2,7±0,57, 2,5±0,51 e 2,7±0,49. Estes resultados apontam que não houve diferença estatística entre os mostos utilizados, indicando que fatores como as variações da matéria-prima processada e as oscilações do processo apresentam um maior impacto na fermentação alcoólica do que o processo de clarificação por ozonização e a origem do caldo utilizado para composição do mosto.

**Palavras-chave:** cana-de-açúcar; clarificação; etanol; levedura; ozonização.

## *Alcoholic fermentation: use of ozone-clarified juice from different stages of the sugar and ethanol industry process*

**ABSTRACT:** This study aimed to verify the influence of the process of clarification of the sugarcane juice by ozonization, in alcoholic fermentation. Musts obtained from the mixed, clarified, evaporated and final honey broths were obtained from the Monte Alegre S/A Plant on different days of production. The yeasts and substrate concentrations used were defined from a factorial design, based on

the evaluation of the response surface (ethanol production), where musts with initial substrate concentrations between 13 and 20 °Brix and yeasts concentrations between 24 and 34 gL<sup>-1</sup>, obtained the best performances. The fermentations were conducted under a temperature of 32 °C and orbital agitation of 150 rpm, in a time of 12 hours. The yields in ethanol, in [g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>], obtained for the different musts were: 2.9 ± 0.81, 2.7 ± 0.57, 2.5 ± 0.51 and 2.7 ± 0.49. These results indicate that there was no statistical difference between must, indicates that factors such as the variations of the raw material processed and the oscillations of the process have a greater impact on the alcoholic fermentation than the process of clarification by ozonation and the origin of the broth used for the composition of the must.

.....  
**Keywords:** clarification; ethanol; ozonation; sugar cane; yeast.  
 .....

## 1 Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, maior produtor e exportador de açúcar do mundo e maior produtor mundial de bioetanol a partir da cana-de-açúcar. Apresentou na safra 2018/2019 produção de 33,10 bilhões de litros de etanol, sendo 9,91 bilhões de litros de anidro e 23,18 bilhões de litros de hidratado (OBSERVATÓRIO DA CANA, 2019). O etanol, derivado de cana-de-açúcar, no Brasil, e de milho, nos EUA, como combustível líquido substituindo a gasolina, contribui para mitigar parte do gás de efeito estufa emitido por carros (CECCATO-ANTONINI *et al.*, 2017; GOLDEMBERG, 2013; WALTER *et al.*, 2014).

O processo de clarificação do caldo de cana-de-açúcar pelo método tradicional da sulfitação, destinado à fabricação do açúcar branco, é empregado na maioria das indústrias do setor. Esse método polui o meio ambiente devido à grande toxicidade do enxofre e seus derivados (ARAÚJO, 2007). O uso de dióxido de enxofre, embora regulamentado, como aditivo alimentar, é observado com cautela pelos países importadores de açúcar, em consequência de possível efeito alergênico associado, diminuindo as exportações de açúcar refinado brasileiro, por meio de adoção de barreira técnica, respaldados pela legitimidade da segurança alimentar, embora se considere a possibilidade de barreira comercial disfarçada (MORILLA; ALVES; AGUIAR, 2016).

Nesse processo, o caldo da cana é tratado com dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) até atingir um pH em torno de 4,2, no qual o tratamento com cal pode ser iniciado. No entanto, problemas relacionados a padrões de segurança alimentar podem ser causados por resíduos de enxofre no produto final, além da perda de sacarose por inversão durante a clarificação (RICCI; TEIXEIRA, 2021; SARTORI *et al.*, 2017).

No processo de clarificação por ozonização, o ozônio é gerado pela divisão dos átomos de oxigênio e pela recombinação destes para se tornar uma molécula de trióxido de oxigênio por meio da ação de descargas elétricas. Tanto as moléculas de ozônio quanto os radicais livres gerados pela decomposição do ozônio reagem com os compostos orgânicos para causar sua oxidação. O ozônio, depois da reação, decompõe-se em produtos não perigosos, tornando-se um agente desinfetante ecológico (ASOKAPANDIAN; PERIASAMY; SWAMY, 2018; PANIGRAHI; MISHRA; DE, 2020).

Relatos da literatura sobre o uso de ozônio no processamento de sucos de frutas estão disponíveis, sucos cítricos, como, laranja, limão e lima (SHAH *et al.*, 2019), suco de melão (FUNDO *et al.*, 2018). Os parâmetros do processo de tratamento com ozônio

não podem ser generalizados e, portanto, os estudos são fundamentais para investigar a eficácia da ozonização para tratamento específico.

Na clarificação do caldo de cana por ozonização, o ozônio é capaz de remover compostos diretamente responsáveis pela cor, mas também pode remover precursores da cor, como aminas e compostos fenólicos. A clarificação por ozonização permite a retirada da cor ICUMSA sem degradação da sacarose nem mudanças significativas no pH, °Brix, acidez (JARAMILLO-SANCHEZ *et al.*, 2018; RICCI; TEIXEIRA 2021; RODRIGUES; SPERANDIO; ANDRADE, 2018).

O processo de clarificação do caldo, que fará parte da composição do mosto, pode influenciar na produção de etanol, pelo processo fermentativo. Segundo Amorim e Leão (2005), há vários fatores envolvidos no processo fermentativo, como o microrganismo utilizado e a forma de conduzir o processo. Fatores como temperatura, pressão osmótica, pH, oxigenação, nutrientes e inibidores, e também fatores microbiológicos como espécie, linhagem, concentração da levedura e contaminação bacteriana afetam o rendimento da fermentação e a eficiência da conversão de açúcar em etanol (AZHAR *et al.*, 2017; LIMA *et al.*, 2001).

Diante da busca por novas tecnologias para a clarificação do caldo de cana, é necessário verificar sua influência no processo de fermentação alcoólica. Este trabalho foi realizado em parceria com a usina Monte Alegre S/A, pioneira no Brasil na fabricação do açúcar com a utilização do ozônio na clarificação do caldo. Uma particularidade encontrada na Usina Monte Alegre é que esta utiliza o caldo de saída do primeiro estágio da evaporação para composição do mosto. Dessa forma, pode-se avaliar o desempenho fermentativo de mostos com diferentes características, de acordo com a etapa de sua produção, ou seja, mostos obtidos a partir de caldo clarificado por ozônio, de caldo evaporado, que além de passar pelo processo de clarificação, recebe um tratamento térmico, de mel final, além do mosto obtido a partir do caldo misto, que não passou por processos de tratamento e serve como parâmetro comparativo. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência do processo de clarificação do caldo de cana por ozonização na fermentação alcoólica, usando os diversos mostos obtidos de diferentes etapas do processo industrial.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Caldos de cana-de-açúcar

Foram utilizados caldos de cana comercial, adquiridos no comércio local, e caldos industriais, coletados de diferentes etapas do processo da Usina Monte Alegre. Os caldos industriais foram identificados de acordo com o dia de coleta – MA-1, MA-2, MA-3, MA-4 e MA-5 – e de acordo com a etapa do processo – CM, CC, CE e MF, sendo CM caldo misto, obtido do sistema de extração nas moendas, CC caldo clarificado, por processo de ozonização, CE caldo evaporado, extraído da saída do primeiro evaporador, e MF mel final, obtido do processo de centrifugação das massas, na fabricação de açúcar. Para caracterização dos caldos, foram realizadas análises de sólidos solúveis totais (°Brix) e pH.

## 2.2 Levedura

Foi utilizada a levedura *Saccharomyces cerevisiae* industrial, Fermol Millenium Destiler – cepa SC 20 –, mesma levedura propagada no início da safra 2016/2017 na Usina Monte Alegre.

Foi realizada uma propagação de células, para obter quantidade suficiente de leveduras para a realização do estudo de fermentação alcoólica. Como meio de cultivo, foi utilizado o caldo de cana comercial, na concentração de 10 °Brix e 2,0 g L<sup>-1</sup> da levedura liofilizada. A massa da levedura SC-20 foi pesada e, em seguida, realizada a inoculação, em câmara de fluxo laminar.

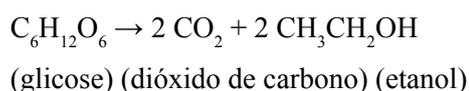
Após a inoculação, foram mantidas em incubadora com temperatura e agitação orbital constantes, de 32°C e 150 rpm, durante o período de 12 horas. Como fermentadores, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 1 litro com 500 mL de meio de cultivo. Ao término da propagação, o mosto fermentado foi transferido para tubos de centrífuga de 50 mL previamente esterilizados, identificados e pesados, e estes foram submetidos à centrifugação a 6.000 rpm durante 10 minutos em centrífuga refrigerada, para separação da massa de levedura. A massa de levedura obtida foi inoculada nos diferentes mostos, de acordo com as quantidades estabelecidas para as concentrações de células (X), dando início ao processo de fermentação.

## 2.3 Fermentação alcoólica: influência da concentração inicial de células e substrato

Com o objetivo de avaliar a influência das variáveis independentes, concentrações de células (X) e substrato (S) sobre a variável dependente, etanol produzido, foi elaborado um planejamento fatorial de dois níveis mais configuração estrela (DCCR), para, assim, definir as condições ótimas de trabalho para o estudo da produção de etanol nos diversos mostos. O planejamento totalizou onze experimentos, executados aleatoriamente. As faixas estudadas foram definidas tendo como base valores comumente usados na maioria das destilarias, em especial na Usina Monte Alegre.

O processo foi conduzido usando caldo de cana comercial, em frasco Erlenmeyer de 1 litro com 500 mL de meio, mantido a 32°C e 150 rpm, em incubadora rotativa orbital simulando um processo de fermentação em batelada simples. As amostragens foram realizadas em duplicata, no início, e com 12 horas de processo, para análise de sólidos solúveis (°Brix) e cálculo da produção de etanol.

A produção teórica de etanol foi obtida a partir da relação de estequiometria da reação, estabelecida pelo físico e químico francês Gay-Lussac em 1815, e sua forma resumida é representada como (LIMA, 2001):



Assim, de acordo com a reação, 1 grama de glicose produz 0,511 gramas de etanol. Com base no consumo de substrato, a produção de etanol foi calculada pela Equação 1:

$$E = (S_0 - S_f) \times 0,511 \quad (1)$$

na qual:  $E$  é a concentração de etanol, em  $\text{g.L}^{-1}$ ;  $S_0$  é a concentração inicial de substrato;  $S_f$  é a concentração final de substrato, em  $\text{g.L}^{-1}$ .

O delineamento experimental e a análise estatística foram realizados com auxílio do software de estatística Statistica 7.0 StatSoft.

## 2.4 Produção de etanol nos diversos mostos

Foram realizados experimentos com o objetivo de estudar a cinética de fermentação para os mostos de CM, CC, CE e MF, coletados em diferentes dias de produção, de acordo com as amostras MA-1, MA-2, MA-3, MA-4 e MA-5, respectivamente, nos dias 1, 2, 3, 4 e 5. Os mostos foram preparados com concentrações de substrato de  $130 \text{ g.L}^{-1}$  e concentração de células de  $30 \text{ g.L}^{-1}$ , definidos de acordo com os resultados obtidos no planejamento fatorial. Foram realizadas amostragens, em duplicata, no início do processo e a cada quatro horas, até completar 12 horas de fermentação, para verificar o consumo de substrato, por meio das análises de açúcares redutores totais (ART) e de análises cromatográficas para a concentração de etanol. Para análise estatística das fermentações, foi aplicado o teste de Tukey, em que se utilizou o software Assistat versão 7.0 pt, 2017.

A velocidade de consumo de substrato foi calculada a partir da Equação 2, e a produtividade em etanol, a partir da Equação 3 (LIMA, 2001):

$$r_s = (S_0 - S_f) / t_f \quad (2)$$

na qual:  $r_s$  é a velocidade de consumo de substrato, em  $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ;  $S_0$  é a concentração inicial de substrato;  $S_f$  é a concentração final de substrato em  $\text{g.L}^{-1}$ ;  $t_f$  é o tempo de fermentação, em horas (12 horas).

$$P_E = (P_m - P_0) / t_f \quad (3)$$

na qual:  $P_E$  é a produtividade em etanol, em  $\text{g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ;  $P_m$  é a concentração final de etanol;  $P_0$  é a concentração inicial de etanol em  $\text{g.L}^{-1}$ ;  $t_f$  é o tempo de fermentação (12 horas).

## 2.5 Análises realizadas

As amostras dos mostos em fermentação foram transferidas para tubos de 2,0 mL e submetidas a uma centrifugação a uma rotação de 10.000 rpm por um tempo de 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para realização das análises de concentração de substrato em sólidos solúveis ( $^{\circ}\text{Brix}$ ), concentração de substrato em açúcares redutores totais (ART), e concentração de etanol.

O  $^{\circ}\text{Brix}$  foi determinado em refratômetro, e o ART, a partir do método DNS adaptado por Vasconcelos, Pinto e Aragão (2013), da Embrapa Agroindústria Tropical.

A determinação do percentual de álcool etílico foi realizada através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência no Laboratório de Engenharia Bioquímica da UFRN. Foi utilizado em um cromatógrafo Accela (ThermoScientific, USA), coluna Shim-pack SCR 101-H (Shimadzu Co., Japan) com proporções de 30 cm x 7,9 mm, com 20 microlitros de injeção, a uma temperatura de  $65^{\circ}\text{C}$  no forno e  $10^{\circ}\text{C}$  nas bandejas de amostras. A fase móvel utilizada foi 5 mM de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , a um fluxo de 0,6 mL/min, num tempo de análise de 30 minutos. A concentração de etanol foi quantificada usando uma curva de calibração.

### 3 Resultados e discussão

#### 3.1 Caracterização dos caldos

A Tabela 1 indica os resultados das análises de °Brix e pH, com as médias e desvios-padrão obtidos, para as amostras dos caldos de diferentes etapas do processo industrial.

**Tabela 1** ▶  
Resultados das análises das concentrações de substrato (°Brix) e pH, realizadas para as amostras de caldos industriais: CM (caldo misto), CC (caldo clarificado), CE (caldo evaporado) e MF (mel final). Fonte: dados da pesquisa

Amostras	CM		CC		CE		MF	
	°Brix	pH	°Brix	pH	°Brix	pH	°Brix	pH
MA-1	14,9	5,20	14,3	6,20	18,7	5,20	64,7	5,53
MA-2	15,4	4,95	14,7	6,50	24,2	4,90	83,4	5,45
MA-3	14,0	5,10	13,4	6,30	21,8	5,80	82,5	5,42
MA-4	13,7	5,17	15,7	6,19	22,0	4,84	62,4	5,45
MA-5	14,2	5,35	14,7	6,80	22,3	6,35	73,5	5,55
Média	14,4 <sup>c</sup>	5,15 <sup>b</sup>	14,6 <sup>c</sup>	6,40 <sup>a</sup>	21,8 <sup>b</sup>	5,42 <sup>b</sup>	73,3 <sup>a</sup>	5,48 <sup>b</sup>
Desvio-padrão	0,5	0,10	0,6	0,17	1,3	0,43	6,5	0,04

Valores com sobrescritos diferentes em uma mesma linha ou coluna são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Legenda: MA-1 – amostra dia 1; MA-2 – amostra dia 2; MA-3 – amostra dia 3; MA-4 – amostra dia 4 e MA-5 – amostra dia 5.

Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade e constatou-se significância estatística entre os diferentes tratamentos de caldos. Verificou-se que as concentrações de substrato (°Brix) não apresentaram variação para os caldos misto e clarificado, sendo diferentes estatisticamente para o caldo evaporado e o mel final.

Esse resultado foi coerente com o processo industrial. O caldo misto e o clarificado diferem-se somente pelo processo de clarificação; neste caso, a utilização do ozônio. Já o caldo evaporado passou pelo primeiro estágio de evaporação, assim teve concentração de sólidos solúveis, o que justifica o aumento do °Brix. O mel final foi obtido após a cristalização da sacarose, sendo, portanto, rico em sólidos solúveis.

O teste também mostrou que o pH dos caldos misto, evaporado e mel final não diferiram estatisticamente entre si; a exceção foi o pH do caldo clarificado. Mesmo com diferença estatística, os valores de pH estão conforme o processo fermentativo, pois valores entre 4,5 e 6,5 favoreceram o crescimento e desenvolvimento das leveduras (MASSON *et al.*, 2015).

De acordo com os resultados obtidos, observaram-se variações entre os dias de coleta para o °Brix e pH, sendo as maiores variações verificadas para o °Brix do mel final, com desvio-padrão de 6,5, e para o pH do caldo evaporado, com desvio-padrão de 0,43.

As variações observadas estão relacionadas à matéria-prima processada (cana-de-açúcar) e aos controles do processo realizados na indústria. Com relação à matéria-prima, a variedade, o tipo de irrigação, o tempo de queima ou permanência e as condições de transporte foram os principais fatores de influência. Favero (2011), utilizando cana processada da safra 2010 proveniente do Vale do Ribeira, localizada na região sul de São Paulo e no leste do Paraná, obteve um caldo com pH 5,27. Já Hamerski, Aquino e

Ndiaye (2011), também utilizando cana da região do Paraná, trabalharam com caldo de cana *in natura* apresentando o pH 4,8 e 18 °Brix.

Vale salientar que os caldos utilizados neste trabalho foram oriundos de diversas variedades de cana-de-açúcar, característica inerente da matéria-prima usada por inúmeras indústrias, incluindo a Usina Monte Alegre. Portanto, justificam-se as variações observadas na caracterização físico-química dos caldos oriundos da matéria-prima processada.

Os valores de °Brix encontrados para o CM e CC foram muito próximos; este foi um resultado importante, mostrando que o processo de clarificação usando ozônio não interferiu na concentração de sacarose presente no caldo, concordando com os resultados obtidos por Ricci e Teixeira (2021).

Com relação aos controles do processo, o volume e a temperatura da água utilizada no processo de extração do caldo (água de embebição) influenciaram diretamente no °Brix do caldo misto, e o estado de sanitização das moendas, no seu pH. Hamerski, Aquino e Ndiaye (2011) observaram que maior ou menor diluição, ocorrida no caldo tratado, se deve ao fato de que o consumo de cal em cada um dos tratamentos é diferenciado e depende da solubilidade do CO<sub>2</sub> no meio, favorecida em pH alcalino. Verificaram, ainda, que o °Brix no caldo clarificado por métodos alternativos à sulfitação é menor quanto maior o pH da reação. Para o caldo evaporado, as principais causas de variação do °Brix foram: eficiência dos evaporadores, devido ao seu estado de limpeza, pressão de vapor utilizado, controle do nível de volume, velocidade de alimentação, bem como qualidade do caldo de alimentação (caldo clarificado). Já o pH pode ser afetado devido ao tempo de residência nos decantadores e ao tempo de evaporação. A variação da concentração de substrato do mel final foi associada à pureza das massas obtidas nos processos de cozimento e à operação das centrífugas, principalmente com relação aos tempos de lavagem destas.

### 3.2 Influência das concentrações iniciais de substrato e células na fermentação alcoólica

A matriz de planejamento com as variáveis de entrada e resposta, obtida para o planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com configuração estrela para um tempo de fermentação de 12 horas, está apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2** ►

Matriz do planejamento fatorial 2<sup>2</sup> + configuração estrela para influência das concentrações de células [X] e substrato [S] na produção de etanol.  
*Fonte: dados da pesquisa*

Experimentos	Variáveis de entrada				Resposta
	X (g.L <sup>-1</sup> )	S (g.L <sup>-1</sup> )	X (g.L <sup>-1</sup> )	S (g.L <sup>-1</sup> )	Etanol (g.L <sup>-1</sup> )
1	-	-	10	80	12,26
2	+	-	30	80	20,18
3	-	+	10	180	19,67
4	+	+	30	180	26,57
5	0	0	20	130	24,02
6	0	0	20	130	24,02
7	0	0	20	130	24,02
8	-α	0	6	130	12,26
9	+α	0	34	130	26,06
10	0	-α	20	60	13,80
11	0	+α	20	200	23,51

A partir da análise de variância, obteve-se um  $F_{calculado}$  de 104,50 para um  $F_{tabelado}$  de 4,53. Logo, é possível afirmar que o modelo obtido apresentou significância estatística e pode ser utilizado para fins preditivos.

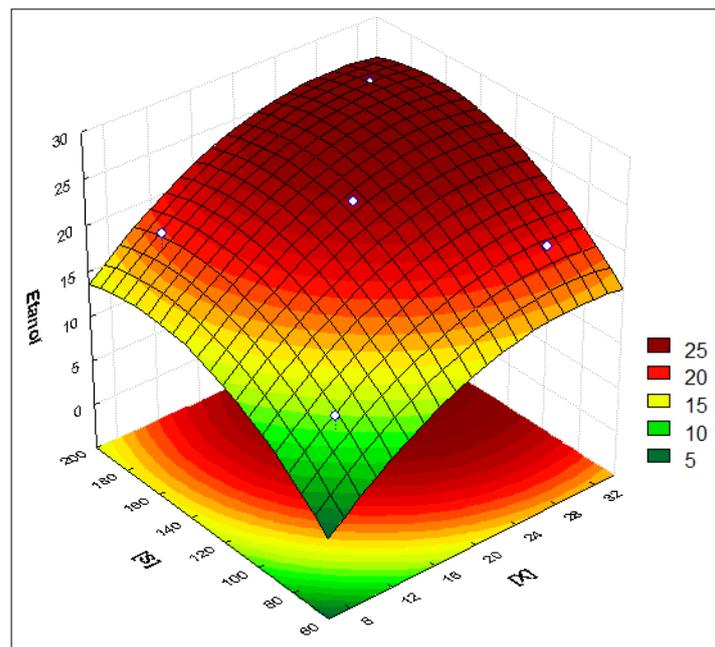
Os coeficientes lineares e quadráticos das concentrações de célula  $[X]$  e substrato  $[S]$  apresentaram significância estatística no processo, ou seja, sua variação implica variação na produção de etanol; apenas o coeficiente da interação entre as variáveis  $X$  e  $S$  não apresentou significância estatística. O modelo matemático empírico encontrado, de 2ª ordem, obtido a partir da regressão não linear (modelo quadrático) dos dados experimentais, com os seus respectivos coeficientes estatísticos para a concentração de etanol, está indicado na Equação 4.

$$Etanol = 24,02 + 4,29 \cdot X + 3,44 \cdot S - 2,24 \cdot X^2 - 2,49 \cdot S^2 \quad (4)$$

O modelo quadrático validado foi usado para gerar a superfície de resposta, tendo o objetivo de otimizar o processo. O intervalo de confiança para o modelo foi concentração de substrato ( $S$ ) variando de 60 a 200 g.L<sup>-1</sup> e concentração de leveduras ( $X$ ) de 6 a 34 g.L<sup>-1</sup>. A Figura 1 apresenta os efeitos das concentrações de células e substrato na produção de etanol. Observou-se que, para concentrações de substrato entre 130 e 200 g.L<sup>-1</sup> e concentrações de células entre 24 e 34 g.L<sup>-1</sup>, obteve-se uma produção maximizada de etanol em torno de 25 g.L<sup>-1</sup>.

Foi adotada a condição de concentração de células de 30 g.L<sup>-1</sup> e de substrato de 130 g.L<sup>-1</sup>, pelo fato desta representar uma maior eficiência do processo. Segundo Azhar *et al.* (2017), o aumento da concentração de substrato até 150 g.L<sup>-1</sup> causou aumento na produção de etanol, mas a alta concentração de açúcar no meio de fermentação pode levar à inibição pelo substrato e resultar na inibição do crescimento celular e produção de etanol. Isso porque a concentração de substrato está além da capacidade das células microbianas. A concentração inicial de substrato tem sido considerada como um fator importante na produção de etanol. A alta produtividade de etanol e seu alto rendimento podem ser obtidos usando maior concentração inicial de açúcar, desde que esta seja menor que a concentração de inibição, no entanto, maior tempo de fermentação será necessário.

**Figura 1** ►  
Superfície de resposta ilustrando os efeitos das concentrações de célula  $[X]$  e substrato  $[S]$  na produção de etanol. Fonte: dados da pesquisa



Com relação às leveduras, optou-se por trabalhar com uma concentração mais elevada, pois, segundo Oliveira *et al.* (2015), a concentração de fermento influenciou a viabilidade celular e, independente da concentração dos contaminantes no meio, quanto maior a quantidade inicial de levedura, maior será a resistência aos inibidores e, conseqüentemente, maior a viabilidade celular. Azhar *et al.* (2017) relataram que a concentração de leveduras não produziu efeitos significativos na concentração de etanol, mas afetaram a velocidade de consumo de substrato e produtividade do etanol.

### 3.3 Cinética da produção de etanol nos diferentes mostos

A Tabela 3 indica os resultados obtidos para as velocidades de consumo de substrato e mostra as produtividades em etanol para um tempo de 12 horas de fermentação.

**Tabela 3** ▶  
Velocidades de consumo de substrato, para os diferentes tipos de mostos das amostras MA-1, MA-2, MA-3, MA-4 e MA-5, em 12 horas de fermentação.  
*Fonte: dados da pesquisa*

Amostras	Velocidade de consumo de substrato ( $r_s$ ) [g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]					Média	Desvio
	CM	CC	CE	MF			
MA-1	9,1	8,8	8,4	9,8		9,0 <sup>a</sup>	0,4
MA-2	6,5	6,0	5,6	7,9		6,5 <sup>b</sup>	0,7
MA-3	5,8	7,0	4,6	5,9		5,8 <sup>b</sup>	0,6
MA-4	10,2	6,3	7,1	7,1		7,7 <sup>ab</sup>	1,3
MA-5	4,8	5,8	6,0	5,9		5,6 <sup>b</sup>	0,4
Média	7,3 <sup>a</sup>	6,8 <sup>a</sup>	6,3 <sup>a</sup>	7,3 <sup>a</sup>			
Desvio	2,3	1,2	1,4	1,6			

<sup>a</sup> Valores com sobrescritos diferentes em uma mesma linha ou coluna são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Legenda: CM – caldo misto; CC – caldo clarificado; CE – caldo evaporado e MF – mel final. MA-1 – amostra dia 1; MA-2 – amostra dia 2; MA-3 – amostra dia 3; MA-4 – amostra dia 4 e MA-5 – amostra dia 5.

Ao analisar os dados em relação à velocidade de consumo de substrato (Tabela 3), percebeu-se que o desvio médio foi maior em relação aos dias de produção do que em relação aos tipos de mostos. Essa conclusão obtida foi a partir da aplicação do teste de Tukey, cuja análise mostrou que a velocidade de consumo de substrato foi a mesma para os dias de produção MA-2, MA-3 e MA-5, pois não apresentaram diferença estatística entre elas, para os diferentes tipos de caldos processados nos respectivos dias.

Com relação aos tipos de tratamentos de caldos, pelo teste F, a análise não foi estatisticamente significativa, mas constatou-se que os mostos de CM, CC, CE e MF não diferiram estatisticamente entre si. Os resultados obtidos para as velocidades de consumo de substrato foram:  $7,3 \pm 2,3$  g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> para o CM,  $6,8 \pm 1,2$  g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> para o CC,  $6,3 \pm 1,4$  g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> para o CE e  $7,3 \pm 1,6$  g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> para o MF.

Fazendo a mesma análise para os dados de produtividade em etanol (Tabela 4), constatou-se que o desvio médio foi maior em relação aos dias de produção, para o mesmo caldo analisado. Aplicando o teste de Tukey, a análise mostrou que as produtividades em etanol não diferiram estatisticamente entre si para os dias MA-3 e MA-4, mas há diferença estatística para a amostra MA-5. Com relação aos tipos de tratamento, pelo teste F, a análise não foi estatisticamente significativa, mas verificou-se que os mostos de CM, CC,

CE e MF não diferiram entre si. Os resultados obtidos para as produtividades em etanol foram:  $2,9 \pm 0,8 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  para o CM,  $2,7 \pm 0,6 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  para o CC,  $2,5 \pm 0,5 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  para o CE e  $2,7 \pm 0,5 \text{ g.L}^{-1}\text{h}^{-1}$  para o MF. O maior desvio observado para a produtividade em etanol foi para o CM, caldo que não passou pelo processo de clarificação por ozônio.

**Tabela 4** ▶

Produtividades em etanol para os diferentes tipos de mostos das amostras MA-3, MA-4 e MA-5, em 12 horas de fermentação. *Fonte: dados da pesquisa*

Amostras	Produtividade em etanol P [g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ]				Média	Desvio
	CM	CC	CE	MF		
MA-3	2,9	3,1	2,5	2,7	2,8 <sup>a</sup>	0,2
MA-4	3,8	3,0	3,0	3,2	3,2 <sup>a</sup>	0,3
MA-5	2,1	2,0	2,0	2,2	2,1 <sup>b</sup>	0,1
Média	2,9 <sup>a</sup>	2,7 <sup>a</sup>	2,5 <sup>a</sup>	2,7 <sup>a</sup>		
Desvio	0,8	0,6	0,5	0,5		

<sup>a</sup> Valores com sobrescritos diferentes em uma mesma linha ou coluna são estatisticamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Legenda: CM – caldo misto; CC – caldo clarificado; CE – caldo evaporado e MF – mel final. MA-3 – amostra dia3; MA-4 – amostra dia 4 e MA-5 – amostra dia 5.

As análises realizadas para as velocidades de consumo de substrato e produtividade em etanol demonstraram que não houve variação significativa em relação aos tipos de tratamento de caldos, mas sim em relação aos dias de produção, o que está relacionado às variações da matéria-prima processada e às oscilações do processo industrial.

As usinas contam com a matéria-prima de diferentes produtores, que podem produzir variedades diferentes de cana-de-açúcar, além das diferenças de solo, adubação, irrigação e condições climáticas, tanto que o pagamento da cana é feito de acordo com a qualidade da matéria-prima entregue. Então, mesmo usando caldo de uma mesma usina, ocorre variação devido à matéria-prima processada e condições do processamento industrial.

Logo, o processo de clarificação por ozonização não trouxe nenhum prejuízo ao processo de fermentação alcoólica, pois o caldo misto, que não recebeu tratamento, apresentou comportamento semelhante aos demais tipos de caldos que receberam o ozônio.

Bicudo *et al.* (2016) comentaram sobre a variação do rendimento fermentativo, observada ao longo da safra, devido à variação da qualidade da matéria prima, o que interferiu significativamente no desempenho da levedura. O mosto, considerado como matéria-prima do processo fermentativo, geralmente constituído de melaço ou caldo, e sua qualidade, depende de variáveis como tipo de cana-de-açúcar processada, período de safra, fatores climáticos, condução operacional da fábrica de açúcar e outros. Bicudo *et al.* (2016) ainda afirmaram que mosto de melaço possuía uma maior quantidade de substâncias inibidoras das células de levedura em sua composição, assim, esperava-se um desempenho fermentativo menor. Como no estudo realizado, o mosto de mel final não obteve rendimentos inferiores. Sugere-se a realização de um estudo mais aprofundado sobre fermentação com mostos de mel final originados de caldos clarificados com ozônio.

## 4 Conclusões

Para o processo de fermentação alcoólica, conduzido sob temperatura de 32°C e utilizando a levedura Fermol Millenium Destiller SC-20, o melhor desempenho em termos de produção teórica de etanol foi obtido para mostos com concentrações iniciais de substrato entre 130 e 200 g.L<sup>-1</sup> e concentrações de células entre 24 e 34 g.L<sup>-1</sup>.

O modelo matemático obtido para produção de etanol em relação à concentração de células e substrato é estatisticamente significativo e preditivo, ou seja, pode ser usado para prever a concentração de etanol dentro dos limites avaliados.

Os diferentes tipos de caldos utilizados (CM, CC, CE e MF) para composição dos mostos não influenciaram significativamente, pela análise estatística, teste F, a fermentação alcoólica, apresentando como resultados das respectivas produtividades em etanol: 2,9 ± 0,8 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para o CM, 2,7 ± 0,6 g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> para o CC, 2,5 ± 0,5 g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> para o CE e 2,7 ± 0,5 g.L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> para o MF. As maiores variações foram observadas para mostos de diferentes dias de produção, o que está relacionado às variações da matéria-prima processada e às oscilações do processo industrial. Esses fatores apresentaram um maior impacto na fermentação alcoólica do que o sistema de clarificação por ozonização e a origem do caldo utilizado para composição do mosto.

Assim, é possível afirmar que a clarificação por ozonização do caldo de cana-de-açúcar não interfere no processo de fermentação alcoólica, podendo ser utilizada pelas usinas sem prejuízo na produção de etanol.

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao Grupo Soares de Oliveira – Usina Monte Alegre S/A, pela parceria realizada.

## Referências

AMORIM, H. V.; LEÃO, R. M. **Fermentação alcoólica**: ciência e tecnologia. Piracicaba: Fermentec, 2005.

ARAÚJO, F. A. D. Processo de clarificação do caldo da cana pelo método da bicarbonatação. **Revista Ciência & Tecnologia**, ano 1, n. 1, p. 1-6, 2007. Disponível em: [http://www.unicap.br/revistas/revista\\_e/artigo7.pdf](http://www.unicap.br/revistas/revista_e/artigo7.pdf) . Acesso em: 10 maio 2022.

ASOKAPANDIAN, S.; PERIASAMY, S.; SWAMY, G. J. Ozone for fruit juice preservation. *In*: RAJAURIA, G.; TIWARI, B. K. (org.). **Fruit juices**: extraction, composition, quality and analysis. Kidlington: Academic Press, 2018. p. 511-527. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00025-4> .

AZHAR, S. H. M.; ABDULLA, R.; JAMBO, S. A.; MARBAWI, H.; GANSAU, J. A.; FAIK, A. A. M.; RODRIGUES, K. F. Yeasts in sustainable bioethanol production: a review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 10, p. 52-61, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.03.003> .

BICUDO, M. H. P.; ANDRIETTA, S. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; ROMERO, J. T. Avaliação da influência da matéria-prima sobre o desempenho do processo de fermentação

alcoólica industrial com reciclo de células a base de sacarose. **STAB – Açúcar, Álcool e Subprodutos**, Piracicaba, v. 35, n. 2, p. 44-49, 2016.

CECCATO-ANTONINI, S. R.; BASSI, A. P. G.; PARALUPPI, A. L.; SANTOS, E. G. D.; MATSUOKA, S. Deterioration and fermentability of energy cana juice. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 9, e2060860, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20160860>.

FAVERO, D. M. **Clarificação do caldo de cana-de-açúcar pelo processo de carbonatação**. 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

FUNDO, J. F.; MILLER, F. A.; TREMARIN, A.; GARCIA, E.; BRANDÃO, T. R. S.; SILVA, C. L. M. Quality assessment of *Cantaloupe* melon juice under ozone processing. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 47, p. 461-466, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.04.016>.

GOLDEMBERG, J. Sugarcane ethanol: strategies to a successful program in Brazil. *In*: LEE, J. W. (org.). **Advanced biofuels and bioproducts**. New York: Springer, 2013. p. 13-20.

HAMERSKI, F.; AQUINO, A. D.; NDIAYE, P. M. Clarificação do caldo de cana-de-açúcar por carbonatação - ensaios preliminares. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 33, n. 3, p. 337-341, 2011. DOI: <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v33i3.7914>.

JARAMILLO-SANCHEZ, G. M.; LOREDO, A. B. G.; GÓMEZ, P. L.; ALZAMORA, S. M. Ozone processing of peach juice: impact on physicochemical parameters, color, and viscosity. **Ozone: Science Engineering**, v. 40, n. 4, p. 305-312, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1080/01919512.2017.1417111>.

LIMA, U. A. (org.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Blucher, 2001.

MASSON, I. S.; COSTA, G. H. G.; ROVIERO, J. P.; FREITA, L. A.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M. J. R. Produção de bioetanol a partir da fermentação de caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 9, p. 1695-1700, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20130549>.

MORILLA, C. H. G.; ALVES, L. R. A.; AGUIAR, C. L. Processo de clarificação de caldo de cana de açúcar por sulfitação: barreiras comerciais e impactos econômicos. **A Economia em Revista (AERE)**, v. 24, n. 1, p. 1-10, 2016. DOI: <https://doi.org/10.4025/aere.v24i1.24595>.

OBSERVATÓRIO DA CANA. **Histórico de produção e moagem, safra 2018/2019**. Disponível em: <https://observatoriodacana.com.br/sub.php?menu=historico-de-producao-e-moagem>. Acesso em: 23 ago. 2019.

OLIVEIRA, J. H. S.; SILVA, M. C. S.; SILVA, L. M. O.; SANTOS, M. S. R.; ALMEIDA, R. M. R. G. Cinética do crescimento de leveduras em meio sintético, na presença de inibidores, usando diferentes concentrações de fermento. *In*: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA (COBEQ 2014)**, 10., 2015, São

Paulo. *Anais [...]. São Paulo: Blucher, 2015*. p. 693-700. DOI: <https://doi.org/10.5151/chemeng-cobeq2014-0484-25271-179132> .

PANIGRAHI, C.; MISHRA, H. N.; DE, S. Effect of ozonation parameters on nutritional and microbiological quality of sugarcane juice. *Journal of Food Process Engineering*, v. 43, n. 11, e13542, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpe.13542> .

RICCI, A. C. G.; TEIXEIRA, A. C. S. C. Clarification of sugarcane juice by ozonation and anodic electrooxidation: effects of process variables and energy consumption. *Sugar Tech*, v. 23, p. 1183-1191, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12355-020-00946-4> .

RODRIGUES, R.; SPERANDIO, L. C. C.; ANDRADE, C. M. G. Investigation of color and turbidity in the clarification of sugarcane juice by ozone. *Journal of Food Process Engineering*, v. 4, n. 3, e12661, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfpe.12661> .

SARTORI, J. A. S.; ANGOLINI, C. F. F.; EBERLIN, M. N.; AGUIAR, C. L. Criegee mechanism as a safe pathway of color reduction in sugarcane juice by ozonation. *Food Chemistry*, v. 225, p. 181-187, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.028> .

SHAH, N. N. A. K.; SULAIMAN, A.; SIDEK, N. S. M.; SUPIAN, N. A. M. Quality assessment of ozone-treated citrus fruit juices. *International Food Research Journal*, v. 26, n. 5, p. 1405-1415, 2019. Disponível em: [http://www.ifrj.upm.edu.my/26%20\(05\)%202019/01.pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/26%20(05)%202019/01.pdf) . Acesso em: 10 maio 2022.

VASCONCELOS, N. M.; PINTO, G. A. S.; ARAGÃO, F. A. S. Determinação de açúcares redutores pelo ácido 3,5-dinitrosalicílico: histórico do desenvolvimento do método e estabelecimento de um protocolo para o laboratório de bioprocesso. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento*, Embrapa Agroindústria Tropical, n. 88, 2013. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/982130> . Acesso em: 10 set. 2021.

WALTER, A.; GALDOS, M. V.; SCARPARE, F. V.; LEAL, M. R. L. V.; SEABRA, J. E. A.; CUNHA, M. P.; PICOLI, M. C. A.; OLIVEIRA, C. O. F. Brazilian sugarcane ethanol: development so far and challenges for the future. *WIREs Energy and Environment*, v. 3, n. 1, p. 70-92, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/wene.87>