

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
-UNICAMP-**

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
Departamento de Tecnologia de Alimentos

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS ANALÍTICAS NO
MONITORAMENTO DO RENDIMENTO DA
FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA**

RODNEY ALEXANDRE FERREIRA RODRIGUES

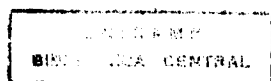
Dissertação apresentada junto à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas como requisito para obtenção do Título
de Mestre em Tecnologia de Alimentos

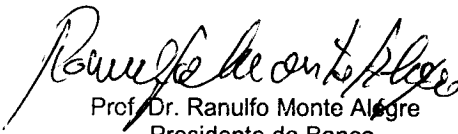
PARECER

Este exemplar corresponde à
redação final da tese defendida
por Rodney Alexandre Ferreira
Rodrigues aprovada pela
Comissão Julgadora em 03 de
março de 1999.

CAMPINAS
Fevereiro -1998

Campinas, 03 de março de 1999




Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Presidente da Banca

9909822-9

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
-UNICAMP-**

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS ANALÍTICAS NO
MONITORAMENTO DO RENDIMENTO DA
FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA**

RODNEY ALEXANDRE FERREIRA RODRIGUES

Farmacêutico Industrial-USP 1986

Orientador : Prof. Dr RANULFO MONTE ALEGRE

FEA-UNICAMP

Fevereiro -1998

BANCA EXAMINADORA :



Prof. Dr Ranulfo Monte Alegre
(Orientador)



Prof.ª Dr.ª Telma Teixeira Franco
(Membro)



Dr.ª Marta Cristina Teixeira Duarte
(Membro)

Dr Airton Vialta
(Suplente)

Campinas, 1999

"A felicidade não é o prêmio da virtude, mas a própria virtude; e não gozamos dela por refrearmos as paixões, mas ao contrário, gozamos dela por podermos refrear as paixões".

Baruch de Espinosa

Dedico esta dissertação :

À minha esposa Marili
pelo carinho,
pelo estímulo,
pelo apoio pessoal
e profissional
sempre muito presentes

A meu pai (*in memoriam*)
Em especial à minha mãe,
que aconselhou, participou e
incentivou meus caminhos

À Deus,
presente em tudo,
o resumo de todos meus sentimentos

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao Prof. Dr Ranulfo Monte Alegre pelo apoio e sugestões na parte escrita deste trabalho. Pela coragem e presença no momento certo, minha gratidão.
- ✓ Ao Professor Dr Gil Eduardo Serra e Dr Silvio Roberto Andrietta pela atenção dispensada na idealização e execução prática deste trabalho.
- ✓ Ao CPQBA-Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas da UNICAMP, por permitir a realização deste trabalho.
- ✓ À Dr^a Marta Cristina Teixeira Duarte pela carinhosa ajuda na redação final deste trabalho. Pelo incentivo, sugestões, esclarecimentos e pela participação como membro da banca de defesa.
- ✓ À Dr^a Telma Teixeira Franco por sua participação como membro da banca de defesa, pelo apoio e sugestões.
- ✓ Ao Dr Airton Vialta - ITAL pelo profissionalismo; colaboração e sugestões dadas na pré-banca deste trabalho.
- ✓ À minha esposa e companheira Marili Villa Nova Rodrigues pelo apoio pessoal e colaboração na realização das práticas de cromatografia.
- ✓ Às amigas do laboratório de Fitoquímica-CPQBA, Dr^a Mary Ann Foglio e Dr^a Carmen Lúcia Queiroga pela colaboração e apoio pessoal.
- ✓ A todos os amigos do CPQBA, em especial à Carla, Mileni, Tércio e Daniel, pelo auxílio técnico.

✓ Aos meus irmãos Ricardo Antônio Ferreira Rodrigues e Reinaldo Augusto Ferreira Rodrigues que sempre incentivaram minha vida profissional.

✓ As Usinas Trapiche, Bonfim, Tamoio e Diamante pelo fornecimento dos melaços utilizados no experimento fermentativo.

✓ Ao amigo Paulo Rehder pela colaboração e sugestões na análise estatística.

✓ Ao João Rabesco e Nei, que propiciaram minha visita aos laboratórios e demais instalações da Usina Diamante para esclarecimentos técnicos.

✓ À Acatec (Equipamentos para pesquisa científica, ensino e laboratório) que gentilmente forneceu referências bibliográficas na área de cromatografia.

✓ Aos amigos Marcus, Paulo e Cida do DTA-FEA pelos bons momentos divididos em sala de aula. Pela amizade e atenção dispensada.

✓ À Profª Drª Maria Isabel Rodrigues e Drª Maria da Graça Stupiello Andrietta que propiciaram minha participação no Curso "Controle da fermentação alcoólica através de testes microbiológicos e bioquímicos" FEA-Unicamp.

✓ À Stab (Sociedade dos técnicos açucareiros e alcooleiros do Brasil), ao Prof. José Paulo Stupiello e demais ministrantes que possibilitaram minha participação no Curso "Atualização tecnológica na indústria sucroalcooleira".

✓ A todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

	Página
Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Siglas, abreviaturas e símbolos.....	ix
Lista de Anexos.....	xi
Resumo.....	xii
Summary.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1. PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA.....	5
2.1.1. Processo de fermentação alcoólica por batelada.....	5
2.1.2. Processo de fermentação alcoólica contínua.....	7
2.1.2.1.Evolução do processo de fermentação alcoólica contínua.....	9
2.2. MELAÇO.....	10
2.3. ANÁLISE DE CARBOIDRATOS.....	15
2.3.1. Polarimetria.....	15
2.3.2. Oxirredutimetria.....	18
2.3.3.Cromatografia.....	20
2.3.3.1. Cromatografia Gasosa.....	21
2.3.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	22
2.3.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Troca Iônica.....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28

3.1. MATERIAL.....	28
3.1.1. Matéria-Prima.....	28
3.1.2. Microrganismo.....	28
3.1.3. Mosto.....	28
3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	29
3.2.1. Análises do Melaço.....	29
3.2.1.1. Determinação de ART pelo método de Fehling.....	29
3.2.1.2. Determinação de ART pelo método de CLAE-TA/CarboPac-DPA.....	30
3.2.1.3. Polarimetria.....	31
3.2.1.4. Determinação do Brix Refratométrico.....	32
3.2.1.5. Determinação do Nitrogênio Protéico.....	32
3.2.1.6. Determinação de Dióxido de Enxofre	33
3.2.2. Análises do Mosto.....	34
3.2.2.1. Determinação de ART pelo método de Fehling.....	34
3.2.2.2. Determinação de ART pelo método de CLAE-TA/CarboPac-DPA.....	34
3.2.2.3. Determinação de Acidez.....	34
3.2.3. Análises do Vinho.....	35
3.2.3.1. Determinação de ART pelo método de Fehling.....	35
3.2.3.2. Determinação de ART pelo método de CLAE-TA/CarboPac-DPA.....	35
3.2.3.3. Determinação de Acidez.....	35
3.2.3.4. Determinação de Glicerol.....	35
3.2.3.5. Determinação da Massa Celular Seca.....	36
3.2.3.6. Determinação de Etanol.....	36
3.3. MÉTODOS DE CULTIVO.....	37
3.3.1. Manutenção da Levedura.....	37
3.3.2. Preparo do mosto.....	37

3.3.3. Condução do Ensaio Fermentativo.....	37
3.4. OBTENÇÃO DE DADOS EXPERIMENTAIS.....	38
3.4.1. Cálculo de Balanço de Massa.....	38
3.4.2. Cálculo de Produtividade Específica de Etanol e Metabólitos.....	38
3.4.3. Cálculo de Rendimento.....	40
3.4.4. Fatores de Produto e Potencial Fermentativo.....	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA MATÉRIA-PRIMA.....	43
4.1.1. Determinação dos Principais Açúcares do Melaço por CLAE.....	45
4.1.2. Determinação da Pureza dos Melaços Através das Análises de Açúcar e Brix.....	46
4.1.3. Análise Estatística dos Resultados Obtidos a Partir das Diferentes Técnicas Empregadas para Determinação de Açúcares no Melaço	49
4.2. ENSAIOS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BATELADA.....	50
4.2.1. Determinação de açúcares no mosto e vinho, por Fehling e CLAE..	50
4.2.1.1. Açúcar Residual.....	50
4.2.2. Determinação de Etanol no Vinho.....	58
4.2.3. Rendimento Fermentativo Calculado pelos Metabólitos.....	60
4.3. COMPARAÇÃO DO POTENCIAL FERMENTATIVO DOS VÁRIOS MELAÇOS, EM RELAÇÃO A UM MEIO SINTÉTICO PADRÃO.....	62
4.4. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO RENDIMENTO FERMENTATIVO EM FUNÇÃO DE VALORES DE SULFITO E NITROGÊNIO.....	70
4.5. AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE ALCOÓLICA DE AMOSTRAS DE MELAÇO FERMENTADAS.....	72

5. CONCLUSÕES..... 80

6. SUGESTÕES..... 81

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 83

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Fluxograma do processo de fabricação de açúcar cristal branco.....	6
Figura 2. Fluxograma de fabricação de álcool.....	8
Figura 3. Processo contínuo de fermentação alcoólica.....	9
Figura 4. Constituintes do melaço de cana-de-açúcar.....	13
Figura 5. Diferentes etapas voláticas do detector de pulso amperométrico.....	26
Figura 6. Balanço global da reação de glicólise (Equação de Gay Lussac).....	40
Figura 7. Variação do teor de sacarose, glicose e frutose nos diferentes melaços	46
Figura 8. Comparação dos valores de concentração de sacarose em melaços de cana-de-açúcar analisados por CLAE e Polarimetria.....	47
Figura 8a. Comparação dos valores de ART em melaços de cana-de-açúcar analisados por CLAE e Fehling.....	48
Figura 8b. Comparação entre os valores de concentração de sacarose por CLAE e da relação Pol/Brix (Pureza aparente).....	49
Figura 9. Dispersão dos valores de MAM, MARS e MAC, para o experimento 120 g/L.....	55
Figura 10. Dispersão dos valores de MAM, MARS e MAC, para o experimento 150 g/L.....	56
Figura 11. Dispersão dos valores de MAM, MARS e MAC, para o experimento 180 g/L.....	57
Figura 12. Correlação de dados de concentração de etanol obtido no vinho e concentração de nitrogênio na matéria-prima.....	59
Figura 13. Amostras ordenadas segundo valores de Potencial Fermentativo (Fehling -120 g/l).....	66
Figura 13a. Amostras ordenadas segundo valores de Potencial Fermentativo (CLAE -120 g/L).....	66

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 14. Amostras ordenadas segundo valores de Potencial Fermentativo (Fehling -150 g/L)	67
Figura 14a. Amostras ordenadas segundo valores de Potencial Fermentativo (CLAE -150 g/L)	67
Figura 15. Amostras ordenadas segundo valores de Potencial Fermentativo (Fehling -180 g/L)	68
Figura 15a. Amostras ordenadas segundo valores de Potencial Fermentativo (CLAE- 180 g/L)	68
Figura 16. Comparação entre os valores de rendimento obtidos por Fehling e CLAE e concentrações de N e SO ₃ ⁻ (Experimento 120 g/L).....	70
Figura 16a. Comparação entre os valores de rendimento obtidos por Fehling e CLAE concentrações de N e SO ₃ ⁻ (Experimento 150 g/L).....	71
Figura 16b. Comparação entre os valores de rendimento obtidos por Fehling e CLAE e concentrações de N e SO ₃ ⁻ (Experimento 180 g/L).....	72
Figura 17. Classificação das amostras de melaço quanto à produtividade alcoólica horária (Ensaio 120 g/L).....	76
Figura 17a. Classificação das amostras de melaço quanto à produtividade alcoólica horária celular (Ensaio 120 g/L).....	76
Figura 18. Classificação das amostras de melaço quanto à produtividade alcoólica horária (Ensaio 150 g/L).....	77
Figura 18a. Classificação das amostras de melaço quanto à produtividade alcoólica horária celular (Ensaio 150 g/L).....	77
Figura 19. Classificação das amostras de melaço quanto à produtividade alcoólica horária (Ensaio 180 g/L).....	78
Figura 19a. Classificação das amostras de melaço quanto à produtividade alcoólica horária celular (Ensaio 180 g/L).....	78

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Constituintes do melaço de cana-de-açúcar.....	14
Tabela 2. Comparação da sensibilidade e tratamento da amostra entre as técnicas cromatográfica e polarimétrica.....	18
Tabela 3. Sequência do DPA na análise de glicose, frutose e sacarose.....	31
Tabela 4. Amostragem sugerida para a etapa de digestão e para a etapa de colorimetria.....	33
Tabela 5. Pesagem do frasco de fermentação nas suas diferentes etapas.....	38
Tabela 6. Parâmetros fermentativos.....	39
Tabela 7. Cálculo das produtividades específicas e produção horária.....	39
Tabela 8. Cálculo de rendimento fermentativo.....	40
Tabela 9. Cálculo dos fatores de produtos.....	41
Tabela 10. Caracterização dos melaços por análises físico-químicas.....	44
Tabela 11. Teste T para análises químicas do melaço.....	49
Tabela 12. Média das determinações da concentração de ART no mosto e vinho, do experimento 120 g/L.....	51
Tabela 12a. Média das determinações da concentração de ART no mosto e vinho, do experimento 150 g/L.....	52
Tabela 12b. Média das determinações da concentração de ART no mosto e vinho, do experimento 180 g/L.....	53
Tabela 13. Teste T para valores de MAM, MARS e MAC, dos ensaios 120, 150 e 180g/L.....	54
Tabela 14. Análise estatística dos valores de rendimento alcoólico pelas técnicas de determinação de ART - Fehling e CLAE.....	61

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 15. Teste T para valores de $Y_{P/M}$, nos experimentos 120, 150 e 180 g/L	62
Tabela 16. Média de triplicatas para os valores de fatores obtidos por Fehling e por CLAE (Ensaio 120 g/L).....	63
Tabela 16a. Média de triplicatas para os valores de fatores obtidos por Fehling e por CLAE (Ensaio 150 g/L).....	64
Tabela 16b. Média de triplicatas para os valores de fatores obtidos por Fehling e por CLAE (Ensaio 180 g/L).....	65
Tabela 17. Média das triplicatas dos valores de PHE, PHEC, MPE e MPC (Ensaio com 120 g/L de ART).....	73
Tabela 17a. Média das triplicatas dos valores de PHE, PHEC, MPE e MPC (Ensaio com 150 g/L de ART).....	74
Tabela 17b. Média das triplicatas dos valores de PHE, PHEC, MPE e MPC (Ensaio com 180 g/L de ART).....	75

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AR	Açúcares redutores
ART	Açúcares redutores totais calculados como glicose
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-TA	Cromatografia líquida de alta eficiência de troca aniônica
CLAE-TI	Cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica
DCE	Detector de captura de elétrons
DIC	Detector de ionização em chamas
DIR	Detector de índice de refração
DPA	Detector de pulso amperométrico
DUV	Detector de ultra-violeta
FAC	Fator de ácidos
FARS	Fator de açúcar residual
FC	Fator células
FE	Fator de etanol
FG	Fator de glicerol
L&E	Lane e Eynon
MAC	Massa de ART consumido (g de ART consumido)
MAM	Massa de ART do mosto (g de ART/g de mosto)
MARS	Massa de ART residual do vinho (g de ART/g de vinho)
MI	Massa do inóculo
MM	Massa do mosto
MPAC	Massa produzida de ácido (g de H ₂ SO ₄ /g de vinho)
MPC	Massa produzida de células (g de células/g de vinho)
MPCO ₂	Massa produzida de CO ₂

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

MPE	Massa produzida de etanol (g de etanol/g de vinho)
MPG	Massa produzida de glicerol (g de glicerol/g de vinho)
MV	Massa do vinho
nm	Comprimento de onda
ODS	Octa decilsilano
PDA	Potato dextrose agar
PEAC	Produção específica de ácido
PEARS	Produção específica de açúcar residual
PEC	Produção específica de células
PEE	Produção específica de etanol
PEG	Produção específica de glicerol
PF	Potencial Fermentativo
PHE	Produtividade horária de etanol
PHEC	Produtividade horária de etanol em relação à massa celular
Pol	Leitura sacarimétrica
PS-DVB	Poliestireno-Divinilbenzeno
Proálcool	Programa Nacional do Alcool
q.s.p.	Quantidade suficiente para
$Y_{P/M}$	Rendimento baseado nos metabólitos
$Y_{P,Sa}$	Rendimento baseado no substrato de alimentação
$Y_{P,Sc}$	Rendimento baseado no substrato consumido
YT	Rendimento teórico

LISTA DE ANEXOS

	Página
Anexo I	93
Anexo Ia Experimento 120 g/L	94
Anexo Ib Experimento 150 g/L	97
Anexo Ic Experimento 180 g/L	100
Anexo II	103
Anexo IIa Determinação de etanol pelas técnicas colorimétrica e de cromatografia gasosa, em amostras fermentadas durante 24 h.....	104
Anexo IIb Determinação de etanol pelas técnicas colorimétrica e de cromatografia gasosa, em amostras fermentadas durante 48 h.....	105
Anexo III	106
Anexo IIIa Experimento 120 g/L.....	107
Anexo IIIb Experimento 150 g/L.....	108
Anexo IIIc Experimento 180 g/L.....	109

RESUMO

O emprego do melaço de cana-de-açúcar como substrato para obtenção de etanol em nosso país é prática antiga e rotineira. Por tratar-se de um subproduto da fabricação do açúcar cristal e por isso dependente da qualidade da cana-de-açúcar, sua composição é variável.

O cálculo de rendimento é o principal parâmetro para avaliação do desempenho de processos fermentativos utilizando-se esse tipo de matéria-prima, podendo ser obtido através da determinação da massa de etanol produzido e da determinação da massa residual de açúcares e metabólitos secundários. Esses dados são bastante importantes para a avaliação do processo fermentativo. Na prática, valores de rendimento próximos ou superiores ao máximo teórico são freqüentemente observados, demonstrando a existência de erros, já que outros produtos são formados na fermentação.

Uma vez que as técnicas analíticas utilizadas em usinas são simples e por vezes inexatas e sendo o melaço de cana-de-açúcar um substrato altamente complexo e bastante utilizado nas destilarias, suas análises devem ser realizadas com rigor para garantir resultados confiáveis.

A partir da fermentação de diferentes melaços em diferentes concentrações, foi possível aplicar técnicas de análise no mosto (açúcar) e no vinho (etanol e metabólitos: CO₂, glicerol, massa celular, açúcar residual e acidez), com a finalidade de verificar o comportamento destes melaços frente a parâmetros como rendimento, potencial

fermentativo e produtividade, bem como verificar as possíveis diferenças no rendimento fermentativo pela comparação de cálculos aplicando-se uma técnica analítica tradicional (Fehling), e outra mais atual de determinação de carboidratos (Cromatografia líquida de alta eficiência-Detector de pulso amperométrico).

Verificou-se que as técnicas são diferentes a níveis de 95% e 93% de confiança, para valores de açúcar residual e rendimento (Y_{PM}) respectivamente. Apesar da análise estatística indicar diferença entre as técnicas, verificou-se boa correlação entre as curvas obtidas.

Verificou-se também que a produção de etanol é dependente da concentração de nitrogênio no meio fermentativo, aumentando em função do aumento da concentração deste elemento até certos limites. Verificou-se não existir correlação entre a coloração escura de melaços e o desempenho fermentativo. Alguns melaços esgotados tiveram baixo desempenho fermentativo, enquanto outros tiveram desempenho superior até mesmo aos melaços ricos. Desta forma verificou-se que melaços esgotados podem fermentar bem, porém existe uma limitação que deve ser determinada em função da análise de alguns constituintes, como nitrogênio e sulfito, dentre outros.

SUMMARY

The use of the sugar cane molasse is employed as fermentation medium for ethanol production in our country is a common practice. As it's a by product of the raw sugar production being dependent of the sugar cane's quality.

The yield calculation is the main parameter for evaluation of the performance of this kind of material in fermentation processes, this can be obtained through the determination of the resulting ethanol mass and by the determination of residual sugar and secondary products metabolism. That data is quite important for evaluation of the fermentation process, that have show in practice to occure yield values close or higher than the theoretic top calculated, revealing discrepancies as a result of other products formed in the fermentation process.

Since the analytic techniques employed in industries are simple as well as sometimes inexact, the sugar cane molasse its analyses should be accomplished with rigidity to guarantee reliable results as it complex fermentation medium quite used in the distilleries.

Starting using molasses in different concentrations, analysis techniques were applied to the must (sugar) and wine (ethanol and metabolism products: CO₂, glycerol, cell mass, residual sugar and acidity), with the purpose of verifying the behavior of these molasses with fermentation potential and productivity, as well as verify the possible

differences in the fermentation yield comparing calculus between applying a traditional analytic technique (Fehling), and other more current carbohydrates determination (High Pressure Liquid Chromatography using Pulsed Amperometric Detector).

It was verified that the techniques differed between 95% and 93% in reability, for residual sugar and yield ($Y_{P/M}$) values respectively. In spite of the indication of statistical analysis difference among the techniques, good correlation were verified among the resulting curves.

It was also shown that the ethanol production is dependent of the nitrogen concentration in the fermentation medium, increasing as a function of this compound concentration up to certain limits. No correlation was confirmed between the dark coloration of molasses and the fermentation performance. Some poor molasses had low fermentation performance, whereas others revealed high fermentation performance even to the rich molasses. So far it was proven that poor molasses can ferment well, even though a limitation exist, that should be determined as a function of the some constituents, as nitrogen, sulfide and others.

1. INTRODUÇÃO

As indústrias brasileiras pioneiras na produção de etanol surgiram vinculadas às usinas açucareiras, onde o melaço, subproduto da fabricação do açúcar, era utilizado como substrato fermentativo com o propósito de transformar esse subproduto, de baixo valor comercial, em outro de maior valor agregado.

A crise mundial do petróleo no início dos anos setenta ocasionou um acréscimo em seu preço, atingindo trinta dólares por barril num intervalo de uma década. Motivado por essa crise, o etanol passou a ter grande importância no panorama nacional com a busca de um combustível alternativo. Apesar do incentivo à produção e uso do álcool, o Brasil despendeu de 1973 a 1982 cerca de 52 bilhões de dólares com importação de petróleo.

O uso e produção do etanol em larga escala visando diminuir a vulnerabilidade do país às instabilidades no Oriente Médio, teve sua semente lançada com a criação do Proálcool em 1975, o qual propiciou aos usineiros grande incentivo através das concessões fiscais. Fatores como a disponibilidade de mão de obra, boa experiência na produção do etanol para uso industrial, grandes extensões territoriais aptas ao cultivo da cana e com clima adequado, capacidade ociosa na indústria, falta de economia de divisas, pouco crescimento interno, grande disparidade de rendas, possibilidade da expansão da

produção de bens de capital, propiciaram sua implantação pelo Governo Federal.

Nesse período a produção de cana-de-açúcar cresceu rapidamente, passando de 68 para 220 milhões de toneladas/safra e a produção de álcool prevaleceu sobre a do açúcar. Dados de 1994 mostram que 70 % da cana produzida foi utilizada na produção de álcool, totalizando cerca de 12 bilhões de litros/ano, o que correspondia a uma participação de doze por cento do consumo total de combustíveis, enquanto que derivados do petróleo como o diesel participava com 41 %, o óleo combustível com 21 %, o gás liquefeito de petróleo com 11 % e a gasolina com 15 %. Desde a criação do Programa, os custos de produção do álcool passaram de US\$ 70 / barril para cerca de US\$ 45 em 1989.

A estabilização do preço internacional do petróleo a níveis abaixo do previsto no auge da crise reduziu drasticamente o investimento de capital no setor alcooleiro, tornando o programa governamental menos competitivo. Com isso, várias destilarias autônomas na região Centro-Sul, principalmente Minas Gerais, encerraram suas atividades.

A grande oferta de petróleo tornou a produção de etanol por via fermentativa menos atrativa e provocou a necessidade de uma mudança no processo tecnológico para diminuição de custos e aumento na produtividade.

Uma avaliação mundial do mercado de açúcar do século vinte revela um consumo crescente a cada ano, devido principalmente ao aumento populacional em países do terceiro mundo. Como exemplo podemos citar o Brasil que atingiu cifras elevadas em seu consumo com valores chegando a quarenta e nove quilos de açúcar per capita. Outros países que apresentam elevado consumo são a África do Sul e os Estados Unidos, com 32 kg e 35 kg per capita, respectivamente.

Como o mercado regulador de açúcar dos anos 90 revelou uma maior rentabilidade que o do álcool, sua produção nos últimos anos cresceu, ultrapassando

valores de 11 milhões de toneladas / safra. Em 93 por exemplo o crescimento esperado para produção de açúcar foi estimado em 20 %, enquanto que para o álcool 13 %. Em função disso, algumas usinas passaram a esgotar ao máximo o melaço aumentando o rendimento em sacarose.

Durante o Proálcool houve evolução tecnológica dos processos produtivos. O Governo incentivou pesquisas que propiciaram melhora na qualidade da matéria prima, na modernização dos equipamentos, no controle e automação dos processos fermentativos, porém não houve um interesse por parte das usinas na implantação de novas técnicas analíticas de controle da qualidade que estavam surgindo, como as técnicas cromatográficas. Com isso, as metodologias permaneceram inalteradas nos laboratórios das usinas, principalmente pela simplicidade e custo.

Como dito anteriormente, o emprego do melaço de cana-de-açúcar como substrato para obtenção de etanol em nosso país, é prática antiga e rotineira. Por tratar-se de um subproduto da fabricação do açúcar cristal e por isso dependente da qualidade da cana-de-açúcar, possui variabilidade em sua composição. Fatores como variedade da cana, condições ambientais, estado sanitário da cultura, estágio de maturação, irrigação, uso de resíduos (bagaço, cinzas, fuligem de caldeiras, torta de filtro e vinhaça), queima, corte, carregamento, transporte e deteriorações alteram a qualidade da cana, e por consequência a do açúcar e a do melaço.

Somado-se a estes fatores está o industrial do ramo que busca sempre maximizar ganhos, alterando os procedimentos produtivos de acordo com a tendência dos preços na bolsa de mercado de valores do açúcar e do álcool. Em outras palavras, ele exige uma menor exaustão da massa cozida quando o interesse é produzir álcool e maior exaustão quando o interesse é o açúcar. Desta forma pode-se gerar melaços com alto conteúdo de sacarose, como aconteceu em grande parte das décadas em que o Proálcool incentivou a produção de etanol para atender seu consumo como combustível, ou gerar melaços altamente esgotados como na atualidade onde o preço do açúcar é mais competitivo,

exigindo desta forma uma grande exaustão da massa cozida, tornando-a pobre em sacarose e tendo a relação impurezas/sacarose aumentada.

O cálculo de rendimento é o principal parâmetro para avaliação do desempenho desse tipo de matéria-prima em processos fermentativos, podendo ser obtido através da determinação da massa de etanol produzida e da determinação da massa residual de açúcares e alguns metabólitos. Portanto, devido a importância destes dados para avaliação da fermentação, devem ser obtidos criteriosamente, de forma a garantir um processo produtivo satisfatório, uma vez que as estimativas de lucros estão baseadas no cálculo de rendimento. Porém, frequentemente na prática observam-se valores de rendimento superiores a 100%, evidenciando-se a existência de erros, já que inevitavelmente outros produtos são sintetizados a partir do açúcar. Por outro lado, valores muito baixos de rendimento deixam os técnicos com a incerteza se isto é decorrência da utilização de melaços esgotados ou da inexatidão das técnicas analíticas empregadas.

Uma vez que as técnicas analíticas utilizadas em usinas para a análise de açúcares em melaço são bastante simples e inexatas, e uma vez que este substrato possui grande variabilidade, é imprescindível que o monitoramento do álcool e do açúcar seja cada vez mais objeto de estudos, para que o processo fermentativo possa ser melhor compreendido e otimizado.

O objetivo deste trabalho foi o de comparar o rendimento e o desempenho fermentativo de diferentes melaços de cana-de-açúcar entre si e em relação a um controle. Paralelamente, o rendimento fermentativo foi calculado pelas determinações de etanol, dos açúcares redutores totais (ART) e metabólitos do processo, comparando-se duas técnicas analíticas de determinação de ART, uma tradicional e outra mais atual.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

No Brasil, a fabricação de açúcar cristal branco a partir da cana-de-açúcar, é realizada conforme as operações básicas descritas na Figura 1.

2.1. PROCESSOS DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

2.1.1. Processo de fermentação alcoólica por batelada

Os processos de fermentação alcoólica convencionais, utilizando inoculação nova a cada batelada, foram amplamente utilizados pelas destilarias nacionais até início dos anos sessenta.

Nesses processos, é inoculado num certo volume de mosto contendo de 100 a 200 g/L de açúcar, sendo a fermentação considerada concluída pelo término da atividade biológica, que por sua vez é consequência da falta de nutrientes ou do excesso de etanol que é um dos inibidores do processo. O vinho é enviado para destilação e novo ciclo é iniciado após sanitização da dorna.

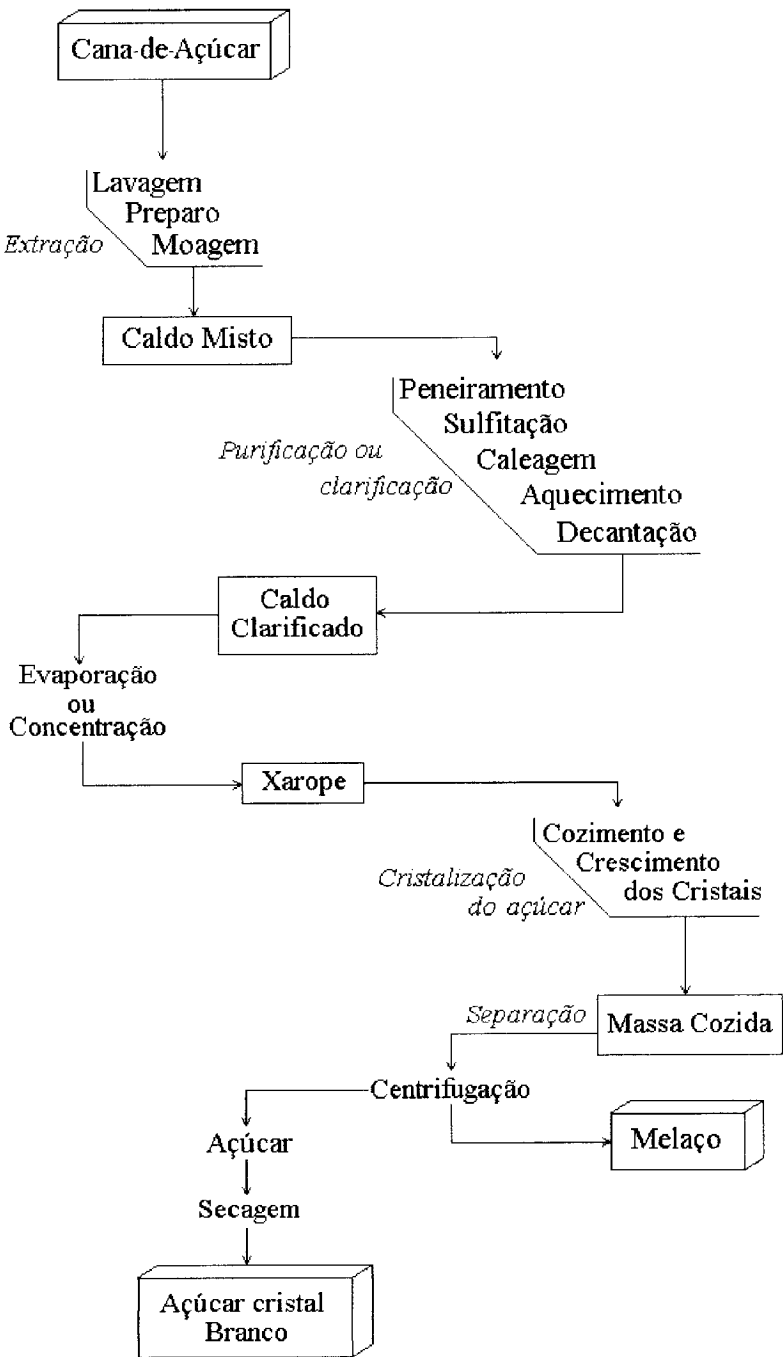


Figura 1. Fluxograma do processo de fabricação de açúcar cristal branco
Fonte: Leme Júnior & Borges¹ citado por Pulzatto (1995).

¹ LEME JÚNIOR, J ; BORGES, J.M. Açúcar de cana. Viçosa : Imprensa Universitária, 1965. 328p.

A batelada, caracterizada pela baixa produtividade alcoólica, tempo elevado de processamento, bem como difícil operacionalização, foi substituída pelo processo *Melle - Boinot* em meados da década de sessenta. Neste processo, classificado como batelada alimentada, a alimentação do substrato é contínua em cada batelada e existe o reciclo do inóculo para bateladas sequenciais. Além disso o processo permite o tratamento ácido do leite de levedura que possibilita a eliminação de possíveis contaminantes. A batelada alimentada representou ganhos em rendimento, melhor operacionalização e redução nos tempos gastos (Drews¹, citado por Carvalho, 1996).

2.1.2. Processo de fermentação alcoólica contínua

A fermentação contínua surgiu com o decorrer do desenvolvimento dos processos em batelada e representa atualmente a forma mais segura e barata para a produção de etanol em escala industrial, caracterizando-se pela alta produtividade, facilidade, flexibilidade e custo operacional reduzido.

Através de métodos de otimização e utilização de modelos matemáticos foi possível projetar as novas plantas para que estas atingissem o máximo de produtividade, sendo que novos valores de parâmetros de operação foram assumidos, aumentando a flexibilidade da planta e tornando-a capaz de absorver oscilações durante a safra (Andrietta, 1997).

O fluxograma do processo de fabricação do álcool etílico na fermentação alcoólica contínua está simplificado na Figura 2, que ilustra desde a etapa de obtenção da cana-de-açúcar até a do álcool hidratado. A Figura 3 destaca o processo de fermentação alcoólica contínua.

¹DREWS, W.A. A fermentação do melaço de cana de açúcar no Brasil.. In: SIMPÓSIO DE FERMENTAÇÃO, 1964, São Paulo. **Anais.** p.213-222.

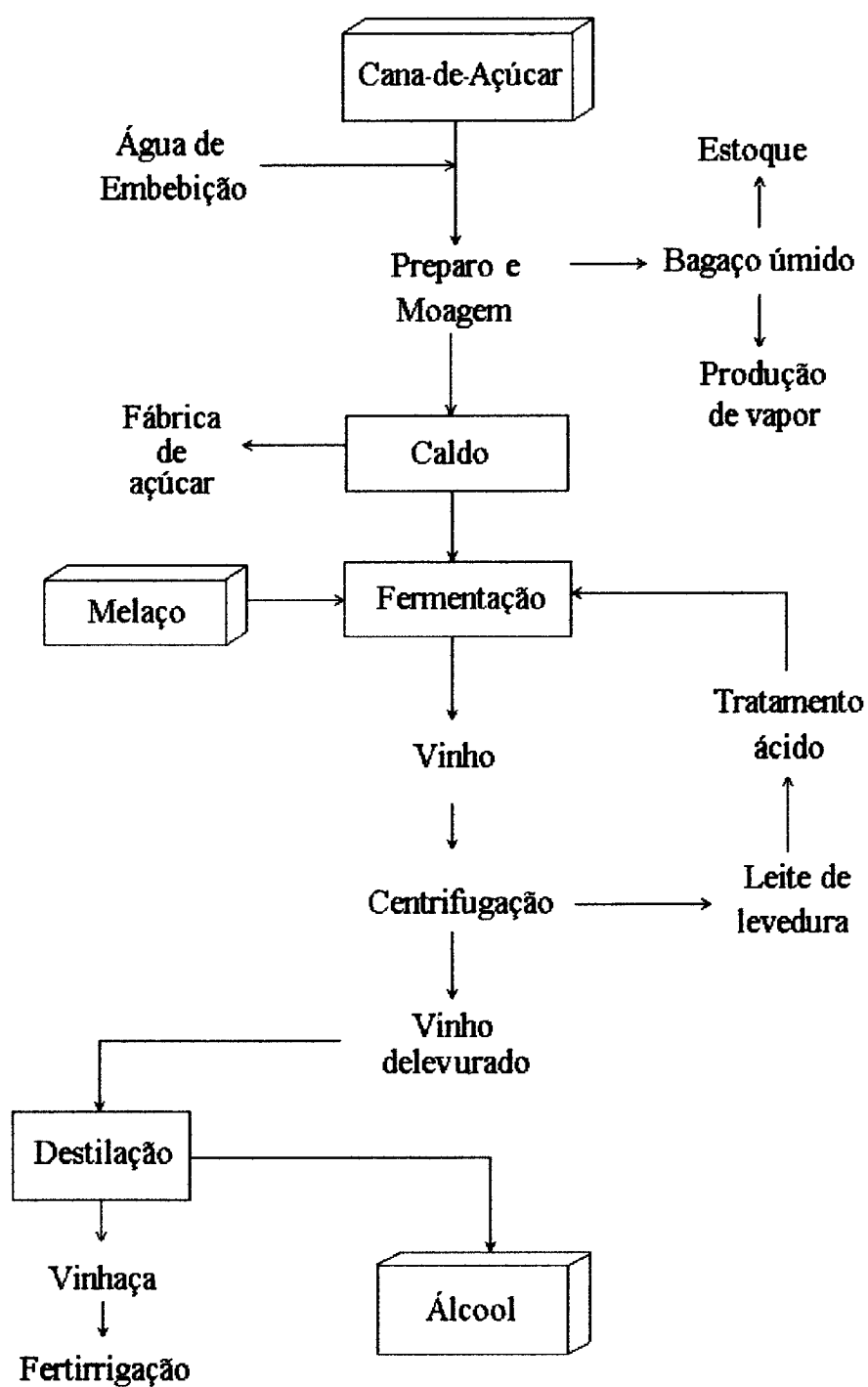


Figura 2. Fluxograma de fabricação de álcool.

Fonte: Guerreiro (1995).

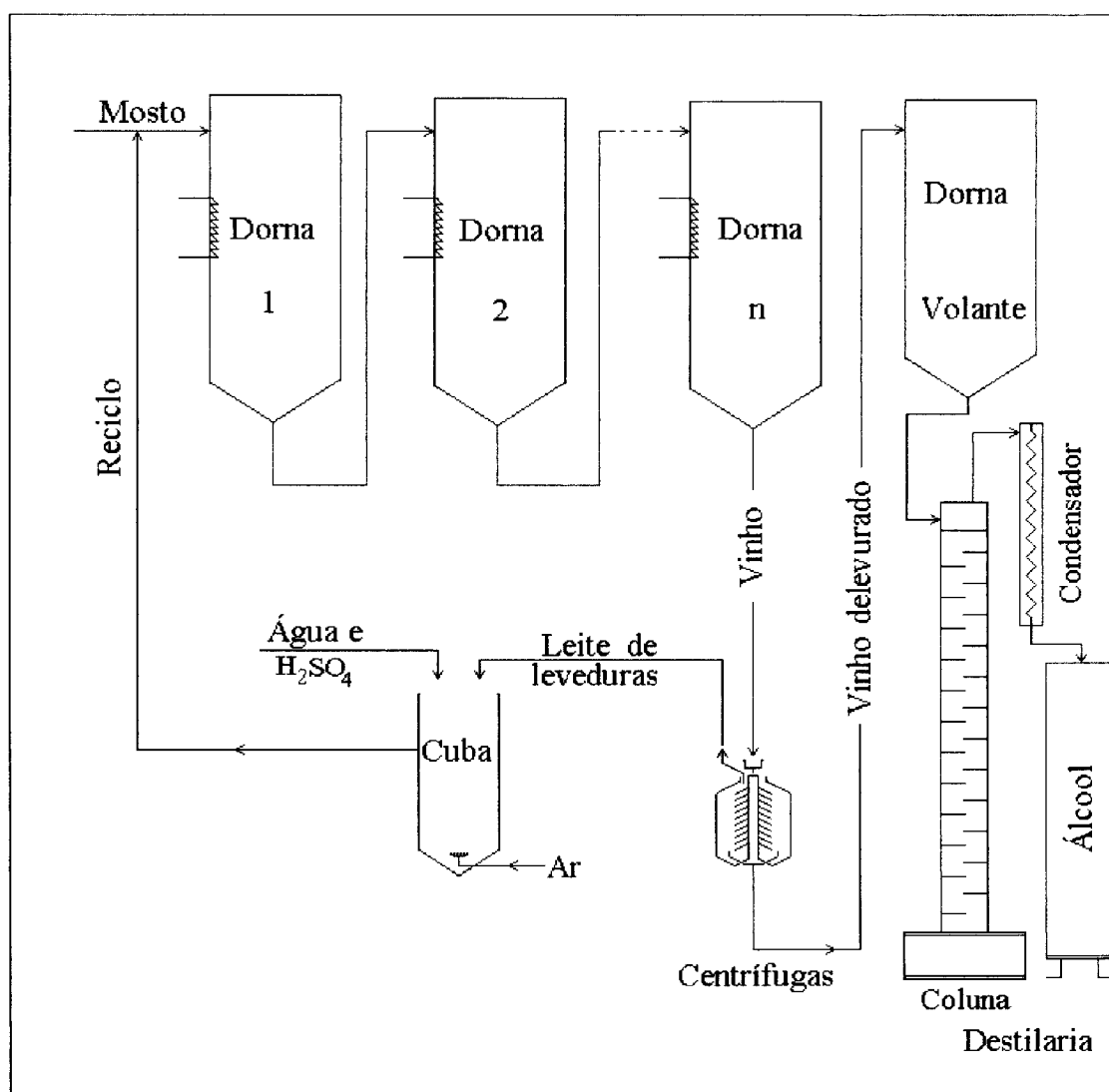


Figura 3. Processo contínuo de fermentação alcoólica.

Fonte: Andrietta (1997).

2.1.2.1. Evolução do processo de fermentação alcoólica contínua

A) Recentrifugação do fermento

A recentrifugação do fermento, visa diminuir a quantidade de metabólitos reciclados ao processo, pois com a recentrifugação é possível promover uma lavagem do

fermento diminuindo a quantidade de vinho que retorna ao processo junto com o leite de levedura.

Dentre as vantagens desta técnica, pode se destacar a menor acidez no fermento devido ao baixo consumo de ácido, o que evita danos às células e proporciona maior velocidade de fermentação devido a menor quantidade de etanol e outros metabólitos reciclados. Como desvantagens estão o maior consumo de energia devido maior número de centrifugas e maior custo de manutenção e dificuldade de operação (Andrietta, 1997).

B) Decantadores para separação de células

Para seu funcionamento é necessário a utilização de linhagens de leveduras floculantes. A dinâmica desse processo é lenta e afeta as células pela exposição ao álcool.

Esta técnica também apresenta vantagens como o baixo custo de instalação, operação e manutenção, baixo consumo de energia e facilidade de operação. No entanto a dinâmica do processo é lenta e apresenta baixa estabilidade (Andrietta, 1997).

2.2. MELAÇO

A utilização do melaço como substrato fermentativo na indústria alcooleira brasileira é tradicional. Com relação aos seus componentes, alguns servem como nutriente sendo fator de crescimento para as leveduras como o inositol, ácido pantotênico e biotina (Ramm-Schmidt, 1988). Também são úteis para a levedura, magnésio, cálcio, zinco, manganês, ferro, cobre, molibdênio, cobalto e boro. Porém, nem todos os seus constituintes são benéficos para o processo como o alumínio, mercúrio, chumbo, estanho, sódio, lítio, flúor, ouro, prata, cádmio, paládio, ósmio, cromo, tório, urânio, vanádio (Amorim, 1996). Outro fator prejudicial é a decantação de substâncias não

fermentescíveis nas dornas (Ramm-Schmidt, 1988).

A atuação de alguns elementos como o potássio, depende de sua concentração no substrato. Como esse componente é abundante no melaço, representando cerca de 35% do conteúdo salino, a produção de etanol pode ser dificultada. O melaço usado em fermentação alcoólica é diluído a 28° Brix atingindo valores médios de potássio em torno de 15000 ppm. Em concentrações adequadas, o potássio pode favorecer a fermentação, participando como ativador enzimático das reações de glicólise, estabilizador de membranas, controlador do pH intracelular, aumentando tolerância ao íon H^+ , ativador da absorção de zinco e cobalto (Amorim, 1996). Segundo Johnson & Lefebvre (1988) sua presença é considerada útil em valores de até 120 ppm, ocorrendo inibição com 400 ppm.

A remoção do potássio pode ser realizada pelas técnicas de osmose reversa, eletrodíálise ou troca iônica, sendo a osmose reversa a de menor custo operacional. O aumento na eficiência fermentativa por essa técnica chega a 10%, significando um lucro de doze dólares por tonelada. Como o custo por tonelada de melaço clarificado e dessalinizado chega a 5 dólares, considerando-se uma vida útil da membrana em torno de 200 horas e capacidade produtiva de 200 toneladas/dia, o lucro pode ser de 7 dólares para cada tonelada produzida (Johnson & Lefebvre, 1988).

O controle do processo fermentativo, assim como sua otimização, tem sido objeto de vários estudos. Bose & Ghose (1973), avaliaram a influência da uréia e do fosfato como suplemento nutricional do melaço durante fermentação em batelada. Com esse processo o autor obteve 43% em álcool baseados no total de açúcar inicial com 91% de conversão do açúcar em álcool em 14 horas de fermentação. Com respeito a cinética fermentativa, Borzani *et al.* (1993) avaliaram a correlação entre o tempo necessário para a completa fermentação e a concentração inicial de açúcar e células de levedura, utilizando também o melaço na fermentação em batelada, concluindo que a relação entre esses dois últimos parâmetros é exponencial.

O melaço, subproduto obtido durante a fabricação do açúcar, concentra todas as

impurezas solúveis provenientes do caldo de cana (Figura 1). Nas centrífugas, após injeção de água e vapor obtém-se os chamados mel pobre e rico, respectivamente. Esses méis são retornados ao cozedor para extração de mais sacarose. Esse retorno ao processo e posterior centrifugação gera um mel inferior, que é conhecido por mel final ou melaço, considerado um xarope residual de onde não mais é viável a extração de sacarose.

A produção anual mundial de melaço de beterraba e de cana de açúcar em 1987 foi de 37 milhões de toneladas. Setenta por cento dele foi utilizado como suplemento de carboidratos para a indústria de ração animal (Johnson, 1984), e o restante como substrato de fermentação para obtenção de dezenas de produtos como o ácido cítrico, ácido acético, acetona, dextrana, rum, glicerol, goma xantana, glutamato monossódico e etanol (Johnson & Lefebvre, 1988).

Vários autores apresentam os constituintes do melaço, conforme pode-se observar na Figura 4 e Tabela 1.

Com referência aos constituintes do melaço de cana-de-açúcar descritos na Figura 4 e Tabela 1, podemos observar que a quantidade de açúcares redutores é bastante considerável e que os valores analíticos oscilam. Atribui-se essa variação às diferenças existentes entre as variedades de plantas e a fatores edafo-climáticos.

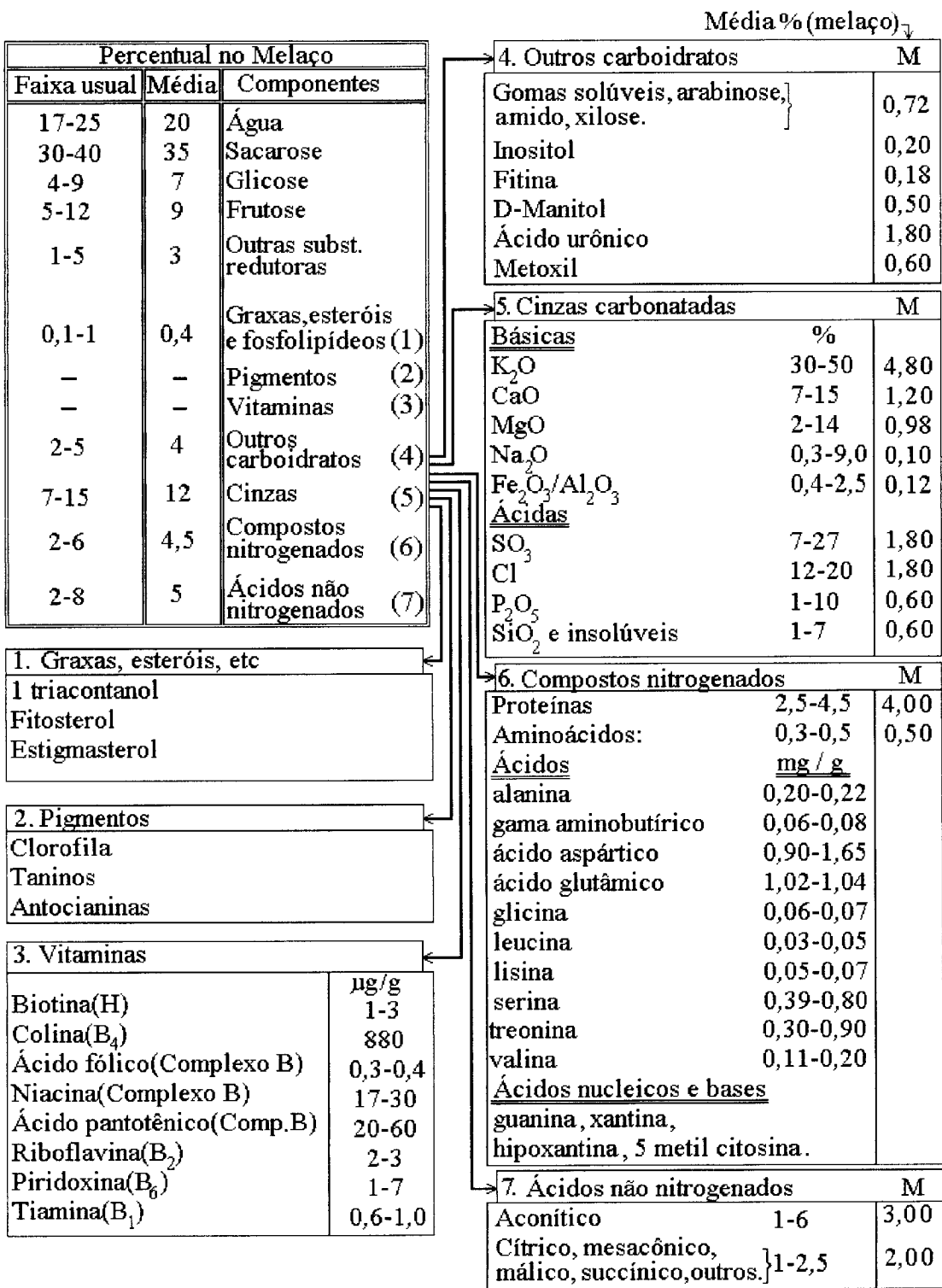


Figura 4. Constituintes do melaço de cana-de-açúcar
Fonte: Binkley & Wolfrom (1953)

Tabela 1. Constituintes do melaço de cana-de-açúcar.

<i>Componentes</i>	<i>Percentual</i>
1. Água	20
2. Compostos orgânicos	72
2.1. Açúcares	62
Sacarose	32
Glicose	14
Frutose	16
2.2. Não açúcares	10
Matérias nitrogenadas	
Ácidos livres e combinados	
Substâncias gomosas solúveis	
3. Compostos inorgânicos	4
CaO	1,5
MgO	0,1
P ₂ O ₅	0,2
SO ₃	1,6
Fe ₂ O ₃ , Na ₂ O, Al ₂ O ₃	0,2
Cloretos	0,4

Fonte : Olbrich (1960); Olbrich (1974).

2.3. ANÁLISE DE CARBOIDRATOS

A literatura científica sobre metodologia analítica para determinação de carboidratos é bastante extensa. Inúmeras referências podem ser encontradas na literatura, desde as pioneiras publicadas no início deste século, bem como as mais recentes encontradas em revistas especializadas no assunto.

Dos muitos métodos, podemos mencionar o colorimétrico do ácido dinitrossalicílico (Miller, 1959), o de oxirredutimetria de Lane e Eynon ou de Fehling (Lane & Eynon, 1934), o enzimático, o polarimétrico, o da cintilação líquida baseado no uso de isótopos radioativos e o cromatográfico (Thompson, s.d.; Neuburger & Johnson, 1987; Olechno *et al.*, 1987; Tsang *et al.*, 1988; Robinett & Herber, 1994).

A determinação de carboidratos em melaços tem sido uma das tarefas mais desafiadoras para os analistas em vista do grande número de interferentes presentes nos mesmos.

A introdução da cromatografia líquida de alta eficiência no início dos anos setenta trouxe um entusiasmo renovado quanto a esse problema, porém nunca alcançou o potencial máximo na indústria do açúcar. Parte da baixa aceitação deve-se à boa precisão e reprodutibilidade de muitos outros métodos propostos.

2.3.1. Polarimetria

Tradicionalmente os açúcares são determinados por meio do polarímetro, tipicamente conhecido por sacarímetro (Melo *et al.*, 1985; Araújo, 1994; Trott, 1994). Para Schäffler (1990) a técnica caracteriza-se por ser barata, de fácil execução, com preparo simples das amostras, porém podendo fornecer valores de leitura sacarimétrica (Pol) alterados em função da necessidade de clarificação de algumas amostras que

apresentam turbidez em solução.

As soluções claras e incolores de açúcares de alta pureza e os materiais de processo de refinação não apresentam nenhum problema em suas análises sendo extremamente reprodutíveis. Entretanto, como a grande maioria dos produtos da indústria açucareira é turba e, às vezes, escura como o melaço, somada à presença de impurezas óticamente ativas, levam a uma série de erros, não fornecendo informações a respeito de constituintes primários como glicose e frutose (Thompson, s.d; Vignes, 1975).

Pouco depois da origem da polarimetria, descobriu-se que com a adição de subacetato de chumbo, seco ou em solução, seguido de filtração, conseguia-se uma eficaz eliminação da turbidez e cor nas soluções impuras. Recentemente, a crescente preocupação com a saúde e com os riscos ambientais inerentes a seu uso, buscou-se novas técnicas onde são empregados reativos alternativos e atóxicos, através de várias combinações de sais de alumínio, cal e carvão ativado (Trott, 1994).

Desde 1982, os laboratórios substituíram o uso de compostos de chumbo pela combinação de resinas aniônicas e carvão ativado para descoloração de amostras de açúcar. Para a realização da leitura por esse tratamento é necessário uma filtração em membrana, pois o filtrado fica levemente turvo, tornando assim a técnica mais cara.

Os compostos de alumínio têm sido usados como agentes clarificantes e não são tóxicos, porém são incapazes de clarificar eficientemente os caldos se não estiverem em mistura com outros agentes. Em mistura, esses compostos mostram-se eficientes, sendo que a pureza aparente é um pouco inferior à obtida com subacetato de chumbo, necessitando de correções através de fórmulas bastante simples. Cloreto de alumínio hexahidratado, hidróxido de cálcio e celite (terra diatomácea - adjuvante de filtração) quando empregados como clarificante para caldos, tiveram resultados satisfatórios. A reação dessa mistura forma o hidróxido de alumínio e a velocidade de filtração da

amostra é semelhante ao material tratado com subacetato de chumbo (Lew, 1986).

Excluindo as dextranas, os valores de rotação específica da maioria dos polissacarídeos associados à cana-de-açúcar, não são demasiados dextrorrotatórios ou levorrotatórios. Eles não devem portanto afetar a leitura de Pol, a não ser em concentrações elevadas.

As dextranas entretanto, são altamente dextrorrotatórias com rotação específica maior ou igual a $+200^\circ$. Esse valor é pelo menos três vezes o da sacarose ($+66,54^\circ$) e pode alterar valores de Pol. A polarização de amostras contendo dextranas, após clarificação com nitrato de chumbo não mostrou valores aumentados, enquanto que com subacetato de chumbo os valores se alteraram (Kitchen, 1988).

Estudos de clarificação com subacetato de chumbo mostraram que seu uso elimina dextranas acima de 40000 Daltons, chamadas de dextranas de alto peso molecular, mas não remove as de 10000 Daltons ou de baixo peso molecular, afetando consideravelmente valores de Pol (Kitchen, 1988).

Abeydeera (1983) cita que os métodos oficiais e clássicos comumente usados na indústria açucareira para determinação de sacarose e açúcares redutores, têm sido satisfatórios apesar de suas limitações, e que as determinações tradicionais como polarimetria e métodos de redução química sofrem interferência de muitos outros compostos, sendo incapazes de diferenciar açúcares redutores totais de glicose e frutose.

Schiweck & Steinle (1988) confirmaram a presença de substâncias opticamente ativas em solução, além da sacarose, como a rafinose, glicose, frutose, arabinose, aminoácidos e fragmentos de pectina.

Alguns dados comparativos entre a CLAE e a Polarimetria, tais como a preparação da amostra e a interferência causada por compostos não açúcares, estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 . Comparação da sensibilidade e tratamento da amostra entre as técnicas cromatográfica e polarimétrica

Cromatografia líquida – CLAE	Polarimetria
• Os açúcares da amostra são separados, permitindo o doseamento individual. • Constituintes da amostra, açúcares ou não, não interferem na análise se as condições operacionais adequadas forem usadas. • A preparação da amostra é simples e não envolve pré-tratamentos para limpeza. • Não requer pré tratamento químico ou derivatização. A identidade da amostra é preservada.	• Determina os compostos com atividade ótica (açúcares e não açúcares) sem individualização das substâncias. • Sais inorgânicos e outros açúcares podem modificar a rotação ótica. • Preparação da amostra é geralmente acompanhada por diluição, precipitação, filtração, sendo fontes de erro para estimativa final. • Os ácidos usados na inversão podem hidrolisar sacarídeos de maior peso molecular, alterando o resultado.

Fonte: Abeydeera (1983)

2.3.2. Oxirredutimetria

A técnica de oxirredutimetria é usualmente utilizada na análise de açúcares e seus derivados em geral (Lane & Eynon, 1934; Johnson, 1984). Seu uso está baseado na redução a quente do cobre bivalente na presença de soluções alcalinas de sais como o tartarato duplo de sódio e potássio ou ferricianeto de potássio, por substâncias denominadas redutoras por apresentarem grupamentos aldeídicos ou cetônicos em suas

moléculas. O protóxido de cobre formado na reação com o tartarato produz um complexo solúvel que é analisado através da titulação. O azul de metileno é utilizado como indicador, pois ele tem cor azul em meio oxidante e torna-se incolor quando reduzido (Horii & Gonçalves, 1991).

Esses métodos apresentam objeções porque raramente a redução é completa, mas sob as mesmas condições a quantidade de cobre reduzida é proporcional à quantidade de açúcares redutores presentes.

Segundo Oliveira (1968) 2 moles de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ equivalem, estequiometricamente, a 1 mol de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ na forma aldose e 12 moles de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ equivalem a 1 mol de $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ na forma cetose. Na oxirredutimetria, um valor médio de equivalência entre o sulfato de cobre e o açúcar redutor (glicose) é utilizado para os cálculos, ou seja, 5 moles de sulfato de cobre para cada mol de glicose. O cálculo com o uso do valor médio leva a erros, uma vez que nas amostras as formas aldose e cetose encontram-se em proporções variadas.

Baseado nessas observações diversos autores afirmam que o poder redutor com relação ao Cu^{++} é variável em função do monossacarídeo, podendo ainda variar para um mesmo monossacarídeo. Porém, é inevitável que o cálculo seja feito dessa maneira nas usinas pois é inexequível avaliar um grande número de amostras em sua composição de aldoses e cetoses.

A rapidez na execução desse método pôde ser melhorada com o aparecimento do Redutec (Fermentec[®]) em 1983, que presta-se à análise de soluções claras contendo de 0,08 a 0,13% de açúcares redutores (Horii & Gonçalves, 1991).

Outras adaptações ao método surgiram. A inversão da sacarose, por exemplo, pode ser realizada com o uso de um forno microondas que reduz sensivelmente o tempo de hidrólise, passando de quarenta minutos para um minuto. Além disso um eletrodo de oxi-redução apresenta uma série de vantagens em relação ao uso do indicador, tornando

desnecessária a titulação prévia das amostras, viabilizando seu uso para amostras escuras e coloridas, possibilitando a automação e obtenção de resultados mais precisos, pois não depende da interpretação do analista para a viragem (Zago *et al.*, 1992).

A técnica de Lane & Eynon apresenta valores maiores de concentração de açúcares redutores quando comparada com determinações de glicose e frutose por CLAE (Damon & Pettitt, 1980, Abeydeera, 1983). Keskar & Kolekar (1995), Melo *et al.* (1987) e Rajakylä & Paloposki (1983) demonstraram que existem diferenças entre as técnicas. No estudo de Rajakylä & Paloposki (1983) verificou-se diferenças que variaram de 2 a 4%.

A presença de impurezas orgânicas e inorgânicas promovem a redução do cobre, sendo conseqüentemente determinadas juntamente com os açúcares redutores pelo método de Lane & Eynon. Outros açúcares redutores produzidos durante a ebulição da amostra como psicose e manose, podem contribuir para discrepâncias encontradas na determinação de açúcares redutores pelo método clássico (Abeydeera, 1983).

A inversão de amostras para determinação de ART por oxirredutimetria pode superestimar os resultados, caso haja inversão de polissacarídeos como é o caso do amido (Sier, *snt.*).

2.3.3. Cromatografia

Várias técnicas citadas por Olechno *et al.* (1987) podem ser usadas para o controle químico de carboidratos, como a cromatografia em papel que caracteriza-se pelo baixo custo, porém sendo demorada até mesmo para monossacarídeos simples, levando de horas até dias para sua completa eluição. A cromatografia em camada delgada é sensível, mas de difícil quantificação e de resolução limitada. A de permeação em gel com colunas abertas ou sob pressão são úteis para separar carboidratos de estruturas

semelhantes. A cromatografia de afinidade por imobilização com o uso de lecitinas, a de fase normal com celulose ou carvão em mistura, a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência são também outras técnicas empregadas para esse fim.

2.3.3.1. Cromatografia Gasosa

Historicamente a cromatografia gasosa (CG) foi amplamente usada para análise de açúcares. Na CG é necessário a formação de derivados voláteis, sendo esta a maior fonte de erros para a referida técnica (Borges *et al.*, 1984; Makee *et al.*, 1985; Neuburger & Johnson, 1987; Olechno *et al.*, 1987; Hardy *et al.* 1988; Tsang *et al.*, 1988). Segundo Olechno *et al.* (1987) os reagentes para derivatização (silinização) são caros, tóxicos e lábeis e a amostra deve ser tratada preliminarmente para eliminação de proteínas e sais. A derivatização leva à formação de picos mal resolvidos e pode formar derivados instáveis em amostras com grande quantidade de água (Hoi, 1980).

Pelas dificuldades encontradas com a derivatização e pelo maior consumo de tempo, a técnica tornou-se ultrapassada. Além disso seu custo fez com que as indústrias tivessem protelado sua aceitação (Wong-Chong & Martin, 1979a).

A quantificação é também complicada em alguns casos, pelo fato de promover a separação de pares anoméricos como por exemplo o α - e o β -glicose que devem ter seus valores somados (Birch, 1973).

Para esta técnica pode-se utilizar detectores como o de ionização em chama (DIC) que tem tendência destrutiva, e o de captura de elétrons (DCE) que necessita de reagentes halogenados para a derivatização.

2.3.3.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O aparecimento da técnica de CLAE, por volta de 1970, possibilitou um desenvolvimento na análise de carboidratos. O método não requer vaporização da amostra como a cromatografia gasosa, portanto não ocorre a degradação térmica dos componentes. O uso de colunas de fase normal quimicamente ligada com grupamento amino, deram resultados imprecisos para açúcares redutores (Dionex, snt b). Por esse método, as colunas podem sofrer deterioração devido à reações do grupo aminocarbonil, formando bases de Schiff e necessitando assim de uma regular regeneração da coluna (Pirisino, 1984).

Vários autores (Yang *et al.*, 1981; Shaw & Wilson, 1983; Borges *et al.*, 1984; Melo *et al.*, 1986) estudaram o uso de colunas amino, comparando a detecção pelo uso do detector de ultra-violeta (DUV) em comprimento de onda de 190 nm, e do detector de índice de refração (DIR), concluindo que para amostras submetidas à análise e detecção por UV era necessário uma purificação prévia para posterior injeção. De acordo com Shaw & Wilson (1983) com o uso do DIR a purificação prévia da amostra não era necessária, porém a sensibilidade era bastante inferior ao UV em cerca de sete vezes no caso de glicose e sacarose e vinte e cinco vezes no caso da frutose.

Devido ao fato dos carboidratos não possuírem grupamentos cromóforos, sua absorção na região do ultra-violeta é quase zero. Caso a derivatização para formação de tais grupos seja incompleta, pode ocorrer a formação de múltiplos picos que dificultam a interpretação dos resultados (Olechno *et al.*, 1987). Desta forma, convencionou-se o uso do DIR para os açúcares (Rajakylä, 1986; White Jr & Widmer 1990). Segundo Scobell *et al.* (1977) a análise com este detector é apropriada para uma variada gama de produtos açucarados, sendo bastante rápida. Uma de suas desvantagens é o fato de não permitir a eluição com gradiente, comprometendo assim a resolução dos picos. Como solução a este problema, a derivatização pós-coluna foi estudada por alguns autores (Herber &

Robinett, 1994).

Muitas reações pós coluna têm sido empregadas na detecção de açúcares a fim de melhorar a sensibilidade da análise. O uso de reações colorimétricas e fluorimétricas como alternativa aos métodos de detecção clássicos foram objeto de alguns estudos. As vantagens do uso de cianoacetamida em reação pós coluna para melhoria da sensibilidade e da estabilidade da linha de base, é citado por Schlabach & Robinson (1983), que descrevem-na como sendo uma técnica compatível com vários tipos de colunas.

Wight & Niekerk (1983) e Wnukowski (1984) empregaram um sistema em fase normal em coluna amino com reação pós coluna, usando azul de tetrazol e detecção por UV, verificando um aumento na sensibilidade e no limite de detecção de açúcares.

2.3.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Troca Iônica

A análise cromatográfica de açúcares teve grande progresso com a cromatografia líquida de alta eficiência de troca iônica (CLAE-TI), onde a resolução dos picos é dependente do pH do eluente e da temperatura. Resinas de troca catiônica com ligações cruzadas, do tipo poliestireno e divinil benzeno (PS-DVB) e água como eluente, são amplamente usadas e bons resultados são obtidos quando amostras de melaço são submetidas a tratamentos prévios para proteção da coluna, propiciando uma linha de base mais estável e uma melhor resolução dos picos. Técnicas de limpeza como a filtração, a centrifugação, o uso de pré colunas, o uso da extração em fase sólida, como por exemplo cartuchos do tipo Sep-Pak[®] - C 18 (Waters) ou cartuchos de troca iônica são freqüentemente citados na literatura. O uso de cartuchos de troca iônica remove todos os interferentes iônicos, incluindo ácidos orgânicos, resultando num cromatograma com menos impurezas quando comparado ao obtido por outras técnicas (Nomura *et al.*, 1984).

A grande dificuldade da análise por CLAE-TI, ocorre quando os açúcares redutores estão presentes em pequenas quantidades em relação à sacarose. Como resultado tem-se um largo pico de sacarose que se sobrepõe ao da glicose, dificultando a interpretação dos cromatogramas e conseqüentemente sua quantificação (Abeydeera, 1983).

Com o avanço dessa técnica as colunas tornaram-se um instrumento prático de controle para açúcares em vários produtos, devido sua alta capacidade regenerativa e portanto vida útil maior (Clarke & Tsang, 1984).

Em seqüência às inovações surgiram as colunas trocadoras de ânions. Elas possuem grupamentos cátions e são conhecidas por colunas aniônicas. Essa cromatografia é denominada cromatografia líquida de alta eficiência de troca aniônica (CLAE-TA) e tem sido usada em diferentes formas iônicas como K^{+1} , Ca^{+2} , Na^{+1} , Ag^{+1} , La^{+3} e Rb^{+1} associado com Ca^{+2} (Goulding ¹ citado em Makkee, 1985). Sua performance depende da eliminação de impurezas orgânicas e inorgânicas, incluindo dextranas de menor peso molecular, que interferem com o pico da sacarose.

Rajakylä & Paloposki (1983) citam o uso da coluna de troca aniônica na forma sódica e com um tratamento bastante simples através da filtração da amostra em membrana 0,22 μm , antes da injeção. Wong-Chong & Martin (1979b) obtiveram boa resolução entre os picos de sacarose e açúcares redutores com o uso de coluna na forma de potássio.

Verhaar & Kuster (1981) conseguiram uma melhor separação entre sacarose, glicose e frutose num tempo de análise inferior, pela adição de trietilamina ao eluente, usando uma coluna de resina na forma de cálcio. O uso da trietilamina altera o valor da constante de equilíbrio das diferentes formas isoméricas (mutarrotação) dos açúcares redutores, resultando no estreitamento da base dos picos.

¹GOULDING, R. W. Liquid chromatography of sugars and related polyhydric alcohols on cation exchangers. The effect of cation variation. **Journal of Chromatography A**, v.103, p. 229-239, 1975.

No início dos anos oitenta o mercado de equipamentos cromatográficos passou a oferecer colunas de troca aniônica para separação de mono, oligo e polissacarídeos. Um exemplo é a coluna CarboPac[®] (Dionex), bastante eficiente para separação de glicose, frutose e sacarose. Essa coluna é empacotada com uma resina polimérica, não porosa, que é estável em pH de 0 a 14, possuindo rápida transferência de massa e excelente estabilidade mecânica, suportando pressão igual ou superior a 4000 psi (Dionex, snt a)

O aparecimento do detector de triplo pulso amperométrico (DPA) possibilitou a detecção de carboidratos sem a necessidade de derivatização das amostras. Essa técnica permite a quantificação dos açúcares a níveis inferiores a dez picomol, e esta alta sensibilidade é justificada pelo fato dos carboidratos serem eletroativos em solução aquosa alcalina, podendo ser detectados em condições seletivas (White Jr & Widmer, 1990; Lewis & Schäfler, 1992). O comportamento dos carboidratos pode ser comparado ao dos álcoois, pois ionizam-se em pH elevado, sendo que o grau de acidez de cada grupo hidroxila depende dos grupamentos vizinhos. Desta forma os diferentes açúcares possuirão diferentes graus de dissociação com relação ao pH utilizado, possibilitando a separação seletiva (Lewis & Schäfler, 1992)

Esse tipo de técnica tem sido bastante utilizada para carboidratos de caráter ácido, porém uma avaliação dos valores de pKas de açúcares neutros (12 a 14), mostram que de fato eles são ácidos fracos e que são ionizados parcialmente em pH em torno de 12. Esse é um artifício que não pode ser realizado em análises que utilizem colunas do tipo clássica com sílica quimicamente ligada, pois as colunas teriam suas matrizes dissolvidas pela excessiva alcalinidade do eluente (Dionex, snt a).

O detector eletroquímico pulsado para monitoramento de separações cromatográficas de açúcares, surgiu em 1983. A aplicação de seqüências repetidas de pulsos voltagem por períodos específicos é a base de seu funcionamento. Nele, os carboidratos podem ser detectados na superfície de um eletrodo de ouro, após oxidação (Lee, 1990; Lewis & Schäfler, 1992).

O ciclo de funcionamento do detector DPA está ilustrado na Figura 5.

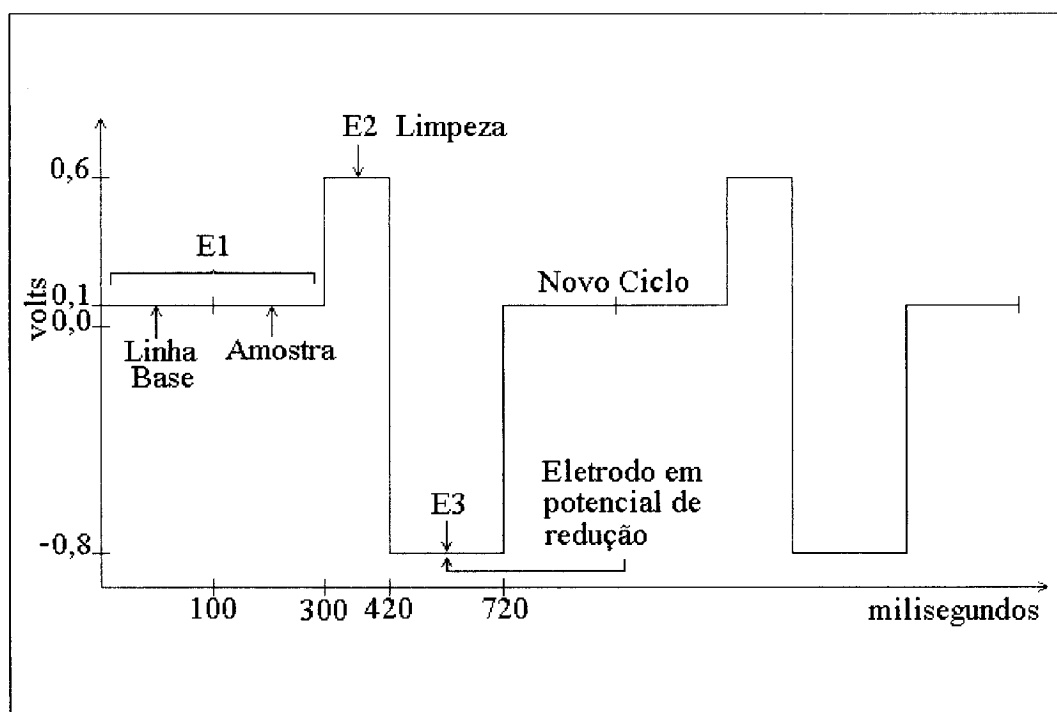


Figura 5. Diferentes etapas voltagens do detector de pulso amperométrico.

Fonte: Olechno *et al* (1987).

Na Figura 5 observam-se três etapas de distintos valores voltagem, denominadas E 1, E 2 e E 3. O ciclo inicia-se com a manutenção da linha base através de uma pequena voltagem, chamada de potencial analítico. Durante esta etapa, após injeção da amostra, verifica-se sua oxidação na superfície do eletrodo, em níveis menores que 1%. A corrente gerada pela oxidação da amostra é monitorada. Posteriormente, o potencial do eletrodo de trabalho é aumentado por uma alta voltagem com a finalidade de eliminar a amostra oxidada em sua superfície. Esta etapa é a chamada limpeza, devendo ser de alta e longa voltagem, entretanto não deve ser demasiadamente alta para não diminuir a vida útil do eletrodo.

A seqüência de pulsos prossegue pela aplicação de outro forte pulso denominado E 3, desta vez de potencial redutor, com a finalidade de retornar a camada superficial de óxido áurico ao estado inicial, mantendo seu equilíbrio. (Edwards *et al.*, 1986; Edwards *et al.*, 1987; Neuburger & Johnson, 1987; Townsend *et al.*, 1988; La Course & Johnson, 1991). Nessa etapa e nas subseqüentes, o sinal não é monitorado e a seqüência completa do pulso ocorre em menos de um segundo. Um novo ciclo inicia-se com a volta do potencial ao nível analítico, onde verifica-se a estabilidade da linha base.

A ocorrência de uma camada não condutiva pode causar distúrbios na linha base gerando ruídos, porém a limpeza manual do eletrodo por polimento, a qual não precisa ser freqüente, resolve este problema. O DPA funciona pela medida de corrente elétrica podendo ter leituras em ampéres ou coulombs.

Rochlin & Pohl (1983) combinaram o DPA com o uso da CLAE-TA, demonstrando sua alta seletividade e sensibilidade para amostras contendo monossacarídeos, dissacarídeos, oligossacarídeos e misturas complexas. O método é simples e não requer preparo da amostra, somente diluição e filtração. Em vista do grande número de interferentes na maioria das amostras de usinas de açúcar, o uso do DIR ou do DUV torna-se ultrapassado quando comparado com o DPA.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A execução dos experimentos deste projeto foi realizada em duas etapas, sendo a primeira de caracterização das amostras de melaço através de análises físico-químicas e a segunda referente às análises do mosto e do vinho.

3.1. MATERIAL

3.1.1. Matéria-Prima

Melaço de cana-de-açúcar fornecido pelas usinas Trapiche (Sirinhaém-PE), Bonfim (Jaboticabal-SP), Tamoio (Araraquara-SP) e Diamante (Jaú-SP).

3.1.2. Microrganismo

Saccharomyces cerevisiae, isolada do processo fermentativo da Usina Clealco (SP), cedida pelo laboratório de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas (CPQBA), da Unicamp. A linhagem foi escolhida por tratar-se de uma levedura utilizada a partir da safra de 95 e que permanece no processo até a safra atual.

3.1.3 Mosto

O mosto empregado nos testes fermentativos foi obtido pela diluição do melaço de cana-de-açúcar em água destilada. Como o valor de ART empregado nas usinas é de

150 g de ART/L (Rossel, 1988; Andrietta, 1997), utilizou-se esse valor como referência e mais duas concentrações, de 120 e 180 g de ART/L.

Os experimentos foram realizados em triplicata e uma 4ª repetição foi reservada para determinação das condições iniciais de acidez e ART. A diluição dos melaços foi definida com base no teor de ART obtido por CLAE na matéria-prima.

Para efeito de controle das fermentações foi introduzido em cada ensaio, um frasco contendo um meio de cultivo sintético padrão, com a seguinte composição (g/L): Sacarose 150; KH₂PO₄ 5; NH₄Cl 5; MgSO₄ .7 H₂O 1; Extrato de levedura 6; Água destilada qsp e pH 6 (Rodrigues & Andrietta, 1996).

3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.2.1. Análises do Melaço

3.2.1.1 Determinação de ART pelo método de Fehling

Foi realizado pela metodologia descrita em Copersucar (1987), baseada no método titulométrico de Lane & Eynon (1934), que emprega as soluções de sulfato de cobre (CuSO₄) e de tartarato duplo de sódio e potássio em meio básico (KNaC₄H₄O₅/NaOH) e solução de azul de metileno como indicador.

A reação entre os íons cobre e os açúcares redutores (AR), ocorre segundo a equação:



O tartarato duplo de sódio e potássio (Sal de Rochelle ou Seignette) forma ligações eletrostáticas com o cobre, mantendo os íons em solução.



O precipitado óxido cuproso, auxilia no ponto de viragem, pela sua coloração característica vermelho tijolo.

Para a determinação de ART, a sacarose foi hidrolisada pela ação do ácido sulfúrico (inversão ácida) e aquecimento a 45° C, e os resultados calculados como g de

glicose/100g de melaço. A amostra diluída é titulada à quente, pela adição desta solução a uma solução básica padronizada de sulfato de cobre.

3.2.1.2 Determinação de ART pelo método de CLAE-TA/CarboPac-DPA

Foi realizada em cromatógrafo líquido de alta eficiência Dionex modelo DX 300, em associação com DPA e eletrodo de ouro, e integrador Dionex modelo 4400. Para as separações, utilizou-se coluna (250x4mm) e pré coluna (4x50mm) Dionex CarboPac-PA1 de troca aniônica e solução aquosa de hidróxido de sódio 150 mM como eluente, na vazão de 1 mL/min e volume de injeção da amostra de 50 µL. Utilizou-se solução de hidróxido de sódio 50% (Fischer®), com baixo teor de carbonato, para a preparação do eluente. O carbonato, mesmo em traços, pode ocasionar perda de eficiência e resolução da coluna, porém em solução concentrada ele mantém-se precipitado.

O eluente foi preparado com água deionizada Nanopure Barnstead® modelo D 4744, isenta de CO₂ e contaminantes microbianos, com baixa resistividade (18 mΩ) e filtrado sob vácuo em filtro de náilon 0,2µ na unidade de filtração Millipore®. Em seguida o eluente foi degaseificado com hélio durante 15 minutos.

A sequência de tempos e potenciais empregada no detector DPA foi selecionada a partir da literatura e seus valores estão descritos na Tabela 3.

Uma curva de calibragem para os açúcares glicose, frutose e sacarose em mistura (p/v), preparada no dia do uso, foi injetada em duplicata ou até obtenção de valores com 97% de concordância.

As amostras e os padrões foram diluídos em água Nanopure e filtradas em filtros 0,45µ para posterior injeção. Todas as amostras foram mantidas em congelador até o momento da análise. Os procedimentos descritos foram realizados de acordo com a metodologia descrita em Dionex (snt a). Os resultados obtidos foram calculados como g de glicose/100 g de melaço.

Tabela 3. Seqüência do DPA na análise de glicose, frutose e sacarose

	Fases da seqüência					
	1	2	3	4	5	6
Tempo em ms	0	500	510	590	600	650
Potencial em volts	0,4	0,4	0,9	0,9	- 0,3	- 0,3

Fonte: Dionex (snt b)

3.2.1.3. Polarimetria

Foi realizada em sacarímetro Rudolph Research Fairfield, modelo PDA 8200. As amostras foram clarificadas segundo metodologia Copersucar (1987), adaptada da literatura (Lew, 1986), substituindo-se o subacetato de chumbo pelo hidróxido de alumínio.

Devido a substituição do subacetato, foi necessária a correção dos valores obtidos, o que foi feito segundo a norma da Associação de Fornecedores de Cana do Estado de São Paulo (Comissão Regional de Pagamento de Cana pelo Teor de Sacarose e Pureza), que emprega para melaços a seguinte fórmula:

$$L_c = 1,0078 * L_{AICB} + 0,0444$$

onde:

L_{AICB} é a leitura obtida e L_c é a leitura corrigida.

A calibragem do aparelho foi feita com prisma Winkel-Zeiss-Gottinger, padronizada com o valor 97,43°S a 20°C.

Foi utilizado tubo contínuo de Pellet com 200 mm de comprimento, que é recomendado para o controle industrial nas Usinas de açúcar, pois permite a troca rápida das soluções no sacarímetro. Os resultados foram expressos em °S/100 g de melaço.

3.2.1.4. Determinação do Brix Refratométrico

Foi realizado em refratômetro marca Bausch & Lomb, segundo metodologia descrita em Contal (s.d), à temperatura ambiente, calibrado com água e com leituras corrigidas para valores padrão de 20°C, através do uso de tabelas normatizadas (ICUMSA ¹ citado em Spencer & Meade, 1963) Os resultados foram expressos em g de sólidos solúveis/100 g de melaço.

3.2.1.5. Determinação do Nitrogênio Protéico

A etapa de digestão foi realizada no microdigestor Hach[®], modelo Digesdahl, na temperatura de 440°C. O equipamento é bastante seguro para este tipo de análise, devido a uma pequena trompa de vácuo que possibilita a eliminação dos gases e pela presença de um funil com tubo capilar para a adição segura dos reagentes. A etapa de reação colorimétrica foi realizada empregando-se o reagente de Nessler, solução de álcool polivinílico (agente dispersador) e estabilizador mineral. A técnica empregada foi realizada segundo metodologia descrita por Watkins *et al* (1987) e os valores obtidos foram expressos em g de N/100 g de melaço.

A mineralização das amostras foi obtida com o uso de ácido sulfúrico concentrado, para transformar os constituintes nitrogenados em sulfato de amônia. Nessa técnica, o uso de água oxigenada 50% é importante na eliminação do excesso de cor do digerido, pois as amostras devem ser límpidas para as leituras em espectrofotômetro.

As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível, da CG Instrumentos Científicos modelo 8000, em 460 nm, e paralelamente foi construída uma curva padrão a partir de ampolas lacradas, contendo solução padrão de nitrogênio.

¹ ICUMSA - International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis. **International Sugar Journal**, v. 39, n. 24, 1936.

A quantidade de amostra para a etapa de digestão e a alíquota do digerido para a determinação colorimétrica, foi baseada nos valores da Tabela 4.

Tabela 4. Amostragem sugerida para a etapa de digestão e para a etapa de colorimetria Hach *et al.* ¹ citado em Watkins *et al.* (1987)

Líquidos				Sólidos (base seca)			
A	B	C	D	A	B	C	D
0,3 a 20	50	10	1	30 a 2 10 ³	0,5	10	1
1 a 60	30	6	0,6	100 a 4,5 10 ³	0,4	6	0,6
2 a 150	20	3	0,3	150 a 9,0 10 ³	0,3	4	0,4
10 a 500	10	2	0,2	400 a 2,5 10 ⁴	0,2	2	0,2
50 a 2,0 10 ³	0,5	1	0	1,5 10 ³ a 1,1 10 ⁵	0,1	1	0
500 a 2,0 10 ⁴	1	0,5	0	6,5 10 ³ a 4,5 10 ⁵	0,05	0,5	0

A : Nitrogênio esperado, em partes por milhão, **B** : Volume da amostra em mL ou massa em mg utilizada na digestão, **C** : Volume de amostra em mL, utilizado na reação colorimétrica, **D** : Volume de KOH 12 N, em mL, utilizado na reação colorimétrica

3.2.1.6. Determinação de Dióxido de Enxofre (determinado como sulfito)

Foi determinado colorimetricamente segundo a técnica descrita por Amorim *et al.* (1996), pela complexação do SO₂ com fucsina básica e reação com formaldeído. Para as leituras utilizou-se o espectrofotômetro UV-visível, em 560 nm. Paralelamente construiu-se uma curva padrão com bissulfito de sódio e os resultados obtidos foram expressos em g de SO₂/g de melaço.

¹ HACH, C.C.; BRAYTON, S.V.; KOPELOV, A.B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.33, n.6, p.1117-1123, 1985.

3.2.2. Análises do Mosto

3.2.2.1. Determinação de ART pelo método de Fehling

A determinação de ART foi feita segundo o método descrito no item 3.2.1.1. Os resultados foram calculados como g de glicose/L de mosto e convertidos para p/p utilizando-se a densidade do mosto. A amostra diluída é titulada à quente, pela adição desta solução a uma solução básica padronizada de sulfato de cobre.

3.2.2.2. Determinação de ART pelo método de CLAE-TA/CarboPac-DPA

A determinação de ART foi feita segundo o método descrito no item 3.2.1.2. Os resultados foram calculados como g de glicose/L de mosto e convertidos para p/p utilizando-se a densidade do mosto.

3.2.2.3. Determinação de Acidez

A análise de acidez no mosto foi realizada segundo técnica descrita por Rodrigues & Andrietta (1996) por titulometria ácido-base, utilizando-se solução aquosa padronizada de hidróxido de sódio 0,05 N como titulante, e solução indicadora de fenolftaleína para determinação do ponto de viragem. A titulação foi realizada com agitação magnética a 70°C com o objetivo de eliminar o CO₂ presente na água, e evitar sua interferência no doseamento. Os resultados obtidos foram expressos em g de H₂SO₄/L de mosto e convertidos para p/p utilizando-se a densidade do mosto.

As amostras mais escuras tiveram seu ponto de viragem determinado com o auxílio de um potenciômetro, em função da dificuldade em detectá-la visualmente.

3.2.3. Análises do Vinho

3.2.3.1. Determinação de ART pelo método de Fehling

A determinação de ART foi feita segundo adaptação do método descrito no item 3.2.1.1. Foi utilizada para determinação de ART uma alíquota do vinho centrifugado. Os resultados foram calculados como g de glicose/L de vinho e convertidos para p/p utilizando-se a densidade do vinho. A amostra é adicionada diretamente a uma solução básica padronizada de sulfato de cobre, e titulada à quente pela adição de uma solução de açúcar invertido de concentração conhecida.

3.2.3.2. Determinação de ART pelo método de CLAE-TA/CarboPac-DPA

A determinação de ART foi feita segundo o método descrito no item 3.2.1.2. Foi utilizada para determinação de ART uma alíquota do vinho centrifugado. Os resultados foram calculados como g de glicose/L de vinho e convertidos para p/p utilizando-se a densidade do vinho.

3.2.3.3. Determinação de Acidez

A determinação de acidez foi feita segundo o método descrito no item 3.2.2.3. Foi utilizada para determinação de acidez uma alíquota do vinho centrifugado. Os resultados foram expressos em g de H_2SO_4 /L de vinho e convertidos para p/p utilizando-se a densidade do vinho.

3.2.3.4. Determinação de Glicerol

A determinação de glicerol, realizada em uma alíquota do vinho centrifugado, foi feita segundo a técnica descrita por Rodrigues & Andrietta (1996) que baseia-se em um método colorimétrico. A determinação foi realizada em comprimento de onda de 410 nm

com o auxílio de um espectrofotômetro UV-visível. Para as reações utilizou-se o kit Laborlab[®], apropriado para determinação de triglicérides. Paralelamente construiu-se uma curva padrão e os resultados obtidos foram expressos em mg de glicerol/100 mL de vinho e convertidos para p/p utilizando-se a densidade do vinho.

3.2.3.5 Determinação da Massa Celular Seca

A massa celular seca foi determinada por gravimetria, segundo a técnica descrita por Rodrigues & Andrietta (1996). Uma amostra de 20 mL do vinho foi centrifugada a 3200 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante reservado para as demais análises. A massa obtida foi ressuspensa em água destilada e recentrifugada, com a finalidade de promover a remoção dos contaminantes. Após repetição deste procedimento, a massa celular foi transferida para placa de alumínio e secada em estufa a 80°C.

Os resultados obtidos foram expressos em g de células/mL de vinho e convertidos em p/p utilizando-se a densidade do vinho.

3.2.3.6. Determinação de Etanol

A quantificação do etanol foi realizada segundo técnica descrita por Salik & Povh (1993) a qual apresenta boa precisão para soluções hidroalcoólicas até 20%. Seu princípio baseia-se na reação química de oxidação do etanol a ácido acético após reação com dicromato de potássio em meio ácido. Essa reação foi realizada com o destilado obtido do vinho. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV-visível em comprimento de onda de 600 nm.

Uma amostra de 25 mL do vinho foi destilada por arraste a vapor em destilador Tecnal, modelo TE 012. O destilado foi recolhido em balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água destilada, de forma a obter-se uma diluição 1 : 1.

Os resultados obtidos foram expressos em mL de etanol/100 mL de vinho e convertidos em p/p utilizando-se a densidade do etanol e a do vinho.

3.3. MÉTODOS DE CULTIVO

3.3.1. Manutenção da Levedura

A levedura foi mantida em meio PDA (Potato Dextrose Agar) sólido inclinado, coberto com óleo mineral, sob refrigeração a 8°C. A renovação das células foi feita por repicagem no meio e incubação a 32°C durante 48 h.

3.3.2. Preparo do Mosto

O mosto foi preparado em balão volumétrico, separadamente para cada condição de fermentação (tipo de melaço e concentração de açúcar) e 100 mL foram distribuídos em frascos Erlenmeyer com capacidade para 250 mL. Os frascos foram adaptados com rolha de borracha e tubo central de vidro com pequeno tampão de algodão hidrófobo, para manter a esterilidade e permitir a saída do CO₂. Os frascos foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 121°C.

3.3.3. Condução do Ensaio Fermentativo

Células da cultura de manutenção, foram ressuspensas em água destilada esterilizada e 10 mL desta suspensão (10% do volume do mosto) foram inoculados nos frascos Erlenmeyer, similarmente para as amostras e para o padrão. Os frascos foram incubados à temperatura de 32°C e agitação de 150 rpm, durante 24 horas, em incubadora New Brunswick modelo G 27 (Rodrigues & Andrietta, 1996).

3.4. OBTENÇÃO DE DADOS EXPERIMENTAIS

3.4.1. Cálculo de Balanço de Massa

Os dados experimentais para cálculo de balanço de massa foram obtidos através de pesagem dos frascos de fermentação durante as várias etapas do experimento, de acordo com a Tabela 5 (Andrietta *et al.*, 1995).

Tabela 5. Pesagem do frasco de fermentação nas suas diferentes etapas

MM	FE – FV
MI	FI – FE
MV	FF – FV
MPCO ₂	FI – FF

MM : Massa do mosto, MI Massa do inóculo, MV : Massa do vinho, MPCO₂ : Massa produzida de CO₂, FE : peso do frasco esterilizado, FF : peso do frasco fermentado, FI : peso do frasco inoculado, FV : peso do frasco vazio

Os dados de pesagem obtidos conforme a Tabela 5 foram utilizados posteriormente para obtenção dos parâmetros descritos na Tabela 6. Esses parâmetros foram utilizados de acordo com procedimento proposto por Andrietta *et al.* (1995) para cálculo de rendimento e produtividade de etanol e metabólitos.

3.4.2. Cálculo de Produtividade Específica de Etanol e Metabólitos

O parâmetro de produção específica é importante para determinar a capacidade de uma determinada cepa transformar o ART consumido em etanol, massa celular, glicerol, ácidos orgânicos e gás carbônico. Os dados de produtividade foram obtidos de acordo com procedimento proposto por Andrietta *et al.* (1995) descrito na Tabela 7.

Tabela 6. Parâmetros fermentativos

<i>Parâmetro</i>	<i>Cálculo para obtenção do parâmetro</i>
MAM	$(MM \times ART_M / 10^3 \times d_M)$
MARS	$(MV \times ART_V / 10^3 \times d_V)$
MAC	MAM - MARS
MPE	$(MV \times EtOH. \times d_E / d_V) / 10^2$
MPC	$[MV \times (cél. _V / d_V) - MI \times (cél. _I / d_I)] \times 10^3$ onde $d_I = 1$
MPG	$(MV \times glic.) / 10^5 \times d_V$
MPAC	$(MV \times ác. _V / 10^3 \times d_V) - (MM \times ác_M / 10^3 \times d_M)$

MAM : Massa de ART do mosto (g), **ART_M** : Açúcares Redutores Totais do mosto (g/L), **d_M** : Densidade do mosto (g/mL), **MARS** : Massa de ART residual (g), **ART_V** : Açúcares Redutores Totais do vinho (g/L), **d_V** : Densidade do vinho (g/mL), **MAC** : Massa consumida de ART (g), **MPE** : Massa produzida de etanol (g), **EtOH.** : Volume de etanol em mL/100 mL de vinho, **d_E** : Densidade do etanol (0,79) (g/mL), **MPC** : Massa produzida de células (g), **cél. _V** : Massa de células do vinho em g/L de vinho, **cél. _I** : Massa de células do inóculo em g/L de inóculo, **MPG** : Massa produzida de glicerol (g), **glic.** : Massa de glicerol em mg/100 mL vinho, **MPAC** : Massa produzida de ácido (g), **ác. _{vinho}** : Acidez do vinho (g/L), **ác. _{mosto}** : Acidez do mosto (g/L).

Tabela 7. Cálculo das produtividades específicas e produção horária

<i>Parâmetro</i>	<i>Cálculo para obtenção do parâmetro</i>
PEE	MPE/MAC
PEC	MPC/MAC
PEG	MPG/MAC
PEAC	MPAC/MAC
PEARS	MARS/MAC
PECO₂	MPCO ₂ /MAC
PHE	MPE/24
PHEC	MPE/(MPC x 24)

PEE : Produção específica de etanol, **PEC** : Produção específica de células, **PEG** : Produção específica de glicerol, **PEAC** : Produção específica de ácido, **PEARS** : Produção específica de açúcar residual, **PECO₂**: Produção específica de CO₂ , **PHE** : Produtividade horária de etanol. **PHEC** : Produtividade horária de etanol em relação à massa celular

3.4.3. Cálculo de Rendimento

A estequiometria da glicólise é importante no cálculo de rendimento dos processos de fermentação alcoólica e está resumida na Figura 6.

$C_6H_{12}O_6 + 2 Pi + 2 ADP \rightarrow 2 C_2H_5OH + 2 CO_2 + 2 ATP + 2 H_2O + 57 kcal$		
↓	↓	↓
Glicose	Etanol	Dióxido de carbono
PM 180	PM 46	PM 44
1 mol	2 moles	2 moles
180 g	92 g	88 g
1 g	0,51 g	0,49 g

Figura 6. Balanço global da reação de glicólise (Equação de Gay Lussac).

Pela equação de Gay Lussac, verifica-se que um mol de glicose pode ser convertido durante a fermentação em dois moles de etanol. Dessa forma, o rendimento teórico com conversão total do açúcar em etanol (YT) seria de 0,51 g de etanol/g de glicose, obtido pela razão 92/180.

Os dados de rendimento foram obtidos de acordo com procedimento proposto por Finguerut *et al.* (s.d.) descrito na Tabela 8.

Tabela 8. Cálculo de rendimento fermentativo

Parâmetro	Cálculo para obtenção do parâmetro
$Y_{P/Sa}$	$(MEP * 10^2)/(MAM) * YT$
$Y_{P/Sc}$	$(MEP * 10^2)/(MAC) * YT$
$Y_{P/M}$	$10^2/(1 + KC + KG + KCO_2 + KAC + KARS) * YT$

KAC : MPAC/MPE, KARS : MPARS/MPE, KC : MPC/MPE, KCO₂ : MPCO2/MPE, KG : MPG/MPE

Muitas destilarias ainda calculam o rendimento fermentativo ($Y_{P/Sa}$) utilizando valores de etanol obtidos pela medição de sua vazão na destilaria, em medidores mecânicos, e o açúcar alimentado (S_a) obtido através da determinação do ART por Fehling. Finguerut *et al.* (s.d.) citam que esta é uma forma inexata de cálculo, em vista das determinações empregadas de medição de etanol e ART, e por não levar em consideração no cálculo os demais compostos formados durante a fermentação. Por este motivo, as usinas estão progressivamente empregando o cálculo de rendimento que utiliza os metabólitos da fermentação, por tratar-se de uma técnica de maior exatidão e porque inevitavelmente outros compostos serão formados além do etanol.

3.4.4. Fatores de Produto e Potencial Fermentativo

Estes fatores são obtidos da diferença entre a produção específica da amostra em relação ao padrão, para o etanol (FE), e da diferença da produção específica do padrão em relação a da amostra, para células, glicerol, ácidos e açúcar residual (FC, FG, FAC, FARS. Os cálculos estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Cálculo dos fatores de produtos

<i>Fatores</i>	<i>Cálculo para obtenção dos fatores</i>
Etanol	$FE = \frac{PEE \text{ amostra} - PEE \text{ padrão}}{PEE \text{ padrão}} * 100$
Células	$FC = \frac{PEC \text{ padrão} - PEC \text{ amostra}}{PEC \text{ padrão}} * 100$
Glicerol	$FG = \frac{PEG \text{ padrão} - PEG \text{ amostra}}{PEG \text{ padrão}} * 100$
Ácido	$FAC = \frac{PEAC \text{ padrão} - PEAC \text{ amostra}}{PEAC \text{ padrão}} * 100$
Açúcar Residual	$FARS = \frac{PEARS \text{ padrão} - PEARS \text{ amostra}}{PEARS \text{ padrão}} * 100$

Estes fatores são utilizados para determinar o Potencial Fermentativo de cada amostra em relação ao padrão (PF). O Potencial Fermentativo foi definido por Andrietta *et al.* (1995) como a soma dos fatores individuais, aplicando-se um valor para cada um deles por grau de importância, sendo que os valores definidos foram 10, 2, 1, 0,25 e 5 para etanol, células, glicerol, acidez e açúcar residual respectivamente.

$$PF = FE * 10 + FC * 2 + FG * 1 + FAC * 0,25 + FARS * 5$$

Vale enfatizar que o estudo deste autor refere-se a avaliação do potencial fermentativo de cepas em comparação a uma cepa padrão e que neste estudo o resultado foi empregado para avaliar o potencial dos diferentes melaços em relação a um meio fermentativo padrão, sendo a cepa utilizada a mesma para todos os experimentos.

Resultados positivos ou negativos do PF, indicam respectivamente, características mais apropriadas ou menos apropriadas que o padrão. Resultados próximos de zero indicam condições adequadas para fermentação, o que significa dizer que quando avaliam-se as produções específicas obtidas de uma fermentação e comparam-se com as produções específicas de uma fermentação padrão, conduzidas sempre nas mesmas condições de temperatura, agitação, inóculo, tempo de fermentação entre outros, espera-se que o resultado do Potencial Fermentativo seja zero.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA MATÉRIA-PRIMA

A matéria-prima fornecida pelas diferentes usinas foi coletada semanalmente durante a safra. A mesma apresentou variações de cor e homogeneidade, intrínsecas ao grau de exaustão adotado no processamento de obtenção do açúcar. Verificou-se que os melaços de coloração mais escura foram os da Usina Trapiche, e os de mais clara os da Usina Diamante (exceto o Mel final), sendo os demais de coloração intermediária. Esta coloração típica de melaços é justificada pelas reações químicas de escurecimento decorrentes do processamento, corroborando a informação de que as amostras da Usina Trapiche eram as mais esgotadas, portanto as que mais intensamente sofreram com o processamento, e as menos esgotadas as da Diamante.

Quanto à homogeneidade, verificou-se grande quantidade de precipitados em algumas amostras da Usina Diamante e Bonfim, provavelmente sacarose, por tratarem-se de amostras mais ricas que as demais. Porém, este problema foi minimizado quando reuniram-se (para uma mesma usina e tipo, ou seja, Mel rico, pobre ou final) as amostras coletadas ao longo da safra, compondo assim amostras mais homogêneas.

Os melaços foram caracterizados através das determinações de Brix, Pol, açúcares redutores totais (ART), sulfito e nitrogênio. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 10 e representam a média entre três amostras distintas.

Após a caracterização dos melaços, os mesmos foram diluídos até concentração adequada de ART (três ensaios distintos: 120, 150 e 180 g/L) para a fermentação em batelada. As diluições dos diferentes melaços, foram obtidas com base no resultado de ART da matéria-prima por CLAE. A partir dos ensaios fermentativos, foi possível realizar um estudo comparativo dos resultados obtidos pela técnica tradicional de dosagem de açúcares, que é o método titulométrico de Fehling, com a técnica cromatográfica, mais específica e sensível.

Tabela 10. Caracterização dos melaços por análises físico-químicas

	<i>Brix</i>	<i>Pol</i>	<i>ART_{CLAE}</i> (%p/p)	<i>ART_{FEHLING}</i> (%p/p)	<i>SO₃²⁻</i> (g/g)	<i>N</i> (mg/g)
<i>TR 1</i>	78,08	27,90	52,51	55,26	34,59	26,20
<i>TR 2</i>	77,28	43,00	67,32	63,23	55,49	9,10
<i>BO 1</i>	78,00	45,14	47,06	60,52	22,31	26,70
<i>BO 2</i>	77,60	51,00	49,65	64,25	20,71	19,70
<i>TA 1</i>	81,80	38,34	48,01	58,08	41,93	29,90
<i>TA 2</i>	80,08	48,19	49,28	60,66	23,02	22,30
<i>DR 1</i>	71,20	63,54	54,70	69,83	*	13,00
<i>DR 2</i>	70,28	63,00	66,22	64,45	*	13,00
<i>DR 3</i>	70,28	57,27	63,16	63,15	*	13,00
<i>DF 1</i>	70,14	54,54	54,07	64,25	10,85	21,00
<i>DF 2</i>	73,60	53,73	63,08	65,60	15,91	22,10
<i>DF 3</i>	80,40	54,89	64,90	65,72	17,45	22,20
<i>DP 1</i>	69,16	61,20	68,71	65,47	30,41	17,70
<i>DP 2</i>	72,68	61,90	72,13	65,93	36,34	11,70
<i>DP 3</i>	73,92	36,92	65,02	63,34	31,87	14,70

* Análises não realizadas em função da posterior deterioração das amostras. *TR* : Usina Trapiche, *BO* : Usina Bonfim, *TA* : Usina Tamoio, *DR* : Usina Diamante (Mel rico), *DF* : Usina Diamante (Mel final), *DP* : Usina Diamante (Mel pobre), *SO₃²⁻* : Sulfito, *N*: Nitrogênio, *Pol* : Polarimetria

Os dados da Tabela 10 mostram variações na composição entre amostras de uma mesma usina e usinas diferentes, principalmente com respeito ao Pol, SO_3^- , e N. Estas variações são esperadas por tratarem-se de amostras provenientes de diferentes fábricas e portanto com graus de exaustão diferenciados. Porém, as determinações de sulfito e nitrogênio apresentaram grande variação, sendo o valor máximo em relação ao mínimo 5,1 vezes para o sulfito e 3,3 vezes para o nitrogênio. Para valores de Pol esta relação atingiu 2,3 vezes, 1,2 para Brix, 1,5 para ART CLAE e 1,2 para ART Fehling.

Ainda com respeito a Tabela 10, as amostras que apresentaram menor valor de sulfito, elemento que compromete a fermentação, foram as da Usina Diamante (DF1) e Bonfim (BO2) e a que apresentou o maior valor a da usina Trapiche (TR2). Esta última apresentou o menor teor de nitrogênio.

4.1.1. Determinação dos Principais Açúcares do Melaço por CLAE

A cromatografia líquida de alta eficiência, diferentemente de outras técnicas, permite a determinação individual dos principais açúcares do melaço. O teor destes açúcares está ilustrado na Figura 7.

Segundo Binkley & Wolfrom (1953), e Olbrich (1960, 1974) a composição de açúcares é bastante variável para melaços de cana-de-açúcar. Para Binkley & Wolfrom (1953), os valores médios de sacarose, glicose e frutose são respectivamente 35, 7 e 9%. Já para Olbrich (1960, 1974) estes valores são 32, 14 e 16%, na mesma ordem.

A partir dos dados da Figura 7, verifica-se que a maioria das amostras apresentou valores de sacarose acima da média citada por estes autores, e valores de glicose e frutose abaixo da média. Além disso, as amostras provenientes da Usina Diamante foram as que apresentaram menores teores de glicose e frutose (Mel rico 1, 2 e 3 e Mel pobre 1 e 2). O fato das usinas usarem artifícios para a obtenção do máximo rendimento em sacarose, recozendo os méis por exemplo, propiciam a formação de compostos de cor e induzem reações químicas, podendo levar à inversão da sacarose e aumentando níveis

de glicose e frutose, levando este material a apresentar grande variabilidade de concentração de cada açúcar.

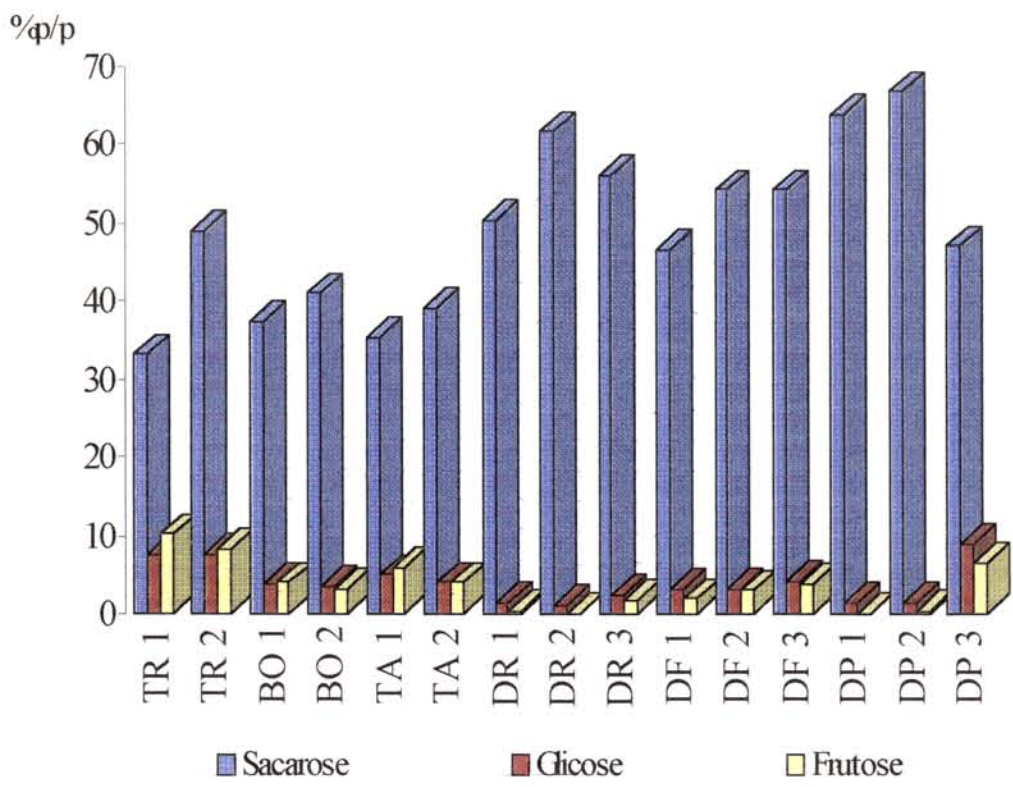


Figura 7. Variação do teor de sacarose, glicose e frutose nos diferentes melaços

4.1.2. Determinação da Pureza dos Melaços Através das Análises de Açúcar e Brix

A determinação polarimétrica em usinas é uma técnica amplamente utilizada por suas características de rapidez e simples execução. Esta determinação é conhecida pelo termo sacarose aparente, pois a técnica não determina somente a sacarose, tendo seus resultados alterados em amostras muito complexas. Algumas usinas utilizam a relação Pol/Brix como determinação do grau de pureza de amostras, relação esta conhecida por pureza aparente. Os resultados obtidos por esta técnica neste tipo de amostra são imprecisos, devido a interferência das impurezas óticamente ativas. Quando comparados com resultados da análise cromatográfica, levam a resultados divergentes. A técnica

CLAE pode ser considerada a mais exata entre as demais pelo fato de não sofrer modificações pela presença de impurezas na amostra, que podem ser adequadamente separadas dos açúcares.

As comparações dos resultados entre as técnicas tradicionais (Fehling e Pol) e a mais atual (CLAE), estão ilustradas nas Figuras 8, 8a e 8b.

A Figura 8 mostra que a curva de Pol manteve-se acima da curva obtida com CLAE, para a maioria das amostras analisadas, confirmando que para melaços, esta técnica pode superestimar os valores. Segundo Kitchen (1988), a presença de dextrana-dextrorrotatória, eleva os valores deste tipo de análise, mostrando assim a imprecisão da técnica para amostras complexas como o melaço. Em alguns casos isto não ocorreu, podendo ser compreendido pelos altos teores de frutose, um açúcar levorrotatório.

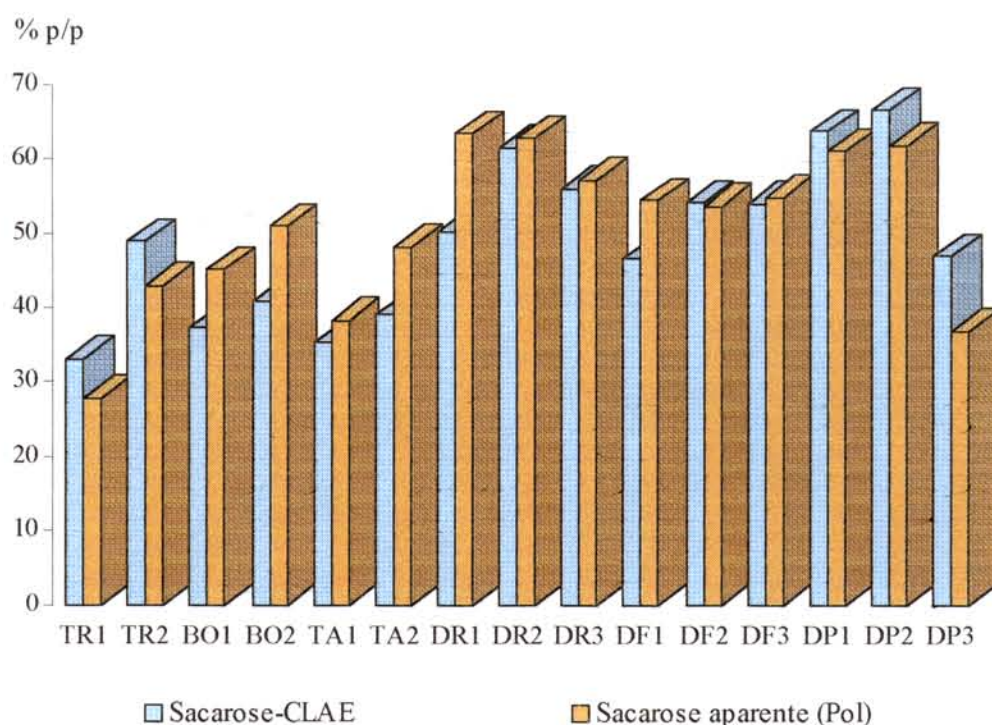


Figura 8. Comparação dos valores de concentração de sacarose em melaços de cana-de-açúcar analisados por CLAE e Polarimetria

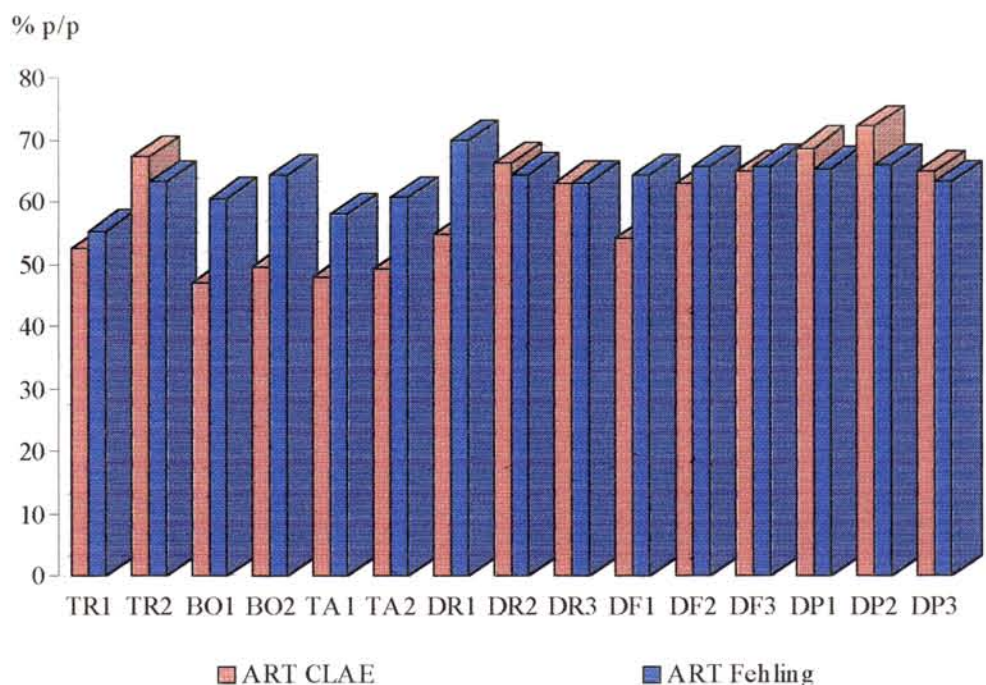


Figura 8a. Comparação dos valores de ART em melaços de cana-de-açúcar analisados por CLAE e Fehling

Os dados obtidos para as análises de determinação de ART por Fehling e CLAE, ilustrado na Figura 8a, demonstram que a técnica titulométrica resultou em valores superiores. Assim como observado para a técnica de Pol, a curva de Fehling manteve-se acima da curva da CLAE, confirmando que para melaços esta técnica também superestima os valores, excetuando-se o caso das amostras TR2, DR2, DP1, DP2 e DP3.

A determinação de Pureza utilizando-se resultados de Pol e Brix obtidos da determinação de sacarose por CLAE, ilustrada na Figura 8b, demonstra que o emprego destas análises para efeito de cálculo de Pureza, acarretam valores bastante superiores aos obtidos por CLAE. Os menores valores obtidos pela relação Pol/Brix foram os das amostras TR1, TA1, DP3 e TR2, justificados pelos maiores teores de frutose-levorrotatória (Figura 7), que alterou o desvio da luz polarizada e ocasionou diminuição nas leituras de Pol. Já os maiores valores obtidos pela relação Pol/Brix foram os da Usina Diamante, exceto a amostra DP3, em função do baixo valor de Pol.

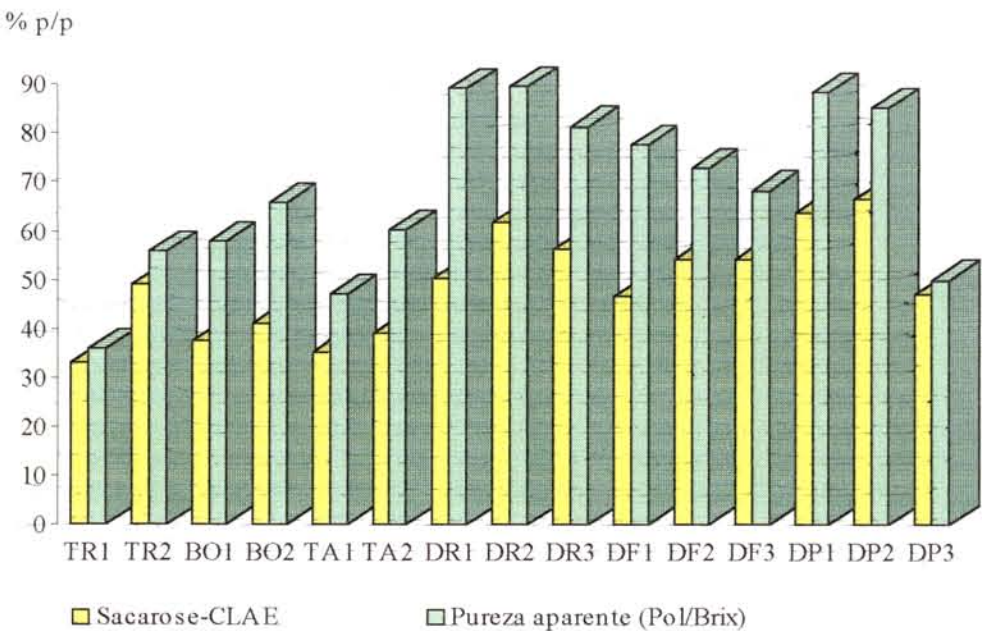


Figura 8b. Comparação entre os valores de concentração de sacarose por CLAE e da relação Pol/Brix (Pureza aparente)

4.1.3. Análise Estatística dos Resultados Obtidos a Partir das Diferentes Técnicas Empregadas para Determinação de Açúcares no Melaço

Na Tabela 11 encontram-se os valores de probabilidade do teste T, empregados para os diferentes métodos de análise do melaço e seus respectivos níveis de significância, obtidos pelo Programa *Statistic for Windows 3.1*[®] (WinSTAT). Verificou-se que o método cromatográfico diferiu dos demais, confirmando a teoria de que a aplicação das técnicas clássicas pode ocasionar erros nos cálculos.

Tabela 11. Teste T para análises químicas do melaço

	Pol/Brix	ART _{Fehling}
ART _{CLAE}	p = 0,0313 *	p = 0,0432 *
ART _{Fehling}	p = 0,1959 ^{ns}	

* O teste indicou haver diferença significativa entre as técnicas, ao nível de 95% de confiança
ns não significativo

4.2. ENSAIOS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EM BATELADA

4.2.1. Determinação de açúcares no mosto e vinho, por Fehling e CLAE.

Os experimentos de fermentação foram delineados utilizando-se um experimento com valor referencial de ART de 150 g/L (Rossel, 1988; Andrietta, 1997), além de dois outros, acima e abaixo do valor citado, nas concentrações de 120 e 180 g/L. Para a diluição e ajuste da concentração de ART, tomou-se por base a concentração obtida por cromatografia líquida na matéria-prima.

4.2.1.1. Açúcar Residual

Durante o processo fermentativo, as leveduras utilizam parte do açúcar fornecido para a produção de etanol e para manter o seu ciclo vital, ou seja, respiração e formação de biomassa. Dados de literatura indicam que aproximadamente 5% do açúcar consumido pela levedura seja desviado para síntese de glicerol, ácidos e formação de massa celular.

O balanço de massa de açúcar nos experimentos, foi calculado pela diferença da massa de açúcar fornecida (ART-mosto) e a massa de açúcar não metabolizada (residual-vinho). A partir desta diferença de massa, obteve-se os valores de massa de açúcar consumido (MAC)

Nas Tabelas 12, 12a e 12b, encontram-se os valores médios obtidos das concentrações de açúcares redutores totais pelas técnicas de Fehling e cromatográfica. Para cada técnica aplicou-se o teste F, cujos valores e respectivos níveis de significância, obtidos pela análise de variância (ANOVA), estão representados nas mesmas Tabelas. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan ao nível de 0,05 de probabilidade. Foram obtidos também através da análise descritiva básica, o desvio padrão (DP), a média para cada técnica (M) e o coeficiente de variação (CV%), pelo programa WinSTAT. As demais análises, referentes às determinações de CO₂, glicerol, massa celular seca, etanol e acidez, estão descritas no ANEXO I.

Tabela 12. Média das determinações da concentração de ART no mosto e vinho, do experimento 120 g/L

	MAM Fehl	MAM CLAE	MARS Fehl	MARS CLAE	MAC Fehl	MAC CLAE
TR1	11,87 h ⁽¹⁾	11,33 b ⁽¹⁾	5,43 f ⁽¹⁾	4,03 de ⁽¹⁾	6,44 a ⁽¹⁾	7,30 a ⁽¹⁾
TR2	10,20 b	11,52 i	9,22 i	6,85 f	1,59 h	4,67 e
BO1	14,31 j	14,85 j	2,11 dg	1,28 b	12,20 j	13,57 d
BO2	12,04 d	13,94 e	4,03 a	2,95 c	8,01 e	10,98 b
TA1	12,11 d	14,45 f	1,22 bc	0,08 a	10,89 i	14,37 j
TA2	13,04 e	14,56 f	2,83 gh	1,15 b	10,21 b	13,41 d
DR1	14,14 i	13,42 d	9,01 i	6,84 f	5,13 cd	6,58 g
DR2	10,73 f	13,40 d	4,61 ae	3,66 d	6,12 a	9,73 c
DR3	10,88 c	12,62 c	5,00 ef	3,75 d	5,88 a	8,87 h
DF1	12,94 e	14,03 h	4,09 a	2,88 c	8,84 f	11,14 b
DF2	11,71 g	12,50 a	1,99 cd	0,93 b	9,72 bg	11,57 i
DF3	10,55 a	10,35 g	1,42 bcd	0,33 a	9,12 fg	10,03 c
DPI	10,49 a	10,07 e	5,60 f	4,33 e	4,90 c	5,74 f
DP2	10,18 b	10,28 c	4,45 ae	3,06 c	5,74 ad	7,22 a
DP3	10,53 a	9,03 a	2,99 h	1,88 g	7,54 e	7,15 a
Pad	10,92 c	11,24 b	0,94 b	0,14 a	9,98 b	11,09 b
F (15,33)	1213,2 *	1916,2 *	87,66 *	231,21 *	138,6*	422,7*
M	11,65	12,33	3,99	2,71	7,69	9,62
DP	1,31	1,79	2,47	2,11	2,69	2,86
CV (%)	1,61	2,07	8,84	11,13	5,00	4,25

MAM:Massa de açúcar mosto, MARS:Massa de açúcar residual-vinho, MAC:Massa de açúcar consumido, M:Média, DP:Desvio padrão, CV: Coeficiente de variação

(1) Para cada variável, médias seguidas por letras iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Duncan.

(*) p < 0,001

Tabela 12a. Média das determinações da concentração de ART no mosto e vinho, do experimento 150 g/L

	MAM Fehl	MAM CLAE	MARS Fehl	MARS CLAE	MAC Fehl	MAC CLAE
<i>TR1</i>	14,72 g ⁽¹⁾	11,99 h ⁽¹⁾	7,10 bc ⁽¹⁾	5,28 e ⁽¹⁾	7,62 ac ⁽¹⁾	6,70 d ⁽¹⁾
<i>TR2</i>	12,98 e	17,13 d	10,25 h	8,92 f	2,73 f	8,21 b
<i>BO1</i>	15,08 d	16,88 d	4,79 fg	3,33 b	10,29 g	13,55 gh
<i>BO2</i>	18,12 b	15,64 c	6,85 abc	4,38 c	11,26 b	11,26 k
<i>TA1</i>	17,03 i	15,75 c	1,36 de	0,69 a	15,67 h	15,06 i
<i>TA2</i>	16,31 h	16,08 c	4,05 f	3,01 b	12,27 bd	13,06 cg
<i>DR1</i>	18,07 b	17,00 d	11,06 h	9,17 f	7,02 a	7,84 b
<i>DR2</i>	14,38 c	13,03 e	6,77 abc	5,39 e	7,61 ac	7,64 ab
<i>DR3</i>	13,31 a	13,83 a	6,07 a	4,85 d	7,24 a	8,97 j
<i>DF1</i>	17,96 b	14,41 f	6,26 ab	4,58 cd	11,70 b	9,83 f
<i>DF2</i>	13,47 a	14,45 bf	2,04 e	1,63 g	11,43 b	12,81 c
<i>DF3</i>	13,49 a	13,81 a	1,64 de	1,02 a	11,85 b	12,80 c
<i>DPI</i>	14,27 c	13,63 a	7,29 c	6,16 i	6,97 a	7,47 ae
<i>DP2</i>	13,44 a	13,39 ae	4,81 fg	3,68 h	8,63 e	9,71 f
<i>DP3</i>	13,52 a	10,17 g	5,09 g	3,15 b	8,43 ce	7,02 de
<i>Pad</i>	14,01 f	14,84 b	1,10 d	0,84 a	12,91 d	14,01 h
F (15,33)	730,61*	151,85*	107,08*	484,48*	97,08*	210,15*
M	14,99	14,52	5,44	4,14	9,74	10,54
DP	1,79	1,84	3,02	2,56	3,11	2,84
CV (%)	1,69	1,79	7,87	8,73	4,52	3,81

MAM:Massa de açúcar mosto, MARS:Massa de açúcar residual-vinho, MAC:Massa de açúcar consumido, M:Média, DP:Desvio padrão, CV: Coeficiente de variação
(1) Para cada variável, médias seguidas por letras iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Duncan.
(*) p < 0,001

Tabela 12b. Média das determinações da concentração de ART no mosto e vinho, do experimento 180 g/L

	MAM Fehl	MAM CLAE	MARS Fehl	MARS CLAE	MAC Fehl	MAC CLAE
<i>TR1</i>	17,38 h ⁽¹⁾	12,76 b ⁽¹⁾	8,46 f ⁽¹⁾	6,14 de ⁽¹⁾	8,92 a ⁽¹⁾	6,62 a ⁽¹⁾
<i>TR2</i>	15,02 b	12,62 i	11,89 i	9,75 f	3,13 h	2,88 e
<i>BO1</i>	20,83 j	18,14 j	6,60 dg	5,34 b	14,23 j	12,80 d
<i>BO2</i>	18,58 d	17,67 e	7,57 a	5,98 c	11,01 e	11,69 b
<i>TA1</i>	18,83 d	15,07 f	3,79 bc	2,14 a	15,04 i	12,92 j
<i>TA2</i>	19,32 e	16,04 f	5,89 gh	3,84 b	13,43 b	12,21 d
<i>DR1</i>	17,67 i	18,55 d	12,31 i	10,50 f	5,36 cd	8,05 g
<i>DR2</i>	16,02 f	14,17 d	7,60 ae	5,68 d	8,42 a	8,49 c
<i>DR3</i>	14,73 c	15,36 c	7,19 ef	4,95 d	7,54 a	10,40 h
<i>DF1</i>	17,69 e	17,63 e	5,81 a	4,58 c	11,88 f	13,05 b
<i>DF2</i>	15,52 g	15,34 c	2,60 cd	1,29 b	12,91 bg	14,05 i
<i>DF3</i>	14,51 a	14,46 a	2,46 bcd	0,68 a	12,05 fg	13,78 c
<i>DPI</i>	14,67 a	15,55 h	7,96 f	6,14 e	6,70 c	9,41 f
<i>DP2</i>	13,61 b	13,85 a	6,22 ae	5,12 c	7,39 ad	8,72 a
<i>DP3</i>	15,72 a	10,68 g	5,00 h	3,33 g	10,72 e	7,34 a
<i>Pad</i>	15,52 c	16,84 b	2,96 b	1,70 a	12,56 b	15,15 b
F (15,33)	1213,22*	1916,19*	87,66*	231,21*	138,63*	422,66*
M	11,65	12,33	3,99	2,71	7,69	9,62
DP	1,31	1,79	2,47	2,11	2,69	2,86
CV (%)	1,61	2,07	8,84	11,13	5,00	4,25

MAM:Massa de açúcar mosto, MARS:Massa de açúcar residual-vinho, MAC:Massa de açúcar consumido. M:Média, DP:Desvio padrão, CV: Coeficiente de variação
(1) Para cada variável, médias seguidas por letras iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Duncan.
(*) p < 0,001

Estatisticamente aplicou-se o teste T, utilizando-se as triplicatas dos valores de Massa de açúcar do mosto (MAM), massa de açúcar residual (MARS) e massa de açúcar consumido (MAC), cujos resultados estão mostrados na Tabela 13.

Tabela 13. Teste T para valores de MAM, MARS e MAC, dos ensaios 120, 150 e 180g/L

	MAM _{CLAE} x MAM _{Fehling}	MARS _{CLAE} x MARS _{Fehling}	MAC _{CLAE} x MAC _{Fehling}
120	p = 0,0352 *	p = 0,0066 **	p = 0,0009 **
150	p = 0,1971 ^{ns}	p = 0,0254 *	p = 0,1964 ^{ns}
180	p = 0,0036 **	p = 0,0035 **	p = 0,5166 ^{ns}
*	O teste indicou haver diferença significativa entre as técnicas, ao nível de 95% de confiança		
**	O teste indicou haver diferença significativa entre as técnicas, ao nível de 99% de confiança		
^{ns}	não significativo		

Diferentemente da análise de melaço (matéria-prima) e de mostos, onde a concentração de açúcares é mais elevada, a análise de açúcar residual torna-se limitada pela baixa sensibilidade e especificidade da determinação de ART em amostras com baixo teor de açúcares redutores. Por outro lado, a cromatografia líquida com detector de pulso amperométrico é altamente sensível, capaz de detectar açúcares a níveis de picomol (White Jr & Widmer, 1990; Lewis & Schäfler, 1992). Este fato pode justificar a diferença significativa entre Fehling e CLAE para os valores de MARS nos três experimentos.

Nas Figuras 9, 10 e 11, encontram-se as dispersões dos valores de MAM (Figuras 9a, 10a e 11a), MARS (Figuras 9b, 10b e 11b) e MAC (Figuras 9c, 10c e 11c), para os experimentos 120, 150 e 180 g/L.

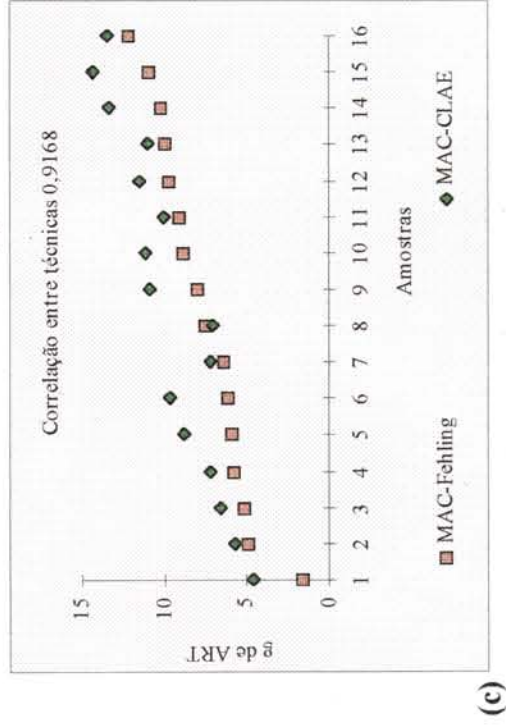
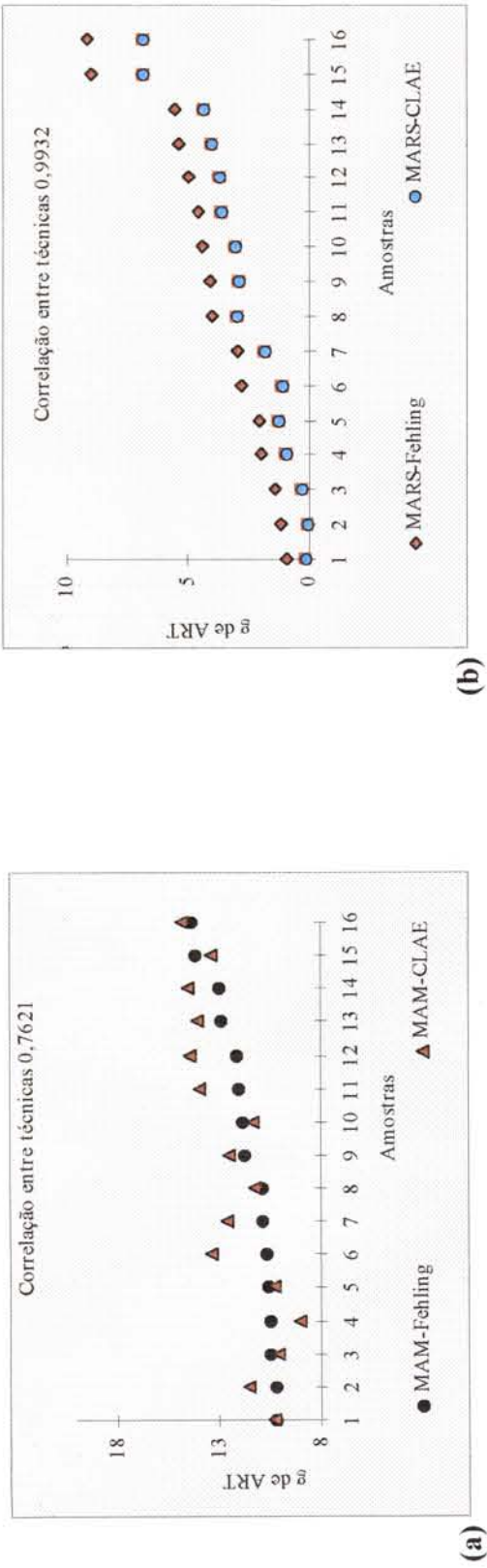


Figura 9. Dispersão dos valores de MAM, MARS e MAC, para o experimento de 120 g/L

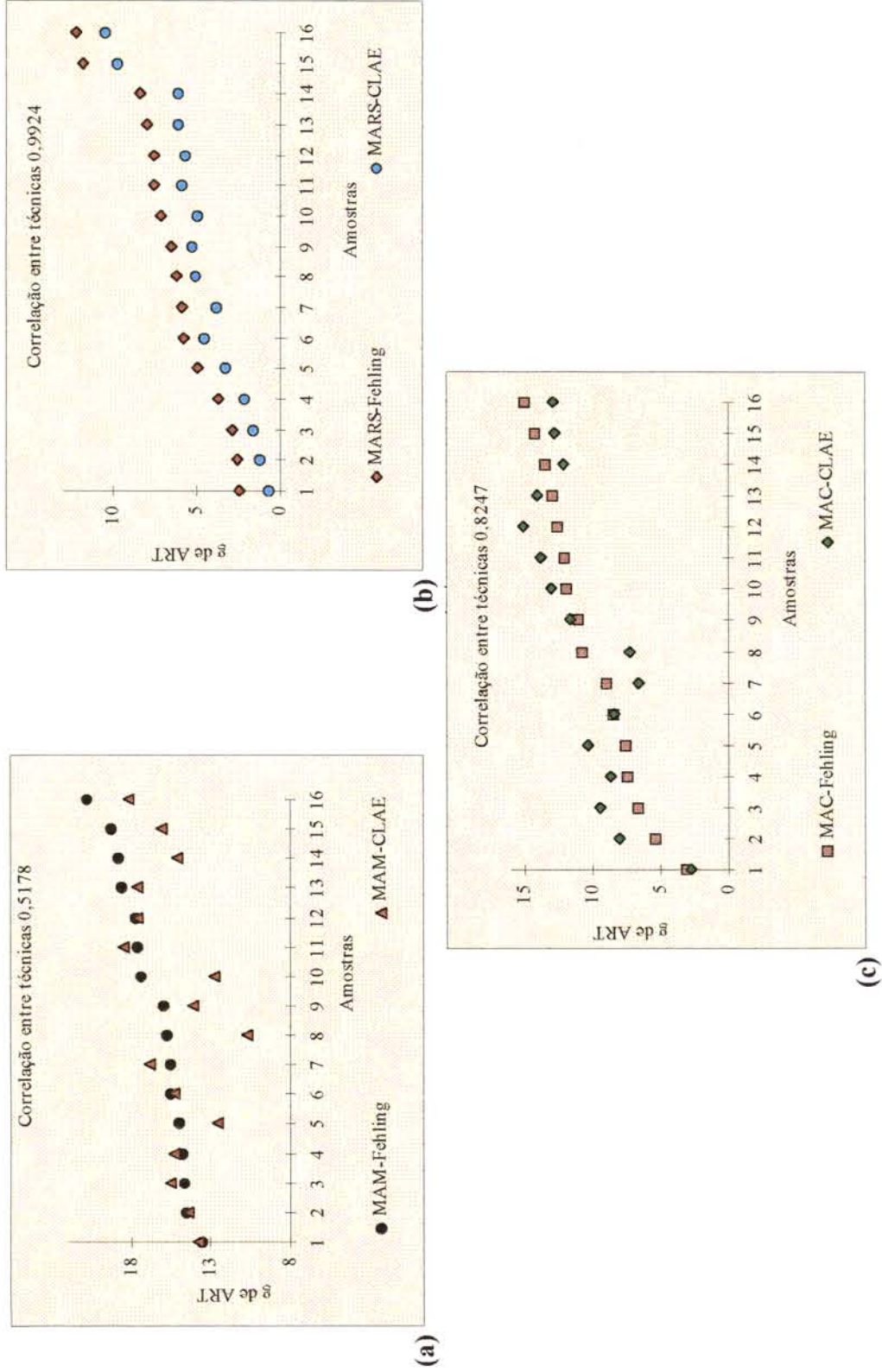


Figura 11. Dispersão dos valores de MAM, MARS e MAC, para o experimento de 180 g/L

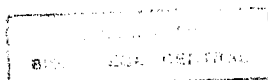
A dispersão dos valores de MAM entre as técnicas demonstrou baixa correlação, a qual pode ser justificada pelos altos fatores de diluição que a análise de CLAE requer, atingindo em alguns casos fatores de 50.000 ou mais. Esta diluição se faz necessária em função da alta concentração de açúcar nas amostras que certamente saturariam o eletrodo. Os resultados obtidos quando se utiliza um pipetador automático para transferência de volumes são sempre repetitivos, mas podem ocorrer erros quando grande número de transferências são realizadas. Além do elevado fator de diluição para a CLAE, deve-se citar a ocorrência de outras substâncias redutoras e a intensa coloração das amostras que afetam a análise por Fehling, quer pelo falso positivo destas substâncias redutoras, quer pela dificuldade de interpretação do ponto de viragem.

Com relação ao MARS (açúcar residual- vinho), apesar do teste T indicar diferença significativa entre técnicas, houve boa correlação entre as mesmas. As amostras puderam ser analisadas sem a necessidade de grandes diluições, pois nesta etapa sobram somente os açúcares que não foram consumidos pela levedura. Na determinação de MAM a titulação é realizada com a amostra (bureta), a qual dificulta a visualização do ponto de viragem pela intensa coloração como dito anteriormente. Ao contrário do MAM, a determinação de MARS é feita com a adição da amostra diretamente na solução de Fehling e a titulação do excedente deste reagente é realizada com uma solução padrão de açúcar invertido (bureta), não dificultando a visualização da formação do óxido cuproso, vermelho tijolo, e portanto a viragem

4.2.2. Determinação de Etanol no Vinho

A produção de etanol na fermentação alcoólica a partir da glicose é parte do metabolismo da *Sacch. cerevisiae*, para a manutenção do ciclo vital. A formação de outros produtos é decorrência de inúmeros fatores, onde parte do açúcar utilizado é desviado para a síntese do glicerol e ácidos entre outros.

Nesse tipo de fermentação, o nitrogênio, proveniente de várias fontes, incluindo aminoácidos, proteínas, enzimas, uréia, amônio, ácidos nucleicos, purinas, pirimidinas,



pigmentos, vitaminas, lecitina, cefalinas e outros, é um elemento importante para o crescimento da levedura e essencial para uma fermentação adequada.

Níveis elevados de nitrogênio ocasionam multiplicação excessiva da levedura e conseqüentemente um desvio maior do açúcar para formação de biomassa e glicérol , diminuindo a produção de etanol. A ocorrência de níveis baixos de nitrogênio, propicia uma fermentação lenta, com baixa multiplicação celular e baixo rendimento fermentativo, ocasionados pelo acúmulo de trealose, um dos principais carboidratos de reserva da célula, em detrimento da produção de etanol. Dessa forma, o nitrogênio deve estar em níveis ideais para não comprometer a fermentação.

Nos vários experimentos realizados, foi possível verificar a relação entre o nitrogênio fornecido e a produção de etanol pela levedura (Figura 12).

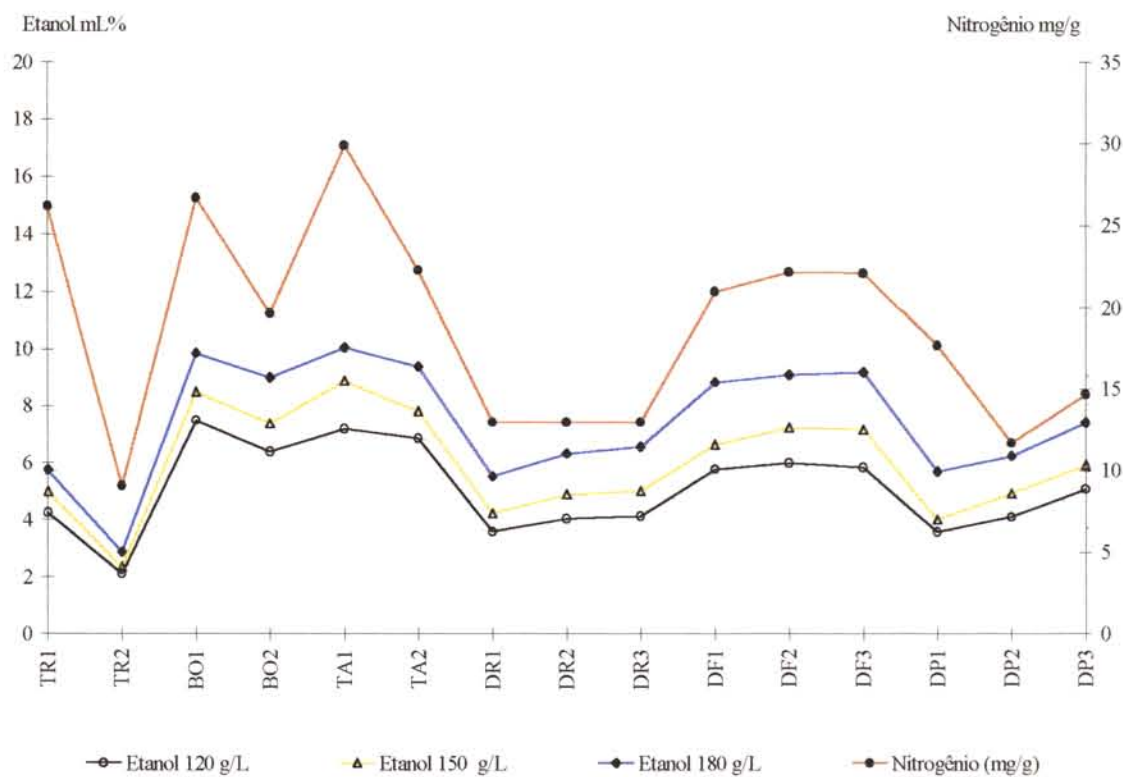


Figura 12. Correlação de dados de concentração de etanol obtido no vinho e concentração de nitrogênio na matéria-prima

As curvas de etanol e nitrogênio ilustradas na Figura 12, demonstram que o aumento na produção de etanol é diretamente proporcional ao aumento da concentração de nitrogênio presente na matéria-prima. Embora a produção de etanol não tenha uma correlação direta com os valores de sulfito na matéria-prima, verifica-se que em algumas amostras ocorre a combinação dos efeitos de concentração de nitrogênio e sulfito, ou seja, o aumento da concentração de sulfito e a diminuição da concentração de nitrogênio, numa mesma amostra, ocasiona diminuição do valor de rendimento em comparação a amostras com elevada concentração de sulfito e elevada concentração de nitrogênio. Esta hipótese torna-se evidente ao comparar-se os rendimentos entre as amostras TR2 e TA1 ($Y_{P/Sa}$ ANEXO III).

Foi realizado um breve estudo comparando-se a técnica colorimétrica de determinação de etanol, utilizada neste trabalho, com a técnica de cromatografia gasosa-CG, estando os resultados descritos no ANEXO II. Verificou-se que a técnica colorimétrica superestimou os resultados na maioria das análises, porém como o objetivo deste trabalho foi o de comparar valores de rendimento obtidos pelas técnicas de CLAE e Fehling, deve-se ressaltar que não houve nenhuma interferência da técnica de determinação de etanol nos cálculos, uma vez que aplicaram-se os mesmos resultados de etanol para cálculo de rendimento por ambas técnicas de determinação de açúcares. Em outras palavras, como rendimento é massa de produto (etanol) por massa de substrato (açúcar), os valores de concentração de etanol não contribuíram para eventuais mudanças nesta relação.

4.2.3 Rendimento Fermentativo Calculado pelos Metabólitos ($Y_{P/M}$)

Na Tabela 14 encontram-se as médias dos resultados do cálculo de rendimento dos experimentos fermentativos, para as três diferentes concentrações iniciais de ART no mosto, por ambas técnicas de análise.

Tabela 14. Análise estatística dos valores de rendimento alcoólico pelas técnicas de determinação de ART - Fehling e CLAE

	Y _{P/M} Fehling			Y _{P/M} CLAE		
	120 g/L	150 g/L	180 g/L	120 g/L	150 g/L	180 g/L
<i>TR1</i>	53,28 be ⁽¹⁾	50,42 c ⁽¹⁾	48,93 h ⁽¹⁾	59,50 ab ⁽¹⁾	56,64 c ⁽¹⁾	55,51 g ⁽¹⁾
<i>TR2</i>	27,96 h	26,95 g	27,73 f	34,07 i	29,67 f	31,67 e
<i>BO1</i>	76,05 ag	67,03 e	63,40 ae	80,03 fg	71,94 b	66,64 a
<i>BO2</i>	66,93 d	58,95 ad	60,96 a	71,70 e	66,74 a	65,23 a
<i>TA1</i>	79,04 af	80,06 b	72,88 j	85,33 cd	83,07 d	78,50 i
<i>TA2</i>	74,04 g	69,31 e	65,42 be	82,68 cg	73,26 b	71,63 c
<i>DR1</i>	36,90 i	36,39 h	39,85 g	42,43 j	40,28 g	43,27 f
<i>DR2</i>	54,71 bc	50,81 c	53,99 d	59,20 ab	55,56 c	59,91 b
<i>DR3</i>	55,11 bc	55,40 d	57,27 i	61,17 b	60,19 i	64,90 a
<i>DF1</i>	66,88 d	60,62 a	67,42 b	72,91 e	66,72 a	71,38 c
<i>DF2</i>	79,20 a	80,29 b	78,40 c	86,31 cd	82,51 d	84,06 d
<i>DF3</i>	80,01 a	83,21 bf	80,71 c	87,77 dh	86,94 e	89,08 j
<i>DP1</i>	50,03 e	45,69 i	52,49 d	55,84 a	49,48 h	58,42 b
<i>DP2</i>	58,79 c	60,04 a	60,97 a	66,68 k	65,39 a	65,13 a
<i>DP3</i>	70,75 df	62,81 a	68,11 b	77,90 f	71,41 b	74,91 h
<i>Pad</i>	84,71 j	86,07 f	79,93 c	90,16 h	87,56 e	85,63 d
F (15,33)	134,31*	180,46*	167,478	159,23*	381,26*	347,40*
M	63,83	61,40	61,54	70,02	65,91	67,00
DP	16,20	16,73	14,36	16,43	16,30	14,95
CV (%)	3,62	3,89	3,33	3,35	3,53	3,19

(1) Para cada variável, médias seguidas por letras iguais indicam não haver diferença significativa ao nível de 0,05 de probabilidade pelo teste de Duncan. (*) p < 0,001

A Tabela 15 mostra os valores do teste T para os cálculos de rendimento, nos diferentes experimentos.

Tabela 15. Teste T para valores de $Y_{P/M}$, nos experimentos 120, 150 e 180 g/L

	$Y_{P/M\ CLAE} \times Y_{P/M\ Fehling}$
120	$p = 0,0634^*$
150	$p = 0,1790^{ns}$
180	$p = 0,0680^*$

* O teste indicou haver diferença entre as técnicas ao nível de 93% de confiança (marginalmente significativa)

^{ns} não significativo

4.3. COMPARAÇÃO DO POTENCIAL FERMENTATIVO DOS VÁRIOS MELAÇOS, EM RELAÇÃO A UM MEIO SINTÉTICO PADRÃO

Através das análises dos produtos do metabolismo fermentativo e do açúcar residual, foi possível determinar os fatores para etanol, glicerol, CO₂, massa celular e açúcar residual e determinar o Potencial Fermentativo das várias amostras de melaço, utilizando-se o meio padrão como referência. Os valores obtidos dos fatores da fermentação e do Potencial Fermentativo de cada amostra estão descritos nas Tabelas 16, 16a e 16b.

A partir dos valores do Potencial Fermentativo, foi possível classificar as amostras em ordem crescente e compará-las em cada ensaio. A classificação das amostras está ilustrada nas Figuras 13, 13a, 14, 14a, 15 e 15a.

Tabela 16. Média de triplicatas para os valores de fatores obtidos por Fehling e por CLAE (Ensaio 120 g/L)

	Fehling						CLAE					
	FE	FC	FG	FAC	FARS	PF	FE	FC	FG	FAC	FARS	PF
TRI	0,5	15,6	-156,4	42,5	-796,3	-4091	-1,4	17,1	-152,3	43,5	-4182,4	-21033
TR2	102,6	-41,5	-507,3	42,0	-6104,3	-30075	-23,5	46,6	-129,2	78,1	-11227,1	-56387
BO1	-6,9	2,2	-119,7	22,6	-84,2	-600	-6,9	2,2	-119,6	22,6	-625,6	-3307
BO2	21,6	-1,7	-241,1	11,8	-436,5	-2207	-1,5	17,7	-176,3	28,4	-1968,9	-9993
TAI	0,4	-17,5	-114,3	30,2	-20,7	-242	-15,6	1,3	-80,2	41,4	57,4	63
TA2	3,3	7,3	-128,1	18,1	-198,2	-1067	-12,7	21,7	-92,5	30,6	-561,7	-2977
DR1	9,1	-2,4	-477,4	-52,6	-1824,6	-9527	-7,2	12,6	-391,7	-31,2	-7926,2	-40078
DR2	0,6	18,9	-337,8	-55,4	-711,6	-3866	-30,1	43,6	-204,6	-8,8	-2803,1	-14436
DR3	6,4	17,5	-208,1	-64,3	-803,9	-4145	-21,7	39,2	-127,1	-21,0	-3149,2	-16017
DF1	-0,5	20,8	-171,3	21,7	-392,3	-2091	-12,3	30,1	-139,3	31,1	-1893,1	-9660
DF2	-6,1	14,3	-76,0	51,8	-117,5	-682	-12,4	20,0	-64,1	55,1	-519,2	-2730
DF3	-3,3	-3,5	-75,0	31,6	-67,5	-445	-2,4	-4,5	-76,6	31,1	-152,7	-865
DPI	10,5	-1,0	-310,5	1,3	-1138,0	-5897	4,5	4,8	-287,5	6,0	-5760,3	-29033
DP2	7,8	6,8	-233,4	19,2	-723,7	-3756	-4,8	17,7	-194,6	28,6	-3162,2	-16012
DP3	2,1	19,0	-216,9	46,4	-322,0	-1757	19,7	5,0	-271,8	37,2	-1933,5	-9723

FE : fator etanol; FC : fator células; FG : fator glicerol; FAC : fator ácidos; FARS : fator açúcar residual; PF : Potencial Fermentativo

Tabela 16a. Média de triplicatas para os valores de fatores obtidos por Fehling e por CLAE (Ensaio 150 g/L)

	Fehling						CLAE					
	FE	FC	FG	FAC	FARS	PF	FE	FC	FG	FAC	FARS	PF
<i>TR1</i>	8,2	-5,5	-126,1	-42,6	-969,1	-4919	6,9	47,7	26,7	-5797,4	-1206,7	-8314
<i>TR2</i>	42,0	-28,9	-287,6	-79,8	-4231,6	-21086	18,9	34,1	73,0	-23794,5	-1700,9	-9556
<i>BO1</i>	37,2	-63,1	-225,5	-101,1	-436,5	-2165	35,7	26,3	31,1	-2859,7	-307,2	-2412
<i>BO2</i>	9,0	-14,3	-184,1	-37,3	-608,2	-3160	4,9	49,7	38,1	-3806,8	-545,8	-3364
<i>TA1</i>	-7,0	-15,5	-61,4	-45,2	0,4	-158	-3,6	46,8	31,6	-449,6	23,4	-54
<i>TA2</i>	6,1	-19,2	-130,7	-22,4	-281,0	-1504	4,1	55,1	48,2	-2001,7	-282,3	-1407
<i>DRI</i>	0,2	-20,1	-343,0	-72,6	-1710,3	-8938	-12,2	36,7	29,7	-9886,1	-1837,0	-10835
<i>DR2</i>	6,7	-24,8	-278,5	-11,1	-920,4	-4870	-6,5	59,3	49,9	-5529,0	-1067,6	-6096
<i>DR3</i>	15,5	-29,3	-184,9	-10,1	-873,1	-4451	-1,2	59,6	60,0	-5268,0	-796,0	-4766
<i>DF1</i>	-5,7	-14,5	-123,9	19,5	-513,9	-2779	-18,4	70,5	56,7	-3286,6	-671,3	-3342
<i>DF2</i>	5,5	-30,3	-51,6	9,8	-106,8	-591	-2,7	66,9	63,5	-1040,9	-111,7	-388
<i>DF3</i>	1,1	-20,1	-21,6	34,9	-59,1	-346	-6,1	76,1	72,7	-777,5	-31,5	7
<i>DPI</i>	-4,5	-7,0	-223,8	-18,7	-1100,7	-5786	-22,5	56,5	49,8	-6523,5	-1266,0	-6392
<i>DP2</i>	-5,1	-3,3	-155,7	-26,0	-543,1	-2928	-21,7	53,8	49,4	-3447,4	-530,5	-2712
<i>DP3</i>	17,9	-11,4	-243,3	15,6	-608,7	-3130	-0,6	69,1	54,4	-3809,4	-643,0	-3029

FE : fator etanol; FC : fator células; FG : fator glicerol; FAC : fator ácidos; FARS : fator açúcar residual; PF : Potencial Fermentativo

Tabela 16b. Média de triplicatas para os valores de fatores obtidos por Fehling e por CLAE (Ensaio 180 g/L)

	Fehling						CLAE					
	FE	FC	FG	FAC	FARS	PF	FE	FC	FG	FAC	FARS	PF
<i>TRI</i>	-10,8	3,6	-178,7	-39,5	-302,3	-1799	45,7	-57,6	-352,1	-132,0	-739,0	-3708
<i>TR2</i>	26,8	-21,7	-427,6	29,2	-1501,3	-7706	67,3	-60,8	-592,7	4,7	-2943,3	-14759
<i>BO1</i>	-4,7	-20,3	-250,5	31,1	-95,5	-805	28,0	-61,8	-367,9	5,7	-272,9	-1564
<i>BO2</i>	12,0	-24,7	-283,4	27,6	-189,8	-1157	27,3	-42,0	-333,8	16,0	-356,4	-1924
<i>TA1</i>	-7,5	-16,2	-170,2	60,8	-6,3	-297	30,0	-63,7	-277,9	43,9	-48,5	-337
<i>TA2</i>	-4,1	-17,6	-227,9	44,9	-84,7	-717	27,6	-56,7	-333,8	25,3	-181,3	-1069
<i>DR1</i>	42,4	-82,0	-579,7	-32,0	-877,4	-4705	14,0	-45,8	-440,7	-7,8	-1068,1	-5729
<i>DR2</i>	3,3	-25,4	-270,7	15,7	-281,5	-1694	23,6	-50,3	-341,2	-2,8	-498,7	-2698
<i>DR3</i>	20,1	-45,6	-289,6	40,8	-301,6	-1675	5,3	-27,9	-239,5	47,2	-327,0	-1874
<i>DF1</i>	2,3	-33,1	-222,4	18,9	-108,8	-810	12,2	-46,3	-251,5	9,6	-214,3	-1294
<i>DF2</i>	-2,5	-29,7	-139,1	47,4	14,8	-150	8,2	-44,2	-164,1	40,6	17,8	-82
<i>DF3</i>	4,6	-28,9	-104,6	40,0	12,8	-53	10,3	-36,2	-114,5	35,5	56,2	197
<i>DPI</i>	17,8	-37,0	-315,0	5,6	-402,3	-2222	1,3	-18,1	-255,6	17,3	-484,9	-2704
<i>DP2</i>	17,4	-34,0	-227,0	7,9	-259,5	-1418	19,7	-36,7	-231,3	4,8	-428,0	-2248
<i>DP3</i>	-3,2	2,7	-219,7	50,4	-96,8	-731	70,8	-72,0	-461,2	10,8	-307,4	-1434

FE : fator etanol; FC : fator células; FG : fator glicerol; FAC : fator ácidos; FARS : fator açúcar residual; PF : Potencial Fermentativo

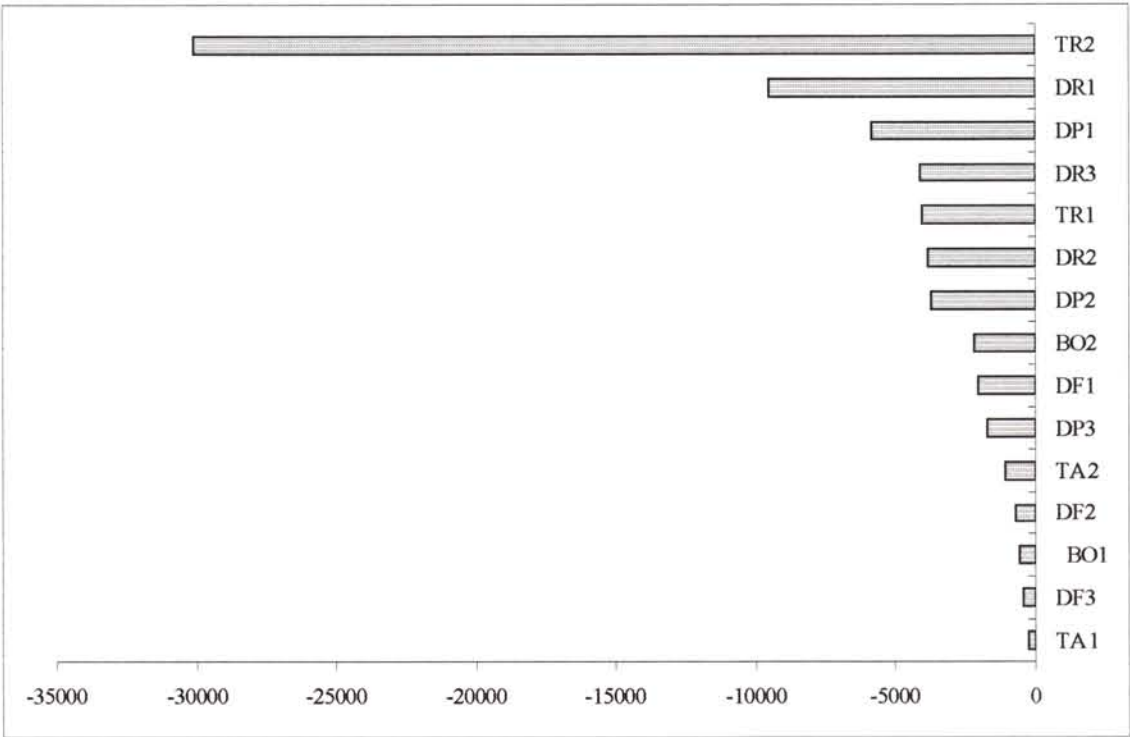


Figura 13. Amostras ordenadas segundo valores de Potencial Fermentativo (Fehling-120 g/L)

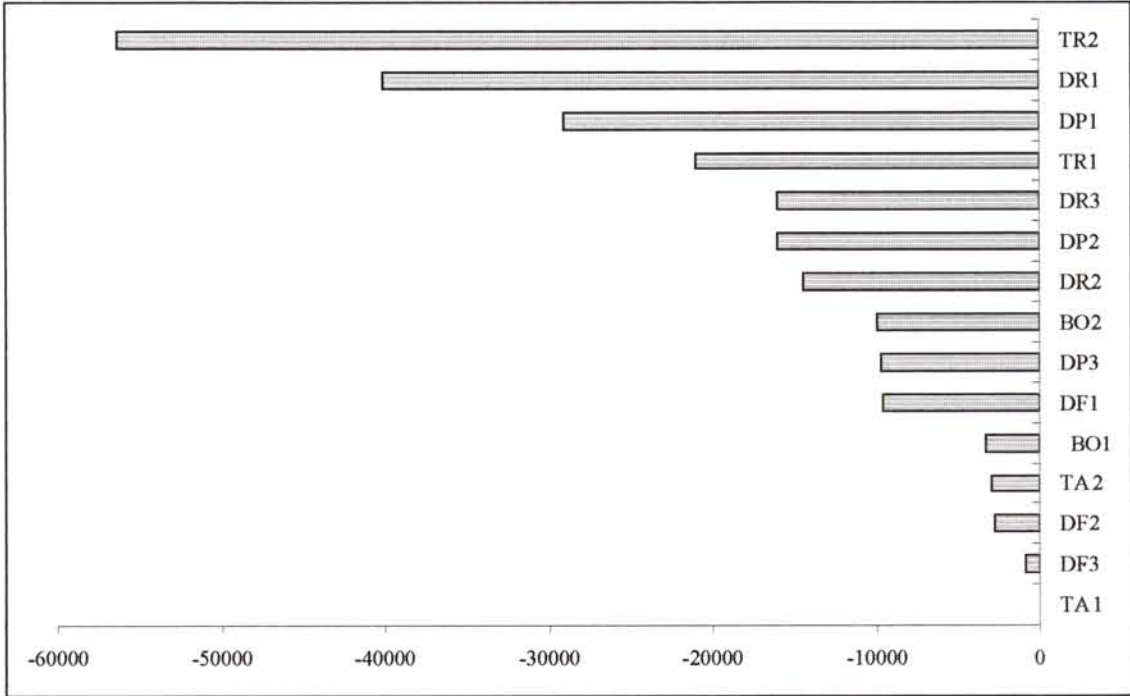


Figura 13a. Amostras ordenadas segundo valores de Potencial Fermentativo (CLAE-120 g/L)

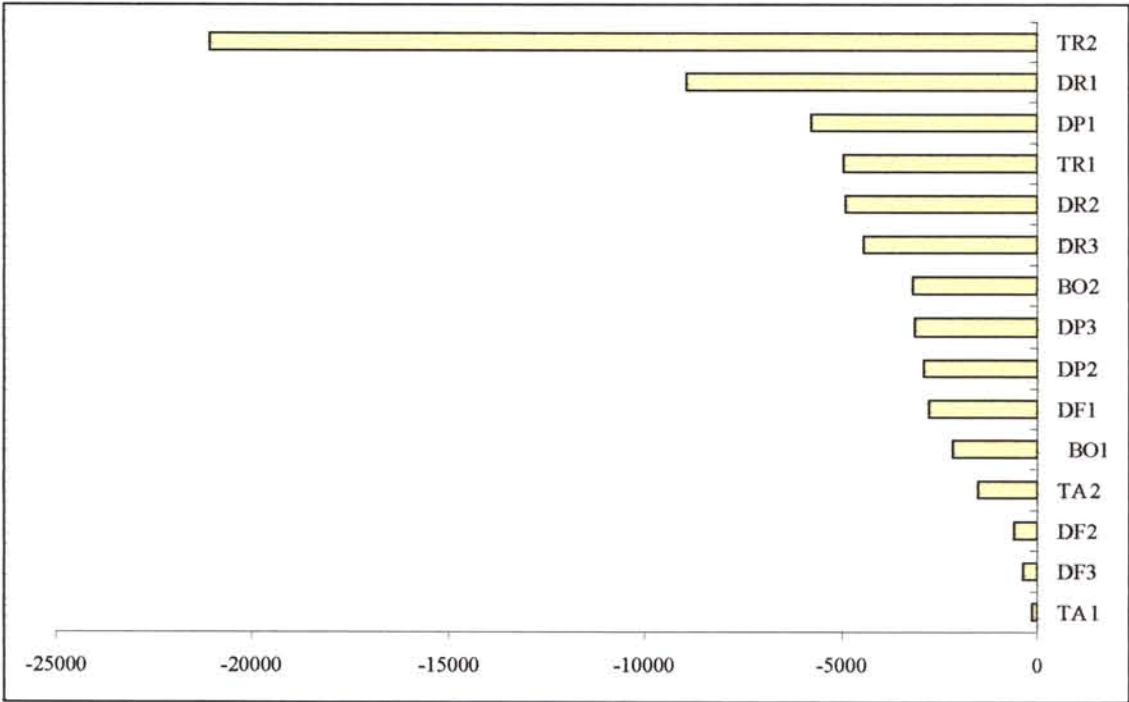


Figura 14. Amostras ordenadas segundo valores de Potencial Fermentativo (Fehling-150 g/L)

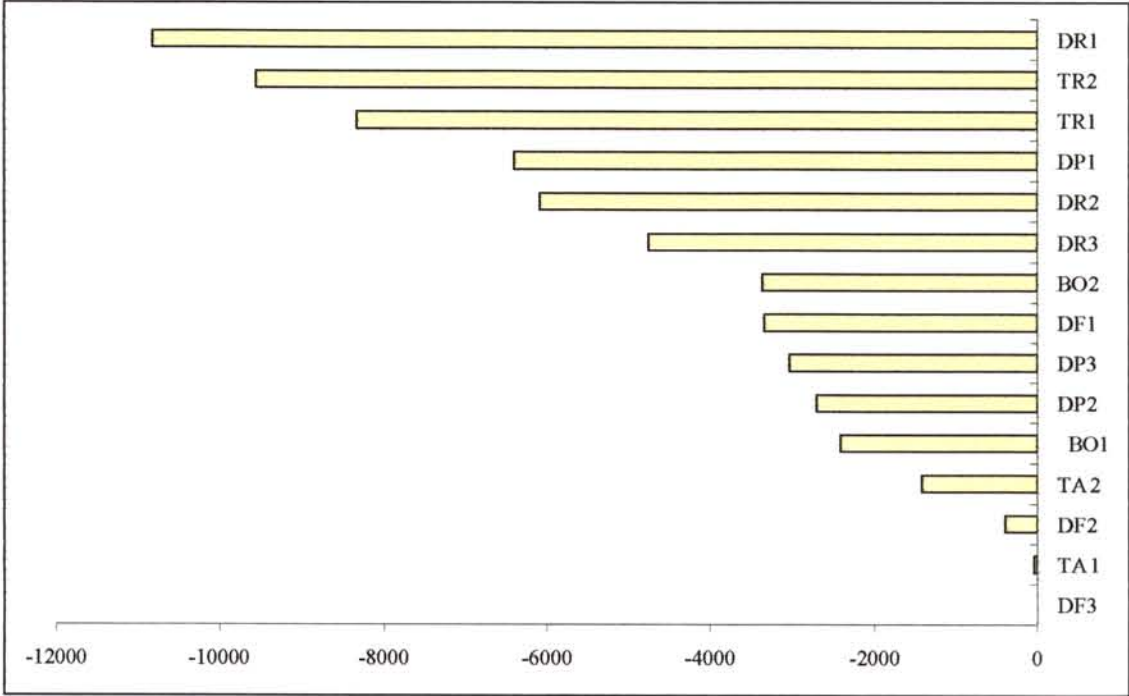


Figura 14a. Amostras ordenadas segundo valores de Potencial Fermentativo (CLAE-150 g/L)

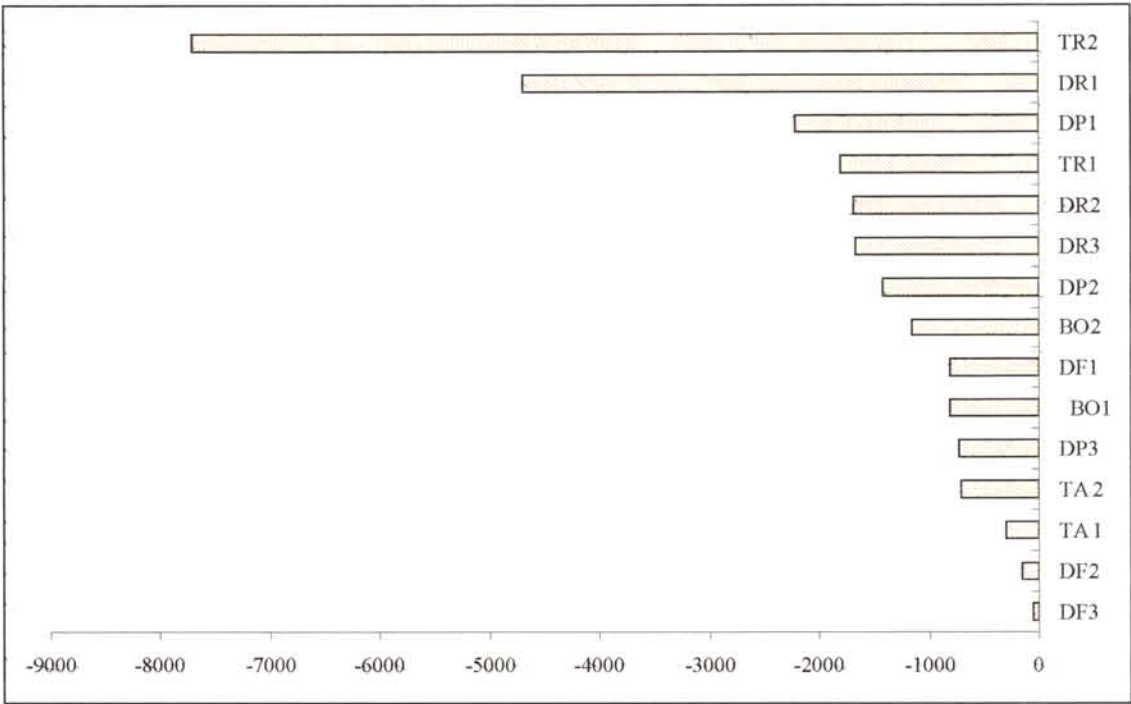


Figura 15. Amostras ordenadas segundo valores de Potencial Fermentativo (Fehling-180 g/L)

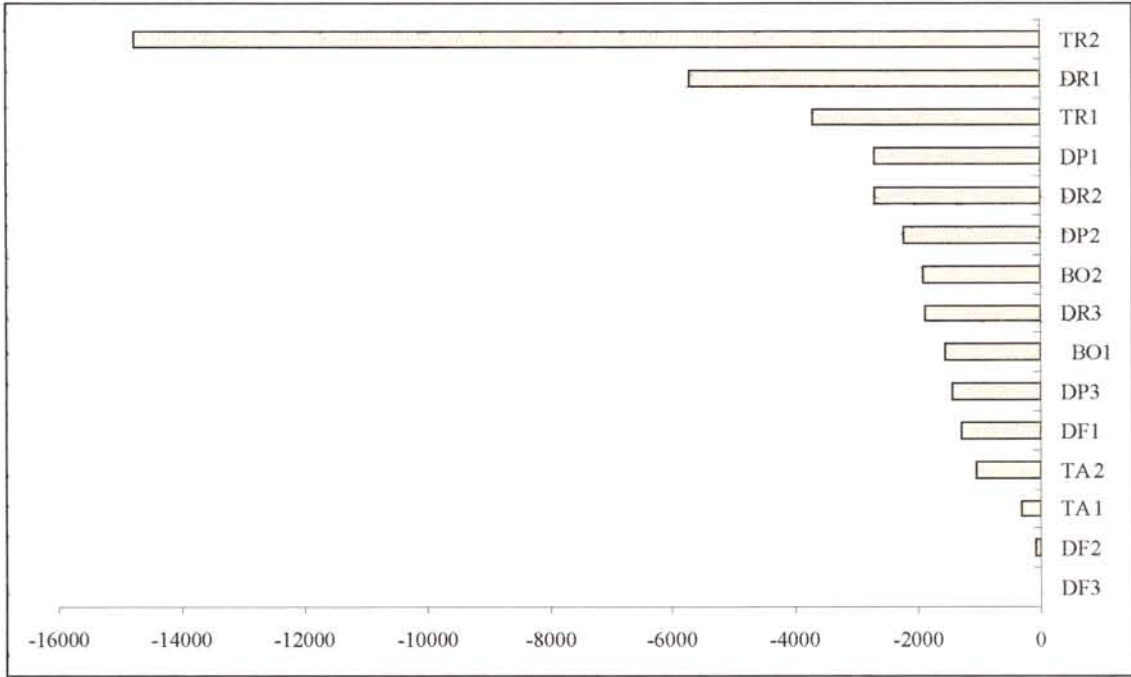


Figura 15a. Amostras ordenadas segundo valores de Potencial Fermentativo (CLAE-180 g/L)

Ao analisar as Figuras 13, 14 e 15, observa-se que na maioria dos casos as amostras que tiveram os mais baixos valores de Potencial Fermentativo foram : TR1, TR2, DR1, DP1 e as que apresentaram os mais altos valores, TA1, TA2, DF2 e DF3.

Com respeito às amostras TR1 e TR2, o fraco desempenho pode ser atribuído ao fato da Usina Trapiche, fornecedora dessas amostras, retirarem na fábrica de açúcar o máximo possível da sacarose, tornando-as altamente esgotadas, ou seja, com baixos teores de sacarose e elevadas concentrações de impurezas. Entretanto algumas amostras da Usina Diamante, que não esgota tanto seus melaços, apresentaram baixos valores de PF, classificando-se entre as piores amostras (DR1, DP1). Isso pode ser atribuído ao fato dos melaços serem matéria-prima de composição bastante variada, sendo que a amostra DR1 possui baixa concentração de nitrogênio e a amostra DP1 alta concentração de sulfito. Amostras mais esgotadas que as da usina Diamante e menos esgotadas que as da Trapiche, por exemplo as das Usinas Tamoio e Bonfim, revelaram um bom PF nos ensaios com 120 e 150 g/L de ART. Entretanto, no ensaio com 180 g/L estas mesmas amostras foram pior classificadas do que algumas amostras da Usina Diamante. Provavelmente, com o aumento da concentração de ART, alguns elementos passaram a desfavorecer a fermentação.

Apesar das usinas estabelecerem critérios e padrões de procedimento para fabricação do açúcar, existe uma série de fatores que tornam difícil a obtenção de melaços com as mesmas características e composição durante toda safra. Dentre estes, podem ser citados a colheita tardia da cana, longos períodos de chuva, armazenamento e condições operacionais inadequadas.

4.4. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO DO RENDIMENTO FERMENTATIVO EM FUNÇÃO DE VALORES DE SULFITO E NITROGÊNIO

A avaliação do comportamento do rendimento fermentativo (Y_{PM}) em função de valores de sulfito e nitrogênio estão ilustradas nas Figuras 16, 16a e 16b. Os valores de SO_3^{2-} e N foram corrigidos em função das diluições utilizadas para ajuste do ART do mosto.

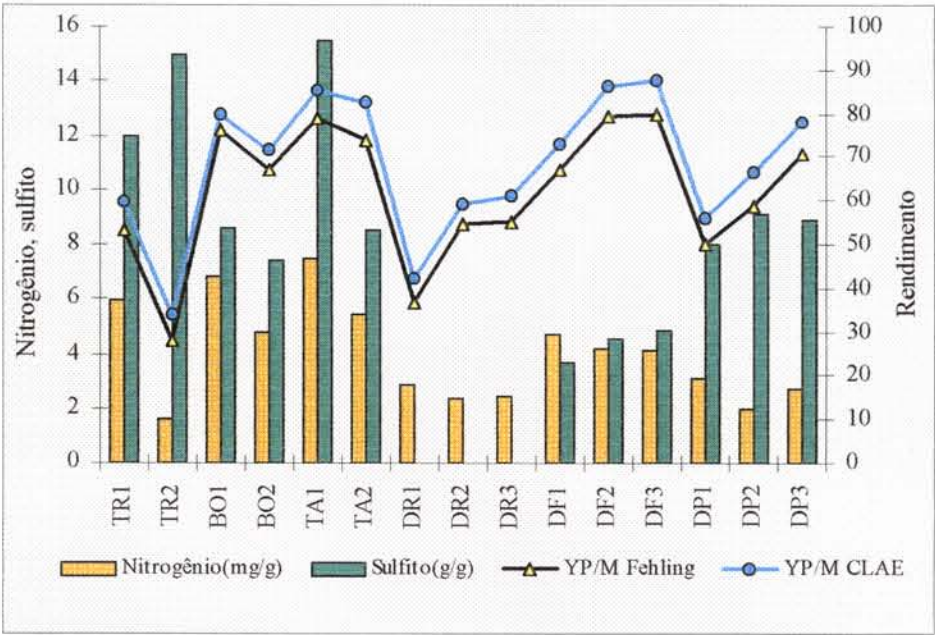


Figura 16. Comparação entre os valores de rendimento obtidos por Fehling e CLAE e concentrações de N e SO_3^{2-} (Experimento 120 g/L)

Os dados da Figura 16, mostraram uma correlação linear entre as técnicas analíticas ($R=0,99397$, $R^2=0,98799$), com valores de rendimento tendendo a diminuir com o aumento de concentração de sulfito e a aumentar com o aumento da concentração de nitrogênio. Isso pode ser evidenciado nas amostras com alto teor de sulfito e baixo teor de nitrogênio (TR2), onde o rendimento foi baixo, e nas amostras com alto teor de nitrogênio e médio teor de sulfito (BO1 e TA2), onde o rendimento foi superior. A equação de correlação entre as técnicas encontrada foi $Y=a+b \cdot x$, onde $Y=CLAE$ e $x=Fehling$ e valores de a e b , $-4,77485$ e $0,97979$, respectivamente.

Amostras como DP2 e DP3, cujo rendimento foi baixo ($\cong 65\%$), e que

apresentaram concentração de sulfito próxima à da amostra BO1 (alto rendimento $\cong$ 85%), continham menos da metade do valor de concentração de nitrogênio desta última, o que reforça a idéia de que esses elementos atuem de forma a terem seus efeitos somados ou anulados, atuando simultaneamente.

Verificou-se também que a curva do rendimento obtido com dados de açúcar determinados pelo método de Fehling, manteve-se sempre inferior à curva obtida com dados de açúcar determinados por CLAE.

O rendimento calculado levando-se em consideração os vários metabólitos produzidos pela levedura ($Y_{P/M}$), mostrou ser a melhor forma de cálculo, quando comparada com as demais $Y_{P/Sa}$ e $Y_{P/Sc}$, as quais demonstraram baixa correlação entre as técnicas e valores de rendimento acima de 100% (Anexo III).

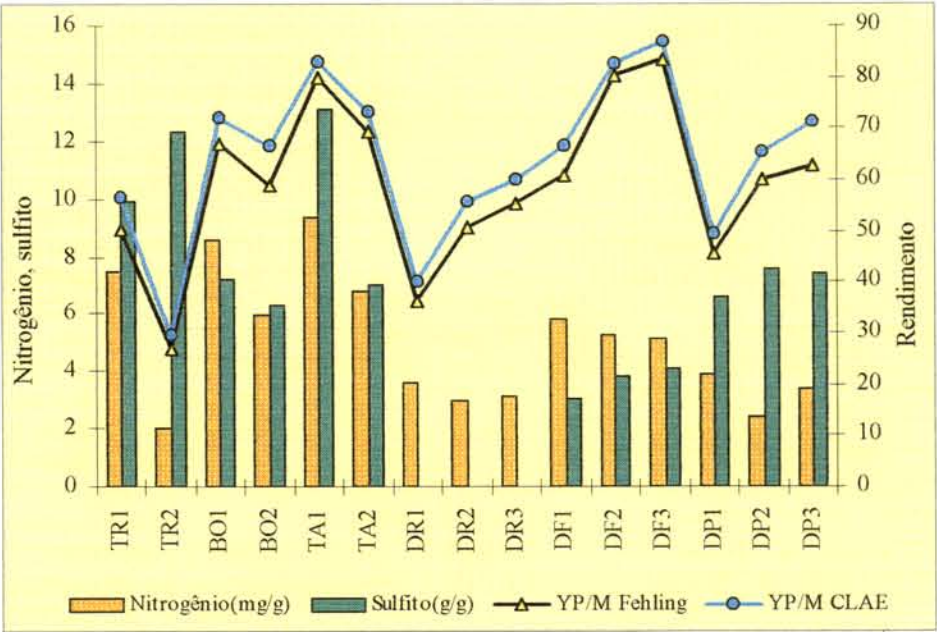


Figura 16a. Comparação entre os valores de rendimento obtidos por Fehling e CLAE e concentrações de N e SO₃⁻ (Experimento 150 g/L)

Após análise dos dados de rendimento ilustrados na Figura 16a, verificou-se correlação hiperbólica entre as técnicas ($R=0,99597$, $R^2=0,98799$). As amostras com mais baixos rendimentos foram as TR2, DR1 e DP1, assim como no ensaio de 120 g/L. A equação de correlação entre as técnicas encontrada foi $Y=x/(a+b*x)$, onde $Y=CLAE$ e

x=Fehling e valores de a e b, 1,13563 e -8,05543 E-04 respectivamente.

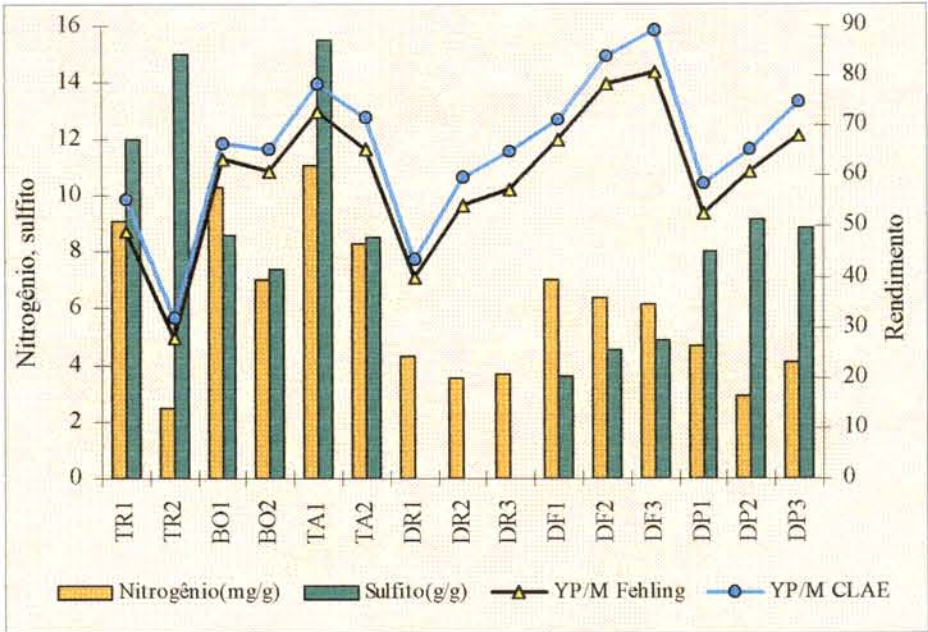


Figura 16b. Comparação entre os valores de rendimento obtidos por Fehling e CLAE e concentrações de N e SO₃²⁻ (Experimento 180 g/L)

Através da Figura 16b verifica-se comportamento similar ao obtido no ensaio com 150 g/L de ART, com relação ao desempenho das amostras. Pela análise dos dados de rendimento ilustrados nesta Figura, verificou-se correlação hiperbólica entre as técnicas ($R=0,99519$, $R^2=0,99042$). A equação encontrada de correlação entre as técnicas foi $Y=x/(a+b*x)$, onde $Y=CLAE$ e $x=Fehling$ e valores de a e b, 1,1654 e -1,08594 E-03 respectivamente.

4.5. AVALIAÇÃO DA PRODUTIVIDADE ALCOÓLICA DE AMOSTRAS DE MELAÇO FERMENTADAS

A produtividade horária de etanol (PHE), bem como a produtividade horária em relação à concentração celular (PHEC), são dados importantes para determinar a capacidade que uma determinada cepa tem em utilizar o substrato, ou seja, os açúcares do melaço e transformá-los em etanol.

O PHE, o PHEC, bem como as massas produzidas de etanol (MPE) e de células (MPC), estão relacionados e classificadas nas Tabelas 17, 17a e 17b.

Tabela 17. Média das triplicatas dos valores de PHE, PHEC, MPE e MPC (Ensaio com 120 g/L de ART)

	PHE	PHEC	MPE	MPC
<i>TR1</i>	0,15	0,42	3,68	0,37
<i>TR2</i>	0,08	0,50	1,82	0,15
<i>BO1</i>	0,27	0,33	6,45	0,81
<i>BO2</i>	0,23	0,42	5,53	0,55
<i>TA1</i>	0,26	0,30	6,19	0,86
<i>TA2</i>	0,25	0,39	5,98	0,64
<i>DR1</i>	0,13	0,37	3,11	0,35
<i>DR2</i>	0,14	0,44	3,47	0,33
<i>DR3</i>	0,15	0,45	3,55	0,33
<i>DF1</i>	0,21	0,44	5,00	0,47
<i>DF2</i>	0,22	0,39	5,18	0,56
<i>DF3</i>	0,21	0,33	5,00	0,64
<i>DP1</i>	0,13	0,39	3,06	0,33
<i>DP2</i>	0,15	0,41	3,51	0,36
<i>DP3</i>	0,18	0,44	4,37	0,41
<i>Pad</i>	0,18	0,26	4,25	0,51

PHE: produtividade horária de etanol; *PHEC*: produtividade horária de etanol em relação à concentração celular; *MPE*: massa produzida de etanol; *MPC*: massa produzida de células.

Tabela 17a. Média das triplicatas dos valores de PHE, PHEC, MPE e MPC (Ensaio com 150 g/L de ART)

	PHE	PHEC	MPE	MPC
<i>TR1</i>	0,18	0,43	4,25	0,41
<i>TR2</i>	0,08	0,47	1,99	0,18
<i>BO1</i>	0,30	0,36	7,27	0,85
<i>BO2</i>	0,26	0,40	6,30	0,65
<i>TA1</i>	0,31	0,34	7,52	0,92
<i>TA2</i>	0,28	0,38	6,70	0,74
<i>DR1</i>	0,15	0,35	3,62	0,43
<i>DR2</i>	0,17	0,36	4,18	0,48
<i>DR3</i>	0,18	0,38	4,29	0,47
<i>DF1</i>	0,24	0,35	5,69	0,68
<i>DF2</i>	0,26	0,34	6,21	0,75
<i>DF3</i>	0,26	0,36	6,18	0,72
<i>DP1</i>	0,14	0,38	3,43	0,38
<i>DP2</i>	0,18	0,39	4,22	0,45
<i>DP3</i>	0,21	0,45	5,07	0,47
<i>Pad</i>	0,21	0,32	5,00	0,49

PHE: produtividade horária de etanol; *PHEC*: produtividade horária de etanol em relação à concentração celular; *MPE*: massa produzida de etanol; *MPC*: massa produzida de células.

Tabela 17b. Média das triplicatas dos valores de PHE, PHEC, MPE e MPC (Ensaio com 180 g/L de ART)

	PHE	PHEC	MPE	MPC
<i>TR1</i>	0,20	0,44	4,89	0,46
<i>TR2</i>	0,10	0,49	2,44	0,21
<i>BO1</i>	0,35	0,38	8,33	0,92
<i>BO2</i>	0,32	0,43	7,58	0,74
<i>TA1</i>	0,36	0,38	8,55	0,94
<i>TA2</i>	0,33	0,39	7,92	0,85
<i>DR1</i>	0,19	0,37	4,66	0,52
<i>DR2</i>	0,22	0,39	5,34	0,57
<i>DR3</i>	0,23	0,39	5,57	0,59
<i>DF1</i>	0,31	0,36	7,44	0,85
<i>DF2</i>	0,32	0,36	7,73	0,90
<i>DF3</i>	0,32	0,39	7,73	0,84
<i>DPI</i>	0,20	0,41	4,84	0,49
<i>DP2</i>	0,22	0,42	5,30	0,53
<i>DP3</i>	0,27	0,47	6,37	0,56
<i>Pad</i>	0,32	0,48	7,70	0,67

PHE: produtividade horária de etanol; *PHEC*: produtividade horária de etanol em relação à concentração celular; *MPE*: massa produzida de etanol; *MPC*: massa produzida de células.

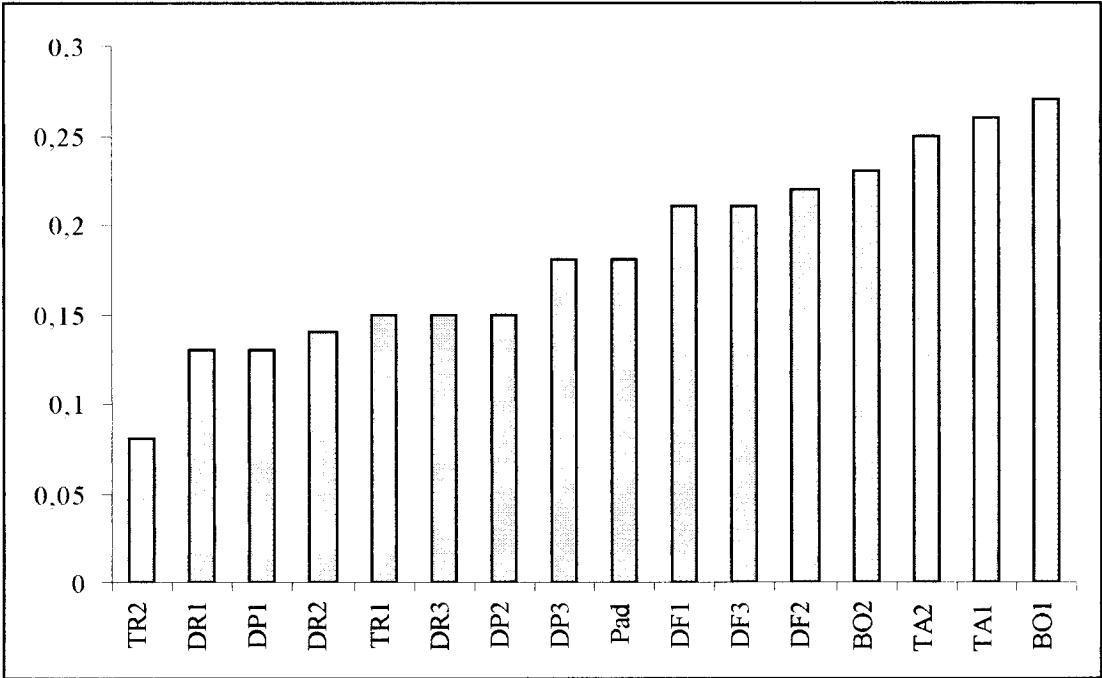


Figura 17. Classificação das amostras de melão quanto à produtividade alcoólica horária (Ensaio 120 g/L)

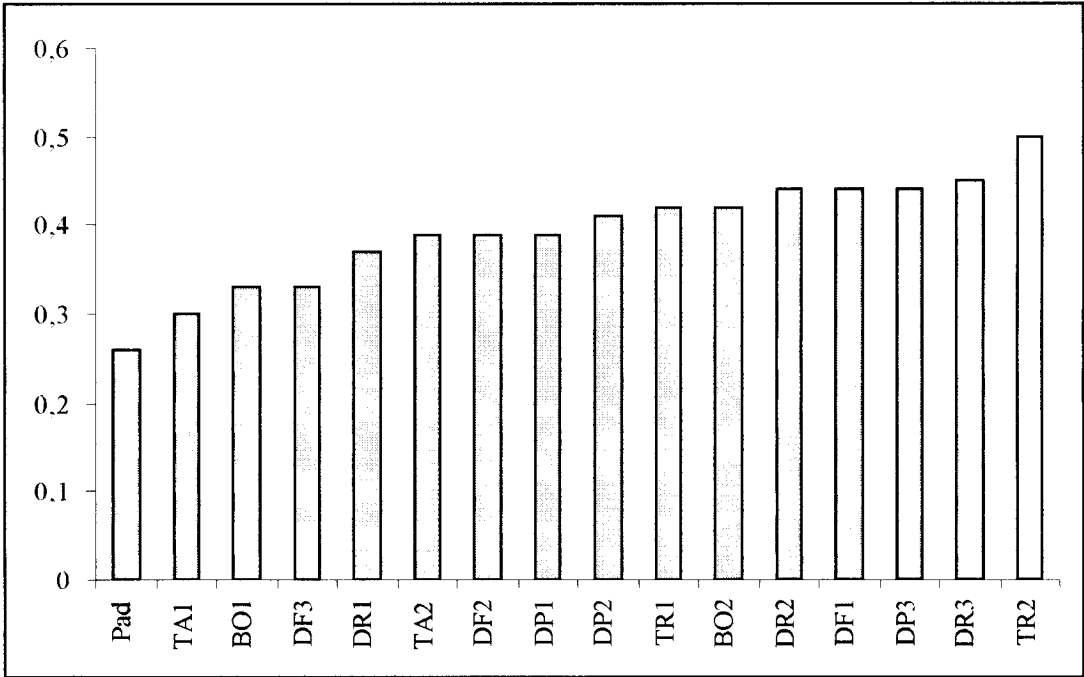


Figura 17a. Classificação das amostras de melão quanto à produtividade alcoólica horária celular (Ensaio 120 g/L)

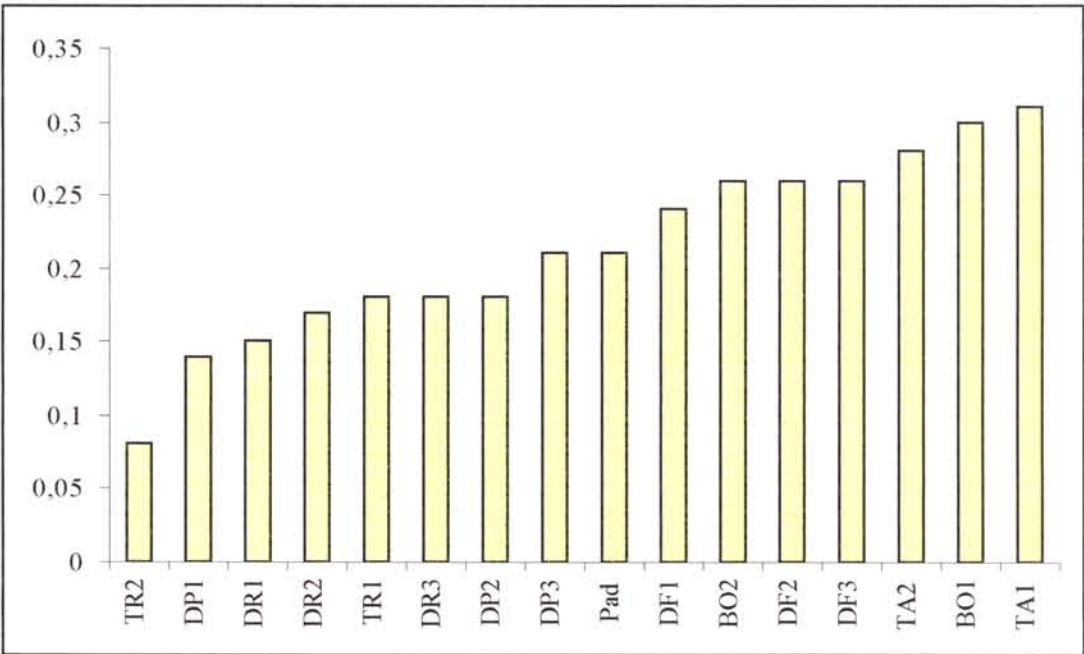


Figura 18. Classificação das amostras de melão quanto à produtividade alcoólica horária (Ensaio 150 g/L)

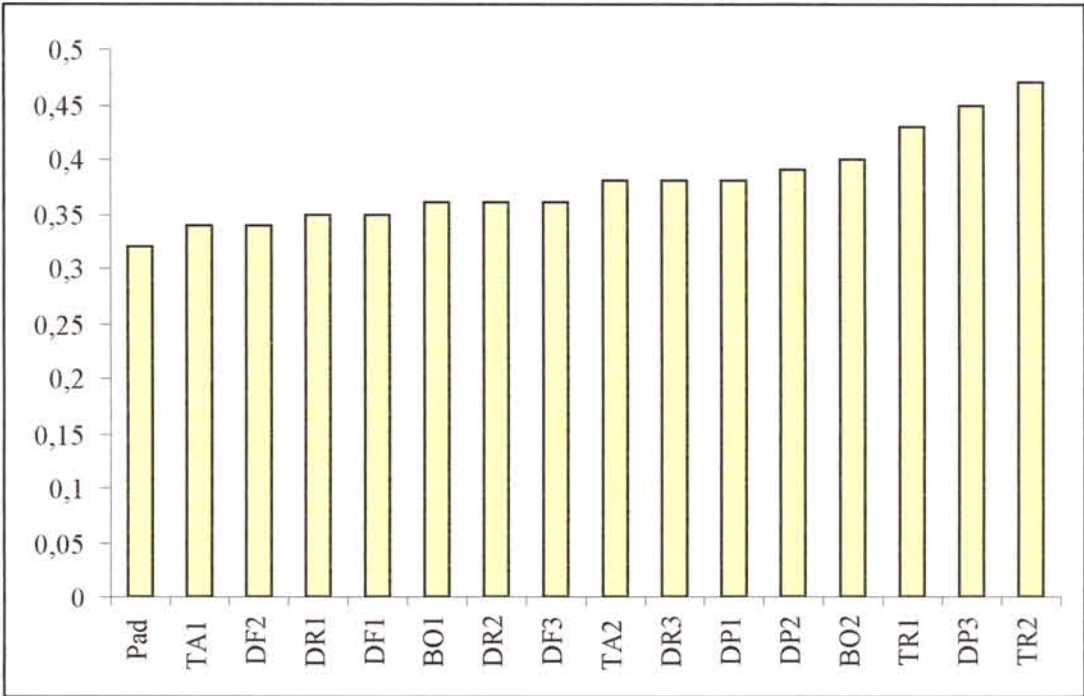


Figura 18a. Classificação das amostras de melão quanto à produtividade alcoólica horária celular (Ensaio 150 g/L)

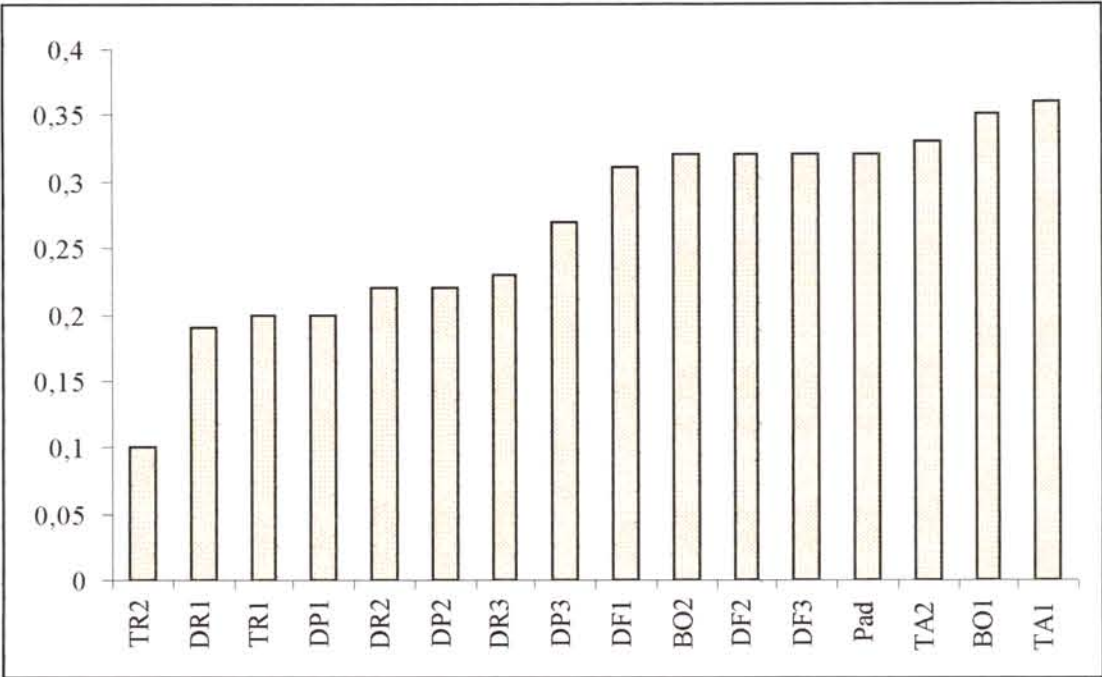


Figura 19. Classificação das amostras de melão quanto à produtividade alcoólica horária (Ensaio 180 g/L)

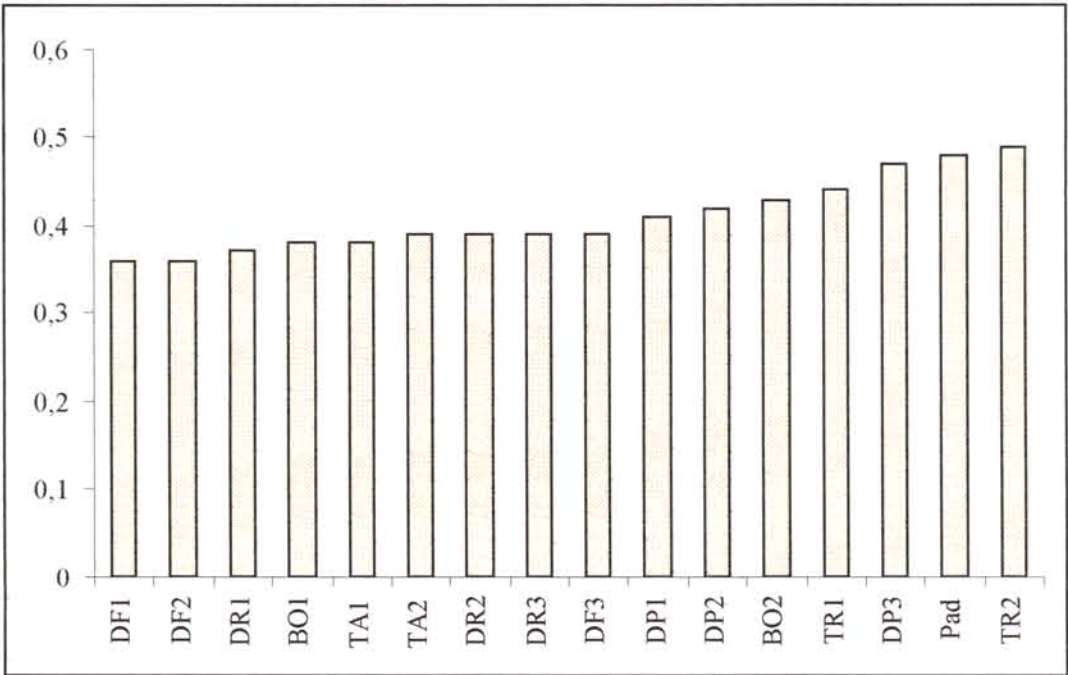


Figura 19a. Classificação das amostras de melão quanto à produtividade alcoólica horária celular (Ensaio 180 g/L)

As amostras que apresentaram melhor produtividade horária foram as amostras BO1, TA1 e TA2. As mais baixas produtividades foram observadas para TR1, TR2, DR1 e DP1. Com respeito à produtividade horária em relação à massa celular, as que permitiram obter maior valor, e conseqüentemente as que apresentaram menor produção de biomassa foram TR1, TR2, DR3, DP3. O contrário foi observado para as amostras BO1, TA1, DR1, DF1 e DF2.

5. CONCLUSÕES

- A análise estatística indicou haver diferença significativa (95% de confiança) entre as técnicas de Fehling e CLAE, para a determinação de ART em melaço (matéria-prima) e na fermentação (vinho). A análise também indicou haver diferença significativa entre as técnicas de Pol e CLAE para melaços.
- A utilização do cálculo de rendimento pelo uso dos metabólitos propicia uma curva com boa correlação quando compara-se a técnica de Fehling com CLAE.
- Cálculos de rendimento utilizando-se o açúcar alimentado ($Y_{P/Sa}$) ou o açúcar consumido ($Y_{P/Sc}$) analisado por Fehling, apresentaram grandes distorções em relação à análise cromatográfica (ANEXO III).
- Verificou-se que para a fermentação alcoólica com mostos à base de melaço, o nitrogênio favorece a produção de etanol e o sulfito a prejudica.
- Verificou-se que não existe correlação entre o desempenho fermentativo e a coloração dos melaços. Processamentos direcionados a obtenção de melaços altamente esgotados (amostras escuras), proporcionaram fermentações com desempenho superior aos melaços de menor exaustão (amostras claras).
- A técnica de Pol superestimou valores de sacarose não sendo indicada para determinação de pureza de melaços, confirmando dados de literatura de que compostos como dextrana e outros constituintes alteram o desvio rotatório.
- A afirmação de que ... "melaços esgotados prejudicam a fermentação e diminuem o rendimento", é parcialmente verdadeira e deve ser reavaliada, uma vez que amostras das Usinas Tamoio e Bonfim, processadas para alta exaustão da sacarose, revelaram em alguns ensaios desempenho superior às amostras da Usina Diamante, menos esgotadas. A afirmação procede quando verifica-se que amostras como a Trapiche 2, altamente esgotada, produz pouco etanol e fermenta lentamente.

6. SUGESTÕES

- Tendo em vista a boa correlação entre as técnicas de Fehling e CLAE para o cálculo de rendimento por metabólitos- $Y_{P/M}$ ($R=0,990$), e para a determinação de açúcares residuais no vinho-MARS ($R=0,980$), sugere-se a utilização da técnica de Fehling em usinas, pela facilidade de execução e baixo custo, e aplicação da equação $Y_{(Fehling)corrigido} = (Y_{(Fehling)determinado} + 3,99525)/0,97936$, para correção dos valores de rendimento. Pode-se também aplicar a correção para valores de açúcar residual, onde $MARS_{(Fehling)corrigido} = (MARS_{(Fehling)determinado} - 0,98041)/1,11253$, para correção dos valores de açúcar residual.
- Tendo em vista a boa correlação entre as técnicas de CG e colorimetria para a determinação de etanol ($R=0,9714$), e uma vez que verificou-se que a técnica de determinação de etanol por colorimetria superestima os resultados, sugere-se a análise pela técnica colorimétrica, mais simples e barata, e a correção do cálculo da massa de etanol produzido através da equação:

$$Etanol_{(colorimétrico)corrigido} = (Etanol_{(colorimétrico)determinado}/1,18085)^{0,99282}.$$

- Utilizar nos laboratórios de usinas as técnicas empregadas neste trabalho para a determinação da massa celular seca, glicerol, açúcar residual, CO_2 e acidez empregadas no cálculo de rendimento por metabólitos ($Y_{P/M}$). As técnicas encontram-se em literatura, são de fácil execução, baratas, rápidas e não requerem infra-estrutura complexa, uma vez que a maioria dos laboratórios de usinas dispõem de equipamentos como estufa, espectrofotômetro, balança analítica, destilador, reagentes, vidrarias, dentre outros.
- A determinação de nitrogênio caracteriza-se por ser uma técnica rápida, barata e de simples execução. Sugere-se a aplicação desta técnica em amostras de melaço, uma vez que verificou-se correlação direta entre a produção de etanol e níveis adequados deste elemento.

- A determinação de sulfito no melaço pode orientar a otimização da produção de etanol a partir de mostos à base de melaço de cana-de-açúcar, uma vez que níveis muito elevados deste elemento podem prejudicá-la, principalmente em melaços com baixos níveis de nitrogênio. Sugere-se sua aplicação no monitoramento da fermentação alcoólica, por tratar-se de uma técnica rápida, barata e de fácil execução.
- Na eventual possibilidade de alguma usina utilizar a técnica cromatográfica para análise de melaços de cana-de-açúcar, sugere-se a utilização de padrão interno apropriado, uma vez que o uso deste padrão minimiza erros provenientes das grandes diluições requeridas neste tipo de análise.
- Homogeneizar eficientemente as amostras para as determinações analíticas, uma vez que é muito comum melaços com precipitados em abundância.
- Uma vez que elementos, como por exemplo o potássio, podem beneficiar ou prejudicar a fermentação alcoólica em função de sua concentração no meio fermentativo, sugere-se um estudo da determinação do teor de cinzas nas amostras de melaço de cana-de-açúcar, avaliando-se seu efeito no rendimento fermentativo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYDEERA, W.P.P. High performance liquid chromatographic determination of sugars on cation exchange resins. **International Sugar Journal**, v. 85, n. 1018, p.300-306, 1983.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L.C.; ALVES,D.M.G. **Processos de produção de álcool** : Controle e monitoramento. Fermentec, Fealq - Esalq - USP, Piracicaba, 1996. 103p.
- ANDRIETTA, S.R. Conceitos de processos de fermentação alcoólica contínua. In: **Atualização Tecnológica na Indústria Sucroalcooleira** . Piracicaba, 1997. p.13-24.
- ANDRIETTA, S.R.; ANDRIETTA, M.G.S.; RODRIGUES, M.I. Método de caracterização de leveduras de processo utilizando parâmetros cinéticos e produção específica. **Stab** - Sociedade dos técnicos açucareiros e alcooleiros do Brasil. Açúcar, Álcool e Subprodutos, p.22-25, mar./abr., 1995.
- ARAUJO, B.E. Fundamentación del cambio de técnica da agotamiento en miel final basado en la determinación de la pureza real de la miel por cromatografia líquida de

- alta resolución HPLC. **International Sugar Journal**, v. 96, n. 1145, p.185-188, 1994.
- BINKLEY, N.W.; WOLFROM, M.L. Composition of cane juice and final molasses. **Advanced Carbohydrate Chemistry**, v.8, p.291-314, 1953.
- BIRCH, G.G. Gas liquid chromatography of food carbohydrates with special reference to trimethylsilyl derivatives. **Journal of Food Technology**, v.8, p.229, 1973.
- BORGES, M.T.M.R.; FERRARI, S.E.; STURION, A.C. Cromatografia líquida de alta eficiência na análise de açúcares: Um estudo preliminar. **Stab - Sociedade dos técnicos açucareiros e alcooleiros do Brasil. Açúcar, Álcool e Subprodutos**, p.38-42, mai./jun., 1984.
- BORZANI, W.; GERAB, A.; DELA HIGUERA, G.A.; PIRES, M.H.; PIPLOVIC, R. Batch ethanol fermentation of molasses : a correlation between the time necessary to complete the fermentation and the initial concentrations of sugar and yeast cells. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.9, p.265-268, 1993.
- BOSE, K.; GHOSE, T.K. Studies on continuous fermentation of indian cane sugar molasses by yeast. **Process Biochemistry**, p.23-25,33, Feb., 1973.
- CARVALHO, B. S. de **Efeito da temperatura na cinética de morte celular em fermentação alcoólica contínua com reciclo de células**. Campinas, 1996. 82p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- CLARKE, M.; TSANG, W.S. C. HPLC in sugar factories and refineries. **International Sugar Journal**, v.86, n.1028, p.215-220, 1984.
- CONTAL - Consultoria Tecnológica em açúcar e álcool. **Manual de controle para laboratório**. Piracicaba, 47p.

- COPERSUCAR - Cooperativa Central de Produtores de Açúcar e Alcool do Estado de São Paulo. **Manual de controle químico da fabricação de açúcar**. 1987. capítulo 4, métodos analíticos. p.1-50.
- DAMON, C.E.; PETTITT JR, B. C. High performance liquid chromatographic determination of fructose, glucose and sucrose in molasses. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, v.63, n.3, p.476-480, 1980.
- DIONEX **Technical Note 20** Analysis of carbohydrates by high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection(HPAEC-PAD) s.n.t, p.1-12, a.
- DIONEX **Technical Note 92** The determination of sugars in molasses by high performance anion exchange with pulsed amperometric detection. s.n.t, p.1-5, b.
- EDWARDS, W.T.; POHL, C.A.; RUBIN, R. Determination of carbohydrates using pulsed amperometric detection combined with anion exchange separations. **Tappi Journal**, v. 70, n. 6, p.138-140, 1987.
- EDWARDS, W.T.; ROCKLIN, R.D.; POHL, C.A. Recent advances in the analysis of carbohydrates using pulsed amperometric detection. In: **PITTSBURGH CONFERENCE AND EXPOSITION ON ANALYTICAL CHEMISTRY AN APPLIED SPECTROSCOPY**, 37.1986, Atlantic City. New Jersey. p.1-6.
- FINGUERUT, J.; ANDRIETTA, S.R.; RODRIGUES, M.I.; ROSSELL, C.E.V. **Novo método para determinação do rendimento da fermentação alcoólica**. COPERSUCAR - Centro de Tecnologia, Divisão Industrial, Coordenadoria de processos. Piracicaba. 11p.
- GUERREIRO, M. A. **Desenvolvimento de um sistema especialista para o projeto de unidades industriais de produção de álcool**. Campinas, 1995. 98p. Tese (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade

Estadual de Campinas.

HARDY, M.R.; TOWNSEND, R.R.; LEE, Y.C. Monosaccharide analysis of glycoconjugates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Analytical Biochemistry**, v.170, p.54-62, 1988.

HERBER, W.K.; ROBINETT, R.S.R. Determination of carbon sources in fermentation media using high performance anion exchange liquid chromatography and pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v.676, p.287-295, 1994.

HOI, Y.L.W.S. Gas-liquid chromatographic determination of fructose, glucose and sucrose in cane sugar products **International Society of Sugar Cane Technology**, p.68-72, 1980.

HORII, J.; GONÇALVES, R.H. Um método alternativo para a determinação de A.R. e A.R.T. **Stab** - Sociedade dos técnicos açucareiros e alcooleiros do Brasil. Açúcar, Alcool e Subprodutos, p.45-47, nov./dez., 1991.

JOHNSON, A.R. Sugar and sugar products. In: **OFFICIAL METHODS OF ANALYSIS OF THE ASSOCIATION OF ANALYTICAL CHEMISTS**. 14.ed. U.S.A.: Association of official analytical chemists, Inc. 1984. p.506-536.

JOHNSON, R.A.; LEFEBVRE, M.S. Desalting of molasses by counter diffusion in the fermentation industry. In: **CHEMISTRY AND PROCESSING OF SUGARBEET AND SUGARCANE**. New York: Elsevier, 1988. v.9, p.340-348.

KESKAR, V.S.; KOLEKAR, T.G. Sugar analysis of molasses by HPLC. In: **PROCEEDINGS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGARCANE TECHNOLOGISTS**, v.1, James H. Cock, 1995, Cartagena. Colombia, 1995, p.378-381.

KITCHEN, R.A. Polysaccharides of sugarcane and their effects on sugar manufacture.

In: **CHEMISTRY AND PROCESSING OF SUGARBEET AND SUGARCANE**. New York:Elsevier, 1988. v.9, 208-235.

LA COURSE, W.R.; JOHNSON, D.C. Optimization of waveforms for pulsed amperometric detection (P.A.D.) of carbohydrates following separation by liquid chromatography. **Carbohydrate Research**, v. 215, p.159-178, 1991.

LANE, J.H.; EYNON, L. **Determination of reducing sugar by Fehling's solution with methylene blue indicator**. London:Norman Rodge, 1934, 8p.

LEE, Y.C. High performance anion exchange chromatography for carbohydrate analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 189, p.151-162, 1990.

LEW, R. B. Replacement of lead by aluminium hydroxide for clarification of beet end samples. **International Sugar Journal**, v.88, n.1048, p.68-72, 1986.

LEWIS, M.J.; SCHÄFFLER, K.J. Analysis of sugars in final molasses by ion chromatography. In: **PROCEEDINGS OF SOUTH AFRICAN SUGAR TECHNOLOGISTS ASSOCIATION**, 1992, p.131-135.

MAKKEE, M.; KIEBOOM, A.P.G.; BEKKUM, H. VAN HPLC analysis of reaction mixtures containing monosaccharides and alditols. **International Sugar Journal**, v.87, n.1035, p.55-58, 63-65, 1985.

MELO, M. S. G.; COSTA, I.C.; MARTINS FILHO, G.; PINTO, F.G. Estudo comparativo da variação do valor da tonelada de cana, calculado através da sacarose polarimétrica e cromatográfica. **Stab** - Sociedade dos técnicos açucareiros e alcooleiros do Brasil. Açúcar, Álcool e Subprodutos, p.40-42, set./out., 1986.

MELO, M.S. G.; COSTA, I.C.; MARTINS FILHO, G.; PINTO, F.G.; SILVA, M.C.P. Análise de melaço. Cromatografia líquida x métodos tradicionais. p.391-392. In: **ANAIS DO CONGRESSO NACIONAL DA STAB**, 4. 1987, Olinda. Pernambuco,

753p.

- MELO, M.S. G.; PINTO, F.G.; MARTINS FILHO, G.; COSTA, I.C. Comparação entre a determinação de sacarose por polarimetria (Pol) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em amostras de caldo de cana. **Stab** - Sociedade dos técnicos açucareiros e alcooleiros do Brasil. Açúcar,Álcool e Subprodutos, p.37-40, mai./jun., 1985.
- MILLER, G.L. Use of dinitrosalysilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, p.426-428, 1959.
- NEUBURGER, G.G.; JOHNSON, D.C. Pulsed amperometric detection of carbohydrates at gold electrodes with a two step potencial waveform. **Analytical Chemistry**, v. 59, p.150-154, 1987.
- NOMURA, N.S.; KUHNLE, J.A.; HILTON, H.W. *Clean-up* procedures for the HPLC analysis of sucrose, glucose and fructose in hawaiian sugar cane products. **International Sugar Journal**, v.86, n.1029, p.244-250, 1984.
- OLBRICH, H. **O melão**: Sua importância e emprego,com especial referência à fermentação e a fabricação de levedura. Trad. de Alcides Serzedello. 3.ed. Rio de Janeiro: s.n., 1960. 153p.
- OLBRICH, H. **Melaços**. In : HONIG, P. **Principios de tecnologia azucarera**. 2.ed. México:Compañia Editorial Continental SA, 1974. v.3, p.425-575, 577p.
- OLECHNO, J.D.; CARTER, S.R.; EDWARDS, W.T.; GILLEN, D.G. **Developments in the chromatographic determination of carbohydrates**. Reprinted from American Biotechnology Laboratory, Sept-Oct., s.l., s.n., 1987.
- OLIVEIRA, A. J. de **Análise em cana de açúcar para efeito de pagamento** : Açúcares redutores - Princípios da oxiredutimetria. Métodos específicos de determinação.

Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo, 1968, 74p.

PIRISINO, J. High pressure liquid chromatography of carbohydrates in foods: Fixed ion resin and amine bonded silica columns. **Food and Science Technology**, v.11, p.159, 1984.

PULZATTO, M.D. **Ação do fósforo e do enxofre na clarificação do caldo de cana de açúcar**. Campinas, 1995. 77p. Tese (Mestre em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

RAJAKYLÄ, E. Use of reversed phase chromatography in carbohydrate analysis. **Journal of Chromatography**, v.353, p.1-12, 1986.

RAJAKYLÄ, E.; PALOPOSKI, M. Determination of sugars (and betaine) in molasses by high performance liquid chromatography comparison of the results with those obtained by the classical Lane Eynon method. **Journal of Chromatography**, v.282, p.603-608, 1983.

RAMM-SCHMIDT, L.H. Ion exchange for desugaring of molasses and byproduct isolation. In: **CHEMISTRY AND PROCESSING OF SUGARBEET AND SUGARCANE**. New York:Elsevier, 1988. v.9, 111-126.

ROBINETT, R.S.R.; HERBER, W.K. Analysis of substrates and metabolites in fermentation broth by ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.671, p.315-322, 1994.

ROCKLIN, R.D.; POHL, C.A. Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Liquid Chromatography**, v.6, p.1577-1590, 1983.

RODRIGUES, M.I.; ANDRIETTA, M.G.S. **Controle da fermentação alcoólica**

através de testes microbiológicos e bioquímicos. Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, jan. 1996, 70p.

ROSSEL, C.E.V. Sugarcane processing to ethanol for fuel purposes. In: **Chemistry and processing of sugarbeet and sugarcane.** New York:Elsevier,1988. v.9, 349-366.

SALIK, F.L.M.; POVH, N.P. Método espectrofotométrico para a determinação de teores alcoólicos em misturas hidroalcoólicas. **Processamento, engenharia industrial e derivados**, p.262-266, 1993.

SCHÄFFLER, K.J. HPLC a possible alternative to pol analysis for factory and molasses? **International Sugar Journal**, v. 92, n.1098, p.114-115, 1990.

SCHIWECK, H.; STEINLE, G. Analytical methods of sugar factories-new developments. In: **Chemistry and processing of sugarbeet and sugarcane.** New York:Elsevier, 1988. v.9, 146-161.

SCHLABACH, T.D.; ROBINSON, J. Improvements in sensitivity and resolution with the cyanoacetamide reaction for the detection of chromatographically separated reducing sugars. **Journal of Chromatography**, v.282, p.169-177, 1983.

SCOBELL, H.D.; BROBST, K.M.; STEELE, E.M. Automated liquid chromatographic system for analysis of carbohydrate mixtures. **Cereal Chemistry**, v.54, n.4, p.905-917, 1977.

SHAW, P. E.; WILSON, C. W. Separation of fructose, glucose and sucrose in fruit by high performance liquid chromatographic using u.v. detection at 190 nm. **Journal of Science Food Agricultural**, v.34, p.109-112, 1983.

SIER, K. **HPIC. The determination of sugars.** Arquivo bibliotecário da Acatec-Equipamentos para pesquisa científica, ensino e laboratório, São Paulo, s.n.t.

- SPENCER, E.; MEADE, G.P. **Cane Sugar Handbook** : a manual for cane sugar manufacturers and their chemists. 9.ed. John Wiley & Sons Inc., 1963.
- THOMPSON, J.C. **Methods for the determination of carbohydrates by ion chromatography**. Lantic Sugar Limited, Arquivo bibliotecário da Acatec-Equipamentos para pesquisa científica, ensino e laboratório, São Paulo, s.n.t., p.1-14.
- TOWNSEND, R.R.; HARDY, M.; OLECHNO, J.D.; CARTER, S.R. Chromatography of carbohydrates. **Nature**, v.335, n. 6188, p.379-380, 1988.
- TROTT, B. Polarimetria. **International Sugar Journal**, v.96, n.1150, p.425-426, 1994.
- TSANG, W.S.C.; CLARKE, M.A.; GODSHALL, M.A.; VALDES, M.M. Raw sugar analysis by chromatographic methods. **International Sugar Journal**, v.90, n.1072, p.71-75, 1988.
- VERHAAR, L.A.T.; KUSTER, B.F.M. Improved column efficiency in chromatographic analysis of sugars on cation exchange resins by use of water-triethylamine eluents. **Journal of Chromatography**, v.210, p.291-299, 1981.
- VIGNES, E.C. The determination of sucrose in cane final molasses. **Zeitschrift fur die Zuckerindustrie**, v.25, n.10, p.561-565, 1975.
- WATKINS, K.L.; VEUM, T.L.; KRAUSE, G.F. Total nitrogen determination of various sample types: a comparison of the Hach, Kjeltex, and Kjeldahl methods. **Journal of Association Official Analytical Chemistry**, v.70, n.3, 1987.
- WHITE JR, D. R.; WIDMER, W.W. Application of high performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection to sugar analysis in citrus juices. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.38, p.1918-1921, 1990.

- WIGHT, A.W.; NIEKERK, P.J.VAN A sensitive and selective method for determination of reducing sugars and sucrose in food and plant material by high performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v.10, p.211-224, 1983.
- WNUKOWSKI, M. Cane sugar invert analysis by HPLC utilizing a post-column derivatization reaction. **International Sugar Journal**, v.86, n.1026, p.170-175, 1984.
- WONG-CHONG, J; MARTIN, F.A Analysis of sugar cane saccharides by liquid chromatography 1. Adsorption chromatography with flow programming. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.27, n.5, p.927-929, 1979a.
- WONG-CHONG, J; MARTIN, F.A Analysis of sugar cane saccharides by liquid chromatography. 2. Ion exchange resins. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.27, n.5, p.929-932, 1979b.
- YANG, M.T.; MILLIGAN, L.P.; MATHISON, G.W. Improved sugar separation by high performance liquid chromatographic using porous microparticle carbohydrate columns. **Journal of Chromatography**, v.209, p.316-322, 1981.
- ZAGO, E.A.; SILVA, L.F.; AMORIM, H.V. Novo método de hidrólise e determinação potenciométrica para açúcares redutores e açúcares redutores totais. **Stab** - Sociedade dos técnicos açucareiros e alcooleiros do Brasil. Açúcar, Alcool e Subprodutos, p.40-42, mar./abr., 1992.

ANEXO I

Anexo Ia. Experimento 120 g/L

Amostra	Frasco vazio (g)	Frasco esterilizado (g)	Frasco inoculado (g)	Frasco fermentado (g)	Massa mosto (g)
TR1	173,49	276,76	286,77	283,22	103,27
TR1	161,05	264,19	274,25	270,96	103,14
TR1	167,85	271,6	281,66	278,5	103,75
TR2	155,07	255,41	265,42	264,17	100,34
TR2	150,99	251,53	261,51	260,22	100,54
TR2	167,89	269,15	279,11	277,87	101,26
BO1	155,54	259,03	269,19	263,01	103,49
BO1	156,9	260,86	270,96	264,99	103,96
BO1	155,82	260,05	270,08	264,2	104,23
BO2	154,2	257,66	267,66	262,86	103,46
BO2	154,7	258,46	268,42	263,42	103,76
BO2	153,75	256,91	266,92	262,11	103,16
TA1	156,59	261,28	271,4	265,42	104,69
TA1	167,21	272,06	282,2	276,2	104,85
TA1	164,93	268,71	278,76	272,69	103,78
TA2	158,84	264,03	274,01	268,68	105,19
TA2	168,85	273,35	283,28	277,86	104,50
TA2	170,5	274,75	284,8	279,61	104,25
DR1	160,49	263,38	273,36	270,01	102,89
DR1	169,08	273,5	283,64	281,14	104,42
DR1	169,55	271,77	281,76	279,28	102,22
DR2	169,19	269,87	279,83	277,09	100,68
DR2	171,25	272,45	282,43	279,72	101,20
DR2	162,07	263,09	273,18	270,3	101,02
DR3	167,37	268,93	279,03	276,23	101,56
DR3	166,86	268,25	278,38	275,54	101,39
DR3	167,05	267,9	278	275,22	100,85
DF1	168,29	270,24	280,25	276,31	101,95
DF1	171,72	273,55	283,75	279,64	101,83
DF1	166,51	269,24	279,26	275,32	102,73
DF2	168,02	270,47	280,29	276,14	102,45
DF2	166,83	268,22	278,27	273,85	101,39
DF2	170,32	272,94	282,99	278,57	102,62
DF3	171,52	271,42	281,54	277,12	99,90
DF3	170,28	272,04	282,11	277,71	101,76
DF3	165,4	266,16	276,22	271,72	100,76
DP1	166,78	267,75	277,7	275,61	100,97
DP1	169,17	271,03	281,04	278,96	101,86
DP1	168,64	269,43	279,15	276,85	100,79
DP2	168,97	269,83	279,95	277,39	100,86
DP2	167,58	268,12	278,09	275,59	100,54
DP2	167,53	268,22	278,19	275,6	100,69
DP3	168,88	270,24	280,17	276,81	101,36
DP3	168,12	270,21	280,31	276,96	102,09
DP3	169,01	271,43	281,48	278,17	102,42
Pad	167,79	269,97	280,05	274,89	102,18
Pad	168,67	270,03	280,1	274,88	101,36
Pad	164,85	267,67	277,7	272,53	102,82
Pad	164,76	266,72	276,85	271,63	101,96

TR : Usina Trapiche, *BO* : Usina Bonfim, *TA* : Usina Tamoio, *DR* : Usina Diamante (Mel rico), *DF* : Usina Diamante (Mel final),
DP : Usina Diamante (Mel pobre), Pad:Padrão

Anexo Ia. Experimento 120 g/L

Amostra	Massa inóculo (g)	Massa vinho (g)	Massa de CO2 (g)	Etanol (mL%)	Glicerol (mg%)	Massa seca (g/L)
TR1	10,01	109,73	3,55	4,60	562,59	3,4450
TR1	10,06	109,91	3,29	4,05	564,13	3,3800
TR1	10,06	110,65	3,16	4,10	564,13	3,3300
TR2	10,01	109,1	1,25	2,18	337,80	1,4550
TR2	9,98	109,23	1,29	1,96	328,56	1,4250
TR2	9,96	109,98	1,24	2,21	325,48	1,4050
BO1	10,16	107,47	6,18	7,69	944,42	7,6050
BO1	10,10	108,09	5,97	7,36	879,75	7,4350
BO1	10,03	108,38	5,88	7,41	932,10	7,2300
BO2	10,00	108,66	4,8	6,33	947,50	5,3200
BO2	9,96	108,72	5	6,24	904,39	5,0750
BO2	10,01	108,36	4,81	6,58	941,34	4,7450
TA1	10,12	108,83	5,98	7,39	833,56	8,0650
TA1	10,14	108,99	6	6,94	787,37	7,5400
TA1	10,05	107,76	6,07	7,22	773,52	8,1900
TA2	9,98	109,84	5,33	6,63	796,61	5,4950
TA2	9,93	109,01	5,42	7,08	810,47	6,2800
TA2	10,05	109,11	5,19	6,86	751,96	5,6750
DR1	9,98	109,52	3,35	3,68	950,58	3,2500
DR1	10,14	112,06	2,5	3,43	981,37	3,2750
DR1	9,99	109,73	2,48	3,63	1030,64	3,1050
DR2	9,96	107,9	2,74	3,93	913,63	3,2600
DR2	9,98	108,47	2,71	4,21	913,63	2,9250
DR2	10,09	108,23	2,88	3,93	907,47	3,0700
DR3	10,10	108,86	2,8	4,32	605,70	2,8500
DR3	10,13	108,68	2,84	3,99	639,57	3,1800
DR3	10,10	108,17	2,78	4,07	622,63	3,1150
DF1	10,01	108,02	3,94	5,77	824,33	4,3700
DF1	10,20	107,92	4,11	5,94	835,10	4,3100
DF1	10,02	108,81	3,94	5,60	796,61	4,3750
DF2	9,82	108,12	4,15	6,13	650,35	4,6950
DF2	10,05	107,02	4,42	5,94	596,46	4,6750
DF2	10,05	108,25	4,42	5,86	499,46	6,1150
DF3	10,12	105,6	4,42	5,66	516,40	5,9700
DF3	10,07	107,43	4,4	5,89	536,56	5,8700
DF3	10,06	106,32	4,5	5,95	593,35	5,8600
DP1	9,95	108,83	2,09	3,43	657,06	3,0550
DP1	10,01	109,79	2,08	3,29	700,00	3,0200
DP1	9,72	108,21	2,3	3,95	688,92	3,1300
DP2	10,12	108,42	2,56	4,11	654,29	3,3450
DP2	9,97	108,01	2,5	4,06	654,29	3,3700
DP2	9,97	108,07	2,59	4,09	665,37	3,3600
DP3	9,93	107,93	3,36	5,07	837,12	3,7350
DP3	10,10	108,84	3,35	4,89	814,96	3,8700
DP3	10,05	109,16	3,31	5,27	806,65	3,8500
Pad	10,08	107,1	5,16	6,41	344,04	6,1400
Pad	10,07	106,21	5,22	6,64	349,58	6,1750
Pad	10,03	107,68	5,17	6,56	303,39	6,2150
Pad	10,13	106,87	5,22	6,54	363,43	6,1700

TR : Usina Trapiche, *BO* : Usina Bonfim, *TA* : Usina Tamoio, *DR* : Usina Diamante (Mel rico), *DF* : Usina Diamante (Mel final),
DP : Usina Diamante (Mel pobre), Pad:Padrão

Anexo Ia.Experimento 120 g/L

Amostra			Fehling	CLAE	Fehling	CLAE
	Acidez -M (g/L)	Acidez -V (g/L)	ART-M (g/Kg)	ART-M (g/Kg)	ART-V (g/Kg)	ART-V (g/Kg)
TR1	1,41	2,33	121,13	115,63	49,09	31,62
TR1	1,41	2,33	121,13	115,63	49,14	37,59
TR1	1,41	2,27	121,13	115,63	50,41	41,02
TR2	0,55	0,80	105,5	119,17	77,96	61,40
TR2	0,55	0,80	105,5	119,17	95,71	61,06
TR2	0,55	0,67	105,5	119,17	80,69	66,44
BO1	0,55	2,88	147,4	152,91	16,16	10,63
BO1	0,55	3,12	147,4	152,91	18,84	12,60
BO1	0,55	3,00	147,4	152,91	22,91	11,94
BO2	0,37	1,96	124,3	143,85	38,98	27,40
BO2	0,37	2,27	124,3	143,85	33,70	25,96
BO2	0,37	2,33	124,3	143,85	37,67	27,47
TA1	0,80	2,76	123,83	147,76	14,76	1,02
TA1	0,80	2,51	123,83	147,76	6,66	0,76
TA1	0,80	3,00	123,83	147,76	12,15	0,41
TA2	0,31	2,20	132,69	148,17	32,39	11,12
TA2	0,31	2,63	132,69	148,17	22,87	9,09
TA2	0,31	2,51	132,69	148,17	21,53	11,09
DR1	0,12	2,08	143,53	136,14	85,74	63,80
DR1	0,12	2,27	143,53	136,14	72,90	58,99
DR1	0,12	1,78	143,53	136,14	87,56	63,93
DR2	0,18	1,71	110,12	137,44	45,88	36,17
DR2	0,18	3,12	110,12	137,44	44,40	33,92
DR2	0,18	3,06	110,12	137,44	36,33	30,45
DR3	0,06	2,51	112,04	129,99	46,95	34,01
DR3	0,06	2,63	112,04	129,99	45,11	34,26
DR3	0,06	2,39	112,04	129,99	45,65	35,00
DF1	0,43	2,08	134,33	145,67	39,06	27,48
DF1	0,43	2,63	134,33	145,67	36,51	23,41
DF1	0,43	1,94	134,33	145,67	36,47	28,01
DF2	0,55	1,78	119,83	128,06	18,99	8,88
DF2	0,55	1,94	119,83	128,06	17,72	7,74
DF2	0,55	1,59	119,83	128,06	17,60	8,84
DF3	0,06	1,78	109,32	107,35	13,59	3,09
DF3	0,06	1,47	109,32	107,35	9,53	3,23
DF3	0,06	1,84	109,32	107,35	16,29	2,78
DP1	0,18	1,29	107,76	103,38	53,82	39,10
DP1	0,18	1,16	107,76	103,38	54,83	43,70
DP1	0,18	1,78	107,76	103,38	45,06	36,21
DP2	0,06	1,41	104,76	105,79	40,53	28,50
DP2	0,06	1,16	104,76	105,79	40,32	26,92
DP2	0,06	1,16	104,76	105,79	41,79	29,03
DP3	0,31	1,41	108,03	92,66	27,59	16,89
DP3	0,31	1,29	108,03	92,66	29,01	19,97
DP3	0,31	1,29	108,03	92,66	25,67	14,88
Pad	0,33	2,82	112,33	116,07	8,21	1,45
Pad	0,33	3,00	112,33	116,07	8,19	0,72
Pad	0,31	2,88	110,67	113,44	8,23	1,43
Pad	0,31	3,12	110,67	113,44	9,56	1,65

TR : Usina Trapiche, BO : Usina Bonfim, TA : Usina Tamoio, DR : Usina Diamante (Mel rico), DF : Usina Diamante (Mel final), DP : Usina Diamante (Mel pobre), Pad:Padrão, M: Mosto, V: Vinho

Anexo Ib. Experimento 150 g/L

Amostra	Frasco vazio (g)	Frasco esterilizado (g)	Frasco inoculado (g)	Frasco fermentado (g)	Massa mosto (g)
TR1	171,91	277,3	287,42	283,45	105,39
TR1	159,46	263,88	273,91	269,9	104,42
TR1	172,28	278,54	288,59	284,95	106,26
TR2	159,64	262,39	272,5	270,96	102,75
TR2	159,18	261,67	271,8	270,26	102,49
TR2	162,15	263,59	273,75	272,22	101,44
BO1	154,34	261,92	272,07	265,46	107,58
BO1	156,74	264,31	274,32	267,68	107,57
BO1	156,7	263,69	273,77	267,12	106,99
BO2	158,4	264,55	274,57	269,09	106,15
BO2	156,89	262,64	272,69	267,11	105,75
BO2	155,79	261,59	271,66	265,93	105,80
TA1	149,77	255,78	265,92	258,56	106,01
TA1	166,77	272,81	282,94	275,81	106,04
TA1	167,44	273,23	283,27	276,19	105,79
TA2	169,31	275,65	285,74	279,72	106,34
TA2	168,03	275,77	285,84	279,81	107,74
TA2	166,6	274,11	284,16	278,02	107,51
DR1	166,26	270,18	280,28	277,31	103,92
DR1	165,61	270,1	280,28	277,34	104,49
DR1	166,2	271,51	281,65	278,78	105,31
DR2	168,68	271,97	282,06	278,6	103,29
DR2	164,8	268,14	278,23	274,86	103,34
DR2	168,98	271,68	281,77	278,44	102,70
DR3	168,37	271,36	281,44	278,01	102,99
DR3	169,62	273,12	283,23	279,92	103,50
DR3	167,02	270,7	280,83	277,43	103,68
DF1	166,37	270,83	280,89	276,32	104,46
DF1	169,85	275,72	285,84	281,36	105,87
DF1	167,73	272,85	282,95	278,38	105,12
DF2	164,26	269,5	279,5	274,16	105,24
DF2	168	272,34	282,45	277,15	104,34
DF2	169,17	273,57	283,67	278,46	104,40
DF3	169,07	273,23	283,26	278,06	104,16
DF3	168,57	273,89	283,98	278,68	105,32
DF3	167,56	272,55	282,69	277,32	104,99
DP1	157,42	260,36	270,34	267,76	102,94
DP1	169,2	272,4	282,51	279,92	103,20
DP1	166,83	270,79	280,86	278,32	103,96
DP2	169,55	272,34	282,5	279,22	102,79
DP2	166,77	270,16	280,26	277,18	103,39
DP2	168,06	271,49	281,63	278,36	103,43
DP3	163,79	267,57	277,65	273,77	103,78
DP3	169,8	272,98	283,07	279,02	103,18
DP3	167,75	271,87	281,96	278,07	104,12
Pad	168,39	271,17	281,31	275,38	102,78
Pad	162,61	265,29	275,31	269,33	102,68
Pad	170,21	273,98	283,96	277,96	103,77
Pad	169,65	272,7	282,8	276,74	103,05

TR : Usina Trapiche, BO : Usina Bonfim, TA : Usina Tamoio, DR : Usina Diamante (Mel rico), DF : Usina Diamante (Mel final), DP : Usina Diamante (Mel pobre), Pad:Padrão

Anexo 1b. Experimento 150 g/L

Amostra	Massa inóculo (g)	Massa vinho (g)	Massa de CO2 (g)	Etanol (mL%)	Glicerol (mg%)	Massa seca (g/L)
TR1	10,12	111,54	3,97	5,01	711,08	3,8850
TR1	10,03	110,44	4,01	5,24	627,98	3,9550
TR1	10,05	112,67	3,64	4,71	627,98	3,6350
TR2	10,11	111,32	1,54	2,30	395,29	1,6650
TR2	10,13	111,08	1,54	2,23	392,52	1,7450
TR2	10,16	110,07	1,53	2,51	421,61	1,7000
BO1	10,15	111,12	6,61	8,39	1295,16	7,8450
BO1	10,01	110,94	6,64	8,53	1248,88	7,8900
BO1	10,08	110,42	6,65	8,53	1254,66	7,9150
BO2	10,02	110,69	5,48	7,26	1176,57	6,0150
BO2	10,05	110,22	5,58	7,26	1141,87	6,0500
BO2	10,07	110,14	5,73	7,63	1318,29	6,1150
TA1	10,14	108,79	7,36	8,92	904,70	8,9450
TA1	10,13	109,04	7,13	8,84	1052,21	8,4750
TA1	10,04	108,75	7,08	8,87	948,08	8,3950
TA2	10,09	110,41	6,02	7,80	1115,84	6,8850
TA2	10,07	111,78	6,03	7,71	959,65	6,8650
TA2	10,05	111,42	6,14	7,94	1130,30	6,8400
DR1	10,10	111,05	2,97	4,28	1150,54	3,9650
DR1	10,18	111,73	2,94	4,23	1167,90	3,9550
DR1	10,14	112,58	2,87	4,17	1208,39	4,0250
DR2	10,09	109,92	3,46	4,87	1156,33	4,5550
DR2	10,09	110,06	3,37	4,87	1098,48	4,4550
DR2	10,09	109,46	3,33	4,93	1023,28	4,4650
DR3	10,08	109,64	3,43	5,07	820,82	4,4500
DR3	10,11	110,3	3,31	4,90	757,19	4,4550
DR3	10,13	110,41	3,4	5,07	751,41	4,3100
DF1	10,06	109,95	4,57	6,59	991,47	6,4100
DF1	10,12	111,51	4,48	6,53	956,76	6,2200
DF1	10,10	110,65	4,57	6,76	1020,39	6,2400
DF2	10,00	109,9	5,34	7,24	699,35	6,9500
DF2	10,11	109,15	5,3	7,41	667,53	7,0900
DF2	10,10	109,29	5,21	7,04	598,12	6,9050
DF3	10,03	108,99	5,2	7,12	534,49	6,7050
DF3	10,09	110,11	5,3	6,95	522,92	6,5950
DF3	10,14	109,76	5,37	7,42	569,20	6,6650
DP1	9,98	110,34	2,58	4,11	791,90	3,5100
DP1	10,11	110,72	2,59	3,87	939,41	3,5400
DP1	10,07	111,49	2,54	4,02	823,72	3,5200
DP2	10,16	109,67	3,28	4,78	658,86	4,1350
DP2	10,10	110,41	3,08	4,84	923,78	4,2650
DP2	10,14	110,3	3,27	5,13	923,78	4,1950
DP3	10,08	109,98	3,88	5,84	1094,05	4,4850
DP3	10,09	109,22	4,05	6,01	1077,84	4,3400
DP3	10,09	110,32	3,89	5,92	1088,65	4,3800
Pad	10,14	106,99	5,93	7,65	510,54	6,0600
Pad	10,02	106,72	5,98	7,86	494,32	6,2450
Pad	9,98	107,75	6	7,97	471,35	6,0900
Pad	10,10	107,09	6,06	7,71	483,51	6,0000

TR : Usina Trapiche, *BO* : Usina Bonfim, *TA* : Usina Tamoio, *DR* : Usina Diamante (Mel rico), *DF* : Usina Diamante (Mel final),
DP : Usina Diamante (Mel pobre), Pad:Padrão

Anexo Ib. Experimento 150 g/L

Amostra			Fehling	CLAE	Fehling	CLAE
	Acidez -M (g/L)	Acidez -V (g/L)	ART-M (g/Kg)	ART-M (g/Kg)	ART-V (g/Kg)	ART-V (g/Kg)
TR1	0,31	2,08	150,45	122,52	65,70	49,17
TR1	0,31	1,84	150,45	122,52	64,48	47,43
TR1	0,31	1,84	150,45	122,52	67,18	50,26
TR2	0,43	1,10	134,33	177,29	97,55	82,91
TR2	0,43	1,22	134,33	177,29	94,22	83,72
TR2	0,43	1,10	134,33	177,29	94,87	82,82
BO1	0,18	3,43	153,62	171,95	47,72	31,96
BO1	0,18	3,25	153,62	171,95	46,40	31,32
BO1	0,18	3,25	153,62	171,95	38,30	28,82
BO2	0,43	2,69	184,24	159,07	74,36	42,57
BO2	0,43	2,82	184,24	159,07	57,24	42,37
BO2	0,43	2,82	184,24	159,07	58,82	36,83
TA1	0,55	3,67	175,25	162,09	11,81	3,76
TA1	0,55	4,35	175,25	162,09	14,44	8,07
TA1	0,55	4,29	175,25	162,09	11,83	7,58
TA2	0,43	2,82	165,88	163,49	43,05	28,24
TA2	0,43	2,63	165,88	163,49	36,38	28,66
TA2	0,43	2,63	165,88	163,49	32,49	26,43
DR1	0,18	2,33	184,24	173,33	98,28	85,49
DR1	0,18	1,78	184,24	173,33	104,31	83,84
DR1	0,18	1,84	184,24	173,33	103,26	84,27
DR2	0,55	1,90	146,88	133,10	60,48	49,07
DR2	0,55	1,78	146,88	133,10	64,56	50,41
DR2	0,55	1,84	146,88	133,10	62,39	49,74
DR3	0,24	1,41	135,97	141,21	62,27	45,93
DR3	0,24	1,41	135,97	141,21	55,06	45,26
DR3	0,24	1,53	135,97	141,21	51,08	43,29
DF1	0,67	2,02	182,72	146,64	60,25	42,71
DF1	0,67	2,14	182,72	146,64	56,26	40,42
DF1	0,67	2,14	182,72	146,64	56,26	43,22
DF2	0,67	2,45	136,83	146,72	13,25	18,73
DF2	0,67	2,20	136,83	146,72	19,27	12,50
DF2	0,67	2,20	136,83	146,72	23,76	13,76
DF3	0,67	2,02	136,42	139,68	15,92	9,76
DF3	0,67	1,90	136,42	139,68	13,28	9,73
DF3	0,67	1,71	136,42	139,68	15,94	8,42
DP1	0,18	1,59	144,91	138,42	64,64	56,87
DP1	0,18	1,41	144,91	138,42	68,56	56,57
DP1	0,18	1,29	144,91	138,42	68,10	56,58
DP2	0,18	1,84	135,97	135,48	47,34	34,64
DP2	0,18	1,84	135,97	135,48	46,07	36,85
DP2	0,18	1,84	135,97	135,48	39,49	30,18
DP3	0,55	1,71	137,66	103,56	42,12	30,13
DP3	0,55	1,59	137,66	103,56	56,71	29,10
DP3	0,55	1,59	137,66	103,56	42,04	27,86
Pad	0,92	2,82	141,21	144,95	15,45	9,58
Pad	0,92	3,00	141,21	144,95	12,07	7,58
Pad	0,92	3,25	144,91	158,12	6,71	7,94
Pad	0,92	3,00	144,91	158,12	6,71	5,94

TR : Usina Trapiche, *BO* : Usina Bonfim, *TA* : Usina Tamoio, *DR* : Usina Diamante (Mel rico), *DF* : Usina Diamante (Mel final),
DP : Usina Diamante (Mel pobre), Pad:Padrão, M: Mosto, V: Vinho

Anexo Ic. Experimento 180 g/L

Amostra	Frasco vazio (g)	Frasco esterilizado (g)	Frasco inoculado (g)	Frasco fermentado (g)	Massa mosto (g)
TR1	165,69	272,02	282,06	277,41	106,33
TR1	161,07	267,67	277,7	273,39	106,60
TR1	164,21	270,54	280,65	276,04	106,33
TR2	157,34	261,12	271,09	269,19	103,78
TR2	158,26	261,02	271,02	268,99	102,76
TR2	166,99	269,84	279,9	277,85	102,85
BO1	156,03	264,58	274,61	266,67	108,55
BO1	154,42	261,38	271,46	263,77	106,96
BO1	157,3	264,09	274,07	266,43	106,79
BO2	160,08	265,83	275,89	269,25	105,75
BO2	153,37	259,8	269,88	263,3	106,43
BO2	155,64	261,32	271,25	264,51	105,68
TA1	155,59	264,15	274,06	265,97	108,56
TA1	167,17	276,16	286,09	278,04	108,99
TA1	166,37	274,53	284,47	276,61	108,16
TA2	171,32	278,46	288,44	281,25	107,14
TA2	162,57	268,89	278,95	271,62	106,32
TA2	168,45	275,51	285,62	278,56	107,06
DR1	168,83	273,75	283,77	279,82	104,92
DR1	167,06	270,92	280,88	276,98	103,86
DR1	167,32	272,77	282,78	279,02	105,45
DR2	168,71	272,01	282,17	277,69	103,30
DR2	167,37	270,64	280,71	276,22	103,27
DR2	165,79	269,27	279,37	274,8	103,48
DR3	170,33	274,33	284,35	279,8	104,00
DR3	168,52	272,18	282,25	277,77	103,66
DR3	166,31	269,56	279,64	275,25	103,25
DF1	163,99	268,71	278,72	272,77	104,72
DF1	170,07	275,12	285,16	279,33	105,05
DF1	162,79	266,83	276,93	271,12	104,04
DF2	166,18	270,58	280,7	273,88	104,40
DF2	169,84	274,04	284,12	277,46	104,20
DF2	171,96	277,37	287,3	280,54	105,41
DF3	170,01	273,81	283,89	277,23	103,80
DF3	162,78	266,54	276,46	269,76	103,76
DF3	168,57	272,11	282,19	275,6	103,54
DP1	158,89	261,82	271,88	268,42	102,93
DP1	169,92	272,56	282,66	279,05	102,64
DP1	165,98	269,27	279,25	275,66	103,29
DP2	163,95	267,19	277,13	273,24	103,24
DP2	169,09	271,83	281,79	277,85	102,74
DP2	168,97	271,44	281,52	277,6	102,47
DP3	167,71	272,53	282,69	277,66	104,82
DP3	166,27	271,1	281,25	276,33	104,83
DP3	169,91	274,63	284,55	279,63	104,72
Pad	168,8	272,18	282,12	275,32	103,38
Pad	169,69	273,05	283	276,07	103,36
Pad	164,76	266,69	276,77	270,07	101,93
Pad	169,62	272,56	282,67	275,99	102,94

TR : Usina Trapiche, *BO* : Usina Bonfim, *TA* : Usina Tamoio, *DR* : Usina Diamante (Mel rico), *DF* : Usina Diamante (Mel final),
DP : Usina Diamante (Mel pobre), Pad:Padrão

Anexo Ic. Experimento 180 g/L

Amostra	Massa inóculo (g)	Massa vinho (g)	Massa de CO2 (g)	Etanol (mL%)	Glicerol (mg%)	Massa seca (g/L)
TR1	10,04	111,72	4,65	5,85	907,57	4,4150
TR1	10,03	112,32	4,31	5,46	888,65	4,1450
TR1	10,11	111,83	4,61	5,93	888,65	4,5250
TR2	9,97	111,85	1,9	3,01	599,46	2,0100
TR2	10,00	110,73	2,03	2,81	588,65	1,9700
TR2	10,06	110,86	2,05	2,81	607,57	1,9450
BO1	10,03	110,64	7,94	9,89	1710,27	8,4750
BO1	10,08	109,35	7,69	9,86	1896,76	8,6750
BO1	9,98	109,13	7,64	9,80	1818,38	8,8800
BO2	10,06	109,17	6,64	9,15	1521,08	6,9800
BO2	10,08	109,93	6,58	8,85	1521,08	7,0050
BO2	9,93	108,87	6,74	9,00	1577,84	7,0300
TA1	9,91	110,38	8,09	10,06	1429,19	8,9100
TA1	9,93	110,87	8,05	10,03	1453,51	8,8100
TA1	9,94	110,24	7,86	10,09	1521,08	8,7500
TA2	9,98	109,93	7,19	9,50	1569,73	7,9550
TA2	10,06	109,05	7,33	9,50	1610,27	8,0050
TA2	10,11	110,11	7,06	9,12	1621,08	8,1050
DR1	10,02	110,99	3,95	5,64	1256,22	4,9700
DR1	9,96	109,92	3,9	5,52	1350,81	4,9650
DR1	10,01	111,7	3,76	5,40	1342,70	4,9100
DR2	10,16	108,98	4,48	6,23	1148,11	5,4400
DR2	10,07	108,85	4,49	6,32	1156,22	5,3100
DR2	10,10	109,01	4,57	6,41	1091,35	5,3750
DR3	10,02	109,47	4,55	6,64	1034,59	5,5750
DR3	10,07	109,25	4,48	6,55	1027,27	5,6300
DR3	10,08	108,94	4,39	6,49	1123,98	5,5100
DF1	10,01	108,78	5,95	8,71	1379,18	7,8900
DF1	10,04	109,26	5,83	8,80	1373,81	8,2000
DF1	10,10	108,33	5,81	8,97	1414,10	7,9900
DF2	10,12	107,7	6,82	9,27	1145,47	8,7250
DF2	10,08	107,62	6,66	8,97	1164,27	8,6000
DF2	9,93	108,58	6,76	9,03	1035,33	8,0200
DF3	10,08	107,22	6,66	9,00	884,89	7,6300
DF3	9,92	106,98	6,7	9,31	866,08	7,8750
DF3	10,08	107,03	6,59	9,19	935,93	8,1700
DP1	10,06	109,53	3,46	5,51	1040,70	4,5900
DP1	10,10	109,13	3,61	5,83	952,05	4,6450
DP1	9,98	109,68	3,59	5,72	1016,52	4,7050
DP2	9,94	109,29	3,89	6,22	860,71	4,9700
DP2	9,96	108,76	3,94	6,25	866,08	4,9550
DP2	10,08	108,63	3,92	6,25	876,83	5,0550
DP3	10,16	109,95	5,03	7,37	1191,13	5,1400
DP3	10,15	110,06	4,92	7,45	1220,68	5,2700
DP3	9,92	109,72	4,92	7,42	1260,98	5,2700
Pad	9,94	106,52	6,8	8,96	465,82	6,2550
Pad	9,95	106,38	6,93	9,43	506,11	6,3800
Pad	10,08	105,31	6,7	9,07	420,15	6,4200
Pad	10,11	106,37	6,68	8,90	430,89	6,3550

TR : Usina Trapiche, BO : Usina Bonfim, TA : Usina Tamoio, DR : Usina Diamante (Mel rico), DF : Usina Diamante (Mel final), DP : Usina Diamante (Mel pobre), Pad:Padrão

Anexo Ic. Experimento 180 g/L

Amostra			Fehling	CLAE	Fehling	CLAE
	Acidez -M (g/L)	Acidez -V (g/L)	ART-M (g/Kg)	ART-M (g/Kg)	ART-V (g/Kg)	ART-V (g/Kg)
TR1	0.80	3.25	178,19	130,84	77,22	50,07
TR1	0.80	3.37	178,19	130,84	85,17	61,95
TR1	0.80	3.25	178,19	130,84	73,44	59,18
TR2	0.43	1.10	155,22	130,49	111,65	92,63
TR2	0.43	0.80	155,22	130,49	111,22	88,51
TR2	0.43	0.67	155,22	130,49	110,04	91,81
BO1	0.92	3.00	214,81	187,09	61,26	49,39
BO1	0.92	3.06	214,81	187,09	65,17	49,53
BO1	0.92	3.00	214,81	187,09	58,42	50,76
BO2	0.73	2.45	192,54	183,09	70,18	55,32
BO2	0.73	2.20	192,54	183,09	74,07	57,37
BO2	0.73	2.63	192,54	183,09	68,88	55,53
TA1	1.71	3.00	193,39	154,75	33,11	18,53
TA1	1.71	3.06	193,39	154,75	34,47	18,63
TA1	1.71	3.06	193,39	154,75	38,19	22,68
TA2	0.98	2.51	199,67	165,76	57,18	37,24
TA2	0.98	2.51	199,67	165,76	52,08	31,83
TA2	0.98	2.69	199,67	165,76	55,88	38,46
DR1	0.49	2.02	182,72	191,76	116,05	99,98
DR1	0.49	1.96	182,72	191,76	109,18	93,12
DR1	0.49	1.78	182,72	191,76	120,40	101,51
DR2	0.73	2.27	165,88	146,74	75,45	56,09
DR2	0.73	2.20	165,88	146,74	70,87	52,85
DR2	0.73	2.20	165,88	146,74	67,00	50,48
DR3	0.92	1.84	151,98	158,42	65,49	41,82
DR3	0.92	1.84	151,98	158,42	66,40	50,16
DR3	0.92	1.90	151,98	158,42	68,83	46,30
DF1	0.49	2.63	183,54	182,90	62,75	39,85
DF1	0.49	2.63	183,54	182,90	44,53	41,95
DF1	0.49	2.33	183,54	182,90	56,21	47,00
DF2	0.98	2.45	159,79	157,98	26,67	11,51
DF2	0.98	2.51	159,79	157,98	19,22	12,34
DF2	0.98	2.51	159,79	157,98	26,59	12,17
DF3	0.86	2.45	150,45	149,91	30,54	6,13
DF3	0.86	2.57	150,45	149,91	17,30	6,45
DF3	0.86	2.39	150,45	149,91	21,29	6,43
DP1	0.24	1.52	151,46	160,54	69,49	53,30
DP1	0.24	1.59	151,46	160,54	76,04	55,53
DP1	0.24	1.59	151,46	160,54	76,27	62,05
DP2	0.24	1.71	140,29	142,75	57,91	44,25
DP2	0.24	1.59	140,29	142,75	51,28	53,11
DP2	0.24	1.71	140,29	142,75	64,49	45,71
DP3	0.73	1.90	160,94	109,34	48,89	29,66
DP3	0.73	1.90	160,94	109,34	46,07	34,21
DP3	0.73	1.78	160,94	109,34	42,95	28,09
Pad	0.49	2.94	166,55	168,34	30,98	15,34
Pad	0.49	2.63	166,55	168,34	22,31	14,98
Pad	0.24	3.67	154,11	179,88	29,60	15,66
Pad	0.24	3.31	154,11	179,88	27,50	17,34

TR : Usina Trapiche, BO : Usina Bonfim, TA : Usina Tamoio, DR : Usina Diamante (Mel rico), DF : Usina Diamante (Mel final),

DP : Usina Diamante (Mel pobre), Pad:Padrão, M: Mosto, V: Vinho

ANEXO II

Anexo IIa. Determinação de etanol pelas técnicas colorimétrica e de cromatografia gasosa, em amostras fermentadas durante 24 h

	Amostra	Etanol Colorimétrico (g)	Etanol Cromatográfico (g)
24 h	TR1	3,8313	3,4884
24 h	TR1	3,3439	3,48
24 h	TR1	3,4633	3,6614
24 h	TR2	1,7154	1,8946
24 h	TR2	1,703	1,2201
24 h	TR2	1,6979	1,284
24 h	BO2	6,0893	5,2002
24 h	BO2	6,586	5,115
24 h	BO2	6,4776	5,6208
24 h	TA2	6,7931	6,1027
24 h	TA2	6,1945	5,0853
24 h	TA2	5,9982	5,4257
24 h	DF2	5,8839	5,0858
24 h	DF2	6,1416	4,4918
24 h	DF2	5,9718	4,5233
24 h	Pad	5,4983	4,5361
24 h	Pad	6,4259	5,8139
24 h	Pad	5,8805	6,286
	Média	4,98	4,24
	DP	1,83	1,53
	CV(%)	8,63	8,76
	Mínimo	1,70	1,22
	Máximo	6,79	6,10

O teste T indicou haver diferença marginalmente significativa entre as técnicas, ao nível de 94% de confiança. (*) p= 0,051

Anexo IIb. Determinação de etanol pelas técnicas colorimétrica e de cromatografia gasosa, em amostras fermentadas durante 48 h

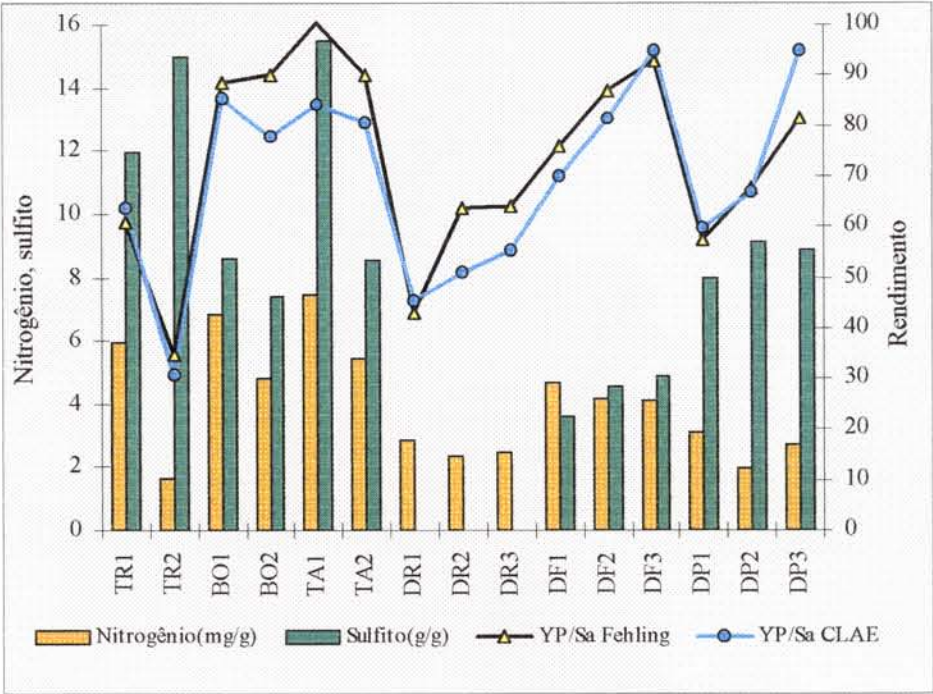
	Amostra	Etanol Colorimétrico (g)	Etanol Cromatográfico (g)
48 h	<i>TR1</i>	5,4757	4,1217
48 h	<i>TR1</i>	5,9117	5,0022
48 h	<i>TR1</i>	5,7949	5,188
48 h	<i>TR2</i>	2,5688	2,4408
48 h	<i>TR2</i>	2,7203	2,3195
48 h	<i>TR2</i>	2,8594	2,4013
48 h	<i>BO2</i>	7,842	6,9124
48 h	<i>BO2</i>	8,7032	7,1969
48 h	<i>BO2</i>	8,4114	6,9711
48 h	<i>TA2</i>	7,5678	6,2656
48 h	<i>TA2</i>	8,0802	6,1152
48 h	<i>TA2</i>	8,0137	5,8995
48 h	<i>DF2</i>	6,9704	4,9443
48 h	<i>DF2</i>	7,1173	6,2404
48 h	<i>DF2</i>	7,1417	6,299
48 h	<i>Pad</i>	6,0902	5,4135
48 h	<i>Pad</i>	6,9795	6,3544
48 h	<i>Pad</i>	6,5913	5,7875
	<i>Média</i>	6,38	5,33
	<i>DP</i>	1,91	1,56
	<i>CV(%)</i>	7,07	6,89
	<i>Mínimo</i>	2,57	2,32
	<i>Máximo</i>	8,70	7,20

O teste T indicou haver diferença marginalmente significativa entre as técnicas, ao nível de 94% de confiança. (*) p= 0,051

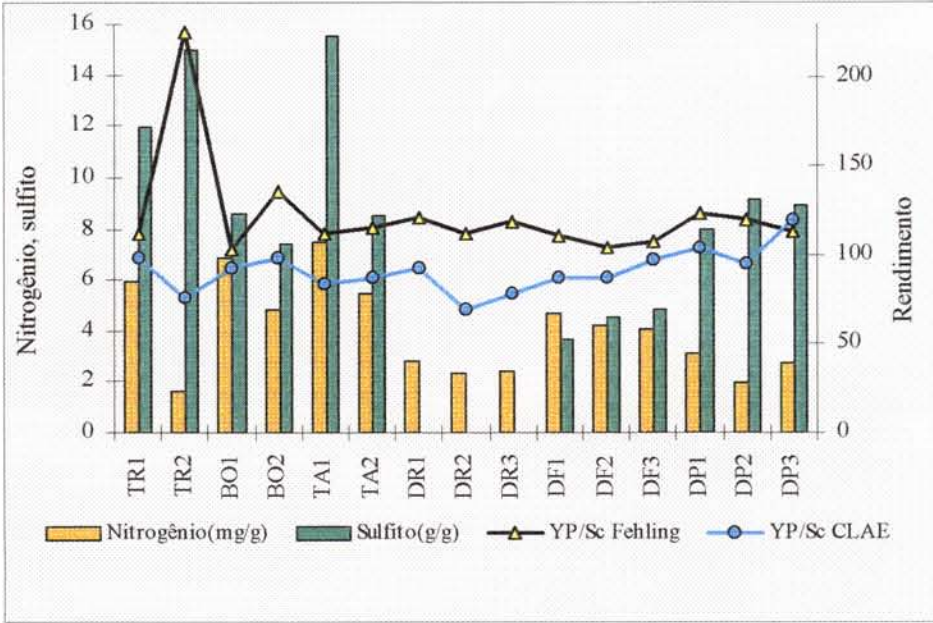
ANEXO III

Anexo IIIa. Experimento 120 g/L

Comparação entre o rendimento obtido através do açúcar alimentado ($Y_{P/Sa}$), utilizando-se as técnicas de Fehling e CLAE e valores de concentração de N e SO_3^{--}
Correlação dos valores de rendimento entre as técnicas Fehling e CLAE ($R=0,932$)

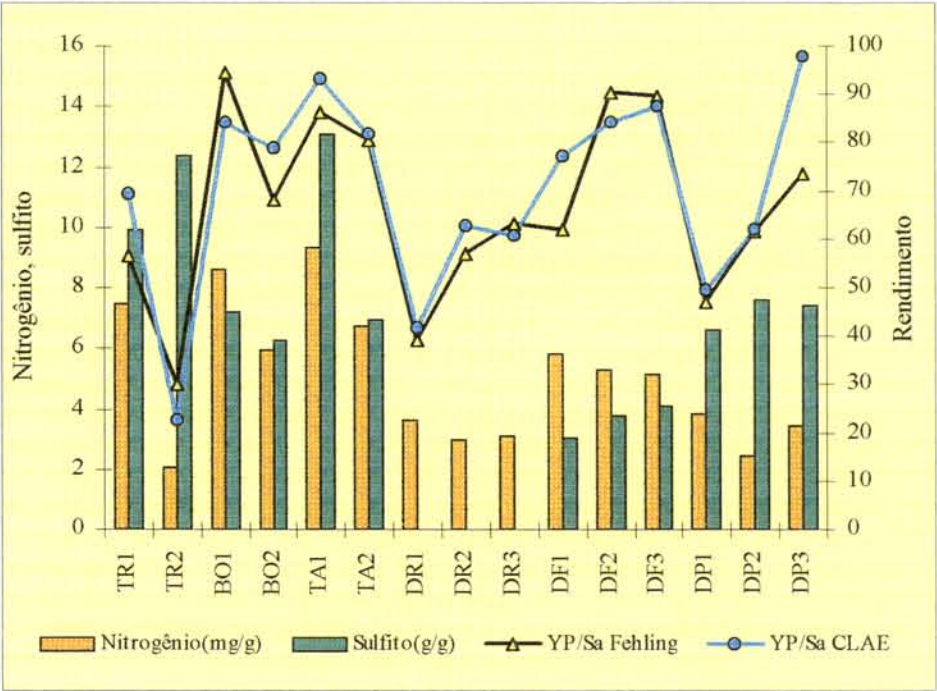


Comparação entre o rendimento obtido através do açúcar consumido ($Y_{P/Sc}$), utilizando-se as técnicas de Fehling e CLAE e valores de concentração de N e SO_3^{--}
Correlação dos valores de rendimento entre as técnicas Fehling e CLAE ($R=0,205$)

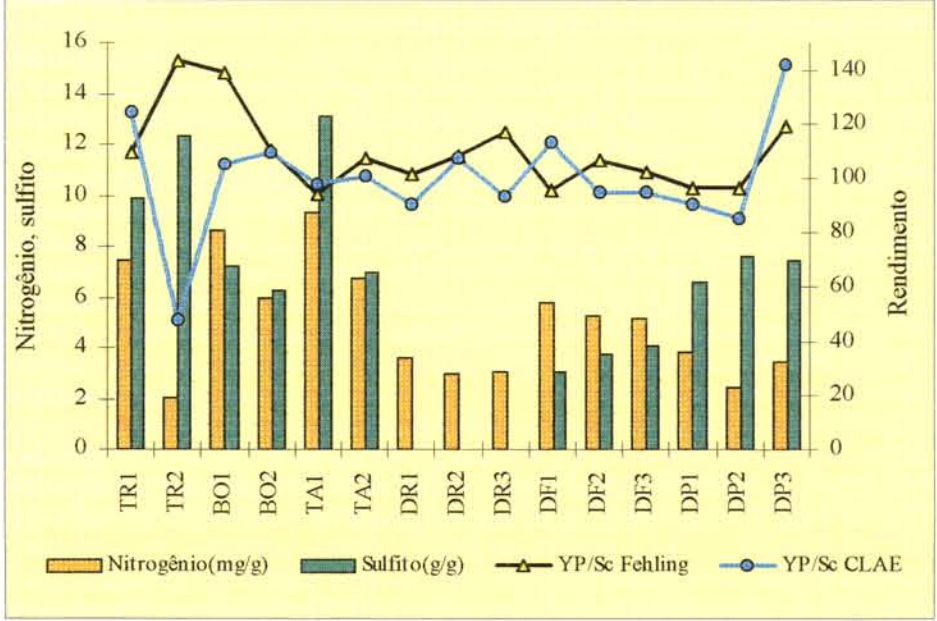


Anexo IIIb. Experimento 150 g/L

Comparação entre o rendimento obtido através do açúcar alimentado ($Y_{P/Sa}$), utilizando-se as técnicas de Fehling e CLAE e valores de concentração de N e SO_3^{--}
Correlação dos valores de rendimento entre as técnicas Fehling e CLAE ($R=0,896$)

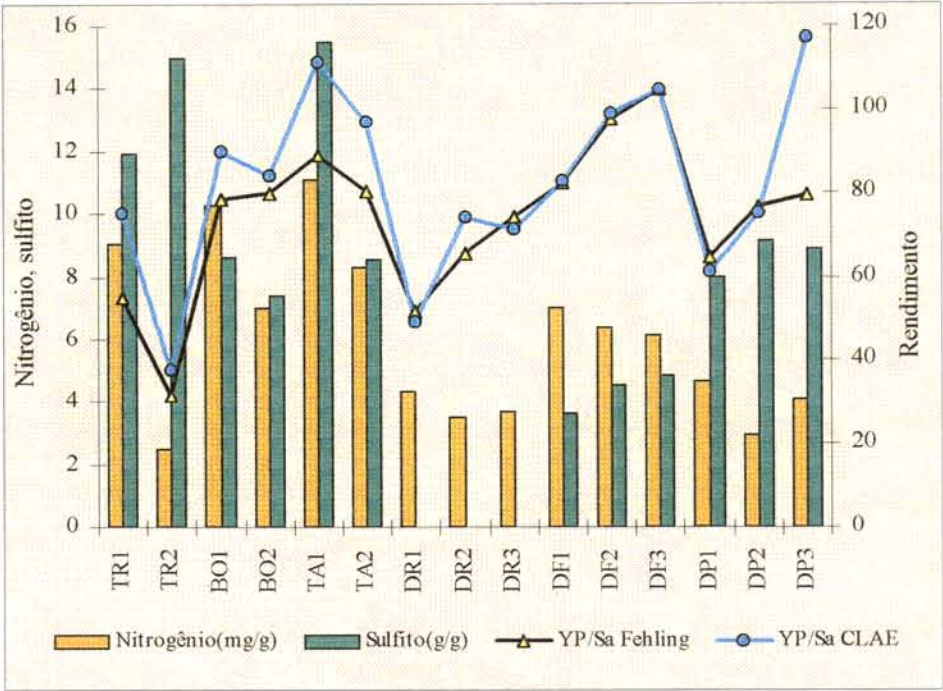


Comparação entre o rendimento obtido através do açúcar consumido ($Y_{P/Sc}$), utilizando-se as técnicas de Fehling e CLAE e valores de concentração de N e SO_3^{--}
Correlação dos valores de rendimento entre as técnicas Fehling e CLAE ($R=0,173$)



Anexo IIIc. Experimento 180 g/L

Comparação entre o rendimento obtido através do açúcar alimentado ($Y_{P/Sa}$), utilizando-se as técnicas de Fehling e CLAE e valores de concentração de N e SO_3^{--}
Correlação dos valores de rendimento entre as técnicas Fehling e CLAE ($R=0,823$)



Comparação entre o rendimento obtido através do açúcar consumido ($Y_{P/Sc}$), utilizando-se as técnicas de Fehling e CLAE e valores de concentração de N e SO_3^{--}
Correlação dos valores de rendimento entre as técnicas Fehling e CLAE ($R=0,096$)

