

**Universidade de Brasília - UnB
Faculdade UnB Gama - FGA
Curso de Engenharia de Energia**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA LEVEDURA (*Saccharomyces cerevisiae*) DE DIFERENTES FONTES
NA OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA CANA-
DE-AÇÚCAR**

**Autor: Pedro Luiz de Almeida Silva
Orientador: Prof.^a Dra. Roseany V. V. Lopes**

**Brasília, DF
2018**



PEDRO LUIZ DE ALMEIDA SILVA

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA LEVEDURA (*Saccharomyces cerevisiae*) DE DIFERENTES FONTES NA OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA CANA-DE-AÇÚCAR

Monografia submetida ao curso de graduação em Engenharia de Energia da Universidade de Brasília, como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em Engenharia de Energia.

Orientador: Prof.^a Dra. Roseany de V. V. Lopes

Brasília, DF
2018

CIP – Catalogação Internacional da Publicação*

Almeida Silva, Pedro Luiz.

Título da Monografia: AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA LEVEDURA (*Saccharomyces cerevisiae*) NA OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA CANA-DE-AÇÚCAR/ Pedro Luiz de Almeida Silva. Brasília: UnB, 2017. 103 42 p : il. ; 29,5 cm.

Monografia (Graduação) – Universidade de Brasília
Faculdade do Gama, Brasília, 2014. Orientação: Roseany de V.
V. Lopes

1. Etanol. 2. Leveduras. 3. Biocombustível
I. Lopes, Roseany de Vasconcelos Viera. II. Doutora.

CDU Classificação



**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA LEVEDURA (*Saccharomyces cerevisiae*) DE
DIFERENTES FONTES NA OBTENÇÃO DE ETANOL A PARTIR DA CANA-DE-
AÇÚCAR**

Pedro Luiz de Almeida Silva

Monografia submetida como requisito parcial para obtenção do Título de Bacharel em (Nome do Curso) da Faculdade UnB Gama - FGA, da Universidade de Brasília, em (28/06/2018) apresentada e aprovada pela banca examinadora abaixo assinada:

Prof. Dra Roseany V. Vieira Lopes, UnB/ FGA
Orientador

Prof. Dra Juliana Petrocchi Rodrigues, UnB/FGA
Membro Convidado

Prof. Dr Marcelo Bento da Silva, UnB/ FGA
Membro Convidado

Brasília, DF
2018

Esse trabalho é dedicado a todos os envolvidos diretamente e indiretamente por meio de muito esforço, dedicação e trabalho para uma melhoria contínua no setor energético brasileiro e mundial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meus familiares e especificamente aos meus avós, Pedro Antônio da Silva e Irene Freire da Silva por terem me criado, me ensinado os valores da vida, por sempre terem acreditado que essa fase seria concluída com êxito, mesmo não estando presentes fisicamente hoje não poderia deixar de agradecê-los.

Aos meus amigos de curso que passamos inúmeras horas de estudos juntos, minha namorada Beatriz Pereira por estar ao meu lado nos momentos mais complicados, mesmo quando meu avô e minha avó faleceram ao decorrer da minha vida acadêmica, ela me mostrou que eu seria capaz de realizar o sonho de ambos.

Agradeço grandiosamente à professora Dra: Roseany V. Vieira Lopes, pela oportunidade de ser seu orientando, por me ensinar e me mostrar os caminhos a serem trilhados durante esse trabalho de conclusão de curso com total dedicação.

Aos professores da UnB-FGA que pude realizar disciplinas, contribuindo na minha formação, e a professora Maria Vitória Duarte Ferrari por me ensinar em sua disciplina de Gestão Ambiental a importância na elaboração e execução de projetos seguindo normas, regras e procedimentos, assim como deve ser seguido em um laboratório.

“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido.
Agora é hora de compreender mais para temer menos.”
Marie Curie.

RESUMO

Com o aumento populacional mundial acompanhado pela demanda crescente de energia de distintas fontes, pesquisadores em todo mundo buscam soluções para uma maior diversificação de suas matrizes energéticas. O etanol proveniente da cana-de-açúcar é um exemplo de combustível que apresenta menor impacto ambiental quando comparado aos combustíveis de origem fóssil. A obtenção deste combustível é possível graças a rota fermentativa de açúcares que estão presentes no caldo da cana, sendo a *Saccharomyces cerevisiae*, a levedura mais utilizada nesse processo. Com o intuito de verificar a influência da utilização da levedura de diferentes marcas na produção de etanol, foram utilizadas duas variedades da *Saccharomyces cerevisiae*, que foram Dona Benta (DB) e a Safale US-05 (SU), com concentrações de 10 e 20 g·L⁻¹. O mosto apresentou valores iniciais de teor de sólidos solúveis de 26,3 °Brix e pH igual a 5. Foram realizadas as análises de graduação alcoólica que apresentaram concentrações alcólicas de 80,85 g·L⁻¹ para a DB (10 g·L⁻¹) e 79,22 g·L⁻¹ para DB (20 g·L⁻¹). Para a SU, cujas concentrações foram de 10 g·L⁻¹ e 20 g·L⁻¹, ambas sem controle da temperatura indicado pelo fabricante, as graduações alcoólicas encontradas foram de 57,73 g·L⁻¹ e 71,05 g·L⁻¹. Para a levedura SU, com controle da temperatura indicada pelo fabricante e concentrações de 10 g·L⁻¹ e 20 g·L⁻¹, as graduações alcoólicas encontradas foram de 64,05 g·L⁻¹ e 63,59 g·L⁻¹, respectivamente. Após o cálculo dos graus alcoólicos foi possível estimar as eficiências para cada reação. Para a levedura SU, sem o controle de temperatura e concentrações de 10 g·L⁻¹ e 20 g·L⁻¹, a eficiência foi de 58,46 % e 65,17 %, respectivamente. Para a levedura SU, com o controle da temperatura e concentrações de 10 g·L⁻¹ e 20 g·L⁻¹, a eficiência foi de 64,86 % e 58,75 %, respectivamente. Para a levedura DB, com concentrações de 10 g·L⁻¹ e 20 g·L⁻¹, a eficiência foi de 90,57 % e 80,22 %. Por fim, foram realizadas as análises de espectroscopia no infravermelho (IV) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) para aferir a produção de etanol, comparando os sinais obtidos com aqueles encontrados na literatura. Os resultados comprovaram a obtenção de etanol após as reações.

Palavras-chave: Etanol, cana-de-açúcar, biomassa, leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

With the increasing population, the growing energy from sources of resources, the world wide seeks solutions for further diversification of its energy matrix. Ethanol from sugarcane is a packaging model that has the lowest environmental impact when compared to fossil fuels. Sugar cane is produced as a fermented sugar, being a *Saccharomyces cerevisiae*, a yeast most used in this process. In order to verify the use of yeast from different brands in the production of ethanol, two varieties of *Saccharomyces cerevisiae*, one Dona Benta and Safale US-05 with 10 and 20 g·L⁻¹ were used. The cane broth has a soluble solids level of 26.3 ° Brix and the pH is equal to 5. The analysis of the alcoholic strength was performed, which presented alcoholic 80.85 g·L⁻¹ for DB in (10 g·L⁻¹), 79.22 g·L⁻¹ for DB in (20 g·L⁻¹). For the SU, whose concentrations were 10 g·L⁻¹ and 20 g·L⁻¹, both without temperature control indicated by the manufacturer, the alcoholic strengths found were 57.73 g·L⁻¹ and 71.05 g·L⁻¹. For SU yeast, with temperature control indicated by the manufacturer and concentrations of 10 g·L⁻¹ and 20 g·L⁻¹, the alcoholic concentrations found were 64.05 g·L⁻¹ and 63.59 g·L⁻¹, respectively. After the calculation of the alcoholic degrees, it was possible to estimate the efficiencies for each reaction. For yeast SU, without the control of temperature and concentrations of 10 g·L⁻¹ and 20 g·L⁻¹, the efficiency was 58.46% and 65.17%, respectively. For SU yeast, with temperature control and concentrations of 10 g·L⁻¹ and 20 g·L⁻¹, the efficiency was 64.86% and 58.75%, respectively. For yeast DB, with concentrations of 10 g·L⁻¹ and 20 g·L⁻¹, the efficiency was 90.57% and 80.22%. Finally, the analyzes of infrared (IR) spectroscopy and hydrogen nuclear magnetic resonance (¹H NMR) were carried out to measure the ethanol production, comparing the signals obtained with those found in the literature. The results showed the ethanol obtained after the reactions.

Keywords: Ethanol, sugarcane, biomass, yeast, *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Matriz Energética Brasileira no ano de 2015 (MME, 2016).....	4
Figura 2 - Matriz Energética Brasileira no ano de 2016 (MME, 2016).....	5
Figura 3 - Produção de cana-de-açúcar por região brasileira (CONAB, 2015).	8
Figura 4 - Partes constituintes da cana-de-açúcar (SUCRE, 2016).	9
Figura 5 - Obtenção de açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar (CORTEZ <i>et al.</i> ,2013)	10
Figura 6 - Obtenção de açúcar e etanol a partir do milho (CORTEZ <i>et al.</i> ,2013).....	11
Figura 7 - Fermentação. Reações enzimáticas. (BROOK <i>et al.</i> , 2014).	14
Figura 8 - Curva de crescimento típica de microrganismos (ROBAZZA <i>et al.</i> , 2010).	15
Figura 9 - Crescimento da levedura IZ-1904 em meios contendo concentrações crescentes de cádmio (BASSOS, SILVA, 2004).	16
Figura 10 - Crescimento da levedura PE-2 em meios contendo concentrações crescentes de cádmio (BASSOS, SILVA, 2004).	17
Figura 11 – Fluxograma de obtenção do etanol hidratado.	20
Figura 12 - Leveduras: a) Safale US 05 e b) Fermix Dona Benta.	21
Figura 13 - Nutrientes para suplementação do microrganismo.....	23
Figura 14 – Início da fermentação do mosto da cana-de-açúcar.	24
Figura 15 - Espectrofotômetro Spectrum Two.....	27
Figura 16 - Aparato de destilação utilizado no trabalho.	27
Figura 17 - Cinética fermentativa para o fermento DB (10 g·L ⁻¹) sem controle de temperatura.....	31
Figura 18 - Cinética fermentativa para o fermento DB (20 g·L ⁻¹) sem controle de temperatura.....	32
Figura 19 - Cinética fermentativa para o fermento SU (10 g·L ⁻¹) sem controle da temperatura.....	33
Figura 20 - Cinética fermentativa para o fermento SU (20 g·L ⁻¹) sem controle da temperatura.....	34
Figura 21 - Cinética fermentativa para o fermento SU (10 g·L ⁻¹) com controle da temperatura.....	35
Figura 22 - Cinética fermentativa para o fermento SU (20 g·L ⁻¹) com controle de Temperatura.....	36
Figura 23 - Formação de Etanol (g·L ⁻¹) - 30 horas de reação.	36

Figura 24. Espectro de RMN ^1H do etanol obtido pela fermentação com a levedura DB (10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).....	37
Figura 25. Espectro de RMN ^1H do etanol obtido pela fermentação com a levedura DB (20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).....	37
Figura 26. Espectro de RMN ^1H do etanol obtido pela fermentação com a levedura SU (10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) sem controle da temperatura.	38
Figura 27. Espectros de RMN ^1H de amostras de etanol obtidas pela fermentação com a levedura SU (20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) sem controle da temperatura.....	38
Figura 28. Espectro de RMN ^1H do etanol obtido pela fermentação com a levedura SU (10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) com controle da temperatura.	39
Figura 29. Espectro de RMN ^1H do etanol obtido pela fermentação com a levedura SU (20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) com controle da temperatura.	39
Figura 30 – Espectro no IV do álcool etílico Itajá.	40
Figura 31 – Espectros no infravermelho das amostras: padrão e etanóis obtidos com a levedura SU (10 e 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) sem controle de temperatura.....	41
Figura 32 – Espectros no infravermelho das amostras padrão e etanóis obtidos com a levedura SU (10 e 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) com controle de temperatura.....	42
Figura 33 – Espectros no infravermelho das amostras padrão e etanóis obtidos com a levedura DB (10 e 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).	43

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 – Dados referentes às safras de variados tipos de biomassa no ano de 2015 (IBGE, 2015).	7
Tabela 2 - Composição mássica e energética da palha, do bagaço e do açúcar (CORTEZ <i>et al.</i> , 2013).	9
Tabela 3 - Propriedades do etanol (VÁSQUES, 2007).....	11
Tabela 4 - Parâmetros mosto antes da fermentação.	28
Tabela 5 – Parâmetros avaliados após fermentação.	29
Tabela 6 - Teores alcoólicos após a fermentação.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica.

ATP – Adenosina Trifosfato.

ATT- Acidez Total Titulável.

DB – Dona Benta.

ha – Hectare.

IPI - Imposto sobre produtos industrializados.

MMA - Ministério do Meio Ambiente.

MME - Ministério de Minas e Energia.

GL - Gay Lussac.

OIE - Oferta interna de energia.

OPEP – Organização dos Países exportadores de Petróleo.

PCI – Poder Calorífico Inferior.

Proálcool - Programa Nacional do Álcool.

RMN¹H – Ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

SU – Safale US – 05.

t – Tonelada.

TEP - Toneladas equivalentes de petróleo.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE QUADROS E TABELAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
1. INTRODUÇÃO	1
1.2. OBJETIVOS	2
1.2.1. Objetivo Geral	2
1.2.2. Objetivos específicos	2
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. CRISE DO PETRÓLEO E PROÁLCOOL	3
2.2. MATRIZ ENERGÉTICA BRASILEIRA	4
2.3. BIOMASSA	5
2.3.1. Cana-de-Açúcar	6
2.3.1.1. Estrutura da Cana-de-Açúcar	8
2.4. ETANOL	10
2.4.1 Etanol de Primeira Geração da Cana-de-açúcar	12
2.5. FERMENTAÇÃO	12
2.6. LEVEDURAS DA LINHAGEM <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2.7. CARACTERIZAÇÃO DO ETANOL	17
2.7.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	17
2.7.2. Graduação Alcólica	18
2.7.3. Determinação de pH	18
2.7.4. Determinação do °Brix	18
3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL	19
3.1. CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR	20
3.2. LEVEDURAS	20
3.3. PRODUÇÃO DE ETANOL	21
3.4. ESTERILIZAÇÃO DOS CALDOS	21
3.5. ANÁLISES DO MOSTO	21
3.5.1. Acidez total titulável (ATT)	21
3.5.2. Medição de pH	22

3.5.3. Sólidos solúveis totais (°Brix)	22
3.6. PREPARO DO MOSTO	22
3.6.1. Correção de pH	22
3.6.2. Chaptalização	22
3.6.3. Adição de Nutrientes	22
3.6.4. Preparo dos Inóculos	23
3.7. FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA	23
3.8. DECANTAÇÃO	24
3.9. ANÁLISES DA VINHAÇA	24
3.9.1. Teor alcóolico	24
3.9.4. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN ¹ H)	26
3.9.5. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)	26
3.9. DESTILAÇÃO	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	28
4.1. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO MOSTO	28
4.2. ANÁLISES DO DESEMPENHO APÓS A FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA	28
4.3. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS LEVEDURAS E SUAS CONCENTRAÇÕES	31
4.3.1. Cinética fermentativa utilizando o fermento DB (10 g.L ⁻¹)	31
4.3.2. Cinética fermentativa utilizando o fermento DB (20 g.L ⁻¹)	31
4.3.3. Cinética fermentativa utilizando o fermento SU (10 g.L ⁻¹) sem controle da temperatura	32
4.3.4. Cinética fermentativa utilizando o fermento SU (20 g.L ⁻¹) sem controle da temperatura	33
4.3.5. Cinética fermentativa utilizando o fermento SU (10 g.L ⁻¹) com controle da temperatura	34
4.3.6. Cinética fermentativa utilizando o fermento SU (20 g.L ⁻¹) com controle da temperatura	35
4.4. ANÁLISE POR RMN ¹ H	36
4.5. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)	40

6. CONCLUSÃO	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1. INTRODUÇÃO

O etanol de cana-de-açúcar surgiu como uma fonte energética no Brasil, impulsionado pelo Proálcool, com os altos e baixos dos anos 70, o resultado foi satisfatório e com sucesso tecnológico para o país. Atualmente, as usinas/destilarias possuem o maior sistema de energia comercial de biomassa do mundo, sendo por meio da produção de etanol e pela cogeração de energia a partir do bagaço da cana (SCHULZ, 2010). O etanol é uma fonte de energia com menor grau de impacto sobre o efeito estufa, pelo fato que de o CO₂ liberado em sua queima é reabsorvido pela fotossíntese durante o crescimento das plantas (GOLDEMBERG, *et. al*, 2008).

A estimativa é que ocorra grande oferta de biocombustíveis por meio dos grandes produtores, devendo subir 30 % quando analisado o espaço de tempo entre 2013 e 2022. Argentina e Brasil devem seguir as previsões, devido serem os maiores exportadores de biocombustíveis. A Argentina exportando biodiesel e o Brasil bioetanol. O ritmo de maior consumidora e importadora de biocombustíveis deve continuar com a União Europeia. Em 2013 foi estimado que com o aumento da demanda por etanol em território nacional seria necessário implantar até o ano de 2020, 120 novas usinas (UDOP, 2013; NOVACANA, 2013).

Os avanços tecnológicos surgiram em centros de pesquisas em diferentes nações para que o processo de obtenção de etanol tivesse melhorias contínuas e os custos de produção se tornassem mais rentáveis para a indústria e viável para o consumidor. Um exemplo de diminuição no custo de produção está na colheita mecanizada quando comparada a colheita manual, tendo uma diminuição de aproximadamente 20% quando comparado os dois processos (BALSALOBRE, *et al.*, 1999).

Com o avanço tecnológico e a busca por uma maior eficiência, as leveduras têm sido selecionadas de acordo com o processo e produto desejável. A produtividade, eficiência da fermentação, tolerância ao etanol, a temperatura e resistência a altas concentrações de açúcares são alguns dos principais fatores na escolha de uma levedura (HAMMOND, 1995; GUTIERREZ, ANNICCHINO, LUCATTI, 1990). Por esse motivo, no processo de fermentação alcoólica, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microorganismo largamente utilizado.

Desta forma, o objetivo desse trabalho é avaliar a influência da utilização da levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, as que têm finalidades distintas

quando aplicadas aos seus usos convencionais (panificação e produção de cerveja) para obtenção de etanol.

1.1. JUSTIFICATIVA

Na matriz energética brasileira, a cana-de-açúcar tem grande participação, tanto na produção de etanol como na cogeração de energia do bagaço desta, ficando atrás apenas do petróleo e seus derivados. Nos anos de 2015 e 2016 teve capacidade de geração de energia superior às hidrelétricas (MME, 2016).

A demanda por etanol tem uma tendência crescente ao analisar seu consumo, havendo correlação com o acréscimo de veículos a combustão vendidos nos últimos anos no Brasil e no mundo. O veículo não sendo *flex* e o consumidor optando em consumir gasolina, o etanol anidro é adicionado em até 27% à gasolina no Brasil, como previsto em sua legislação. Parcerias entre órgãos governamentais e o setor privado tendem a melhorar a produção de etanol, havendo grandes esforços para aprimorar as principais propriedades da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, contribuindo, assim para que a fermentação seja otimizada.

O presente trabalho empregará a levedura *Saccharomyces cerevisiae* de duas fontes e usos distintos na produção de etanol, utilizando o caldo da cana-de-açúcar para verificar o rendimento e eficiência das reações de fermentações.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo Geral

Utilizar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* de fontes e usos distintos para obtenção de etanol a partir do caldo da cana-de-açúcar.

1.2.2. Objetivos específicos

- Obter etanol do caldo da cana-de-açúcar, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial e cervejeira (artesanal);
- Acompanhar as cinéticas da fermentação por determinação de pH, °Brix e temperatura das reações;
- Caracterizar o etanol obtido por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H), espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) e graduação alcóolica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CRISE DO PETRÓLEO E PROÁLCOOL

O Brasil, por volta dos anos de 1970 importava 80 % do petróleo consumido em solo nacional. Dados apontam que no triênio de 1974-76 o valor dispendido em importação de petróleo foi de US\$ 8,6 bilhões, contra o triênio anterior cujo valor foi de US\$ 1,4 bilhão. Importando o petróleo mais caro, certa parte do aumento da dívida externa estava relacionada com a crise do petróleo. Por consequência, foram propostos programas de cunho energético, como o Proóleo, o Procarvão e o Proálcool, e o último teve maior efetividade em solo nacional (SHIKIDA, BACHA, 1998).

Nos anos de 1970 era vislumbrado um novo cenário, a utilização da cana-de-açúcar para a produção de combustível ao invés de exclusivamente para a área alimentícia. Por meio do Decreto de número 76.593, em 14 de novembro de 1975, foi criado o Proálcool (Programa Nacional do Álcool), (PIACENTE, 2006). O intuito principal do programa em sua primeira fase (1975-1979) era produzir álcool etílico anidro para ser adicionado à gasolina. Em sua segunda fase (1980-1985), após mais um conflito no Oriente Médio entre Irã e Iraque e, com carros movidos a álcool etílico hidratado já inseridos no cenário nacional, aumentaram-se as produções de automóveis e de álcool (SHIKIDA, BACHA, 1998).

Em meados dos anos de 1970, além da crise do petróleo ocorreu a crise da agroindústria canavieira decorrente da instabilidade do mercado externo açucareiro, sendo possível a viabilidade do Proálcool. Tal ambiente foi totalmente favorável ao surgimento de novas alternativas, como o Proálcool, Procarvão, Proóleo, mas o ambiente de crise no setor canavieiro propiciou o uso da cana-de-açúcar como melhor forma energética (SHIKIDA, BACHA, 1998).

A segunda fase (1980 a 1985) ficou marcada pelo aumento da produção de álcool, tendo como meta 10,7 bilhões de litros em 1985. Enfatizando o uso de álcool etílico hidratado para automóveis e dando maior foco na implantação de destilarias autônomas para que se fosse possível alcançar o objetivo da nova fase do programa (SHIKIDA, BACHA, 1998).

Nos anos de 1986 a 1995 houve um desaceleração do Proálcool acarretado por um menor investimento por parte do Estado foi um dos gargalos para a queda do

programa, que foi de US\$ 5,406 bilhões entre 1980 e 1984, onde 56 % era oriundo de capital público e 44 % de capital privado, caiu drasticamente para US\$ 0,511 bilhão, tendo um investimento de 39 % do setor público e 61% do setor privado (LOPES, 1996).

Outro problema foi que a partir do fim de 1985 a oferta ficou menor que a demanda, acarretando na importação de metanol para a adição à gasolina ou ao próprio álcool hidratado, atacando um dos pontos do programa que era a economia de divisas (SHIKIDA, BACHA, 1998).

2.2. MATRIZ ENERGÉTICA BRASILEIRA

A matriz energética de um país é baseada na oferta interna de energia (OIE) – energia necessária para movimentar a economia, sendo medida em toneladas equivalentes de petróleo (tep). O Brasil apresentou o valor de 286 milhões (tep) acumulados ao decorrer do ano de 2016 e averiguado no mês de dezembro desse mesmo ano. Dessa quantidade total apresentada o setor de energias renováveis correspondeu a 43,6% (MME, 2016). As Figuras 1 e 2 apresentam a matriz energética brasileira nos anos de 2015 e 2016, com participação significativa de derivados da cana-de-açúcar.

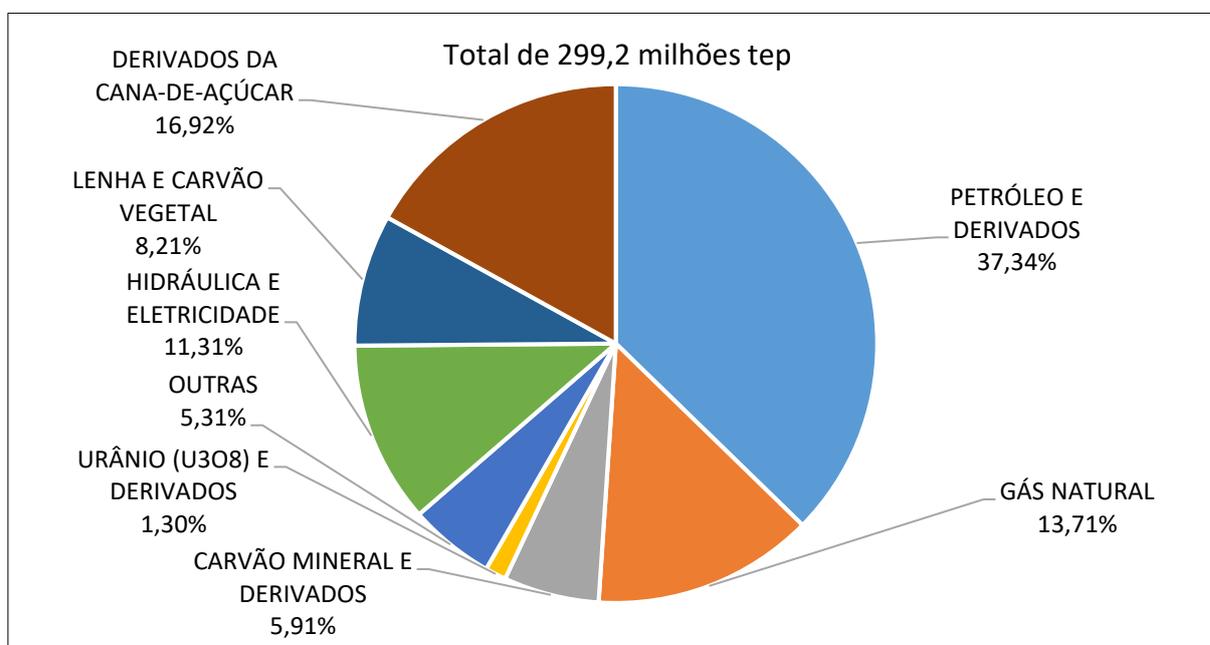


Figura 1 - Matriz Energética Brasileira no ano de 2015 (MME, 2016).

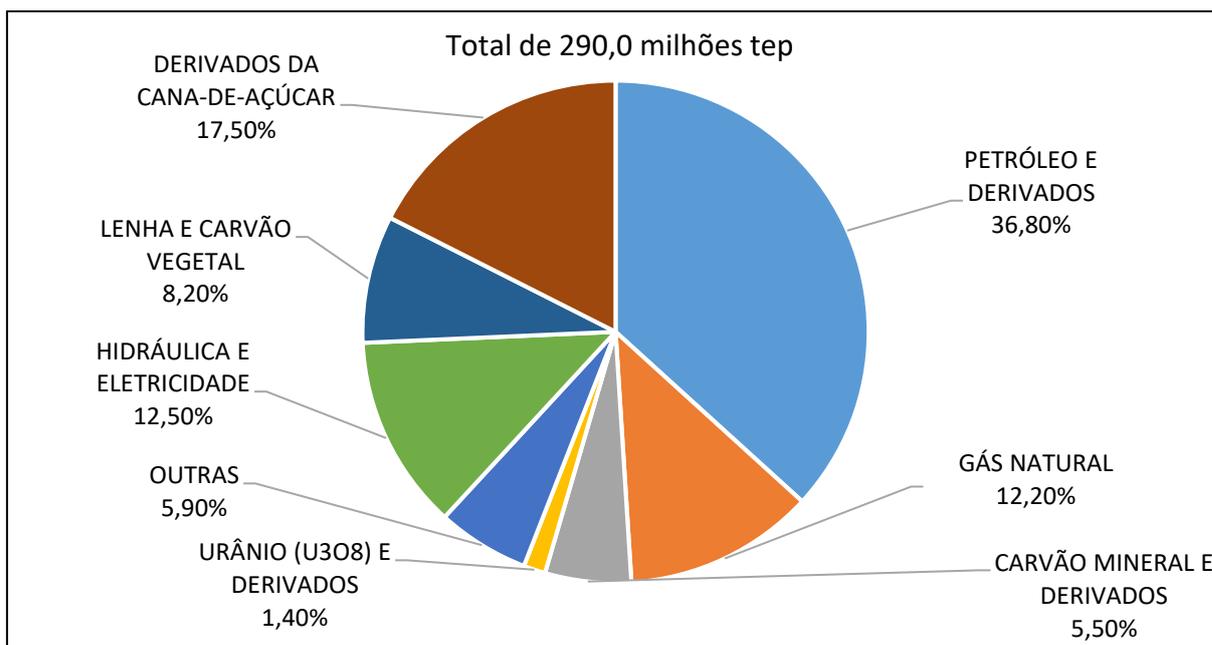


Figura 2 - Matriz Energética Brasileira no ano de 2016 (MME, 2016).

Com um cenário de crise econômica com queda de aproximadamente 3,8 % do PIB em 2015, a demanda por Energia teve uma diminuição 2,1 %, apresentando uma certa equidade com o cenário mundial cuja a queda foi de 2,2 %. Mesmo com um momento conturbado economicamente, a participação dos derivados da cana-de-açúcar apresentou um acréscimo na matriz energética brasileira ao analisar os dados de 2014/15, 2015/16, respectivamente de 1,1 % e 0,6 % (MME, 2015). Salientando que a tendência da participação da cana-de-açúcar na matriz energética brasileira deve seguir crescente nos próximos anos, como demonstrado nos anos anteriores.

2.3. BIOMASSA

Biomassa é considerada qualquer matéria de origem orgânica que tenha capacidade de ser transformada em energia mecânica, térmica ou elétrica. Pode ser classificada em três grupos de acordo com sua origem, como: florestal, agrícola e rejeitos urbanos e industriais. Dependendo da matéria-prima utilizada, apresentará potenciais energéticos distintos, quanto ao processo para obtenção de produtos energéticos (ANEEL, 2008).

- Biomassa florestal é caracterizada por produtos e subprodutos oriundos de recursos florestais, sendo basicamente biomassa lenhosa, podendo ser cultivada ou não, tendo a sua obtenção a partir de florestas cultivadas ou do desmatamento de florestas nativas. Os fins de tais materiais lenhosos têm variadas destinações, como: produção de

papel e celulose, móveis, etc. Para fins energéticos utiliza-se rotas de transformação termoquímica das mais simples até as mais complexas, que vão desde a sua combustão direta, carbonização até a transformação em combustíveis líquidos e gasosos (metanol, etanol, gases de síntese, licor negro, entre outros) (ANEEL, 2008).

- Biomassa de rejeitos urbanos e industriais é considerada como resíduos sólidos e líquidos presentes em aterros sanitários, lixos e esgotos, contendo os mais diversificados materiais, podendo ser classificados em matéria orgânica e inorgânica. Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA), os resíduos orgânicos são restos de animais ou vegetais, advindos de zonas urbanas ou doméstica, áreas de atividades agrícolas ou industriais, regiões com estações de tratamento, etc. Tais resíduos podem ser utilizados para fins energéticos, podendo ocorrer a combustão direta, a gaseificação, pela rota termoquímica, e ao separar os resíduos recicláveis, pode ocorrer a produção de biogás pela digestão anaeróbia. Pela digestão anaeróbia é possível produzir biogás graças a matéria orgânica presente no esgoto.

Os resíduos agrícolas podem ser empregados como fonte energética ao passar por processos como: transformação termoquímica, combustão direta, pirólise ou gaseificação.

- Biomassa agrícola tem como origem o plantio não florestal, é o principal processo para a geração da biomassa agrícola, pois visa a obtenção de um produto que gere uma fonte principal de renda para o empreendedor, e que seus subprodutos e resíduos possam agregar uma maior diversificação na produção, por fim, maior lucratividade. As indústrias do setor energético têm em suas plantas de produção rotas tecnológicas para transformações biológicas e físico-químicas das biomassas agrícolas que foram colhidas, como a fermentação, hidrólise e esterificação, gerando combustíveis líquidos, como o etanol, o biodiesel e diversos tipos de óleos vegetais. As biomassas mais integradas ao processo de transformação para ganho energético são, cana de açúcar, o milho, o trigo, a beterraba, a soja, o amendoim, o girassol, a mamona e o dendê.

2.3.1. Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar tem papel fundamental no agronegócio nacional, na produção alimentícia e na geração de energia, tendo previsão de aumento na produção de 2,9% para o ano transcorrido de 2017 comparado a safra de 2016. A produção de

açúcar deve chegar até o final desse ano a um valor de 39,96 milhões de toneladas, e o etanol ultrapassar os 27,5 bilhões de litros (CONAB, 2016). A Tabela 1 apresenta dados referentes às safras de variados tipos de biomassa no ano de 2015, esclarecendo a importância econômica da cana-de-açúcar para o Brasil.

Tabela 1 – Dados referentes às safras de variados tipos de biomassa no ano de 2015 (IBGE, 2015).

Principais produtos	Área		Quantidade produzida (t) (10 ⁶)	Rendimento médio (kg/ha)	Valor da produção (1000 R\$)
	Plantada ou destinada à colheita (ha) (10 ⁶)	Colhida (ha) (10 ⁶)			
Total	76,80	75,83			265 488 161
Soja (em grão)	32,31	32,18	97,50	3 029	90 357 010
Cana-de-açúcar	10,16	10,10	748,64	74 173	43 665 638
Milho (em grão)	15,85	15,41	85,28	5 536	29 771 411

Com mais de 13 % da área para plantio sendo destinada para o cultivo de cana-de-açúcar, com um valor de produção equivalente a 43 bilhões de reais, é possível a obtenção de uma boa matéria orgânica para a produção de etanol. A Figura 5 apresenta a produção de cana no Brasil de acordo com cada região.

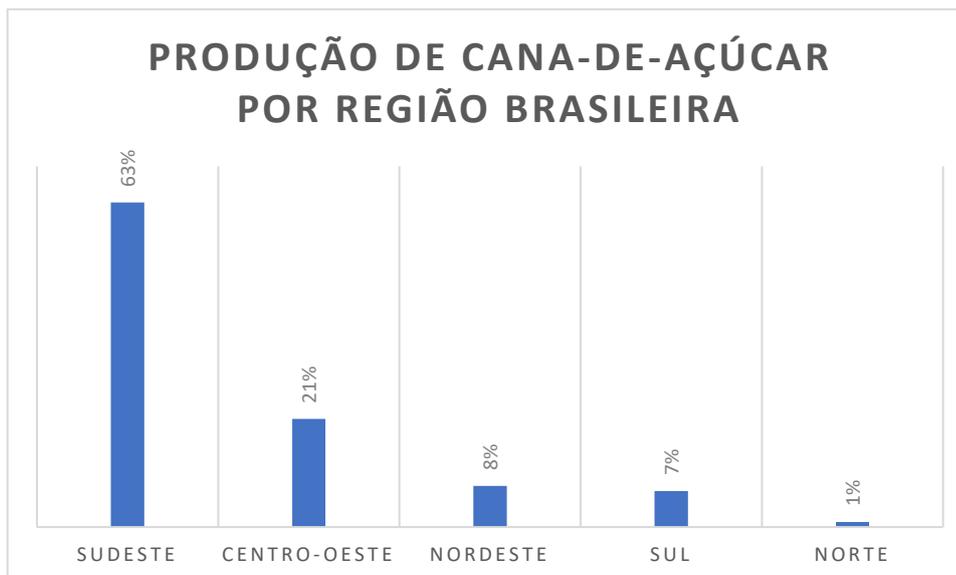


Figura 3 - Produção de cana-de-açúcar por região brasileira (CONAB, 2015).

2.3.1.1. Estrutura da Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar faz parte da família de plantas que apresentam folhas com o formato de lâminas, com haste fibrosa espessa e classificada como gramínea, medindo entre 2 e 5 metros de altura. A cana-de-açúcar apresenta uma grande variedade por serem híbridas de várias espécies do gênero *Saccharum*, sendo a *Saccharum officinarum*, a mais conhecida (CORTEZ *et al.*, 2013).

A cana-de-açúcar é constituída de quatro partes principais, folhas verdes, colmos, folhas secas e raiz. As partes utilizadas da planta são o talo, que é o conjunto de colmos, sendo divididos por nós e constituídos por fibras (celulose, hemicelulose e lignina) e açúcar (sacarose, frutose e lactose), e pelas folhas (folhas secas e folhas verdes) (CORTEZ *et al.*, 2013). Na Figura 4 é possível observar as principais partes constituintes da cana.

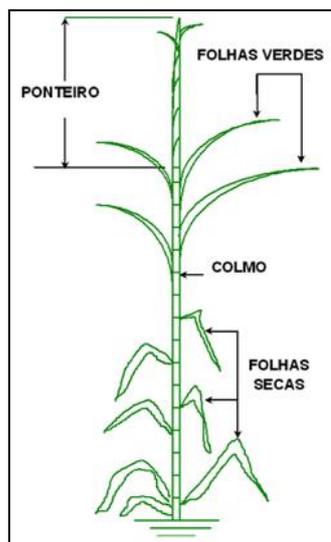


Figura 4 - Partes constituintes da cana-de-açúcar (SUCRE, 2016).

A composição mássica da cana-de-açúcar é constituída por palha, bagaço e açúcar que somadas dão 42,5 % do conteúdo total da planta, apresentando praticamente a mesma proporção entre si, e os 57,5 % restantes é água. Em termos energéticos a mesma proporção pode ser notada, apresentando um agregado energético de 7400 MJ por tonelada de cana (CORTEZ *et al.*, 2013). A Tabela 2 desconsidera o restante da cana-de-açúcar ao apresentar as porcentagens mássicas, como raízes e folhas, e a capacidade energética da palha, bagaço e açúcar.

Tabela 2 - Composição mássica e energética da palha, do bagaço e do açúcar (CORTEZ *et al.*, 2013).

Componentes	Conteúdo mássico		Conteúdo energético	
	[kg/t]	[%]	[MJ]	[%]
Palha	140	32,9%	2500	33,8%
Bagaço	135	31,8%	2400	32,4%
Açúcar	150	35,3%	2500	33,8%
Total	425	100%	7400	100%

A cana-de-açúcar é constituída por fibra e sumo, onde o sumo é composto por água, sólidos solúveis ou °Brix. O °Brix é composto de sacarose mais açúcares

reduzidores e sais. Considerando a cana com matéria seca a 30 %, tem 70 % de umidade, 14,7 % de fibras, 13 % de açúcares e 2,3 % de não-açúcares.

2.4. ETANOL

O etanol é um produto proveniente da fermentação de amiláceos e biomassa ricas em açúcares (cana-de-açúcar, milho, beterraba, mandioca, trigo e sorgo sacarino e sucessivamente destilação do fermentado. É uma substância orgânica, faz parte do grupo funcional hidroxila (-OH), e sua fórmula molecular é (C₂H₅OH), podendo ser hidratado que é azeotrópico, contendo 95,1% e 96 % de etanol em massa (INPM), e anidro que apresenta 99,6 % de etanol em massa (INPM) e 0,7 % de água. O etanol anidro é obtido a partir da desidratação do etanol hidratado, sendo miscível em qualquer proporção quando adicionado à gasolina, salientando que a respectiva adição é positiva ao analisar a octanagem do combustível (CORTEZ *et al.*,2013). A rota de obtenção o etanol a partir da cana-de-açúcar e do milho são apresentados nas Figuras 5 e 6.

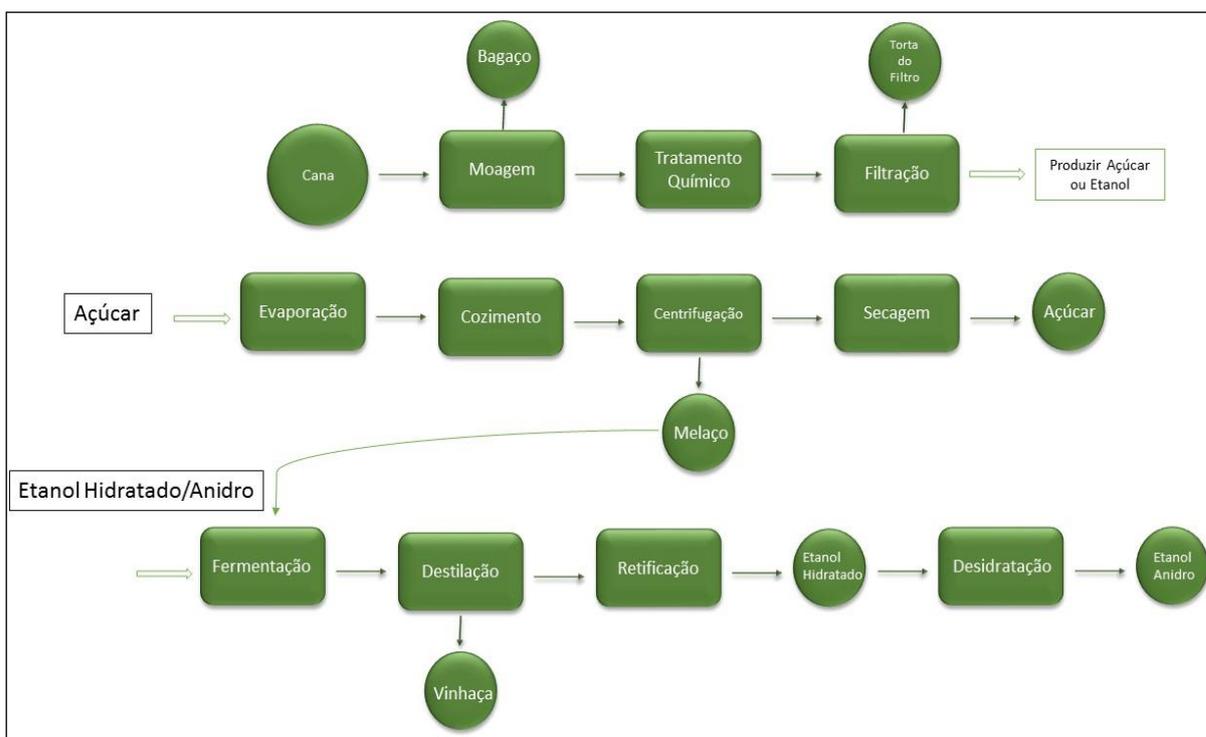


Figura 5 - Obtenção de açúcar e etanol a partir da cana-de-açúcar (CORTEZ *et al.*,2013)

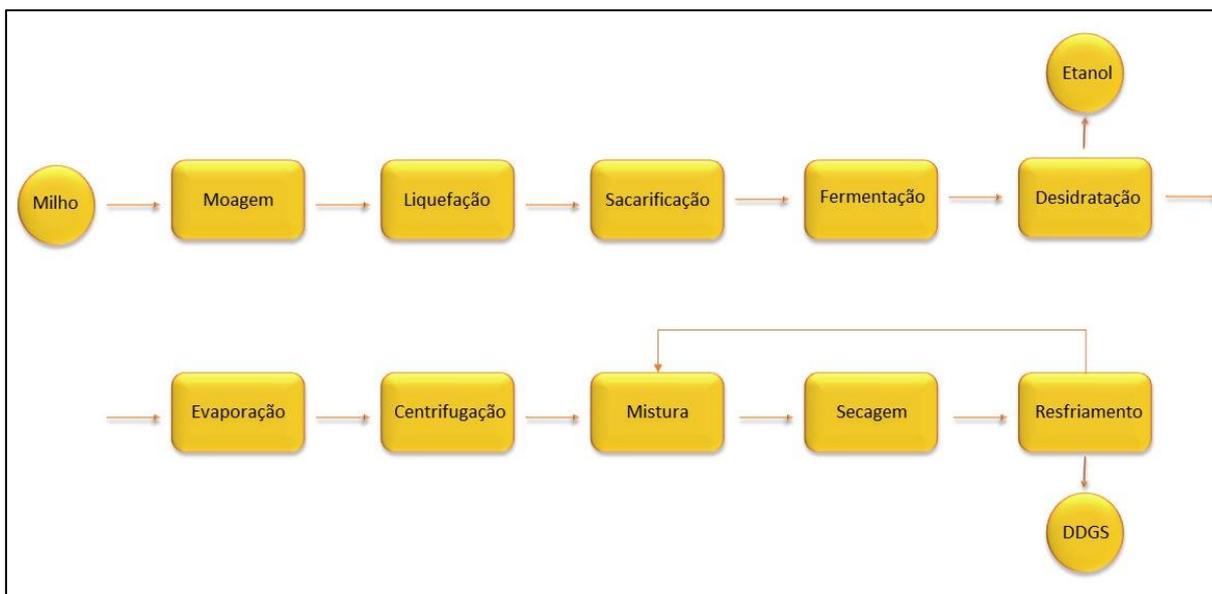


Figura 6 - Obtenção de açúcar e etanol a partir do milho (CORTEZ *et al.*, 2013).

O etanol para fim combustível tem características como ser incolor, de odor aromático, reação neutra e sabor ardente. Ao ser queimado, tem chama de coloração azulada, pouco luminosa, mas transfere uma quantidade alta de calor. É inflamável, em estado puro inflama-se espontaneamente pela ação dos raios solares. (CORTEZ *et al.*, 2013). A Tabela 3 mostra algumas propriedades do etanol.

Tabela 3 - Propriedades do etanol (VÁSQUES, 2007).

Propriedades	Valor
Massa molar, g/mol	46,0
Ponto de ebulição, °C	78,32
Ponto de fusão, °C	-117,22
Ponto de congelamento, °C	-114,1
Peso específico 20°C, g/cm ³	0,7894
Oxigênio, %	34,8
Calor de combustão a 25°C, J/g (PCI)	29676,7

Uma das principais distinções entre a gasolina e o etanol está na quantidade de oxigênio na composição do etanol (aproximadamente 35 %), uma presença tão

elevada de oxigênio propicia uma queima mais limpa, ganho de rendimento do motor e redução dos gases de efeito estufa (CORTEZ *et al.*, 2013).

2.4.1 Etanol de Primeira Geração da Cana-de-açúcar

A produção convencional para a obtenção de bioetanol de primeira geração a partir da cana-de-açúcar segue os seguintes métodos: recebimento e limpeza da cana-de-açúcar, extração de açúcares, tratamento e concentração do caldo, fermentação, destilação e desidratação (DIAS *et al.*, 2009).

Após o processo de colheita por máquinas agrícolas ou por meio manual a cana colhida é lavada com água para a retirada de impurezas provenientes da plantação.

A obtenção do caldo ocorre durante a moagem, onde o caldo será utilizado nos processos de fermentação, destilação e retificação, caso se queira obter o etanol anidro ocorrerá o processo de desidratação. O bagaço que antes era descartado após a moagem, nos dias atuais é utilizado para a produção de etanol de segunda geração e a cogeração de energia a partir de sua queima (DIAS *et al.*, 2011).

2.5. FERMENTAÇÃO

A fermentação alcoólica é um processo biológico onde leveduras atuam sobre açúcares fermentescíveis, como sacarose, glicose e frutose (LIMA, MARCONDES, 2002). Bioquimicamente a fermentação se dá quando ocorre a oxidação incompleta do açúcar, tendo como subproduto um composto orgânico oxidável. Primeiramente ocorre a hidrólise por meio da enzima que converte sacarose em glicose mais frutose. Estando em via glicolítica e ocorrendo uma sequência de reações, são transformadas em piruvato. Posteriormente a enzima piruvato descarboxilase descarboxila o piruvato, formando acetaldeído e liberando CO₂. Em sequência o acetaldeído é reduzido a etanol, pela enzima álcool desidrogenase (ADH) (MISSAWA, 2009). A equação (1) apresenta a formação de etanol após o processo fermentescível.



Uma avaliação estequiométrica gera valores de 0,51 g de etanol e 0,49 g de dióxido de carbono para 1 g de glicose, mas a síntese celular e produtos secundários limitam uma eficiência de 100 % na conversão. A fermentação alcoólica é dividida em dois processos, a fase para a produção de glicólise e o metabolismo anaeróbico do piruvato. Na matriz citoplasmática de microrganismos eucarióticos ocorre a produção

de glicose, sendo separada em duas partes: a fase inicial de seis carbonos e a fase final de três carbonos. O intuito da levedura quando metaboliza anaerobicamente o açúcar é gerar uma forma de energia Adenosina Trifosfato (ATP) que tem funções fisiológicas definidas, como absorção, excreção, biossínteses para manutenção da vida, crescimento e multiplicação. O etanol e CO₂ não tem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose (ROMÃO, 2011).

A fosforização da glicose ocorre na fase dos seis carbonos por duas vezes, dando origem a frutose 1,6-bi fosfato, consumindo duas moléculas de ATP. Na fase dos três carbonos, acontece a conversão para piruvato, formando moléculas de ATP.

O piruvato é reduzido a etanol em duas etapas: primeiramente ocorre a descarboxilação do piruvato em uma reação sem reversibilidade catalisado pelo piruvato descarboxilase, e na segunda fase o acetaldeído é reduzido a etanol. Os produtos de excreção para a célula em anaerobiose são etanol e CO₂. O processo envolve 10 reações em sequência ordenada, onde cada etapa é catalisada por uma enzima específica (LIMA, BASSO E AMORIM, 2001):

- (1) - Ocorre a formação da glicose 6-fosfato a partir da transferência de um grupo fosfato (PO₄⁻) para o composto orgânico. Uma molécula de ATP é consumida. A glicose 6-fosfato é precursora das próximas reações;
- (2) - Isomerização do composto glicose 6-fosfato formando a frutose 6-fosfato. Aldeído é transformado em cetona;
- (3) - ATP é consumida com a fosforilação do carbono frutose. Ocorre um ganho de energia na próxima etapa;
- (4) - Conversão da frutose fosforilada em duas moléculas de três carbonos. É formado um precursor metabólico que influenciará na etapa (5). O gliceraldeído 3-fosfato oxida e de forma simultânea é fosforilado, ocasionando em uma molécula de alta energia, liberando elétrons que reduzem o NAD⁺ e NADH (Dinucleótido de nicotinamida e adenina). O NAD são compostos orgânicos presentes em seres vivos e responsáveis pela produção de energia para as células;
- (6) - Em mais uma fosforilação é produzido novamente um ATP, formando um precursor metabólico, assim como na etapa (7);
- (8) - A última fosforilação a partir do precursor da etapa anterior, ocorrendo a clivagem oxidativa de uma molécula de glicose. O resultado é a formação de duas moléculas

de piruvato, um dos percussores mais importantes da reação. A partir do piruvato a etapa final de conversão é possível;

(9) - O piruvato é descarboxilado em acetaldeído, é utilizado posteriormente para oxidar o NADH, formando o etanol (10). As etapas descritas acima estão apresentadas na Figura 7.

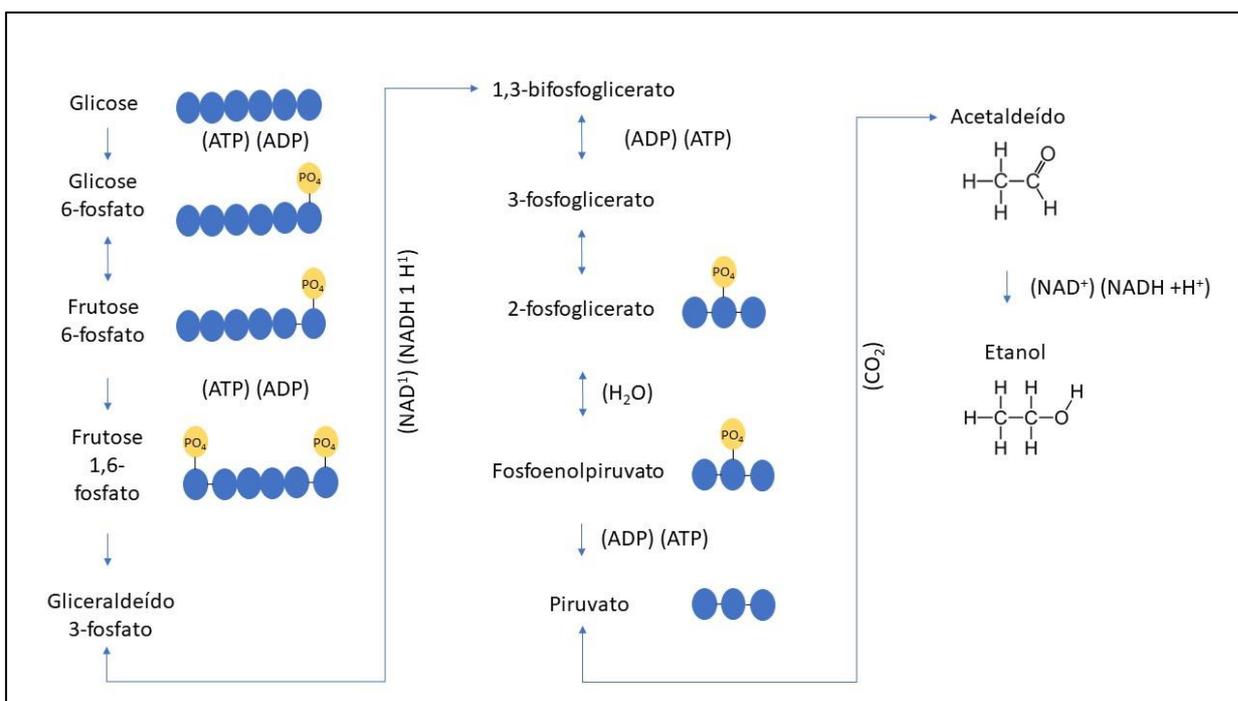


Figura 7 – Fermentação. Reações enzimáticas (Adaptado de BROOK *et al.*, 2014).

2.6. LEVEDURAS DA LINHAGEM *Saccharomyces cerevisiae*

O processo fermentativo utiliza leveduras que são tolerantes a etanol de alto rendimento, tendo em vista que quanto maior a concentração deste, maior é o nível de ataque, podendo ser letal às células presentes na fermentação (AMORIM *et al.*, 2011).

Os principais requisitos a serem seguidos para o crescimento de leveduras incluem: água, uma fonte de carbono – carboidratos fermentescíveis como fonte de energia, oxigênio, fonte de nitrogênio, fatores que melhorem o crescimento, como vitaminas, e íons inorgânicos – essenciais para o metabolismo celular (RUSSEL, 2003). As leveduras em baixa concentração de oxigênio promovem a síntese de produtos secundários, que são prejudiciais para a função e integridade das membranas das células (INGLEDEW, 1999).

De forma mais detalhada os parâmetros que devem ser levados em consideração na fermentação para a obtenção de etanol combustível são, a temperatura estar na faixa de 28 e 35 °C, o pH em uma faixa admissível, sendo de 4 a 5 considerada ótima, pois os mostos industriais apresentam pH entre 4,5 e 5,5 (AMORIM *et al.*, 1996; SANTOS 2008). A levedura se adapta bem, pois o caldo da cana apresenta pH em torno de 5,2 a 6,8. Para a neutralização da levedura é realizado o tratamento em ácido sulfúrico com o pH entre 2,0 a 3,2, no período de uma ou duas horas, visando a diminuição da ação microbiana (LIMA *et al.*, 2001; ROMÃO, 2011).

Com as propriedades adequadas que propicie um meio favorável ao desenvolvimento das leveduras a Figura 8 apresenta a sua curva de crescimento. Na fase *lag* ocorre o crescimento de tamanho dos microrganismos e sua função metabólica é altamente aproveitada. Essa fase é marcada pela adaptação e reconstituição da levedura, sem haver multiplicação celular. A segunda fase *log* ou exponencial de crescimento é a mais importante por conta do aumento exponencial do número de células. Cada célula se divide em intervalos constantes de tempo, caracterizado pelo intenso metabolismo celular que causa algumas alterações no meio (temperatura, produtos de excreção etc). Na fase estacionária o número de células permanece quase que constante por um período de tempo, havendo um baixo consumo de energia, esgotamento dos nutrientes e acúmulo de produtos finais tóxicos. A última fase conhecida como fase de declínio o número de células que morrem excedem o número de novas células.

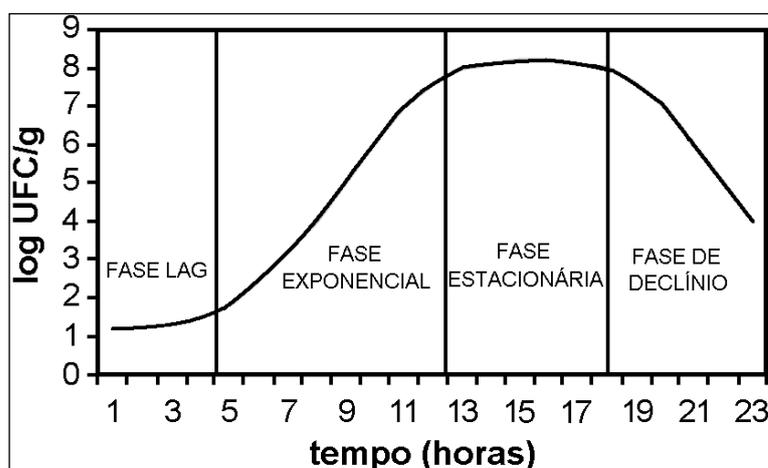


Figura 8 - Curva de crescimento típica de microrganismos (ROBAZZA *et al.*, 2010).

Pesquisas têm sido intensificadas para a expansão da produção de etanol combustível, aumentando a produtividade da levedura, o rendimento da fermentação alcoólica (MEDINA, 2010), ou melhoria dos substratos adicionados à *Saccharomyces cerevisiae* (WISSELINK *et al.*, 2007). Para garantir a competitividade do processo fermentativo é necessária a utilização de linhagens com um grau de tolerância elevado ao estresse, já que a produção de etanol combustível chega ao limite quando o micro-organismo não tem a capacidade de crescimento (FIEDUREK, 2011).

PE2 e CAT1 são estirpes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com o maior índice de utilização na fermentação para obtenção de etanol combustível no Brasil. A levedura PE2 apresenta baixa formação de espuma, alta capacidade de implantação, resistência e dominância na fermentação, já a levedura CAT1 apresenta um elevado número de genes que metabolizam vitaminas B1 e B6, sendo possível a concorrência direta com as leveduras selvagens e de laboratório. CAT1 produz pouca espuma, baixa floculação e reduz o consumo de insumos (KONG, 2007; LOPES, 2000). As Figuras 9 e 10 apresentam a resistência ao estresse causado pela toxicidade do cádmio nas leveduras IZ-1904 e PE-2. O acúmulo de produtos finais tóxicos são encontrados na fase estacionária da curva de crescimento da levedura.

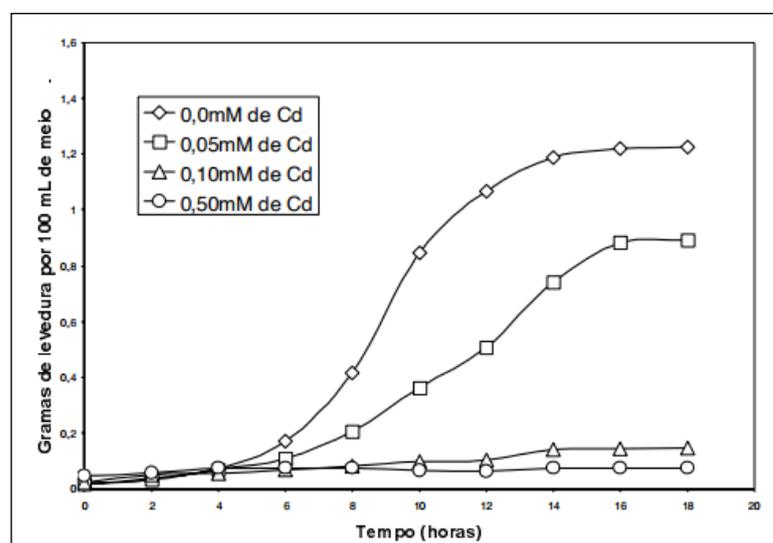


Figura 9 - Crescimento da levedura IZ-1904 em meios contendo concentrações crescentes de cádmio (BASSOS, SILVA, 2004).

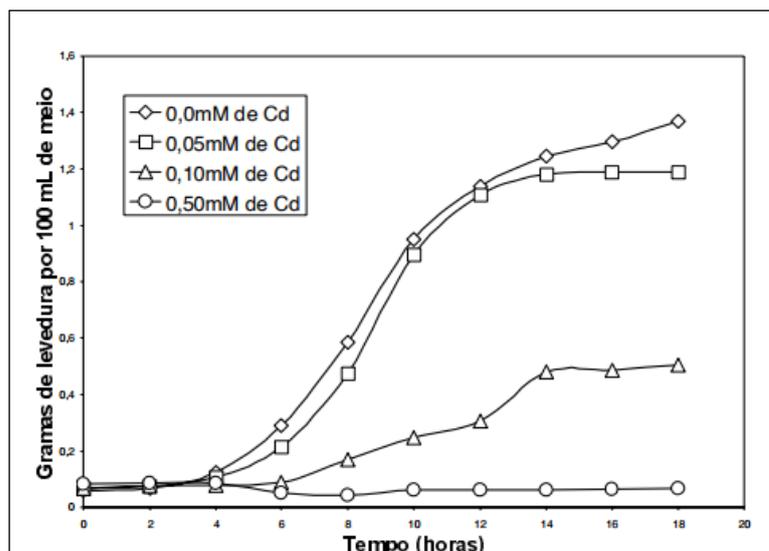


Figura 10 - Crescimento da levedura PE-2 em meios contendo concentrações crescentes de cádmio (BASSOS, SILVA, 2004).

É possível notar quanto maior o estresse causado sobre a levedura menor será sua capacidade de multiplicação celular. A levedura PE2 usada em grande escala na indústria sucroalcooleira apresenta maior reprodução celular por conta da sua elevada resistência quando comparada com outras leveduras da mesma espécie.

2.7. CARACTERIZAÇÃO DO ETANOL

O etanol que será obtido a partir da cana-de-açúcar nesse trabalho será analisado por meio de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), graduação alcóolica, pH, $^{\circ}\text{Brix}$ espectroscopia na região do infravermelho para fins de rendimento e eficiência ao decorrer do processo fermentativo.

2.7.1. Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

Dentre as formas de espectrometria de absorção, destaca-se a espectrometria de RMN que sob condições apropriadas em um campo magnético, a amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência em uma frequência orientada pelos parâmetros estruturais da amostra (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

A ressonância magnética nuclear tem o papel de identificar o esqueleto carbonohidrogênio de uma substância orgânica. Alguns núcleos como o ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^9F e ^{31}P ,

possuem estados de *spin* de $+1/2$ e $-1/2$, e graças a tal propriedade é possível a aplicação da (RMN) (BRUICE, 2006).

O estado de *spin* de um núcleo é excitado quando um campo magnético é aplicado, gerando os estados de *spin* α ($+1/2$) e β ($-1/2$). Após a excitação o núcleo volta ao seu estado inicial e o sinal é detectado por (RMN) que gera um gráfico da frequência aplicada por sua intensidade (BRUICE, 2006).

A caracterização utilizando RMN ^1H ocorre por conta que cada grupo de prótons quimicamente equivalentes em uma substância libera um sinal no espectro de RMN ^1H da substância. O dimetil éter (CH_3OCH_3) libera um sinal principal apenas, por apresentar o mesmo núcleo de prótons em CH_3 e CH_3 , sendo que o mesmo não ocorre para o etanol ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) que apresenta três sinais principais (BRUICE, 2006).

2.7.2. Graduação Alcólica

Em uma mistura alcólica é possível determinar a porcentagem de etanol em volume e massa, sendo representado pela sigla % v/v, sendo medida na faixa de temperatura de 15 a 20 °C, mas no Brasil a representação mais utilizada é o grau Gay Lussac (°GL), quando referenciado a volume. Outra forma de medir é o grau INPM (°INPM), apresentando o percentual de álcool puro, em massa, existente em uma mistura alcólica (FERNANDES, 2011).

2.7.3. Determinação de pH

A acidez é determinada com base na escala pH. Essa escala tem relação com a concentração de íon de hidrogênio ou hidroxônio (H^+ ou H_3O^+) presentes em uma solução. Variando de 0 a 14, quanto menor o valor, maior seu índice de acidez. Os valores de pH variam de 5,2 a 6,8 no caldo da cana (LIMA *et al.*, 2001; ROMÃO, 2011).

2.7.4. Determinação do °Brix

O caldo da cana-de-açúcar contém sólidos solúveis, como açúcares, ácidos orgânicos, amidas, sais, gomas, pectinas, ceras, proteínas e outro. O °Brix representa em porcentagem a quantidade de sólidos solúveis em uma solução pura de sacarose (DAL BEM, KOIKE, & PASSARINI, 2003).

2.7.5. Espectroscopia na região do Infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR)

Os avanços tecnológicos que ocorreram nos últimos tempos trouxeram melhoria na eficiência e o barateamento dos componentes de medidas ópticas fazendo com que as técnicas espectroscópicas fossem mais utilizadas nas caracterizações de materiais de diferentes tipos. Pela rapidez, versatilidade e caráter não destrutivo, a espectroscopia de infravermelho é uma técnica de espectroscopia bastante difundida. Ela baseia-se em processos de interação entre radiação e matéria com fundamentos assentados em efeitos de absorção da radiação (GALZERANI; RODRIGUES, 2012).

A espectroscopia de infravermelho é muito usada em análises de sólidos amorfos, líquidos e gases. Sendo bastante empregada no estudo dos modos vibracionais típicos das moléculas que compõem as substâncias (GALZERANI; RODRIGUES, 2012).

A técnica estuda a relação da radiação eletromagnética com a matéria, baseando-se na absorção da radiação incidente por átomos e moléculas. Os espectros de infravermelho são obtidos através da incidência de uma radiação na amostra e determinando a fração de radiação incidente que é absorvida com uma particular energia (GUARANY, 2004).

A espectroscopia no infravermelho é baseada no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração característica, que equivalem a níveis de energia da molécula, conhecidos com níveis vibracionais. Assim se a molécula receber luz a mesma energia de uma dessas vibrações, então ocorrerá a absorção da luz (GUARANY, 2004).

Um raio monocromático de luz infravermelha é incidido pela amostra, e a quantidade de energia absorvida é gravada. E procedimento ocorre ao longo de uma faixa de comprimentos de onda de interesse, construindo um gráfico com as informações referentes a substância analisada (GUARANY, 2004).

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

O Fluxograma da Figura 11 apresenta as fases desenvolvidas na obtenção do etanol a partir do mosto da cana-de-açúcar, onde foi verificada a influência da levedura em estudo, obtida de fontes e usos distintos.

- (1) - Compra do caldo da cana-de-açúcar no comércio local;
- (2) - Acidez Titulável utilizando NaOH e fenolftaleína;

- (3) - Adição dos nutrientes ao caldo após a acidez titulável;
- (4) - Imediatamente após a adição dos nutrientes é adicionado a levedura;
- (5) - Monitoramento da fermentação até que o °Brix apresente valores constantes em 3 ou mais medições;
- (6) - Decantação do material fermentando por aproximadamente 24 h;
- (7) – Destilação e obtenção do etanol Hidratado.

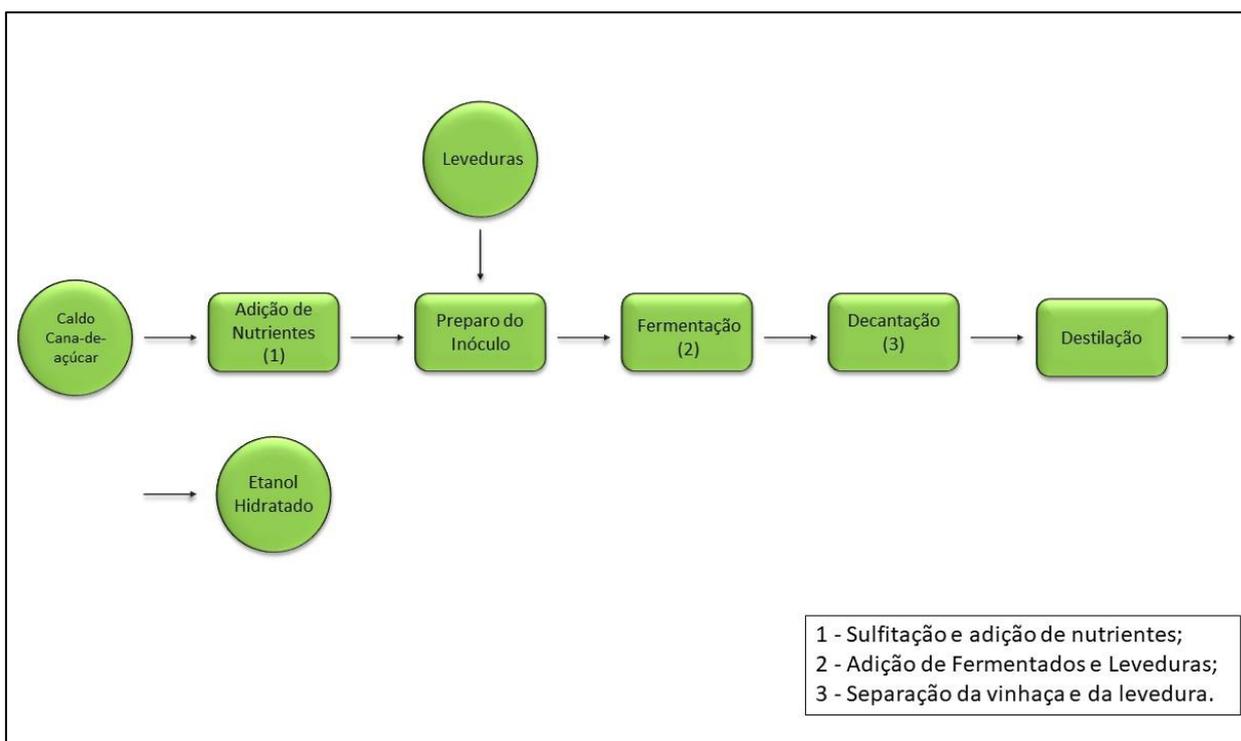


Figura 11 – Fluxograma de obtenção do etanol hidratado.

3.1. CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR

O caldo de cana-de-açúcar foi adquirido por meio de vendedores/comerciantes no Distrito Federal, tendo passado apenas pelo processo de moagem.

3.2. LEVEDURAS

A Figura 12 mostra as marcas das leveduras utilizadas da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, quais sejam, Safale Us-05 (SU) e Dona Benta Fermix (DB).



Figura 12 - Leveduras: a) Safale US 05 e b) Fermix Dona Benta.

3.3. PRODUÇÃO DE ETANOL

Os experimentos aconteceram no Laboratório de Química da Faculdade do Gama (FGA), em biorreatores de vidro com capacidade de 1 L, onde foram produzidas 6 bateladas cada uma com 800 mL de fermentado, sendo duas utilizando a levedura (DB) e quatro usando a levedura (SU), duas controlando a temperatura e duas sem controle da temperatura.

3.4. ESTERILIZAÇÃO DOS CALDOS

A esterilização foi realizada à 60 °C por 30 minutos, para eliminar qualquer microrganismo que pudesse inibir as atividades das leveduras.

3.5. ANÁLISES DO MOSTO

3.5.1. Acidez total titulável (ATT)

A acidez total titulável foi realizada a partir da titulação de 50 mL de uma amostra do suco do caju com solução padrão de NaOH (0,1 mol·L⁻¹), utilizando 3 gotas de fenolftaleína como indicador. A acidez total é calculada a partir da Equação 2 (ADOLFO, 2005).

$$ATT = \frac{n \times M \times f \times PM}{10 \times V} \text{ x g de ácido por 100 ml de amostra} \quad (2)$$

Onde:

ATT = acidez total titulável (g·mL⁻¹);

n = volume gasto na titulação da solução de NaOH (mL);

M = molaridade da solução de NaOH (mol·L⁻¹);

f = fator de correção da solução de NaOH;

PM = peso molecular do ácido acético (60 g);

V = volume da amostra (mL).

3.5.2. Medição de pH

A medição do pH foi feita utilizando um medidor de pH portátil para analisar a acidez presente no mosto e a correção a ser feita antes e durante a fermentação.

3.5.3. Sólidos solúveis totais (°Brix)

Na análise de sólidos solúveis totais foi usado um refratômetro analógico expresso em °Brix para fazer a leitura. As medidas foram feitas em três estágios, antes da fermentação, durante e após, para mensurar os açúcares consumidos e geração da curva de fermentação.

3.6. PREPARO DO MOSTO

3.6.1. Correção de pH

A correção do pH foi realizada com acréscimo de solução $0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaOH até que o pH do mosto chegasse em um valor de 5.

3.6.2. Chaptalização

A chaptalização ocorreu por conta da diluição dos sólidos solúveis totais quando foi adicionado à solução de NaOH para correção do pH, o que acarretou na diminuição do °Brix. Assim para retornar ao °Brix original foi adicionada sacarose ao mosto.

3.6.3. Adição de Nutrientes

A adição de nutrientes, fósforo e nitrogênio foi realizada visando suplementar, satisfatoriamente, as necessidades do microrganismo. Esses dois nutrientes foram adicionados ao mosto nas formas de fosfato de potássio (K_3PO_4) (VETEC), e sulfato de amônio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ (VETEC, P.A), nas concentrações de 0,6 e 0,2 gramas para cada litro de mosto, respectivamente. Metabissulfito de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) (VETEC), foi adicionado ao mosto numa concentração de $0,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. A Figura 13 mostra os nutrientes adicionados ao mosto.

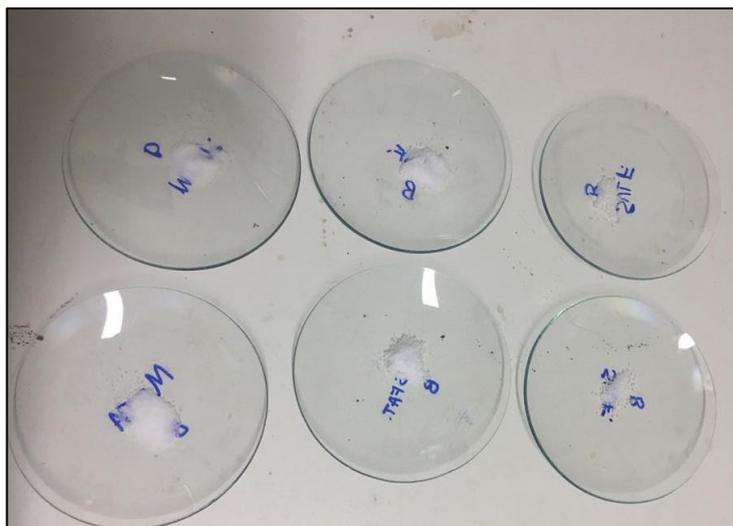


Figura 13 - Nutrientes para suplementação do microrganismo.

3.6.4. Preparo dos Inóculos

Os microrganismos utilizados foram as leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, de duas fontes diferentes: a Dona Benta Fermix (DB) e a Safale Us-05, adicionadas nas concentrações de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Foram realizadas seis bateladas, duas com o fermento DB, com concentrações 10 e $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, duas com o fermento SU e concentrações 10 e $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, porém controlando a temperatura da fermentação e por fim duas utilizando o fermento SU, com concentrações 10 e $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, mas sem o controle de temperatura.

3.7. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

A fermentação é a etapa de inoculação do microrganismo ao mosto, para que ele consuma o substrato e produza álcool. A Figura 14 mostra o início da fermentação de uma das bateladas realizadas.



Figura 14 – Início da fermentação do mosto da cana-de-açúcar.

As fermentações foram conduzidas em reatores em batelada de vidro (capacidade de 1 L), com a utilização de agitadores magnéticos (marca Quimis). As análises da fermentação foram realizadas em intervalos de hora em hora, analisando decaimento de substrato (°Brix), temperatura e pH.

3.8. DECANTAÇÃO

Finalizada a fermentação, a vinhaça foi levada à geladeira por 24 h para facilitar a decantação da levedura, pelo fato da levedura ser menos solúvel a baixas temperaturas. Dessa forma, após 24 h foi feita a primeira separação da vinhaça e levedura. Essa etapa foi repetida outras vezes, até que se eliminasse a maior quantidade de levedura possível.

3.9. ANÁLISES DA VINHAÇA

3.9.1. Teor alcóolico

O teor alcóolico final foi medido através de um ebuliômetro, utilizando as temperaturas de ebulição do fermentado e da água, com o auxílio de uma régua própria do equipamento para determinar a graduação alcoólica. Para o levantamento da curva de fermentação, as estimativas dos teores alcóolicos durante a fermentação foram quantificadas a partir das leituras de °Brix usando o refratômetro e pela transformação

desses valores em peso específico, a partir dos valores obtidos na Equação 3, chega-se ao resultado final utilizando a Equação 4.

As equações são hipóteses para as análises, expressas em mL de etanol em 100 mL de amostra, também conhecido como °GL. Estas hipóteses foram feitas pelo fato do volume de mosto na fermentação ser baixo e a impossibilidade da retirada de 50 mL de amostra a cada hora para realização da técnica de ebulliometria.

$$SG = \frac{^{\circ}\text{Brix}}{268,6 - \left(\frac{^{\circ}\text{Brix}}{258,2} \times 227,1\right)} + 1 \quad (3)$$

Onde:

SG = peso específico;

°Brix = medida do refratômetro.

$$^{\circ}\text{GL} = (\Delta\text{SG}) \times 131 \quad (4)$$

Onde:

°GL = graus de Gay-Lussac (mL de etanol/100 mL de amostra);

ΔSG = variação do peso específico a cada h de fermentação.

3.9.2. Fator de Rendimento

O fator de rendimento foi calculado a partir da equação 5, utilizando a relação entre o teor alcóolico final e a quantidade de substrato consumido durante a fermentação. Esse valor mostra o rendimento em conversão do açúcar consumido na reação em etanol.

$$Y_{P/S} = \frac{Y_p}{\Delta S} \quad (5)$$

Onde:

$Y_{P/S}$ = fator de rendimento;

Y_p = rendimento experimental ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$);

ΔS = variação de substrato (sacarose) ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

3.9.3. Eficiência do Processo

A eficiência do processo foi calculada utilizando da Equação 6, usando a relação entre o rendimento teórico e o rendimento experimental obtido pelo ebulliômetro.

$$\eta = \frac{Y_{\frac{P}{S}}(experimental)}{Y_{\frac{P}{S}}(teórico)} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

η = eficiência do processo (%);

$Y_{\frac{P}{S}}(experimental)$ = rendimento experimental ($g.L^{-1}$);

$Y_{\frac{P}{S}}(teórico)$ = rendimento teórico ($g.L^{-1}$).

3.9.4. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN 1H)

As amostras foram analisadas em um espectrômetro Bruker Avancer III HD, 14 T e frequência de 600 MHz, utilizando a água deuterada como solvente e referência dos espectros. Os espectros foram analisados por meio do programa 2D RMN processor.

3.9.5. ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

Os espectros de infravermelho foram realizados em um espectrofotômetro Spectrum Two da marca Perkin Elmer, operando em modo transmitância, na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , a temperatura ambiente, em resolução de 4 cm e 4 varreduras, com os dados armazenados no computador por meio do software Spectrum versão 5.0.1. A Figura 15 apresenta o equipamento utilizado.



Figura 15 - Espectrofotômetro Spectrum Two.

3.9. DESTILAÇÃO

A destilação ocorreu em um aparato de destilação simples e durante 2 h, até que a vinhaça fosse toda destilada e a etapa finalizada. A Figura 16 mostra o aparato usado na destilação da vinhaça.



Figura 16 - Aparato de destilação utilizado no trabalho.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DO MOSTO

A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos da análise do mosto antes da fermentação.

Tabela 4 - Parâmetros mosto antes da fermentação.

Parâmetros do mosto	
°Brix	26,317 ± 0,037
pH	4,933 ± 0,110
ATT (g de ácido acético / 100 mL de amostra)	0,144

O teor de sólidos solúveis é utilizado com a finalidade de averiguar a qualidade de um fruto. É um valor de importância para os frutos, tanto para o consumo “*in natura*” como para o processamento industrial. Valores altos representa menos adição de açúcar, conseqüentemente a redução no gasto de energia e maior rendimento do produto, resultando em maior economia no processamento (SILVA *et al.*, 2002).

A cana tem que apresentar um valor mínimo de sólidos solúveis de 13 °Brix para que seja viável industrialmente o processo de fermentação. Com base no valor apresentado pelo caldo de cana utilizado no trabalho em estudo, verifica-se que o mesmo apresentou teor de sólidos solúveis (°Brix) acima do mínimo necessário (EMBRAPA, 2011).

Com relação ao potencial hidrogeniônico (pH), o valor encontrado neste trabalho foi coerente com o valor esperado numa fermentação, já que a faixa tolerável pelo microorganismo é entre 4,5 a 5,5, sendo considerada, inclusive, uma faixa ótima para uma fermentação (LIMA *et al.*, 2001). A ATT quantificada neste trabalho apresentou variação pequena, demonstrando que há menos ácidos livres no mosto, resultado que corrobora com o valor de pH obtido.

4.2. ANÁLISES DO DESEMPENHO APÓS A FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

Na Tabelas 5 estão apresentados os parâmetros analisados após a fermentação do caldo da cana para as duas marcas de leveduras, variando suas massas a partir de cada litro de mosto.

Tabela 5 – Parâmetros avaliados após fermentação.

Parâmetros após fermentação			
Levedura	°Brix	pH	Temperatura(°C)
DB (10 g/L)	11,8	4,9	28,0
DB (20 g/L)	8,0	4,5	29,0
SU (10 g/L)	13,2	4,7	25,0
SU (20 g/L)	10,0	5,1	28,0
SU (10 g/L) – com controle temperatura	11,8	5,0	20,0
SU (20 g/L) – com controle temperatura	11,8	4,6	20,0

De maneira geral, observou-se que o decaimento de °Brix foi expressivo quando a concentração de levedura foi maior, porém para as reações realizadas com a levedura SU e com controle de temperatura, a concentração da mesma não influenciou no °Brix final. Com relação ao pH e à temperatura, verificou-se que os mesmos não variaram significativamente para todas as reações, independentemente de ter havido controle de temperatura e permaneceram na faixa considerada ótima para o bom desempenho da reação.

Na Tabela 6 encontram-se os valores obtidos da análise da graduação alcoólica (teórico e experimental).

Tabela 6 - Teores alcoólicos após a fermentação.

Teor Alcoólico (g.L⁻¹)		
Levedura	Téorico	Experimental
DB (10 g/L)	89,27	80,85
DB (20 g/L)	98,75	79,22
SU (10 g/L)	98,75	57,73
SU (20 g/L)	109,02	71,05
SU (10 g/L) - controle temperatura	98,75	64,05
SU (20 g/L) - controle temperatura	108,23	63,59

Os resultados obtidos indicaram que os teores alcoólicos experimental e teórico para a reação, com a levedura SU (10 g.L⁻¹), sem controle de temperatura foram 98,75 g.L⁻¹ e 57,73 g.L⁻¹, respectivamente, e eficiência de 58,46 %. Para a reação com a mesma levedura e concentração de 20 g.L⁻¹ foram encontrados 109,02 g.L⁻¹ e 71,05

$\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, e eficiência de 65,17 %. Os resultados sugerem que ao aumentar a concentração da levedura, a eficiência da reação poderá ser maior.

As reações realizadas com a levedura SU com controle de temperatura (17 °C a 22 °C), mostraram os seguintes resultados: para a reação realizada com concentração de levedura de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, o teor alcoólico experimental foi de $64,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $98,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para o teor alcoólico teórico, com eficiência de 64,86 %. Para a reação realizada com concentração de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, os resultados para os mesmos parâmetros foram $63,59 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $108,23 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, e eficiência de 58,75%. A partir dos resultados obtidos é possível inferir que para a reação com concentração de levedura de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, com controle de temperatura, o resultado da eficiência foi semelhante ao obtido para a reação com concentração de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sem controle de temperatura. Da mesma maneira, a eficiência encontrada foi semelhante para a reações com concentrações de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sem controle de temperatura e $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, com controle de temperatura. Isso indica que o controle da temperatura para manutenção da levedura, não é um parâmetro relevante para ser monitorado.

Para as reações em que foi utilizado o fermento DB, quando utilizada a concentração de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, os teores alcoólicos experimental e teórico foram de $80,85 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $89,27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente e eficiência de 90,57 %. Para a concentração de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ os mesmos parâmetros obtidos foram de $79,22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $98,75 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, porém com eficiência de 80,22%. Os resultados mostraram que as eficiências obtidas quando utilizado o fermento DB foram superiores às eficiências encontradas para o fermento SU, indicando que, provavelmente, as condições reacionais para este fermento podem não estar adequadas ao desenvolvimento e síntese da levedura. Vale salientar ainda que eficiências próximas ou acima de 90 % podem ser explicadas por condições ideais de assepsia do mosto, condições de pH e temperatura adequadas para a fermentação (HAMELINCK *et al.*, 2005). Essa afirmação pode ser validada para as reações em que o fermento DB foi utilizado.

4.3. ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE AS LEVEDURAS E SUAS CONCENTRAÇÕES

4.3.1. Cinética fermentativa utilizando o fermento DB ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

A Figura 17 mostra a cinética fermentativa da reação com a levedura DB e concentração de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, onde observa-se a conversão de substrato a etanol em função do tempo de reação.

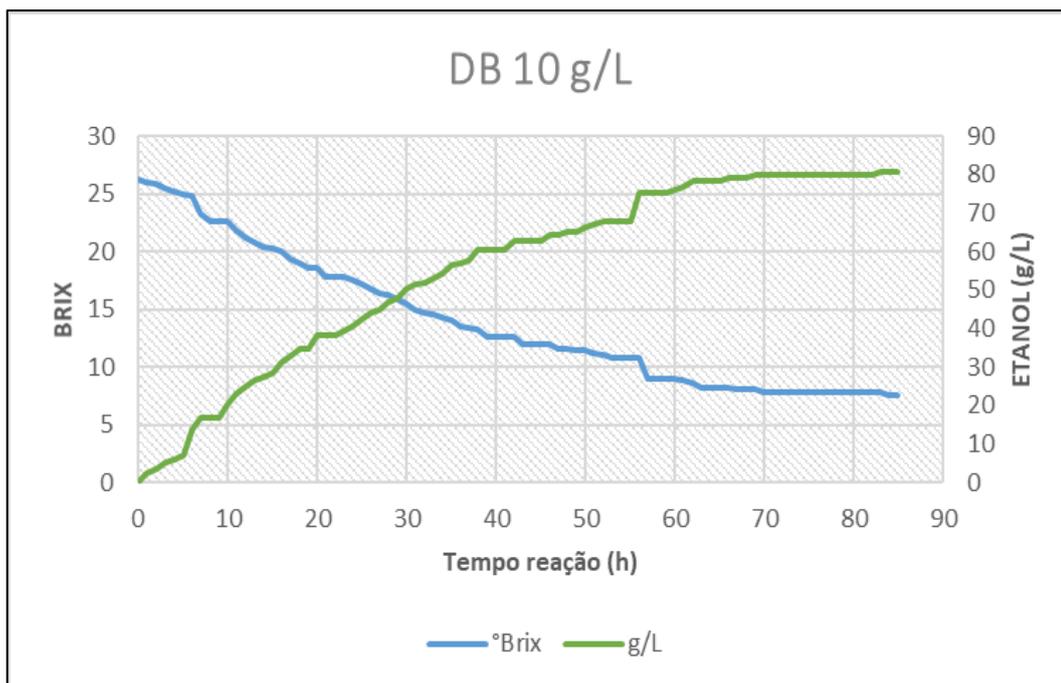


Figura 17 - Cinética fermentativa para o fermento DB ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) sem controle de temperatura.

Para essa reação foi utilizado 800 mL do caldo de cana-de-açúcar, com teor de sólidos solúveis inicial de 26,3 °Brix, pH de 5,0 e temperatura de 25 °C. A reação ocorreu durante 70 h e foi observado que o período de maior conversão de substrato a etanol ocorreu entre 20 e 70 h de reação. A reação foi observada por 85 h, tendo um decaimento final de 18,5 °Brix e concentração final de etanol de 80,85 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.3.2. Cinética fermentativa utilizando o fermento DB ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

A Figura 18 mostra a cinética fermentativa para a reação com a levedura DB, cuja concentração foi de $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

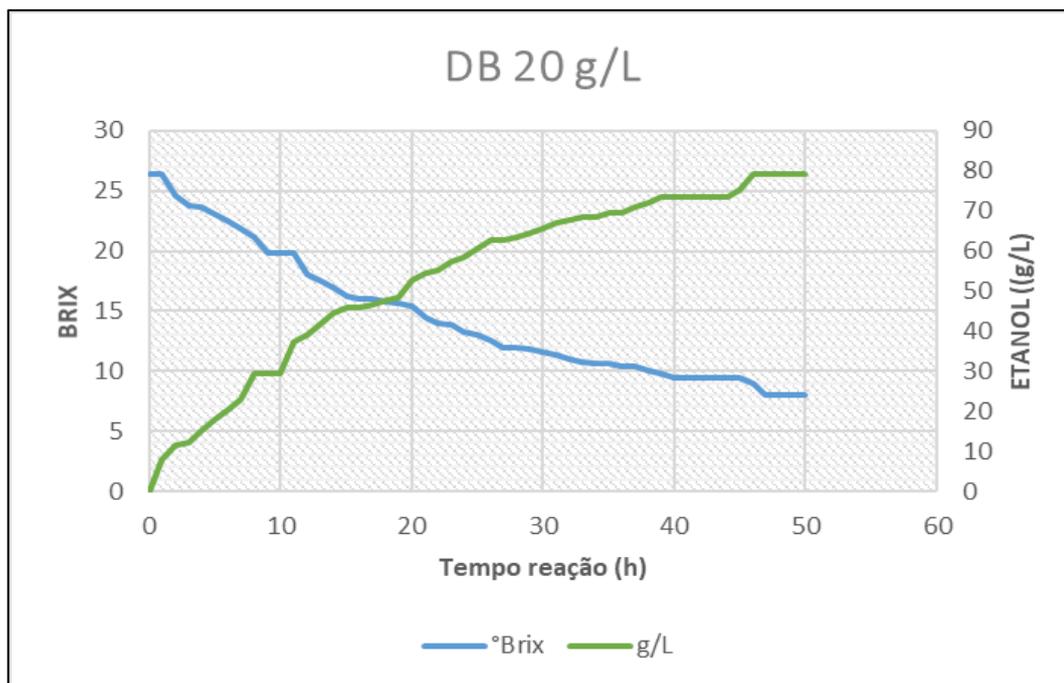


Figura 18 - Cinética fermentativa para o fermento DB ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) sem controle de temperatura.

Nessa reação, foi utilizada a levedura DB e 800 mL do caldo de cana-de-açúcar. O teor de sólidos solúveis inicial foi de $26,3 \text{ }^\circ\text{Brix}$, pH de 5 e temperatura de $21 \text{ }^\circ\text{C}$. Com as condições citadas, a reação durou 46 h, embora tenha sido acompanhada por 50 h, onde teve decaimento final de $18,3 \text{ }^\circ\text{Brix}$, gerando uma concentração final de etanol de $79,22 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.3.3. Cinética fermentativa utilizando o fermento SU ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) sem controle da temperatura

A Figura 19 apresenta a cinética fermentativa da reação da levedura SU ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

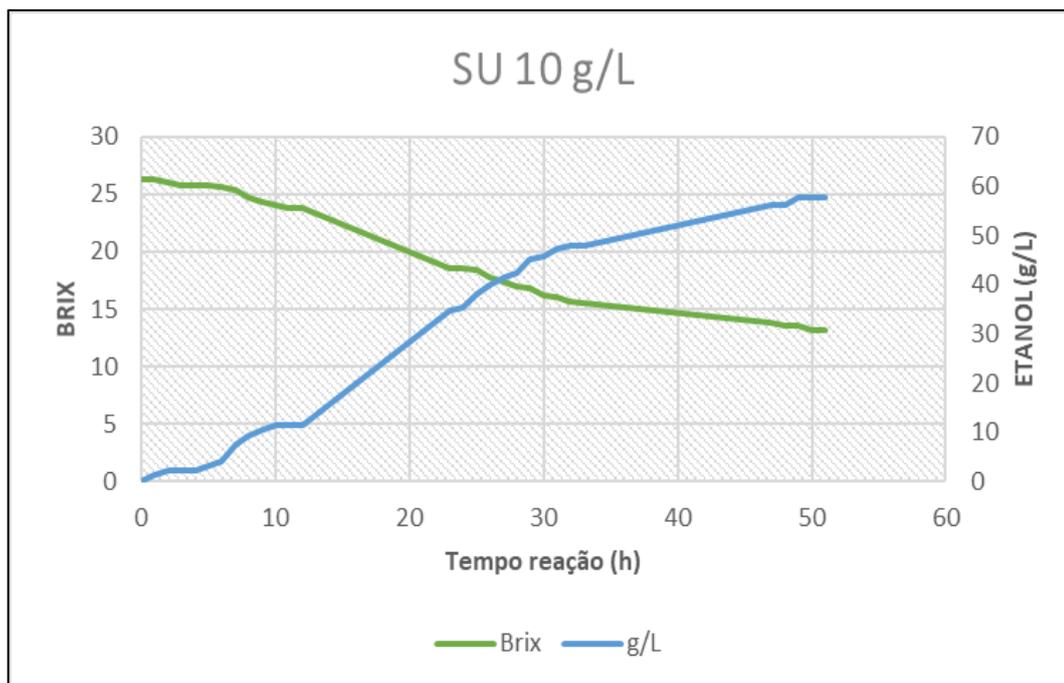


Figura 19 - Cinética fermentativa para o fermento SU ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) sem controle da temperatura.

Nessa reação, foi utilizada a levedura SU e 800 mL do caldo de cana-de-açúcar. O teor de sólidos solúveis inicial foi de 26,3 °Brix, pH de 5 e temperatura de 20°C. O tempo reacional foi de 48 h de reação. Para essa batelada, foi observado que houve maior conversão de substrato a etanol no tempo entre 12 e 48 h de reação. No entanto, a reação foi observada por 51 h e o decaimento de °Brix final chegou a 13,1, onde a concentração de etanol foi de 57,73 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.3.4. Cinética fermentativa utilizando o fermento SU ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) sem controle da temperatura

A Figura 20 apresenta a cinética fermentativa da reação utilizando a levedura SU.

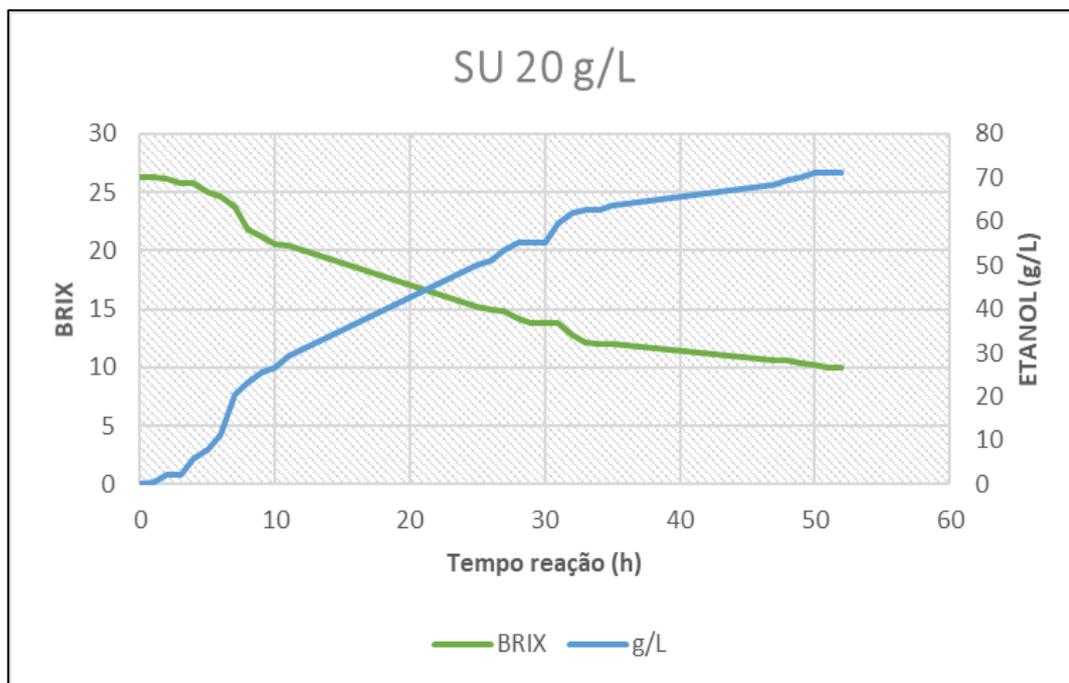


Figura 20 - Cinética fermentativa para o fermento SU (20 g·L⁻¹) sem controle da temperatura.

Para essa batelada foi utilizada a levedura SU e 800 mL do caldo de cana-de-açúcar, com teor de sólidos solúveis inicial de 26,3 °Brix, pH de 4,8 e temperatura de 20°C. Com as condições citadas, o tempo reacional foi de 50 h. Foi observado que no tempo entre 11 e 50 h, houve maior produção de etanol. A reação foi observada por 53 h, o °Brix final foi de 16,3 e a concentração de etanol de 71,05 g·L⁻¹.

4.3.5. Cinética fermentativa utilizando o fermento SU (10 g·L⁻¹) com controle da temperatura

A Figura 21 ilustra a cinética fermentativa da reação da levedura DB.

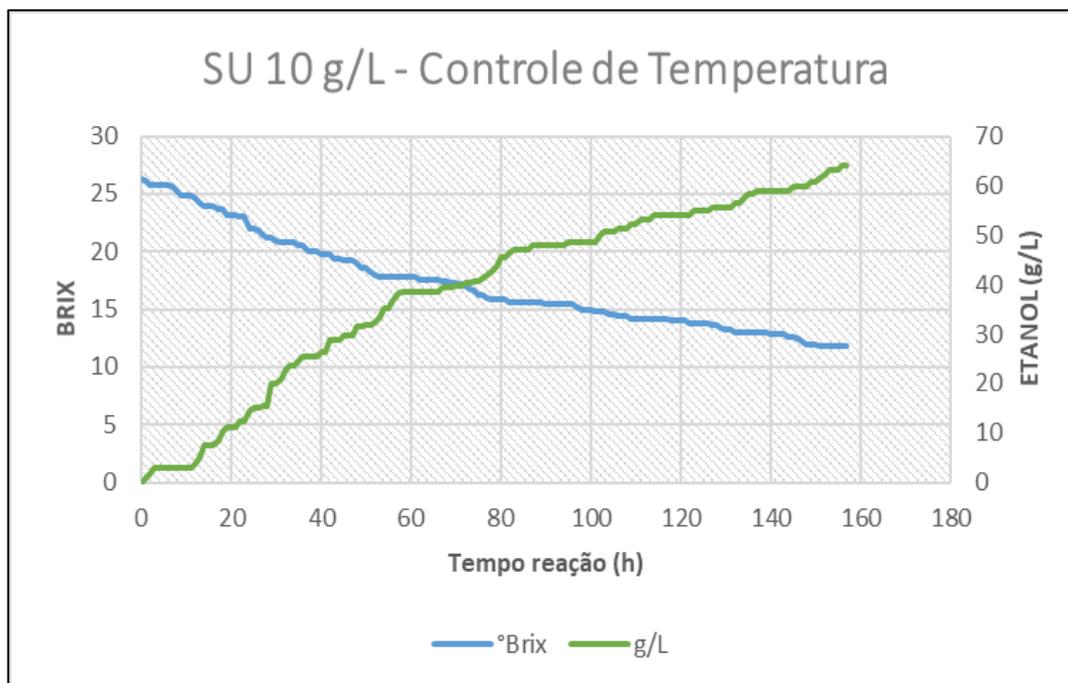


Figura 21 - Cinética fermentativa para o fermento SU ($10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) com controle da temperatura.

Na reação em questão, foi usada a levedura SU e 800 mL do caldo de cana-de-açúcar. O teor de sólidos solúveis inicial de 26,4 °Brix, pH de 5,1 e temperatura de 17°C. Em tais condições a reação ocorreu durante 155 h. Para essa batelada, foi observado que houve obtenção considerável de etanol entre 56 e 155 h de reação. A reação foi observada por 157 h, tendo um decaimento de 14,6 °Brix final, onde a concentração final de etanol foi de $64,05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

4.3.6. Cinética fermentativa utilizando o fermento SU ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) com controle da temperatura

Para essa reação, foi usada a levedura SU e 800 mL do caldo de cana-de-açúcar, com teor de sólidos solúveis inicial de 26,3 °Brix, pH de 4,9 e temperatura de 20°C. Na Figura 22 é possível notar houve maior produção de etanol no tempo de 100 h aproximadamente, porém com considerável produção deste entre 30 e 110 h de

reação. A reação foi observada por 115 h, onde apresentou decaimento de 14,5 °Brix e concentração de etanol de 63,59 g·L⁻¹.

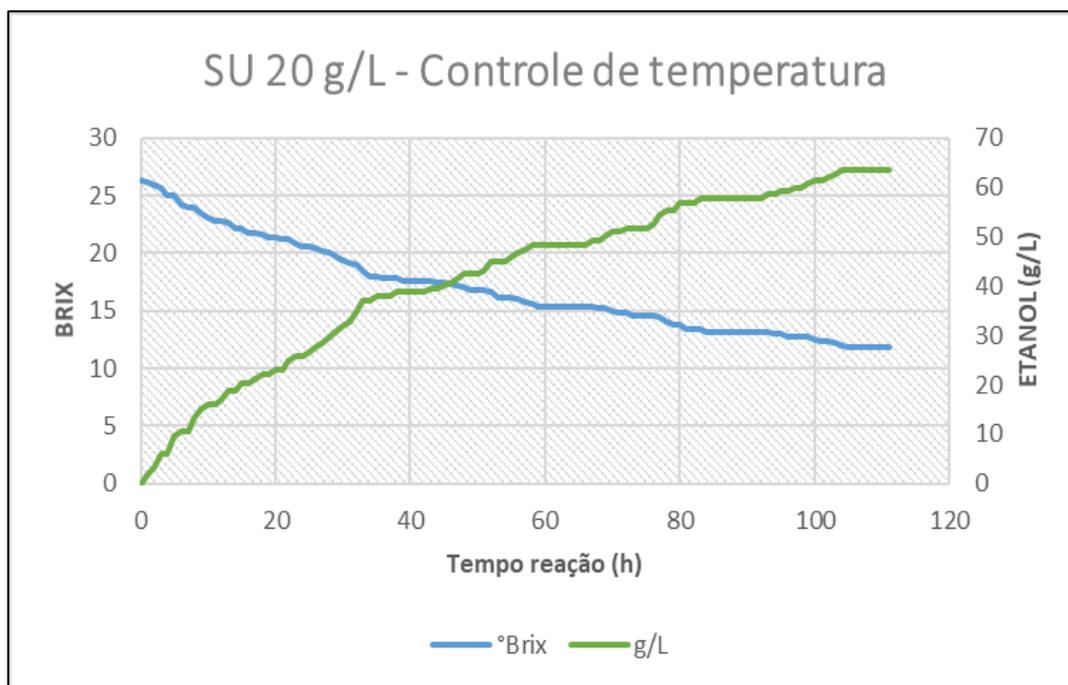


Figura 22 - Cinética fermentativa para o fermento SU (20 g·L⁻¹) com controle de Temperatura.

A figura 23 apresenta que a levedura com maior poder de conversão de açúcares fermentescíveis em etanol é a DB na concentração de 20 g·L⁻¹, nas primeiras 30 horas de reação.

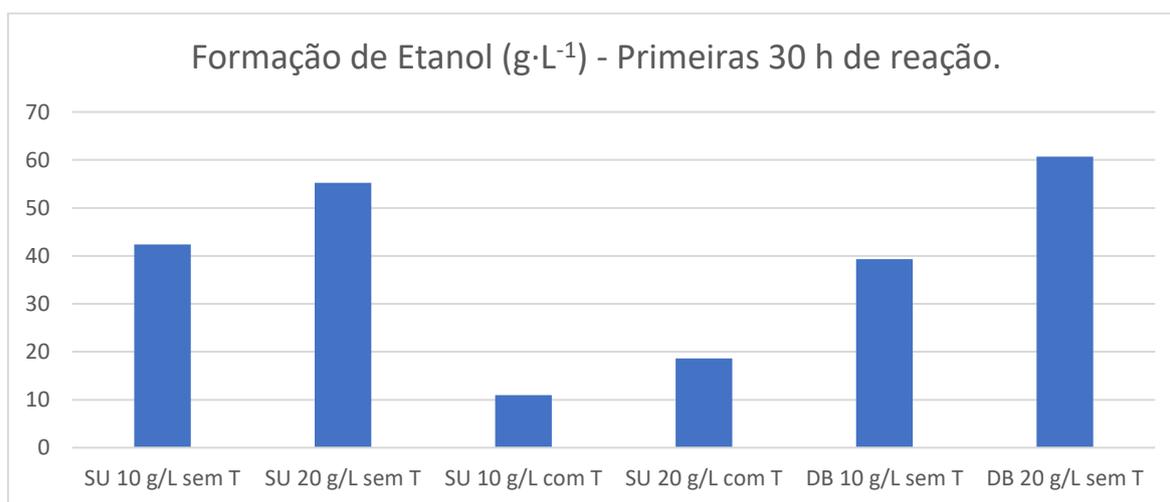


Figura 23 - Formação de Etanol (g·L⁻¹) - 30 horas de reação.

4.4. ANÁLISE POR RMN ¹H

A análise dos etanóis por RMN ¹H foi realizada utilizando o óxido deuterado (D₂O) como referência. As Figuras 24 a 29 apresentam os espectros de RMN ¹H das amostras dos etanóis em estudo. É importante ressaltar que no momento da

preparação das amostras para a análise, as mesmas foram numeradas de forma aleatória e, portanto, serão colocadas na ordem de apresentação do trabalho.

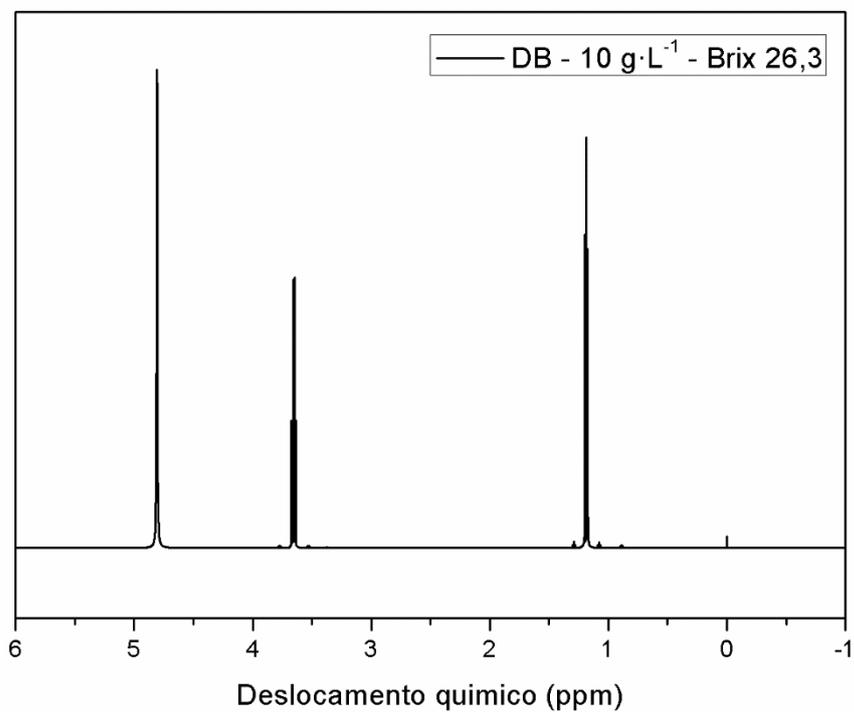


Figura 24. Espectro de RMN ^1H do etanol obtido pela fermentação com a levedura DB (10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

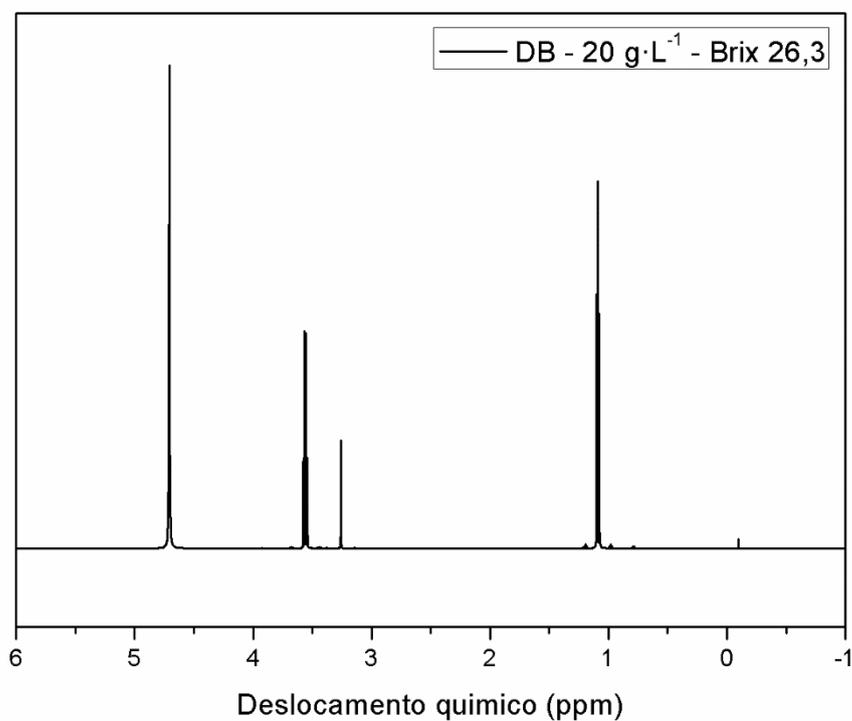


Figura 25. Espectro de RMN ^1H do etanol obtido pela fermentação com a levedura DB (20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

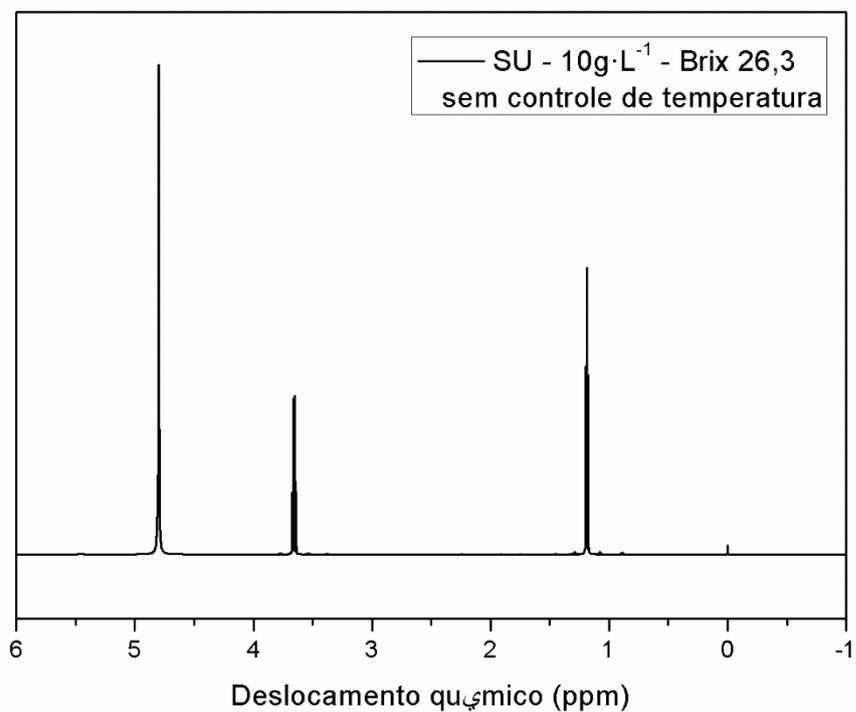


Figura 26. Espectro de RMN ¹H do etanol obtido pela fermentação com a levedura SU (10 g·L⁻¹) sem controle da temperatura.

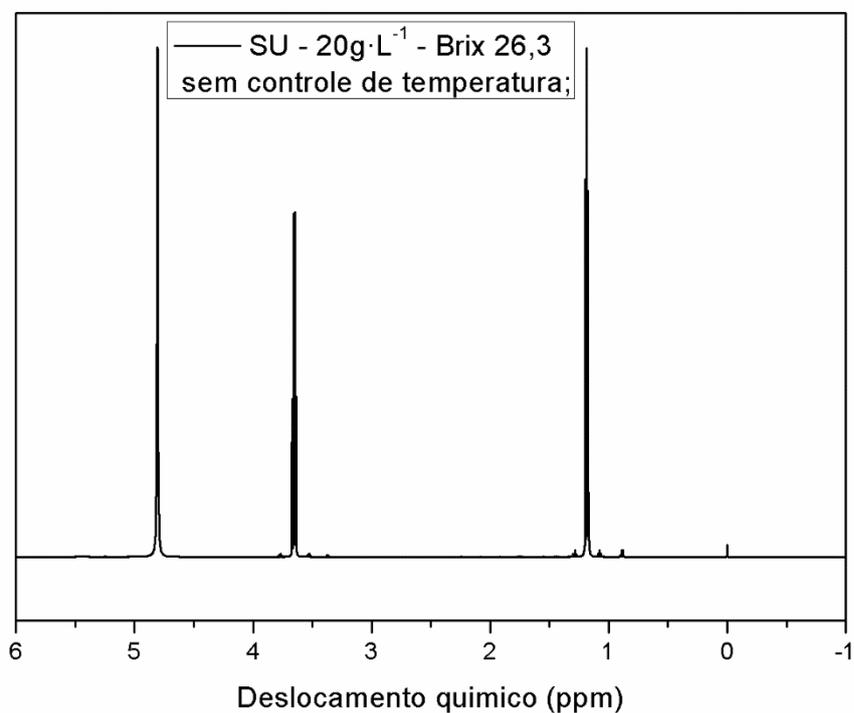


Figura 27. Espectros de RMN ¹H de amostras de etanol obtidas pela fermentação com a levedura SU (20 g·L⁻¹) sem controle da temperatura.

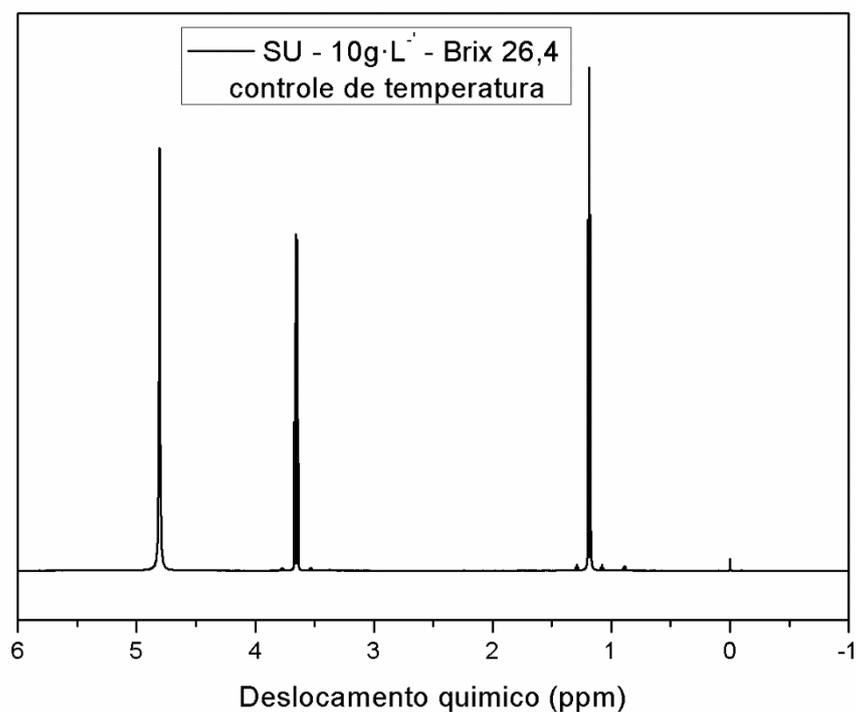


Figura 28. Espectro de RMN ¹H do etanol obtido pela fermentação com a levedura SU (10 g·L⁻¹) com controle da temperatura.

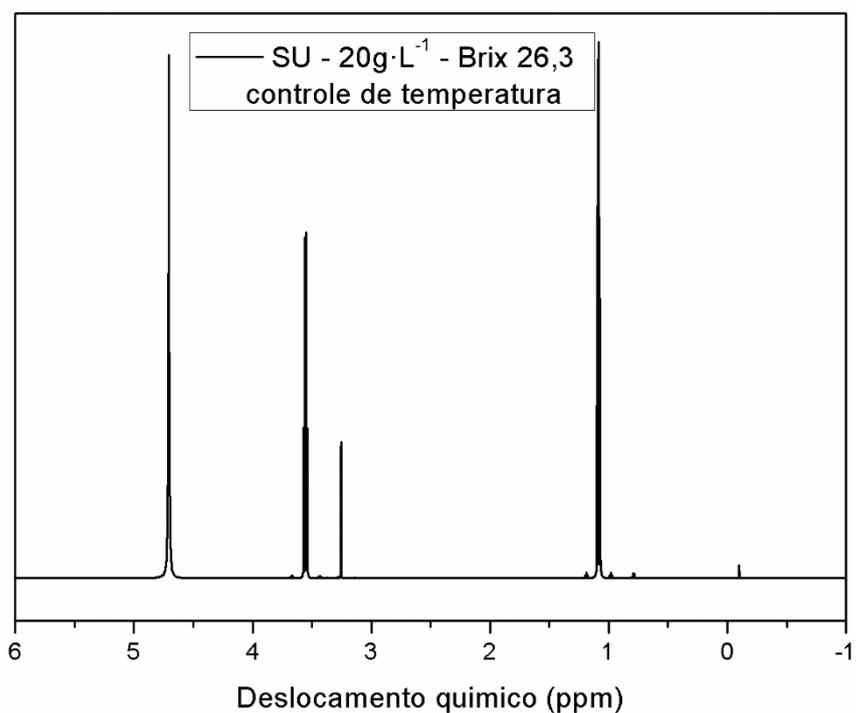


Figura 29. Espectro de RMN ¹H do etanol obtido pela fermentação com a levedura SU (20 g·L⁻¹) com controle da temperatura.

Sabendo que o etanol apresenta como molécula: CH₃CH₂OH e que todas as amostras foram dissolvidas em D₂O, em todos os espectros foi identificado o sinal do tripleto característico do CH₃ em 1,17 ppm e o quadripleto característico do CH₂ em

3,65 ppm, validando a região encontrada nos espectros deste trabalho. Sendo assim, o composto etanol está presente em todas as amostras obtidas das misturas hidroalcoólicas após a etapa de destilação. É importante destacar que o sinal dubleto do OH não apareceu nos espectros devido à faixa de diluição do solvente (GOTTLIEB *et al.*, 1997).

Vale salientar ainda que nas amostras 2 e 3 foram identificados os sinais em 3,7 e 4,8 ppm, sinais que podem ser atribuídos, provavelmente à presença de água ou de prótons de outros compostos não identificados, mas que estão presentes nas referidas amostras. De acordo com TURANOV e KHITRIN (2014), os prótons de água podem trocar de posição no espectro com outras moléculas na mistura, inclusive, o tempo de residência finito dos prótons aquosos provoca ampliação dos picos de água.

4.5. ANÁLISE POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FT-IR)

No presente trabalho foi utilizado etanol da marca Itajá 99,5 g·L⁻¹ ou 99,6 °GL como padrão. A Figura 30 apresenta o espectro do referido etanol.

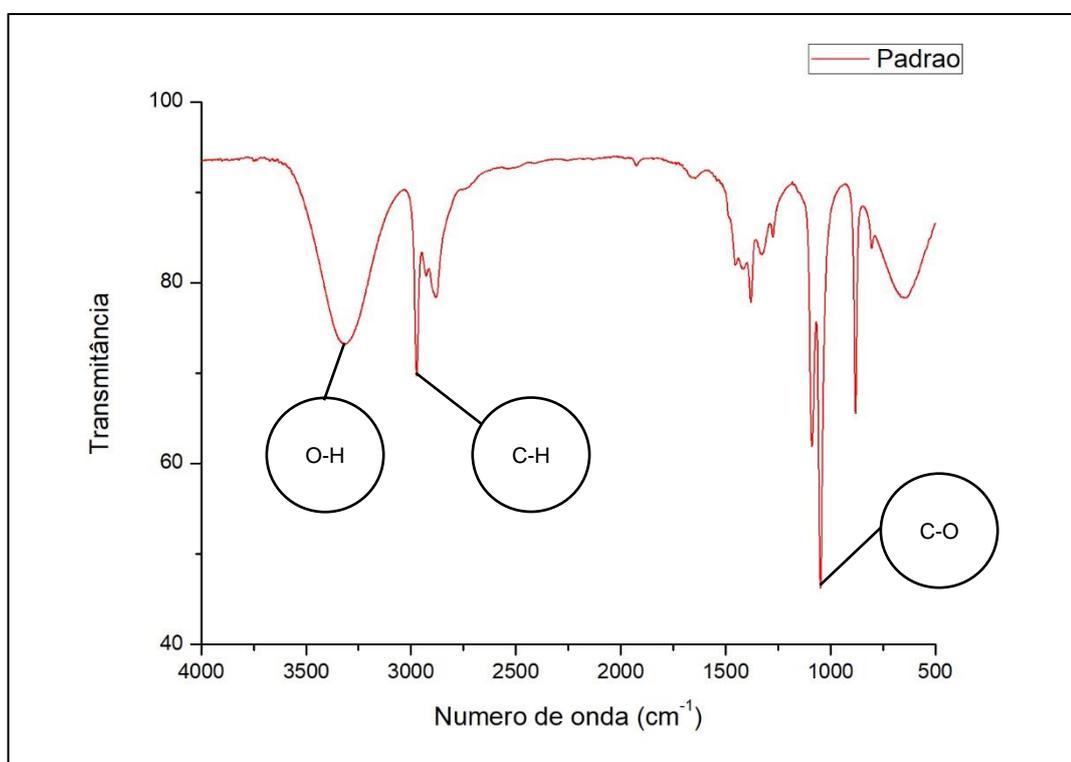


Figura 30 – Espectro no IV do álcool etílico Itajá.

Pelo espectro da Figura 30 é possível identificar a banda entre 2800 a 3000 cm⁻¹, atribuída aos grupos funcionais C-H, existentes nos grupos funcionais CH₂ e CH₃, identifica-se ainda, a banda em 1000 e 1280 cm⁻¹ referente ao grupo C-O e a banda

entre 3300 e 3500 cm^{-1} relacionada ao grupo funcional O-H, onde uma maior concentração de O-H é observada com um maior estiramento da banda (OLIVEIRA, 2001).

Na Figura 31 são apresentados os espectros no IV do etanol padrão, já mencionado anteriormente e dos etanóis obtidos a partir da fermentação com a levedura SU, cujas concentrações foram 10 e 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, porém sem controle da temperatura.

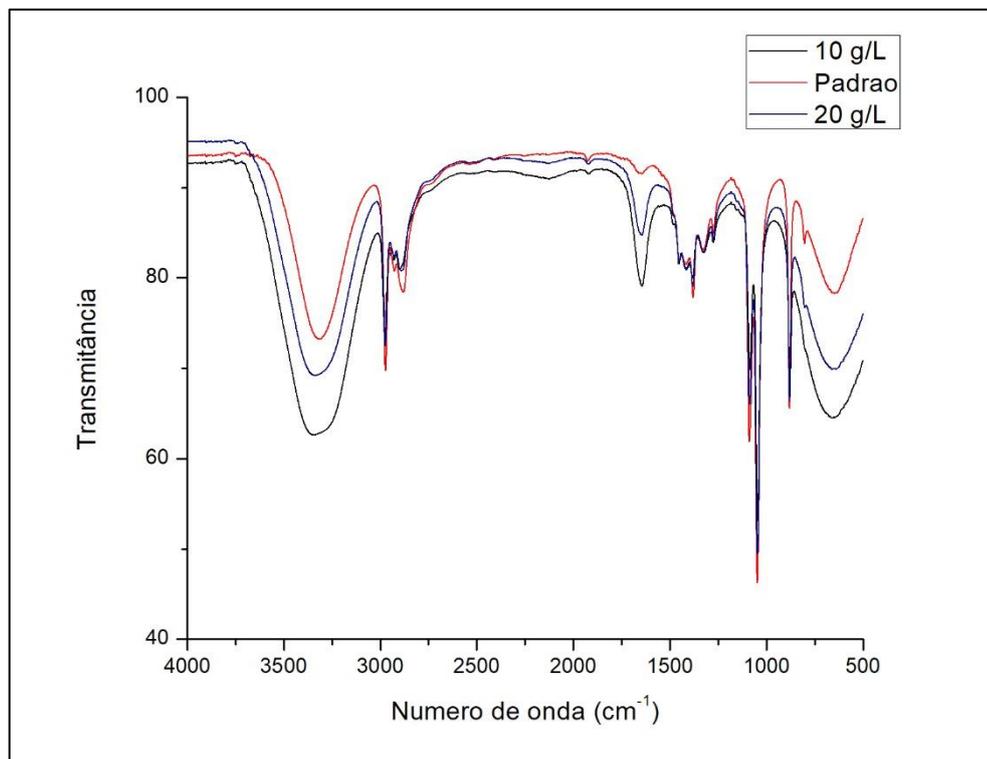


Figura 31 – Espectros no infravermelho das amostras: padrão e etanóis obtidos com a levedura SU (10 e 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) sem controle de temperatura.

Por meio dos espectros é possível identificar a banda entre 3300 e 3500 cm^{-1} que apresenta o grupo funcional OH, presente no etanol. É importante ressaltar que essa banda se torna mais intensa para os etanóis obtidos nesse trabalho e isso se deve, provavelmente, à presença de água nas amostras, visto que são etanóis hidratados obtidos a partir da destilação simples, por ser uma mistura azeotrópica a separação total entre água e álcool etílico não é possível. Essa observação corrobora os valores de graus alcoólicos, tendo em vista que o padrão apresenta grau alcoólico 99,5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e os etanóis obtidos 57,73 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (SU – 10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e 71,05 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (SU – 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), confirmando que no restante da composição dos etanóis há presença de água. Uma banda característica em etanóis primários, como o caso do etanol etílico é a banda de CO em 1050 cm^{-1} , apresentada em todos os espectros conforme as figuras 30 a 33.

A Figura 32 apresenta os espectros no IV com o comparativo entre o álcool etílico padrão e os etanóis obtidos com a levedura SU, nas concentrações de 10 e 20 g·L⁻¹, com o controle da temperatura. Assim como nos demais espectros, foi identificada a banda entre 3300 e 3500 cm⁻¹, que apresenta o grupo funcional OH, presente no etanol. No entanto, ao comparar os espectros dos etanóis produzidos, verifica-se que os mesmos ficaram praticamente sobrepostos, indicando que podem conter em suas composições, o mesmo percentual de água. Tal sobreposição pode ser explicada pelo grau alcoólico dos respectivos etanóis que foram de 64,05 g·L⁻¹ (SU 10 g·L⁻¹) e 63,59 g·L⁻¹ (20 g·L⁻¹), cuja variação entre eles foi de 0,46 g·L⁻¹.

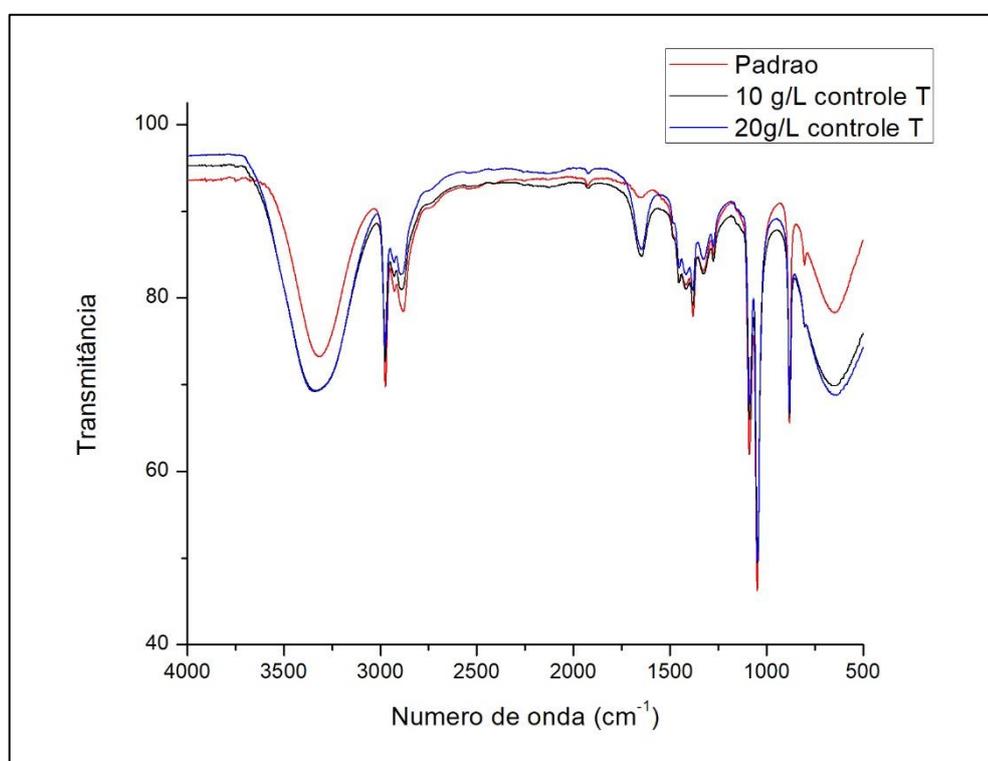


Figura 32 – Espectros no infravermelho das amostras padrão e etanóis obtidos com a levedura SU (10 e 20 g·L⁻¹) com controle de temperatura.

Na Figura 33 são apresentados os espectros comparativos entre o álcool etílico padrão e os etanóis produzidos com a levedura DB, nas concentrações de 10 g·L⁻¹ e 20 g·L⁻¹, sem o controle da temperatura. Novamente é identificada a banda entre 3300 e 3500 cm⁻¹, relativa ao grupo funcional OH do etanol e da água. Verifica-se que houve sobreposição dos espectros dos etanóis produzidos. E mais uma vez, o resultado das graduações alcoólicas, quais sejam: 80,85 g·L⁻¹, com concentração de levedura 10 g·L⁻¹ e 79,22 g·L⁻¹, com concentração 20 g·L⁻¹, inferem o motivo da sobreposição.

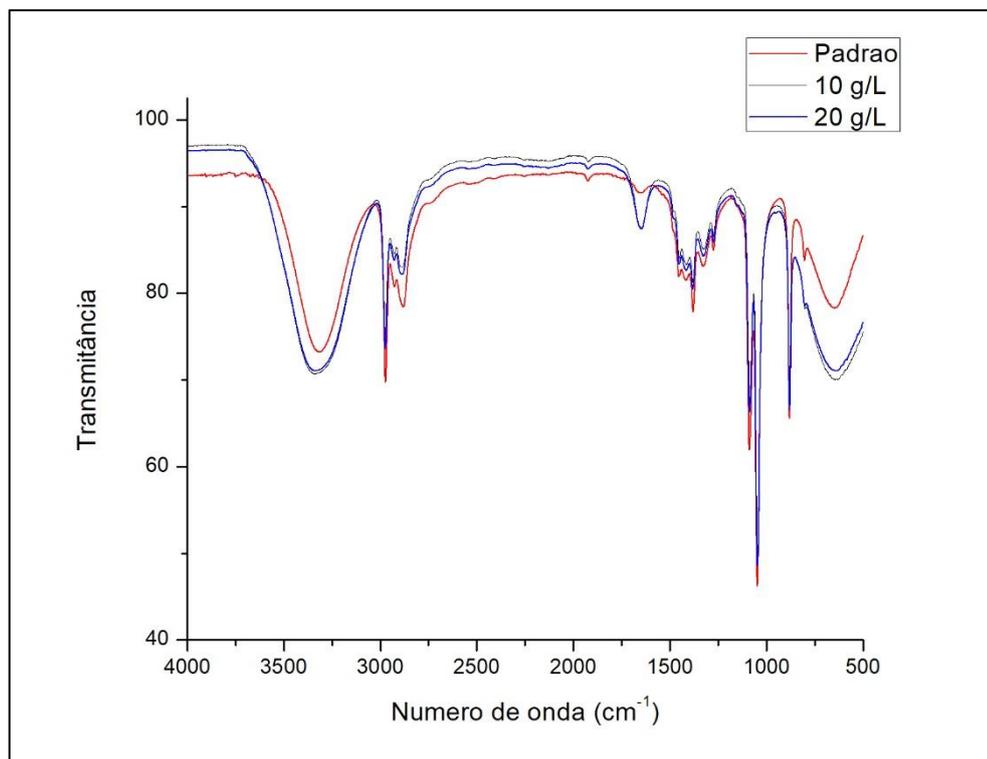


Figura 33 – Espectros no infravermelho das amostras padrão e etanóis obtidos com a levedura DB (10 e 20 g·L⁻¹).

6. CONCLUSÃO

O etanol produzido a partir da cana-de-açúcar é bem difundido. Uma melhor investigação durante a cinética fermentativa gera dados e conclusões para trabalhos futuros, aumentando a possibilidade de uma melhor eficiência fermentativa, maiores graus alcoólicos, uma maior velocidade fermentativa, etc.

O álcool obtido a partir da fermentação do mosto da cana de açúcar apresentou a maior graduação (80,85 g·L⁻¹) e a maior eficiência (90,57%) quando utilizado a levedura da marca DB, com a concentração de 10 g·L⁻¹. Eficiências acima de 90 % estão relacionadas com uma boa assepsia do mosto, pH e temperatura ideais para o microrganismo.

Pela espectroscopia no infravermelho foi possível confirmar a obtenção do etanol, com distintas graduações alcoólicas, apresentando os grupos funcionais O-H, C-H e C-O esperados. As bandas de O-H que mais se aproximaram do etanol padrão foram as que apresentaram as maiores graduações alcoólicas, e uma maior presença de O-H um maior estiramento da banda. Ao analisar a banda de C-O foi possível notar um maior pico no etanol padrão por conta da menor concentração de água em sua composição.

Os espectros de RMN ^1H dos etanóis ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) confirmaram também a obtenção de etanol a partir do esqueleto carbono-hidrogênio que apresentou três sinais principais. Foi observado o sinal do tripleto de CH_3 em 1,17 ppm e o quadripleto característico do CH_2 em 3,65 ppm.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL). Atlas de Energia Elétrica do Brasil, Parte II – Energias Renováveis, Capítulo 4: Biomassa. 3 ed. p. 67. 2008.
- AMORIM, H. V., LOPES, M. L., DE CASTRO OLIVEIRA, J. V., BUCKERIDGE, M.S., GOLDMAN, G.H. **Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. Appl Microbiol Biotechnol.** 91(5), 1267-75. 2011.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G. **Processo de produção de álcool – controle e monitoramento.** FERMENTEC, Piracicaba, p. 56-59, 1996.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 89 – 105, 2008.
- BALSALOBRE, M. A. A. et al. **Cana-de-açúcar: quando e como cortar para o consumo animal.** *Balde Branco*, n. 421, p.19-13, 1999.
- BASSOS, L. C.; SILVA, M., **Efeitos do Cádmio sobre o Crescimento das Leveduras Saccharomyces Cerevisiae Pe-2 e Saccharomyces Cerevisiae Iz-1904, e a Capacidade da vinhaça em Atenuar a Toxicidade.** Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 24(1): 016-022, jan.-mar. 2004.
- BELIK, W. **Agroindústria processadora e política econômica.** Campinas, IE/Unicamp, 1992. (Tese de Doutorado).
- BRASIL, IPEA, **Petróleo: da crise ao carro flex, 2010.** Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/desafios/index.php?option=com_content&view=article&id=2321:catid=28&Itemid=23>, acessado em maio de 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Balço nacional da cana-de-açúcar e agroenergia.** Brasília, DF, 2007. p.13.
- BROOKS, G.; CARROLL, K.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg-26.** AMGH Editora, 2014.
- BRUICE, P. Y. **Química Orgânica.** 4 ed. Pearson, 2006. p.524-543.
- COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C.; COLLINS, K. E.; KENNETHH, E. T. **Fases Estacionárias Para Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Em Fase Reversa (Clae-Fr) Baseadas Em Superfícies De Óxidos Inorgânicos Funcionalizados.** Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP. Quim. Nova, Vol. 25, No. 4, 616-623, 2002.

- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira – Cana-de-açúcar**. p.08. 2016.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da Safra Brasileira – Cana-de-açúcar**. p.13. 2015.
- CORTEZ, L. A. B., **Bioenergia e Biorrefinaria: Cana-de-Açúcar e Espécies Florestais**. UFV. Viçosa. Brasil, p.18-19. 2013.
- DAL BEM, A. J., KOIKE, G. H., & PASSARINI, L. C. **Modelagem e simulação para o processo industrial de fabricação de açúcar e álcool**. *Minerva*, p.33-46. 2003.
- DIAS, M. O. S., CUNHA, M. P., FILHO, R. M., BONOMI, A., JESUS, C. D. F., ROSSELI, C. E. V. (2011), *Simulation of integrated first and second generation bioethanol production from sugarcane: comparison between different biomass pretreatment methods*. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.38, ed. 8, p. 955-966, ago. 2011.
- EMBRAPA, **Árvore do conhecimento – cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CON-TAG01_90_22122006154841.html>. Acessado em Maio de 2016.
- E. V., MACIEL, M. R. W., 2009. *Production of bioethanol and other bio-based materials from sugarcane bagasse: integration to conventional bioethanol production process*. **Chemical Engineering Research and Design** 87, p. 1206 –1216, 2009.
- FERNANDES, A. C. **Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar**. Piracicaba: Stab. 2011.
- FIEDUREK, J., SKOWRONEK, M., & GROMADA, A. **Selection and adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to increased ethanol tolerance and production**. *Polskie Towarzystwo Mikrobiologów*, 60(1), 51-8. 2011.
- GALZERANI, J. C., RODRIGUES A. G. **Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades**. Departamento de Física, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 34, n. 4, 4309, 2012.
- GOLDEMBERG, J.; COELHO, S. T.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, v. 36, p. 2086–2097, 2008.

- GUARANY, Cristiano Alves. **Estudos de materiais ferroelétricos por espectroscopia no infravermelho**. 2004. 89 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, 2004.
- GUIDINI, C. Z. **Fermentação Alcoólica em Batelada Alimentada Empregado *Saccharomyces cerevisiae* de Características Floculantes**. p-41 Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) - Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, 2013.
- GUTIERREZ, L. E.; ANNICCHINO, A. V. K. O.; LUCATTI, L. **Capacidade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com ácidos graxos**. In: ANAIS DA ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA “LUIZ DE QUEIROZ”, 2., 1990, Piracicaba. Anais... Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, v. 47, p. 575-95. 1990.
- HAMELINCK, C. N.; VAN HOOIJDONK, G.; FAAIJ, A. P. C. **Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle-and long-term**. Biomass and bioenergy, v. 28, n. 4, p. 384-410, 2005.
- HAMMOND, J. R. **Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century**. Progress to date. Yeast, Chichester, England, v. 11, n. 16, p. 1613-27, 1995.
- INGLEDEW, W. M. **Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer**. In: (Ed.). The alcohol textbook. 3rd. ed: UK: Nottingham University Press, 1999. Alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*: a yeast primer.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção Agrícola Municipal – Culturas Temporárias e Permanentes**. p.16. 2015.
- KONG, Q. X., ZHANG, A. L., CAO, L. M., CHEN, X. Over-expressing GLT1 in a *gpd2*Delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae* to improve ethanol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75 (6), 1361-1366. 2007.
- LANÇAS, F. M. et al. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”. *Scientia chromatographica*, v. 1, n. 2, p. 35-61, 2009.
- LIMA, L. R.; MARCONDES, A. A. **Álcool Carburante: Uma Estratégia Brasileira**. Curitiba: Editora UFPR, p.248, 2002.
- LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. **Biotecnologia Industrial**, v.3, p.1-43, 2001.

- LOPES, L. A. **Vinte anos de Proálcool: avaliações e perspectivas**. *Economia&Empresa*, 3(2):49-57, abr./jun. 1996.
- LOPES, M. L. **Estudo do polimorfismo cromossômico em *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem PE2) utilizada no processo industrial de produção de etanol**. Rio Claro. (PhD). Thesis. Instituto de Biociências de Rio Claro. Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho). 2000.
- OLIVEIRA, L. F. **Espectroscopia Molecular**. Departamento de Química. Universidade Federal de Juiz de Fora. p. 24-29. 2001.
- MACEDO, I. C. A tecnologia para o setor sucroalcooleiro: situação atual e perspectivas. In: Fernandes, E. S. L. & Coelho, S. T. (orgs.). **Perspectivas do álcool combustível no Brasil**. São Paulo, USP /IEE, p. 57-64.1996.
- MEDINA, V. G., ALMERING, M.J., VAN MARIS, A.J., PRONK, J.T. **Elimination of glycerol production in anaerobic cultures of a *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered to use acetic acid as an electron acceptor**. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, p.190–195.2010.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA (MME). **Boletim Mensal de Energia**. p.1-2. Dez 2016.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA (MME). **Resenha Energética Brasileira – Exercício de 2015**. p. 3-4. Maio 2015.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA), **Gestão de Resíduos Orgânicos**. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/cidades-sustentaveis/residuos-solidos/gest%C3%A3o-de-res%C3%ADduos-org%C3%A2nicos#o-que-fazer> >, acessado em maio de 2017.
- MISSAWA, S. K. **Modificação de linhagens industriais de *Saccharomyces cerevisiae* para o aumento da produtividade de álcool e floculação condicional**. 150 f. Tese (Doutorado em genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.
- NOVACANA. **EUA fazem projeção sobre o futuro do mercado de etanol**. Disponível em <<http://www.novacana.com/n/etanol/mercado/futuro/eua-projecao-futuro-mercado-etanol-190213/>>. Acessado em maio de 2017.

- OLALDE, A. R. **Desenvolvimento tecnológico e competitividade da indústria brasileira: a indústria sucro-alcooleira**. Campinas, 1993. (Relatório final, contrato SCTDE/Fecamp/Unicamp-IE).
- PIACENTE, E. A.. **Perspectiva do Brasil no mercado internacional de etanol**. Dissertação de Mestrado de Engenharia Mecânica. Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2006.
- RAMOS, P. & BELIK, W. **Intervenção estatal e a agroindústria canavieira no Brasil**. Revista de Economia e Sociologia Rural, 27(2):197-214, abr./jun. 1989.
- ROMÃO, B. B. **Produção de etanol por hidrólise ácida de melaço de soja**. 93 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.
- RUSSELL, I. **Understanding yeast fundamentals**. In: (Ed.). THE ALCOHOL TEXTBOOK. A reference for the beverage, fuel and industrial alcohol industries: UK: Nottingham University Press, 2003. Understanding yeast fundamentals.
- SANTOS, A. M. **Fermentação alcoólica com levedura imobilizada em colmos de bambu e em fibra de coco**. p.82 Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008.
- SCHULZ, M. A. **Produção de bioetanol a partir de rejeitos da bananicultura: polpa e cascas de banana**. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Programa de Mestrado em Engenharia de Processos, Universidade da Região de Joinville, Joinville, 2010.
- SHIKIDA, P. F. A.; BACHA, C. J. C., **Evolução da Agroindústria Canavieira Brasileira de 1975 a 1995**. p. 70-78, 1998.
- SILVA, J. P. N.; SILVA, R. N., **Noções da Cultura da Cana-de-Açúcar**. 2012. p-15.
- SILVA, J. et al.. **Determinação da qualidade e do teor de sólidos solúveis nas diferentes partes do fruto da pinheira (annona squamosa L.)**. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 24, n. 2, p. 562-564, agosto 2002.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Sétima Edição. Ed. abdr, 2005.
- SUCRE. **Contexto da palha de cana no Brasil: atuação do Projeto SUCRE**. 2016. Disponível em: <<http://pages.cnpem.br/sucres/2016/04/11/contexto-palha-cana-brasil-atuacao-projeto-sucres/>>. Acesso em maio de 2017.

- TÁVORA, F.L., Centro de Estudos da Consultoria do Senado, **História e Economia dos Biocombustíveis no Brasil. Brasília.** Senado Federal, p. 17, 2011.
- TURANOV, A., KHITRIN, A.K. **Proton NMR characterization of gasoline-ethanol blends.** Fuel, 137, 335-338, 2014.
- UDOP- União dos produtores de Bioenergia. **Retomada: US\$ 65 bi investidos em novas usinas renderão US\$ 62 bi em impostos.** Disponível em: <<http://www.udop.com.br/index.php?item=noticias&cod=1082044#nc>>. Acessado em maio de 2017.
- VÁSQUES, M. P. **Desenvolvimento de processo de hidrólise enzimática e fermentação simultâneas para a produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar.** Universidade Federal de Rio de Janeiro Escola de Química 2007.
- W.S. ROBAZZA, J.T. TELEKEN, G.A. GOMES. **Modelagem Matemática do Crescimento de Microrganismos em Alimentos.** Universidade do Estado de Santa Catarina 2010.
- WISSELINK, H. W., TOIRKENS, M. J., BERRIEL, M. D. F., WINKLER, A. A., VAN DIJKEN, J. P., PRONK, J. T., VAN MARIS, A. J. A. **Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for efficient anaerobic alcoholic fermentation of L-arabinose.** *Applied and Environmental Microbiology*, 73(15): 4881-4891. 2007.