Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”

Recuperação e tratamento de água proveniente de vinhaça biodigerida e sua
utilização em processos de produção de bioenergia

Bianca Chaves Martins

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2018

Bianca Chaves Martins
Bacharel em Biotecnologia

Recuperação e tratamento de água proveniente de vinhaça biodigerida e sua utilização em processos de produção de bioenergia

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ANOTONIO SAMPAIO BAPTISTA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Microbiologia
Agrícola

Piracicaba
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Martins, Bianca Chaves

Recuperação e tratamento de água proveniente de vinhaça biodigerida e sua utilização em processos de produção de bioenergia/ Bianca Chaves Martins. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2018.

76 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Vinhaça biodigerida 2. Tratamento físico-químico 3. Fermentação alcoólica 4. Estresse osmótico. I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me permitir realizar esse sonho, por iluminar meu caminho nos momentos que mais precisei, pela oportunidade de crescer pessoal e profissionalmente e pelas benções em minha vida.

Aos meus pais, Joaquim e Meigna, por sempre me apoiarem, me incentivando a buscar meus sonhos, sempre de braços abertos me recebendo com carinho, amor, paciência e compreensão, não deixando de acreditar nunca em mim. Agradeço pelos conselhos sábios nos momentos mais difíceis dessa jornada. Vocês são a minha base e meu refúgio sempre.

A minha irmã Júlia, por ser uma pessoa tão especial em minha vida, me fazendo ser melhor a cada dia, ser motivo de orgulho e inspiração.

À toda minha família, por acreditarem em mim e incentivarem meus estudos.

Ao Marco Aurélio, por estar ao meu lado, me incentivando e acreditando em meu potencial, agradeço por me ouvir com paciência em todos os momentos difíceis e tornar meus dias mais divertidos e felizes.

Ao orientador Prof. Antonio Sampaio Baptista, pela orientação, pelos ensinamentos e pelas oportunidades únicas e por acreditar na realização deste estudo.

Ao pessoal do laboratório, em especial Manuella, Rubens, Laysa, Gabriela, Eric, Amanda e Eduardo, que me acolheram e ajudaram a realizar esse estudo, tornando-se mais que colegas de trabalho, mas amigos de verdade. Obrigada pelos momentos de descontração, pelas risadas e conselhos valiosos.

A todos os integrantes do grupo GTSBio pela ajuda e comprometimento.

À Professora Dr. Sônia Maria de Stefano Piedade pela grande ajuda na análise estatística dos dados.

A equipe técnica do laboratório, Pedrinho, Silvino e Rose, pela ajuda e ensinamentos.

À Usina São Martinho pela concessão do material utilizado nesse estudo.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, pela oportunidade concedida.

À Engie Brasil Energia pelo suporte financeiro através da FUSP.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram com a realização desse trabalho. Fica aqui minha gratidão e orgulho por ter ao meu redor pessoas maravilhosas.

EPÍGRAFE

“Mantenha seus pensamentos positivos, porque seus pensamentos tornam-se suas palavras.

Mantenha suas palavras positivas, porque suas palavras tornam-se suas atitudes.

Mantenha suas atitudes positivas, porque suas atitudes tornam-se seus hábitos.

Mantenha seus hábitos positivos, porque seus hábitos tornam-se seus valores.

Mantenha seus valores positivos, porque seus valores tornam-se seu destino!”

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
LISTA DE TABELA.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. HIPÓTESES.....	15
3. OBJETIVO.....	17
4. JUSTIFICATIVA.....	19
5. REVISÃO DA LITERATURA.....	21
5.1. PANORAMA GERAL DO SETOR SUCROENERGÉTICO	21
5.2. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	21
5.3. VINHAÇA.....	26
5.4. TRATAMENTOS E RECUPERAÇÃO DE ÁGUA PARA REUSO INDUSTRIAL	27
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
6.1. INSTALAÇÃO EXPERIMENTAL	31
6.2. MATERIAL	31
6.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	31
6.4. ETAPA 1 - TRATAMENTOS PARA A RECUPERAÇÃO DA ÁGUA PRESENTE NA VINHAÇA BIODIGERIDA	32
6.4.1. <i>Determinações físico-químicas</i>	33
6.4.2. <i>Potencial hidrogeniônico</i>	33
6.4.3. <i>Condutividade</i>	33
6.4.4. <i>Turbidez</i>	33
6.4.5. <i>Teor de sólidos</i>	33
6.4.6. <i>Teor de Cátions</i>	34
6.4.7. <i>Teor de Ânions</i>	34
6.5. ETAPA 2 - ENSAIO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	35
6.5.1. <i>Análises da viabilidade celular da população de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i>	37
6.5.2. <i>Contaminação Total</i>	38
6.5.3. <i>Concentração de leveduras</i>	39
6.5.4. <i>Teor Alcoólico</i>	39
6.5.5. <i>Teor de açúcares e glicerol</i>	40
6.5.6. <i>Teor de ânions</i>	40
6.5.7. <i>Teor de cátions</i>	40
6.5.8. <i>Rendimento fermentativo</i>	41
6.5.9. <i>Produtividade de fermentação</i>	41
6.6. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	41
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
7.1. ETAPA 1 - RECUPERAÇÃO DA ÁGUA PRESENTE NA VINHAÇA BIODIGERIDA	43
7.2. ETAPA 2 - ENSAIO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	51
7.2.1. <i>Concentração de açúcares no mosto e no vinho delevedurado</i>	51
7.2.2. <i>Viabilidade celular das leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i> ,	55
7.2.3. <i>Teor de cátions e ânions</i>	57
7.2.4. <i>Glicerol</i>	63
7.2.5. <i>Teor alcoólico, rendimento e produtividade da fermentação alcoólica</i>	65
8. CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS.....	70

RESUMO

Recuperação e tratamento de água proveniente de vinhaça biodigerida e sua utilização em processos de produção de bioenergia

O Brasil é o segundo maior produtor de etanol do mundo. A produção de etanol brasileira é quase que exclusivamente por via fermentativa. A fermentação alcoólica é uma etapa do processo industrial que consome grandes quantidades de água para diluir o xarope ou melaço para o preparo do mosto. Ademais, para cada litro de etanol produzido são gerados cerca de 10 a 14 litros de vinhaça. Este resíduo apresenta alto potencial poluente e pode atingir os recursos hídricos. Contudo, é composto por mais de 90% de água. Nesse sentido, uma estratégia para reduzir o potencial poluidor é realizar a produção de biogás através da biodigestão anaeróbia da vinhaça. Após esse processo, a água contida na vinhaça biodigerida pode ser tratada, com o auxílio de processos físico-químicos, e reutilizada em outros processos industriais. Por esses motivos, o objetivo do trabalho foi recuperar a água presente na vinhaça biodigerida e utilizá-la na diluição do xarope para fermentação alcoólica. Na primeira etapa da pesquisa, a vinhaça biodigerida foi submetida aos tratamentos físico-químicos, os quais consistiram em etapas de coagulação, sedimentação, centrifugação, filtrações sucessivas em filtro de areia, filtro de polipropileno (20 e 5 μm), filtro de carvão ativado e microfiltração (0,22 μm). A avaliação do resultado desses tratamentos foi realizada com base nos resultados de pH, condutividade, teor de sólidos totais (ST), sólidos totais voláteis (STV) e sólidos totais fixos (STF), demanda química de oxigênio (DQO), turbidez, teores de cátions e ânions. A segunda etapa, consistiu na realização de fermentação alcoólica com 4 ciclos fermentativos, utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Foram investigados dois tratamentos, a saber: 1) Tratamento 1 (T1) - Controle: o mosto foi preparado com diluição do xarope realizada com o uso de água destilada; e, Tratamento 2 (T2): o mosto foi preparado com a diluição do xarope utilizando água proveniente da vinhaça biodigerida após os tratamentos supracitados. Na 2ª etapa foram avaliados os seguintes parâmetros: açúcares redutores totais (ART), teor alcoólico, teores de cátions e ânions, glicerol, viabilidade celular, concentração de células de levedura, contaminação microbiana, rendimento e produtividade. As amostras de vinhaça biodigerida e amostras de água proveniente da vinhaça biodigerida apresentaram os seguintes resultados: pH 7,68 e a 7,99, respectivamente; turbidez de 2190 ($\pm 39,69$) NTU e a 729,67 ($\pm 10,07$) NTU, respectivamente; e os teores totais de cátions de 24.984,67 mg L^{-1} e para 22.930,99 mg L^{-1} , respectivamente. Também foram observadas diminuições nos teores dos seguintes componentes da água recuperada da vinhaça biodigerida: condutividade: diminuição de 39%; o teor de ST: redução de 28,2% e de STV diminuição de 42,5%. Já os teores totais de ânions nas amostras de água recuperada e tratada não apresentaram diferença significativa. Na fermentação alcoólica, aquela conduzida sob as condições do T2 apresentou diferenças significativas no rendimento, em que no ciclo 3 a diferença entre os dois tratamentos foi de 12,6% (T1: 83,56% e T2: 70,99%) e no ciclo 4 essa diferença foi de 9,1 % (T1: 80,65% e T2: 71,56%). A produtividade no T2 também foi menor; no ciclo 2, a diferença entre T1 e T2 foi de 1,6 $\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (T1: 8,83 $\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$ e T2: 7,25 $\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$); no ciclo 3 a diferença foi ainda maior atingindo 2,96 $\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$ (T1: 10,0 $\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$ e T2: 7,04 $\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$). Esse comportamento também foi observado no ciclo 4, quando a produtividade de T1 foi 2,47 $\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$ maior do que T2, ou melhor, T1: 10,25 $\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$ e T2: 7,78 $\text{mL L}^{-1} \text{h}^{-1}$.

h⁻¹. Essas diferenças nos resultados de T2 em relação aos do Tratamento Controle podem ser atribuídos altos teores de cátions no mosto, uma vez que as diferenças foram muito grandes, pois em T1 foram encontrados teores médios de 11206,86 ±123,99 mg L⁻¹ e em T2, os resultados encontrados foram de 29.521,14 ±597,29 mg L⁻¹. Isso pode ter induzido estresse osmótico às leveduras submetidas ao T2, de modo que, afetou negativamente a produtividade da fermentação. Portanto, conclui-se que é possível utilizar a água proveniente da vinhaça biodigerida no preparo do mosto para a fermentação alcoólica. Contudo, há necessidade de tratamento complementar aos realizados no presente estudo, visando reduzir a concentração de sais e por consequência o estresse osmótico às leveduras.

Palavras-chave: 1. Vinhaça biodigerida 2. Tratamento físico-químico 3. Fermentação alcoólica 4. Estresse osmótico

ABSTRACT

Recovery and treatment of water from biodigested vinasse and its use in bioenergy production processes

Brazil is the second largest producer of ethanol in the world. Brazilian ethanol production is almost exclusively via fermentation. Alcoholic fermentation is a stage of the industrial process that consumes large amounts of water to dilute the syrup or molasses for the preparation of the must. In addition, about 10 to 14 liters of vinasse are generated for each liter of ethanol produced. This residue presents high polluting potential and can reach water resources. However, it is composed of more than 90% water. In this sense, a strategy to reduce the polluting potential is to realize biogas production through anaerobic biodigestion of vinasse. After this process, the water contained in biodigested vinasse can be treated with the support of physico-chemical processes and reused in other industrial processes. For these reasons, the objective of the work was to recover the water present in the biodigested vinasse and to use it in the dilution of syrup for alcoholic fermentation. In the first phase of the research, biodigested vinasse was submitted to physical-chemical treatments, which consisted of coagulation, sedimentation, centrifugation, successive sand filtration, polypropylene filter (20 and 5 μm), activated carbon filter and microfiltration (0, 22 μm). The evaluation results of these treatments were carried out based on the results of pH, conductivity, total solids (TS), total volatile solids (STV), and fixed total solids (FTS), chemical oxygen demand (COD), turbidity, content of cations and anions. The second stage consisted of alcoholic fermentation with 4 fermentation cycles, using *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. Two treatments were investigated: 1) Treatment 1 (T1) - Control: the wort was prepared with dilution of the syrup performed with the use of distilled water; and Treatment 2 (T2): the wort was prepared by diluting the syrup using water from the biodigested vinasse after the above treatments. In the second stage, the following parameters were evaluated: total reducing sugars (ART), alcohol content, cation and anion contents, glycerol, cell viability, yeast cell concentration, microbial contamination, yield and productivity. Samples of biodigested vinasse and samples of water from biodigested vinasse presented the following results: pH 7.68 and 7.99, respectively; turbidity of 2190 (± 39.69) NTU and 729.67 (± 10.07) NTU, respectively; and the total cation contents of 24,984.67 mg L^{-1} and 22930.99 mg L^{-1} , respectively. Reductions of the following proportions were also observed in the water recovered from biodigested vinasse: conductivity: 39% decrease; the ST content: reduction of 28.2% and STV decrease of 42.5%. The total amount of anions in the samples of recovered and traded water did not present significant difference. In the alcoholic fermentation, the one conducted under T2 conditions presented significant differences in the yield; , in which in cycle 3 the difference between the two treatments was 12.6% (T1: 83.56% and T2: 70.99%) and in cycle 4 this difference was 9.1% (T1: 80, 65% and T2: 71.56%). Productivity in T2 was also lower; in cycle 2 the difference between T1 and T2 was 1.6 $\text{mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (T1: 8.83 $\text{mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and T2: 7.25 $\text{mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$); in cycle 3 the difference was even higher reaching 2.96 $\text{mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (T1: 10.0 $\text{mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and T2: 7.04 $\text{mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). This behavior was also observed in cycle 4, when the productivity of T1 was 2.47 $\text{mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ higher than T2, or better, T1: 10.25 $\text{mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and T2: 7.78 $\text{mL L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. These differences in the results of T2 in relation to the Control Treatment can be attributed high levels of cations in the wort, since the differences were very large, because in T1 were found average contents of $11206.86 \pm 123.99 \text{ mg L}^{-1}$ and in T2, the results found were $29,521.14 \pm 597.29 \text{ mg L}^{-1}$. This may have induced osmotic stress to the yeasts submitted to T2, so that it negatively affected the fermentation productivity. Therefore, it is concluded that it is possible to use water from the biodigested vinasse in the preparation of the must for alcoholic fermentation. However, there is a need for

complementary treatment to those carried out in the present study, in order to reduce the concentration of salts and consequently the osmotic stress to the yeasts.

Keywords: 1. Biodigerida vinasse 2. Physical-chemical treatment 3. Alcoholic fermentation 4. Osmotic stress

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PROCESSO DE FERMENTAÇÃO MELLE BOINOT	22
FIGURA 2. FASE DE CRESCIMENTO DAS LEVEDURAS EM FERMENTAÇÃO	23
FIGURA 3. FLUXOGRAMA PRODUÇÃO DE ETANOL E GLICEROL.....	24
FIGURA 4. FLUXOGRAMA ETAPAS EXPERIMENTAIS	31
FIGURA 5. ESQUEMA ILUSTRATIVO DE COMO FOI MONTADA A BANCADA DE TESTE PARA O TRATAMENTO VINHAÇA BIODIGERIDA	32
FIGURA 6. ESQUEMA DO PREPARO DO MOSTO PARA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA: (A) TRATAMENTO 1; (B) TRATAMENTO 2.	35
FIGURA 7. ILUSTRAÇÃO DA CONDUÇÃO DO ENSAIO DE FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA COM RECICLOS.....	36
FIGURA 8. DILUIÇÃO SERIADA E PLAQUEAMENTO	38
FIGURA 9. REDUÇÃO DE CONDUTIVIDADE EM RELAÇÃO A AMOSTRA INICIAL NOS TRATAMENTOS DA VINHAÇA BIODIGERIDA.	45
FIGURA 10. REDUÇÃO DA TURBIDEZ EM RELAÇÃO A AMOSTRA INICIAL NOS TRATAMENTOS DA VINHAÇA BIODIGERIDA	46
FIGURA 11. REDUÇÃO DOS TEORES DE SÓLIDOS TOTAIS NA VINHAÇA BIODIGERIDA EM FUNÇÃO DIFERENTES SISTEMAS DE TRATAMENTOS.....	47
FIGURA 12. REDUÇÃO DOS TEORES DE SÓLIDOS TOTAIS VOLÁTEIS NA VINHAÇA BIODIGERIDA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES SISTEMAS DE TRATAMENTOS POR FILTRAÇÃO.....	47
FIGURA 13. REDUÇÃO DE CÁTIOS E ÂNIOS AO FINAL DO TRATAMENTO DA VINHAÇA BIODIGERIDA	50
FIGURA 14. TEORES DE GLICEROL NO VINHO DE LEVEDURADO	64
FIGURA 15. RENDIMENTO FERMENTATIVO AO DECORRER DOS CICLOS.....	66
FIGURA 16. PRODUTIVIDADE DA FERMENTAÇÃO NO DECORRER DOS CICLOS.	67

LISTA DE TABELA

TABELA 1. NUTRIÇÃO IÔNICA LEVEDURAS	25
TABELA 2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DA VINHAÇA <i>IN NATURA</i> E BIODIGERIDA	27
TABELA 3. PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A CARACTERIZAÇÃO DA VINHAÇA BIODIGERIDA UTILIZADA NA ETAPA 1 DO PROJETO	33
TABELA 4. PARÂMETROS ANALISADOS NA ETAPA 2	37
TABELA 5. COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS DE CADA TRATAMENTO DA VINHAÇA BIODIGERIDA.	44
TABELA 6. TEORES DE ÂNIONS NOS TRATAMENTOS APLICADOS À VINHAÇA BIODIGERIDA	48
TABELA 7. TEORES DE CÁTIONS NOS TRATAMENTOS APLICADOS À VINHAÇA BIODIGERIDA	49
TABELA 8. TEORES DE GLICOSE, FRUTOSE, SACAROSE E ART NO MOSTO DE FERMENTAÇÃO.....	52
TABELA 9. TEORES DE AÇÚCARES TOTAIS GLICOSE, FRUTOSE, SACAROSE E ART NO VINHO DELEVEDURADO	53
TABELA 10. VIABILIDADE CELULAR AO DECORRER EM TODOS OS CICLOS FERMENTATIVOS.....	55
TABELA 11. CONTAGEM CONTAMINAÇÃO TOTAL OBSERVADAS AO LONGO DOS CICLOS FERMENTATIVOS.....	56
TABELA 12. CONCENTRAÇÃO DE LEVEDURAS NA SUSPENSÃO.....	56
TABELA 13. TEOR DE CÁTIONS NO MOSTO DE FERMENTAÇÃO E VINHO DELEVEDURADO	58
TABELA 14. TEOR DE ÂNIONS NO MOSTO DE FERMENTAÇÃO E VINHO DELEVEDURADO	60
TABELA 15. TEORES DE GLICEROL NO MOSTO DE FERMENTAÇÃO E VINHO DELEVEDURADO	63
TABELA 16. TEOR ALCOÓLICO TEÓRICO E DO VINHO DELEVEDURADO.....	65
TABELA 17. RENDIMENTO DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	66
TABELA 18. PRODUTIVIDADE DE ETANOL E TEMPO DE FERMENTAÇÃO.	67

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a crescente demanda energética mundial por fontes renováveis como alternativas ao uso de combustíveis fósseis gerou grande número de pesquisas nessa área. Isto porque os combustíveis fósseis são fontes de energia que geram poluentes e estão associados ao aquecimento global e às mudanças climáticas (VERMA; SHARMA; DWIVEDI, 2016).

A humanidade e a comunidade científica vêm observando o quão importante é o uso racional dos recursos naturais, sobretudo a água, uma vez que é um recurso imprescindível para as atividades humanas, mas apenas uma parcela referente à água doce pode ser aproveitada na maior parte das mesmas (BERNARDO; DANTAS, 2005) e ainda apresenta distribuição desigual devido a fatores climáticos (OTAKI; UEDA; SAKURA, 2017). A disponibilidade da água, juntamente com a poluição dos mananciais e o fato de que uma grande quantidade deste recurso vem sendo descartada como resíduo após o uso são razões que levam a necessidade de um melhor gerenciamento e conservação da água e efluentes industriais (MIERZWA, 2002).

Por outro lado, tendo em vista a relevância dessas fontes renováveis, a cana-de-açúcar ganhou importância econômica para a produção de etanol, o qual vem sendo utilizado em grande volume em substituição aos combustíveis derivados do petróleo (TORRES *et al.*, 2012). A cadeia sucroenergética compõe um segmento de grande relevância no Brasil, contribuindo positivamente do ponto de vista social, ambiental e econômico para o país (UNICA, 2017).

Neste sentido, no setor sucroenergético brasileiro há grande preocupação em se produzir de forma sustentável, de modo que, o aproveitamento de resíduos e subprodutos é de extrema importância. O principal resíduo gerado por essa indústria é a vinhaça, a qual apresenta mais de 90% de água (CORTEZ *et al.*, 2014) e alta carga orgânica com Demanda Química de Oxigênio (DQO) de aproximadamente 15.000- 27.000 mg L⁻¹, pH de aproximadamente 4,5 e elevado teor de potássio (SYDNEY *et al.*, 2014), sendo necessário dar destino adequado a esse resíduo.

As indústrias de processos, a qual a indústria de cana-de-açúcar faz parte, consomem grande quantidade de água. A fermentação alcoólica é uma etapa do processo industrial da produção de etanol que consome muito desse recurso na diluição de xarope ou melaço para a preparação do mosto. Nessa conformidade, é preciso considerar na gestão, a redução na captação e o uso da água. Para tal, esses objetivos podem ser alcançados realizando o tratamento e o reaproveitamento das águas residuais, como a vinhaça, em unidades de regeneração, onde a água tratada pode ser empregada dentro da própria planta industrial (INGARAMO *et al.*, 2009).

O tratamento adequado da vinhaça permite a recuperação da água. Neste sentido, a biodigestão anaeróbia do efluente é amplamente aceita como o primeiro passo de tratamento, pois permite a remoção de 80-90% da DBO e a energia bioquímica recuperada é de 85-90% como biogás (PANT; ADHOLEYA, 2007). Dessa forma, por meio desse processo a vinhaça pode ser utilizada para a produção de energia térmico-elétrica e tem a sua carga orgânica reduzida. Em seguida, para

que a água seja recuperada em grandes volumes e com qualidade, há diversas técnicas físico-químicas, como reações químicas, adsorção e filtração (BOCHENEK; SITARZ; ANTOS, 2011), que reduzem significativamente a concentração de matéria orgânica, de sólidos e a carga inorgânica (SAGNE *et al.*, 2008; MOSSE *et al.*, 2011).

Por esses motivos, a fim de contribuir para melhorar a sustentabilidade da cadeia produtiva do setor sucroenergético, o presente projeto propõe investigar e realizar tratamentos necessários para que a água proveniente da vinhaça biodigerida possa ser utilizada nos processos industriais na etapa de fermentação.

2. HIPÓTESES

É possível realizar tratamentos físico-químicos na vinhaça biodigerida, de modo que se permita recuperar a água nela presente, de tal forma que se apresente com menor concentração de sólidos, turbidez e condutividade. Além disso, que é possível utilizar água recuperada para a preparação do mosto a ser utilizado para a fermentação alcoólica, sem que se tenha prejuízos no rendimento e produtividade do processo.

3. OBJETIVO

Realizar os tratamentos necessários na água presente na vinhaça biodigerida, a fim de que se possa utilizar essa água no processo industrial de produção de etanol.

Objetivos Específicos

- a) Definir o processo de tratamento e reaproveitamento da água proveniente da vinhaça;
- b) Realizar o preparo do mosto para a fermentação alcoólica com água proveniente do processo de tratamento da vinhaça biodigerida;
- c) Investigar o rendimento e a produtividade da fermentação alcoólica utilizando a água proveniente da vinhaça biodigerida no preparo do mosto.

4. JUSTIFICATIVA

Nos últimos anos, tem-se observado vários fenômenos naturais, os quais têm conduzido à comunidade científica a entender que há necessidade urgente do uso racional dos recursos naturais. Dentre esses recursos, a água merece muita atenção, pois apesar do planeta Terra ter inúmeros reservatórios de água, nem todos são de águas potáveis e poucos atendem padrões para o consumo humano ou industrial. E diariamente grandes volumes desses recursos são usados e descartados sem o devido tratamento, ao passo que, poderiam ser reutilizados no ciclo de produção.

O setor sucroenergético corresponde a um segmento da economia brasileira de grande relevância, contudo é responsável pela captação de cerca de 1,83 m³ de água para cada tonelada de cana processada e pela produção de grande volume de resíduos, sobretudo, a vinhaça, a qual é constituída principalmente por água e material orgânico. Considerando uma usina padrão que processa 2 milhões de toneladas de cana por safra (210 dias), a captação diária de água poderia abastecer uma população de cerca de 79 mil pessoas por dia no Brasil.

De tal modo, são necessários estudos e conhecimentos avançados para o tratamento adequado e o reaproveitamento da água proveniente da vinhaça. Por esses motivos, acredita-se que submeter a vinhaça a um processo biológico (metanogênese) e em seguida a processos físico-químicos possam contribuir para que no final a sua água recuperada e tratada possa ser utilizada no preparo do mosto para a fermentação alcoólica. Esse conhecimento contribuirá para melhorar a sustentabilidade do ciclo de produção, reduzir o impacto ambiental, economizar energia, minimizar o uso de recursos naturais e aumentar a reciclagem de materiais.

5. REVISÃO DA LITERATURA

5.1. Panorama geral do setor sucroenergético

A cana-de-açúcar é uma planta que foi introduzida e começou a ser plantada no Brasil na década de 1530, considerada uma planta versátil devido à variedade de processos industriais que a utilizam como matéria-prima, como produção de açúcar, etanol, bioeletricidade, bioplásticos, biohidrocarbonetos e bioquímicos (UNICA, 2015).

No atual cenário econômico, o Brasil é o maior produtor e exportador mundial de açúcar, representando, aproximadamente, 20% da produção global e 40% da exportação mundial, e é o segundo maior produtor de etanol. A estrutura produtiva é constituída por 370 unidades em operação e mais de 1000 municípios com atividades vinculadas à indústria sucroenergética no país. Além de tudo, o setor por utilizar uma fonte de energia renovável, contribuiu com a redução da emissão de gases de efeito estufa (GEE) em mais de 300 milhões de toneladas de CO_{2eq} de março de 2003 até meados de 2015 (SIAMIG, 2017).

A área plantada com cana-de-açúcar no país em 2015 foi de 10.870.647 hectares. Sendo que essa produção de cana-de-açúcar se centraliza, sobretudo, nas regiões Nordeste e Centro-Sul do Brasil. Dentre os estados produtores, São Paulo é o maior produtor no país, com uma moagem de 365,99 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, produção de 24,248 milhões toneladas de açúcar e 13,197 bilhões de litros de etanol na safra 2016/2017 (UNICA, 2017).

O Brasil após a criação do Programa Nacional do Álcool se tornou um pioneiro no uso de etanol como combustível para veículos motorizados e ainda segundo a Portaria nº 75 de 5 de março de 2015 ficou estabelecido a adição obrigatória de etanol anidro combustível na proporção de 27% para gasolina comum e 25% na gasolina *premium* (BRASIL, 2017). Dessa forma, a cana-de-açúcar e o setor sucroenergético são considerados pilares da economia brasileira (UNICA, 2015).

Por outro lado, apesar de toda a tecnologia envolvida e desenvolvida e dado ao grande porte, as indústrias ligadas à cana-de-açúcar apresentam a geração de elevadas quantidades de efluentes líquidos, com alto teor de matéria-orgânica, como é o caso da vinhaça. Sendo preciso inserir sistemas para recuperar a água e gestão adequada de águas residuais para obter melhorias ambientais através de uma produção mais sustentável (TORRES *et al.*, 2012).

5.2. Fermentação alcoólica

No Brasil, a fermentação de mosto (caldo, melaço ou xarope) por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* constitui o principal processo utilizado para a produção de álcool (SILVA, J. A. *et al.*, 2006). *Saccharomyces cerevisiae* são fungos ascomicetos, os quais se reproduzem por gemulação ou fissão (WALKER, 1998). Utilizam, entre outras fontes de carbono, glicose e frutose como substrato e sua capacidade fermentativa é amplamente utilizada em diversos processos industriais (MELO, 2006).

Diferentes processos de produção do bioetanol são utilizados, entre eles batelada sem centrifugação, batelada com centrifugação e fermentação contínua. De acordo com AMORIM (2005), o processo de batelada sem centrifugação é utilizado sobretudo por fabricantes de aguardente e apresenta rendimento fermentativo de 70 a 75%; no processo batelada com centrifugação, conhecido como processo Melle-Boinot, permite-se o reaproveitamento (reciclo) das leveduras, reduzindo o tempo de fermentação para 10 horas e rendimento variando de 75-80%; e na fermentação contínua as dornas são ligadas em série, formando uma cascata e o que permite atingir rendimentos entre 88-92%.

No país o processo mais utilizado é o Melle Boinot. Este foi introduzido no Brasil no final da década 1940, neste processo como pode-se observar pela Figura 1 o mosto é encaminhado para as dornas de fermentação, onde adiciona-se as leveduras e após um período de 8 a 12 horas obtém-se o vinho (7 a 10% de álcool). Esta passa pela etapa de centrifugação separando-se o creme de levedura e vinho delevedurado que segue para a destilação. Esse creme recuperado é conduzido ao tratamento ácido para controlar contaminação bacteriana e em seguida retorna para um novo ciclo de fermentação (BNDS & CGEE, 2008).

Figura 1. Processo de fermentação Melle Boinot
Fonte: BASSO et al., 2011 apud TONOLLI, 2017.

Nesse processo para se otimizar a produção de etanol, bem como o rendimento e produtividade, a cinética do desenvolvimento das leveduras (Figura 2) é um parâmetro relevante. O crescimento das leveduras são divididos em 6 fases, na fase *lag* ocorre a adaptação das leveduras ao meio, em que número de células totais e viáveis é constante; na fase seguinte observa-se uma aceleração do crescimento; na fase exponencial a população atinge a velocidade máxima de

crescimento e dependendo das condições do meio, substrato disponível e fatores que ofereçam estresse, as leveduras iniciam a fase de desaceleração do crescimento e entram em uma fase estacionária, onde o número de células é constante e por fim, o declínio com a morte celular (RIBEIRO; BLUMER; HORII, 1999). Ainda de acordo com esses autores, a maior produtividade acontece na fase

exponencial de crescimento, com isso, para o processo fermentativo o intuito é manter as leveduras nesta fase para que tenham a máxima produção de etanol.

Figura 2. Fase de crescimento das leveduras em fermentação (1. *Lag*-fase; 2. Fase de aceleração do crescimento; 3. Fase exponencial de crescimento; 4. Fase de desaceleração do crescimento; 5. Fase estacionária; 6. Fase de declínio).

Fonte: adaptado RIBEIRO; BLUMER; HORII (1999)

Nas dornas, as leveduras realizam o processo de fermentação com o intuito de gerar energia química para suas atividades celulares e para tanto utilizam carboidratos monossacarídeos gerando como co-produto o etanol (NOVELLO, 2015). A sacarose, açúcar presente na cana-de-açúcar, por ser um carboidrato dissacarídeo precisa passar por um processo de hidrólise, catalisada pela enzima invertase e dessa forma quebrada nos açúcares monossacarídeos: glicose e frutose (SALVATO, 2010). Ademais, o etanol a ser produzido durante a fermentação depende diretamente da quantidade de açúcar disponível no mosto.

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* produzem etanol pela via Embden-Meyerhof-Parnas, ou via glicolítica, em que a glicose é convertida em piruvato e este convertido em etanol e CO₂ (NELSON & COX, 2014). A equação geral da fermentação etanólica pode ser observada na Eq. 1 e o fluxograma da via, na Figura 3.

(Eq. 1)

Figura 3. Fluxograma produção de etanol e glicerol.
Fonte: Adaptado MELO, 2006

Além da produção de etanol durante a fermentação outros compostos também são formados como ácido succínico, alcoóis superiores e glicerol, o qual pode-se observar na Figura 3 (GUTIERREZ, 1991). O glicerol é o principal subproduto da fermentação e alterações em seu metabolismo influenciam diretamente a produção de etanol, uma vez que o açúcar disponível dependendo da condição ambiental pode ser desviado para maior produção de glicerol, diminuindo a formação do etanol, que é produto final de interesse industrial do setor sucroenergético (OLIVEIRA, 2003).

As leveduras durante o processo de fermentação industrial estão sujeitas a diversas condições estressantes como contaminação bacteriana, alta concentração de etanol, altas temperaturas, leveduras selvagens, choque osmótico, altos teores de sais, inanição nutricional e entre outros. Essas condições desfavoráveis para as células induz a respostas de defesa e entre os mecanismos tem-se a produção de glicogênio, trealose, ácido succínico e glicerol, sendo esse último uma resposta ao choque osmótico (LOPES *et al.*, 2016).

As necessidades de minerais para as leveduras é um ponto importante para a fermentação alcoólica, uma vez que a exigência dos íons inorgânicos varia de micro a milimolar e tanto deficiências quanto concentrações elevadas de minerais provocam alterações metabólicas significativas (AMORIM *et al.*, 1989). Determinados sais, quando em excesso, comprometem o crescimento das leveduras, assim como, a produção de etanol, entre eles os íons Cu²⁺, Ca²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺ e Zn²⁺. O íon Cu²⁺ é altamente prejudicial e reduz a produção final de etanol, o íon Ca²⁺ impede crescimento celular

e altas concentrações de Cd^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} e outros íons metálicos são considerados tóxicos à célula por causarem rupturas nas membranas plasmáticas (JONES; GADD, 1990).

CHIN & INGLEDEW (1993) constataram que os íons de cálcio possuem grande potencial inibidor ao interferir no processo das enzimas e no transporte de outros íons. Por consequência, o excesso de sais minerais no meio extracelular leva ao aumento da pressão osmótica e, assim, a ruptura das células comprometendo a fermentação alcoólica. Na Tabela 1 observa-se a necessidade nutricional iônica das leveduras, a qual dependendo do íon a necessidade é bem baixa.

Tabela 1. Nutrição iônica leveduras

Íon	Crescimento ótimo leveduras
NH_4	1 mM
K^+	2 - 10 mM
Mg^{2+}	2 - 4 mM
Ca^{2+}	0,5 – 5 mM
Zn^{2+}	5 – 15 μM
Fe^{2+}	1 – 10 μM
SO_4^{2-}	1 mM
Cl^-	1 mM

Fonte: JONES; GADD, 1990

Dessa forma, para que a fermentação seja o mais eficiente possível é preciso um ambiente intracelular adequado e equilibrado, pois a composição e distribuição iônica no interior das células estão associadas à natureza física e química do meio externo (HAYASHI *et al.*, 2012). No preparo do mosto é preciso levar em consideração a importância do ambiente externo para o crescimento dos microrganismos, para que não leve as leveduras às situações de estresse osmótico, pois caso contrário haverá reduções na atividade enzimática e no fluxo metabólico, comprometendo as estruturas celulares, os gradientes químicos (SANT'ANA, 2009) e a eficiência da fermentação alcoólica.

Contaminação microbiana também é um fator que influencia o rendimento e produtividade do processo e aumenta os gastos de produção. No processo Melle-Boinot dado ao ambiente não estéril e o reciclo das leveduras, a contaminação em escala industrial é cerca de $2,0$ a $3,9 \cdot 10^7$ UFC mL^{-1} (LOPES *et al.*, 2016). As bactérias contaminantes competem com as leveduras pelo açúcar e outros nutrientes do mosto (CHIN; INGLEDEW, 1994) e produzem ácidos láctico e acético que intoxicam as leveduras (CHERUBIN, 2003), afetando a produção de etanol.

Além disso, na produção de etanol a vinhaça gerada está relacionada com a eficiência do processo, pois aumentando a quantidade de etanol produzida, verifica-se uma redução no volume de vinhaça (TONOLLI, 2017). Assim, a conduzir uma fermentação alcoólica evitando os fatores que levam as leveduras a estresses ocasiona em maior produção de etanol e ainda impacta na quantidade de resíduo formado.

5.3. Vinhaça

A vinhaça é um resíduo agroindustrial, o qual passou pelo processo de fermentação e teve o álcool extraído pela destilação, composta por matéria solúvel e insolúvel (CHIN; INGLEDEW, 1993). Além disso, está entre os poluentes orgânicos de grande impacto ambiental, apresentando potencial poluidor 100 vezes maior que o esgoto doméstico. Esse subproduto residual do processo industrial de produção do etanol, apresenta-se como um líquido na cor marrom e com mais de 90% de água em sua composição (CORTEZ *et al.*, 2014).

Normalmente, para cada litro de etanol produzido são gerados até 14 litros de vinhaça, a qual apresenta baixo teor de sólidos totais, alta turbidez e concentração de compostos orgânicos, como ácidos, alcoóis, aldeídos, cetonas, ésteres e açúcares, os íons potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e sulfato (SO_4^{2-}) e tem o pH em torno de 5 (ORTEGÓN *et al.*, 2016). A composição química varia em relação à origem do mosto (melaço, caldo e misto). Geralmente, o mosto proveniente de caldo de cana contém menor concentração de carga orgânica e íons cálcio, magnésio e potássio, quando comparado ao mosto de melaço, o qual apresenta maiores concentrações destes compostos (SILVA; GRIEBELER; BORGES, 2007). Outros fatores que também alteram a composição da vinhaça são as distintas características do campo, como clima, solo e qualidade da cana-de-açúcar (PRADA; GUEKEZIAN; SUÁREZ-IHA, 1998).

Este resíduo é considerado um poluente quando atinge as massas de água, trazendo grande preocupação ambiental quanto a sua eliminação, pois apresenta alta carga de matéria orgânica, tornando-se uma fonte importante de crescimento microbiano (CAMPOS *et al.*, 2014). No Brasil, o método de disposição de vinhaça mais utilizado é a aplicação no solo (fertirrigação) para suprir as necessidades de potássio da cultura de cana-de-açúcar. No entanto, é preciso adotar medidas para supervisionar a concentração desse nutriente no solo, uma vez que em excesso pode levar a contaminação das águas subterrâneas em várias áreas (NITAYAVARDHANA; KHANAL, 2010; DIAS, *et al.*, 2015).

A fração solúvel da vinhaça pode retornar ao ciclo de produção, como no preparo do mosto para fermentação alcoólica, tornando-se uma alternativa atrativa. Para tanto, esse resíduo precisa passar por um processo de recuperação e tratamento adequado, uma vez que a vinhaça é composta por elevado teor de sais que leva as leveduras aos desequilíbrios físico-químicos durante o processo fermentativo (CHIN; INGLEDEW, 1993).

Para o aproveitamento da vinhaça tratamentos biológicos têm sido reconhecidos como métodos eficazes para a gestão de efluentes industriais altamente poluídos. A digestão anaeróbia envolve etapas químicas e microbiológicas complexas, em que a vinhaça sofre o processo de degradação até chegar aos componentes básicos, e posteriormente a produção do biogás (CO_2 + metano) e para que as reações ocorram é imprescindível a presença de populações microbiológicas distintas e co-dependentes (ERSAHIN *et al.*, 2011).

A digestão anaeróbia é amplamente aceita como etapa inicial para o tratamento de vinhaça em destilarias, pois nessa fase ocorre a remoção de 80-90% da DQO (PANT; ADHOLEYA, 2007) formando uma mistura de água e de compostos inorgânicos e orgânicos (BAEZ-SMITH; CONSULTING, 2006). Esse processo de biodigestão anaeróbia, realizada em reatores, pode ser conduzido até a etapa de metanogênese, onde se tem a produção de biogás, cuja proporção em metano pode chegar a 96% em processos otimizados (CORTEZ *et al.*, 2014), o qual apresenta grande potencial para ser aproveitado na produção de energia elétrica.

Por consequência, a vinhaça que passa pelo processo de biodigestão tem suas características físico-químicas modificadas, em que há preservação dos macronutrientes (N, P e K) e micronutrientes (Fe, Zn, Mn, Cu e Mg) (SOARES, 2015). Além disso, há a remoção de grande parte da matéria orgânica, reduzindo de forma significativa sua DQO, aumento da concentração de nitrogênio amoniacal, bem como, elevação do pH aos valores próximos à neutralidade, e observa-se uma constância no conteúdo de potássio, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Características físico-químicas da vinhaça *in natura* e biodigerida

Determinações	Vinhaça <i>in natura</i>	Vinhaça biodigerida
pH	4,34	7,7
DQO (mg L ⁻¹)	29823	5800
Nitrogênio amoniacal (mg L ⁻¹)	40	220
Fósforo P ₂ O ₅ (mg L ⁻¹)	17	32
Sulfato (mg L ⁻¹)	29780,12	0,0
Potássio K ₂ O (mg L ⁻¹)	1400	1400

Fonte: Cortez *et al.*, 1998, apud Poveda, 2014; Calegari, 2017.

5.4. Tratamentos e recuperação de água para reuso industrial

A água é um recurso essencial ao desenvolvimento dos processos industriais, e para tanto, sua qualidade interfere de maneira significativa nos mesmos. É considerada um solvente universal e essa capacidade de solvência pode representar uma grande ameaça para equipamentos industriais (GE, 2012) e processos microbiológicos.

Dessa forma, é necessário o uso de técnicas físico-químicas para que se alcance a qualidade desejada, uma vez que, a água a ser tratada para o uso industrial apresenta diversas impurezas, entres elas partículas coloidais (diâmetro médio entre 1 a 1000 nm), que não sedimentam sob ação da gravidade, como: substâncias inorgânicas, sólidos em suspensão, sólidos sedimentáveis e material orgânico não biodegradável (NUNES, 2001).

Existem inúmeras técnicas aplicadas ao tratamento de água e efluentes e a escolha do melhor método depende da finalidade, isto é, quais substâncias se pretende remover. Entre as técnicas iniciais,

normalmente realizadas, tem-se a coagulação, floculação e sedimentação, que formam o processo de clarificação (GE, 2012).

As partículas coloidais na água apresentam-se dispersas individualmente, uma vez que, a superfície é carregada negativamente e impede a aproximação das mesmas. Por isso, para alterar essa propriedade e conseguir remover as impurezas faz-se uso inicialmente do processo de coagulação/floculação que é aplicado facilmente e com baixos custos de operação (GUERREIRO *et al.*, 2016). Nesse processo, é necessária a adição de um coagulante químico, como o sulfato de alumínio amplamente usado no Brasil, que reage com a água gerando íons positivos que atraem as impurezas carregadas com carga negativa, ocasionando na formação de partículas grandes. Adiciona-se ainda compostos, como carbonato de cálcio ou hidróxido de cálcio, que aumentam o pH do meio, auxiliando o coagulante em sua ação (KADOOKA *et al.*, 2016). As partículas desestabilizadas sofrem agitação lenta para que os coloides possam se agregar e formar flocos pesados, os quais serão facilmente removidos nas próximas etapas (ZARPELON; AZZOLINI, 2015).

A etapa posterior é a separação centrífuga, também amplamente utilizada no tratamento de águas residuais proveniente dos setores alimentício, químico e agricultura. É realizada em equipamentos que aceleram o processo de decantação (ação da gravidade), sendo denominados de centrífugas de decantação (VOLF, 2014). O processo é realizado por meio de um movimento de rotação intenso criando, assim, um campo de aceleração centrífuga capaz de separar pela diferença de densidade os sólidos e partículas em suspensão do líquido (MCCARTHY; NORTH; ZEALAND, 2011).

Em adição as etapas de coagulação e sedimentação a filtração é utilizada para reduzir os teores de sólidos dissolvidos de águas superficiais e esgoto, por meio de um processo mecânico simples, envolvendo os mecanismos de adsorção (física e química), interceptação, difusão e compactação inercial (GE, 2012).

Entre os métodos de filtração, filtros de areia e adsorção em carvão ativado têm sido provados serem eficazes para a remoção de micropoluentes orgânicos (FRANK; RUHL; JEKEL, 2015). A filtração é um processo físico-químico, cuja eficácia depende do material de composição do filtro. Filtros de areia são opções baratas e comumente utilizados em sistemas de pós-tratamento simplificado, composto por areia, brita e em alguns casos carvão mineral (JUNIOR; MARTINS, 2016). Nesse tipo de filtro o afluente entra em contato com a superfície do leito de areia se infiltrando entre ele e por meio de mecanismo de adsorção há a remoção de matéria orgânica e nutrientes (TONETTI *et al.*, 2012)

Filtros de polipropileno também vêm sendo amplamente empregados no tratamento de água para retenção de particulados em suspensão. A estrutura do polipropileno torna-o bastante versátil, apresenta ampla variação de tamanho dos poros, durabilidade significativa, material inerte, fácil instalação e boa capacidade de filtração (LIU *et al.*, 2006).

Combinado aos processos de tratamento citados acima, tem-se a técnica de adsorção em carvão ativado, que é substância adsorvente não específica, eficaz e que apresenta área superficial

extremamente porosa (ILOMUANYA *et al.*, 2017). Permite a remoção de cor, matéria orgânica dissolvida, fenóis, fosfatos, nitratos, sólidos em suspensão e matéria orgânica não biodegradável (NUNES, 2001). A partir desses processos torna-se possível tratar águas residuais e atingir requisitos mais rigorosos de permissão de descarga de efluentes e/ou reutilizá-los em outros processos industriais.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Instalação Experimental

O estudo foi realizado no Setor de Açúcar e Alcool, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

6.2. Material

O material submetido às etapas de tratamento e recuperação da água foi a vinhaça biodigerida obtida junto à Usina São Martinho, proveniente de um biodigestor comercial. Para a fermentação alcoólica foi utilizado xarope como matéria-prima, obtido em usina na região de Piracicaba. Os materiais foram caracterizados no Laboratório de Tecnologia Sucroenergética do Setor de Açúcar e Alcool- LAN/ESALQ/USP.

6.3. Procedimento experimental

O procedimento experimental foi dividido em duas etapas, conforme esquematizado na Figura 4. Na Etapa 1 a vinhaça biodigerida foi submetida aos tratamentos físico-químicos necessários para se recuperar a água, a qual foi utilizada na segunda etapa do estudo. Na etapa 2, foram realizados ensaios de fermentação alcoólica com dois tratamentos. No tratamento 1, para o preparo do mosto foi utilizada água destilada para diluição do xarope. Por outro lado, no tratamento 2, foi utilizada a água recuperada da vinhaça biodigerida para o preparo do mosto a partir do xarope.

Figura 4. Fluxograma etapas experimentais

6.4. Etapa 1 - Tratamentos para a recuperação da água presente na vinhaça biodigerida

A vinhaça biodigerida foi submetida a diversos tratamentos físico-químicos com o objetivo de torná-la apropriada para o preparo do mosto. Esses tratamentos consistiram em, inicialmente, ajustar o pH da vinhaça biodigerida para 7,5, para tal foi utilizada a solução de H_2SO_4 1M e submetê-la a um processo primário de floculação. Nesse tratamento, o coagulante utilizado foi o sulfato de alumínio na concentração de 200 mg L^{-1} . Após a adição do reagente a vinhaça biodigerida, sob tratamento, foi agitada até a diluição do sulfato de alumínio e em seguida permaneceu em repouso por 12 horas. Posteriormente, foi realizada a remoção da fração sobrenadante, a qual foi encaminhada à centrifugação.

A centrifugação do material foi realizada em centrífuga horizontal Thermo Scientific®, modelo Sorvall ST 40R, aplicando-se $3925 g$ durante 10 minutos. Na sequência, a vinhaça biodigerida passou por filtragens sucessivas em um conjunto de filtração. Este conjunto foi composto por: a) filtro com coluna de areia e filtro de carvão ativado, composto por três camadas de quartzo e uma de carvão vegetal ativado de casca de coco (Teixeira Tozzi®); b) filtro de coluna $9 \frac{3}{4}$ " de polipropileno 20μ (EcoFi®); c) filtro de coluna $9 \frac{3}{4}$ " de carvão granulado ativado com sais de prata (Carbon Block - Aquabios®); d) filtro de coluna $9 \frac{3}{4}$ " de polipropileno de 5μ (EcoFi®); e) filtro de coluna $9 \frac{3}{4}$ " de polipropileno de $0,22 \mu$ (EcoFi®). O esquema ilustrativo de como a bancada para o tratamento da vinhaça biodigerida foi montada pode ser observada na Figura 5.

Figura 5. Esquema ilustrativo de como foi montada a bancada de teste para o tratamento vinhaça biodigerida. a) PP 20 – filtro polipropileno $20 \mu\text{m}$; b) CA – carvão ativado; c) PP 5 – filtro polipropileno $5 \mu\text{m}$; d) PP 0.22 – filtro polipropileno $0,22 \mu\text{m}$.

6.4.1. Determinações físico-químicas

Em cada etapa de tratamento da água proveniente da vinhaça biodigerida foram coletadas amostras de água tratada para as análises físico-químicas, bem como da vinhaça biodigerida, conforme os parâmetros na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros utilizados para a caracterização da vinhaça biodigerida utilizada na Etapa 1 do projeto.

Parâmetros	Referências
pH	APHA, 2012
Condutividade	APHA, 2012
Turbidez	APHA, 2012
Teor de sólidos	APHA, 2012
DQO	APHA, 2012
Teores de cátions	EITH <i>et al.</i> , 2006
Teores de ânions	EITH <i>et al.</i> , 2006

6.4.2. Potencial hidrogeniônico

O pH das amostras de vinhaça biodigerida e da água recuperada foram mensurados em pHmetro da marca Metrohm® modelo 827, seguindo as recomendações do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012).

6.4.3. Condutividade

A condutividade das amostras de vinhaça biodigerida e água recuperada foram mensuradas em condutivímetro da marca Metrohm® modulo condutividade 856, seguindo as recomendações do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012).

6.4.4. Turbidez

A turbidez das amostras foi determinada pelo método nefelométrico em um turbidímetro de bancada marca Tecnal® modelo TB-1000, seguindo as recomendações do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012).

6.4.5. Teor de sólidos

As análises de Sólidos Totais (ST), Sólidos Totais Fixos (STF) e Sólidos Totais Voláteis (STV) foram mensuradas pelo método de gravimetria, seguindo as recomendações do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012). Para os cálculos foram utilizadas as equações 2, 3 e 4.

$$\text{Sólidos totais (mgL}^{-1}\text{)} = \frac{(M_1 - M_0) \times 1000}{\text{Vol. amostra}} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$\text{Sólidos Totais Voláteis (mgL}^{-1}\text{)} = \frac{(M_1 - M_2) \times 1000}{\text{Vol. amostra}} \quad (\text{Eq. 3})$$

$$\text{Sólidos Totais Fixos (mgL}^{-1}\text{)} = \frac{(M_2 - M_0) \times 1000}{\text{Vol. amostra}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

M₀: massa da cápsula vazia

M₁: massa da cápsula com amostra

M₂: massa da cápsula com amostra após estufa

6.4.6. Teores de Cátions

Para a determinação das concentrações dos íons sódio, amônio, potássio, magnésio e cálcio, foi utilizada a cromatografia iônica, com o auxílio de um cromatógrafo, modelo IC 930 Compact, da marca Metrohm®, conforme o método de EITH *et al.* (2006).

O sistema cromatográfico utilizado foi composto de uma coluna Metrosep C4-250/4.0, detector de condutividade. Para a condução das análises a temperatura da coluna cromatográfica foi ajustada em 30 °C, com o auxílio de um forno de aquecimento. Em seguida, foi utilizada como solução eluente a solução de ácido oxálico 2,7 mM. O fluxo de fase móvel foi de 0,9 mL min⁻¹. Para as análises as amostras foram diluídas 30 vezes, filtradas em unidades filtrantes Durapore de 0,45 µm. O volume de amostra injetado foi de 20 µL.

6.4.7. Teores de Ânions

Para a determinação das concentrações dos íons cloreto, nitrato, fosfato e sulfato, foi empregado a cromatografia iônica, em cromatógrafo de íons, modelo IC 930 Compact, da marca Metrohm® conforme descrito por EITH *et al.* (2006).

Para a análise foi utilizado um detector de condutividade e Coluna cromatográfica, modelo Metrosep A Supp 5 250/4.0, sob 25 °C. Como eluente foi utilizado a solução de eluente bicarbonato de sódio (1,0 mM) e carbonato de sódio (3,2 mM), com fluxo de 0,7 mL min⁻¹. Além disso, foi utilizada uma solução de regeneração de supressor químico composta por ácido sulfúrico 100 mM. As amostras foram diluídas 20 vezes e filtradas em unidades filtrantes Durapore de 0,45 µm. O volume de amostra injetado foi de 20 µL.

6.5. Etapa 2 - Ensaio de fermentação alcoólica

Os ensaios de fermentação alcoólica foram conduzidos em dois blocos no tempo, dois tratamentos, 4 ciclos fermentativos e 4 repetições por tratamento. Os tratamentos diferiram-se entre si em relação a água utilizada para a diluição dos mostos a partir de xarope. Dessa forma, para o Tratamento 1 (T1) foi utilizada água destilada como tratamento controle e para o Tratamento 2 (T2), a água recuperada proveniente da vinhaça biodigerida. O esquema ilustrativo do preparo do mosto e da condução do ensaio com reciclos pode ser observado nas Figuras 6 e 7.

Figura 6. Esquema do preparo do mosto para fermentação alcoólica: (A) Tratamento 1; (B) Tratamento 2.

Figura 7. Ilustração da condução do ensaio de fermentação alcoólica com ciclos: (A) Tratamento 1; (B) Tratamento 2.

Para o preparo do mosto, o xarope foi inicialmente clarificado. Para tal o xarope foi diluído com a água proveniente da vinhaça biodigerida e com água destilada. Para o preparo do mosto do tratamento controle, foi ajustado o teor de sólidos solúveis até 25°Brix. Na sequência, foi aquecido até a fervura e mantido nessa condição durante 15 minutos. Em seguida, a solução de xarope foi sifonada para retirar o sobrenadante. Posteriormente, para cada 2 litros de xarope diluído fervido foram adicionadas 5 g de fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Em seguida, foi realizada a esterilização desse material em uma autoclave, utilizando temperatura de 120°C, 1 atm durante 15 min. Após esta etapa, o xarope foi resfriado e mantido em repouso por 48 horas. Na sequência, o sobrenadante foi novamente sifonado e submetido ao procedimento de esterilização em autoclave, conforme descrito anteriormente. Para o preparo do mosto o xarope clarificado teve a concentração de açúcares redutores totais (ART) ajustada com água destilada (T1) e com a água recuperada da

vinhaça (T2) até atingir o valor de $170,16 \text{ g L}^{-1} \pm 12,4 \text{ ART}$. Além disso, o pH do mosto foi ajustado para 6,13 com solução de NaOH ou H_2SO_4 1M.

Para conduzir a fermentação alcoólica, foram utilizados Erlenmeyers de 500 mL, contendo 300 mL de mostos por frascos para ambos os tratamentos. Esses reatores foram inoculados no primeiro ciclo fermentativo com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (3 % m v⁻¹). Cada tratamento teve 4 repetições, de modo que foram conduzidas 8 unidades experimentais por ciclo fermentativo. Foram conduzidos 4 ciclos fermentativos, sendo que nos três últimos ciclos foram utilizadas leveduras recicladas do ciclo anterior, conforme demonstrado na Figura 7.

A inoculação da levedura no mosto, bem como, todo o processo de reciclo foram feitos em câmara de fluxo laminar para minimizar a contaminação bacteriana. Para tanto, foi conduzido o plaqueamento de amostras de mostos em todos reatores utilizados, sendo as coletas realizadas em dois momentos, no início e no final de cada ciclo fermentativo. Também foi adotado o mesmo modelo de amostragem para o estudo de viabilidade celular.

O processo foi mantido sob agitação e a temperatura constante de $30 (\pm 3)^\circ\text{C}$ e acompanhado por meio da perda de CO_2 dos reatores, em que quando o peso dos reatores estabilizaram foi determinado o fim da fermentação. Ao final do ciclo, as amostras foram centrifugadas a 3925 g durante 10 minutos. As amostras de vinho de levedura obtidas foram armazenadas em freezer, sob temperatura de -20°C para posterior análises. Já o creme de levedura foi reconduzido para o próximo ciclo fermentativo, ou seja, inoculado em um novo mosto.

A tabela 4 indica os parâmetros analisados no processo de fermentação alcoólica.

Tabela 4. Parâmetros analisados na Etapa 2

Determinações	Referências
pH	APHA, 2012
Viabilidade celular	PIERCE, 1970
Contaminação total	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1996
Concentração de leveduras	KOSHIMIZU <i>et al.</i> , 1982
Teores de carboidratos	EITH <i>et al.</i> , 2006
Teores de cátions	EITH <i>et al.</i> , 2006
Teores de ânions	EITH <i>et al.</i> , 2006
Teor Alcoólico	ZAGO <i>et al.</i> , 1996

6.5.1. Análises da viabilidade celular da população de *Saccharomyces cerevisiae*

A análise de viabilidade celular da população de levedura foi determinada através da coloração diferencial das células vivas pela solução de azul de metileno 0,1% e as contagens das células

vivas e mortas, por microscopia ótica, de acordo com metodologia descrita por Pierce (1970). Esta análise foi efetuada no início e no final de cada ciclo fermentativo.

Para a análise foram coletados 0,5 mL de mosto/vinho com leveduras em cada reator e adicionados a 9,5 mL de água destilada. Em seguida, dessa solução foram transferidos 0,3 mL para um outro tubo e adicionado 0,3 mL da solução de azul de metileno 0,1%. Em seguida, esse material foi agitado e 0,1 mL da amostra obtida foi transferida para a câmara de *Neubauer* e com o auxílio de um microscópio óptico, em aumento de 40X x 10 X, foram realizadas as contagens das células incolores (ativas) e das coradas com o azul de metileno (inativas). A viabilidade celular foi calculada por meio da Equação 5:

$$V(\%) = \frac{\text{número de células incolores}}{\text{número de células incolores} + \text{número de células coradas}} \times 100$$

(Eq. 5)

6.5.2. Contaminação Total

Para acompanhar a contaminação total nos reatores no decorrer do processo fermentativo foram realizadas coletas de amostras no início e final de cada ciclo. Em seguida, esse material foi submetido a uma diluição em série e realizado o plaqueamento por semeadura em superfície, como descrito na Figura 8. Para o preparo do meio de cultivo utilizado, meio de cultura YEPD composto por 1% de extrato de levedura; 1% de peptona; 2% de glicose e 2% de ágar foi vertido em placas de petri devidamente esterilizadas. Além disso, também foi adicionado ao meio de cultura cicloheximida 10 mg L⁻¹. Para a diluição das amostras dos reatores foram utilizados tubos contendo água peptonada 0,1% e por meio de uma diluição seriada chegou até a diluição de 10⁻², a partir desse tubo foi pipetado 0,1 mL na placa com meio solidificado e com o auxílio da alça de Drigalsky espalhou a amostra com movimentos circulares e incubado a 30 °C por 48 horas para posterior contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

Figura 8. Diluição seriada e plaqueamento

6.5.3. Concentração de leveduras

A determinação da quantidade aproximada de leveduras no reator foi determinada por centrifugação, tendo sua precisão na ordem de 10%. Ao fim de cada ciclo fermentativo, foi medido o volume presente no reator. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 3925 *g* por 10 minutos. Ao término dessa etapa foi medido o volume do sobrenadante e por diferença foi encontrado o volume de sedimento (creme de levedura). A partir desses dados foi calculada a concentração de leveduras % v v⁻¹ (Equação 6) e relacionada a porcentagem de volume e a concentração em grama de matéria seca por litro de suspensão pela Equação 7 (KOSHIMIZU et al., 1982).

$$X = \frac{V_s}{V_T} \times 100$$

(Eq. 6)

Onde:

X: concentração de leveduras na suspensão, % v v⁻¹

V_s: volume ocupado pelo sedimento, ml

V_T: volume total, ml

$$Y = 0,01 + 3,02 \times X$$

(Eq. 7)

Onde:

X: concentração de leveduras na suspensão, % v v⁻¹

Y: concentração de leveduras na suspensão, g L⁻¹

6.5.4. Teor Alcoólico

Amostras de 25 mL de vinho foram destiladas em destilador, Modelo TE-10, marca Tecnal. Para a destilação, após a água da caldeira ter entrado em ebulição, a sua torneira, bem como da câmara de destilação foi fechada e o termostato colocado na temperatura de trabalho. Esta temperatura é determinada de modo que o material destilado não ultrapasse a altura de 5 cm do destilador. A destilação foi conduzida até que o volume 25 mL fosse coletado em um balão volumétrico colocado na válvula de saída do condensado do destilador.

A amostra coletada foi analisada em um densímetro digital modelo 5000, da marca Schmidt Haensch®, em que a temperatura de trabalho estabelecida foi de 20 °C com desvio de 0,05 °C. Dada a estabilização da temperatura, foram injetados ar e água para a calibração do equipamento, respectivamente. Após esse processo, foram transferidas as alíquotas de amostra no tubo receptor de amostra, tomando-se o cuidado para não haver formação de bolhas de ar dentro do tubo de leitura.

Completado o tubo com a amostra, foi realizada a leitura, a qual foi expressa como percentual em volume de álcool puro existente no volume da mistura (% m/m), correspondente ao °GL.

6.5.5. Teor de açúcares e glicerol

Para a determinação das concentrações de glicose, frutose, sacarose e glicerol, foi empregada a cromatografia iônica, com o auxílio de um cromatógrafo de Íons, modelo IC 930, da marca Metrohm® conforme descrito por EITH *et al.* (2006).

Para a análise foi utilizado coluna cromatográfica, modelo Metrosep Carb 1 – 150/4.0 e detector amperométrico. A solução de eluente foi preparada com hidróxido de sódio 200 mM, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura da coluna cromatográfica foi mantida constante sob 35°C. As amostras de mosto de ambos os tratamentos foram diluídas 300 vezes e as de vinho, 10 vezes. Ambas as amostras foram filtradas em unidades filtrantes Durapore de 0,45 µm. Foram injetados 0,25 µL de amostra e o tempo de corrida foi de 9 minutos.

6.5.6. Teores de ânions

Para a determinação das concentrações dos íons cloreto, nitrato, fosfato e sulfato foi empregada a cromatografia iônica, com o auxílio de um cromatógrafo de Íons, modelo IC 930, da marca Metrohm® conforme descrito por EITH *et al.* (2006).

Para a análise foi utilizado coluna cromatográfica, modelo Metrosep A Supp 5 250/4.0 e detector de condutividade. A solução de eluente era composta por bicarbonato de sódio (1,0 mM) e carbonato de sódio (3,2 mM), com fluxo de 0,7 mL min⁻¹. A temperatura da coluna cromatográfica foi mantida constante sob 25°C. Além disso, foi utilizada uma solução de regeneração de supressor químico composta por ácido sulfúrico 100 mM. As amostras de mosto de ambos os tratamentos foram diluídas 10 vezes e as amostras de vinho 15 vezes, ambas as amostras foram filtradas em unidades filtrantes Durapore de 0,45 µm. Foram injetados 20 µL e o tempo de duração de cada corrida foi de 30 minutos.

6.5.7. Teores de cátions

Para a determinação das concentrações dos íons sódio, amônio, potássio, magnésio e cálcio, foi empregada a cromatografia iônica, com o auxílio de um cromatógrafo de Íons, modelo IC 930, da marca Metrohm® conforme descrito por EITH *et al.* (2006).

A coluna utilizada foi Metrosep C4–250/4.0, à 30 °C, detector de condutividade, tendo como solução eluente o ácido oxálico 2,7 mM, com fluxo de 0,9 mL min⁻¹. As amostras do Tratamento 1 foram diluídas 20 vezes e as do Tratamento 2, 30 vezes. Em seguida foram filtradas em unidades filtrantes Durapore de 0,45 µm. O volume de amostra injetado foi de 20 µL a duração de cada corrida 35 minutos.

6.5.8. Rendimento fermentativo

O cálculo do rendimento fermentativo foi realizado com base na estequiometria da fermentação alcoólica, em que 100% de rendimento ocorre quando há formação de 51,11 g (64,75 mL) de etanol a partir de 100g de açúcares redutores totais. Dessa forma, o rendimento fermentativo foi calculado a partir da concentração de açúcares redutores totais presentes no mosto e a concentração de álcool no vinho delevedurado. Assim, o rendimento fermentativo foi calculado de acordo com a Equação 8.

$$RF = \frac{g \text{ de etanol obtidos no vinho}}{g \text{ de ART fornecido} \times 0,5111} \times 100$$

(Eq. 8)

6.5.9. Produtividade de fermentação

Com base na concentração alcoólica do vinho ao final da fermentação e no tempo de fermentação, foi calculada a produtividade, em gramas de álcool por litro por hora ($g L^{-1} h^{-1}$). A produtividade de fermentação (PF) foi calculada por meio da equação 9.

$$PF = \frac{\text{concentração de etanol no vinho } (gL^{-1})}{\text{tempo de fermentação } (h)}$$

(Eq. 9)

6.6. Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado para a etapa 1 do experimento foi o inteiramente casualizado e para a etapa 2 do experimento foi o delineamento em blocos casualizados, com fatorial 2x4, com dois blocos (períodos diferentes de realização dos ensaios), dois tratamentos e 4 ciclos fermentativos. Os resultados obtidos foram submetidos ao Teste de F ($p \leq 0,05$). Conforme os resultados desse teste, foi aplicado o teste de comparação de médias, Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Os cálculos foram realizados com o auxílio do pacote estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 1985).

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir, são apresentados e discutidos os resultados obtidos nos ensaios de recuperação da água presente na vinhaça biodigerida, correspondente a etapa 1 do experimento. Em seguida, são apresentados e discutidos os resultados obtidos sobre o processo fermentativo, correspondente a etapa 2 do experimento.

7.1. Etapa 1 - Recuperação da água presente na vinhaça biodigerida

As análises físico-químicas foram realizadas em todas as etapas do tratamento da vinhaça biodigerida. Na Tabela 5 encontra-se os valores obtidos para os parâmetros de condutividade, pH, turbidez, sólidos e DQO ao decorrer de cada tratamento.

A vinhaça biodigerida proveniente da usina apresentou pH condizente com o que se encontra na literatura, o qual para processos de biodigestão anaeróbia os valores de pH estão entre 6 a 8 (CREMONEZ *et al.*, 2013). A concentração média de Demanda Química de Oxigênio (DQO) foi de 24108 ($\pm 2085,81$) mg O₂ L⁻¹. Este valor é considerado alto para a vinhaça biodigerida, uma vez que a vinhaça *in natura* normalmente apresenta teores de DQO entre 20000 a 35000 mg O₂ L⁻¹ (SZYMANSKI; BALBINOT; SCHIRMER, 2010). Para vinhaça biodigerida, a DQO nos estudos de GUERREIRO *et al.* (2016) e RODRIGUES *et al.* (2017) foi de 3856 mg O₂ L⁻¹ e 12550 mg O₂ L⁻¹, respectivamente. Nestes mesmos trabalhos, foi analisado a turbidez da vinhaça biodigerida e encontrou-se valores entre 900 e 1500 NTU, que são valores inferiores ao encontrado neste estudo (2190 NTU). A turbidez elevada condiz com a alta concentração de compostos orgânicos, como a elevada DQO, bem como íons presentes na amostra (ORTEGÓN *et al.*, 2016). A alta condutividade elétrica de 19559 $\mu\text{S cm}^{-1}$ também pode ser fundamentada pela presença dos altos teores de íons (Tabelas 6 e 7), tendo em vista que a condutividade elétrica é um parâmetro que mede a presença desses analitos dissolvidos na água (ORTEGÓN *et al.*, 2016). O teor de sólidos totais, sólidos totais voláteis e sólidos totais fixos na vinhaça biodigerida foram de 21680,00 mg L⁻¹; 14166,67 mg L⁻¹; e 7533,33 mg L⁻¹, respectivamente, corroborando com os altos teores encontrados de DQO, turbidez e íons nas amostras desse tratamento.

A condutividade elétrica da vinhaça biodigerida até o tratamento do filtro de polipropileno de 5 μm não apresentou diferença significativa, somente no último tratamento com filtro de polipropileno de 0,22 μm que houve diferença significativa, e ao final do processo teve-se uma redução de 5585 $\mu\text{S cm}^{-1}$ em relação ao valor da amostra inicial, como pode ser observado na Figura 9. Essa baixa redução de condutividade encontrada se deve ao fato de que os tratamentos não conseguiram reter as substâncias dissolvidas, que se dissociam em ânions e cátions e são responsáveis pela condutividade presente na amostra (FUNASA, 2014), tais dados estão de acordo com os valores encontrados para a concentração de cátions e ânions (Tabela 6 e 7), os quais apresentaram uma redução pequena ao final dos tratamentos.

Tabela 5. Composição das amostras de cada tratamento da vinhaça biodigerida.

Tratamento	Condutividade $\mu\text{S cm}^{-1}$	pH	Turbidez NTU	Sólidos Totais mg L^{-1}	Sólidos Totais Voláteis mg L^{-1}	Sólidos Totais Fixos mg L^{-1}	DQO $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$
VB	19559 (± 130) a	7,68 ($\pm 0,03$) b	2190,00 ($\pm 39,69$) a	21680,00 ($\pm 1015,14$) a	14166,67 ($\pm 714,37$) a	7533,33 ($\pm 469,77$) a	24108 ($\pm 2085,81$) bc
C/D	19075 (± 141) a	7,54 ($\pm 0,02$) b	1192,67 ($\pm 8,08$) b	20413,33 ($\pm 225,78$) ab	14486,67 ($\pm 501,21$) a	5893,33 ($\pm 723,63$) a	29988 ($\pm 2058,00$) a
CT	19512 (± 217) a	8,03 ($\pm 0,03$) a	830,83 ($\pm 5,80$) c	18646,67 ($\pm 142,42$) c	10920,00 ($\pm 604,62$) bc	7726,67 ($\pm 744,77$) a	26754 ($\pm 3278,24$) ab
FA	19199 (± 222) a	8,08 ($\pm 0,03$) a	827,67 ($\pm 17,39$) c	19226,67 ($\pm 482,22$) bc	12133,33 ($\pm 728,39$) bc	7653,33 ($\pm 538,37$) a	24990 ($\pm 1188,19$) bc
FPP 20	19182 (± 144) a	8,10 ($\pm 0,06$) a	746,33 ($\pm 119,98$) c	1986,67 ($\pm 278,59$) c	11866,67 ($\pm 274,58$) b	6960,00 ($\pm 213,85$) a	24402 ($\pm 1772,15$) bc
FCA	19327 (± 299) a	8,09 ($\pm 0,08$) a	769,00 ($\pm 50,59$) c	18146,67 ($\pm 387,37$) c	10453,33 ($\pm 1384,69$) cd	7693,33 ($\pm 105,77$) a	21168 ($\pm 739,88$) c
FPP 5	19363 (± 12) a	8,14 ($\pm 0,13$) a	797,67 ($\pm 12,06$) c	18213,33 ($\pm 473,40$) c	10960,00 ($\pm 509,13$) bc	7253,33 ($\pm 971,65$) a	25284 ($\pm 1636,92$) bc
FPP 0,22	13974 (± 325) b	7,99 ($\pm 0,03$) a	729,67 ($\pm 10,07$) c	15556,67 ($\pm 312,01$) d	8140 ($\pm 398,74$) d	7646,67 ($\pm 290,01$) a	20286 ($\pm 678,96$) c
F	285.33 *	37.91 *	311.53 *	40.94 *	27.59*	2.36 ns	10.58*

VB: vinhaça biodigerida; C/D: etapa coagulação e decantação; CT: etapa centrifugação; FA: etapa filtro de areia; FPP 20: etapa filtro de polipropileno 20 μm ; FCA: etapa filtro de carvão ativo; FPP 5: etapa filtro de polipropileno 5 μm ; FPP 0,22: etapa filtro de polipropileno 0,22 μm .

Letras diferentes na mesma coluna diferem ao Teste de Tukey a 5% de significância.

* significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

ns: não significativo ($p \geq 0,05$)

Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento.

Os processos de coagulação/decantação e centrifugação, filtros de areia, PP20, carvão ativo e PP5 retêm materiais com tamanho superior a 5 micras e o filtro de polipropileno de 0,22 μm , considerado um processo de microfiltração, é capaz de reter sólidos solúveis totais, sólidos em suspensão, turbidez, protozoários, oocistos, cistos, algumas bactérias e vírus (JUNIOR, 2006; DÍAZ-REINOSO et al., 2017) e dessa forma, os íons não foram retidos de maneira eficiente.

Figura 9. Redução de condutividade em relação a amostra inicial nos tratamentos da vinhaça biodigerida.

O pH inicial da vinhaça era 7,68 e foi corrigido para 7,5 para o processo de coagulação/decantação, o qual após a retirada do material decantado apresentou uma mudança de 0,04 em seu pH. Após a centrifugação observou-se uma variação significativa no pH, o qual foi para 8,03, tal variação evidencia que houve redução de sólidos como pode-se observar nos teores de turbidez, sólidos totais e totais voláteis que nesse tratamento (centrifugação) também diferiram significativamente do valor inicial. GUERREIRO *et al.* (2016) e RODRIGUES *et al.* (2017) em seus estudos observaram mudanças no pH da amostra após reduções em parâmetros como teor de DQO e turbidez. Após a etapa de centrifugação até o final do tratamento com PP 0,22 o pH das amostras não diferiram entre si, assim como os parâmetros de turbidez, condutividade, sólidos totais fixos e DQO mostrando que da mesma forma que a remoção desses parâmetros não foi significativa e a não alteração no pH seguiu o mesmo comportamento.

Pela Tabela 5 e Figura 10, observa-se que os processos de coagulação/decantação juntamente com o tratamento por centrifugação foram capazes de remover de forma cumulativa 62,06% da turbidez inicial, promovendo diferenças significativas ($p \leq 0,01$) do valor inicial. Após a centrifugação não houve diferença estatisticamente significativa na redução desse parâmetro, sendo que ao final de todas as etapas dos tratamentos realizados foi possível remover então 66,7% da

turbidez inicial dos materiais tratados. A turbidez é um parâmetro que mede a resistência da água à passagem de luz, proporcionada por partículas em suspensão, como coloides orgânicos e inorgânicos (APHA, 2012; KATSOYIANNIS *et al.*, 2017). ZAYAS *et al.* (2007) obteve redução de turbidez de 99% após o processo de coagulação/decantação utilizando uma dose de coagulante de 20 g L⁻¹. As diferenças dos resultados obtidas podem ser atribuídas às doses de coagulantes utilizados nos estudos, uma vez que na pesquisa de ZAYAS e colaboradores, a dose foi 100 vezes maior do que a dose que foi utilizada no presente estudo. Embora a dose de coagulante do trabalho desses autores tenha permitido maior remoção de material particulado, a massa foi equivalente a 20 % (v v⁻¹) do material a ser tratado e essa situação é inviável para ser adotada em prática industrial. Com isso, acredita-se que deve ser praticado o uso de baixas concentrações do coagulante, seguindo de processos complementares para a remoção da turbidez, pois assim os processos complementares devem ser eficientes para a remoção de partículas muito pequenas em suspensão.

Figura 10. Redução da turbidez em relação a amostra inicial nos tratamentos da vinhaça biodigerida

A análise de sólidos totais refere-se à soma do teor de sólidos voláteis totais e fixos totais (APHA, 2012), e pela Tabela 5 observa-se que o tratamento de coagulação/decantação não removeu de forma significativa os sólidos totais. Por outro lado, o processo de centrifugação foi capaz de remover eficientemente parte desses sólidos, pois reteve 8,6% do teor de sólidos presentes na vinhaça biodigerida após o tratamento de coagulação/decantação. Ademais, a eficiência de remoção dos sólidos totais após o tratamento por centrifugação até o tratamento PP 5 foi baixa, sem diferenças estatísticas entre os materiais após essas etapas do tratamento, contudo após o tratamento de filtração através do filtro PP 0,22 a redução cumulativa de sólidos totais foi de 28,2% (v v⁻¹), diferindo estatisticamente dos valores iniciais (Figura 11). A análise de sólidos voláteis totais indica o teor de sólidos orgânicos na amostra (APHA, 2012) e observa-se que no tratamento de

coagulação/decantação houve um pequeno aumento de 320 mg L^{-1} , o que pode ser atribuído ao coagulante adicionado. Os valores desse parâmetro no decorrer dos tratamentos sofreram reduções da ordem de 42,5% em relação ao inicial (Figura 12). Esses resultados corroboram com a remoção das partículas em suspensão indicada pela análise de turbidez, demonstrando que as mesmas diferenças significativas nos teores de sólidos totais entre os tratamentos aplicados. A análise de sólidos fixos totais indica o teor de sólidos inorgânicos (APHA, 2012), como os minerais, presentes na matriz analítica. De modo que, observando-se a Tabela 5 verifica-se que não ocorreram remoções significativas de sólidos fixos totais em função dos tratamentos utilizados. Esses resultados coincidem com as baixas remoções de cátions e ânions, conforme podem ser observadas nas Tabelas 6 e 7. Isto indica que os sólidos inorgânicos para serem removidos precisam de membranas com porosidade menores do que $0,22 \mu\text{m}$, utilizadas neste estudo.

Figura 11. Redução dos teores de sólidos totais na vinhaça biodigerida em função diferentes sistemas de tratamentos.

Figura 12. Redução dos teores de sólidos totais voláteis na vinhaça biodigerida em função de diferentes sistemas de tratamentos por filtração.

A demanda química de oxigênio da vinhaça biodigerida após o passar pelo tratamento de coagulação/decantação teve um aumento significativo em sua concentração, certamente devido a adição do coagulante que pode ter contribuído para seu aumento. ZAYAS *et al.* (2007) em seu estudo com vinhaça biodigerida constatou que ao usar baixas doses de coagulante a eficiência de remoção de DQO foi inferior à 20% e ao aumentar a dose obteve uma remoção de 84%. Além disso, analisando-se a Tabela 5 verifica-se que ao final do último tratamento (Filtro Polipropileno 0,22 μm) a DQO não difere significativamente da DQO inicial. Por esses motivos, pode-se dizer que os tratamentos somente com o coagulante/decantação não foram eficientes para a remoção da DQO.

Nas Tabelas 6 e 7, encontram-se os resultados obtidos dos teores de ânions e cátions, respectivamente, para as amostras de água proveniente da vinhaça biodigerida submetidas à diferentes tratamentos físico-químicos. Dentre esses resultados, pode-se destacar que, na vinhaça biodigerida oriunda do biorreator industrial da usina não foi detectado teores de nitrato, bem como de sulfato e amônio. No entanto, foram encontradas altas concentrações dos íons cloreto (3.950,58 mg L^{-1}), potássio (15.334,22 mg L^{-1}), magnésio (7.849,67 mg L^{-1}) e cálcio (1.284,87 mg L^{-1}). Esses teores elevados certamente são provenientes da vinhaça *in natura* e que não foram consumidos no processo de biodigestão anaérobica, uma vez que segundo a literatura altas concentrações desses minerais são relatadas na vinhaça *in natura* (CHRISTOFOLETTI *et al.*, 2013; ORTEGÓN *et al.*, 2016). E conforme SILVERIO *et al.* (2017), os teores de minerais presentes na vinhaça praticamente não sofrem alterações em suas concentrações pelo processo de metanogênese.

Tabela 6. Teores de ânions nos tratamentos aplicados à vinhaça biodigerida

Tratamento	Nitrato (mg L^{-1})	Cloreto (mg L^{-1})	Sulfato (mg L^{-1})	Fosfato (mg L^{-1})
VB	nd	3950,58 ($\pm 8,82$) bc	nd c	24,97 ($\pm 2,32$) bc
C/D	nd	3950,82 ($\pm 4,18$) bc	198,46 ($\pm 22,21$) b	46,03 ($\pm 14,44$) a
CT	nd	3923,15 ($\pm 37,17$) c	176,33 ($\pm 3,31$) b	27,32 ($\pm 0,83$) abc
FA	nd	4097,17 ($\pm 26,88$) a	184,38 ($\pm 2,63$) b	43,50 ($\pm 0,38$) ab
FPP 20	nd	4037,96 ($\pm 3,03$) ab	185,16 ($\pm 1,13$) b	41,76 ($\pm 0,61$) ab
FCA	nd	4009,08 ($\pm 9,64$) abc	184,05 ($\pm 7,14$) b	38,94 ($\pm 0,20$) ab
FPP 5	nd	3977,77 ($\pm 33,99$) bc	183,09 ($\pm 0,72$) b	47,26 ($\pm 1,00$) a
FPP 0,22	nd	3792,47 ($\pm 54,05$) d	242,64 ($\pm 2,16$) a	14,37 ($\pm 0,54$) c
F	-	20.35 *	144.05 *	10.45 *

VB: vinhaça biodigerida; C/D: etapa coagulação e decantação; CT: etapa centrifugação; FA: etapa filtro de areia; FPP 20: etapa filtro de polipropileno 20 μm ; FCA: etapa filtro de carvão ativo; FPP 5: etapa filtro de polipropileno 5 μm ; FPP 0,22: etapa filtro de polipropileno 0,22 μm .

Letras diferentes na mesma coluna diferem ao Teste de Tukey a 5% de significância.

* significativo ao nível de 1% de probabilidade ($p < 0,01$).

nd: não detectado

Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento.

Em relação aos teores de ânions a concentração total na vinhaça biodigerida foi de 3 975,55 mg L^{-1} (Tabela 6). No final de todos os tratamentos houve um aumento de 70,93 mg L^{-1} , tal aumento pode ser atribuído ao fato de que na etapa de coagulação/decantação houve a adição de 200 mg L^{-1}

de sulfato de alumínio. Ainda pode-se verificar que na vinhaça biodigerida não foi detectado teores de sulfato e que após a adição do coagulante foi possível detectá-lo nas amostras. Ademais, após o tratamento do filtro de areia houve um pequeno aumento nos teores de cloreto e fosfato, os quais diferem significativamente do valor da amostra inicial.

Os teores do íon cloreto presentes na matriz inicial diferem significativamente apenas dos teores desses íons nos materiais obtidos após a passagem no filtro de areia e no filtro PP 0,22. No material de estudo após submetido ao tratamento em filtro de areia observa-se que ocorreram aumento de 146,59 mg L⁻¹ nos teores de cloretos e no filtro PP0,22 houve uma redução de 4,65% (185,3 mg L⁻¹) em relação ao tratamento PP5.

O íon sulfato não foi detectado na vinhaça biodigerida, no entanto com a adição de sulfato de alumínio na etapa de coagulação a presença desse analito foi detectada nos tratamentos subsequentes. Após passar pela na etapa do filtro PP0,22, apresentou diferença significativa, observando-se aumento de 59 mg L⁻¹ em sua concentração.

A concentração do íon fosfato presente nas amostras foi baixa, cujo teor teve redução significativa de 10,6 mg L⁻¹ ao final de todos os tratamentos e também apresentou diferença significativa na etapa de coagulação/decantação, uma vez que houve um aumento em sua concentração nesse tratamento. A redução dos teores de ânions no final dos tratamentos pode ser observada na Figura 13.

Tabela 7. Teores de cátions nos tratamentos aplicados à vinhaça biodigerida

Tratamento	Sódio (mg L ⁻¹)	Potássio (mg L ⁻¹)	Cálcio (mg L ⁻¹)	Magnésio (mg L ⁻¹)	Amônio (mg L ⁻¹)
VB	515,91 (±3,46) ab	15334,22 (±137,14) a	1284,87 (±48,54) b	7849,67 (±68,56) bc	nd
C/D	530,32 (±1,34) a	15117,88 (±0,67) ab	1703,65 (±62,22) a	7966,53 (±52,40) ab	nd
CT	518,52 (±3,65) ab	15853,90 (±209,27) b	940,03 (±37,32) c	7979,73 (±92,41) ab	nd
FA	547,50 (±24,52) a	15192,55 (±68,55) ab	760,94 (±88,06) c	8087,67 (±6,69) a	nd
FPP20	529,64 (±0,03) a	15002,44 (±3,94) ab	895,25 (±5,58) c	7972,67 (±33,88) ab	nd
FCA	542,96 (±23,11) a	14917,23 (±44,27) ab	545,79 (±25,39) d	7639,68 (±29,22) c	nd
FPP5	557,33 (±0,70) a	14873,88 (±171,56) b	917,66 (±3,46) c	7815,73 (±47,48) bc	nd
FPP 0,22	479,57 (±0,06) b	14033,32 (±81,64) c	1142,98 (±38,72) b	7275,12 (±69,34) d	nd
F	7.97 *	23.52 *	114.14 *	43.01 *	-

VB: vinhaça biodigerida; C/D: etapa coagulação e decantação; CT: etapa centrifugação; FA: etapa filtro de areia; FPP 20: etapa filtro de polipropileno 20 µm; FCA: etapa filtro de carvão ativo; FPP 5: etapa filtro de polipropileno 5 µm; FPP 0,22: etapa filtro de polipropileno 0,22 µm.

Letras diferentes na mesma coluna diferem ao Teste de Tukey a 5% de significância.

* significativo ao nível de 1% de probabilidade (p<0,01).

ns: não significativo (p≥0,05)

Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento.

A concentração total de cátions na vinhaça biodigerida foi de 24.989,67 mg L⁻¹ e ao final de todos os tratamentos houve redução de 2.058,68 mg L⁻¹, equivalente a 8,2% do valor inicial. Os teores de sódio na amostra inicial não diferiram significativamente dos teores observados nas amostras de vinhaça biodigerida após o tratamento com o PP0 0,22, cuja redução total foi de 36,34 mg L⁻¹ (7,04%). Os teores de potássio na vinhaça biodigerida diferem significativamente da concentração observada nos tratamentos centrifugação, filtro PP5 e filtro PP0,22, em que na etapa de centrifugação houve um aumento de 519,68 mg L⁻¹ (3,4%) e nas etapas filtro PP5 e PP0,22 houve uma redução de 460,34 mg L⁻¹ (3%) e 1 300,9 mg L⁻¹ (8,48%), respectivamente, em relação ao teor da amostra inicial.

As concentrações de cálcio na amostra inicial não diferem estatisticamente da concentração final de cálcio no filtro PP0,22, cuja redução foi de 141,89 mg L⁻¹ (11,04%). O teor de magnésio na vinhaça biodigerida difere significativamente apenas dos teores desse elemento encontrados na amostra após os tratamentos como filtro de areia e com filtro PP 0,22. No filtro de areia observa-se um aumento de 238 mg L⁻¹ e no filtro PP0,22 houve uma redução de 6,9% (540,61 mg L⁻¹) em relação ao tratamento PP5. O íon amônio não foi detectado na vinhaça biodigerida, assim como nos tratamentos subsequentes aplicados. A redução dos teores de ânions ao final dos tratamentos pode ser observada na Figura 13.

Figura 13. Redução de cátions e ânions ao final do tratamento da vinhaça biodigerida

A partir das análises realizadas, de modo geral, observa-se que a remoção de turbidez, sólidos totais e sólidos totais voláteis pelo sistema de tratamento aplicado à vinhaça biodigerida foi mais eficiente do que a remoção dos teores de cátions e ânions. Além disso, que o sistema de filtração utilizado não foi eficiente para a redução dos teores desses minerais. Uma possível explicação para isso é que os minerais são moléculas muito pequenas, de modo que não conseguem ser retidas pelo filtro PP0,22 (porosidade de 0,22 µm), segundo JUNIOR (2006) moléculas responsáveis pela dureza (íons cálcio e magnésio) podem ser removidos pelo processo de nanofiltração (tam. poro <2nm) e outros íons como sulfatos, nitratos e sódio pelo processo de osmose reversa. Esses resultados estão

de acordo com a literatura, a qual aponta que para a remoção de cátions e ânions em amostras líquidas é preciso etapas de desmineralização, sendo os métodos mais empregados a osmose reversa e a colunas com resinas de troca iônicas (BOCHENEK; SITARZ; ANTOS, 2011; BITAW; PARK; YANG, 2016), para assim gerar produto final com elevado grau de pureza (TAVARES *et al.*, 2004).

A qualidade da água recuperada ao final do tratamento apesar de não atender aos padrões de qualidade para potabilidade e usos mais exigentes de qualidade, como para a geração de vapor em caldeiras de alta pressão. Para esta finalidade as concentrações de cálcio e magnésio presentes na água devem ser inferiores à 0,3 mg L⁻¹ e a condutividade de máxima de 5.400 µS cm⁻¹ (ANA, 2009). Contudo, tem potencial para ser aplicada em outras finalidades dentro do processo industrial de uma usina, como é o caso da sua aplicação no preparo do mosto para fermentação alcoólica. Assunto esse que será discutido no próximo tópico.

7.2. Etapa 2 - Ensaio de fermentação alcoólica

7.2.1. Concentração de açúcares no mosto e no vinho delevedurado

Na tabela 8 são demonstrados os resultados dos açúcares glicose, frutose, sacarose e açúcares redutores totais (ART) no mosto de fermentação encontrados nos Tratamento T1 e T2 (T1 – diluição do xarope com água destilada; T2 - diluição do xarope com água recuperada da vinhaça biodigerida), no decorrer de quatro ciclos fermentativos.

Tabela 8. Teores de glicose, frutose, sacarose e ART no mosto de fermentação.

Tratamento	Ciclo fermentativo			
	1	2	3	4
Glicose mg L⁻¹ - Mosto				
T1	23 921,91 (±4 642,58) bA	24 327,74 (±4 192,08) abA	25 373,30 (±13 19,19) abA	27 203,57 (±776,94) aA
T2	12 613,12 (±1 082,36) aB	12 119,58 (±1 561,58) aB	12 267,07 (±1 080,92) aB	12 858,02 (±614,24) aB
Frutose mg L⁻¹ - Mosto				
T1	24 857,47 (±5 135,83) aA	25 404,57 (±4 724,66) aA	23 879,04 (±1 648,66) aA	25 185,64 (±1 163) aA
T2	13 703,80 (±1 637,30) aB	12 950,43 (±2496,38) aB	11 181,51 (±399,55) aB	12 389,23 (±1 420,78) aB
Sacarose mg L⁻¹ - Mosto				
T1	111 359,37 (±8 813,75) abB	118 523,02 (±12 467,33) bB	101 283,50 (±12 224,72) aB	100 980,66 (±2 079,15) aB
T2	148 861,64 (±12 894,41) aA	144 756,58 (±2 589,29) aA	142 502,61 (±8 606,99) aA	142 286,82 (±3 720,01) aA
ART mg L⁻¹ - Mosto				
T1	165 706,71 (±10 515,55) bB	174 181,48 (±8 996,68) aA	155 600,01 (±13 003,02) bB	158 418,91 (±3 236,24) bB
T2	182 621,64 (±15 482,81) aA	177 064,42 (±4 302,31) aA	173 076,32 (±8 060,37) aA	174 648,41 (±4 258,12) aA

Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5%, através da aplicação do teste de Tukey.

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si, ao nível de significância de 5%, através da aplicação do teste de Tukey.

Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento nos dois blocos.

Observa-se que os teores de açúcares (glicose, frutose e sacarose) nos dois tratamentos diferem significativamente entre si, apesar dos mostos terem sido preparado a partir do mesmo xarope utilizado nos dois tratamentos. A concentração de glicose e frutose no T1 foram maiores do que no T2, em média 100 (±9,46) % e 98,6 (±13,51) %, respectivamente. Por outro lado, a concentração de sacarose no T2 foi, em média 36% maior do que o observado no T1. Os teores de açúcares nos mostos utilizados nos diferentes ciclos dentro do tratamento 2 não diferem significativamente entre si. No tratamento 1, os teores de glicose diferiram significativamente nos ciclos 1 e 4. Por outro lado, não foram observadas diferenças nos teores de frutose. Já os teores de sacarose não apresentaram diferenças entre os ciclos.

Ainda na Tabela 8 pode-se observar os teores de ART no mosto, cujo cálculo leva-se em conta a soma dos açúcares na forma de açúcares redutores em que a sacarose é desdobrada em açúcar invertido. Considerando a estequiometria da inversão da sacarose em glicose e frutose, para cada 100 g de sacarose produz-se 105 g de açúcares redutores. Dessa forma, o ART entre os mostos do T1 e T2 diferiram estatisticamente, sendo essa diferença, em média, de 8%, tal diferença foi devido à dificuldade de se padronizar a quantidade de açúcares no T2 pela análise de sólidos solúveis (°BRIX),

uma vez que neste tratamento ao diluir o xarope com a água recuperada da vinhaça biodigerida uma quantidade significativa de sólidos solúveis que não eram açúcares estava presente. Dentro do tratamento 2, o ART dos ciclos não diferiu estatisticamente, apenas no T1 que o ART do ciclo 2 diferiu dos demais.

Os teores de ART utilizados para conduzir esse trabalho foram semelhantes às concentrações de açúcares recomendadas e utilizadas nas usinas brasileiras, que variam de 16 a 18% no mosto de fermentação alcoólica (TONOLI, 2017). Concentrações de substrato elevadas, entre outros fatores, podem inibir as leveduras, dado que quando estressadas começam a ter rendimento menor pela incapacidade de fermentar todo o açúcar disponível (NOVELLO, 2015).

Na tabela 9 observa-se que os teores residuais de glicose, frutose, sacarose e ART encontrados no vinho delevedurado em ambos tratamentos no decorrer dos ciclos fermentativos (T1 – diluição do xarope com água destilada; T2 - diluição do xarope com água recuperada da vinhaça biodigerida).

Tabela 9. Teores de açúcares totais glicose, frutose, sacarose e ART no vinho delevedurado.

Tratamento	Ciclo fermentativo			
	1	2	3	4
GLICOSE mg L⁻¹ – VINHO				
T1	110,22 (±53,10) aA	35,31 (±24,43) bA	63,08 (±34,07) bA	123,96 (±67,85) aA
T2	111,75 (±54,67) aA	16,60 (±32,96) bA	26,30 (±36,59) bB	10,42 (±21,01) bB
FRUTOSE mg L⁻¹ - VINHO				
T1	87,07 (±66,73) aA	76,69 (±50,14) aA	111,62 (±81,24) aA	132,63 (±64,32) aB
T2	247,50 (±341,13) bA	546,35 (±579,28) bA	111,18 (±59,85) bA	1838,53 (±2329,70) aA
SACAROSE mg L⁻¹ - VINHO				
T1	nd	nd	nd	nd
T2	nd	nd	nd	nd
ART mg L⁻¹ - VINHO				
T1	197,29 (±103,91) aA	112,00 (±54,33) aA	176,04 (±104,13) aA	256,59,61 (±100,17) aB
T2	359,25 (±346,71) bA	562,95 (±576,08) bA	137,48 (±64,35) bA	1879,39 (±2392,63) aA

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento nos dois blocos.

n.d.: não detectado.

Em ambos os tratamentos e no decorrer de todos os ciclos fermentativos, nas amostras coletadas e analisadas observa-se que não foram detectados a presença de sacarose no vinho delevedurado demonstrando que as leveduras inverteram toda sacarose presente no mosto em glicose

e frutose. Por outro lado, observa-se a presença de glicose e frutose em todos os ciclos fermentativos dos dois tratamentos, apesar de serem concentração baixas, menores do que 1% da concentração inicial de açúcar. Esses resultados demonstram que as leveduras não foram capazes de consumir todo o açúcar disponível nos mostos.

Os teores de glicose no vinho delevedurado do Tratamento 1 foram maiores nos ciclos 1 e 4 ($110,22 \pm 53,1 \text{ mg L}^{-1}$; $123,96 \pm 67,85 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente), os quais diferem significativamente dos ciclos 2 e 3. No ciclo 2 observa-se um consumo maior de glicose, no entanto com o decorrer do reciclo o residual foi aumentando. No tratamento 2, a concentração de glicose nas amostras do ciclo 1 foi maior do que as concentrações de glicose encontradas nos demais ciclos. Sendo que foi observado o menor teor residual desse açúcar ($10,42 \text{ mg L}^{-1}$) na amostra do ciclo 4. Comparando os resultados dos teores de glicose observados nos dois tratamentos investigados, no ciclo 1 e 2 as concentrações de glicose não diferiram significativamente entre os tratamentos. Contudo, nas amostras dos ciclos 3 e 4 foram obtidos resultados, os quais apresentam diferença estatística, em que o teor de glicose no T1 foi maior que no T2, sendo os valores de T1 ciclo 3: $63,08 \text{ mg L}^{-1}$ e ciclo 4: $23,96 \text{ mg L}^{-1}$ e T2 ciclo 3: $26,30 \text{ mg L}^{-1}$ e ciclo 4: $10,42 \text{ mg L}^{-1}$.

Os teores de frutose no vinho delevedurado em ambos tratamentos foram maiores do que os teores de glicose, sendo que no último ciclo observa-se as maiores concentrações. Tal comportamento deve-se ao fato de as leveduras consumirem a glicose de forma preferencial. (BERTHELIS *et al.*, 2004) realizaram um estudo com 16 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* avaliando as diferenças de consumo de glicose e frutose e observaram o consumo da frutose foi lento e ponderaram que esse efeito é uma das principais causas de os teores de frutose residual serem mais elevados. Os teores de frutose no vinho do T1 ao decorrer dos ciclos, apesar não apresentarem diferença estatística, aumentou nos ciclos 3 e 4, e no T2 não se observa diferença significativa nos ciclos 1, 2 e 3, apenas o ciclo 4 difere dos demais, devido a maior concentração residual ($1838,53 \text{ mg L}^{-1}$). O aumento de açúcar residual observado no último ciclo de fermentação pode ser decorrente do estresse pelo qual a levedura sofre ao decorrer dos reciclos (LOPES *et al.*, 2016) e no caso do T2 aos teores de sais superiores podem ter ocasionaram esse aumento na concentração de frutose.

As concentrações ART no vinho delevedurado (Tabela 2) no T1 não apresentaram diferenças significativa dos teores ART residuais entre os ciclos 1 e 2. Contudo, nos ciclos 3 e 4 foram observados aumentos nos teores de ART residual no vinho. No T2, os ARTs residuais nas amostras dos ciclos 1, 2 e 3 não diferem estatisticamente entre si. No entanto, foi observado que os teores de ART nas amostras de vinho do T2 ciclo foram maiores do que nos demais ciclos. Isso pode ser um indicativo que no ciclo 4 as leveduras não conseguiram consumir todo o açúcar disponível.

Os teores de ART residuais dos ciclos 1, 2 e 3 não diferem estatisticamente entre os tratamentos T1 e T2. No entanto, no ciclo 4 foram observadas diferenças entre os tratamentos. Tais resultados mostraram que apesar das maiores concentrações de sais presentes no T2, como observado nas Tabelas 13 e 14, o consumo de açúcar dos mostos nos dois tratamentos até o ciclo 3 não diferiram significativamente.

7.2.2. Viabilidade celular das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*,

Os resultados encontrados nas análises de viabilidade celular são demonstrados na Tabela 10. A viabilidade inicial do inóculo utilizado para ambos os tratamentos foi de 68,1%, por outro lado, pode-se observar que a viabilidade celular das leveduras no final do 1 ciclo já era de 80,34 %, Essa diferença representou um incremento de 16,7 % da viabilidade das células das leveduras.

Tabela 10. Viabilidade celular ao decorrer em todos os ciclos fermentativos

Tratamento	Viabilidade Celular (%)				
	Ciclo fermentativo				
		1	2	3	4
	Inicial	Final			
T1	68,10 ($\pm 1,06$) A	80,34 ($\pm 4,54$) aA	75,23 ($\pm 4,65$) abA	71,13 ($\pm 4,75$) bA	58,75 ($\pm 8,27$) cA
T2	68,10 ($\pm 1,06$) A	78,63 ($\pm 6,70$) aA	73,92 ($\pm 3,91$) aA	69,23 ($\pm 5,34$) bA	62,16 ($\pm 4,01$) cA

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento nos dois blocos.

No tratamento 1, a viabilidade das leveduras no final primeiro ciclo diferiu significativamente da viabilidade das leveduras encontradas nos ciclos 3 e 4. Além disso, no ciclo 4 os valores médios de viabilidade das leveduras diferiram estatisticamente dos valores encontrados nos outros ciclos. Ainda se forem comparadas as médias de viabilidades nos tempos finais dos quatro ciclos, verifica-se que ocorreram reduções de 21,6% no ciclo 4. No tratamento 2, a viabilidade das leveduras no final dos ciclos 1 e 2 não diferiram entre si, mas as viabilidades das leveduras nos ciclos 3 e 4 diferiram estatisticamente entre si e os demais ciclos. De modo que, no 4 ciclo os valores médios de viabilidade celular reduziram cerca de 16,47 %, quando comparados com o valores de viabilidade das leveduras no ciclo 1. Tais resultados demonstram que ocorreram perdas da viabilidade das células de leveduras submetidas aos dois tratamentos, indicando que as leveduras com o decorrer dos ciclos fermentativos sofreram estresse diversos que afetaram a viabilidades das células das leveduras. E esses resultados são coerentes com os maiores teores de açúcares residuais observados nos vinhos delevedurados, uma vez que como foi diminuindo a viabilidade, o consumo dos açúcares foi sendo comprometido.

Comparando as médias de viabilidade observadas nos finais dos ciclos fermentativos dos dois tratamentos observa-se que não ocorreram diferenças significativas entre o T1 e o T2 em nenhum dos ciclos. Esses resultados demonstram que o elevado teor de sais presentes no Tratamento 2 não foi a principal causa de perdas significativa de viabilidade das leveduras em relação ao tratamento controle.

De acordo com a literatura, entre as principais causas de redução de viabilidade em sistemas de fermentação que fazem ciclos de leveduras é a elevada contaminação microbiana. CHIN & INGLEDEW (1994) em seus estudos avaliaram o efeito da contaminação em fermentações e constataram que em fermentações com contaminações bacterianas de 10^8 UFC mL⁻¹ foram observadas reduções de até 60% na viabilidade celular das leveduras ao final de 5 ciclos. Nobre (2005) ao estudar o cultivo misto de *S. cerevisiae* e *B. subtilis* observou que contaminações acima de 10^6 UFC mL⁻¹ reduziram em 59,2 % a viabilidade da levedura.

O presente estudo foi conduzido ao máximo de forma estéril para evitar a contaminação dos reatores, dessa forma na Tabela 11 são demonstrados a contagem total de UFC mL⁻¹. Observa-se a baixa contaminação na ordem de 10^2 nos dois tratamentos mesmo com o decorrer dos ciclos, certamente esse parâmetro não deve ter influenciado a viabilidade celular, dado que efeitos prejudiciais na viabilidade são encitrados em casos de contaminação maiores do que de 10^6 UFC mL⁻¹. NOBRE (2005) em seu estudo ao avaliar o efeito da contaminação microbiana na ordem de 10^2 sobre a viabilidade das leveduras *S. cerevisiae* observou que não houve diferenças significativas na viabilidade comparada com o tratamento controle, pressupõe-se com isso que a contaminação microbiana não é causa da redução de viabilidade neste estudo.

Tabela 11. Contagem contaminação total observadas ao longo dos ciclos fermentativos.

Tratamento	UFC mL ⁻¹				
	Ciclo fermentativo				
		1	2	3	4
	Inicial	Final			
T1	1×10^2	$0,73 \times 10^2$	$0,68 \times 10^2$	$0,36 \times 10^2$	$1,51 \times 10^2$
T2	$2,5 \times 10^2$	$1,56 \times 10^2$	$1,14 \times 10^2$	$2,55 \times 10^2$	$6,45 \times 10^2$

Na tabela 12 são demonstrados os valores para concentração de leveduras ao decorrer dos ciclos fermentativos.

Tabela 12. Concentração de leveduras na suspensão

Tratamento	Ciclo fermentativo			
	1	2	3	4
	Concentração de leveduras na suspensão (g L ⁻¹)			
T1	42,51 (4,70) aA	40,66 (±3,56) aA	41,81 (±4,23) aA	40,47 (±4,11) aA
T2	43,89 (±3,14) aA	35,74 (±3,71) bB	34,03 (±3,61) bB	32,84 (±3,11) bB

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento nos dois blocos.

No tocante a concentrações de leveduras ao longo dos ciclos fermentativos, observa-se que no Tratamento 1 não ocorreram diferenças estatisticamente significativas, embora tenha sido observado a redução de 2 g L^{-1} de leveduras no ciclo 4, quando comparado com o ciclo 1.

No tratamento 2, observa-se que as concentrações de leveduras ao longo dos ciclos fermentativos 2, 3 e 4 não diferiram estatisticamente entre si, mas em relação ao ciclo 1 há uma diferença significativa, em que do ciclo 1 para o ciclo 2 a concentração de leveduras diminuiu $8,15 \text{ g L}^{-1}$. A redução nas concentrações de leveduras foi verificada ciclo após ciclo, chegando no último ciclo de fermentação com valores de $11,04 \text{ g L}^{-1}$ menor que o observado no ciclo 1.

Comparando-se os valores de concentração de células de leveduras de T1 com os valores de T2 observa-se que no ciclo 1 não ocorreu diferenças estatísticas entre eles. No entanto, nos ciclos 2, 3 e 4 foram encontradas diferenças significativas, uma vez que no T2 a concentração de leveduras foi diminuindo significativamente e no T1 manteve-se constante. A redução da concentração de biomassa no decorrer dos ciclos também foi relatado por BRANDBERG; GUSTAFSSON; FRANZÉN (2007).

Segundo D'AMORE *et al.* (1988) e STEINLE (2013) altas concentrações de soluto resultam em maiores pressões osmóticas para as leveduras. Essa pressão osmótica leva às perturbações no gradiente osmótico e tem como consequência a redução do crescimento das células de levedura. GALAFASSI *et al.* (2013) em seu estudo com levedura para produção de vinho avaliaram o crescimento dessas leveduras em meio com elevadas concentrações de sais e observaram redução de 70% na taxa de crescimento das leveduras. Dessa forma, pressupõe-se que as altas concentrações de sais (Tabela 13 e 14) no mosto utilizado no tratamento 2, no qual as leveduras foram expostas, levaram-nas a uma menor produção de biomassa ciclo após ciclo comparado com o T1.

7.2.3. Teor de cátions e ânions

Nas Tabelas 13 e 14 é possível observar os resultados obtidos da determinação das concentrações de cátions e ânions no mosto de fermentação e no vinho de levedurado, respectivamente. Em ambos tratamentos, no decorrer dos ciclos fermentativos (T1 – diluição do xarope com água destilada; T2 - diluição do xarope com água recuperada da vinhaça biodigerida).

Tabela 13. Teor de cátions no mosto de fermentação e vinho delevedurado

Trat.	Ciclo fermentativo				Ciclo Fermentativo			
	1	2	3	4	1	2	3	4
	Sódio mg L ⁻¹ - MOSTO				Sódio mg L ⁻¹ - VINHO			
T1	1 568,57 (±172,71) bA	1 629,30 (±149,88) bA	1 630,20 (±172,01) bA	1 746,49 (±28,89) aA	2 062,27 (±533,68) aA	2 008,97 (±544,05) aA	1 975,41 (±634,96) aA	2 077,20 (±477,67) aA
T2	1 158,31 (±109,78) aB	1 197,72 (±130,22) aB	1 175,84 (±118,98) aB	1 223,26 (±103,46) aB	1 474,69 (±290,38) aB	1 377,27 (±345,46) aB	1 380,51 (±350,03) aB	1 557,52 (±44,28) aB
	Potássio mg L ⁻¹ - MOSTO				Potássio mg L ⁻¹ - VINHO			
	1	2	3	4	1	2	3	4
	Sódio mg L ⁻¹ - MOSTO				Sódio mg L ⁻¹ - VINHO			
T1	5 173,66 (±167,71) bB	5 352,63 (±165,05) abB	5 447,25 (±79,64) aB	5 414,22 (±94,66) aB	6 808,72 (±1987,84) aB	6 765,62 (±1732,43) aB	6 668,98 (±1840,24) aB	6 956,95 (±1588,79) aB
T2	13 098,10 (±123,71) bA	13 527,02 (±106,31) aA	13 374,33 (±279,29) aA	13 535,91 (±147,96) aA	17 260,34 (±4527,67) aA	16 829,66 (±4342,83) aA	16 775,38 (±4663,08) aA	16 376,18 (±4178,37) aA
	Magnésio mg L ⁻¹ - MOSTO				Magnésio mg L ⁻¹ - VINHO			
	1	2	3	4	1	2	3	4
	Sódio mg L ⁻¹ - MOSTO				Sódio mg L ⁻¹ - VINHO			
T1	3 835,23 (±111,17) aB	3 973,91 (±93,50) aB	3 924,02 (±132,14) aB	3 950,35 (±91,22) aB	3 756,82 (±379,40) aB	3 617,99 (±432,71) aB	3 445,81 (±307,15) aB	3 615,96 (±558,11) aB
T2	11 222,83 (±237,71) bA	11 407,80 (±64,06) abA	11 477,56 (±302,10) abA	11 691,29 (±306,27) aA	10 713,34 (±1263,95) aA	10 291,47 (±1279,41) aA	10 269,01 (±1023,81) aA	9 998,77 (±1174,14) aA
	Cálcio mg L ⁻¹ - MOSTO				Cálcio mg L ⁻¹ - VINHO			
	1	2	3	4	1	2	3	4
	Sódio mg L ⁻¹ - MOSTO				Sódio mg L ⁻¹ - VINHO			
T1	684,25 (±791,34) aB	400,14 (±412,54) abB	97,23 (±113,11) abB	nd bB	1 188,74 (±1372) aB	1 262,60 (±1198,54) aB	868,16 (±753,13) abA	611,50 (±706,10) bB
T2	3 249,41 (±55,21) aA	3 727,39 (±335,93) aA	3 385,45 (±169,65) aA	3 632,34 (±162,54) aA	3 014,42 (±814,62) aA	2 887,82 (±1269,38) aA	2 748,94 (±1166,22) aB	2 728,16 (±1182,26) aA

Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento em dois blocos.

nd: não detectado

Na Tabela 13, pode-se verificar que os teores de sódio no mosto do T1 nos ciclos 1, 2 e 3 não diferem estatisticamente entre si e são menores do que os teores de sódio no ciclo 4, em que se observa neste ciclo uma diferença de cerca de 1%. No mosto do T2 as concentrações de sódio nos mostos não diferem estatisticamente entre os ciclos fermentativos. Comparando os mostos dos dois tratamentos há diferença significativa entre eles em todos os ciclos, sendo tal diferença em média 454,86 ($\pm 49,00$) mg L⁻¹ maior no T1. No vinho delevedurado observa-se que os teores de sódio do T1 com o decorrer dos ciclos fermentativos não apresentam diferenças significativas, bem como os teores de sódio nos mostos dos 4 ciclos fermentativos no T2 não diferem estatisticamente entre si. Comparando os vinhos dos dois tratamentos há diferença significativa entre eles em todos os ciclos, em que assim como no mosto do T1 os teores eram maiores, no vinho também se observa essa relação.

Os teores de potássio no mosto do T1 no ciclo 1 difere estatisticamente dos ciclos 3 e 4, cerca de 5% menor, e nos ciclos 2, 3 e 4 não há diferenças significativas entre eles. No mosto do Tratamento 2, o ciclo 1 difere estatisticamente dos demais ciclos e os ciclos 2, 3 e 4 não diferem entre si. Comparando o mosto dos dois tratamentos há diferença significativa entre eles em todos os ciclos, em que no T2 o teor de potássio foi em média 8.036,00 ($\pm 130,00$) mg L⁻¹ maior que o Tratamento 1. Esta diferença é maior do que a própria concentração desse íon no T1. No vinho delevedurado em que os teores de potássio do T1, no decorrer dos ciclos fermentativos não apresentaram diferenças significativas, assim como no T2. Por outro lado, ao comparar os dois tratamentos verifica-se que há diferenças estatísticas entre eles em todos os ciclos, sendo que no T2, o teor de potássio é em média 10.010,32 ($\pm 430,06$) mg L⁻¹ maior que o Tratamento 1, e da mesma forma que no mosto tal diferença foi maior do que a própria concentração desse íon no T1.

Em relação a concentração de magnésio nos mostos utilizados no T1 verifica-se que não há diferença estatística nos teores desse elemento nos diferentes ciclos de fermentação. E nos mostos utilizados no T2, os teores de magnésio entre os ciclos 1 e 4 diferem estatisticamente entre si. Comparando o mosto dos dois tratamentos há diferença significativa entre eles em todos os ciclos, uma vez que os teores desse íon no T2 foram em média 7.528,99 ($\pm 157,60$) mg L⁻¹ maior que no T1. No vinho delevedurado do T1 não foram observadas diferenças estatísticas entre as concentrações de magnésio nos 4 ciclos fermentativos. Também não foram encontradas diferenças estatísticas nos teores de magnésio nos 4 ciclos fermentativos para o T2. Comparando os dois tratamentos entre si verifica-se que ocorreram diferenças estatísticas nos teores médios de magnésio entre eles, em todos os ciclos fermentativos. Sendo que, no T2 as concentrações de magnésio foram em média 6 709,00 ($\pm 246,3$) mg L⁻¹ maiores do que no T1.

As concentrações de cálcio nos mostos do T1 apresentaram diferenças estatísticas apenas entre os ciclos 1 e 4. No mosto do tratamento 2 não há diferença estatística entre os ciclos. Comparando-se os dois tratamentos entre si, observa-se que ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre eles em todos os ciclos fermentativos. Sendo observado que no T2 a concentração média foi de 3203,24 ($\pm 452,35$) mg L⁻¹ maior que no T1.

Tabela 14. Teor de ânions no mosto de fermentação e vinho delevedurado

Trat.	Ciclo fermentativo				Ciclo Fermentativo			
	1	2	3	4	1	2	3	4
	Cloreto mg L⁻¹ - MOSTO				Cloreto mg L⁻¹ - VINHO			
T1	1 991,60 (±98,26) aB	2 006,31 (±43,94) aB	2 042,87 (±85,21) aB	2 053,66 (±43,94) aB	2 896,24 (±476,65) aB	2 408,74 (±63,09) abB	2 589,02 (±150,91) abB	2 374,89 (±305,96) bB
T2	5 114,44 (±131,08) aA	5 215,85 (±264,31) aA	5 138,05 (±141,52) aA	5 070,51 (±197,06) aA	6 007,15 (±114,29) aA	5 357,02 (±322,37) bA	5 900,92 (±201,32) aA	5 307,48 (±144,59) bA
	Nitrato mg L⁻¹ - MOSTO				Nitrato mg L⁻¹ - VINHO			
T1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
T2	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Fosfato mg L⁻¹ - MOSTO				Fosfato mg L⁻¹ - VINHO			
T1	1243,07 (±268,78) abA	1307,36 (±311,10) aA	1279,12 (±379,09) abA	1220,43 (±336,30) bA	636,36 (±125,03) bB	1419,00 (±70,92) aA	1338,34 (±120,53) aA	1296,73 (±15,30) aA
T2	997,94 (±308,58) aB	1017,94 (±313,55) aB	991,22 (±294,91) aB	1036,91 (±349,14) aB	1072,62 (±313,41) aA	1056,30 (±95,92) aB	1112,96 (±275,83) aB	1092,49 (±286,80) aB
	Sulfato mg L⁻¹ - MOSTO				Sulfato mg L⁻¹ - VINHO			
T1	955,31 (±27,43) aB	988,94 (±54,63) aB	994,37 (±39,90) aB	975,60 (±9,98) aB	605,43 (±14,22) aB	654,40 (±4,60) aA	653,47 (±17,01) aB	670,93 (±29,03) aB
T2	1380,67 (±183,33) aA	1416,79 (±233,86) aA	1359,28 (±187,98) aA	1367,10 (±156,31) aA	1009,37 (±171,91) aA	1036,42 (±98,28) aB	1114,12 (±186,28) aA	1100,62 (±151,25) aA

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

n.d.: não detectado.

Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento em dois blocos.

No vinho delevedurado do T1 ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre o ciclo 4 e os ciclos 1 e 2. Já no vinho do T2 não foram observadas diferenças estatísticas entre os quatros ciclos. Ao comparar os dois tratamentos, é possível observar que em todos os ciclos os teores de cálcio do T2 foram maiores do que T1, em média de $1.862,09 (\pm 202,14) \text{ mg L}^{-1}$.

Na Tabela 14 é possível observar os resultados obtidos das concentrações de ânions nos mostos para as fermentações e nos vinhos delevedurados, em ambos tratamentos, no decorrer dos 4 ciclos fermentativos (T1 – diluição do xarope com água destilada; T2 - diluição do xarope com água recuperada da vinhaça biodigerida).

A concentração de cloreto no mosto do T1 foi em média de $2017,19 (\pm 31,43) \text{ mg L}^{-1}$ e não apresentou diferença significativa entre os ciclos fermentativos desse tratamento. Nas amostras de mosto do T2 também foi observado diferença significativa entre os ciclos fermentativos desse Tratamento. Comparando os dois tratamentos entre si, verifica-se que em todos os ciclos há diferença significativa entre o T1 e o T2, sendo este último apresentou em média $3111,1 (\pm 79,5) \text{ mg L}^{-1}$ maior que o T1. No vinho delevedurado, é possível observar que ocorreram diferenças estatística entre os teores de cloretos nos ciclos 1 e 4. Também pode ser observado que no T2 os teores de cloretos dos vinhos delevedurados dos ciclos 1 e 3 diferiram estatisticamente nos ciclos 2 e 4. Entre os dois tratamentos observa-se diferença estatística entre eles em todos os ciclos, em que o T2 apresentou em média $3095,72 (\pm 176,77) \text{ mg L}^{-1}$ de cloreto a mais do que no maior que no T1.

No tocante aos teores de nitrato, não foram detectados nas amostras de em nenhum dos dois tratamentos avaliados.

As concentrações de fosfato no mosto do T1 foram $1243,07 (\pm 268,78) \text{ mg L}^{-1}$; $1307,36 (\pm 311,10) \text{ mg L}^{-1}$; $1279,12 (\pm 379,09) \text{ mg L}^{-1}$; $1220,43 (\pm 336,30) \text{ mg L}^{-1}$ para os ciclos 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Considerando esses resultados os valores obtidos nos ciclos 2 e 4, diferiram estatisticamente, sendo essa diferença de de 86 mg L^{-1} . No T2, os teores médios de fosfatos nos mostos dos 4 ciclos fermentativos não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Comparando os mostos dos dois tratamentos verifica-se diferença estatística entre eles, em que no T1 o teor de fosfato é em média $251,49 (\pm 49,78) \text{ mg L}^{-1}$ maior que o T2. Em relação ao vinho delevedurado, no T1 os teores de fosfato do ciclo 1, diferiram significativamente dos teores de fosfato dos demais ciclos. Já no T2, as concentrações de fosfato nos vinhos delevedurados dos diferentes ciclos fermentativos não apresentam diferenças estatísticas entre si. Ao comparar os resultados dos teores médios de fosfatos encontrados no T1 e no T2, observa-se que ocorreram diferença estatística entre eles em todos os ciclos, em que em média a concentração de fosfato no vinho delevedurado do T1 é maior $307,15 (\pm 111,00) \text{ mg L}^{-1}$ que o T2.

Os teores de sulfato nos mostos do T1 foram $955,31 (\pm 27,43) \text{ mg L}^{-1}$; $988,94 (\pm 54,63) \text{ mg L}^{-1}$; $994,37 (\pm 39,90) \text{ mg L}^{-1}$; $975,60 (\pm 9,98) \text{ mg L}^{-1}$. Estes resultados não diferiram estatisticamente entre si nos ciclos fermentativos, assim como no T2 não se observa essa diferença estatística. Ao avaliar as diferenças nos teores médios de sulfato entre os dois tratamentos, verifica-se que diferiram significativamente entre si em todos os ciclos e que os teores de sulfato do T2 foram de $402,41 (\pm 29,99) \text{ mg L}^{-1}$ maiores do que no T1. Em relação ao vinho delevedurado, os teores de sulfato no T1 não diferiram estatisticamente no decorres

dos ciclos fermentativos, sendo em média 646,06 ($\pm 28,25$) mg L⁻¹. No vinho delevedurado do T2, os teores de sulfato entre os ciclos não diferem estatisticamente e a concentração média foi de 1065,13 ($\pm 50,31$) mg L⁻¹. Comparando os vinhos delevedurado dos dois tratamentos entre si, verifica-se que em todos os ciclos ocorreram diferenças significativas entre o T1 e o T2. Neste último, em média, os teores de sulfato foram 419 ($\pm 33,97$) mg L⁻¹ maiores que o T1.

No que tange aos constituintes inorgânicos catiônicos e aniônicos, eles desempenham e auxiliam em diversas funções metabólicas e estruturais dentro das células das leveduras. O potássio em ambos os tratamentos foi o cátion mais abundante no mosto e no vinho delevedurado. É um mineral de grande importância, uma vez que está associado com a regulação do crescimento e da fermentação das leveduras, por outro lado, altas concentrações de potássio externo podem levar a despolarização da membrana plasmática e afetar o transporte de cátions bivalentes, reduzindo por exemplo a absorção de magnésio (JONES; GADD, 1990).

Os cátions bivalentes, como cálcio e magnésio são essenciais para as leveduras, uma vez que estimulam crescimento e a replicação, além de serem cofatores em diversos processos metabólicos. No entanto, elevadas concentrações os tornam tóxicos dado que podem bloquear grupos funcionais de biomoléculas, inibir sistemas de transporte de nutrientes e promover ruptura da estrutura da membrana plasmática, comprometendo o metabolismo celular e podendo levar as leveduras a morte celular (JONES; GADD, 1990; WALKER, 1998). Altas concentrações de cálcio afetam o crescimento das leveduras, uma vez que competem pela ligação no mesmo sistema de transporte que transporta o magnésio (LOPES, 1989).

Os ânions mais relevantes para o crescimento e metabolismo celular das leveduras são os íons cloreto, sulfato e fosfato. O fosfato é essencial para a formação ácidos nucleicos e moléculas estruturais, o sulfato é um ânion assimilado pelas leveduras para a formação de metionina e glutatona e o íon cloreto está associado a regulação do conteúdo de água das células (WALKER, 1998).

RODRIGUES & SANT'ANNA (2001) em seu estudo sobre o efeito do cloreto de sódio sobre as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* observaram que esse sal na concentração de 0,6M afetou a produção de biomassa, em que o controle sem adição do sal apresentou uma produção de biomassa 25,73% superior. Além disso, verificou que houve estresse na membrana plasmática devido a pressão osmótica dado que a concentração de proteínas extracelulares foi maior que no tratamento controle. LOPES (1989) descreve que para alcançar alta eficiência no processo fermentativo as concentrações de fosfato devem estar entre 190 e 1710 mg L⁻¹.

Neste estudo, verificou-se que os teores totais de cátions e ânions no T2 foram maiores do que os teores desses íons encontrados no T1. Uma possível explicação para tal é que no tratamento 2 essas concentrações representam íons que vieram com a água recuperada da vinhaça biodigerida em conjunto com os íons presentes no xarope utilizado substrato para as leveduras. Os teores de cátions foram os que mais diferiram entre os tratamentos, em que no mosto do T1 verifica-se uma concentração média entre os ciclos de 11206,86 ($\pm 123,99$) mg L⁻¹ e no T2 esse teor de cátions foi de 29521,14 ($\pm 597,20$) mg L⁻¹. No vinho, verifica-se no T2 uma concentração de cátions de 17997,945 mg L⁻¹ maior que no T1. Dessa forma, pressupõe-se que as elevadas concentrações dos constituintes inorgânicos no T2, comparado ao observado

no T1, tenham sido a causa do estresse osmótico observado nas leveduras através dos parâmetros de concentração de leveduras (Tabela 12) teor de glicerol (Tabela 15), rendimento (Tabela 17) e produtividade (Tabela 18).

7.2.4. Glicerol

Na Tabela 15 é possível observar os resultados obtidos dos teores de glicerol no mosto de fermentação e no vinho delevedurado em ambos tratamentos no decorrer dos ciclos fermentativos (T1 – diluição do xarope com água destilada; T2 - diluição do xarope com água recuperada da vinhaça biodigerida).

Tabela 15. Teores de Glicerol no mosto de fermentação e vinho delevedurado

	Ciclo fermentativo			
	1	2	3	4
	Glicerol mg L ⁻¹ - Mosto			
T1	nd	nd	nd	nd
T2	nd	nd	nd	nd
	Glicerol mg L ⁻¹ - Vinho			
T1	10 505,19 (±421,58) aA	7 167,47 (±241,59) bA	6 905,85 (±882,82) cA	6 606,16 (±490,79) dA
T2	7 678,30 (±174,03) aB	6 572,86 (±398,15) bB	6 183,63 (±277,91) cB	5 982,45 (±322,02) cB

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

n.d.: não detectado.

Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento em dois blocos.

Verifica-se que nos mostos utilizados para a fermentação em ambos os tratamentos não foram detectados teores de glicerol. No vinho delevedurado dos dois tratamentos foi verificada a presença do analito, no T1 os maiores teores de glicerol foram no ciclo 1 (10505,19 ±421,58 mg L⁻¹) e os menores no ciclo 4 (6606,16±490,79 mg L⁻¹). Ademais, no Tratamento 1 as médias das concentrações de glicerol diferiram estatisticamente entre si em todos os ciclos fermentativos. No T2, os teores de glicerol com o decorrer da fermentação foram diminuindo, as concentrações do ciclo 1 (7678,30 ±174,03 mg L⁻¹) e ciclo 2 (6572,86 ±398,15 mg L⁻¹) diferem estatisticamente entre si e os teores de glicerol nos ciclos 3 e 4 não diferem entre si. Comparando os dois tratamentos entre si, observa-se que diferiram significativamente em todos os ciclos, no qual os teores de glicerol do T1 foram maiores do que no T2, como pode ser observado na Figura 14.

Figura 14. Teores de Glicerol no vinho delevedurado

Durante o processo de fermentação alcoólica pelas *Saccharomyces cerevisiae*, além da produção do etanol, principal produto de interesse, outros compostos também são formados. O glicerol é o subproduto mais abundante produzido pelas leveduras e sua síntese é uma resposta primária a osmotolerância (JONES; GADD, 1990), relacionado ao aumento da atividade das enzimas glicerol-3-fosfato desidrogenase e glicerol-3-fosfato fosfatase (MELO, 2006).

D'AMORE *et al.* (1988) e TONOLI (2017) em seus estudos sobre fermentações com altas concentrações de ART no mosto, maiores que 20%, constataram que a concentração de glicerol no vinho delevedurado foi aumentando com o aumento da quantidade de açúcar no mosto, tal comportamento se deve à pressão osmótica provocada pelos açúcares ocasionando respostas das leveduras à essas condições adversas. Contaminação bacteriana é outro fator que ocasiona a maior produção de glicerol pelas leveduras, CHERUBIN (2003) verificou em seu trabalho sobre o efeito da contaminação bacteriana na fermentação que com o decorrer dos ciclos fermentativos o aumento da contaminação na ordem 10^7 UFC ml⁻¹ levou a maior formação de glicerol.

No tratamento T1, como abordado anteriormente, os teores de ART não são considerados altos, a temperatura foi mantida constante e a contaminação microbiana foi baixa. Dessa forma, pressupõe-se que a redução dos teores de glicerol observada no decorrer dos ciclos está relacionada com as condições externas favoráveis as leveduras, ou seja, ambiente que não oferece pressão osmótica e não estimule a produção de glicerol elevada. GUTIERREZ (1991) utilizando mosto com concentração de 16% de açúcares observou que a produção de glicerol foi cerca de 6,2 g L⁻¹, resultados semelhantes ao observado no tratamento T1.

Por outro lado, em meios hipertônicos, como aqui observado no T2, as leveduras estão expostas a ao estresse osmótico, uma vez que acabam perdendo água para o meio externo e em resposta a essa condição diversos mecanismos regulatórios são ativados para a sobrevivência do organismo e proteção das estruturas

celulares (MELO, 2006). O glicerol, o qual é o principal composto produzido para essa osmotolerância em resposta a ambientes adversos. No tratamento T2 observa-se que sua concentração no vinho delevedurado no ciclo 1 foi de 7678,30 mg L⁻¹ ciclo 1, este valor é 36,8% menor que no tratamento 1, e nos demais ciclos fermentativos do T2 é observado o mesmo comportamento.

A literatura mostra que o estresse osmótico ocasionado por sais à *Saccharomyces cerevisiae* faz com que essas leveduras produzam e acumulem glicerol com o intuito de contrabalancear a pressão osmótica (BROWN, 1990; ALBERTYN *et al.*, 1994; WALKER, 1998). O sistema de transporte de glicerol que controla sua concentração no citosol é realizado através do canal Fps1p, codificado pelo gene FPS1. Esse canal permite às leveduras ajustarem a permeabilidade da membrana plasmática para o glicerol dependendo das condições externas, controlando a entrada e saída desse composto. Em condições hiperosmóticas, há inibição da atividade desse canal, diminuindo a difusão de glicerol para o meio extracelular e consequentemente, sua retenção intracelular (WALKER, 1998; OLIVEIRA, 2003; MELO, 2006).

Com isso, pressupõe-se que os teores de glicerol menores encontrados no T2 em relação ao T1 podem ser explicados por esse comportamento, em que as leveduras sob as condições salinas elevadas diminuíram a difusão de glicerol para o meio extracelular com o intuito de contrabalancear a pressão osmótica e conseguir sobreviver nesse ambiente.

7.2.5. Teor alcoólico, rendimento e produtividade da fermentação alcoólica

Na tabela 16 é possível observar os resultados obtidos para o teor alcoólico do vinho delevedurado em ambos tratamentos no decorrer dos ciclos fermentativos (T1 – diluição do xarope com água destilada; T2 - diluição do xarope com água recuperada da vinhaça biodigerida). E partir desses resultados calculou-se rendimento da fermentação alcoólica.

Tabela 16. Teor alcoólico teórico e do vinho delevedurado.

Ciclo	Tratamento			
	T1	T2	T1	T2
	Teor alcoólico teórico (ml L ⁻¹)		Teor alcoólico obtido (ml L ⁻¹)	
1	109,48 (±2,71)	119,75 (±8,51)	93,05 (±12,20)	110,96 (±2,60)
2	110,69 (±2,86)	115,21 (±2,48)	78,16 (±9,21)	79,60 (±3,17)
3	101,16 (±10,94)	111,36 (±4,77)	84,53 (±2,02)	79,06 (±7,60)
4	102,30 (±2,91)	112,77 (±3,17)	82,52 (±1,31)	80,70 (±9,40)

Na tabela 17 verifica-se os resultados obtidos para o rendimento fermentativo em ambos tratamentos no decorrer dos ciclos fermentativos (T1 – diluição do xarope com água destilada; T2 - diluição do xarope com água recuperada da vinhaça biodigerida).

Tabela 17. Rendimento da fermentação alcoólica.

Tratamento	Ciclo fermentativo			
	1	2	3	4
	Rendimento Fermentativo (%)			
T1	84,99 ($\pm 6,68$) aB	70,61 ($\pm 11,03$) bA	83,56 ($\pm 7,12$) aA	80,65 ($\pm 4,92$) aA
T2	92,65 ($\pm 12,64$) aA	69,09 ($\pm 9,80$) bA	70,99 ($\pm 12,80$) bB	71,56 ($\pm 10,00$) bB

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento em dois blocos.

A partir desses resultados observa-se que no T1 apenas o rendimento no ciclo 2 difere estatisticamente dos demais, sendo o maior rendimento fermentativo no ciclo 1. No T2 o rendimento observado no ciclo 1 difere estatisticamente dos demais ciclos, os quais não diferem entre si, ademais no ciclo 1 verifica-se o maior rendimento, o qual no ciclo 2 caiu 34%. Comparando os dois tratamentos apenas no ciclo 2 que não há diferença significativa entre eles, nos demais ciclos (1, 3 e 4) verifica-se diferença significativa entre o T1 e o T2, o qual o rendimento do T1, exceto no ciclo 1, foi maior do que no T2. Na Figura 15 observa-se os rendimentos ao decorrer dos ciclos.

Figura 15. Rendimento fermentativo ao decorrer dos ciclos.

FERRARI (2013) em seu estudo avaliando a cinética do processo fermentativo observou rendimentos fermentativo variando de 73,2 a 87%, valores estes condizentes com o verificado no T1 e no ciclo 1 do T2. BORGES (2008) avaliando o processo de fermentação em batelada alimentada também verificou rendimentos dentro dessa faixa, entre 81 e 84,3%.

BLOMBERG (1995) ao avaliar em seu estudo os efeitos do estresse salino em *Saccharomyces cerevisiae* observou uma ampla variedade de mudanças nas atividades celulares e na expressão de proteínas, e constatou comprometimento na produção de etanol e consequentemente no rendimento fermentativo.

Dessa forma, pressupõe-se que para o Tratamento 2 no ciclo 1, os elevados teores de sais não comprometeram o processo fermentativo, dado que o rendimento não difere estatisticamente daqueles encontrados em T1. No entanto no decorrer dos recidos, valores de rendimento foram menores do que em T1 estão relacionados com o estresse salino, ao qual as leveduras estavam expostas.

Na tabela 18 verifica-se os resultados obtidos para a produtividade da fermentação e os tempos de fermentação em ambos tratamentos no decorrer dos ciclos fermentativos (T1 – diluição do xarope com água destilada; T2 - diluição do xarope com água recuperada da vinhaça biodigerida).

Tabela 18. Produtividade de etanol e tempo de fermentação.

Tratamento	Ciclo fermentativo			
	1	2	3	4
	Produtividade (ml L⁻¹ h⁻¹)			
T1	11,38 (±0,86) aA	8,83 (±1,30) cA	10,00 (±0,66) bA	10,25 (±0,56) bA
T2	11,33 (±1,96) aA	7,25 (±1,11) bB	7,04 (±1,16) bB	7,78 (±1,52) bB
	Tempo de Fermentação (h)			
T1	7,62	8,27	7,92	7,52
T2	9,22	10,25	10,15	10,1

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem entre si no teste de Tukey a 5% de significância.

Entre parênteses encontram-se os desvios padrão de cada tratamento em dois blocos.

Observa-se que no Tratamento 1 a maior produtividade (11,380 mL.L.h⁻¹) foi no ciclo 1, a qual difere estatisticamente das produtividades dos demais ciclos. No ciclo 2, verifica-se a menor produtividade (8,33 mL.L.h⁻¹) e essa difere significativamente dos demais ciclos, por fim, os ciclos 3 e 4 não diferem estatisticamente entre si. No tratamento 2, a maior produtividade (11,33 mL.L.h⁻¹) foi no ciclo 1 e esta produtividade é maior que a encontrada nos demais ciclos fermentativos. Por outro lado, verifica-se redução de 4,08 mL.L.h⁻¹ do ciclo 1 para o ciclo 2. Os resultados de produtividade dos ciclos 2, 3 e 4 não diferiram estatisticamente entre si. Comparando as produtividades dos dois Tratamentos, apenas no ciclo 1 que T1 e T2 não diferiram significativamente, nos demais ciclos observa-se diferença estatística entre eles. Em geral, a produtividade média no Tratamento 1 foi maior do que a do T2, como pode-se observar na Figura 16.

Figura 16. Produtividade da fermentação no decorrer dos ciclos.

Os resultados de produtividade do presente estudo no T1 estão condizentes com os valores observados na literatura, em que FERRARI (2013), que em seu estudo verificou valores de produtividade fermentativa entre 8,36 e 9,75 ml L⁻¹ h⁻¹, assim como TOSETTO (2002) avaliando o comportamento cinético das leveduras observou produtividade de 8,67 a 12,52 ml L⁻¹ h⁻¹.

Por outro lado, verifica-se que no T2 a fermentação levou cerca de 2 horas a mais, em todos os ciclos, para acabar do que o T1 e isso refletiu diretamente em sua menor produtividade. Esse maior tempo para consumir os açúcares disponíveis e finalizar o processo de fermentação refletiu em uma produtividade menor. Isso pode ser atribuído ao estresse osmótico causado pelo elevado teor de sais. Ademais, levando em consideração que a concentração de leveduras no T2 ao decorrer dos ciclos fermentativos foi diminuindo pressupõe-se que isso contribuiu para o maior tempo de fermentação, dado que uma menor quantidade de leveduras estava disponível no meio para realizar a fermentação alcoólica.

8. CONCLUSÃO

O tratamento da vinhaça biodigerida para a recuperação da água nela contida é possível, com o uso de processos físico-químicos (coagulação centrifugação) e sucessivas filtrações (filtros de polipropileno, carvão ativado e microfiltração). O desempenho desses processos para a remoção da turbidez, sólidos totais e sólidos totais voláteis é bastante eficiente. Em contrapartida, para a remoção dos sais se mostra pouco eficaz.

A água proveniente da vinhaça biodigerida após convenientemente tratada pode ser utilizada na diluição do mosto a ser utilizado para a fermentação alcoólica. Contudo, há altas concentrações de sais presentes nessa água recuperada, qual acompanha o mosto e faz parte da fermentação alcoólica. Então, após vários ciclos fermentativos sucessivos pode ser observado estresse osmótico às leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e esse estresse tem por consequência efeitos negativos sobre a fermentação alcoólica e isso afeta negativamente o rendimento e a produtividade da fermentação.

Há necessidade de estudos futuros com o uso de tratamentos intermediários após a filtração com polipropileno e o uso de sistema de ultra filtração, seguido de osmose reversa para melhorar a eficácia do tratamento e recuperação da água presente na vinhaça biodigerida. Com isso, conduzir menores concentrações ao mosto e assim, reduzir os efeitos dos estresses osmóticos sobre as leveduras.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (ANA). Federação das Indústrias do Estado de São Paulo. União da Indústria da Cana-de-açúcar. Centro de Tecnologia Canavieira. **Manual de conservação e reuso de água na agroindústria sucroenergética**. Brasília, DF, 2009.
- ALBERTYN, J.; HOHMANN, S.; THEVELEIN, J. M.; PRIOR, B. GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. **Molecular and cellular biology**, v. 14, n. 6, p. 4135–44, 1994.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). 2012. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22^a ed., Washington: American Public Health Association, 2012.
- AMORIM, H. V. *et al.* Processos de fermentação alcoólica, seu controle e monitoramento. **Fermentec, Centro de Biotecnologia Agrícola, ESALQ/USP**, 1989.
- AMORIM, H. V. **Fermentação Alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 448 p. 2005.
- BAEZ-SMITH, C.; CONSULTING, S. B. Anaerobic Digestion of Vinasse for the Production Of Methane in the Sugar Cane Distillery. **Sugar Processing Research Institute - Conference on Sugar Processing**, p. 268–287, 2006.
- BERNARDO, L. D.; DANTAS, A. D. B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. 2 ed. São Carlos: RiMa, 2005.
- BERTHEL, N. J.; OTERO, R. R. C.; BAUER, F. F.; THEVELEIN, J. M.; PRETORIUS, I. S. Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **FEMS Yeast Research**, v. 4, n. 7, p. 683–689, 2004.
- BITAW, T. N.; PARK, K.; YANG, D. R. Optimization on a new hybrid Forward osmosis-Electrodialysis-Reverse osmosis seawater desalination process. **Desalination**, v. 398, p. 265–281, 2016.
- BLOMBERG, A. Global changes in protein synthesis during adaptation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to 0.7 M NaCl. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 12, p. 3563–3572, 1995.
- BNDES/CGEE. **Bioetanol de Cana-De-Açúcar: Energia para o Desenvolvimento Sustentável**. BNDES, 71 p. 2008.
- BOCHENEK, R.; SITARZ, R.; ANTOS, D. Design of continuous ion exchange process for the wastewater treatment. **Chemical Engineering Science**, v. 66, n. 23, p. 6209–6219, 2011.
- BORGES, P. C. S. **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada**. (2008). Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2008.
- BRANDBERG, T.; GUSTAFSSON, L.; FRANZÉN, C. J. The impact of severe nitrogen limitation and microaerobic conditions on extended continuous cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* with cell recirculation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 585–593, 2007.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria MAPA Nº 75 DE 05/03/2015**. Disponível em: < <https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=281775> >. Acesso em: 20 nov. 2017.
- CALEGARI, R. P. Produção de biogás a partir de vinhaça concentrada. 75 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2017.
- CAMPOS, C. R.; MESQUITA, V. A.; SILVA, C. F.; SCHWAN, R. F. Efficiency of Physicochemical and biological treatments of vinasse and their influence on indigenous microbiota for disposal into the environment. **Waste Management**, v. 34, n. 11, p. 2036–2046, 2014.
- CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 124 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2003.
- CHIN, P. M.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactic acid bacteria on wheat mash fermentations prepared with laboratory backset. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 4, p. 311–317, 1994.
- CHIN, P. M.; INGLEDEW, W. M. Effect of Recycled Laboratory Backset on Fermentation of Wheat Mash. 1993. **Journal Agriculture Food and Chemistry**, v. 41, n. 7, p. 1158-1163, 1993.
- CHRISTOFOLETTI, C. A.; ESCHER, J. P.; CORREIA, J. E.; MARINHO, J. F. U.; FONTANETTI, C. S. Sugarcane vinasse: Environmental implications of its use. **Waste Management**, v. 33, n. 12, p. 2752–2761, 2013.
- CORTEZ, L. A. B.; ROSSEL, C. E. V.; JORDAN, R. A.; LEAL, M. R. L. V.; LORA, E. E. S. R&d needs in the industrial production of vinasse. **Sugarcane bioethanol - R & D for productivity and sustainability**, p. 619–636, 2014.
- CREMONEZ, P. A.; FEIDEN, A.; ZENATTI, D. C.; CAMARGO, M. P.; NADALETI, W. C.; ROSSI, E.; ANTONIELLI, J. Biodigestão anaeróbia no tratamento de resíduos lignocelulósicos. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 2, p. 21–35, 2013.
- D'AMORE, T.; PANCHAL, C. J.; RUSSEIL, I.; STEWART, G. G. Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 2, p. 365–372, 1988.
- DIAS, M. O. S.; FILHO, R. M.; MANTELATTO, P. E.; CAVALETT, O.; ROSSEL, C. E. V.; BONOMIC, A.; LEAL, M. R. L. V. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, 2015.
- DÍAZ-REINOSO, B. ; MOURE, A.; GONZÁLEZ, J.; DOMINGUEZ, H. A membrane process for the recovery of a concentrated phenolic product from white vinasses. **Chemical Engineering Journal**, v. 327, p. 210–217, 2017.
- EITH, C.; KOLB, M.; RUMI, A.; SEUBERT, A.; VIEHWEGER, K. H. Práticas em cromatografia de íons: uma introdução. 142 p. Metrohm, 2006.
- ERSAHIN, M. E.; OZGUN, H.; DERELI, R. K. OZTUR, I. Anaerobic Treatment of Industrial Effluents : An Overview of Applications. **Waste Water - Treatment and Reutilization**, p. 3–28, 2011.

- FERRARI, F. C. S. **Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol em escala industrial**. 57 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.
- FRANK, J.; RUHL, A. S.; JEKEL, M. Impacts of backwashing on granular activated carbon filters for advanced wastewater treatment. **Water Research**, v. 87, p. 166–174, 2015.
- Fundação Nacional de Saúde. Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS/Ministério da Saúde, **Fundação Nacional de Saúde**. – Brasília: Funasa, 112 p., 2014.
- GALAFASSI, S.; TOSCANO, M. VIGENTINI, I. PISKUR, J.; COMPAGNO, C. Osmotic stress response in the wine yeast *Dekkera bruxellensis*. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 316–319, 2013.
- GENERAL ELECTRIC COMPANY. **Handbook of industrial water treatment**. 1997-2012. Disponível em: <<http://www.gewater.com/handbook/index.jsp>>. Acesso em: 04 mar. 2017.
- GUERREIRO, L. F. RODRIGUES, C. D.; DUDA, R. M.; OLIVEIRA, R. A.; BOAVENTURA, R. A. R.; MADEIRA, L. M. Treatment of sugarcane vinasse by combination of coagulation/ flocculation and Fenton 's oxidation.. **Journal of Environmental Management**, v. 181, p. 237–248. 2016.
- GUTIERREZ, L. E. Produção de glicerol por linhagens de *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 48, n. 1965, p. 55–69, 1991.
- HAYASHI, K.; YANO, S.; ABE, H.; FUJITA, Y.; KISHIDA, M. Improvement of the growth defect in salt- and ethanol-tolerant yeast mutagenized with error-prone DNA polymerization by using backcross cell fusion. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2012. v. 114, n. 4, p. 476–478.
- ILOMUANYA, M. O.; NASHIRU, B.; IFUDU, N. D.; IGWILO, C. I. Effect of pore size and morphology of activated charcoal prepared from midribs of *Elaeis guineensis* on adsorption of poisons using metronidazole and *Escherichia coli* O157: H7 as a case study. **Journal of Microscopy and Ultrastructure**, v. 5, n. 1, p. 32–38, 2017.
- INGARAMO, A.; HELUANE, H.; COLOMBO, M. CESA, M. Water and wastewater eco-efficiency indicators for the sugar cane industry. **Journal of Cleaner Production**, v. 17, n. 4, p. 487–495, 2009.
- JONES, R. P.; GADD, G. M. Ionic nutrition of yeast--physiological mechanisms involved and implications for biotechnology. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 12, p. 402–418, 1990.
- JUNIOR, A. O.; PAWLOWSKY, U. Avaliação de tecnologias avançadas para o reúso de água em indústria metal-mecânica. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 305-316, 2007.
- JUNIOR, R. M.; MARTINS, M. V. L. Dimensionamento de Filtro de Areia para Tratamento de Água Cinza do Bloco Novo do IRN. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 5, n. 3, p. 356–363, 2016.
- KADOOKA, H.; SAEDI, M.; TANAKA, T.; IWATA, M. Mechanism of clarification of colloidal suspension using composite dry powdered flocculant. **Journal of Water Process Engineering**, v. 11, p. 32–38, 2016.
- KATSOYIANNIS, I. A.; GKOTSIS, P.; CASTELLANA, M.; CARTECHINI, F.; ZOUBOULIS, A. I. Production of demineralized water for use in thermal power stations by advanced treatment of secondary wastewater effluent. **Journal of Environmental Management**, v. 190, p. 132–139, 2017.

- KOSHIMIZU, L. H. *et al.* Avaliação da Concentração de Leveduras Suspensas em um Meio Aquoso pela Medida do Volume Ocupado pelas Células. **Saccharum**. São Paulo: 1982. v. 4 (18). p.14 – 16.
- LIU, L.; XU, Z.; SONG, C.; GU, Q.; SANG, Y.; LU, G. Adsorption-filtration characteristics of melt-blown polypropylene fiber in purification of reclaimed water. v. 201, p. 198–206, 2006.
- LOPES, M. L.; PAULILLO, S. C. L.; GODOY, A.; CHERUBIN, R. A.; LORENZI, M. S.; GIOMETTI, F. H. C.; BERNARDINO, C. D.; NETO, H. B. A.; AMORIM, H. V. Ethanol production in Brazil: a bridge between science and industry. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 47S, p. 64–76, 2016.
- MCCARTHY, O. J.; NORTH, P.; ZEALAND, N. Centrifuges and Separators: Applications in the Dairy Industry. p. 175–183. 2011.
- MELO, H. F. **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial**. (2006). 110 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE, 2006.
- MIERZWA, J. C. **O uso racial e o reuso como ferramentas para o gerenciamento de águas e efluentes na indústria estudo de caso da Kodak Brasileira**. (2002). 367 f. Tese (Engenharia). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo- SP, 2002.
- MOSSE, K. P. M.; PATTI, A. F.; CHRISTEN, E. W.; CAVAGNARO, T. R. Review: Winery wastewater quality and treatment options in Australia. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, v. 17, n. 2, p. 111–122, 2011.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. W. H. Freeman and Company, New York, 6 ed. 2014.
- NITAYAVARDHANA, S.; KHANAL, S. K. Innovative biorefinery concept for sugar-based ethanol industries: Production of protein-rich fungal biomass on vinasse as an aquaculture feed ingredient. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 23, p. 9078–9085, 2010.
- NOBRE, T. P. **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.
- NOVELLO, A. P. **Seleção de leveduras para fermentação com alta pressão osmótica usando processo de fermentação extrativa**. (2015). 116 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2015.
- NOVELLO, A. P. **Seleção de leveduras para fermentação com alta pressão osmótica usando processo de fermentação extrativa**. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.
- NUNES, J. A. **Tratamento físico-químico de águas residuárias industriais**. 3 ed. Aracaju: Gráfica e Editora Triunfo Ltda. 2001.
- OLIVEIRA, A.J.; GALLO, C.R.; ALCARDE, V.E.; GODOY, A.; AMORIM, H.V. **Métodos para o controle microbiológico na produção de álcool e açúcar**. Piracicaba: FERMENTEC; FEALQ; ESALQ-USP, 1996. 89p

- OLIVEIRA, R. P. S. **Molecular and physiological approaches towards the characterisation of glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae***. (2003). Dissertação (Mestrado) - Universidade do Minho. Braga, 2003.
- ORTEGÓN, G. P.; ARBOLEDA, F. M.; CANDELA, L.; TAMOH, K.; VALDES-ABELLAN, J. Vinasse application to sugar cane fields. Effect on the unsaturated zone and groundwater at Valle del Cauca (Colombia). **Science of the Total Environment**, v. 539, p. 410–419, 2016.
- OTAKI, Y.; UEDA, K.; SAKURA, O. Effects of feedback about community water consumption on residential water conservation. **Journal of Cleaner Production**, v. 143, p. 719–730, 2017.
- PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2321–2334, 2007.
- PANT, D.; ADHOLEYA, A. Biological approaches for treatment of distillery wastewater: A review. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2321–2334, 2007.
- PIERCE, J. S. Institute of brewing: analysis committee measurement of yeast viability. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 76, p. 442–443, 1970.
- POVEDA, M. M. R. **Análise econômica e ambiental do processamento da vinhaça com aproveitamento energético**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, São Paulo/SP, 2014.
- PRADA, S. M.; GUEKEZIAN, M.; SUÁREZ-IHA, M. E. V. Metodologia analítica para a determinação de sulfato em vinhoto. **Química Nova**, v. 21, n. 3, p. 249–252, 1998.
- RIBEIRO, C. A. F.; BLUMER, S.A. G.; HORII, J. **Apostila Fundamentos de Tecnologia Sucroalcooleira**. 1999. Disponível em: <https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4053798/mod_resource/content/1/>
- RODRIGUES, A. M.; SANT'ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 1, p. 57–62, 2001.
- RODRIGUES, C. S. D. ; NETO, A. R.; DUDA, R. M.; OLIVEIRA, R. A.; BOAVENTURA, R. A. R.; MADEIRA, L. M. Combination of chemical coagulation, photo-Fenton oxidation and biodegradation for the treatment of vinasse from sugar cane ethanol distillery. **Journal of Cleaner Production**, v. 142, p. 3634–3644, 2017.
- SAGNE, C.; FARGUES, C.; LEWANDOWSKI, R.; LAMELOISE, M. L.; DECLOUX, M. Screening of reverse osmosis membranes for the treatment and reuse of distillery condensates into alcoholic fermentation. **Desalination**, v. 219, n. 1–3, p. 335–347, 2008.
- SALVATO, F. **Fermentação de mosto industrial por linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* com transportador de sacarose e sobreexpressão de invertase interna: estudo comparativo com linhagens com alta e baixa atividade de invertase externa**. (2010). Dissertação (Mestrado)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2010.
- SANT'ANA, G. S. **Resposta ao estresse ácido em *Saccharomyces cerevisiae* e efeito protetor do íon sódio na morte celular induzida por ácido**. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto/MG, 2009.

- SAS INSTITUTE, INC. Users Guide: Statistics, Version 5 Edition. SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA, 1985.
- SILVA, J. A.; SILVA, F. L. H.; ALVES, R. R. N.; SANTANA, D. P. Influência das variáveis nitrogênio, fósforo e °Brix na produção dos metabólitos secundários contaminantes totais da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 695–698, 2006.
- SILVA, M. A. S.; GRIEBELER, N. P.; BORGES, L. C. Uso de vinhaça e impactos nas propriedades do solo e lençol freático. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 1, p. 108–114, 2007.
- SILVEREIO, M. S.; CALEGARI, R. P.; LEITE, G. M. F. L.; AGUIAR, C. L.; BAPTISTA, A. S.; GOMIG, A.; NETO, J. P.; CUSATIS, M. Transformando resíduos de novos processos em novas oportunidades: geração de energia a partir de vinhaça de etanol 2ª geração com foco na sustentabilidade. **In: IX Congresso de Inovação Tecnológica em Energia Elétrica (CITENEL)**, 2017.
- SINDICATO DA INDÚSTRIA DE FABRICAÇÃO DO ÁLCOOL NO ESTADO DE MINAS GERAIS (SIAMIG). **Perfil da Produção**. p. 1-12, 2017. Disponível em: <<http://www.siamig.com.br/indicadores/perfil-da-producao>> Acesso em: 20 nov. 2017.
- SOARES, M. G. **Efeito da suplementação de cobalto na biodigestão anaeróbia de vinhaça de cana-de-açúcar em reator termofílico de leito estruturado**. (2015). Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas/MG, 2015.
- STEINLE, L. A. **Fatores que interferem na fermentação alcoólica**. (2013). Monografia - Universidade Federal de São Carlos, Sertãozinho/SP, 2013.
- SYDNEY, E. B. LARROCHE, C.; NOVAK, A. C.; NOUAILLE, R.; SARMA, S. J.; BRAR, S. K.; LETTI, L. A. J.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. **Bioresource Technology**, v. 159, n. February, p. 380–386, 2014.
- SZYMANSKI, M. S. E.; BALBINOT, R.; SCHIRMER, W. N. Biodigestão anaeróbia da vinhaça: aproveitamento energético do biogás e obtenção de créditos de carbono – estudo de caso. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 4, p. 901–912, 2010.
- TAVARES, G. A.; BENDASSOLLI, J. A.; SOUZA, G.; NOLASCO, F. R. Implantação de uma estação de produção de água desionizada para uso nos laboratórios do CENA/USP empregando resinas de troca iônica. **Revista Analytica**, v. 10, p. 36-42, 2004.
- TONETTI, A. L.; FILHO, C. B.; NICOLAU, C. E.; BARBOSA, M.; TONON, D. Tratamento de esgoto e produção de água de reúso com o emprego de filtros de areia. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 17, n. 3, p. 287–294, 2012.
- TONOLLI, F. C. Adaptação de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico. (2017). 77 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2017.

- TORRES, N. H.; SARTORI, S. B.; HELOISA, J.; AMÉRICO, P.; ROMANHOLO, F.; Indústria Sucroalcooleira: Gestão de Subprodutos. **Revista de Ciências Agro-Ambientais**, v. 10, n. 2, p. 225–236, 2012.
- TOSETTO, G. M. **Influência da matéria-prima no comportamento cinético de levedura na produção de etanol**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- ÚNIAO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Moagem de cana-de-açúcar e produção de açúcar e etanol – safra 2016/2017**. 2017. Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br>>. Acesso em: 20 nov. 2017.
- ÚNIAO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Sugarcane one plant, many solutions sugar, ethanol, bioelectricity & beyond**. 2015. Disponível em: <http://www.unica.com.br/documentos/publicacoes>>. Acesso em: 20 nov. 2017.
- VERMA, P.; SHARMA, M. P.; DWIVEDI, G. Impact of alcohol on biodiesel production and properties. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 56, p. 319–333, 2016.
- VOLF, L. **Decanting Centrifuge Production Process Optimization using Plant Simulation**. *Procedia Engineering*, v. 69, p. 720–724, 2014.
- WALKER, G. **Yeast physiology and biotechnology**. New York: John Wiley & Sons Ltd, 350p, 1998.
- ZARPELON, W.; AZZOLINI, J. C. Caldeiras de alta pressão: caracterização e avaliação da qualidade do tratamento das águas. **Unoesc & Ciência ACET**, v. 6, n. 2, p. 141–154, 2015.
- ZAGO, E.A.; SILVA, L.F.L.F.; BERNADINO, C.D.; AMORIM, H.V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar**. 2ed. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ/USP, 1996. 194p
- ZAYAS, T. ROMERO, V.; SALGADO, L.; MERAZ, M.; MORALES, U. Applicability of coagulation/flocculation and electrochemical processes to the purification of biologically treated vinasse effluent. **Separation and Purification Technology**, v. 57, n. 2, p. 270–276, 2007.