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

Controle de qualidade em fermentações para produção de etanol utilizando
cromatografia de íons

Laysa Maciel Lewandowski Meira Prado

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

Piracicaba
2017

Laysa Maciel Lewandowski Meira Prado
Bacharela em Ciências dos Alimentos

Controle de qualidade em fermentações para produção de etanol utilizando cromatografia de íons

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

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

Piracicaba
2017

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

Prado, Laysa Maciel Lewandowski Meira

Controle de qualidade em fermentações para produção de etanol
utilizando a cromatografia de íons / Laysa Maciel Lewandowski Meira
Prado. - - Piracicaba, 2017.

80 p.

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

1. Fermentação 2. Cromatografia 3. Etanol 4. Validação I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de conquistar tantas coisas boas e por tantas bênçãos em minha vida quando eu mais precisei.

Aos meus pais, Edilson e Tamara que estiveram sempre ao meu lado, me apoiando, sempre cheios de paciência, compreensão, amor e carinho, nunca deixando de acreditar em mim. Também agradeço pela ajuda indescritível em todos os momentos difíceis dessa caminhada. São sem dúvidas indispensáveis em minha vida.

Vocês são meu orgulho e força, amo muito vocês!

A todos meus familiares, que sempre torceram por esta conquista e estiveram dispostos a me ajudar em qualquer momento, em especial meus padrinhos Milton e Aurora, meus tios Fernando e Adriana e minhas avós Ude e Iza (em memória).

Ao orientador Prof. Dr. Antonio Sampaio Baptista, pela orientação, paciência e compreensão, que tão carinhosamente acreditou na realização deste estudo.

A família República Gaia PQP, que me acolheu e proporcionou não só um lugar para morar, mas também me ensinou sobre amizade, convivência, diferenças e amor fraterno, me ajudando a enfrentar os obstáculos pelo caminho, sempre me mostrando o valor da amizade. Vocês são muito importantes!

Ao Giovanni, por estar ao meu lado durante todo meu mestrado, sempre acreditando em meu potencial, me dando amor e carinho, com muita paciência e mimos. Obrigada por me fazer feliz mesmo quando eu estava baixo astral. Te amo.

Ao pessoal do laboratório, em especial à Gabriela, Rubens, Manuella, Bianca, Eric e Pietro, que estiveram comigo, me ajudando, me aturando quando os surtos chegavam e me fazendo rir diariamente. Muito obrigada por tudo, mas principalmente pela bela amizade ali formada.

A equipe técnica do laboratório: Silvino, Rose e Pedrinho, que com muita paciência me ensinaram o que era preciso.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, pela acolhida e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola pela oportunidade de aprendizado.

À agência de fomento CAPES, pelo suporte financeiro.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho fosse concluído.

EPÍGRAFE

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	11
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	15
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1. A MATÉRIA-PRIMA	17
3.2. UTILIZAÇÃO DA CANA-DE-AÇÚCAR	17
3.3. CONTROLE DE QUALIDADE NA PRODUÇÃO DE ETANOL	20
3.4. CROMATOGRAFIA	22
3.5. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	24
3.6. CROMATOGRAFIA DE ÍONS	25
3.7. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS	27
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. EXECUÇÃO DA PESQUISA E OBTENÇÃO DA AMOSTRA	31
4.2. ENSAIO DE FERMENTAÇÃO.....	31
4.3. ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR, BROTAMENTO, BROTOS VIVOS DAS LEVEDURAS E CONTAMINAÇÃO TOTAL E BACTERIANA.	33
4.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE BRIX DO CALDO (B)	34
4.5. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES REDUTORES E AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS PELO MÉTODO DO ÁCIDO DINITROSSALICÍLICO (DNS).....	34
4.6. DETERMINAÇÃO DE TEOR ALCOÓLICO EM VINHOS DE DESTILARIAS PELO DENSÍMETRO DIGITAL EDM 4000 SCHMIDT HAENSCH.	36
4.7. ANÁLISE DE ACIDEZ TOTAL.....	37
4.8. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES E GLICEROL POR IC.....	37
4.9. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR IC.....	41
4.10. DETERMINAÇÃO DE ÍONS POR IC	42
4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	44
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45

5.1. VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA CROMATOGRÁFICA PARA DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS.	45
5.2. ENSAIO DE FERMENTAÇÃO	49
5.3. DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES POR CROMATOGRAFIA DE ÍONS (IC) X MÉTODO DE DNS 50	
5.4. DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS POR CROMATOGRAFIA IÔNICA (IC) E PELA METODOLOGIA CONVENCIONAL (TITULAÇÃO).....	61
5.5. DETERMINAÇÃO DOS TEORES DE CÁTIOS E ÂNIOS POR CROMATOGRAFIA IÔNICA.....	64
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
REFERÊNCIAS	73

RESUMO

Controle de qualidade em fermentações para produção de etanol utilizando a cromatografia de íons

Considerando o crescimento do setor sucroenergético na última década e a busca por combustíveis renováveis, a fim de reduzir a dependência aos combustíveis fósseis, pesquisas nas áreas de açúcar e álcool estão comumente ligadas ao desenvolvimento de tecnologias que visem obtenção de processos e produtos com qualidade, lucro, altos rendimentos, minimização de perdas e gastos. O desenvolvimento de equipamentos e procedimentos analíticos que busquem vantagens competitivas em relação às metodologias convencionais está cada dia mais evidente e no processo de produção de açúcar e álcool, faz-se cada vez mais usuais. Uma dessas técnicas analíticas é a cromatografia. Por isso, a necessidade de trabalhos que avaliem técnicas cromatográficas aumenta diariamente, visto a importância que essas têm dentro do processo produtivo, no controle de qualidade e para a tomada de decisões. Por esses motivos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o uso da técnica de cromatografia de íons para o controle analítico e de qualidade em fermentações para a produção de etanol. Para a realização deste estudo, inicialmente foi realizada validação da metodologia para análise de açúcares e depois foram realizados ensaios de fermentação. Os ensaios consistiram em fermentações com três tipos de mostos diferentes (três tratamentos), sendo os mostos obtidos a partir de caldo ou de xarope ou misto (caldo + xarope), com teores de ART (açúcares redutores totais, respectivamente de 146,26 ($\pm 1,53$) g L⁻¹, 148,61 ($\pm 3,62$) g L⁻¹ e 158,35 ($\pm 4,67$) g L⁻¹, resultados estes obtidos pela cromatografia iônica e 107,75 ($\pm 3,19$) g L⁻¹, 115,90 ($\pm 10,41$) g L⁻¹ e 134,53 ($\pm 8,33$) g L⁻¹ para os mostos a base de caldo, xarope e misto, quando analisados pela metodologia convencional. Cada tratamento foi feito em cinco repetições, utilizando 300 mL de mosto cada, onde foram inoculados 9g de levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Os parâmetros analisados foram: viabilidade celular, brotamento, brotos vivos das leveduras, teores de Brix, teores de AR e ART por cromatografia iônica e por DNS, eficiência e rendimento fermentativo. Os resultados obtidos para AR final no caldo, xarope e misto na análise cromatográfica foram de 0,197 ($\pm 0,04$) g L⁻¹, 0,283 ($\pm 0,12$) g L⁻¹ e 0,259 ($\pm 0,08$) g L⁻¹, respectivamente. Por outro lado, nas análises por DNS foram obtidos valores de: 0,352 ($\pm 0,14$) g L⁻¹, 0,811 ($\pm 0,03$) g L⁻¹ e 0,572 ($\pm 0,03$) g L⁻¹, respectivamente. Os valores de ART no vinho encontrados no caldo, xarope e misto por cromatografia foram 0,231 ($\pm 0,05$) g L⁻¹, 0,358 ($\pm 0,09$) g L⁻¹ e 0,335 ($\pm 0,19$) g L⁻¹ enquanto por DNS os teores foram 0,389 ($\pm 0,04$) g L⁻¹, 1,521 ($\pm 0,20$) g L⁻¹ e 0,906 ($\pm 0,21$) g L⁻¹. Estes valores geraram rendimentos fermentativos médios nos mostos fermentados obtidos a partir de caldo de cana, xarope e xarope + caldo de cana, foram 89,77 %, 83,59% e 76,65 %, respectivamente. Nos mostos fermentados obtidos a partir de caldo de cana, xarope e xarope + caldo de cana, os rendimento fermentativos foram 121,88 %, 106,82 e 90,23% para as análises cromatográficas e DNS, respectivamente. Conclui-se que, a técnica de cromatografia de íons quando utilizada para o controle analítico da fermentação alcoólica permite ter como vantagens em relação às técnicas convencionais analisadas, precisão, exatidão e robustez do método, rapidez de análise e facilidade no preparo das amostras, além de versatilidade, sendo capaz de analisar outros compostos de uma mesma amostra analítica, tais como ácidos, cátions e

ânions, sendo capaz de fornecer resultados confiáveis para o controle analítico e de qualidade e monitoramento em fermentações para a produção de etanol.

Palavras-chave: Fermentação; Cromatografia; Etanol; Validação

ABSTRACT

Quality control in fermentation for ethanol production using ion cromatography

Considering the growth of the sugar-energy sector in the last decade and the search for renewable fuels, in order to reduce dependence on fossil fuels, research in the areas of sugar and alcohol are commonly linked to the development of technologies that aim at obtaining processes and products with quality, high profit, and loss and expense minimization. The development of equipment and analytical procedures that seek competitive advantages over conventional methodologies is increasing, and arriving at the plants and distilleries for the production of sugar and alcohol, becoming more and more usual. Such is the case of chromatography. The necessity for research evaluating chromatographic techniques increases daily, considering the importance they have within the production process and in quality control. Thus, this work aims to evaluate the use of chromatographic techniques for analytical and quality controls in fermentations for ethanol production, through sugar analysis by traditional methods and ion chromatography. For the accomplishment of this study, initially the sugar analysis methodology was validated, and then fermentation tests were carried out. Such tests consisted of three treatments, each one of them composed of broth, syrup and mixed content (broth + syrup), with the respective Total Reducing Sugars (ART) of 146,26($\pm 1,53$) g L⁻¹, 148,61 ($\pm 3,62$) g L⁻¹ and 158,35 ($\pm 4,67$) g L⁻¹, were obtained by ionic chromatography, and, respectively, of 107,75 ($\pm 3,19$) g L⁻¹, 115,90 ($\pm 10,41$) g L⁻¹ and 134,53 ($\pm 8,33$) g L⁻¹ through the conventional methodology. Each treatment had five repetitions, with 300ml of wort each, where 9g of *Saccharomyces cerevisiae* yeast were inoculated. The parameters evaluated were: cell viability, budding, living buds of yeast, °Brix levels, AR and ART levels through ionic chromatography and traditional method, efficiency and fermentative yield. The AR obtained results were 0,197 ($\pm 0,04$) g L⁻¹, 0,283 ($\pm 0,12$) g L⁻¹ and 0,259 ($\pm 0,08$) g L⁻¹ respectively for broth, syrup and mixture in the ionic chromatographic analysis, and 0,352 ($\pm 0,14$) g L⁻¹, 0,811 ($\pm 0,03$) g L⁻¹ and 0,572 ($\pm 0,03$) g L⁻¹ in the traditional analysis method. The ART obtained results were 0,231 ($\pm 0,05$) g L⁻¹, 0,358 ($\pm 0,09$) g L⁻¹ and 0,335 ($\pm 0,19$) g L⁻¹ through the chromatographic method and 0,389 ($\pm 0,04$) g L⁻¹, 1,521 ($\pm 0,20$) g L⁻¹ e 0,906 ($\pm 0,21$) g L⁻¹ through the traditional method. These values generated mean fermentative yields of respectively 89,77%, 83,59% and 76,65% for broth, syrup and mixed samples, in the chromatographic analysis and 121,88%, 106,82% and 90,23%, in the conventional analysis. The fermentative efficiency was satisfactory for the chromatographical methodology, with means of 83,25%, versus 106,31% of the conventional methodology. It was concluded that the ionic chromatography technique, when used for the analytical control of alcoholic fermentation, has advantages when compared to the analyzed conventional technique, such as precision, accuracy and methodological robustness, faster analysis, shorter sample preparation time, and versatility, being capable of analyzing different substances in the same source, such as acids, cations and anions, being capable of supplying trustworthy results for analytical and quality control and the surveillance of fermentations for ethanol production.

Keywords: Fermentation; Cromatography; Ethanol; Validation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma do processo industrial para produção de açúcar e etanol de cana-de-açúcar.....	19
Figura 2. Tipos de cromatografia e suas divisões	23
Figura 3. Cromatógrafo de íons – Compact IC Flex 930, Metrohm	25
Figura 4. Interações de troca iônica de colunas cromatográficas para cromatografia iônica.....	26
Figura 5. Detector amperométrico, utilizado para análise de carboidratos. Um determinado potencial é aplicado entre um eletrodo de trabalho (WE) e um eletrodo de referência (RE), no qual o analito eletroquimicamente ativo poderá sofrer redução ou oxidação, e ao passar entre os eletrodos, a corrente fluirá e esta representará o sinal de medida.....	27
Figura 6. Preparo do mosto para ensaio de fermentação e separação do vinho para análises convencionais e cromatográficas.....	32
Figura 7. Preparo de amostra para análise de viabilidade celular de leveduras	33
Figura 8. Tempos de retenção do Glicerol, Glicose, Frutose e Sacarose em diferentes variações de metodologia.....	46
Figura 9. Curva analítica obtida para análise de açúcares por DNS.....	50
Figura 10. Curvas analíticas dos açúcares glicose, frutose e sacarose obtidas pela análise cromatográfica.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos métodos convencionais e dos métodos cromatográficos.....	22
Tabela 2. Dados para construção da curva de calibração para análise de açúcares pelo método de DNS.	34
Tabela 3. Dados para construção da curva de calibração utilizada para análise de carboidratos pelo método cromatográfico.	41
Tabela 4. Dados para construção da curva de calibração utilizada para análise de ácidos orgânicos pelo método cromatográfico.	42
Tabela 5. Dados para construção da curva de calibração utilizada para análise de cátions pelo método cromatográfico.....	43
Tabela 6. Dados para construção da curva de calibração utilizada para análise de ânions pelo método cromatográfico.	44
Tabela 7. Linearidade, limite de detecção e de quantificação, em mg L^{-1} , da sacarose, glicose e frutose para a validação da metodologia cromatográfica aplicada para carboidratos.	46
Tabela 8. Precisão e exatidão dos carboidratos testados na validação de metodologia cromatográfica.	48
Tabela 9. Parâmetros avaliados no teste de robustez para a metodologia cromatográfica aplicada aos carboidratos.....	48
Tabela 10. °Brix e pH dos mostos utilizados na fermentação alcoólica.....	49
Tabela 11. Equação do gráfico analítico, coeficiente de correlação e coeficiente de variação (%) para análise de carboidratos por DNS.	51
Tabela 12. Equações de reta das curvas da figura 10, coeficientes de correlação e coeficiente de variação (%) para análise de carboidratos por cromatografia de íons.	52
Tabela 13. Teores de açúcares redutores (glicose e frutose) presentes no mosto de fermentação, composto por caldo, xarope e misto (caldo + xarope).	53
Tabela 14. Teores de açúcares redutores totais (glicose, frutose e sacarose) presentes no mosto de fermentação, composto por caldo, xarope e misto (caldo + xarope).	54
Tabela 15. Teores de açúcares redutores (glicose e frutose) presentes no vinho delevedurado, após fermentação de mosto de caldo, xarope e misto (caldo + xarope).	56

Tabela 16. Teores de açúcares redutores totais (glicose, frutose e sacarose) presentes no vinho delevedurado, após fermentação de mosto de caldo, xarope e misto (caldo + xarope).	57
Tabela 17. Teor alcoólico do vinho delevedurado, após fermentação de mosto de caldo, xarope e misto (caldo + xarope) obtido pela leitura em densímetro digital. ...	58
Tabela 18. Rendimento da fermentação alcoólica, calculada a partir dos teores do teor alcoólico obtido e do teor alcoólico teórico, a partir da metodologia cromatográfica e convencional.	59
Tabela 20. Viabilidade celular (%) inicial, intermediária medida durante a fermentação e final, ao término da fermentação.....	60
Tabela 21. Teores de ácidos orgânicos (g L^{-1}) presentes nos mostos utilizados nos ensaios de fermentações, determinados por cromatografia iônica e por titulação. ..	62
Tabela 22. Teor de ácidos orgânicos presentes nos vinhos delevedurados ao final da fermentação alcoólica, quantificados por cromatografia iônica e por titulação.	63
Tabela 23. Teores de sódio, potássio, magnésio e cálcio do mosto a partir de caldo de cana-de-açúcar e do vinho centrifugado, obtidos das análises por cromatografia iônica.	64
Tabela 24. Teores de sódio, potássio, magnésio e cálcio do mosto a partir de xarope e do vinho centrifugado, obtidos das análises por cromatografia iônica.	66
Tabela 25. Teores de sódio, potássio, magnésio e cálcio do mosto a partir de caldo de cana-de-açúcar mais xarope e do vinho centrifugado, obtidos das análises por cromatografia iônica.....	67
Tabela 26. Teores de cloreto, fosfato e sulfato no mosto a partir de caldo e no vinho centrifugado ao final da fermentação alcoólica.	68
Tabela 27. Teores de cloreto, fosfato e sulfato no mosto a partir de xarope e no vinho centrifugado ao final da fermentação alcoólica.	69
Tabela 28. Teores de cloreto, fosfato e sulfato no mosto misto e no vinho centrifugado ao final da fermentação alcoólica.	70

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é líder mundial na produção de cana-de-açúcar e a atividade canavieira tem aumentado expressivamente na última década, destacando-se ainda mais na economia nacional e na matriz energética renovável, representando uma parcela importante na geração do PIB do país. Segundo a UNICA (2016), o setor sucroenergético gerou, em 2015, mais de R\$113 bilhões, representando um dos maiores PIBs do agronegócio brasileiro.

Com a atual aplicação dos resíduos e coprodutos antes descartados, geração de novos derivados da cana e o aumento na demanda por energia limpa e sustentável, houve um aumento na perspectiva econômica para o etanol, refletindo em investimentos e, conseqüentemente, em maior geração de renda e emprego no segmento industrial do setor sucroenergético (SANTOS, 2015; CEPEA, 2011; SZMERECSÁNYI, 1979 citado por CAMPOS, 2015).

O processo de obtenção de etanol a partir de biomassa ocorre em diversas etapas, podendo ser exemplificado de maneira mais simples, por quatro grandes etapas, sendo elas: o preparo da matéria-prima e extração do caldo; preparo do mosto para a fermentação; fermentação e finalmente a destilação (MACEDO, 1993).

Uma vez que a fermentação é iniciada, o controle do processo torna-se um ponto chave, e implica na busca de dois resultados básicos: qualidade do produto (intermediário e final) e minimização de perdas com a máxima eficiência.

Altas concentrações de açúcares durante a fermentação elevam a velocidade do processo fermentativo, podendo resultar em perdas na atividade de transporte de açúcar, produzindo menos álcool. Assim, altas concentrações de álcool no meio, podem retardar o crescimento e a viabilidade das leveduras, bloqueando sua capacidade fermentativa (SOUZA, 2009). A presença de ácidos orgânicos também pode causar danos à fermentação alcoólica, devido a sua ação inibitória sobre as leveduras, interferindo assim na manutenção de suas células (MAIORELLA et al., 1983 e OLIVA-NETO, 1995 citado por DORTA, 2006).

Buscando prevenir tais problemas, que podem vir a alterar custos, aumentar perdas e inibir resultados satisfatórios no final do processo, o monitoramento durante a fermentação torna-se cada vez mais necessário, uma vez que só se pode melhorar o que é medido, fazendo com que novas tecnologias sejam implantadas, trazendo rapidez, exatidão e facilidade de manuseio. Com isso e na busca de máximos rendimentos, a implementação de equipamentos cada vez mais modernos está assumindo lugar de destaque no meio agroindustrial, seja para produção de açúcar ou etanol.

Nesse sentido, avanços tecnológicos no processo de fabricação de álcool são bem-vindos e as agências de fomento à pesquisa têm incentivado trabalhos nessa área (PASCHOALINI, 2009).

A utilização de equipamentos mais modernos e precisos como os cromatógrafos, acabam se tornando uma alternativa evidente, visto sua capacidade de realizar separações e análises quantitativas em uma grande quantidade de compostos em diversos tipos de amostras, numa escala de tempo pequeno, com alta resolução, eficiência e sensibilidade.

Por estes motivos, o objetivo do projeto de pesquisa foi avaliar o uso destas técnicas cromatográficas para análise de açúcares no controle analítico e de qualidade em fermentações para a produção de etanol.

2. OBJETIVO

Avaliar o uso de técnicas cromatográficas para o controle analítico e da qualidade em fermentações para a produção de etanol, através de análises de açúcares por métodos tradicionais e por cromatografia de íons;

Realizar a validação da cromatografia de íons para análise de açúcares;

Determinar o rendimento de fermentação utilizando métodos tradicionais e de cromatografia de íons;

Avaliar a acidez do mosto utilizando metodologias tradicionais e por cromatografia de íons;

Avaliar a concentração de cátions e ânions por cromatografia de íons

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. A matéria-prima

A cana-de-açúcar (*Saccharum ssp.*) é uma planta originária do sudeste asiático, introduzida no Brasil em 1532, por Martin Afonso de Souza. Sendo que inicialmente foi plantada em São Vicente e depois foi introduzida com sucesso no nordeste brasileiro, principalmente na faixa litorânea (DeQUADROS, et al., 2011).

As variedades comerciais cultivadas atualmente são híbridas, originadas de cruzamentos realizados no início do século XX e apresentam uma maior capacidade de armazenamento de sacarose, resistência a doenças, vigor, rusticidade e tolerância a fatores climáticos se comparadas aos cultivares parentais (CIB, 2009).

Esta cultura se transformou, desde sua introdução no período colonial, em uma das principais culturas da economia brasileira, sendo o Brasil hoje responsável pela maior produção canavieira em ordem mundial. É uma das espécies com alta taxa de assimilação fotossintética e, conseqüentemente, capacidade para produzir biomassa contendo açúcar, amido, proteínas e lignocelulose (celulose, hemicelulose e lignina em sua maioria) (DINARDO-MIRANDA, VASCONCELOS, LANDELL, 2008; BRASIL, 2015).

3.2. Utilização da cana-de-açúcar

No Brasil, a cana-de-açúcar é utilizada principalmente para a produção de açúcar, etanol e bioeletricidade. O país é o maior produtor mundial de açúcar, sendo responsável por mais da metade da produção mundial e o 2º produtor mundial de etanol (BRASIL, 2015).

Em estudos realizados por Neves e Trombin (2014), notou-se um crescimento de 44% no PIB do setor sucroenergético quando comparamos as safras de 2008/2009 e 2013/2014. O valor bruto movimentado na safra 2013/2014 superou US\$100 bilhões, com um PIB de aproximadamente US\$ 43 bilhões. Atualmente, o PIB setorial encontra-se em aproximadamente US\$ 48 bilhões.

O setor sucroenergético pode ser considerado, de todos os setores agroindustriais, aquele que vem apresentando maiores avanços na área de pesquisa e desenvolvimento, objetivando a recuperação dos resíduos agrícolas gerados (EPE, 2007).

Segundo a UNICA (2016), foram processadas, na região Centro-Sul, aproximadamente 617 milhões de toneladas de cana na safra de 2015/2016, sendo que para a atual safra 2016/2017, a previsão de moagem poderá alcançar até 630 milhões de toneladas,

devendo totalizar uma produção de cerca de 34 milhões de toneladas de açúcar e 28 bilhões de litros de etanol.

O Brasil tem se destacado mundialmente ao longo dos anos em relação à produção e ao consumo de etanol, o que se deve, principalmente, a criação do Proálcool (Programa Nacional do Álcool). O programa foi criado em 14 de novembro de 1975, que tornou o etanol um produto efetivo na substituição da gasolina em meio à crise de preços do petróleo. O mercado de etanol vem crescendo de acordo com o aumento das inovações adotadas pelas usinas nas áreas tecnológicas e organizacionais, gerando competitividade internacional (AZEVEDO; SANTOS; MAGALHÃES, 2012).

Por ser considerado uma fonte de energia limpa e renovável, o etanol tem despertado a atenção frente a pressão dos preços e perspectivas de esgotamento das reservas de petróleo e emissões consideráveis de CO₂ na atmosfera (BASTOS, 2007). Além disso, apresenta a capacidade de gerar dez vezes mais energia do que necessita se comparado a sua produção.

A fabricação de álcool de cana no Brasil é feita através da fermentação do caldo obtido após a moagem da cana-de-açúcar. As etapas de fabricação de álcool são divididas nas operações de extração do caldo, preparo do mosto, preparo do fermento, fermentação, destilação, retificação e desidratação (Figura 1). O preparo do mosto seguido da adição de leveduras ao caldo misto ou ao melaço dará início à primeira etapa do processo contínuo de fermentação, onde as leveduras usarão os açúcares do mosto para seu crescimento e multiplicação (NASCIMENTO, 2012).

Figura 1. Fluxograma do processo industrial para produção de açúcar e etanol de cana-de-açúcar.

Fonte: BNDES/CGEE, 2008 adaptado por Tonoli, 2017.

O álcool produzido durante a fermentação é dependente da quantidade de açúcares presentes no mosto, no qual a exoenzima invertase, por meio de hidrólise, transforma a sacarose em glicose e frutose e a partir desses açúcares, a levedura produz o etanol e o CO₂ (NOBRE, 2006; LIMA et al., 2001).

O processo de produção de etanol difere drasticamente de outras fermentações industriais, sendo que uma delas refere-se ao substrato, onde o mosto a ser fermentado não sofre nenhum tratamento no sentido de eliminar toda a microbiota do caldo de cana-de-açúcar (ANDRIETTA; STECKELBERG, 2006).

O efeito de inibição dos açúcares e do etanol sobre o metabolismo da levedura tem influência direta na eficiência da fermentação, quando tratamos da alimentação de substrato nas dornas. É importante que este processo fermentativo não seja interrompido ou tenha sua velocidade reduzida por excesso de substrato. Para o controle deste parâmetro, geralmente o acompanhamento da concentração de açúcares redutores totais é feito no meio de fermentação (DARÉ, 2008).

3.3. Controle de qualidade na produção de etanol

Podemos definir controle de qualidade como sendo o processo de monitoramento das atividades, com o objetivo de garantir o modo como essas estão sendo realizadas, corrigindo quaisquer desvios significativos (ROBBINS; COULTER, 1998, p.414 citado por CARLINI JUNIOR; BARRETO; FILHO, 2006).

Otimizar e controlar um processo bioquímico está intrinsecamente relacionado com as informações obtidas no sistema estudado, pois com base nelas realiza-se o direcionamento aos parâmetros que interferem no processo. Uma vez analisados estes parâmetros, têm-se as variáveis chaves do processo, que podem ser alteradas, com a finalidade de tornar ótima a condição de operação. Alguns processos podem apresentar maior dificuldade quanto a otimização e o controle por terem como agentes transformadores um ser vivo, onde uma mínima alteração nos parâmetros do processo pode acarretar em variações no metabolismo desses (ex: leveduras, bactérias), resultando em alterações significativas na qualidade e quantidade final do produto (NASCIMENTO, 2012).

No caso da fermentação alcoólica, é de grande importância para o controle dentro da usina, que análises sejam feitas rotineiramente, buscando obter informações para alcançar maior rendimento industrial, com minimização de perdas, além de aperfeiçoar o tempo e o meio de análises. É indispensável que as técnicas utilizadas sejam rápidas e eficazes, e que tragam respostas significativas referentes ao processo. Uma vez que os dados estejam computados, estes também servirão de informações para os próximos ciclos fermentativos, mostrando caminhos a serem tomados em relação ao desempenho da destilaria (AMORIM; ZAGO; OLIVEIRA, 1982; DERMIBAS, 2002).

Através da coleta e análise de dados durante o processo de produção busca-se garantir uma execução satisfatória, onde os problemas detectados possam ser analisados e corrigidos assim que identificados (CORRÊA et al., 2007).

Alguns parâmetros de monitoramento contribuem para uma maior eficiência do processo de fermentação alcoólica, como análise de densidade ou °Brix, temperatura, pH, contaminação bacteriana, velocidade de alimentação e açúcares residuais no vinho. O volume de álcool que pode ser formado pela ação do fermento que depende do °Brix (quantidade de sólidos em gramas por cem gramas) do mosto, ou mais corretamente, da quantidade de açúcares nele existentes. A sacarose é absorvida na forma de seus monossacarídeos estruturais, glicose e frutose, após a hidrólise feita pela invertase (AMORIM, 2005).

O cálculo de rendimento industrial a partir da determinação da massa do etanol produzido e da determinação da massa residual de açúcar e outros metabólitos é o principal parâmetro para avaliação dos processos fermentativos. Além do etanol e do dióxido de carbono, glicerol, ácidos orgânicos e compostos de menor significado, podem ser quantificados. O acompanhamento de todo processo deve ser ativo, no qual os resultados das análises são interpretados e uma ação corretiva é direcionada a fim de retificar qualquer discrepância. Para obtenção de resultados confiáveis, é necessária a adoção de metodologias e equipamentos padronizados (AMORIM; ZAGO; OLIVEIRA, 1982).

Segundo Amorim (2005), o uso de equipamentos capazes de mensurar os produtos na fermentação variou durante os anos. A utilização da cromatografia líquida de alta eficiência, CLAE, foi inicialmente uma boa opção devido à alta eficiência, porém seu custo era demasiado alto. Por volta da década de 90, o uso da CLAE voltou a ser uma opção para determinação do ART no mosto, visto que a metodologia convencional utilizada, a colorimétrica, sofria interferência de outros componentes. A CLAE reduzia a margem de erro e os aparelhos já possuíam um custo mais acessível. Atualmente, normas como a NBR 10894:2012, já descrevem a técnica da cromatografia de íons como meio para determinação do teor de sulfatos e cloretos no etanol combustível (ABNT, 2012; ANP, 2011).

A cromatografia é um processo mais complexo e preciso se comparado as metodologias convencionalmente utilizadas dentro da usina, que envolvem refratometria, espectrofotometria e titulometria, apresentando como diferencial a alta seletividade em relação aos diferentes monossacarídeos e dissacarídeos presentes no meio. A CLAE é uma técnica empregada na análise simultânea de diferentes açúcares, como a glicose, a frutose e a sacarose, visto sua capacidade em quantificar estes componentes numa única análise (DORNEMANN, 2016).

Na Tabela 1 apresentam-se as vantagens e desvantagens dos métodos cromatográficos e dos métodos tradicionalmente utilizados para análise de açúcares e outros analitos no controle da fermentação.

Tabela 1. Vantagens e desvantagens dos métodos convencionais e dos métodos cromatográficos.

	Vantagens	Desvantagens
Métodos convencionais	<ul style="list-style-type: none"> • Baixo custo de análise e equipamento (vidrarias); • Metodologias já validadas; • Materiais utilizados são de simples aquisição; • Podem alcançar uma exatidão de até 99,9% quando o composto analisado se encontra em mais de 10% da amostra (volumétricos e gravimétricos); 	<ul style="list-style-type: none"> • Potencial relativização de resultados (titulométricos), pois cada analista tem uma percepção diferente do ponto de viragem; • Necessita de preparo de amostra além de diluições; • Não recomendado para amostras com alta turbidez (colorimétrica); • Velocidade de análise moderada; • Reagentes com alta toxicidade (DNS);
Métodos cromatográficos	<ul style="list-style-type: none"> • Fácil interpretação de resultados; • Resultados rápidos; • Baixo tempo de análise; • Necessita pouco volume de amostra; • Preparo de amostra simples (diluição e filtragem); • Alta resolução; • Alta sensibilidade; • Versátil – capaz de quantificar diversos tipos de analitos (açúcares, ácidos orgânicos, ânions e cátions, entre outros); • Capacidade de separar e quantificar misturas complexas; • Capaz de detectar traços (ppm, ppb); • Registro de resultados final computadorizado; 	<ul style="list-style-type: none"> • Custo elevado de manutenção e equipamento; • Necessidade de diferentes detectores (não existe um detector universal); • Necessidade de experiência para manuseio do equipamento; • Preparo de curvas analíticas em curtos períodos de tempo (dias); • Necessita de um espaço com controle de temperatura;

Fonte: Adaptado de Santos, 2008a; Collins, Braga e Bonato, 1997; CEFET, s/a, Dornemann, 2016

3.4. Cromatografia

A descoberta da cromatografia como técnica analítica ocorreu no início do último século, em 1906, sendo empregada na separação de componentes em extrato de folhas, utilizando uma coluna de vidro recheada com carbonato de cálcio e uma fase móvel de éter de petróleo (FIGUEIREDO, 2012).

Segundo definição dada pela IUPAC (1993), a cromatografia é o método físico de separação no qual os componentes a serem separados se distribuem entre duas fases, uma sendo denominada fase estacionária, e a outra denominada fase móvel. Durante a passagem pela fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes seja seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferentes desses componentes (COLLINS; BRAGA, 1987; SKOOG et al., 1998).

A fase conhecida como estacionária pode ser sólida ou líquida, dispostas sobre um suporte sólido com grande área superficial, enquanto a fase móvel, também chamada de eluente, pode ser gasosa, líquida ou ainda um fluido supercrítico (HARRIS, 2001).

As diferentes formas de cromatografia podem ser classificadas considerando-se os critérios fase móvel empregada, fase estacionária utilizada, modo de separação e forma física do sistema cromatográfico (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998), conforme descrito na Figura 2.

Figura 2. Tipos de cromatografia e suas divisões

Fonte: Adaptado de Degani, Cass e Vieira, 1998

A separação dos componentes em uma amostra é apenas uma parte da análise cromatográfica, sendo a identificação e a quantificação dos analitos obtidos o complemento final, o que só é possível com a utilização de detectores adequados. Entre os detectores mais

utilizados estão o espectrofotométrico (UV/Vis), índice de refração, evaporativo com espalhamento de luz (ELSD), fluorescência, espectrômetro de massas (GARCIA, 2010).

3.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) surgiu por volta de 1970. A tecnologia utiliza colunas fechadas com partículas muito finas, proporcionando separações mais eficientes do que a cromatografia tradicional (papel, camada delgada ou coluna aberta), possuindo excelente capacidade analítica, podendo separar até 100 componentes em uma amostra por corrida (FIGUEIREDO, 2012; COLLINS; BRAGA e BONATO, 1997). Nesta técnica cromatográfica, o circuito é fechado, o que permite sua utilização inúmeras vezes. As colunas utilizadas são bastante eficientes, mas oferecem resistência à vazão da fase móvel, fazendo-se necessária a aplicação de altas pressões para que a velocidade de eluição aumente. A injeção é feita através de microseringas ou de válvulas de injeção (VOGEL, 2002; SKOOG et al., 2002).

Para que um solvente possa ser utilizado como fase móvel na CLAE, este deve apresentar alto grau de pureza e boa dissolução da amostra, não deve dissolver a fase estacionária, ter baixa viscosidade e deve ser compatível com o detector (COLLINS; BRAGA e BONATO, 1997).

As fases estacionárias utilizadas na cromatografia líquida de alta eficiência, geralmente sílica ou seus derivados, devem ter alta resolução entre os componentes da amostra e ser de fácil introdução na coluna. Uma característica importante da partícula dos materiais utilizados nesta fase é possuir uniformidade e pequeno coeficiente de variação de diâmetro das partículas. Estas podem variar 3 a 40 μm de diâmetro e quanto menor for a partícula, maior será a eficiência da separação, favorecendo assim o processo de difusão das moléculas da amostra (CECCHI, 2003).

É comum a utilização de uma pequena coluna entre o injetor e a coluna de trabalho, chamada de pré-coluna, para retenção de impurezas que possam estar presentes na amostra, evitando que sejam adsorvidas pela coluna de trabalho, aumentando seu tempo de vida (CIOLA, 1998).

Os detectores são responsáveis por monitorar o fluxo da fase móvel na saída da coluna, detectando de forma contínua as propriedades físicas ou físico-químicas da amostra, enviando um sinal para registro que é, geralmente, diretamente proporcional à concentração

do componente na amostra (STOLYHOW; COLIN; GULOCHON, 1985 citado por SANTOS, 2008a).

3.6. Cromatografia de íons

O termo “cromatografia de íons” foi criado em 1975, por Small, Stevens e Baumann com a introdução da detecção por condutividade combinada com um método químico de redução da condutividade. Pode ser definida como uma técnica de natureza eletrostática, onde a separação e quantificação dos íons ocorrem ao se empregar colunas que possuam resinas trocadoras de íons ou equivalentes, onde os íons mais atraídos pela resina se moverão mais devagar do que os menos atraídos (CIOLA, 1998; ARAUJO, 2006).

Figura 3. Cromatógrafo de íons – Compact IC Flex 930, Metrohm

Fonte: Eith et al., (2009)

O mecanismo que rege este processo de separação é a troca de íons entre os solutos da amostra e os componentes iônicos das fases móvel (líquida) e estacionária (sólida). Desta forma, a cromatografia de íons torna-se uma subdivisão da cromatografia líquida de alta eficiência (KLEIN, 2010). O processo de troca iônica ocorre na condição de equilíbrio e a eficiência da separação desses íons depende fortemente da interação existente entre eles e os grupamentos funcionais da fase estacionária (WEISS, 2004).

As interações entre o eluente e fase estacionária, do tipo carga-carga são responsáveis pela separação, onde íons de cargas opostas são atraídos para a fase estacionária, por meio de forças eletrostáticas (ARAÚJO, 2006).

Figura 4. Interações de troca iônica de colunas cromatográficas para cromatografia iônica.

Fonte: Nicésio, (2012),

A cromatografia iônica (CI) apresenta grande variedade de colunas de separação, sistemas de eluição e detectores, tornando-se assim uma boa alternativa de escolha para análises de íons (EITH et al., 2006).

O sistema de detecção usado em cromatografia de íons não difere, em princípio, daqueles usados na CLAE convencional. O detector universal e mais frequentemente usado em CI é o detector de condutividade, enquanto os dois tipos de fases estacionárias utilizados e que diferem no princípio são trocadores de íons de superfície funcional e trocadores de íons peliculares (HADDAD, JACKSON, 1990).

No caso da análise de carboidratos, o detector utilizado é o amperométrico, que apresenta alta sensibilidade, permitindo a determinação simultânea de carboidratos com pouca interferência, limites de detecção baixos e baixa sensibilidade a compostos cromóforos, sendo ideal para utilização em caldos de fermentação (HANKO & ROHRER, 2000).

Figura 5. Detector amperométrico, utilizado para análise de carboidratos. Um determinado potencial é aplicado entre um eletrodo de trabalho (WE) e um eletrodo de referência (RE), no qual o analito eletroquimicamente ativo poderá sofrer redução ou oxidação, e ao passar entre os eletrodos, a corrente fluirá e esta representará o sinal de medida.

Fonte: Eith et al., (2006).

A vantagem desta técnica se dá pela determinação rápida e simplificada de espécies iônicas simultaneamente e pela boa resolução, podendo ser utilizada para a análise de íons orgânicos e inorgânicos em várias matrizes como, por exemplo, meios de fermentação, com limites de detecção da ordem de ppm, podendo-se chegar a ppb, fazendo da técnica ideal para otimização e avaliação do processo fermentativo (De BORBA, 2014; NIEDZIELSKI et al., 2006; HANKO & ROHRER, 2000; LEE, 1990).

Contudo, é de extrema importância em um método experimental de ensaio, a garantia da qualidade dos seus resultados analíticos, de modo a poder tomar as decisões mais acertadas, evitando alteração significativa do valor do resultado final. Assim, a validação de um método analítico, como a cromatografia, surge como um aspecto crucial da garantia da qualidade analítica, para que se obtenham resultados condizentes ao verdadeiro valor do teor do analito presente na amostra. Os ensaios de validação devem ser executados por pessoal competente e realizados em equipamentos e instrumentos dentro das especificações, e adequadamente calibrados (RIBANI et al., 2004; ICH, 1995; RELACRE, 2000).

3.7. Validação de metodologias analíticas

Ao se aplicar um método analítico conhecido, como é o caso da cromatografia, se faz necessário assegurar os resultados obtidos, para que esses possam ser aceitos como verdadeiros e corretos. Desta forma, a validação vem para fornecer evidências objetivas de que os requisitos para uma devida aplicação ou uso foram atendidos (INMETRO, 2000).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, (2003) a validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados.

Muitos são as agências credenciadoras que asseguram a qualidade das técnicas e determinam como proceder a validação, entre elas, a ANVISA, o INMETRO, a ISO, a IUPAC e o ICH. Percebe-se que entre elas, não há um procedimento normatizado que estabelece como proceder com a validação, e podem ser descritos de maneiras distintas, de acordo com sua aplicação (THOMPSON et al., 2002; RIBANI et al., 2004).

A validação deve avaliar a relação entre os resultados experimentais obtidos durante o trabalho e o propósito do método, demonstrando que este se ajusta ao que lhe foi proposto (BRITO et al., 2003). Na validação de métodos cromatográficos, os parâmetros analíticos a serem avaliados envolvem seletividade, linearidade, precisão e exatidão, robustez e limite de detecção e quantificação (RIBANI et al., 2004).

O termo seletividade define se o método é capaz de avaliar as substâncias presentes na amostra sem sofrer interferência na presença de outros componentes e/ou interferentes como impurezas, produtos de degradação, excipientes ou outro ingrediente ativo. Esta avaliação garante que o pico de resposta obtido seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI et al., 2004).

A linearidade indica a capacidade do método em apresentar uma resposta diretamente proporcional ao teor do analito em uma determinada faixa de aplicação. Pode ser determinada pela relação matemática entre o sinal medido e a concentração do componente, geralmente obtida pela equação de reta:

$$y = ax + b \text{ (OLIVEIRA, 2006, de ARAGÃO et al., 2009).}$$

De acordo com o INMETRO, (2003), a robustez do método analítico mede a sensibilidade dele em relação a pequenas variações em seus parâmetros, sem que se altere sua capacidade de avaliação. Este teste serve para indicar fatores que possam influenciar significativamente a resposta do método em estudo (BRITO et al., 2003).

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos numa série de medidas de uma mesma amostragem, e segundo seção V da consulta pública nº129, anexo V, publicado pela ANVISA em 2016, os valores de desvio padrão relativo aceitáveis para fins de avaliação da precisão do método variam de acordo com a concentração do analito na amostra, podendo variar de 2 a 35% (FIGUEIREDO, 2012; ANVISA, 2016). Enquanto a exatidão

mede o grau de concordância dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor de referência, onde a variação entre o valor teórico e o real deve ser menor que 15%, ou ainda, apresentar taxa de recuperação de 12 a 102%, dependendo da concentração do analito na amostra e do tipo de matriz (ANVISA, 2003, ANVISA, 2016).

Por fim, temos os limites de detecção e quantificação. O limite de detecção (LD) pode ser definido como a menor concentração da substância em estudo que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Este limite pode variar de acordo com o tipo de amostra analisada (ICH, 1995; INMETRO, 2003). O LD pode ser expresso pela equação 1, usando-se o método baseado na curva analítica (RIBANI et al., 2004; ANVISA, 2003).

$$LD = 3,3 \frac{s}{S} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

s: desvio padrão estimado da resposta ou o coeficiente linear da equação.

S: inclinação coeficiente angular da curva analítica.

Por fim, tem-se o limite de quantificação (LQ), definido pela ANVISA, (2003), como a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais aceitáveis. O LQ pode ser expresso pela equação 2:

$$LD = 10 \frac{s}{S} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

s: desvio padrão estimado da resposta ou o coeficiente linear da equação.

S: inclinação coeficiente angular da curva analítica.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Execução da pesquisa e obtenção da amostra

Os experimentos foram realizados no Setor de Açúcar e Álcool, do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição – ESALQ/USP.

Os mostos utilizados nos ensaios de fermentação foram preparados a partir de xarope a 60° Brix e caldo a 18° Brix, obtidos em usinas de açúcar da região de Piracicaba, de modo a se obter a concentração de açúcar desejada para o estudo.

4.2. Ensaio de fermentação

O estudo do controle analítico foi realizado a partir de ensaio de fermentação com 3 tratamentos e 5 repetições, onde cada tratamento correspondeu a um tipo de mosto, consistindo em caldo, xarope e misto (caldo + xarope).

O caldo utilizado para preparo do mosto passou pelo processo de clarificação com a adição de 2,5 g de fosfato de sódio monobásico L⁻¹ de caldo fervido. Após a adição do reagente, o caldo foi autoclavado e mantido em repouso por 48h, para posterior separação de sobrenadante do material sedimentado.

Ao final da clarificação, o caldo foi diluído com água destilada a fim de se obter a concentrações de açúcar de 15,8° Brix, e então autoclavados a 1atm por 20 minutos, para esterilização.

O xarope obtido da usina passou pelo processo de diluição, para obtenção de 15,8° Brix, com água destilada, e posterior esterilização na autoclave a 1atm por 20 minutos.

A quantidade de inóculo utilizado foi de 3% da massa seca, de *Saccharomyces cerevisiae*, em relação ao volume do reator, correspondendo a 9 g.

Preparo do mosto

Análise do vinho – Aplicado a todos os tratamento

Figura 6. Preparo do mosto para ensaio de fermentação e separação do vinho para análises convencionais e cromatográficas.

Para a realização da fermentação, foram utilizados 300 mL do mosto autoclavado, em Erlenmeyers de 500 mL.

A fermentação foi acompanhada através da perda de CO₂ dos reatores no decorrer da fermentação. No final do ciclo fermentativo as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm/10

minutos e o vinho de levedurado, assim como o mosto foram armazenados em congelador a -20°C, para análises posteriores.

4.3. Análise da viabilidade celular, brotamento, brotos vivos das leveduras e contaminação total e bacteriana.

4.3.1. Viabilidade celular, brotamento e população de *Saccharomyces cerevisiae*

Foram determinadas através da coloração diferencial das células vivas pela solução de azul de metileno 0,1% e contagem das células vivas, mortas e dos brotos viáveis, por microscopia óptica, de acordo com metodologia descrita por Pierce (1970) citado por Oliveira et al.(1996). Esta análise foi efetuada no início, meio e no final do ciclo fermentativo.

Para a solução de azul de metileno 0,1%, foram utilizados 0,025 g de corante azul de metileno, 5 g de citrato de sódio e 25 mL de água destilada. O azul de metileno e o citrato de sódio foram pesados em balança analítica e então adicionados a água destilada em um erlenmeyers. Após completa dissolução dos sólidos, a solução foi transferida para um frasco âmbar com identificação.

Para a contagem da viabilidade celular, foram coletados 0,5 mL da suspensão de leveduras (vinho) e adicionados a 9,5 mL de água destilada. Após diluição, foram transferidos 0,3 mL para o tubo e adicionados 0,3 mL da solução de azul de metileno 0,1%. A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos por 10 segundos. Com o auxílio de uma pipeta automática, foram transferidos 0,1 mL da amostra preparada para a câmara de Neubauer e coberta com uma lamínula. A câmara foi levada ao microscópio óptico e a contagem de células vivas e mortas nos campos de observação (figura 7) foi feita com a objetiva de 40x.

Figura 7. Preparo de amostra para análise de viabilidade celular de leveduras

A contagem foi realizada e a viabilidade calculada pela seguinte equação:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{(\text{número de células vivas})}{(\text{número de células totais})} \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

4.4. Determinação do teor de BRIX do caldo (B)

A determinação do °Brix (teor de sólidos solúveis por cento, em peso, de caldo) foi realizada em refratômetro digital, de leitura e correção de temperatura automáticas e resolução máxima de 0,1° Brix (um décimo de grau Brix), com o valor final expresso em temperatura de 20°C (vinte graus Celsius).

4.5. Determinação de Açúcares Redutores e Açúcares Redutores Totais pelo método do Ácido Dinitrossalicílico (DNS)

4.5.1. Curva para Determinação de Açúcares Redutores e Açúcares Redutores Totais

A curva de calibração para este método colorimétrico relaciona a concentração de açúcares redutores totais com valores de transmitância. A partir da solução padrão com 1 g L⁻¹ de glicose de concentração foram realizadas diluições em balões volumétricos de 50 mL, conforme Tabela 2:

Tabela 2. Dados para construção da curva de calibração para análise de açúcares pelo método de DNS.

Tubo	Concentração diluição (g L ⁻¹)	Volume solução diluída (mL)	Volume água destilada (mL)
0	0,0	0,000	1,000
1	0,2	0,250	0,750
2	0,4	0,500	0,500
3	0,6	0,625	0,375
4	0,8	0,750	0,250
5	1,0	1,000	0,000

Com as diluições para curva de calibração prontas, seguiu-se o procedimento a seguir para posterior leitura em espectrofotômetro.

Após o preparo da solução de glicose de 1 g L^{-1} , foram transferidos para tubos de ensaio os volumes apropriados da solução, conforme Tabela 1 e adicionados em cada tubo, 1mL do Reagente DNS, homogeneizando-se bem. Os tubos foram então colocados em banho-maria em ebulição por 5 minutos. Após este tempo, os tubos foram resfriados até temperatura ambiente.

Após o resfriamento a cada tubo foi adicionado 10,5 mL de água destilada, homogeneizado e determinada a % T em $\lambda = 540 \text{ nm}$.

4.5.2. Açúcares Redutores

Em um tubo de ensaio foram transferidos 1 mL da amostra a ser analisada e 1 mL do Reagente DNS. Após a homogeneização em agitador de tubos, por 10 segundos, os tubos foram colocados em banho de água fervente por 5 minutos e resfriados em seguida até temperatura ambiente. Ao atingir temperatura ambiente, 25°C , foi adicionado 10,5 mL de água destilada e homogeneizado em agitador de tubos, por 10 segundos. Após este procedimento, a determinação dos açúcares em %T foi realizada em um espectrofotômetro a 540 nm de comprimento de onda.

Os valores de %T obtidos foram convertidos em concentração de Açúcares Redutores com o auxílio da equação obtida pela curva padrão construída previamente, descrita no Item 4.5.1.

4.5.3. Açúcares Redutores Totais

Em um balão volumétrico de 100 mL foram adicionados 25 mL de solução HCl 1,3N e 5 mL da amostra. O balão foi mergulhado em banho-maria sob temperatura de 60°C - 65°C , durante 30 minutos. Ao final do tempo, o balão foi resfriado em água corrente até atingir temperatura ambiente. Esta solução obtida foi neutralizada com uma solução de NaOH 4N, utilizando papel tornassol para verificar a faixa de pH. Em seguida, o volume do balão foi completado com água destilada.

Os resultados foram obtidos em %T com o uso do espectrofotômetro em comprimento de onda de 540nm.

4.6. Determinação de teor alcoólico em vinhos de destilarias pelo densímetro digital EDM 4000 Schmidt Haensch.

Para as análises de teor alcoólico, foram coletados 25 mL de amostra de cada unidade experimental, no início e no final da fermentação. Essa amostra foi destilada em microdestilador, modelo MA 012/1 Marconi. Após a amostra ter sido destilada, ela foi analisada com o auxílio do densímetro digital para líquidos e gases, Densímetro EDM 4000, da Schmidt Haensch.

4.6.1. Destilação

Com o auxílio de uma pipeta volumétrica de 25 mL, a amostra foi transferida para a câmara de destilação, com posterior passagem de água destilada para lavagem do local onde a amostra foi colocada. Após a água da caldeira ter entrado em ebulição, as torneiras da caldeira e do coletor de amostras foram fechadas e o termostato colocado na temperatura de trabalho. A destilação foi conduzida até que o volume de 25 mL tenha sido coletado em um balão volumétrico colocado na válvula de saída do condensador do destilador.

4.6.2. Leitura no Densímetro Digital

Para o densímetro atingir as condições de trabalho, foi preciso primeiramente adequar a temperatura em 20°C com um desvio de 0,05°C. Após a estabilização da temperatura, foram injetados ar e água para a calibração do equipamento.

Após o densímetro ter atingido as condições de trabalho, foram transferidas as alíquotas de amostra no tubo receptor de amostra, tomando-se o cuidado para que não houvesse formação de bolhas de ar dentro do tubo de leitura. Após completar o tubo com a amostra, apertou-se o botão start e observou-se o valor da densidade na tela. Este valor foi utilizado posteriormente para o cálculo do valor em °GL, através da conversão da densidade lida, para concentração alcoólica da solução em % v/v retirado de uma tabela de conversão de densidade relativa a 20°C/20°C.

4.7. Análise de Acidez Total

Para a análise de acidez total, foram transferidos 20 mL de amostra homogeneizada para um Erlenmeyer de 250 mL. Nestes, foram adicionados 50 mL de água destilada e 2-3 gotas de solução indicadora de fenoftaleína. A bureta foi completada com Hidróxido de Sódio 0,1N e a titulação foi realizada até atingir o pH 8,2, caracterizado pelo ponto de viragem da solução com a amostra. Então, foi anotado o volume de solução de Hidróxido de Sódio gasto na titulação de cada amostra.

A acidez total (mg de ácido acético/L de amostra) foi obtida pela equação 4:

$$Acidez\ total = \frac{(volume\ gasto \times N \times F \times 60 \times 1000)}{(volume\ de\ amostra\ em\ mL)} \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

A= acidez total (mg de ácido acético/L)

Volume gasto= volume de Hidróxido de Sódio gasto na titulação

N = normalidade da solução de NaOH

F = fator de padronização (F=0,9960)

60 = equivalente de ácido acético

4.8. Determinação de Açúcares e Glicerol por IC

4.8.1. Execução experimental da validação de metodologia analítica para determinação de açúcares por cromatografia de íons

A validação da metodologia analítica foi executada conforme RE nº899/03 da ANVISA e DOQ-CGCRE-008 INMETRO (ANVISA, 2003; INMETRO, 2003).

4.8.1.1. Seletividade

A seletividade do método foi testada através da comparação dos resultados obtidos nas corridas cromatográficas com a combinação de vários fatores, como mudança de fluxo, temperatura e dia de leitura, utilizando padrões contendo os açúcares a serem analisados

(glicose, frutose e sacarose) e a amostra de interesse (mosto e vinho da fermentação alcoólica). A seletividade foi testada a partir dos padrões utilizados na curva de calibração para validação do método, variando de 10 a 100 ppm.

Quando a resposta do instrumento ao se aplicar o método não sofreu interferência de outros componentes da matriz, apresentando boa resolução, considerou-se que o método foi seletivo para o analito de interesse.

4.8.1.2. Linearidade

A linearidade do método foi determinada a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração do analito de interesse, através da construção de curvas analíticas com diferentes concentrações de açúcar, variando-se de 10 mg L⁻¹ a 100 mg L⁻¹. A curva analítica foi preparada por uma série de diluições da solução estoque de 1000 mg L⁻¹. Neste teste buscou-se um coeficiente de correlação linear $r \geq 0,99$ e uma curva de resposta do tipo:

$$Y = ax + b,$$

Onde: y= área do cromatograma obtido da corrida cromatográfica [(nA) x min]

a= coeficiente angular da reta

x= concentração de açúcar (mg L⁻¹)

b= coeficiente angular da reta

4.8.1.3. Precisão e exatidão

A avaliação da precisão e exatidão foi obtida em uma série de medidas de uma mesma amostra. A amostra consistiu em um padrão de açúcares (glicose, frutose e sacarose), numa concentração de 35 mg L⁻¹ de açúcar, e em uma amostra de vinho de levedurado, fortificada com uma solução de 35 mg L⁻¹ de açúcar.

A avaliação da precisão do método foi feita neste trabalho com base na repetibilidade e verificada pela concordância de no mínimo 9 (nove) determinações, sendo expressa como desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), segundo a equação 5:

$$DPR = \frac{DP}{CMD} \times 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

DP é o desvio padrão;

CMD, a concentração média determinada.

A exatidão foi medida juntamente com as determinações de precisão, onde o método foi considerado exato quando apresentou taxa de recuperação entre 80 – 110% (AMSTALDEN, 2010). A recuperação está relacionada com a exatidão, pois expressa a quantidade de determinado analito, recuperado no processo de separação, em relação à quantidade real presente na amostra. O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos (ASSONUMA, 2009).

Para o cálculo da exatidão foi utilizada a equação 6:

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

4.8.1.4. Robustez

A robustez do método foi testada a partir da combinação da variação da temperatura (23,5° C, 25°C e 35°C) e fluxo de eluente utilizado (0,9 mL min⁻¹ e 1,0 mL min⁻¹). O método foi considerado robusto quando apresentou resultados de recuperação entre 80% e 120%, precisão com desvio padrão relativo abaixo de 20% e ainda, quando não houve alteração na resolução dos picos ou picos coeluídos (AMSTALDEN, 2010; RIBANI et al., 2004).

4.8.1.5. Limite de Detecção (LD) e limite de Quantificação (LQ)

A estimativa do limite de detecção (LD) foi feita com base na relação de 3,3 vezes o ruído da linha de base, a partir da construção de curvas de calibração (com concentração de 10 mg L⁻¹, 30 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹, 80 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹), e então determinado pela equação 7:

$$LD = 3,3 \frac{DPa}{IC} \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

DPa: desvio padrão do intercepto com o eixo do Y;

IC: inclinação da curva de calibração.

O cálculo do limite de quantificação (LQ) foi feito com base na relação de 10 vezes o ruído da linha de base, a partir da construção de curvas de calibração (com concentração de 10 mg L⁻¹, 30 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹, 80 mg L⁻¹ e 100 mg L⁻¹), e então determinado pela equação 8:

$$LD = 10 \frac{DPa}{IC} \quad \text{Equação 8}$$

Onde:

DPa: desvio padrão do intercepto com o eixo do Y;

IC: inclinação da curva de calibração.

4.8.2. Determinação de Açúcares por IC

As análises foram realizadas de acordo com a metodologia desenvolvida por Application Work AWI CBR-0022-082012 (EITH et al., 2006). O equipamento utilizado foi um cromatógrafo de íon, modelo 930 Compact IC Flex, equipado com um Detector Amperométrico.

Foram utilizados 5 mL de amostra de mosto e vinho delevedurado, previamente diluída em uma proporção de 1/500 para o mosto, que apresenta uma alta concentração de açúcares e impurezas, e 1/1 para o vinho delevedurado. As amostras foram filtradas em unidades filtrantes Durapore 0,45 µm de porosidade. Em seguida, foram injetados 0,25 µL da amostra no cromatógrafo de íons para a análise de açúcares e de glicerol. Foi utilizado o seguinte sistema cromatográfico: Coluna Metrosep Carb 1 – 150/4.0, o eluente foi a solução de NaOH 200 mM, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹, sob 35°C, durante 9 minutos.

Para a determinação dos carboidratos, uma curva padrão de resposta do sinal analítico (área) *versus* concentração dos padrões foi construída para verificar a linearidade do detector no intervalo de concentração de trabalho. A curva padrão foi preparada a partir de açúcares com ≥99% de pureza. As faixas de concentração utilizadas na curva padrão variaram de 31,25 mg L⁻¹ a 500 mg L⁻¹.

Foi preparada uma solução estoque de 500 mg L^{-1} em um balão de 100 mL, do qual se deu a diluição para as concentrações desejadas, conforme Tabela 3:

Tabela 3. Dados para construção da curva de calibração utilizada para análise de carboidratos pelo método cromatográfico.

Balão (25 mL)	Concentração diluição (g L^{-1})	Volume solução estoque diluída (mL)
0	31,25	1,562
1	62,5	3,125
2	125,0	6,25
3	250,0	12,5

Após as diluições, foram filtrados 10 mL de cada concentração preparada, incluindo-se a solução estoque, com filtros Durapore $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ em frascos de vidro pequenos, devidamente identificados, para análise em Cromatógrafo de íons.

4.9. Determinação de Ácidos Orgânicos por IC

As análises foram realizadas de acordo com o Application Work AWICBR-0024¹02012 (EITH et al., 2006). O equipamento utilizado foi o cromatógrafo de íons, modelo 930 Compact IC Flex, da Metrohm, com detector de condutividade.

Foram utilizados 5 mL de amostra de mosto e vinho delevedurado, previamente diluída em uma proporção de 1/100. As amostras foram filtradas em unidades filtrantes Durapore $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de porosidade. Em seguida, foram injetados $20 \text{ }\mu\text{L}$ de amostras no Cromatógrafo de íons para a análise de ácidos orgânicos. Foi utilizado o seguinte sistema cromatográfico: coluna Metrosep OrganicAcid, o eluente foi a solução de H_2SO_4 $0,5 \text{ mM}$ + 15% de acetona, a um fluxo de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, sob 25°C , durante 27 minutos e solução de regeneração do supressor químico de 20 mM de LiCl.

Nesta análise foi determinado ácido acético, propiônico, butírico, láctico, aconítico e succínico. Para a determinação dos ácidos orgânicos, uma curva padrão de resposta do sinal analítico (área) *versus* concentração dos padrões foi construída para verificar a linearidade do detector no intervalo de concentração de trabalho. Os padrões dos ácidos orgânicos foram preparados a partir dos respectivos sais com $\geq 99\%$ de pureza e as faixas de concentração utilizadas na curva padrão variaram de $3,125 \text{ mg L}^{-1}$ até 100 mg L^{-1} .

Foi preparada uma solução estoque de 100 mg L^{-1} em um balão de 100 mL, do qual se deu a diluição para as concentrações desejadas, conforme Tabela 4:

Tabela 4. Dados para construção da curva de calibração utilizada para análise de ácidos orgânicos pelo método cromatográfico.

Balão (25 mL)	Concentração diluição (g L^{-1})	Volume solução estoque diluída (mL)
0	3,125	0,781
1	6,25	1,562
2	12,5	3,125
3	25,0	6,25
4	50,0	12,5

Após as diluições, foram filtrados 10 mL de cada concentração preparada, incluindo-se a solução estoque, com filtros Durapore $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ em frascos de vidro pequenos, devidamente identificados, para análise em Cromatógrafo de íons.

4.10. Determinação de Íons por IC

4.10.1. Cátions

As análises foram realizadas de acordo com a metodologia desenvolvida pela IC Application Note N°C-36, em um Cromatógrafo de íons modelo 930 Compact IC Flex com detector de condutividade (EITH et al., 2006).

Foram utilizados 5 mL de amostra de mosto e vinho delevedurado, previamente diluída em uma proporção de 1/100. As amostras foram filtradas em unidades filtrantes Durapore $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de porosidade. Em seguida, foram injetados $20 \text{ }\mu\text{L}$ de amostras no Cromatógrafo de íons para a análise de cátions. Foi utilizado o seguinte sistema cromatográfico: coluna Metrohm, MetrosepCation1-2, o eluente foi a solução de Ácido Tartárico 7,5 mM, Ácido Dipicolínico 0,135 mM e Ácido Ascórbico 3 mM, com fluxo de $0,9 \text{ mL min}^{-1}$, sob 30°C , durante 32 minutos.

Para a determinação dos cátions sódio, potássio, nitrato, cálcio e magnésio, uma curva de resposta do sinal analítico (área) *versus* concentração dos padrões foi construída para verificar a linearidade do detector no intervalo de concentração de trabalho. Os padrões foram preparados a partir de Sulfato de Sódio, Iodeto de Potássio, Cloreto de Amônio, Nitrato de

Magnésio e Cloreto de Cálcio com $\geq 99\%$ de pureza e as faixas de concentração utilizadas na curva padrão variaram de $3,125 \text{ mg L}^{-1}$ a 100 mg L^{-1} .

Foi preparada uma solução estoque de 100 mg L^{-1} em um balão de 100 mL, do qual se deu a diluição para as concentrações desejadas, conforme tabela 5:

Tabela 5. Dados para construção da curva de calibração utilizada para análise de cátions pelo método cromatográfico.

Balão (25 mL)	Concentração diluição (g L^{-1})	Volume solução estoque diluída (mL)
0	3,1250	0,781
1	6,250	1,562
2	12,5	3,125
3	25,0	6,25
4	50,0	12,5

Após as diluições, foram filtrados 10 mL de cada concentração preparada, incluindo-se a solução estoque, com filtros Durapore $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ em frascos de vidro pequenos, devidamente identificados, para análise em Cromatógrafo de íons.

4.10.2. Ânions

As análises foram realizadas em um Cromatógrafo de íons modelo 930 Compact IC Flex com detector de condutividade, conforme metodologia desenvolvida pela IC Application Note N°.S-30 (EITH et al., 2006).

Foram utilizados 5 mL de amostra de mosto e vinho delevedurado, previamente diluída em uma proporção de 1/100. As amostras foram filtradas em unidades filtrantes Durapore $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ de porosidade. Em seguida, foram injetados $20 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra no Cromatógrafo de íons para a análise de ânions. Foi utilizado o seguinte sistema cromatográfico: coluna Metrohm MetrosepAnion Dual 1, o eluente foi a solução de Bicarbonato de Sódio 3,2 mM e Carbonato de Sódio 1mM, com fluxo de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$, sob 25°C , durante 28 minutos e solução de regeneração do supressor químico de 20 mM de H_2SO_4 .

Para a determinação dos ânions uma curva de resposta dos analitos (área) *versus* concentração dos padrões foi construída para verificar a linearidade do detector no intervalo de concentração escolhida (5 mg L^{-1} a 80 mg L^{-1}). Para o preparo da curva padrão, os padrões

foram preparados a partir de Cloreto de Sódio, Nitrito de Sódio, Nitrato de Potássio, Fosfato de Sódio e Sulfato de Sódio $\geq 99\%$ de pureza e as faixas de concentração utilizadas na curva padrão variaram de 5 mg L^{-1} a 80 mg L^{-1} .

Foi preparada uma solução estoque de 80 mg L^{-1} em um balão de 100 mL, do qual se deu a diluição para as concentrações desejadas, conforme Tabela 6:

Tabela 6. Dados para construção da curva de calibração utilizada para análise de ânions pelo método cromatográfico.

Balão (25 mL)	Concentração diluição (g L^{-1})	Volume solução estoque diluída (mL)
0	5,0	1,562
1	10,0	3,125
2	20,0	6,25
3	40,0	12,5

Após as diluições, foram filtrados 10 mL de cada concentração preparada, incluindo-se a solução estoque, com filtros Durapore $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ em frascos de vidro pequenos, devidamente identificados, para análise em Cromatógrafo de íons.

4.11. Rendimento fermentativo

O rendimento fermentativo foi calculado com base na concentração de açúcares redutores totais e na concentração de álcool no vinho delevedurado. Com base na relação estequiométrica da fermentação alcoólica, foi considerado que 100 % de rendimento ocorre quando há formação de 51,11 g (64,75 mL) de etanol a partir de 100 g de açúcares redutores totais.

4.12. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variância (ANOVA) pelo teste F e as médias comparadas no teste de Tukey ao nível de significância de 5% probabilidade ($p \leq 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas no programa SAS – Statistical Analysis System (SAS Institute, 1990).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Validação de metodologia cromatográfica para determinação de Açúcares por Cromatografia de íons.

Para o teste de seletividade, foram, inicialmente, identificados os picos cromatográficos de acordo com seu respectivo íon, observando seu tempo de retenção. Segundo Klein (2010), o tempo de retenção é diferente para cada analito e pode variar de acordo com a vazão e composição da fase móvel, o tipo de fase estacionária utilizada, entre outros fatores.

Desta forma, foi possível perceber que a seletividade e a resolução dos picos dos açúcares analisados, glicose, frutose e sacarose, não foram afetados quando foram feitas alterações de fluxo e temperatura na metodologia e somente obteve-se mudança no tempo de retenção, que aumentou conforme a temperatura e o fluxo de eluente diminuíram, conforme Figura 8. A resposta produzida pelo método para os analito foi capaz de distinguir cada açúcar analisado, tanto nos padrões demonstrados, quanto na matriz fortalecida, não aparecendo picos além dos comprovados nos cromatogramas apresentados na Figura 8.

Figura 8. Tempos de retenção do Glicerol, Glicose, Frutose e Sacarose em diferentes variações de metodologia.

(1): tempos de retenção dos padrões, 100 ppm, em condição de fluxo $0,9 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de 25°C ; (2): tempos de retenção dos padrões, 100 ppm, em condição cromatográfica de fluxo $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de 23°C ; (3): tempos de retenção dos padrões, 100 ppm, em condições de fluxo $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de 35°C ; (4): tempos de retenção de amostra de vinho fortalecida com padrão, 40ppm, em condições de fluxo $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de 23°C .

Esses resultados demonstraram seletividade do método, uma vez que não houveram alterações capazes de alterar a quantificação dos analitos no método utilizado, nem respostas distintas dos analitos entre as modificações testadas.

Resultados obtidos de limites de detecção (LD), limites de quantificação (LQ) e valores do coeficiente de correlação obtidos para o teste de linearidade são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Linearidade, limite de detecção e de quantificação, em mg L^{-1} , da sacarose, glicose e frutose para a validação da metodologia cromatográfica aplicada para carboidratos.

Parâmetro	Analitos		
	Sacarose	Glicose	Frutose
Linearidade	$r=0,9999$	$r=0,9997$	$r=0,9986$
LD (mg L^{-1})	0,4	1,4	2,7
LQ (mg L^{-1})	1,2	4,3	8,2

De acordo com a literatura sobre a validação de métodos analíticos, o coeficiente de correlação (r) deve ser superior a 0,99 para ser usado como critério de aceitação da linearidade da gama de trabalho utilizada (OLIVEIRA, 2006; ANVISA, 2003). Neste estudo, pode-se observar que o intervalo de trabalho apresentou excelente relação linear com o sinal analítico, devido aos valores de coeficiente de correlação muito próximos a 1, ($r=0,9999$; $r=0,9997$ e $r=0,9986$), para sacarose, glicose e frutose respectivamente, caracterizando uma correlação linear quase perfeita entre a área do pico e a concentração de cada analito, indicando confiabilidade da técnica para os três compostos.

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) encontrados para glicose, frutose e sacarose também foram satisfatórios, apresentando valores menores que 3 mg L^{-1} para LD e menores que 9 mg L^{-1} para LQ.

Se forem comparados os resultados de limite de detecção encontrados por Corrêa et al. (2013), que corresponderam a 3,6; 3,2 e $4,8 \text{ mg L}^{-1}$ para glicose, frutose e sacarose, respectivamente e limites de quantificação em torno de $12,00 \text{ mg mL}^{-1}$ para esses mesmos analitos, percebe-se que os resultados descritos na literatura apresenta limites de detecção próximos ao obtido neste trabalho, ainda que o sistema utilizado tenha sido a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de índice de refração, forno a 40°C e água ultrapura como fase móvel.

Já no trabalho apresentado por HANKO & ROHRER, (2000), o limite de detecção encontrado para sacarose foi de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$, igual ao limite de detecção obtido neste trabalho. Sendo que o sistema cromatográfico utilizado foi equivalente ao adotado nesta pesquisa. Tendo o caldo como matéria-prima para a fermentação, sendo utilizado para tal determinação o cromatógrafo de íons com detector amperométrico, eletrodo de trabalho de ouro e coluna de troca aniônica da marca Dionex.

Ainda comparando os resultados deste trabalho com a literatura, verifica-se semelhança dos resultados aqui encontrados com trabalho aqueles obtidos por BLANCO et al., (2004), onde os limites de detecção para glicose e frutose foram, respectivamente, 1 e $0,6 \text{ mg L}^{-1}$, quando da análise de cidra (fermentado de suco de maçã), em cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector Amperométrico e eluente com concentração de 20 mM de NaOH.

Desta forma pode-se dizer que a cromatografia iônica apresentou sensibilidade aceitável para quantificar e detectar as concentrações dos carboidratos apresentando valores condizentes com a literatura.

No tocante aos resultados de precisão e exatidão apresentados na Tabela 8, verifica-se que para a repetibilidade do método foi precisa para a quantificação dos compostos,

apresentado coeficientes de variação iguais a 15,38% $\pm$ 1,19, 8,43% $\pm$ 3,25 e 15,78% $\pm$ 2,82, para sacarose, glicose e frutose, respectivamente. De acordo com RIBANI et al., 2004 e ANVISA, 2016, coeficientes de variação até 20% são aceitos para a análise de precisão em amostras que possuem matriz complexa.

Tabela 8. Precisão e exatidão dos carboidratos testados na validação de metodologia cromatográfica.

Parâmetro	Analitos		
	Sacarose	Glicose	Frutose
Repetibilidade [DPR(%)]	15,38 ($\pm$ 1,19)	8,43 ($\pm$ 3,25)	15,78 ($\pm$ 2,82)
Exatidão (%)*	88,02 ($\pm$ 2,45)	108,9 ($\pm$ 10,55)	109,6 ($\pm$ 3,36)

[DPR(%)]: desvio padrão relativo, em %.

* média dos valores encontrados.

Os resultados obtidos para o teste de exatidão apresentados na Tabela 8, mostram que a recuperação dos compostos sacarose, glicose e frutose foram 88,02 ($\pm$ 2,45), 108,9 ($\pm$ 10,55) e 109,6 ($\pm$ 3,36), respectivamente. De acordo com a AMSTALDEN, 2010 e ANVISA, 2016, resultados de recuperação entre 80 – 110% são aceitáveis, atendendo assim o requisito necessário para que o método seja considerado exato para a determinação e quantificação dos açúcares sacarose, glicose e frutose.

Deste modo, com base nos resultados obtidos, considera-se que o método de cromatografia de íons, empregado neste estudo, apresentou resultados satisfatórios quanto à exatidão e a precisão analítica para os analitos de interesse.

Tabela 9. Parâmetros avaliados no teste de robustez para a metodologia cromatográfica aplicada aos carboidratos.

Parâmetro	Analitos		
	Sacarose	Glicose	Frutose
Robustez - Fluxo 0,9mL min ⁻¹ + 35°C	√	√	√
Robustez - Fluxo 1,0 mL min ⁻¹ + 23,5°C	√	√	√
Robustez - Fluxo 0,9mL min ⁻¹ + 25°C	√	√	√

√: indica que o método foi robusto para os parâmetros analisados.

Para as três variações analíticas apresentadas no trabalho e descritas na Tabela 9, os resultados de precisão para sacarose e frutose foram de 8% ($\pm$ 1,5%) para os testes com variação de fluxo de eluente 0,9 mL min⁻¹ + 35°C e 1,0 + 23,5 °C, e precisão de 2% ($\pm$ 0,7%) para o teste com fluxo de eluente de 0,9 mL min⁻¹ + 25°C. Para a glicose, os valores de precisão encontrados foram de 7% ($\pm$ 2,7%), 5,5% ($\pm$ 0,0%) e 1,5% (0,2%), para as combinações 0,9 mL min⁻¹ + 35°C; 1,0 + 23,5 °C e 0,9 mL min⁻¹ + 25°C, respectivamente.

A recuperação média para glicose e sacarose foi de 102,0% ($\pm 5,5\%$) e 98,5 ($\pm 0,5\%$) para as combinações de fluxo de eluente de $0,9\text{mL min}^{-1} + 35^\circ\text{C}$ e $0,9\text{mL min}^{-1} + 25^\circ\text{C}$, respectivamente, enquanto para frutose, a recuperação média das três combinações foi de 102,5% ($\pm 4,9\%$).

Além de tais valores, os coeficientes de correlação (r) das curvas analíticas encontradas apresentaram valores próximos a 1, sendo para as três combinações (fluxo de eluente + temperatura), iguais a 0,999.

As pequenas variações sofridas no tempo de retenção não foram capazes de alterar a qualidade do método estudado, uma vez que apresentaram precisão e exatidão dentro dos limites descritos por RIBANI et al., (2004) e ANVISA, (2016).

Desta forma, o método cromatográfico em estudo para utilização em fermentações alcoólicas pode, satisfatoriamente, ser aplicado para determinação dos carboidratos sacarose, glicose e frutose de forma precisa, exata e robusta.

5.2. Ensaio de fermentação

Na Tabela 10 são apresentados os resultados da caracterização do mosto que foram encontrados no início do ensaio de fermentação. Verifica-se que os teores de sólidos solúveis nos mostos dos três tratamentos foram 15,8 °Brix. Contudo, os resultados de pH encontrados nos três tratamentos avaliados foram diferentes entre si. Esses foram 5,3; 5,63 e 5,52 para os mostos obtidos a partir de caldo, de xarope e misto (caldo + xarope), respectivamente.

Tabela 10. °Brix e pH dos mostos utilizados na fermentação alcoólica.

Tratamento	Mosto	Repetições	°Brix	pH
1	Caldo	5	15,8	5,30
2	Xarope	5	15,8	5,63
3	Misto (caldo + xarope)	5	15,8	5,52

No início da fermentação, os mostos foram submetidos à análise cromatográfica para quantificação dos teores de carboidratos presentes no meio.

5.3. Determinação de açúcares por cromatografia de íons (IC) x método de DNS

5.3.1. Curvas analíticas IC e DNS

Antes de iniciar as análises foi necessário determinar o intervalo de concentração a ser utilizado, a fim de se obter a curva analítica, conforme descrito nos itens 4.5.1 e 4.8., onde foi possível construir as curvas padrões utilizadas para quantificação dos analitos de interesse a partir da equação linear resultante.

Na Figura 9 é possível observar a curva analítica obtida das leituras em espectrofotômetro a 540nm, a partir do padrão de glicose preparado, conforme indicado na Tabela 2, demonstrada no item 4.5.1.

Figura 9. Curva analítica obtida para análise de açúcares por DNS.

Os valores obtidos em %T foram convertidos em absorbância pela seguinte fórmula:

$$\text{Abs} = 2 - \log\left(\frac{\%T}{100}\right) \quad \text{Equação 9}]$$

Desta forma foram obtidos os valores de absorbância para cada concentração (0,0 g L⁻¹ a 1 g L⁻¹) e assim identificada a equação da curva para quantificação dos açúcares nas amostras. A equação da reta, coeficiente de correlação e o coeficiente de variação da curva analítica podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11. Equação do gráfico analítico, coeficiente de correlação e coeficiente de variação (%) para análise de carboidratos por DNS.

Analito	Equações	Coeficientes de correlação (r)	CV (%)
Glicose	$Y = 0,3881X$	0,994	0,14

Foi possível obter uma excelente relação linear, visto o resultado do coeficiente de correlação observado, $r=0,9938$, para a equação de reta ($y=0,3881x$), o que segundo Brito et al., (2003), é considerada uma correlação fortíssima, pois apresentou R entre 0,91 e 0,99.

Para a análise cromatográfica, a quantificação foi feita baseando-se nas curvas de calibração de soluções padrão, construída a partir de picos cromatográficos, onde a área sob cada pico foi proporcional à concentração do componente em questão.

Para a determinação de açúcares foram analisados os açúcares glicose, frutose e sacarose. As curvas padrões podem ser verificadas na Figura 10.

Figura 10. Curvas analíticas dos açúcares glicose, frutose e sacarose obtidas pela análise cromatográfica.

Na Tabela 12, verifica-se que as equações de reta, os coeficientes de correlação e os desvios padrões relativos dos três açúcares quantificados no presente trabalho, glicose, frutose e sacarose por cromatografia iônica.

Tabela 12. Equações de reta das curvas da figura 10, coeficientes de correlação e coeficiente de variação (%) para análise de carboidratos por cromatografia de íons.

Analito	Equações	Coeficientes de correlação (r)	CV (%)
Glicose	$Y = -1,20377 + 2,35923x$	0,999	0,90
Frutose	$Y = -3,42185 + 1,74520x$	0,999	3,62
Sacarose	$Y = -3,63321 + 1,33735x$	0,999	3,01

Foi observado uma excelente relação linear para os três analitos, visto a ótima correlação apresentada pelas três curvas analíticas, iguais a 0,999, o que de acordo com Brito et al., (2003), é considerada uma correlação fortíssima, quase perfeita. Com este resultado, o método avaliado indicou uma forte linearidade.

Os coeficientes de variação das três curvas analíticas também foram ótimos, visto seus valores baixos, iguais a 0,90%, 3,62% e 3,01% para glicose, frutose e sacarose, o que segundo PIMENTEL-GOMES (1985) citado por GARCIA, (1989) é um coeficiente considerado baixo.

Com as curvas analíticas prontas e consideradas ótimas, as amostras de vinho e mosto foram submetidas então à análise por DNS e por cromatografia, resultando nos teores de açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART) abaixo apresentados nas Tabelas 13, 14, 16 e 16.

5.3.2. Açúcares no mosto e vinho por IC e DNS

5.3.2.1. Açúcares redutores (AR) no mosto

Na Tabela 13, são demonstrados os resultados de açúcares redutores totais obtidos nas análises dos mostos utilizados para a fermentação, através da análise cromatográfica e pela metodologia do DNS. Analisando a referida tabela é possível verificar que, a diferença apresentada entre as amostras de mosto dentro de uma mesma técnica já era esperada, uma vez que apresentam composição de açúcares e nutrientes diferentes. As amostras de caldo e xarope diferiram entre si ($p \leq 0,01$) quando analisadas por cromatografia, apresentando valores de 24,00 ($\pm 3,15$) g L⁻¹ e 20,63 ($\pm 0,49$) g L⁻¹, respectivamente, enquanto a amostra de mosto

misto, com teor de $23,22 (\pm 0,23) \text{ g L}^{-1}$, não diferiu das amostras de caldo e xarope. A variação máxima de concentração obtida entre as amostras na metodologia cromatográfica foi de $2,38 \text{ g L}^{-1}$.

Tabela 13. Teores de açúcares redutores (glicose e frutose) presentes no mosto de fermentação, composto por caldo, xarope e misto (caldo + xarope).

AR – açúcares redutores	Metodologia		F	°Brix
	MOSTO	IC (g L^{-1})	DNS (g L^{-1})	
Mosto de Caldo		24,00 ($\pm 3,15$) Aa	23,18 ($\pm 1,58$) aC	29,16 **
Mosto de Xarope		20,63 ($\pm 0,49$) Bb	35,14 ($\pm 0,97$) aA	15,8
Mosto Misto		23,22 ($\pm 0,23$) bAB	29,75 ($\pm 1,29$) aB	15,8

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem ao teste de Tukey a 5% de significância.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem ao teste de Tukey a 5% de significância

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

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

Média de 3 repetições por bloco

No que diz respeito às análises dos açúcares redutores pelo método do DNS, verifica-se que as amostras dos três tratamentos apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,01$) entre si, correspondendo a $23,18 (\pm 1,58) \text{ g L}^{-1}$, $35,14 (\pm 0,97) \text{ g L}^{-1}$ e $29,75 (\pm 1,29) \text{ g L}^{-1}$, respectivamente para os mostos de caldo, xarope e misto, com variação máxima de concentração entre as amostras de $8,46 \text{ g L}^{-1}$.

Os resultados das análises dos mostos elaborados a partir de caldo não demonstraram diferenças significativas entre as metodologias aplicadas, resultando em concentrações de açúcares redutores de $24,00 (\pm 3,15) \text{ g L}^{-1}$ e $23,18 (\pm 1,58) \text{ g L}^{-1}$ através da cromatografia iônica e do DNS, respectivamente.

Por outro lado, os resultados dos teores de açúcares redutores dos mostos obtidos a partir de xarope e misto (caldo + xarope) apresentaram diferenças significativas ($p \leq 0,01$) entre as duas metodologias utilizadas. Foram observados resultados de $20,63 (\pm 0,49) \text{ g L}^{-1}$ e $23,22 (\pm 0,23) \text{ g L}^{-1}$ nas amostras de mostos de xarope e misto, através da análise de cromatografia de íons e $35,14 (\pm 0,97) \text{ g L}^{-1}$ e $29,75 (\pm 1,29) \text{ g L}^{-1}$ nas amostras de mosto de xarope e misto, através de análises pelo método de DNS.

Nos tratamentos em que os resultados das análises de açúcares redutores diferiram estatisticamente entre as duas metodologias utilizadas. As análises através do método de DNS revelaram resultados de açúcares redutores 70% e 28% maiores, nas amostras de mostos de xarope e misto, respectivamente, do que os valores encontrados na cromatografia de íons.

Os açúcares redutores (AR) no meio fermentativo são representados pelas moléculas de frutose e glicose, que na metodologia convencional é quantificado pela leitura da % de transmitância da amostra. Os açúcares sofrem redução através do agente oxidante ácido 3,5-dinitrosalicílico, gerando um composto corado (ácido 3-amino-5-nitrosalicílico) (ODELI E TAVARES, 1994; SAQIB e WHITNEY, 2011).

A presença de impurezas e outras substâncias degradadas no meio é capaz de alterar a coloração do meio, assim como diferentes açúcares no meio podem produzir diferentes intensidades na coloração desenvolvida pela reação (HONIG, 1953 e DELGADO; CESAR, 1977 citado por HAMERSKI, 2009, MILLER, 1959). Portanto, infere-se que, possivelmente, as diferenças observadas nos resultados das análises a partir de DNS possam ser pelos motivos expostos anteriormente. Como a metodologia de DNS é uma técnica colorimétrica, o fato das amostras de mosto de xarope e misto apresentarem uma coloração mais intensa, pode explicar os resultados diferentes, uma vez que esta técnica está ligada ao controle do comprimento de onda da luz incidente na amostra, indicando a razão entre a intensidade da luz incidente e a luz que conseguiu, de fato, atravessar a amostra.

5.3.2.2. Açúcares redutores totais (ART) no mosto

Na Tabela 14 são demonstrados os resultados obtidos das análises de açúcares redutores totais nos mostos das fermentações dos três tratamentos (caldo, xarope e misto) realizadas por cromatografia de íons e pela metodologia convencional, DNS.

Tabela 14. Teores de açúcares redutores totais (glicose, frutose e sacarose) presentes no mosto de fermentação, composto por caldo, xarope e misto (caldo + xarope).

ART –				
Açúcares	Metodologia			
redutores totais				
MOSTO	IC (g L ⁻¹)	DNS (g L ⁻¹)	F	°Brix
Mosto de Caldo	146,26 (±1,53) aB	107,75 (±3,19) bB	18,31 **	15,8
Mosto de Xarope	148,61 (±3,62) aAB	115,90 (±10,41) bAB		15,8
Mosto Misto	158,35 (±4,67) aA	134,53 (±8,33) bA		15,8

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem ao teste de Tukey a 5% de significância.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem ao teste de Tukey a 5% de significância

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

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

Média de 3 repetições por bloco.

Os resultados das análises de açúcares redutores totais obtidos através das duas metodologias estudadas diferiram estatisticamente entre si ($p \leq 0,01$). Os resultados demonstraram concentrações de $146,26 (\pm 1,53) \text{ g L}^{-1}$, $148,614 (\pm 3,62) \text{ g L}^{-1}$ e $158,36 (\pm 4,67) \text{ g L}^{-1}$, nos mostos de caldo, xarope e misto, respectivamente, quando analisados por cromatografia iônica; por outro lado, $107,75 (\pm 3,19) \text{ g L}^{-1}$, $115,90 (\pm 10,41) \text{ g L}^{-1}$ e $134,53 (\pm 8,33) \text{ g L}^{-1}$ nos mostos de caldo, xarope e misto, quando analisados através da metodologia convencional.

Os resultados de açúcares redutores totais nos três tratamentos foram semelhantes entre si, quando as análises foram feitas por cromatografia de íons. A variação média dos resultados foi de $12,09 \text{ g L}^{-1}$. O mesmo comportamento de resultados foi observado quando os resultados foram obtidos para análise de DNS nos mostos dos três tratamentos. Contudo, a variação foi de $26,78 \text{ g L}^{-1}$. Esses resultados indicam que a análise por cromatografia de íons é mais precisa do que pela análise pelo método de DNS.

Os métodos tradicionais usados para quantificação de açúcares redutores totais se fundamentam principalmente na hidrólise dos compostos pela adição de ácido, porém, ao se manter o meio reacional com pH 4 ou menor, pode ocorrer a formação de compostos como hidroximetilfurfural, o quais podem promover interferências na quantificação dos açúcares totais ou ainda quantificação destes como sendo um açúcar total (TREVELYAN & HARRISON, 1952 citado por SILVA et al., 2003; BORGES et al., 1987).

As análises realizadas por cromatografia de íons demonstraram resultados mais confiáveis do que as análises realizadas pelo método de DNS. Isto porque os resultados da quantificação dos teores de AR e ART, através da cromatografia de íons, apresentaram menores desvios padrão. Demonstrando boa reprodutibilidade, assim como uma menor variação entre as concentrações de AR e ART.

A importância de análises precisas para determinações quantitativas dos açúcares em mostos é imprescindível para cálculo do rendimento fermentativo. Além disso, para definir o momento exato do término da fermentação. Valores menores ou maiores do que os reais acabam influenciando diretamente nestes cálculos, uma vez que utilizam os teores de ART para estimativa, conforme a equação a seguir descrita por Tonoli, (2017):

$$\text{Rendimento da fermentação} = \frac{\text{Teor de álcool produzido (\%m/m)}}{\text{teor de ART (\%)} \times 0,5111} \quad \text{equação 10}$$

Os resultados obtidos para rendimento fermentativo estão expressos no item 5.3.2.4.

5.3.2.3. Açúcares redutores e açúcares redutores totais no vinho delevedurado

Os resultados dos teores de AR e ART nos vinhos delevedurados são demonstrados nas Tabelas 15 e 16, tanto para as análises cromatográficas quanto para análise por DNS.

Tabela 15. Teores de açúcares redutores (glicose e frutose) presentes no vinho delevedurado, após fermentação de mosto de caldo, xarope e misto (caldo + xarope).

AR – açúcares redutores	Metodologia		F
	IC (g L ⁻¹)	DNS (g L ⁻¹)	
VINHO			
Caldo	0,197 (±0,04) bB	0,352 (±0,14) aC	73,67 **
Xarope	0,283 (±0,12) bA	0,811 (±0,03) aA	
Misto	0,259 (±0,08) bA	0,572 (±0,03) aB	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem ao teste de Tukey a 5% de significância.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem ao teste de Tukey a 5% de significância

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

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

Média de 15 repetições por bloco.

Comparando-se os resultados obtidos através das análises por cromatografia e por DNS, observa-se diferença estatística significativa (p≤0,01) entre as metodologias para os três tratamentos.

Os resultados observados através da análise das amostras de vinhos de caldo, xarope e misto por cromatográfica de íons foram 0,197 (±0,04) g L⁻¹, 0,283 (±0,12) g L⁻¹ e 0,259 (±0,08) g L⁻¹, respectivamente. Já os resultados encontrados ao se analisarem esses vinhos através do método de DNS foram de 0,352 (±0,14) g L⁻¹, 0,811 (±0,03) g L⁻¹ e 0,572 (±0,03) g L⁻¹.

As diferenças de concentração de açúcares redutores observadas entre as metodologias para cada tratamento foram de 0,155 g L⁻¹, 0,528 g L⁻¹ e 0,313 g L⁻¹ nos vinhos obtidos a partir de caldo, xarope e misto, respectivamente.

Os resultados de teores de AR obtidos utilizando o método de DNS foram 78%, 186% e 120% maiores do que os resultados encontrados através das análises por IC, nos mostos fermentados obtidos a partir de caldo, xarope e misto, respectivamente.

No que diz respeito aos teores de AR do vinho, quando se analisa os resultados obtidos entre os tratamentos pelas duas metodologias empregadas, observa-se que utilizando a metodologia cromatográfica foi verificada diferença significativa somente no vinho proveniente do caldo em relação aos vinhos de xarope e misto. Por outro lado, os resultados

obtidos através da metodologia convencional, diferiram estatisticamente ($p \leq 0,01$) entre si nos três tratamentos.

Esperava-se concentrações de açúcares residuais, no vinho, próximas a zero. Porém, ao encontrar pequenos teores no vinho, pode-se dizer que isso pode ser devido à presença de substâncias redutoras infermentescíveis, principalmente quando utilizadas grandes proporções de melaço (RIBEIRO et al., 1999) ou ainda, que as leveduras não haviam consumido completamente os açúcares do meio.

Tabela 16. Teores de açúcares redutores totais (glicose, frutose e sacarose) presentes no vinho de levedurado, após fermentação de mosto de caldo, xarope e misto (caldo + xarope).

ART – açúcares redutores totais		Metodologia	
VINHO	IC (g L ⁻¹)	DNS (g L ⁻¹)	F
Caldo	0,231 ($\pm 0,05$) bB	0,389 ($\pm 0,04$) aC	80,42 **
Xarope	0,358 ($\pm 0,09$) bA	1,521 ($\pm 0,20$) aA	
Misto	0,335 ($\pm 0,09$) bA	0,906 ($\pm 0,21$) aB	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem ao teste de Tukey a 5% de significância.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem ao teste de Tukey a 5% de significância

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

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

Média de 15 repetições por bloco.

Comparando os resultados obtidos, verifica-se que há diferença estatística significativa ($p \leq 0,01$) entre as metodologias para os três tratamentos.

Os resultados de ART obtidos nos vinhos de caldo, xarope e misto nas análises cromatográficas foram 0,231 ($\pm 0,05$) g L⁻¹, 0,358 ($\pm 0,09$) g L⁻¹ e 0,335 ($\pm 0,19$) g L⁻¹, enquanto que na metodologia convencional os teores obtidos de ART foram 0,389 ($\pm 0,04$) g L⁻¹, 1,521 ($\pm 0,20$) g L⁻¹ e 0,906 ($\pm 0,21$) g L⁻¹.

No que diz respeito aos teores de ART do vinho, quando analisamos os resultados das metodologias, temos na cromatografia diferença significativa somente do caldo em relação ao xarope e misto, enquanto no método convencional, os resultados diferiram estatisticamente ($p \leq 0,01$) entre si para os três tratamentos.

Para a técnica cromatográfica, os valores de desvio padrão foram satisfatórios, porém para a técnica convencional os valores de desvio padrão apresentaram-se elevados quando comparados esses ao valor médio obtido, indicando baixa reprodutibilidade dos resultados.

Os resultados obtidos utilizando o DNS foram 68%, 324% e 186% maiores do que quando analisados por IC, nas amostras de vinho de caldo, xarope e misto, respectivamente.

Essas diferenças, tanto para os teores de AR quanto para os de ART mostram a necessidade do uso de uma metodologia capaz de detectar e quantificar analitos separadamente, em baixas concentrações, de maneira mais precisa.

A metodologia convencional, por ser uma técnica colorimétrica pode apresentar algumas desvantagens para ser aplicada em uma usina quando comparadas a cromatografia, como o preparo das amostras para análise, que necessita de hidrólise e posterior neutralização quando da análise de ART, dificultando assim sua realização, pois em um número elevado de amostras acaba demandando um tempo maior. A cromatografia, por ser uma técnica de separação, permite quantificar diversos compostos em uma única corrida. Além disso, destaca-se no preparo de amostra, pois necessita somente de uma diluição e filtração, em curto intervalo de tempo.

Fatores como espectrofotômetro e vidrarias descalibrados, interferência de luz ou ainda a geração de efluentes tóxicos são as grandes desvantagens na utilização da metodologia convencional.

5.3.2.4. Teor alcoólico e rendimento fermentativo

O teor alcoólico dos vinhos foi obtido após destilação e análise em densímetro. O resultado obtido da densidade foi transformado em °GL (%v/v) utilizando uma tabela de conversão de densidade. Este valor em °GL foi ainda multiplicado pela densidade do álcool, $0,78932 \text{ g cm}^{-3}$ e então multiplicado por 10, para obtenção do teor alcoólico em g L^{-1} .

Na Tabela 17 é possível observar os teores alcoólicos obtidos para os três tratamentos, caldo, xarope e misto, assim como os valores teóricos obtidos de acordo com os teores de açúcares analisados por IC e por DNS.

Tabela 17. Teor alcoólico do vinho de levedurado, após fermentação de mosto de caldo, xarope e misto (caldo + xarope) obtido pela leitura em densímetro digital.

Vinho	Teor Alcoólico obtido (g L^{-1}) *	Teor alcoólico	Teor alcoólico teórico
		teórico (g L^{-1}) – IC ¹	(g L^{-1}) – DNS ²
Caldo	67,11 ($\pm 3,25$)	74,74 ($\pm 0,77$)	55,06 ($\pm 1,63$)
Xarope	63,27 ($\pm 3,72$)	75,94 ($\pm 1,85$)	59,22 ($\pm 5,32$)
Misto	62,03 ($\pm 4,33$)	80,92 ($\pm 2,38$)	68,74 ($\pm 4,26$)

*média de 15 repetições por tratamento

¹ teor alcoólico teórico calculado a partir do teor de açúcar obtido pela cromatografia iônica

² teor alcoólico teórico calculado a partir do teor de açúcar obtido pela metodologia convencional do DNS

Com os valores de teor alcoólico obtido e teor alcoólico teórico calculados a partir da quantificação de açúcares por cromatografia e por DNS, foi possível avaliar o rendimento fermentativo nas amostras a partir dos dois métodos (Tabela 18).

Tabela 18. Rendimento da fermentação alcoólica, calculada a partir dos teores do teor alcoólico obtido e do teor alcoólico teórico, a partir da metodologia cromatográfica e convencional.

Rendimento de fermentação	Metodologia		
	IC (%) *	DNS (%) *	F
Caldo	89,79 ($\pm 4,34$) bA	121,88 ($\pm 5,91$) aA	21,55**
Xarope	83,32 ($\pm 4,85$) bB	106,82 ($\pm 6,28$) aB	21,55**
Misto	76,65 ($\pm 5,35$) bC	90,23 ($\pm 6,30$) aC	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem ao teste de Tukey a 5% de significância.

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna diferem ao teste de Tukey a 5% de significância

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

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

*média de 15 repetições por tratamento

Os resultados obtidos nas amostras de vinho diferiram significativamente ($p \leq 0,01$) dentro de cada tratamento e em cada tratamento. Os resultados de rendimento de fermentação alcançados para fermentação quando utilizados os teores de açúcar pela cromatografia foram satisfatórios, correspondendo a 89,79% ($\pm 4,34\%$), 83,32% ($\pm 4,85\%$) e 76,65% ($\pm 5,35\%$).

Os resultados de rendimento fermentativo encontrados quando utilizados os teores de açúcar encontrados por DNS não foram aceitáveis, uma vez que apresentaram-se acima de 100%, sendo 121,88% ($\pm 5,91\%$) para o caldo e 106,82% ($\pm 6,28\%$) para o xarope. A exceção se dá pelo resultado obtido para o tratamento misto, que obteve eficiência de 90,23% ($\pm 6,30\%$).

É de suma importância a precisão das medidas analíticas dos teores de etanol e açúcar, vista a necessidade destes para o cálculo do rendimento fermentativo (FERNANDES, 2011), e tal afirmação pode ser compreendida com os resultados aqui apresentados.

Segundo Lima et al. (2001), um bom rendimento da fermentação deve atingir um valor da ordem de 90%-92% do rendimento estequiométrico, equivalendo a 0,46 – 0,47 g etanol g açúcar⁻¹.

Andrietta e Stuppiello, (1990) observaram em estudo, um rendimento de etanol igual a 87,1% ao estudarem a fermentação alcoólica do caldo de cana. Em trabalho de Daugulis e Swaine, (1987) citado por Ferrari, (2013), assumiram-se valores de rendimentos como sendo 83,2%.

Os rendimentos apresentados no presente trabalho estão de acordo com a literatura, dentro dos valores encontrados, com exceção dos rendimentos calculados para caldo e xarope, quando medidos a partir do DNS, que equivaleram a mais de 100%.

Neste sentido, foram observados resultados satisfatórios quando analisamos os valores obtidos através da metodologia cromatográfica, os quais resultaram em dados mais concretos, precisos e de acordo com a literatura encontrada.

5.3.2.5. Viabilidade celular, brotamento e população de *Saccharomyces cerevisiae*

Os resultados encontrados nas análises de viabilidade celular são demonstrados na Tabela 20 e dizem respeito às viabilidades de células de leveduras no início da fermentação, durante a fermentação e ao término da fermentação. A viabilidade inicial do inóculo utilizado foi de 83%, valor este considerado para a correção dos 3% da quantidade pesada para fermentação. Os resultados não apresentaram diferenças significativas entre as médias de viabilidade celular das leveduras nos mostos durante a fermentação e corresponderam à 75,8%, 84,5% e 80,1%. No final das fermentações, as viabilidades celulares foram 78,5%, 86,5% e 85% para mostos obtidos a partir de caldo, xarope e misto, quando analisada a viabilidade no decorrer da fermentação.

Tabela 19. Viabilidade celular (%) inicial, intermediária medida durante a fermentação e final, ao término da fermentação.

Tratamento	Viabilidade Inicial	Viabilidade Intermediária	Viabilidade Final
Caldo	83,0% a	75,8% a	78,5% a
Xarope	83,0% a	84,5% a	86,5% a
Misto	83,0% a	80,1% a	85,0% a

F = 0.9585 ns

ns: não significativo ($p \geq 0,05$)

A viabilidade celular variou de 75,8 a 86,5%, apresentando média de 82,15%. A maior viabilidade determinada foi a da fermentação com mosto de xarope e a menor a com mosto de caldo.

Em trabalho descrito por Tonoli, (2017), foram encontradas viabilidades de 82,83% e 85,97% durante a fermentação com teores médios de ART de 136,64 g L⁻¹ e 165,44 g L⁻¹.

De acordo com Lopes (2015), no processo industrial de produção de etanol não são desejadas fermentações com viabilidade acima de 85%, isso porque maiores viabilidades tendem à maior produção de biomassa e consequentemente à menor produtividade de etanol. Desta forma, pode-se afirmar que a viabilidade encontrada no trabalho foi satisfatória, visto que o teor máximo se encontra dentro do limite descrito por Lopes, (2015), sendo 86,50% e ainda similar ao encontrado na literatura.

Serra et al., (1980) citado por Cherubin, (2003) avaliaram as condições de controle de fermentação e determinaram que há uma correlação positiva entre a viabilidade da levedura e o rendimento fermentativo, mostrando a necessidade de controle sobre os fatores que influenciam na viabilidade celular.

5.4. Determinação de ácidos orgânicos por cromatografia iônica (IC) e pela metodologia convencional (titulação)

Alguns ácidos orgânicos estão presentes na cana e alguns são produzidos durante o processamento do caldo, devido a degradação dos açúcares no meio ou pela presença de microrganismos (DOHERTY & RACKEMANN, 2008 citado por HAMERSKI, 2009).

Durante a fermentação, os microrganismos do meio podem competir com as leveduras por nutrientes, produzindo ácidos orgânicos, aumentando a toxicidade do meio, reduzindo o pH do meio fermentativo e reduzindo assim a capacidade produtiva da levedura (ALMEIDA, 2014)

Na Tabela 21 são apresentados os resultados obtidos nas análises de ácidos orgânicos por cromatografia e por titulação, dos três tratamentos utilizados nos ensaios de fermentação alcoólica, mosto de caldo, de xarope e misto (caldo + xarope).

Tabela 20. Teores de ácidos orgânicos (g L^{-1}) presentes nos mostos utilizados nos ensaios de fermentações, determinados por cromatografia iônica e por titulação.

Mosto	Metodologia		
	IC (g L^{-1})	Convencional Titulação (g L^{-1})	F
Caldo	0,50 ($\pm 0,00$) bC	0,55 ($\pm 0,04$) aC	49,94**
Xarope	1,07 ($\pm 0,02$) bA	1,19 ($\pm 0,01$) aA	
Misto	0,80 ($\pm 0,01$) bB	1,07 ($\pm 0,00$) aB	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem ao teste de Tukey a 5% de significância.

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

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

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

Média de 15 repetições por bloco

No que diz respeito aos mostos, os resultados das análises diferiram significativamente ($p \leq 0,01$) tanto entre os tratamentos dentro de uma mesma metodologia, quanto entre as metodologias, mesmo apresentando resultados próximos.

Os valores obtidos nas análises cromatográficas dos mostos foram $0,50 (\pm 0,00) \text{ g L}^{-1}$, $1,07 (\pm 0,02) \text{ g L}^{-1}$ e $0,80 (\pm 0,01) \text{ g L}^{-1}$, nas amostras de mostos obtidos a partir de caldo, xarope e misto, enquanto para o método convencional foram $0,55 (\pm 0,04) \text{ g L}^{-1}$, $1,19 (\pm 0,01) \text{ g L}^{-1}$ e $1,07 (\pm 0,00) \text{ g L}^{-1}$, para os mesmos mostos.

As diferenças de resultados podem ser explicadas pelas diferenças nas composições dos materiais e pela origem dos materiais, uma vez que foram coletados em propriedades distintas e em épocas diferentes e desta forma, passaram por tratamentos distintos.

As composições químicas do melaço e do caldo de cana dependem muito da cana utilizada, onde a composição da cana-de-açúcar pode variar dentro de uma mesma região. Esta variação na composição química da cana-de-açúcar ocorre quantitativamente e é extremamente variável, de acordo com as propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, o estágio de maturação da cana, com a irrigação-fertilizada (vinhaça) e com muitos outros fatores (SANTOS, 2008b).

A composição de ácidos do mosto misto foi de acordo com o esperado, levando em consideração os resultados obtidos para o caldo e o xarope, uma vez que é composto de caldo mais xarope, na proporção de 1/1.

Diferenças apresentadas podem estar ligadas ao tipo de método, uma vez que a metodologia titulométrica pode apresentar variações de resultados, pois depende do analista, que tem sua própria percepção do "ponto de viragem da cor", ou devido aos equipamentos de medição de pH e vidrarias volumétricas descalibrados.

Os desvios padrões observados para as duas metodologias foram baixos, se comparados às concentrações de ácidos encontradas. Desta forma, a metodologia cromatográfica apresenta-se em vantagem quando comparada com a titulação, pois é capaz de detectar os analitos separadamente, mais rapidamente, de forma automatizada e padronizada, permitindo assim que o analista possa realizar outras atividades concomitantemente ao funcionamento do cromatógrafo e que as diferenças de resultados para a mesma amostra, obtidos através de diferentes analistas é pequena.

Resultados satisfatórios também foram encontrados nas análises dos ácidos orgânicos no vinho de levedurado. Esses são demonstrados na Tabela 22.

Tabela 21. Teor de ácidos orgânicos presentes nos vinhos de levedurados ao final da fermentação alcoólica, quantificados por cromatografia iônica e por titulação.

Vinho	Metodologia		
	IC (g L ⁻¹)	Titulação (g L ⁻¹)	F
Caldo	4,13(±0,78) aA	3,86 (±0,42) aA	13,91**
Xarope	4,02(±0,53) aA	3,33(±0,36) aA	
Misto	2,27(±0,31) bB	3,15(±0,47) aB	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem ao teste de Tukey a 5% de significância.

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

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

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

Média de 15 repetições por bloco

Os resultados obtidos nos vinhos obtidos a partir do caldo ou do xarope não apresentaram diferenças significativas tanto entre a técnica cromatográfica e a convencional, tanto quando comparadas dentro da mesma técnica analítica, enquanto o vinho proveniente do mosto misto (caldo + xarope) apresentou diferença estatística ($p \leq 0,01$) entre as técnicas e entre os vinhos de caldo e xarope.

Os resultados observados nas análises em IC foram de 4,13 (±0,78) g L⁻¹, 4,02 (±0,53) g L⁻¹ e 2,27 (±0,31) g L⁻¹ nos mostos obtidos a partir de caldo, xarope e misto, respectivamente, enquanto os resultados por titulação apresentaram valores de 3,86 (±0,42) g L⁻¹, 3,33(±0,36) g L⁻¹ e 3,15(±0,47) g L⁻¹ nos mostos obtidos a partir de caldo, xarope e misto, nesta ordem.

Os três tratamentos apresentados tiveram predominância de ácido succínico e acético em sua composição, equivalendo a 78,6%, 71,9% e 65,7% das concentrações de ácidos

nocaldo, xarope e misto, respectivamente, quando submetidos às análises por cromatógrafo de íons.

Em trabalho realizado por Tonoli, (2017), os teores de ácido succínico e acético, encontrados ao final da fermentação, para mosto de xarope com 14,9° Brix foram de 1,42 g L⁻¹ e 1,27 g L⁻¹, respectivamente. Quando comparado com os resultados de trabalho, observa-se resultados similares tanto nos mostos a partir do caldo quanto para o xarope, com valores de 1,754 g L⁻¹ e 1,493 g L⁻¹ no vinho de caldo e 1,282 g L⁻¹ e 1,607 g L⁻¹ no vinho de xarope, para ácido succínico e acético, respectivamente.

A formação de ácidos orgânicos é uma resposta das leveduras ao estresse osmótico ocorrido quando se trabalha com altas concentrações de açúcares ou sais no mosto. Dos ácidos formados, o ácido succínico costuma ser o de maior expressão, atuando principalmente como agente antibacteriano natural em ação conjunta com o etanol (BASSO et al., 1997; PACHECO, 2012).

5.5. Determinação dos teores de cátions e ânions por cromatografia iônica

5.5.1. Teores de cátions

Os teores de cátions foram quantificados através da análise cromatográfica, em cromatógrafo de íons. Nas Tabelas 23, 24 e 25, é possível observar os resultados obtidos das análises realizadas nos mostos e nos vinhos obtidos a partir de caldo de cana-de-açúcar, xarope e misto (caldo + xarope).

Tabela 22. Teores de sódio, potássio, magnésio e cálcio do mosto a partir de caldo de cana-de-açúcar e do vinho centrifugado, obtidos das análises por cromatografia iônica.

CALDO	Cátions			
	Sódio (mg L ⁻¹)	Potássio (mg L ⁻¹)	Magnésio (mg L ⁻¹)	Cálcio (mg L ⁻¹)
Mosto	775,82	18292,04	1186,29	377,28
	(±26,6) b	(±403,5) a	(±92,4) a	(±63,2) a
Vinho	1085,18	21082,87	1330,77	468,54
	(±43,2) a	(±702,7) a	(±210,9) a	(±84,9) a
F	139,06 **	0,30 ns **	1,30 ns	3,07 ns

Letras minúsculas 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 para cada tratamento.

Média de 15 repetições por bloco

Os teores de sódio e potássio obtidos no mosto e no vinho de caldo apresentaram diferenças estatísticas significativas ($p \leq 0,01$). Os resultados de sódio obtidos foram 775,82 ($\pm 26,6$) mg L⁻¹ e 1085,18 ($\pm 43,2$) mg L⁻¹ no mosto e no vinho, respectivamente. Os teores de potássio encontrados foram, 18292,04 ($\pm 403,5$) mg L⁻¹ e 21082,87 ($\pm 702,7$) mg L⁻¹, no mosto e no vinho, respectivamente.

Os teores sódio e potássio obtidos no vinho sofreram aumento na participação da quantidade proporcional presente no meio de 39.8% e 14.5%, respectivamente.

No que diz respeito aos teores de magnésio e cálcio do mosto e do vinho a partir do caldo, as diferenças não foram significativas.

Dos constituintes inorgânicos presentes no caldo, o potássio é o mineral mais abundante e aquele que pouco é afetado durante o processo de clarificação do caldo (BAYMA, 1974; DELGADO e CESAR, 1989). Sua presença no meio fermentativo está ligada a várias reações da glicólise e em outros passos do metabolismo, como a absorção de outros íons pela levedura (LOPES, 1989). Em trabalho de ROTHSTEIN & DEMIS, (1953 citado por LOPES, 1989), foi observado que a presença de K⁺ no meio pode aumentar em 83% a quantidade de açúcar consumido. Os valores de desvio padrão, $\pm 403,5$ mg L⁻¹ e $\pm 702,7$ mg L⁻¹ foram excelentes, assim como o coeficiente de variação, 2,21% e 3,33%, nas amostras de mosto e vinho, respectivamente. Desvios padrões baixos indicam variabilidade menor com maior reprodutibilidade do instrumento, enquanto CV baixo, abaixo de 10% (GARCIA, 1989), indicam que a amostra é homogênea.

O controle do teor de cálcio no meio torna-se importante, uma vez que sua presença pode intensificar a agregação das leveduras no meio, o que prejudica a produção de álcool, acarretando em maior perda de células de levedura no fundo da dorna ou nas centrifuga (YOKOYA, 1989; YOKOYA e OLIVA-NETO, 1992 citado por ALCARDE & YOKOYA, 2003). Os valores de desvio padrão para este parâmetro foram excelentes, uma vez que se apresentaram média de $\pm 74,05$ mg L⁻¹ equivalendo a menos de 20% de sua média. O coeficiente de variação (CV) de 16,7 e 18,1%, para mosto e vinho, respectivamente, pode ser considerados bom, uma vez que está, ainda, abaixo de 20%. Valores de coeficiente de variação acima de 20% podem ser considerados altos.

A presença dos íons magnésio no meio fermentativo tem um importante papel nutricional para a levedura, influenciando seu crescimento e eficiência de transformação do substrato em etanol (SANTOS, 2008) e podem ser acumulados na célula de levedura durante o processo (VILLEN et al., 2009 citado por MENEZES, 2012). Os valores para desvio padrão e coeficiente de variação encontrados, $\pm 92,4$ mg L⁻¹ e $\pm 210,9$ mg L⁻¹ e 7,8% e 15,8%

respectivamente, para mosto e vinho também foram satisfatórios, ainda que no meio fermentativo os resultados obtidos não tenham apresentado diferenças significativas.

Tabela 23. Teores de sódio, potássio, magnésio e cálcio do mosto a partir de xarope e do vinho centrifugado, obtidos das análises por cromatografia iônica.

XAROPE	Cátions			
	Sódio (mg L ⁻¹)	Potássio (mg L ⁻¹)	Magnésio (mg L ⁻¹)	Cálcio (mg L ⁻¹)
Mosto	19,85 (±2,75) b	9551,43 (±1779,77) a	1979,06 (±554,9) a	1364,40 (±417,66) b
Vinho	152,36 (±26,41) a	10266,99 (±734,89) a	2246,55 (±210,75) a	1729,10 (±152,33) a
F	71,60 **	1,47 ns	2,31 ns	7,90*

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

* significativo ao nível de 5% de probabilidade ($0,01 \leq p < 0,05$)

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

ns: não significativo ($p \geq 0,05$)

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

Média de 15 repetições por bloco

Nas análises realizadas no mosto e vinho de xarope, o teor de cálcio apresentou diferença significativa ($p \leq 0,05$), ao mesmo tempo em que as frações obtidas para sódio diferiram significativamente ($p \geq 0,01$), apresentando taxas de incremento de 7,5% e 660%, respectivamente.

Os valores observados para sódio foram de 19,85 (±2,75) mg L⁻¹ para o mosto e 152,36 (±26,41) mg L⁻¹ para o vinho, e os teores de cálcio foram 1364,40 (±417,66) mg L⁻¹ e 1729,10 (±152,33) mg L⁻¹, para mosto e vinho, respectivamente.

O teor de potássio, ainda que não tenha apresentado diferença significativa ($p \geq 0,01$) entre o mosto e o vinho de xarope, correspondeu a 50% do valor obtido para o mosto e vinho provenientes do caldo, apresentando teores de 9551,43 (±1779,77) mg L⁻¹ para o mosto e 10266,99 (±734,89) mg L⁻¹ para o vinho.

As diferenças observadas entre os resultados das análises de caldo e de xarope podem ser explicadas devido às diferenças na composição físico-química desses materiais, visto que foram coletadas em épocas e propriedades distintas.

Tabela 24. Teores de sódio, potássio, magnésio e cálcio do mosto a partir de caldo de cana-de-açúcar mais xarope e do vinho centrifugado, obtidos das análises por cromatografia iônica.

MISTO	Cátions			
	Sódio (mg L ⁻¹)	Potássio (mg L ⁻¹)	Magnésio (mg L ⁻¹)	Cálcio (mg L ⁻¹)
Mosto	457,32 (±14,12) b	16019,25 (±252,30) a	1717,66 (±21,32) a	985,26 (±29,03) b
Vinho	653,62 (±105,32) a	15449,05 (±855,72) a	1754,33 (±96,79) a	1125,09 (±43,85) a
F	9,90 **	1,25 ns	0,41 ns	27,34 **

Letras minúsculas 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 para cada tratamento.

Média de 15 repetições por bloco

Nas análises realizadas no mosto e vinho misto, somente sódio e cálcio diferiram estatisticamente entre si ($p \leq 0,01$), apresentando um incremento de 43,1% e 14,2%, respectivamente.

Os teores de sódio observados foram 457,32 (±14,12) mg L⁻¹ e 653,62 (±105,32) mg L⁻¹ no mosto e vinho, respectivamente, enquanto cálcio mostrou resultados de 985,26 (±29,03) mg L⁻¹ para o mosto e 1125,09 (±43,85) mg L⁻¹ para o vinho.

As concentrações de potássio encontradas foram 16019 (±252,30) mg L⁻¹ e 15449,05 (±855,72) mg L⁻¹, para o mosto e vinho, enquanto magnésio apresentou os seguintes resultados 1717,66 (±21,32) mg L⁻¹ para o mosto e 1754,33 (±96,79) mg L⁻¹ para o vinho.

Os valores observados no mosto e no vinho misto são proporcionais aos encontrados para caldo e xarope, visto que é composto por estes dois materiais em iguais proporções (1:1).

Em estudos de Conway e Duggan, (1956) citado por Lopes, (1989), mostos com altos teores de potássio são capazes de reduzir, dentro de certos limites, a absorção de magnésio nas células de leveduras. Tal estudo pode explicar os teores de magnésio encontrados nos três tratamentos, onde não se observaram diferenças significativas.

5.5.2. Teores de ânions

Os principais ânions encontrados na cana-de-açúcar e consequentemente no mosto utilizado para a fermentação são fosfato, cloreto, sulfato e nitrato (CHEN; CHOU, 1993 citado por HAMERSKI, 2009), porém, não foram detectados teores de nitrato nos materiais analisados.

Na Tabela 26 podem ser observados os resultados obtidos para os teores de alguns ânions presentes no mosto obtido a partir de caldo e no vinho centrifugado.

Tabela 25. Teores de cloreto, fosfato e sulfato no mosto a partir de caldo e no vinho centrifugado ao final da fermentação alcoólica.

CALDO	Ânions		
	Cloreto (mg L ⁻¹)	Fosfato (mg L ⁻¹)	Sulfato (mg L ⁻¹)
Mosto	3152,66 (±10,27) b	1683,54 (±98,95) a	1165,62 (±8,01) b
Vinho	3739,65 (±92,82) a	789,29 (±336,68) b	1486,53 (±59,61) a
F	114,05 **	19,92 **	82,59 **

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

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

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

Média de 15 repetições por bloco.

Os resultados das concentrações de ânions obtidos apresentaram diferenças significativas (p≤0,01) quando comparados os teores encontrados no vinho e no mosto para os três analitos quantificados.

Os teores de cloreto e sulfato foram maiores no vinho centrifugado do que no mosto utilizado, enquanto para o fosfato, o mosto apresentou maior teor.

O teor médio de cloreto encontrados no mosto foi de 3152,66 (±10,27) mg L⁻¹ e a concentração desse ânion no vinho foi de 3739,65 (±92,82) mg L⁻¹. Através da análise estatística, foi observado que as concentrações do ânion fosfato no mosto e no vinho foram semelhantes entre si, sendo 1683,54 (±98,95) mg L⁻¹ e 789,29 (±336,68) mg L⁻¹, respectivamente.

No que tange ao sulfato, verifica-se que a concentração desse ânion no mosto foi de 1165,62 (±8,01) mg L⁻¹ e no vinho com 1486,53 (±59,61) mg L⁻¹.

Considerando as variações observadas nos teores dos ânions analisados de antes e após a fermentação, verifica-se que teores de cloreto e sulfato tiveram aumentos de 18,6% e 27,5%, respectivamente. Por outro lado, os teores de fosfato sofreram decréscimo de 53,12%. Isto indica que conforme as necessidades nutricionais das leveduras as concentrações desses nutrientes podem variar bastante por ocasião do processo de fermentação.

Segundo Honig, (1969) citado por Martins, (2014), teores de fosfato maiores do que 500 mg L⁻¹ no caldo de cana são considerados altos. Contudo, Lopes, (1989) citando Rothstein e Demis, (1953); Reed e Peppler (1973) e Atkin e Gray (1947), descreve que

concentrações de 190 a 1710 mg L⁻¹ de fosfato no mosto são consideradas satisfatórias para a obtenção alta eficiência de fermentação.

A presença de íon sulfato no meio pode promover a reação de oxidação por bactérias redutoras de sulfato, fazendo com que o produto de interesse industrial seja transformado em outros compostos, como acetato, ácido sulfídrico e água ou totalmente em CO₂ (KOUSI et al., 2011).

Resultados das concentrações de ânions, obtidos no mosto a partir de xarope, podem ser observados na Tabela 27.

Tabela 26. Teores de cloreto, fosfato e sulfato no mosto a partir de xarope e no vinho centrifugado ao final da fermentação alcoólica.

XAROPE	Ânions		
	Cloreto (mg L ⁻¹)	Fosfato (mg L ⁻¹)	Sulfato (mg L ⁻¹)
Mosto	1605,27	45,86	400,31
	(±2,10) a	(±10,00) a	(±0,43) a
Vinho	1644,88 (±137,64) a	43,77	237,03
		(±2,06) a	(±36,41) b
F	0,18 ns	0,82 ns	57,47 **

Letras minúsculas 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.

Média de 15 repetições por bloco

Os resultados das análises do mosto obtido do xarope e do vinho demonstraram diferenças significativas (p≤0,01) apenas para os teores de sulfato. Este apresentou teores de 400,31 (±043) mg L⁻¹ e 237,03 (±36,41) mg L⁻¹, para o mosto e vinho, respectivamente. Isso indica o decréscimo de 40,75% nos teores de sulfato por ocasião da fermentação.

Os teores de cloreto e fosfato não diferiram estatisticamente, apresentando variação quase nula entre mosto e vinho.

Na Tabela 28, é possível verificar que os teores de cloreto e sulfato encontrados no tratamento misto, que assim como o xarope e o caldo, apresentaram grandes variações.

Os resultados obtidos apresentaram diferenças significativas (p>0,01) quando comparados os teores do vinho e do mosto para os teores de sulfato e fosfato, enquanto o teor de cloreto não apresentou resultados com diferenças significativas.

As concentrações de fosfato encontradas no tratamento misto foram 922,31 ($\pm 6,74$) mg L⁻¹, no mosto, e 167,12 ($\pm 213,16$) mg L⁻¹ para no vinho. Isso representa a diminuição da concentração de 81,9%.

Os íons fosfatos podem ser absorvidos mais rapidamente pelas leveduras quando há presença de íons potássio no meio (AMORIM, 1977 citado por LOPES, 1989).

Tabela 27. Teores de cloreto, fosfato e sulfato no mosto misto e no vinho centrifugado ao final da fermentação alcoólica.

MISTO	Ânions		
	Cloreto (mg L ⁻¹)	Fosfato (mg L ⁻¹)	Sulfato (mg L ⁻¹)
Mosto	2626,84 ($\pm 13,35$) a	922,31 ($\pm 6,74$) a	1019,92 ($\pm 3,56$) b
Vinho	2671,75 ($\pm 91,25$) a	167,12 ($\pm 213,16$) b	1117,99 ($\pm 50,02$) a
F	0,69 ns	35,86 **	2,97 **

Letras minúsculas 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.

Média de 15 repetições por bloco

Para os íons sulfato, os resultados observados no mosto e no vinho foram de 1019,92 ($\pm 3,56$) mg L⁻¹ e 1117,99 ($\pm 50,02$) mg L⁻¹, enquanto as concentrações de cloreto encontradas foram de 2626,84 ($\pm 13,35$) mg L⁻¹ no mosto e 2671,75 ($\pm 91,25$) g L⁻¹ no vinho.

Os teores de cloreto e fosfato encontrados no mosto misto estavam dentro do esperado, pois sua composição é dada pela mistura de xarope e caldo, em iguais proporções, devendo então, apresentar resultados intermediários.

As diferenças observadas nos três tratamentos podem ser em função da composição da matéria-prima original ou devido a diferenças no metabolismo das leveduras pela alteração da composição dos mostos. Isto significa que pelo fato da absorção e a utilização dos nutrientes serem diferentes para as leveduras, ocorrem variações na composição do vinho final.

6. CONCLUSÕES

A cromatografia de íons é uma técnica que apresenta maior precisão, exatidão e sensibilidade para o controle analítico de fermentações do que as técnicas convencionais. Além disso, apresenta maior produtividade na obtenção das respostas analíticas.

A cromatografia de íons apresenta exatidão, precisão, sensibilidade, rusticidade e repetibilidade. Além disso, apresenta limite de detecção de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$, $1,4 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,7 \text{ mg L}^{-1}$ para a sacarose, glicose e frutose, respectivamente. Também apresenta limite de quantificação de $1,2 \text{ mg L}^{-1}$, $4,3 \text{ mg L}^{-1}$ e $8,2 \text{ mg L}^{-1}$ para a sacarose, glicose e frutose, respectivamente.

Devido às diferenças na exatidão e na precisão dos métodos cromatográficos comparados com os métodos tradicionais, é possível observar que os rendimentos podem ser diferentes quando se aplica as duas metodologias. No presente estudo, quando se aplicou a cromatografia de íons os rendimentos foram de 89,77 %, 83,59 % e 76,65 %, para as fermentações de mostos a partir de caldo, xarope e caldo + xarope, respectivamente. Contudo, quando se aplicou o método de DNS para a análise de ART, os valores de rendimento de fermentação foram de 121,88 %, 106,82 % e 90,23 %, para as fermentações com os mostos obtidos a partir de caldo, xarope e caldo + xarope, respectivamente.

Os teores de açúcares redutores (AR) são menores quando avaliados pela cromatografia de íons do que pelo método de DNS. Os resultados de AR final obtidos por cromatografia de íons foram $0,197 (\pm 0,04) \text{ g L}^{-1}$, $0,283 (\pm 0,12) \text{ g L}^{-1}$ e $0,259 (\pm 0,08) \text{ g L}^{-1}$, para o vinho de caldo, de xarope e misto (caldo + xarope), enquanto por DNS foram de $0,352 (\pm 0,14) \text{ g L}^{-1}$, $0,811 (\pm 0,03) \text{ g L}^{-1}$ e $0,572 (\pm 0,03) \text{ g L}^{-1}$.

Os teores de ART no vinho são menores quando se utilizar a cromatografia de íons do que pelo método de DNS. Os valores encontrados de ART no vinho, para caldo, xarope e misto, por cromatografia foram $0,231 (\pm 0,05) \text{ g L}^{-1}$, $0,358 (\pm 0,09) \text{ g L}^{-1}$ e $0,335 (\pm 0,19) \text{ g L}^{-1}$, enquanto por DNS os teores foram $0,389 (\pm 0,04) \text{ g L}^{-1}$, $1,521 (\pm 0,20) \text{ g L}^{-1}$ e $0,906 (\pm 0,21) \text{ g L}^{-1}$, para caldo, xarope e misto.

Para a análise da acidez total, há pouca diferença de resultados quando se aplica a cromatografia de íons ou a titulometria. Contudo, pela análise cromatográfica é possível saber qual ácido está contribuindo com a acidez e inferir sobre qual pode ser o agente responsável pela acidez.

A técnica da cromatografia de íons utilizada para o controle analítico da fermentação alcoólica apresenta vantagens em relação às técnicas convencionas analisadas, devido à

precisão e exatidão do método, rapidez de análise e facilidade no preparo das amostras, além de sua versatilidade, sendo capaz de analisar outros compostos de uma mesma matriz, tais como ácidos, cátions e ânions.

A cromatografia é capaz de fornecer resultados confiáveis para o controle analítico e de qualidade em fermentações para a produção de etanol e pode ser utilizada para o monitoramento durante a fermentação alcoólica.

REFERÊNCIAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Etanol combustível — Determinação da concentração de cloreto e sulfato, NBR 10894**. Rio de Janeiro, 2012.
- ALVARENGA; QUEIROZ. Produção mais limpa e aspectos ambientais na indústria sucroalcooleira. In: 2º INTERNATIONAL WORKSHOP | ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION, 2009, 9p. São Paulo, 2009.
- AMORIM, H. V. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA. Ciência e Tecnologia. 448p. Fermentec, Piracicaba-SP, 2005
- AMORIM, H. V.; ZAGO, E. A.; OLIVEIRA, A. J. **Novos métodos analíticos para o controle da fermentação alcoólica**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1982.
- AMSTALDEN, L. C. Validação e protocolos em análises química. Conselho Regional de Química – IV Região (SP). Laboratório T&Analítica – Campinas, 2010.
- ANDRIETTA, M.G.S.; STECKELBERG, C.; Bioetanol – Brasil, 30 anos na vanguarda. Construindo a história dos produtos naturais – **Multiciência**. n. 7, p. 1- 14, 2006.
- ANDRIETTA; S.R.; STUPIELLO, J.P. Simulação e modelagem para processos de fermentação alcoólica por batelada alimentada. STAB, Piracicaba, p. 36-40, 1990
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; RE nº 899, de 29/5/2003: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, Ministério da Saúde: Brasil, 2003.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Consulta Pública nº 129, de 12 de fevereiro de 2016, Ministério da Saúde: Brasil, 2016.
- ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustível. **Resolução ANP No7 de 9/02/2011: estabelece as especificações do álcool etílico anidro combustível e do álcool etílico hidratado combustível**. Rio de Janeiro, 2011.
- ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.
- ASSONUMA, M. M. **Determinação de alantoína e avaliação farmacológica de Cordia ecalyculata vell. (chá de bugre)**. (2009). 79p. Dissertação (Mestre em Química). Universidade estadual Paulista. Araraquara, 2009
- AZEVEDO, M. S.; SANTOS, R. V. O.; MAGALHÃES, T. V. Produção de Etanol no Brasil. Bolsista de Valor: **Revista de Divulgação do Projeto Universidade**. Petrobras e IF Fluminense, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p.151-154, 2012.

- BASSO, L. C.; ALVES, D. M. G.; AMORIM, H. V. The antibacterial action of succinic acid produced by yeast during fermentation. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v. 28, p. 77-88, 1997.
- BASTOS, V D 2007. 'Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias'. Acesso em 25 out. 2015. <http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set2501.pdf>
- BLANCO, D.; MURO, D.; GUTIÉRREZ, M. D. A comparison of pulsed amperometric detection and spectrophotometric detection of carbohydrates in cider brandy by liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta** n. 517, p 65–70. 2004.
- BORGES, M. T. M. R.; PARAZZI, C.; PIEDADE, S. M. D. S. Avaliação de métodos químicos de determinação de açúcares redutores em xaropes. **Anais do 4º Congresso Nacional da STAB. VIII Convenção da ACTALAC**, Olinda, PE, Brasil, 8-13 novembro de 1987.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. **Cana-de- açúcar**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>>. Acesso em 10 fev. 2015
- BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P., POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. Curitiba. V. 13. P. 129-146. 2003
- CAMPOS, N. L., Políticas de estado no setor sucroenergético. **Revista Geo UERJ**, n. 26, p. 301-328, 2015.
- CARLINI JUNIOR, R J, BARRETO, C F, LISBOA FILHO, W. A utilização do controle de qualidade de acordo com o sistema de análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC) na indústria pesqueira brasileira: o caso da Netuno Pescados no estado de Pernambuco. **Organizações Rurais & Agroindustriais**, Lavras, v. 8, n 1, p. 11-24, 2006
- CECCHI, H M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. Editora da UNICAMP, 2003.
- CEPEA, Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - **Desenvolvimento metodológico e cálculo do PIB das cadeias produtivas do algodão, cana-de-açúcar, soja, pecuária de corte e leite no Brasil**. Relatório Final. Piracicaba: 2011.
- CHERUBIN, R. A. **Efeito da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. (2003). 124 p. Tese (Doutor em Microbiologia Agrícola), Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo (USP), 2003.

- CIB – Conselho de Informações Sobre Biotecnologia. **Guia da cana-de-açúcar, avanço científico beneficia o país.** 2009. Disponível em: <http://cib.org.br/wp-content/uploads/2011/10/guia_cana.pdf>. Acesso em: 18 dez. 2016.
- CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC.** Edgard Blucher, 1998.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas: editora da UNICAMP. 7ª ed. 1997.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas: editora da UNICAMP. p.13-17.1987.
- CORRÊA, H L, GIANESI, I G N, CAON, M, Planejamento, Programação e Controle da produção. São Paulo: Atlas, 5ª edição, 2007.
- CORRÊA, L. C.; RYBKA, A. C. P.; SILVA, P. T. S.; BIASOTO, A. C. T.; PEREIRA, G. E. **Determinação de Açúcares em Mosto, Sucos de Uva e Vinho por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).** Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 112, EMBRAPA. 15 p. Petrolina, PE. Dezembro, 2013
- DARÉ, R M. **Avaliação de coeficientes de rendimento e modelagem do processo fermentativo de produção de etanol.** (2008). 67 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Mestre em Engenharia Química, área de Concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos., Departamento de Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- De BORBA, B. M; JACK, R. F.; ROHRER, J. S.; WIRT, J.; WANG, D. Simultaneous determination of total nitrogen and total phosphorus in environmental waters using alkaline persulfate digestion and ion chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1369, p. 131–137. Sciencedirect; (2014)
- DEGANI, A G.; CASS, Q B.; VIEIRA, P C. Cromatografia um breve ensaio. **Química nova na escola**, v. 7, p. 21-25, 1998.
- DEMIRBAS, A.; Biodiesel from vegetable oils via transesterification in supercritical methanol. **Energy Conversion And Management**, Trabzon, Turkey, v. 43, p.2349-2356, 2002
- De QUADROS, D. P. C.; CHAVES, E. S.; SILVA, J. S. A.; TEIXEIRA, L. S. G.; CURTIUS, A. J.; PEREIRA, P. A. P. Contaminantes em Biodiesel e Controle de Qualidade. **Revista Virtual de Química**, Salvador, BA, v. 3, n. 5, p.376-384, 2011.
- DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M.; LANDELL, M. G. A. **Cana-de-açúcar.** Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. 882 p.

- DORNEMANN, G. M. **Comparação de métodos para determinação de açúcares redutores e não-redutores.** (2016). 37p. Trabalho de diplomação de Engenharia Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2016
- DORTA, C. **Sinergismo entre sulfito, ácido láctico, pH e etanol na fermentação alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 e M-26.** (2006). 135p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, São Paulo. 2006.
- EITH, C.; KOLB, M.; RUMI, A.; SEUBERT, A.; VIEHWEGER, K. H. **Práticas em Cromatografia de íons: Uma Introdução.** 2006. 142p. Metrohm, 2006.
- FERNANDES, A. C. **Cálculos na Agroindústria da Cana-de-açúcar.** 3ª edição, Piracicaba: STAB, p. 416. 2011.
- FERRARI, F. C. S. **Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol em escala industrial.** (2013). 57p. Dissertação (Mestre em Microbiologia Agropecuária). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal SP, 2013.
- FIGUEIREDO, T. M. P.. **Validação de métodos analíticos: Determinação do Teor de Açúcar numa amostra de produto alimentar.** (2012) 104 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Mestre em Química, Área de Especialização em Controle de Qualidade e Ambiente, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2012.
- GARCIA, C. H. Tabelas para classificação do coeficiente de variação. Circular técnica nº 171, IPEF, novembro, 1989.
- GARCIA, A C.; **Glicerol e açúcares totais em aguardentes de cana-de- açúcar.** (2010). 79 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Mestre em Ciências. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- HADDAD, P. R., JACKSON, P E. Ion Chromatography – Principles and Applications, 1st ed., **J. Chromatogr. Library.** v. 46, Elsevier Verlag, Amsterdam, 1990.
- HAMERSKI, F. **Estudo de variáveis no processo de carbonatação do caldo de cana-de-açúcar.** (2009) 148f. Dissertação (Mestre em Tecnologia de alimentos). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2009.
- HANKO, V. P.; ROHRER, J. S. Determination of carbohydrates, sugar alcohols, and glycols in cell cultures and fermentation broths using high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. **Analytical Biochemistry.** v. 283, p. 192-199. 2000.
- HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa.** 5ed. 876 p. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

- INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH); Validation of Analytical Procedures: Methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.
- INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008**, 2003.
- IUPAC (Analytical Chemistry Division Commission on Analytical Nomenclature). Pure Appl. Chem.; 1993. Disponível em: http://old.iupac.org/publications/analytical_compendium/ . Acessado em 30 out. 2015.
- KLEIN, A.C. **Cromatografia iônica como método analítico alternativo para a análise quantitativa de analitos**. (2010). 46 f. Trabalho de Conclusão de Curso – Química Industrial, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Química, Porto Alegre, 2010.
- LEE, Y. C. High-performance anion-exchange chromatography for carbohydrate analysis. **Analytical Biochemistry** n. 189, p. 151-162. 1990
- LIMA, U.A; BASSO, L. C.; AMORIM, H.V de. In: Lima, Urgel de Almeida (Coord.). **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher. Biotecnologia Industrial; v.3, p.1-43, 2001.
- LOPES, J. J. C.. **Balanco de nutrientes minerais no processo Melle-Boinot de fermentação alcoólica**. (1989), 74 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Mestre em Agronomia, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.
- MACEDO, L. C. H. **Etanol etílico: da cachaça ao cereal**. São Paulo: Ícone, 1993.
- MARTINS, N. G. S. **Os fosfatos na cana-de-açúcar**. (2004). 87 f. Dissertação (Mestre em Ciências)–Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2004.
- MENEZES, J. A. S. **Aspectos físicos e químicos do caldo de cana que afetam a capacidade fermentativa das células de levedura**. (2012). 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- NASCIMENTO, R. J. A. **Monitoramento em tempo real de processos fermentativos por espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS)**. (2012). 127 f. Dissertação (Mestrado Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2012.

- NEVES, M F, TROMBIN, V. G. **A dimensão do setor sucoenergético: mapeamento e quantificação da safra 2013/14**. Ribeirão Preto: Markestrat, Fundace. FEA-RP/USP, 2014.
- NIEDZIELSKI, P.; KURZYCA, I.; SIEPAK, J. A new tool for inorganic nitrogen speciation study: Simultaneous determination of ammonium ion, nitrite and nitrate by ion chromatography with post-column ammonium derivatization by Nessler reagent and diode-array detection in rain water samples. **Analytica Chimica Acta**, vol 77, p. 220–224. Sciencedirect; (2006).
- ODELI, D. T.; TAVARES, L. B. B. Uso do método do ácido dinitrossalicílico (DNS) na determinação de carboidratos nos alimentos dietéticos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processos de Alimentos (B. CEPPA)**, v. 12, n. 2, p. 117-126, Paraná, 1994.
- 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, 89p. 1996.
- OLIVEIRA, F. M. Controle da Qualidade Analítica. LABWIN – Serviços Especializados Ltda. 24 p. 2006.
- PACHECO, T. F. Tecnologia industrial. **Sistema Embrapa de Produção Agroindustrial de Sorgo Sacarino para Bioetanol. Sistema BRS1G - Tecnologia Qualidade Embrapa**. Documentos, v. 139, p. 92-106, 2012.
- PASCHOALINI, G., Estudo do processo fermentativo de usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização. **Revista de Ciência e Tecnologia**, Piracicaba, SP, v. 16, n. 32, p.59-68, 2009
- RELACRE, Guia Relacre 13, Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química, Instituto Português da Qualidade, Portugal, 2000.
- RIBANI, M., BOTOLLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, C. A. F.; BLUMER, S. A. G.; HORII, J. Fundamentos de tecnologia sucroalcooleira, 2ª parte, tecnologia do álcool. Piracicaba, 1999.
- SANTOS, A. F.; RIBEIRO, C. A.; POLESE, L.; ERNANDES, J. R.; KESSERLINGH, S. M.; NONATO, R. V. Determinação de parâmetros de validação de métodos cromatográficos para análise de 5-hidroximetilfurfural e açúcares em amostras de processo de produção de polímero biodegradável. **Eclética Química**. São Paulo, v. 31, n. 1. p. 13-20, 2006
- SANTOS, P. C. **Método de cromatografia líquida de alta eficiência com detector evaporativo de espalhamento de luz para a determinação de Biciclo [2.2.1] Heptano-**

- 2,3-dicarboxilato de Sódio.** (2008a). 56 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Mestre em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- SANTOS, A. M. **Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada.** (2008b). 77p. Dissertação (Mestrado em Engenharia química) – Universidade Federal do Alagoas, Maceió, 2008.
- SANTOS, G. R., Produtividade na agroindústria canavieira. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (Ipea). **Radar**, v 39, jun. 2015.
- SAQIB, A. A. N.; WHITNEY, P. J. Differential behaviour of the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent towards mono and di-saccharide sugars. **Biomass and bioenergy**. v. 35, p. 4748-4750. 2011
- SAS Institute. **SAS users guide: statistic.** 6.ed. Cary: SAS Institute, 1990. 584p.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** São Paulo:Varela, 1997. 259p.
- SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D. X.; ASSIS, E. M.; ASQUIERI, E. R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 23, n. 3, p. 337-342. 2003
- SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental.** 5ª ed. 836p. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- SKOOG, D. A.; HOOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of instrumental analysis.** Philadelphia, Cap. 26, p. 674-700. 1998.
- SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de S. cerevisiae.** (2009). 136p. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantã/IPT. São Paulo, 2009.
- TONOLI, F C. **Adaptação de leveduras para a fermentação com alto teor alcoólico.** (2017). 77 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Mestre em Ciências, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.
- THOMPSON, M; ELLISON, S L R; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.
- UNICA, União da Indústria de cana-de-açúcar. **Moagem no Centro-Sul atinge 603,86 milhões de toneladas no final de fevereiro.** Disponível em: <<http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=76>>. Acesso em: 9 mar. 2016.

VOGEL, A. **Análise Química Quantitativa**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC- Livros Técnicos e Científicos Editora S.A, 2002. 462p.

WEISS, J. Handbook of Ion Chromatography, 3ª edição, volume 1, Alemanha, 2004.