



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS – UFAL
CENTRO DE TECNOLOGIA – CTEC
ENGENHARIA QUÍMICA



Maria Regina Pereira Brandão

**Avaliação do uso do antibiótico natural e convencional durante o processo
da fermentação alcoólica**

Maceió

2024

Maria Regina Pereira Brandão

**Avaliação do uso do antibiótico natural e convencional durante o processo
da fermentação alcoólica**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao curso de Engenharia Química, do Centro de
Tecnologia da Universidade Federal de
Alagoas, como requisito parcial para obtenção
do título de Bacharel em Engenharia Química.
Orientadora: Prof. Dr. Dayana de Gusmão
Coelho
Coorientadora:
Prof. Dra. Livia Maria de Oliveira Ribeiro.
Prof. Dra. Margarete Cabral dos Santos Silva

Maceió

2024

“Eu tenho absoluta certeza, que a Sua bondade e a Sua misericórdia me acompanharão todos os dias da minha vida.”

Folha de Aprovação

MARIA REGINA PEREIRA BRANDÃO

Avaliação do uso do antibiótico natural e convencional durante o processo da fermentação alcoólica.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Engenharia Química da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

BANCA EXAMINADORA:



Documento assinado digitalmente

DAYANA DE GUSMAO COELHO

Data: 02/04/2024 12:06:14-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora: Profa. Dra. Dayana Gusmão
Coelho(Universidade Federal de Alagoas)



Documento assinado digitalmente

LIVIA MARIA DE OLIVEIRA RIBEIRO

Data: 02/04/2024 10:13:51-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Coorientadora: Profa. Dra. Livia Maria de OliveiraRibeiro
(Universidade Federal de Alagoas)



Documento assinado digitalmente

RENATA MARIA ROSAS GARCIA ALMEIDA

Data: 06/04/2024 09:03:18-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dra. Renata Maria Rosas Garcia
Almeida(Universidade Federal de Alagoas)



Documento assinado digitalmente

CARLOS EDUARDO DE FARIAS SILVA

Data: 05/04/2024 21:58:01-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Carlos Eduardo de Farias Silva
(Universidade Federal de Alagoas)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, expresso minha profunda gratidão a Deus pelo Seu amor imensurável, que nunca me desamparou nos momentos mais desafiadores da minha jornada acadêmica. É a Ele que devo a realização do meu sonho, e é verdadeiramente gratificante perceber que estou concretizando esse objetivo. Nos momentos em que a vontade de desistir tentou se instalar, Deus não apenas impediu, mas também me fortaleceu, lembrando-me do propósito do meu sonho e concedendo-me a força necessária para perseverar.

Quero expressar minha gratidão a minha querida avó, Maria de Lourdes Brandão da Silva, que, tenho certeza, estaria radiante hoje se pudesse compartilhar este momento comigo. Ela foi minha âncora emocional e financeira quando decidi ingressar na Universidade. Sua dedicação foi inabalável; em nenhum momento ela hesitou ou questionou, apenas ofereceu um apoio incondicional que moldou o curso da minha jornada acadêmica. Além disso, não posso deixar de agradecer à minha mãe, minha confidente e melhor amiga, Janaina Brandão da Silva. Ela esteve ao meu lado nos momentos tristes e felizes, testemunhando cada desafio que enfrentei. Sua presença constante foi um farol em meus dias mais escuros, fornecendo conselhos sábios e a força necessária para seguir em frente. Se hoje celebro essa conquista, é porque ela nunca me permitiu desistir. A ambas, minha avó e minha mãe, dedico este triunfo com profundo agradecimento e amor eterno.

Também não posso deixar de agradecer a todos que me orientaram nesse trabalho, e em especial, a Prof. Dra. Livia Maria de Oliveira Ribeiro que me orientou com muita paciência, disponibilidade e ótimas indicações para que o estudo fosse realizado com efetividade.

Agradeço também ao meu amigo presenteado pelo meio acadêmico, Engenheiro Lucas Santana Da Silva, que me ajudou com este trabalho, tirando todas as dúvidas que surgiam e com indicações para que o estudo fosse realizado com sucesso.

Não posso deixar de agradecer a todos os meus amigos que me ajudaram e me deram forças ao longo desse caminho, em especial a Ana Dayane que me acompanhou desde o início, ela que esteve ao meu lado quando passamos pela mudança de Universidade, compartilhando todas as dificuldades juntas. Não poderia deixar de agradecer a Itaíza Bruna, Rosiele Ataíde, Deidiane Soares, Cristofane Linhares e Vanessa Lins, onde, compartilhamos momentos de alegria e superações juntos. Por fim, não poderia deixar de agradecer ao meu namorado, Erick Phelipe, que me ajudou em todos os momentos da minha graduação me dando apoio e me consolando em vários momentos.

RESUMO

O etanol (C_2H_5OH) é uma substância orgânica obtida pela fermentação de açúcares, destacando-se como uma alternativa sustentável devido à sua menor poluição em comparação com combustíveis derivados do petróleo. Além de ser utilizado como combustível, o etanol tem aplicações na indústria farmacêutica, em bebidas alcoólicas e como antídoto. Sua produção envolve a fermentação alcoólica por microrganismos anaeróbicos, resultando em etanol, gás carbônico e energia. A eficiência da produção de etanol está diretamente ligada ao controle adequado da fermentação, incluindo fatores como concentração de açúcares, temperatura, pH e prevenção de contaminação bacteriana. O presente estudo visa comparar o uso de antibióticos naturais (própolis vermelho e resíduo de própolis) e convencionais (terramicina) na produção de álcool. Foram utilizados 3 L de caldo de cana, sendo que no caldo tratado com antibióticos naturais foram adicionados 25g/L de própolis e resíduo de própolis, enquanto no caldo tratado com antibiótico convencional (terramicina) foram utilizadas concentrações de 2g/L, 4g/L e 8g/L. Os resultados indicaram que tanto o caldo tratado com própolis quanto o caldo com 8g/L de terramicina foram os mais eficazes em termos de controle da acidez, manutenção do pH ideal, teor alcoólico. Sendo assim, o caldo com 8g de terramicina e o caldo com a própolis obteve os melhores valores de rendimento com 93,34% e 68,60% respectivamente. Esses resultados sugerem que o uso de antibióticos naturais, como a própolis, pode ser uma alternativa viável e sustentável para a produção de etanol, proporcionando benefícios tanto econômicos quanto ambientais.

Palavras- Chaves: Fermentação alcoólica, etanol, levedura, antibiótico natural, antibiótico convencional.

ABSTRACT

Ethanol (C_2H_5OH) is an organic substance obtained by the fermentation of sugars, standing out as a sustainable alternative due to its lower pollution compared to petroleum-derived fuels. In addition to being used as a fuel, ethanol has applications in the pharmaceutical industry, in alcoholic beverages and as an antidote. Its production involves alcoholic fermentation by anaerobic microorganisms, resulting in ethanol, carbon dioxide and energy. The efficiency of ethanol production is directly linked to adequate fermentation control, including factors such as sugar concentration, temperature, pH and prevention of bacterial contamination. The present study aims to compare the use of natural antibiotics (red propolis and propolis residue) and conventional antibiotics (terramycin) in alcohol production. 3 L of sugarcane juice was used, and in the juice treated with natural antibiotics, 25g/L of propolis and propolis residue were added, while in the juice treated with conventional antibiotics (terramycin) concentrations of 2g/L, 4g/L were used. and 8g/L. The results indicated that both the broth treated with propolis and the broth with 8g/L of terramycin were the most effective in terms of controlling acidity, maintaining the ideal pH, alcoholic content. Therefore, the broth with 8g of terramycin and the broth with propolis obtained the best yield values with 93.34% and 68.60% respectively. These results suggest that the use of natural antibiotics, such as propolis, can be a viable and sustainable alternative for ethanol production, providing both economic and environmental benefits.

Keywords: Alcoholic fermentation, ethanol, yeast, natural antibiotic, conventional antibiotic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Sequência das reações enzimáticas de conversão da glicose a etanol.	17
Figura 2. Fluxograma da metodologia para obtenção do álcool.	26
Figura 3. Terramicina utilizada como antibiótico convencional.	28
Figura 4. Própolis vermelha: a) forma bruta e b) resíduo	29
Figura 5. Micro Destilador TE – 012-250	30
Figura 6. Medição do método de Gay Lussac (°GL).	32
Figura 7. Espectrofotômetro modelo SHIMADZU UV-1280.	33
Figura 8. Processo de dissolução da própolis: a) 25g do extrato de própolis vermelha. b) início da dissolução e c) termino da dissolução	35
Figura 9. Processo de dissolução do residuo de própolis: a) 25g do extrato de própolis vermelha b) inicio da dissolução e c) termino da dissolução	35
Figura 10. Caldos preparados: a) caldo sem espuma e b) caldo com espuma	36
Figura 11. Evolução do processo de fermentação após duas horas.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tipos de própolis mais difundidas no mundo: origem vegetal e as principais classes de constituinte. _____	24
Tabela 2: Classificação da própolis brasileira de acordo com suas características físico-químicas e localização. _____	24
Tabela 3. Estudo das análises do antibiótico convencional em relação ao pH e acidez. _____	38
Tabela 4: Estudo das análises do antibiótico natural em relação ao pH e acidez _____	39
Tabela 5. Estudo das análises de AR e ART do caldo _____	40
Tabela 6. Teor e rendimento alcoólico dos caldos com antibióticos _____	41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS.....	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1	Proálcool	15
3.2	Tratamento do caldo para a fermentação	15
3.2	Leveduras.....	16
3.4	Metabolismo das leveduras.....	17
3.5	Nutrição das leveduras	18
3.6	Processo fermentativo	18
3.7	Fatores que afetam a fermentação	19
3.7.1	Temperatura.....	19
3.7.2	pH	20
3.7.3	Inibidores da fermentação	20
3.7.4	Concentração de açúcares.....	20
3.7.5	Concentração de inóculo	21
3.7.6	Contaminação bacteriana.....	21
3.7.7	Antissépticos.....	21
3.8	Antibióticos Convencionais.....	21
3.8.1	Antibiótico naturais	23
3.8.2	Própolis Vermelha	25
4	METODOLOGIA	26
4.1	Preparo do caldo de cana-de-açúcar.....	26
4.2	Antibióticos utilizados para combate da infecção	27

4.2.1 Antibiótico convencional: terramicina	27
4.2.2 Antibiótico natural: Própolis vermelha.....	28
4.3 Fermentação alcoólica.....	29
4.3.1 Inoculação do mosto.....	29
4.3.2 Filtração do caldo e destilação.....	30
4.4 Métodos de análises	31
4.4.1. Acidez.....	31
4.1.2 Teor alcoólico.....	31
4.1.3 Determinação de açúcares redutores (AR) em glicose pelo método do DNS utilizando o espectrofotômetro	32
4.1.4. Determinação de açúcares redutores totais (ART) pelo método do DNS utilizando o espectrofotômetro.....	33
4.1.5 Rendimento do Álcool (%).....	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1. Análise da Acidez e do pH em função da infecção bacteriana	37
5.2. Concentração de AR e ART	39
5.3 Álcool Produzido e Rendimento do Álcool (%)	41
6 CONCLUSÃO	43
7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	44
8 REFERÊNCIA	45

1 INTRODUÇÃO

O etanol é um exemplo de energia renovável presente no dia a dia da população mundial, isso porque proporciona mais performance ao motor e possui apelo ambiental positivo (FEY, 2016). O etanol derivado da cana de açúcar contribui para a qualidade do ar com menor poluição e a consequente redução da incidência de doenças respiratórias entre a população, se comparado com os combustíveis derivados do petróleo. Apesar da gasolina ter um maior rendimento, muitas vezes o álcool tem o melhor custo benefício e proporciona ao motorista mais potência e torque no motor devido a sua composição.

O etanol de cana pode ser utilizado para gerar subprodutos: industrial (fabricação de detergentes, produtos de limpeza, têxteis e solventes); cosméticos (fabricação de perfumes, desodorantes, cremes e produtos de higiene em geral); alimentício e farmacêuticos (fabricação de bebidas, vinagre, vacinas, antibióticos e antissépticos) (RAIZEN, 2022). Para aumentar o consumo do etanol nos próximos anos com vistas ao desenvolvimento de uma indústria competitiva, principalmente nos países desenvolvidos, será necessária uma elevação efetiva de sua produção. Além disso, é importante o estímulo à pesquisa visando o desenvolvimento de novas rotas tecnológicas de produção do etanol, com base na utilização de biomassa celulósica.

A produtividade está relacionada com o rendimento da fermentação alcoólica, no qual, deve ser efetuado um balanço material e energético, além do próprio balanço econômico. Quanto mais completo o balanço material, considerando todos os insumos e exumos materiais, mais efetivo será o controle do processo, permitindo uma melhor fiscalização de sua economicidade (PACHECO, 2010).

A contaminação bacteriana é apontada como o maior problema para o processo de fermentação, no qual, influencia diretamente na viabilidade da levedura, reduzindo o pH do mosto fermentado e prejudicando a taxa de consumo da glicose por parte da levedura. (LAGO, 2022). Por isso, é de suma importância durante o processo fermentativo valores de pH menores, ou seja, mais ácido pois, não afetam a atividade celular das leveduras, tornando-se um importante aliado no controle de contaminações industriais (AMARAL, T.M, 2022). Dessa maneira, as fermentações alcoólicas conduzidas em meio ácidos, demonstram resultados superiores em relação ao rendimento em etanol, pelo fato de reduzir o crescimento do fermento, e, portanto, a redução da produção de glicerol. (SOUSA; MONTEIRO, 2011).

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo determinar o rendimento do processo de fermentação em batelada a partir do caldo de cana-de-açúcar em função do fermento e da razão

de infecção a partir do controle das bactérias contaminantes da fermentação alcoólica com o antibiótico natural e convencional.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Comparar o uso do antibiótico natural (própolis vermelho e resíduo de própolis) e convencional (terramicina) para a produção de álcool.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar a eficiência do biocida natural com a do biocida convencional durante a fermentação alcoólica em relação ao rendimento;
- Avaliar o uso do antibiótico do tipo terramicina em função da razão de infecção na fermentação;
- Avaliar o uso do antibiótico natural em função da razão de infecção na fermentação.
- Comparar o teor alcoólico após o uso do antibiótico natural e convencional

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Proálcool

No ano de 1975, foi criado o Programa Nacional do Álcool ou Proálcool pelo decreto nº 76.593, com o objetivo de ampliar a matriz energética brasileira em função de recursos renováveis e limpos, incentivando a produção de bioetanol para os mercados internos e externos. O programa concentrou-se em retomar a produção de bioetanol anidro, o qual passou a ser misturado à gasolina em teor de 10 a 25% e os carros passaram a ser abastecidos com o bioetanol hidratado. O grande sucesso resultou, em 1985, onde cerca de 96% dos automóveis foram vendidos com motor a bioetanol hidratado, promovendo a maior frota automotiva mundial movida com um biocombustível (SILVA; MIGOT; SILVA, 2019).

O término do Proálcool em 1988, aconteceu com uma ideia, dentre outras várias que surgiram na época, de que o petróleo seria um recurso infinito, fazendo com que o preço da gasolina se estabilizasse no mercado internacional. A partir disso, aumentou o interesse do mundo em combustíveis alternativos, além de autossuficiência energética, vislumbrando-se um futuro sustentável (MANFRED NITSCH, 2023) Em resposta, os engenheiros desenvolveram motores capazes de funcionar tanto a gasolina quanto com bioetanol, protegendo das oscilações dos preços que ambos estão sujeitos. Sendo assim, no contexto da produção de bioetanol, destaca-se o tratamento do caldo para a fermentação como um passo crucial, marcando uma transição significativa para fontes de energia mais ecológicas e eficientes.

3.2 Tratamento do caldo para a fermentação

O tratamento do caldo tem os seguintes objetivos: eliminar a maior parte das impurezas grosseiras (bagacilho, areia); máxima eliminação de partículas coloidais, responsáveis pela maior formação de espumas e também por dificultarem a recuperação do fermento; preservação de nutrientes, vitaminas, açúcares, fosfatos, sais minerais, aminoácidos livres que são necessários ao metabolismo das leveduras e minimização dos contaminantes microbianos, os quais competem com as leveduras pelo substrato e podem produzir metabólitos indesejáveis, diminuindo a eficiência e a viabilidade do fermento (ALCARDE, 2022). Objetivando melhorar o mosto a ser fermentado, é feita a filtragem de bagacilhos, ricos em substâncias pécicas

possuindo unidades metoxilas, que quando liberadas pelas enzimas das leveduras fermentativas, dão origem ao metanol, produto indesejável (RIBEIRO, 2016).

Os processos do tratamento do caldo para a produção do álcool envolvem: peneiramento, calagem, aquecimento, decantação, concentração e resfriamento. Na peneiragem ocorre a remoção do bagacilho, em seguida adiciona-se o leite de cal que através de reações químicas entre fosfatos dissolvidos na matéria prima resultam na coagulação dos materiais presentes, formando precipitado insolúvel que adsorve e arrasta as impurezas, tais como ácidos e compostos fenólicos (ALBUQUERQUE, 2011). Além disso, o pH deve ser controlado, pois, quanto mais se aproxima de sete, maior é a remoção de nutrientes do caldo e o excesso de cal pode afetar o crescimento da levedura em cultura (ALCARDE, A.R, 2022).

O aquecimento consiste em elevar a temperatura do caldo entre 103°C e 105°C, depois o caldo é levado para a próxima etapa, decantação (JACOB, A.B; CAMPOS, R.T; 2023). A decantação visa a separação, de impurezas com mínima remoção de nutrientes e é conduzida em menor intensidade na clarificação do caldo, por conta do tempo de retenção do caldo no decantador, que gira em torno de três horas. A concentração do caldo para a produção e armazenamento de xarope é uma das operações que serve como estratégia tanto para a elevação do teor de açúcar total do mosto, com consequente aumento do teor alcoólico, quanto para garantia da continuidade do processo fermentativo em paradas de moagem (ALCARDE, 2022). A temperatura do caldo que alimenta a dorna é um fator importante no rendimento da fermentação. Sendo assim, o caldo proveniente do tratamento deve ser resfriado a temperaturas convenientes por um equipamento adicional antes de ser direcionado à alimentação das dornas.

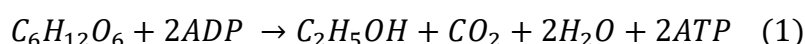
3.2 Leveduras

As leveduras são células eucarióticas unicelulares contendo núcleo, mitocôndria, aparelho de Golgi, vesículas de secreção, retículo endoplasmático, vacúolos, ribossomos, membrana plasmática, periplasma, parede celular e outras organelas. Tais microorganismos são usados como modelo em estudo de células eucarióticas em geral, pois eles apresentam características estruturais e funcionais de eucariotos superiores. No entanto, uma célula animal não apresenta parede celular rígida como a levedura (SILVA, 2010). A maioria das leveduras pertence a ordem *Saccharoycetales*, da classe dos *Ascomycetes*. Entre as 350 espécies conhecidas de leveduras, a mais comum usado no processo de fermentação para produzir o álcool é a *Saccharomyces cerevisiae*. (EMBRAPA, 2023).

3.4 Metabolismo das leveduras

As leveduras utilizam o oxigênio presente no mosto no início do processo fermentativo para a produção de esteróis e ácidos graxos insaturados. Elas metabolizam mais de 90% dos açúcares por via fermentativa e o restante é utilizado no crescimento celular (FIGUEIRA, R. 2021).

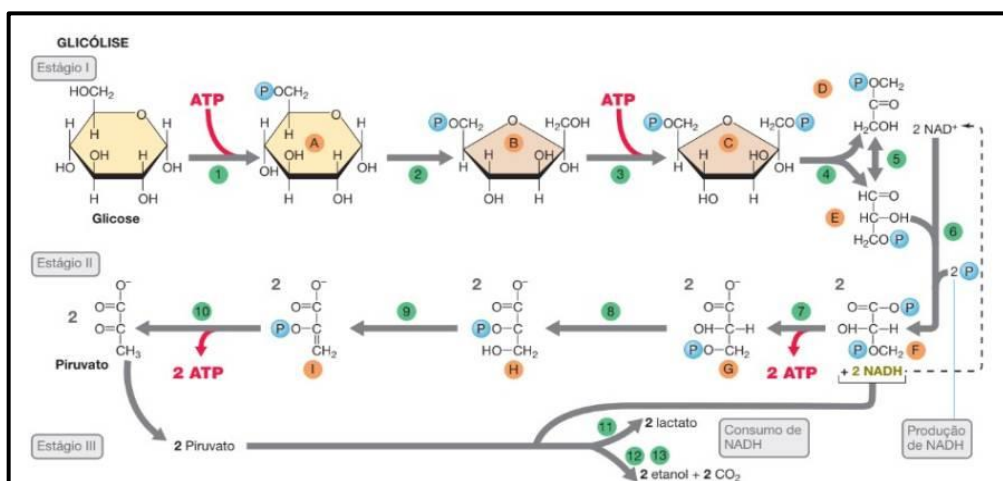
A reação global da fermentação, em que a glicose é convertida em etanol é dada por:



O objetivo da levedura ao metabolizar anaerobicamente a glicose, é produzir a molécula energética ATP. A transformação de glicose em etanol envolve 12 reações em sequência ordenada, cada uma catalisada por uma enzima específica. Estas reações, sofrem a ação de diversos fatores como nutrientes, minerais, pH, temperatura, entre outros e ocorrem a nível de citoplasma, logo, é nessa região da célula que o etanol é produzido (SILVA, 2010).

Uma molécula de glicose é convertida a duas outras de ácido pirúvico através da glicólise que consiste em uma sequência de 10 reações enzimáticas, conforme Figura 1. O ácido pirúvico pode ser utilizado no processo respiratório ou fermentativo. No processo fermentativo, duas enzimas são de fundamental importância para a produção de etanol: a enzima piruvato descarboxilase que contém um átomo de magnésio e catalisa a reação em que o ácido pirúvico é descarboxilado a aldeído. Por outro lado, a enzima álcool desidrogenase, que contém um átomo de zinco, é responsável pela conversão do aldeído ao etanol (SILVA, 2010).

Figura 1: Sequência das reações enzimáticas de conversão da glicose a etanol.



Fonte: MADIGAN, M. T, 2016

Na fermentação alcoólica, juntamente com a produção de etanol e de biomassa, as leveduras produzem subprodutos de interesse metabólico como glicerol, ácidos orgânicos, álcoois superiores, acetaldeído, entre outros.

3.5 Nutrição das leveduras

As leveduras são compostas principalmente de C, H, O, N, S e P presentes em macromoléculas (proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos e lipídios), junto com íons inorgânicos (K^+ , Mg^{2+} , entre outros) e elementos traço que desempenham papel estrutural e funcional no metabolismo celular. Além disso, a levedura necessita ainda de fatores de crescimento como vitaminas, purinas e pirimidinas, nucleosídeos e nucleotídeos, aminoácidos, ácidos graxos e esteróis. Quando uma espécie de levedura necessita de um fator de crescimento e não ocorre a adição deste fator ao meio de cultura, então ocorre um crescimento pobre e diminuição da velocidade dos processos metabólicos. Em geral, são utilizadas vitaminas como a biotina, ácido pantotênico, ácido nicotínico (na forma de nicotinamida), tiamina e vitamina B (SILVA, 2010).

3.6. Processo fermentativo

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico que ocorre pela transformação de açúcares em álcool etílico (C_2H_6O), e dióxido de carbono (CO_2), catalisado por enzimas. Este processo é executado principalmente por leveduras, em nível citoplasmático, tendo como objetivo a produção de energia, na forma de ATP, que será empregada nas funções fisiológicas e ainda para o crescimento e reprodução do micro-organismo (FAVONI, et.al, 2018). A fermentação ocorre em três fases: fase preliminar ou pré-fermentação, fase de fermentação principal e tumultuosa, fase de fermentação complementar ou pós-fermentação.

A fase preliminar inicia-se, quando o substrato é acrescentado junto às células. Nesta fase, a multiplicação celular é intensa, e o açúcar consumido é usado na reprodução. Caracteriza-se por uma pequena elevação da temperatura e baixo desprendimento de CO_2 , cuja duração depende das características do sistema de fermentação, e pode ser reduzida quando se emprega elevada concentração de células ou pela adição de células em um meio nutricionalmente mais rico que o original (LIMA, et.al, 2001).

Na fase tumultuosa, inicia-se com o desprendimento intenso de dióxido de carbono, que faz com que o mosto se agite como em ebulição, formando espuma. Durante esta fase há aumento da temperatura que é corrigida através de trocadores de calor. A duração desta fase é evidenciada pela diminuição do desprendimento de CO_2 (VENTURINI, 2010). Na fase complementar, o desprendimento de gás carbônico diminui sensivelmente e o líquido ascende na dorna fermentativa, a temperatura abaixa e há redução abrupta no teor de açúcares do meio, completando o processo em torno de 8 horas durante a safra (PASCHOALINI et al., 2009).

Os nutrientes são importantíssimos para desenvolver a fermentação, afetam inclusive a velocidade e multiplicação da levedura. A concentração adequada de nutrientes do mosto é extremamente importante, pois em quantidades insuficientes ou exageradas, pode ter resultados negativos sobre o processo fermentativo como um todo. E a falta de nutrientes, é uma função específica no metabolismo celular, no qual, compromete o metabolismo e consequentemente a eficiência de fermentação (PEREIRA; et.al, 2021).

Para a fermentação ser completa e ter um bom rendimento é necessário que os teores de (ART) no mosto, sejam superiores a açúcares, em torno de 12%. Mostos muito diluídos geram fermentações mais rápidas, resultando em menor teor alcoólico do vinho, maior consumo de água diluição e facilidade de contaminação do mosto. No entanto, na utilização de mostos muito concentrados as fermentações são incompletas e demoradas, acarretando a perda do açúcar e menores rendimentos na destilação (RIBEIRO, 2016).

3.7. Fatores que afetam a fermentação

Diversos fatores afetam a fermentação como, fenômenos físicos (temperatura, pressão osmótica), químicos (pH, oxigenação, nutrientes minerais e orgânicos, inibidores) e os fenômenos microbiológicos (espécie, linhagem e concentração de levedura, contaminação bacteriana). Todos esses fatores têm impacto diretamente no rendimento da fermentação e, também, na eficiência da conversão do açúcar em etanol (REIS; RIBEIRO, 2009).

3.7.1. Temperatura

As temperaturas ótimas para a produção industrial de etanol situam-se na faixa de 26 a 35°C. À medida que a temperatura aumenta, aumenta a velocidade da fermentação, mas favorece a contaminação bacteriana, ao mesmo tempo que a levedura fica mais sensível à

toxidez do etanol. Por outro lado, temperaturas elevadas permitem maior perda de etanol por evaporação em dornas abertas.

3.7.2. pH

As fermentações se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, sendo adequada entre 4 e 5. A fermentação alcoólica inicia com valores de pH baixos, finalizando com valores de 3,5 a 4,0. Fermentações conduzidas em meios mais ácidos resultam em maiores rendimentos em etanol, pelo fato de restringir o crescimento do fermento, com a consequente redução da produção de glicerol, ao mesmo tempo que reduz a contaminação bacteriana. Entretanto, fermentações alcoólicas desenvolvem-se bem em níveis mais elevados, em substratos de alto poder tampão, como os melaços, em pH 5,8/5,9. Os caldos de cana fermentam sem correção da acidez, em pH natural que varia de 5,2 a 6,8. Pelo descrito, a tolerância à acidez é uma característica importante para as leveduras industriais.

3.7.3 Inibidores da fermentação

O processo fermentativo pode ser inibido não só pelos seus próprios produtos como o etanol, como por diferentes substâncias que podem estar presentes nos mostos. Assim, alguns minerais como potássio e cálcio podem se apresentar em quantidades excessivas, que acarretam efeitos negativos à fermentação, quando se emprega elevada proporção de melaço. A sulfitação do caldo de cana para a sua clarificação pode resultar em melaços com elevados teores de sulfito, que pode acarretar efeitos tóxicos à levedura comprometendo a fermentação, bem como aumentar a acidez do álcool obtido.

3.7.4. Concentração de açúcares

Aumentando-se a concentração de açúcares, aumenta-se a velocidade de fermentação, a produtividade e, dentro de certos limites, acarreta-se menor crescimento do fermento e menor formação de glicerol por unidade de substrato processado. Porém, elevados teores de açúcar acarretam um estresse osmótico da levedura, de tal sorte que existe, dependendo do processo de fermentação, uma faixa de concentração considerada ideal (LIMA, U.A, et al, 2001).

3.7.5. Concentração de inóculo

Maiores concentrações de leveduras na dorna permitem fermentações mais rápidas, com maior produtividade e com maior controle sobre as bactérias contaminantes, além de restringir crescimento da própria levedura. Por outro lado, elevado teor de levedura exige energia de manutenção maior, isto é, maior consumo de açúcar para manter células vivas. Como consequência, resulta em maior competição pelos nutrientes do meio, minerais e vitaminas, diminuindo a viabilidade do fermento (LIMA, U.A, et al, 2001). Sendo assim, existe um teor ótimo de levedura na dorna, dependendo das condições do processo industrial.

3.7.6. Contaminação bacteriana

Pela dimensão da fermentação industrial, o processo não é conduzido em condições de completa assepsia, a contaminação bacteriana, principalmente de *Lactobacillus* e *Bacillus*, está sempre presente e, dependendo de sua intensidade, compromete o rendimento do processo fermentativo. As altas temperaturas de fermentação favorecem a contaminação bacteriana, o aumento do tempo de fermentação e o estresse da levedura. A contaminação bacteriana associa-se ao aumento da formação de ácido láctico e, embora não haja uma confirmação definitiva sobre as causas da floculação da levedura. (CAMILI, E.A, 2010).

3.7.7. Antissépticos

No Brasil não é comum esterilizar os mostos das destilarias de álcool e de aguardente. Quando se faz a clarificação do caldo por aquecimento, há uma redução dos microorganismos, mas não é uma esterilização, pois após a clarificação, o meio é resfriado e colocado em dornas sem os cuidados necessários para manter um ambiente livre de microorganismos. As contaminações encontram um caminho aberto. Para controlar o problema das contaminações, é aconselhado o uso de antissépticos, capazes de criar ambiente favorável ao desenvolvimento das leveduras e desfavorável a outros microorganismos. Cada antisséptico atua de uma forma diferente, agindo sobre um ou mais grupos de microorganismos. Alguns agem favoravelmente às leveduras, ao mesmo tempo que inibem a outros microorganismos (LIMA, U.A, et al, 2001).

3.8. Antibióticos Convencionais

Antibióticos são substâncias produzidas que inibem o crescimento de bactérias, causando sua destruição. Eles podem ser produzidos por processos de síntese química ou por culturas microbianas posteriormente modificadas quimicamente (JUNIOR, R.O.S; *et.al*, 2023). As primeiras substâncias descobertas eram produzidas por fungos, como a penicilina. Atualmente, existem também antibióticos sintetizados ou alterados em laboratórios farmacêuticos para evitar resistências e diminuir efeitos colaterais

Da mesma razão que se empregam os antissépticos, usam-se os antibióticos nas fermentações industriais para a produção de etanol. O antibiótico é usado normalmente para se referir a algum agente antimicrobiano sintético, semissintético ou natural, que seja efetivo em baixas concentrações. Para ser efetivo, um antibiótico precisa alcançar o seu alvo, matando o micro-organismo (biocida) ou impedindo seu crescimento e reprodução (SINGLETO e SAINSBURY, 2006). Os antibióticos são produtos metabólitos secundários produzidos por microrganismos, geralmente mofo e bactérias do gênero *Streptomyces*, *Bacillus* e *Paenibacillus spp.* Alguns antibióticos também podem ser produzidos usando manipulação química parcial ou completa, tais como a fosfomicina, entre outros (LEITE, 2011).

Desde a descoberta da penicilina, vários outros antibióticos foram desenvolvidos e introduzidos no mercado. Esses antibióticos tinham um objetivo em comum, matar bactérias. Para isso, utilizavam de diferentes rotas, ou seja, atacavam de diferentes maneiras.

Os principais alvos dos antibióticos são parede celular, ribossomos, replicação do DNA, síntese de RNA e enzimas específicas (GUILFOILE, 2007)

Entretanto, percebeu-se, que bactérias combatidas por esses antibióticos começaram a criar resistência à ação dos mesmos, tornando-os ineficazes. Essa resistência fundamenta-se nas modificações genéticas sofridas intensamente por esses microrganismos, gerando descendentes com características diferentes e muitas vezes favoráveis a resistência a ação dos antibióticos. Uma vez que a reprodução celular desses micro-organismos acontece rapidamente, uma simples bactéria resistente surgida em meio a tantas outras susceptíveis a ação do antibiótico consegue gerar milhões de outras bactérias resistentes em poucas horas (LEITE, 2011).

O antibiótico utilizado frequentemente nas destilarias é o HJ Kamoran, a base de montesina, o que implica uma elevação nos custos produtivos (NETO, et al, 2014). Uma vez que os antibióticos apresentam custo elevados, a dosagem dos antibióticos está limitada pela relação custo/benefício. Dessa forma, a indústria considera aceitável trabalhar com níveis de unidades formadoras de colônia (UFC) da ordem de grandeza de 10^5 UFC mL^{-1} não sendo considerado economicamente operar em níveis mais baixos (SILVA, F.M.S, 2015).

Além dos antibióticos serem caros eles deixam resíduos químicos nas leveduras, os quais dão margem a questionamentos sobre a utilização destas leveduras para o consumo animal e humano. Países da Europa e os Estados Unidos estão proibidos de utilizarem leveduras com algum tipo de resíduo dos antibióticos (LEITE, 2011).

Porém, vem sendo criadas alternativas para os setores sucroenergéticos. Produtos naturais que prometem agir como antibióticos, mas sem deixar resíduos nas leveduras, estão entrando no mercado de insumos químicos para destilarias, principalmente nas usinas que tem interesses na comercialização de leveduras íntegras, autolisadas ou do extrato de leveduras. Sendo assim, a escolha do antibiótico depende do seu custo no tratamento.

3.8.1. Antibiótico naturais

O uso de antibióticos naturais diminui os resíduos deixados no processo. Os compostos bioativos com função antimicrobiana além de isentar resíduos de antibióticos ou produtos químicos, não geram resistência às bactérias, não afetam a levedura. O fato disto ocorrer é devido a alta complexidade de sua fórmula química, composta por agrupamento de álcoois, fenóis, ésteres, ácidos, aldeídos e terpenos. (VIÉGAS, E.K.D, 2011).

A própolis pode ser definida como uma resina natural produzida pelas abelhas e utilizada pela população para o tratamento de inúmeras condições médicas, incluindo inflamação e infecções bacterianas (VIÉGAS, E.K. D, 2011). Além disso, são usadas na fabricação de vernizes, isolamento industrial, usado como desinfetante entre outros (RODRIGUES, 2009).

A composição da própolis é geralmente composta por 50% de resina e bálsamo vegetal, 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outras substâncias variadas, incluindo resíduos (BURDOCK, 1998). A principal classe de constituintes da própolis é dos compostos fenólicos, no qual, possuem anel aromáticos com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo grupos funcionais.

No Brasil, as composições químicas e propriedades biológicas são diferentes dependendo da região em que as amostras são coletadas. Essa variação é explicada pela biodiversidade brasileira. (RODRIGUES, 2009). Devido a isso, existem preferências pela própolis brasileira: um em relação às suas características organolépticas e o outro em relação ao menor teor de metais pesados e demais poluentes ambientais. (AQUINO NETO; SEIXAS; PEREIRA, 2002). Sendo assim, a Tabela 1 refere-se aos diversos tipos de própolis mais

difundidas no mundo, com destaque para a verde e a vermelha, mais comum no Brasil. E a tabela 2, que se refere aos diferentes tipos de própolis brasileira.

Tabela 1: Tipos de própolis mais difundidas no mundo: origem vegetal e as principais classes de constituinte.

<i>Tipos de própolis</i>	<i>Origem geográfica</i>	<i>Fonte vegetal</i>	<i>Constituintes majoritários</i>
<i>Álamo</i>	Europa, América do Norte, Regiões não tropicais da Ásia, Nova Zelândia	Populusssp. da secção Aigeiros, na maioria das vezes P. nigra L.	Flavonas, flavononas, ácidos cinâmicos e os seus ésteres. ácidosp-cumárico prenilados, ácidos diterpênicos.
<i>Verde (Alecrim)</i>	Brasil	Baccharis spp., predominantemente B. dracunculifolia D. C.	ácidosp-cumárico prenilados, ácidos diterpênicos.
<i>Bétula</i>	Rússia	Betula verrucosaEhrh.	Flavonas e e flavonols.
<i>Vermelha</i>	Brasil, Cuba e México	Dalbergia spp.	Isoflavonóides e pterocarpanos
<i>Mediterrânea</i>	Sicília, Grécia, Creta, Malta.	Cupressaceae (espécie não definida)	Diterpenos (principalmente ácidos do tipo labdânicos)
<i>"Clusia"</i>	Cuba, Venezuela	Clusia spp.	Poliprenilados e benzofenonas
<i>"Pacífico"</i>	Região do Pacífico (Okinawa, Taiwan e Indonésia)	Macaranga tanarius	Prenil flavononas

Fonte: Autora, 2024.

Tabela 2: Classificação da própolis brasileira de acordo com suas características físico-químicas e localização.

<i>Extrato Etanólico de Própolis</i>		
<i>Grupo*</i>	<i>Cor</i>	<i>Origem</i>
<i>1 (RS)</i>	Amarela	Região Sul
<i>2 (RS)</i>	Marrom	Região Sul
<i>3 (PR)</i>	Marrom escura	Região Sul
<i>4 (PR)</i>	Marrom	Região Sul
<i>5 (PR)</i>	Marrom esverdeada	Região Sul
<i>6 (BA)</i>	Marrom avermelhada	Região Nordeste
<i>7 (BA)</i>	Marrom esverdeada	Região Nordeste
<i>8 (PE)</i>	Marrom escura	Região Nordeste
<i>9 (PE)</i>	Amarela	Região Nordeste
<i>10 (CE)</i>	Amarela escura	Região Nordeste
<i>11 (PT)</i>	Amarela	Região Nordeste
<i>12 (SP)</i>	Verde ou Marrom-esverdeada	Região Sudeste
<i>13 (AL)</i>	Vermelha	Região Nordeste

Fonte: Autora, 2024.

A Tabela 2, foi classificada de acordo com as características físico-químicas, no qual, sete são provenientes da região Nordeste, cinco da região Sul e uma proveniente do Sudeste. E a classificação do tipo 13 refere-se a região de manguezais muito comum no estado de Alagoas.

3.8.2. Própolis Vermelha

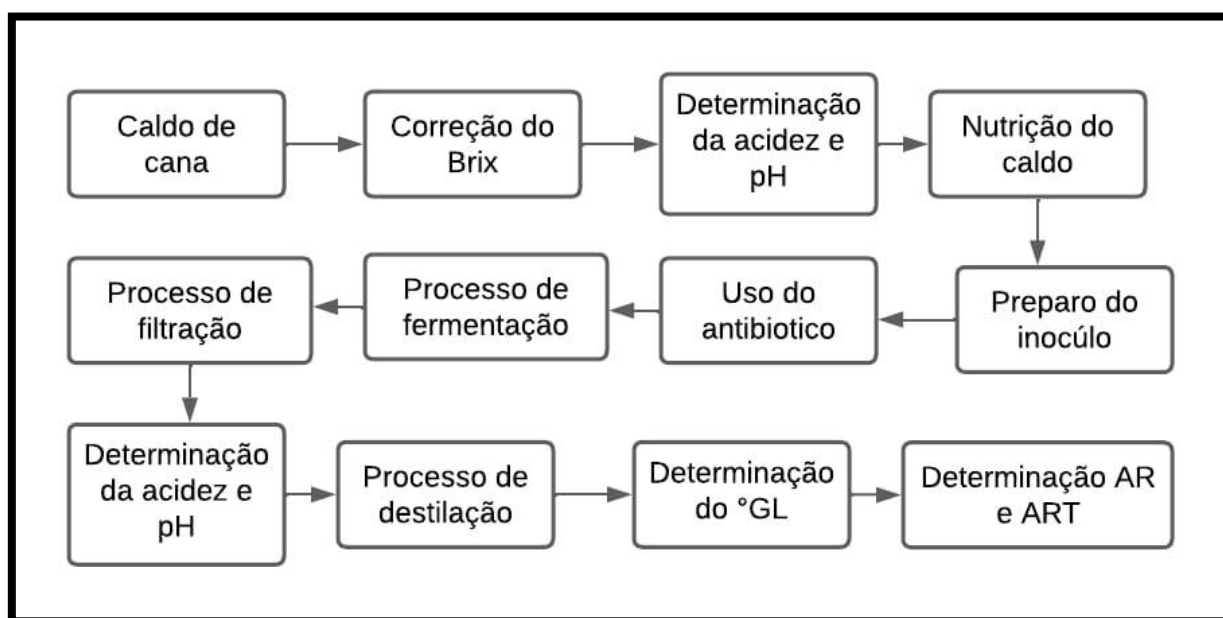
A própolis vermelha é um dos 13 diferentes tipos de própolis encontrados em colmeias localizadas no caule de manguezais, rios e litorais principalmente da região Nordeste do Brasil, Cuba, Venezuela e México (COSTA et al., 2021; LOTTI et al., 2010) e possui alguns compostos diferentes das demais própolis. Tais compostos pertencem a diferentes classes, como: fenólicos, triterpenóides, isoflavonoides, pinocembrina, dalbergina, benzofenonaspreniladas e um epóxido da naftoquinona, composto isolado pela primeira vez em um produto natural (TRUSHEVA et al., 2006).

A própolis vermelha é proveniente da ação de abelhas sobre a *Dalbergia ecastophillum*, popularmente conhecida como rabo-de-bugio, da família Fabaceae (Leguminosae), da região nordeste do Brasil, especificamente do estado de Alagoas, oriunda de um local de vegetação litorânea, apresenta maiores percentuais de fenóis totais e o terceiro maior teor de flavonoides totais, quando comparadas às demais própolis brasileiras (NASCIMENTO, 2021). Os manguezais de Alagoas são conhecidos pela produção de própolis vermelha, tornando um produto único no mundo.

4 METODOLOGIA

A metodologia empregada neste estudo iniciou-se com a preparação do mosto, onde foi utilizado caldo de cana de açúcar e foram adicionados os nutrientes, as leveduras e os antibióticos em estudo: natural e convencional. Após isso, deu-se início as fermentações alcoólicas, seguida pela filtração do mosto e pelo processo de destilação, conforme pode ser visto no fluxograma da Figura 2.

Figura 2. Fluxograma da metodologia para obtenção do álcool.



Fonte: Autora, 2024.

4.1. Preparo do caldo de cana-de-açúcar

A pesquisa se iniciou com a aquisição de 3L de caldo de cana-de-açúcar, o qual foi obtido de um quiosque localizado na Universidade Federal de Alagoas (UFAL), próximo ao Centro de Tecnologia (CTEC). Após a obtenção dos 3L de caldo de cana-de-açúcar, foram separados 1L de caldo em três erlenmeyers de 1L. Na sequência, foram realizadas análises do Brix (sólidos solúveis) por meio de um refratômetro analógico.

Para uma boa fermentação alcoólica, é fundamental que o brix do caldo de cana esteja dentro da faixa de 18° a 22° Brix (A.L. Moreira et al, 2008). Sabendo que o caldo de cana é muito rico em açúcar, foi necessário diluí-lo com água destilada até atingir 18 graus Brix. Além

disso, é importante que o caldo de cana tenha um pH na faixa entre 4 a 5 para um bom desenvolvimento de leveduras (ALCARDE, A.R, 2022).

O procedimento foi realizado com 1L com o intuito de induzir uma infecção. Nesse caldo foram acrescentados os antibióticos utilizados afim de estudo nesse trabalho, sendo-os: própolis vermelha, como antibiótico natural, terramicina, como antibiótico convencional e um resíduo obtido durante o processo de fabricação da própolis, onde estes serão detalhados nos tópicos a seguir:

4.2 Antibióticos utilizados para combate da infecção

Como já mencionado, foram utilizados, como fim de comparação, dois antibióticos: um convencional e outro de origem natural. No entanto, durante a visita à fábrica que realiza extração da própolis foi entendido que os mesmos possuem uma problemática diante um resíduo de que é gerado durante todo o processo de fabricação. Dessa forma, resolveu-se utilizá-lo, também, como antibiótico natural afim de comparação e um posterior direcionamento a este descarte.

4.2.1 Antibiótico convencional: terramicina

Os antibióticos, ou antimicrobianos, apresentam diversas classificações. Neste estudo, optou-se pelo uso de um antibiótico convencional da classe tetraciclina, especificamente a terramicina por possuir o mesmo composto ativo da penicilina, pelo seu baixo custo e fácil obtenção.

A terramicina utilizada, Figura 3, foi obtida em uma farmácia local, onde foram seguidos os procedimentos indicados no rótulo da embalagem para sua ativação. Segundo o fabricante, Zoetis, 2g de terramicina devem ser diluídas em 1L de água destilada. Como na indústria, utiliza-se, comumente 8g desse antibiótico, então decidiu-se variar essa quantidade em 2, 4 e 8g, para fins de comparação.

Figura 3. Terramicina utilizada como antibiótico convencional.



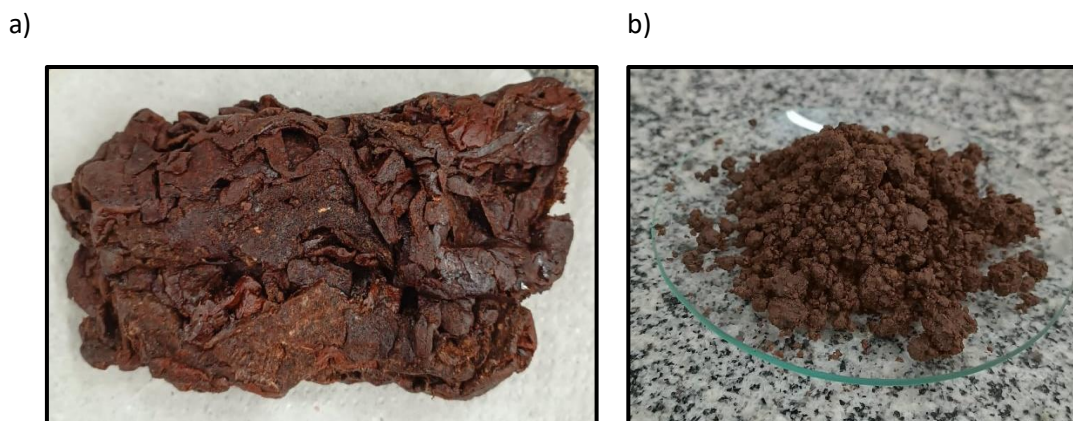
Fonte: Zoetis, 2023.

4.2.2 Antibiótico natural: Própolis vermelha

A própolis é um produto apícola resinoso que possui atividade microbiana eficiente contra uma variedade de microrganismos. O mecanismo de ação da própolis tem sido atribuído a inibição da divisão celular, destruição da parede celular, desorganização do citoplasma, alterações na membrana citoplasmática e inibição da síntese proteica (CARNEIRO, M.J.R, et al, 2014). Baseando-se nisso foi utilizado a própolis vermelha em forma bruta.

A própolis vermelha, Figura 4a, foi coletada no apiário Zumbi dos Palmares, situado na região serrana dos quilombos em Alagoas, uma área pioneira na produção de produtos apícolas e derivados. Da mesma forma, foi adquirido o resíduo de produção, Figura 4b, onde, segundo os produtores, são resíduos que se acumulam nas tubulações e equipamentos, o qual precisam ser retirados, de forma manual, para não diminuir a eficiência do processo. Esses resíduos, até então, são descartados sem nenhum tratamento. Como o volume do resíduo gerado é bastante, então a empresa possui a necessidade de obter uma opção viável a esse produto, tanto do ponto de vista financeiro quanto sustentável.

Figura 4. Própolis vermelha: a) forma bruta e b) resíduo



Fonte: Autora, 2024.

Como pode ser observado nas figuras, as própolis obtidas vieram de forma bruta, então foi necessário dissolvê-las para serem utilizadas na fermentação.

Segundo o fornecedor, para obter os princípios ativos da própolis, é necessário dissolver 25g do extrato em 100 mL de álcool 70 a 120 °C e, em seguida, completar para 1 L de água destilada. Dessa forma, esse foi o procedimento utilizado para obtenção dos extratos, em forma líquida, tanto da própolis vermelha quanto do seu resíduo.

Em posse dos antibióticos, foram realizados os procedimentos para a etapa de fermentação alcoólica.

4.3 Fermentação alcoólica

A fermentação alcoólica iniciou-se com a preparação do mosto, seguida de sua fermentação no caldo e avaliação dos parâmetros necessários para seu bom funcionamento.

4.3.1 Inoculação do mosto

A preparação do inóculo de *Saccharomyces Cerevisae* foi realizada através de uma cultura prévia em um meio de crescimento apropriado, de acordo com a instrução do fornecedor.

Com o caldo de cana-de-açúcar pronto foi dissolvido em água os nutrientes: 1,0 g de fosfato de amônia, 0,1 g de sulfato de magnésio e 20 g de levedura (Fermento biológico da marca Fleischman). Após isso, esses nutrientes foram adicionados no caldo e agitados de forma manual.

Momentaneamente a adição dos nutrientes, foram adicionados os antibióticos já preparados, sendo-os chamados: caldo com terramicina, caldo com própolis e caldo com resíduos.

A partir disso, aferiu-se a porcentagem dos sólidos solúveis (Brix) de hora em hora e a partir do momento em que o valor do Brix repetiu em 3 medições, considerou-se o término da fermentação.

4.3.2 Filtração do caldo e destilação

Após a conclusão do processo de fermentação, o mosto foi filtrado de forma a separar o produto dos resíduos gerados. Esse procedimento envolveu o uso de um filtro para filtrar o caldo, seguido pela etapa de destilação. Nesse contexto, empregou-se o micro destilador TE – 012-250, Figura 5, para realizar a destilação do caldo.

Figura 5. Micro Destilador TE – 012-250



Fonte: Tecnal, 2023.

O procedimento para realizar a destilação consistiu inicialmente em colocar uma amostra em cuba, que possui uma capacidade de 250 mL. Após isso, iniciou o processo de destilação, que foi concluído em um período de 4 minutos em cada amostra.

Durante a destilação, o álcool resultante foi coletado no Erlenmeyer de 500 mL, posicionado dentro de um recipiente contendo água e gelo. Esse procedimento foi repetido até que o caldo fosse completamente destilado ou até que fosse obtida uma quantidade suficiente para a medição do grau Gay-Lussac (°GL).

4.4 Métodos de análises

Os produtos obtidos foram analisados com base em sua acidez, teor alcoólico, pH, açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART).

4.4.1. Acidez

Para determinação da acidez, empregou-se o método do Instituto Adolfo Lutz, IAL 235/IV, no qual é baseado na titulação de neutralização de ácidos utilizando uma solução padronizada de Hidróxido de sódio, NaOH, em conjunto com o indicador fenolftaleína. A acidez total é expressa em g/L.

No procedimento, foram transferidos 2 mL da amostra para um frasco erlenmeyer de 250 mL. Posteriormente, adicionou-se 50 mL de água destilada e 2 gotas de fenolftaleína. Em seguida, procedeu-se à titulação com uma solução de hidróxido de sódio com concentração de 0,1M, até obter uma coloração rósea persistente. Para o cálculo da acidez foi utilizado a seguinte equação (1).

$$Acidez \left(\frac{meq}{L} \right) = \frac{Volume\ consumido \times N \times f \times 1000}{Volume\ total\ da\ amostra} \quad (1)$$

Onde:

$$N = normalidade\ de\ NaOH = 10 \frac{g}{L}$$

$$f = fator\ de\ correção = 0,979$$

Através desses cálculos, foi possível determinar a acidez do caldo de cana antes e após o processo fermentativo.

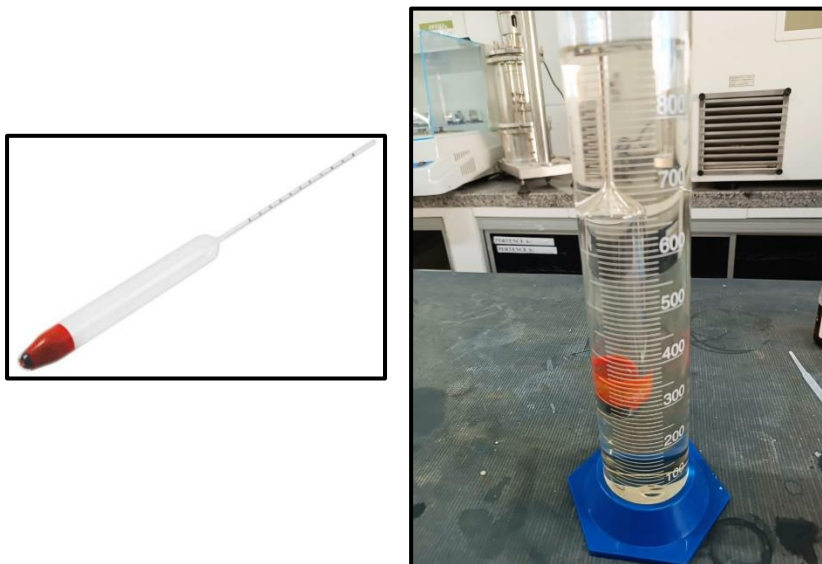
4.1.2 Teor alcoólico

O método utilizado para determinar o teor alcoólico foi pelo método de Gay Lussac (°GL). Alcoolômetro, segundo Gay Lussac, é um instrumento destinado a medir o teor de álcool de uma solução água mais álcool na faixa de 0 a 100° GL, com divisões de 0,1 e 1° GL.

A escala de temperatura no caso de termo densímetros varia de 0 a 50°C com divisão de 1°C (INCOTERM, 200). O procedimento basicamente consiste em inserir a amostra da solução

na proveta, no qual, utilizei de 500mL e de 100 mL. Em seguida, é inserido o alcoolômetro na escala de 0 a 10° GL, que deve está livre de impurezas. Ao colocar o alcoolômetro na solução, o instrumento começa a flutuar até se estabilizar e a partir desse ponto, é feito uma medição precisa, Figura 6.

Figura 6. Medição do método de Gay Lussac (°GL).



Fonte: Autor, 2024.

4.1.3 Determinação de açúcares redutores (AR) em glicose pelo método do DNS utilizando o espectrofotômetro

Para determinação dos açúcares redutores, foram transferidos 0,25 mL das amostras de caldo de cana-de-açúcar e caldo filtrado para tubos de ensaio, com tampa, referentes a cada dia do estudo. Em seguida, acrescentou-se 0,5 mL de água destilada. Quando a água no banho-maria atingiu a fervura, adicionou-se ao mesmo tubo 0,25 mL do reagente 3,5-dinitrosalicílico (DNS), e a amostra foi aplicada ao banho fervente por 5 minutos. Após esse período, o tubo foi transferido para o banho de gelo, e 4 mL de água destilada foram introduzidos nas amostras. A leitura foi realizada no espectrofotômetro, Figura 7, utilizando um comprimento de onda de 540 nm, correspondente à concentração padrão de glicose.

Figura 7. Espectrofotômetro modelo SHIMADZU UV-1280.



Fonte: Autora, 2024.

A partir disso, foi feito o cálculo para determinar o teor de açúcar redutor de cada amostra (AR). A partir da curva padrão de concentrações conhecidas de glicose tem-se a equação da reta linear que permite calcular a concentração de glicose em cada amostra representada pela equação 2 (BRITO, 2021).

$$\text{Concentração } \left(\frac{g}{L} \right) = \frac{Abs}{0,1705} \quad (2)$$

Com os valores da leitura da absorbância e dos cálculos da concentração foi plotado o gráfico, que deu origem a curva de calibração. Com a curva elaborada foi possível gerar a equação da mesma, que foi utilizada na etapa seguinte de análises das amostras dos caldos.

4.1.4. Determinação de açúcares redutores totais (ART) pelo método do DNS utilizando o espectrofotômetro.

Inicialmente, fez-se a hidrólise de açúcares não redutores. Para esse procedimento, 1 mL das amostras de caldo de cana-de-açúcar e caldo fermentado, previamente congelados, foi transferido para tubos de ensaio com tampa. Em seguida, adicionou-se 5 mL de ácido sulfúrico de 1,5 M (H₂SO₄) e submeteu-se ao banho fervente por 15 minutos, agitando a cada 5 minutos para promover a hidrólise de polissacarídeos e outros açúcares não redutores. Posteriormente, as amostras foram resfriadas e adicionou-se 1 gota de fenolftaleína. Com cautela, utilizando uma pipeta Pasteur, foi adicionado de gota a gota uma solução de hidróxido de sódio (NaOH –

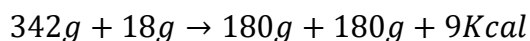
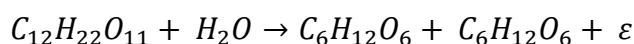
10%) até alcançar a coloração rosada. Em seguida, adicionou-se ácido sulfúrico (H_2SO_4) gota a gota até que a cor retornasse à tonalidade original. Após essa etapa, as amostras foram fornecidas para uma prova de 50 mL e complementadas com água destilada até atingir o volume de 50 mL.

Com a hidrólise pronta, foi feito o mesmo procedimento referente a metodologia da determinação de açúcares redutores em glicose pelo método do DNS, sendo possível determinar o ART e, por fim, o rendimento do teor alcoólico. A partir disso, foi utilizado a equação (3).

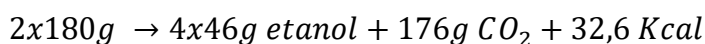
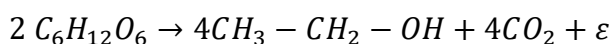
$$\text{Concentração } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{Abs}{0,1705} \times \text{diluição} \quad (3)$$

4.1.5 Rendimento do Álcool (%)

Para determinar o rendimento do álcool foi necessário fazer a relação estequiométrica:



Portanto, de 1,0g de sacarose obtém 1,05g de ART.



Sendo assim, $184/360 = 0,51g$ de álcool por grama de açúcar consumido.

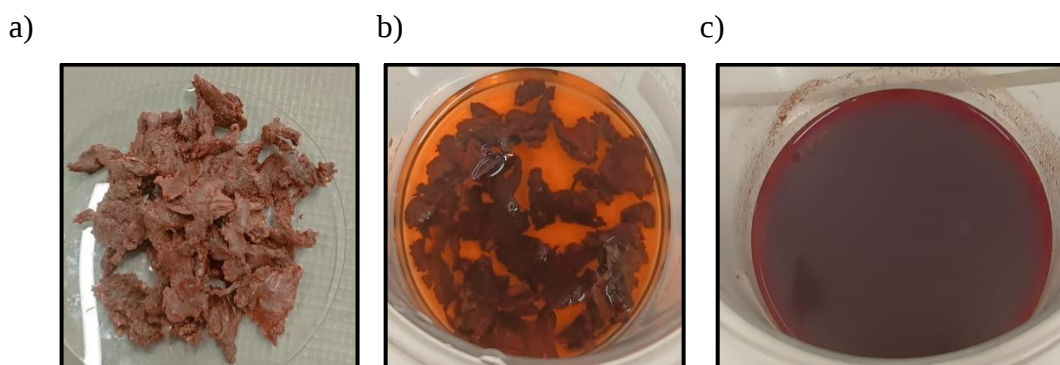
Quando se considera o substrato formado de sacarose, juntamente com pequenas porcentagens de glicose e frutose, como na indústria brasileira de etanol, o açúcar é definido como açúcar redutor total (ART) e o rendimento estequiométrico da fermentação é 0,511 g de etanol por grama de ART. Quando o rendimento estequiométrico é calculado com base na sacarose o valor do mesmo é 0,538 g de etanol por grama de sacarose (CRUZ, 2019). Sendo assim, o rendimento do álcool (%) pode ser expresso pela equação 3.

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{etanol em } ^\circ GL \times 10}{(\text{ART}_{\text{antes da fermentação}} - \text{ART}_{\text{após a fermentação}}) \times 0,51} \times 100 \quad (3)$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

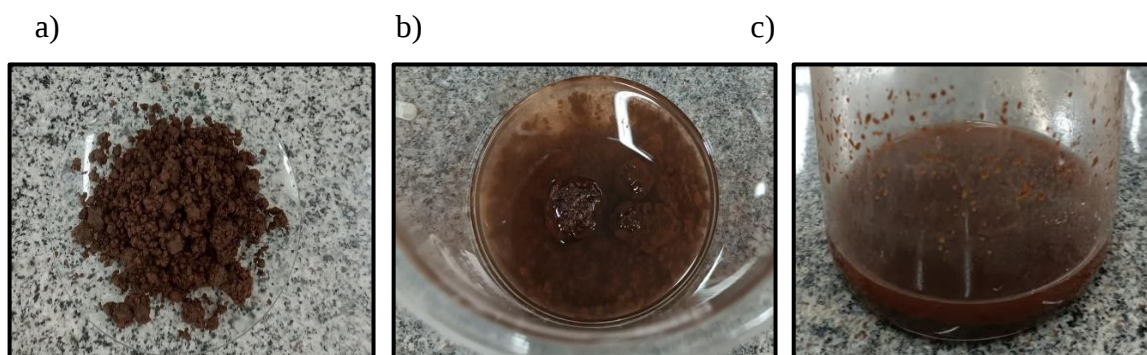
Um ponto bem importante do trabalho foi realizar a diluição dos extratos, pois como se tratou de extrato bruto, onde não foi possível encontrar metodologia científica na literatura, utilizou-se as fornecidas pelos produtores. Dessa forma, foram dissolvidos 25g do extrato e do resíduo em etanol de 70% em banho maria a 120°C, conforme Figuras 8 e 9.

Figura 8. Processo de dissolução da própolis: **a)** 25g do extrato de própolis vermelha. **b)** início da dissolução e **c)** termino da dissolução



Fonte: Autora, 2024.

Figura 9. Processo de dissolução do resíduo de própolis: **a)** 25g do extrato de própolis vermelha **b)** início da dissolução e **c)** termino da dissolução

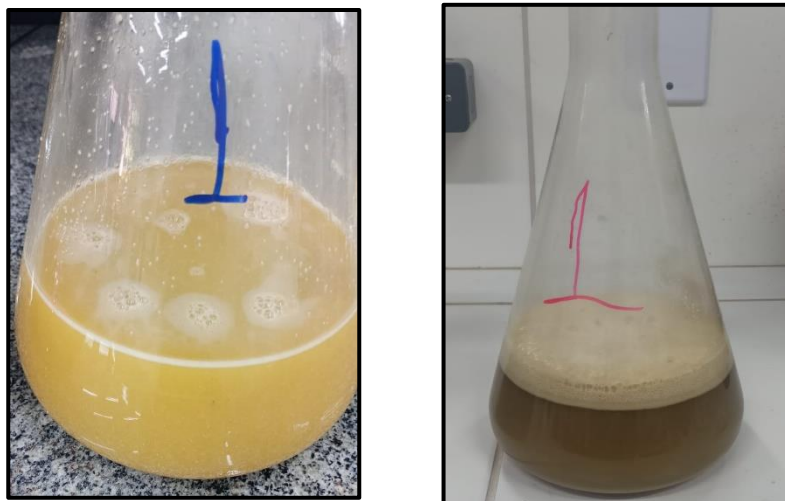


Fonte: Autora, 2024.

Após as dissoluções, os antibióticos foram adicionados aos caldos.

Para fins de comparação, foram obtidos dois tipos de caldos: um caldo esterilizado e outro não esterilizado. No caldo não esterilizado foram adicionados os nutrientes, bem como os antibióticos, e o caldo esterilizado seguiu sem algum tipo de adição de antibiótico, Figura 10.

Figura 10. Caldos preparados: a) caldo sem espuma e b) caldo com espuma



Durante o processo de fermentação foi notório ver a presença de espumas apontando a ativação do processo fermentativo. Em fermentações normais, as espumas apresentam bolhas que se rompem facilmente e de aspectos fino, já as fermentações contaminadas possuem espumas persistente (SILVA, M. 1995).

Sendo assim, em alguns caldos as espumas apareceram no início da fermentação, logo após colocar os nutrientes e a levedura. Depois de um tempo, as espumas cessaram ou ficaram em quantidades reduzidas. Em contrapartida, outros caldos permaneceram com as espumas, indicando sua contaminação.

Após as adições, o teor de brix foi monitorado a cada duas horas até que se observasse a repetição, marcando o término do processo de fermentação. Foi possível notar a formação de espuma no caldo, especialmente naquele ao qual o resíduo de própolis foi adicionado. As variações nos caldos após duas horas de fermentação estão ilustradas na Figura 11, onde estão exempladas na seguinte ordem: caldo com o resíduo, caldo com a própolis e o caldo controle.

Figura 11. Evolução do processo de fermentação após duas horas.



Fonte: Autora, 2024.

Após as 48 horas, foi feita a análise de pH e acidez e, em seguida, os caldos foram filtrados e depois destilados, obtendo o valor do teor alcoólico, pelo método do Gray Lussac (°GL).

5.1. Análise da Acidez e do pH em função da infecção bacteriana

A partir da metodologia, o primeiro passo foi avaliar o caldo de cana-de-açúcar antes e após a fermentação em relação a acidez, pH e contaminantes de bactérias. Durante o processo de fermentação, como esperado, a acidez total do meio aumentou e o pH diminuiu, fenômeno atribuído a formação de ácidos e, simultaneamente, transformação de açúcar e álcool. segundo Usina Caeté (2016), aumentos de acidez maiores que 50% indicam a ocorrência de infecções. Isso pode ter ocorrido devido a exposição do caldo ao ambiente durante seu armazenamento e processo de filtração, ocasionando uma possível infecção bacteriana.

Em relação ao pH, a hidrólise ou quebra da molécula de sacarose, ocorre facilmente na presença da enzima invertase, que atua como um catalisador das reações biológicas. Sua eficácia está diretamente relacionada às condições de pH e temperatura do meio, destacando a sensibilidade dessa enzima às variações ambientais. Esta enzima fica exposta ao meio externo podendo sofrer alterações quando em contato com o meio ácido (alta concentração de H^+), onde quanto menor for o pH maior a chance de alteração da carga da proteína constituinte e consequentemente maior produção de etanol (FRANCISCO, 2017). Portanto, o intervalo de pH

mais favorável para otimizar esse processo situa-se entre 3,5 e 5,5, onde os valores encontrados para o caldo esterilizado encontram-se dentro dessa faixa.

Isso sugere um ambiente propício para o teor alcoólico (°GL), indicando condições adequadas para a produção de etanol. A estabilidade do pH durante a fermentação demonstra uma capacidade de controle e eficiência do caldo esterilizado, fatores cruciais para garantir uma produção consistente e de alta qualidade de etanol. Essas observações ressaltam a importância do uso do caldo esterilizado como uma estratégia viável para alcançar resultados satisfatórios no processo de fermentação, contribuindo assim para a eficiência e a rentabilidade da produção de etanol.

A Tabela 3, apresenta os resultados referentes aos valores de acidez e pH para o caldo controle e para o caldo não esterilizado com o uso da terramicina como antibiótico convencional. O caldo controle foi feito para comparar a eficiência dos antibióticos utilizados, onde esse caldo foi produzido, também, sem esterilização e sem nenhum antibiótico, apenas com os nutrientes de fermentação. As quantidades de terramicina foram variadas em 2, 4 e 8g, conforme explicado na metodologia, item 4.2.1.

Tabela 3. Estudo das análises do antibiótico convencional em relação ao pH e acidez.

	<i>ACIDEZ (meq/L)</i>			<i>pH</i>	
	Início fermentação	Fim fermentação	Diferença acidez	Início fermentação	Fim fermentação
<i>Caldo controle</i>	0,224	0,897	0,673	3,82	3,8
<i>Caldo (2g)</i>	0,224	0,696	0,472	3,82	3,72
<i>Caldo (4g)</i>	0,224	0,658	0,434	3,82	3,65
<i>Caldo (8g)</i>	0,224	0,5648	0,340	3,82	3,59

Fonte: Autora, 2024.

Como esperado, por ser um caldo não esterilizado, a diferença da porcentagem de acidez do caldo controle deu superior (65%) quando usado a terramicina como antibiótico. Como já explicado, valores acima de 50% indicam caldo com grande quantidade de infecção bacteriana.

Analisando os caldos com o antibiótico, percebe-se uma diminuição da porcentagem de acidez, bem como dos valores de pH, quando comparado ao caldo controle. O caldo com 8 g de terramicina forneceu um valor de acidez de 32%, seguido de 41 e 45% para os caldos com 4 e 2 g, respectivamente. Esses resultados eram esperados, pois indicam a relação entre quantidade de antibiótico e controle de infecção, ou seja, à medida que se colocou uma maior quantidade de antibiótico (8g), a porcentagem de acidez diminuiu, indicando um melhor controle bacteriano. Já com relação ao pH, os valores ao final da fermentação diminuíram,

indicando, como será visto posteriormente, a relação dessa diminuição com o teor alcoólico. É possível analisar, também, que o resultado para o caldo com 8g de terramicina, obteve um menor pH, o qual será favorecido a produção de álcool.

No estudo com os antibióticos naturais (própolis e resíduo), apresentados na Tabela 4, é possível perceber que eles também apresentaram uma diminuição na porcentagem de acidez e pH, quando comparados ao caldo controle. Para o caldo com própolis obteve-se uma porcentagem de diminuição de acidez de 8%, seguido de 16% para o resíduo, ambos menores que os 65% para o caldo controle. Esses resultados indicam um eficiente controle de infecções. Em contrapartida, os valores finais de pH, tanto para a própolis quanto para o resíduo foram superiores ao controle, o qual pode-se atribuir esse resultado à presença de dextrana, uma substância viscosa presente no caldo de cana, que pode ter reagido com alguma substância da própolis, algum princípio ativo, influenciando o meio. Uma vez que sua presença indica que a cana-de-açúcar sofreu deterioração entre as etapas de corte e seu processamento, logo, a dextrana pode interferir na eficiência do rendimento do álcool (SARTORI, J.A.S; et al. 2015).

Tabela 4: Estudo das análises do antibiótico natural em relação ao pH e acidez

	ACIDEZ (%)			pH	
	Início fermentação	Fim fermentação	Diferença acidez	Início fermentação	Fim fermentação
<i>Caldo controle</i>	0,247	0,897	0,65	3,82	3,8
<i>Caldo com a própolis</i>	0,247	0,326	0,079	3,82	4,06
<i>Caldo com o resíduo</i>	0,247	0,407	0,160	3,82	4,17

Fonte: Autora, 2024.

Ao comparar os resultados da terramicina com a própolis, em relação a acidez, é possível perceber o quão positivo é a utilização desse antibiótico natural no controle de bactérias causadoras de infecção. Porém, mesmo esse resultando sendo bastante animador, precisa-se avaliar outras variáveis até chegar em uma possível conclusão.

5.2. Concentração de AR e ART

A determinação da concentração de Açúcares Redutores (AR) é fundamental, pois fornece informações sobre a quantidade de açúcares disponíveis para serem convertidos durante

a fermentação. Isso é essencial para avaliar a eficiência do processo fermentativo, da produção de álcool e de outros produtos derivados.

Já o ART refere-se aos açúcares redutores totais no qual tem a capacidade de detectar e medir todas as perdas de açúcares (sacarose, glicose e frutose), ou seja, o ART é responsável por reduzir a presença de grupos funcionais como aldeídos e cetonas e produzir o álcool (RICARDO, 2023). Sendo assim, os resultados dessas análises estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Estudo das análises de AR e ART do caldo

	AR (g/L)		ART (g/L)	
	Início fermentação	Fim fermentação	Início fermentação	Fim fermentação
<i>Caldo controle</i>	6,067	6,578	157,70	9,68
<i>Caldo (2g)</i>	6,067	11,182	157,70	24,63
<i>Caldo (4g)</i>	6,067	3,672	157,70	12,02
<i>Caldo (8g)</i>	6,067	2,220	157,70	10,78
<i>Caldo com a própolis</i>	6,067	3,252	157,70	11,80
<i>Caldo com o resíduo</i>	6,067	5,525	157,70	18,40

Fonte: Autora, 2024.

É possível analisar que todos os caldos apresentaram uma diminuição do AR e do ART após a fermentação, indicando o consumo dos açúcares e, conseqüentemente, a produção de álcool.

No entanto, para o AR, os valores finais foram menores que o valor do caldo controle, o que sugere que, a adição dos antibióticos, tendo como um dos constituintes de sua base os açúcares, aumentou a quantidade destes disponíveis para serem convertidos em álcool. Uma lógica segue nos resultados obtidos pelo caldo com terramicina a 8 g e o caldo com a própolis, onde, pela grande quantidade de antibiótico utilizado (8 g) e por ser um antibiótico natural, a quantidade de açúcares consumido superou a dos outros, fornecendo assim, um baixo valor de AR. Em relação ao resíduo, por não se conhecer de fato sua composição, fez com que esse se comportasse diferente quando comparado a própolis.

Já em relação ao ART, todos os caldos tiveram seus valores diminuídos em relação ao caldo controle, sugerindo uma eficiência de álcool. Sendo assim, pode-se observar que o caldo com 8g de antibiótico convencional a terramicina e o caldo com a própolis foram os mais eficientes em relação ao teor alcoólico se comparado com os demais, podendo ser visto na tabela 6, que se refere ao teor alcoólico e ao rendimento (%)

5.1 Álcool Produzido e Rendimento do Álcool (%)

O teor alcoólico dos mostos foi medido pelo método Gay Lussac (°GL) e o rendimento alcoólico pela equação 3, presente no item 4.5.1 da metodologia. Os resultados podem ser vistos na Tabela 6 referentes aos caldos com os antibióticos.

Tabela 6. Teor e rendimento alcoólico dos caldos com antibióticos

	<i>Teor alcoólico (°GL)</i>	<i>Teor alcoólico (g/L)</i>	<i>Rendimento do etanol (%)</i>
<i>Caldo controle</i>	1	10,00	13,22
<i>Caldo (2g)</i>	3	30,00	30,89
<i>Caldo (4g)</i>	4	40,00	40,51
<i>Caldo (8g)</i>	8	80,00	93,34
<i>Caldo com a própolis</i>	7,5	68,00	68,60
<i>Caldo com o resíduo</i>	3,5	28,00	16,28

Fonte: Autora, 2024.

Na análise dos caldos contendo própolis e resíduo de própolis, foram considerados os valores iniciais do teor alcoólico, que se referem à diluição da própolis. É importante destacar que a própolis e o resíduo de própolis foram dissolvidos em 100 ml de etanol etílico a 70°GL, resultando em um teor alcoólico inicial de 0,7 g/L tanto para a própolis quanto para o resíduo de própolis.

Como pode ser visto, os valores de rendimento alcoólico indicaram que todas as fermentações realizadas foram eficientes na conversão de açúcares em álcool. Um resultado bastante positivo que merece ser mencionado foi o valor do rendimento alcoólico do caldo, quando utilizado a própolis como antibiótico, ser bem próximo ao valor do caldo quando utilizado a terramicina, sendo este o antibiótico utilizado em processos industriais.

Esse resultado se mostra bastante promissor, não apenas pelo ponto de visto sustentável, mas também financeiro, já que o valor do extrato da própolis bruto é bem inferior ao da terramicina vendida comercialmente.

Assim, concluiu-se que, a partir dos resultados obtidos foi possível obter um controle de agente microbianos sem atrapalhar o rendimento alcoólico da produção substituindo um antibiótico convencional por um natural, no caso a própolis vermelha.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados analisados e discutidos relativos à acidez, pH, açúcares redutores (AR) e açúcares redutores totais (ART), uma comparação abrangente foi conduzida entre o antibiótico natural, o antibiótico convencional e o caldo sem antibiótico. Os caldos com antibióticos apresentaram o melhor rendimento, indicando que, realmente, é preciso utilização de algum produto para ajudar no combate a uma infecção.

Além disso, é importante destacar, especialmente, o caldo tratado com a própolis. Além de demonstrar resultados promissores no teor alcoólico, muito próximos ao do antibiótico convencional, ele segue uma iniciativa notável em direção à sustentabilidade, fazendo uso de um produto de fácil obtenção com um excelente custo-benefício.

Por outro lado, o caldo com o resíduo de própolis não apresentou um dos melhores rendimentos. No entanto, considerando sua origem, sua utilização no processo de fermentação alcoólica torna-se viável. Além de sustentável, contribui para uma produção econômica e traz resultados positivos para a produção.

Sendo assim, os resultados deste estudo apontam para a importância de escolhas estratégicas nos métodos de tratamento, considerando não apenas a eficácia imediata, mas também os impactos a longo prazo, a sustentabilidade e o potencial de reaproveitamento de recursos.

7 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Caracterizar o resíduo;
- Realizar análises microbiológicas nos caldos;
- Implementar análises laboratoriais específicas, como cromatografia líquida e espectrometria de massa, para avaliar a influência do resíduo de própolis na produção de etanol;
- Comparar metodologias para determinar açúcares redutores totais (ART) e açúcares redutores (AR), incluindo a metodologia de Lane-Eynon;
- Ampliar o estudo para incluir o melaço como substrato.

8. REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, F.M. **Processo de fabricação do açúcar**. 3.ed. Recife: Editora Universitária UFPE, 449 p. 2011.

ALCARDE, A. R. Fermentação. **EMBRAPA**. 2022. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/pos-producao/processamento-da-cana-de-acucar/tratamento-do-caldo/fermentacao#:~:text=O%20pH%20tem%20papel%20importante,o%20melhor%20controlador%20das%20contamina%C3%A7%C3%B5es>>. Acesso em 05 de fev. 2024.

ALCARDE, A.R. **Tratamento do caldo**. EMBRAPA. 2022. Disponível em:<<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/pos-producao/processamento-da-cana-de-acucar/tratamento-do-caldo/>>. Acesso em 17 de outubro de 2022.

Álcool ou gasolina: como saber qual é a melhor opção? **PORTAL AUTO SHOPPING**. 2022. Disponível em: <<<https://www.portalausshopping.com.br/blog/alcool-ou-gasolina-como-saberqualeamelhoropcao>>. Acesso em 12 de outubro de 2022.

AMARAL,T.M. **Fatores de controle no processo da fermentação alcoólica: uma revisão**. Trabalho de conclusão de curso em tecnologia de alimentos pela Universidade Federal de Goiana para obtenção de tecnólogo de alimentos. Morrinhos, Goiana. 2022.

ANDRÉ RICARDO F. Balanço de massa em Açúcares Redutores Totais (ART). 2023. Disponível em: < <https://www.linkedin.com/pulse/balan%C3%A7o-de-massa-em-a%C3%A7%C3%BAcares-redutores-totais-art-ferreira/?originalSubdomain=pt> >. Acesso em 05 de março de 2024.

ANTIBIÓTICO. In: WIKIPÉDIA, a enciclopédia livre. Flórida: Wikimedia Foundation, 2023. Disponível em: <<https://pt.wikipedia.org/w/index.php?title=Antibi%C3%B3tico&oldid=65754916>>. Acesso em: 05 fev. 2024.

Biocombustível: conheça o protocolo etanol mais verde. **CANAL AGRO**. 2021. Disponível em:<<https://summitagro.estadao.com.br/sustentabilidade/biocombustivel-conheca-o-protocolo-etanol-mais-verde/>>. Acesso em 13 de outubro de 2022.

BRAZ, A.C.S. Estudo da fermentação do bagaço de cana para obtenção de etanol de segunda geração. Trabalho de Conclusão de Curso pela Universidade Federal da Paraíba em Tecnólogo em Produção Sucroalcooleira. 2016.

Bruno Henrique Francisco. **Efeito do pH na morfologia da levedura**. 2017. Disponível em: < <https://www.linkedin.com/pulse/efeito-do-ph-na-morfologia-da-levedura-bruno-francisco/?originalSubdomain=pt> >. Acesso no dia 02 de março de 2024.

BURDOCK, G.A. Review of the biological Properties and toxicity of bee propolis. **Food and Chemical Toxicology**, London, v.36, n.4, p.347-363.1998.

CAMILI, E.A. Parâmetros operacionais do processo de produção de etanol a partir de polpa de mandioca. Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp - Câmpus de Botucatu. Tese de doutorado em Agronomia. 2010.

COSTA, C. L. et al. Anaerobe – ResearchArticle In vitro inhibitoryeffectofBrazilianredpropolis on planktonic and biofilm forms of *Clostridioides difficile*. **Anaerobe**, p. 102322, 2021.

Etanol e veículos flex-fuel: possibilidade de escolha e a economia efetiva dos consumidores. **UDOP – energia que inova**. 2019. Disponível em: <https://www.udop.com.br/noticia/2019/02/06/etanol-e-veiculos-flex-fuel-possibilidade-de-escolha-e-a-economia-efetiva-aos-consumidores>.> Acesso em 12 de outubro de 2022.

Etanol: entenda o que é, para que serve e como é usado no Brasil. **RAIZEN**. 2022. Disponível em: <https://www.raizen.com.br/blog/etanol/>>. Acesso em 12 de outubro de 2022.

Etanol: Fonte de benefícios ambientais e sociais. **COPERSUCAR**. 2018. Disponível em: <https://www.copersucar.com.br/noticias/etanol-cenario-geral-beneficios-biocombustivel>>. Acesso em 24 de setembro de 2022.

FAVONI, S.P.G; et.al. **Fermentação alcoólica na produção de etanol e os fatores determinantes do rendimento**. Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais, v.9, n.4. 2019.

FEY, Angela. **A importância do etanol na América Latina**. BioBlog. 2016. Disponível em: <https://www.bioblog.com.br/a-importancia-do-etanol-na-america-latina/>>. Acesso em 24 de setembro de 2022.

FIGUEIRA, R; et.al. Quantificação do metabolismo respirofermentativo de leveduras de cerveja, vinho e pão por método estequiométrico. *Energia na Agricultura*, Botucatu, v. 36, n. 1, p. 10-16. 2021

GORDINHO, M. C. **Do álcool ao etanol: trajetória única**. São Paulo: Editora Terceiro Nome/UNICA, 2010.

GUILFOILE, P. G. **Antibiotic-Resistent Bacteria**. 1 a Ed. Chelsea House Publishers. p.10-37, 2007.

HENRIQUE, Alisson. **Tecnologia industrial – Tratamento de Caldo: Um importante aliado na eficiência industrial**. RPA NEWS. Disponível em: <https://revistarpanews.com.br/tecnologia-industrial-tratamento-de-caldo-um-importante-aliado-na-eficiencia-industrial/>>. Acesso em 16 de outubro de 2022.

INCOTERM. **Instruções de uso do alcoolômetro segundo Gay Lussac**. 2008, p.8. Disponível em: <https://www.incoterm.com.br/media/2010/01/5682-manual.pdf> >. Acesso em 05 de fev. 2024.

JUNIOR, R.O.S; *et.al.* O uso da biotecnologia na produção de antibióticos: Uma revisão integrativa. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**. São Paulo, v.9.n.06. jun. 2023.ISSN -2675 –3375.

JUNIOR, R.R. C. Estudo de diferentes processos de produção de cachaça e influência nas características físico-químicas do produto. Projeto de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Rio Grande em Engenharia Agroindustrial Agroquímica. Santo Antonio da Patrulha, Rio Grande do Sul. 2016, 57 p.

LAGO, J. V; *et.al.* Avaliação do uso da nisina para o controle da contaminação bacteriana em fermentação alcoólica de milho. **Brazilian Journal of Development**. Curitiba, v.8, n.5, p.32989-33006, maio. 2022.

LEITE, I.R. **Avaliação da ação de antibiótico natural na fermentação alcoólica contaminada por cultura mista**. Dissertação para o título de mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Uberlândia. Minas Gerais. 2011.

LIMA, U. A.; *et.al.* **Biotecnologia industrial: Processos fermentativos e enzimáticos**.1. ed.3.v. São Paulo: Blucher, 2001.

LOTTI, C. et al. Constituintes químicos da própolis vermelha mexicana. **J. Agric. Food Chem**, v. 58, p. 2209–2213, 2010.

MADIGAN, M. T. et. al. (2016). **Microbiologia De Brock**. Artmed Editora, 14ª Edição. 987p.Disponível em
<<https://wiki.feagri.unicamp.br/doku.php?id=fa733:metabolismo#refnotes:cite:1:note6>>
Acesso em junho de 2023.

Metabolismo. Repositório Público da Faculdade de Engenharia Agrícola – UNICAMP. Disponível em :< <https://wiki.feagri.unicamp.br/doku.php?id=fa733:metabolismo>.>
Acesso em 17 de outubro de 2021.

MOREIRA, A.L; ALMEIDA, W.S; SCABBIA, R.J.A; TEIXEIRA, R.R.P. **Dosagem de ácido lático na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar**. Biológico, São Paulo, v.70, n.1, p.35-42, jan./jun., 2008.

NASCIMENTO, N.M. **Desenvolvimento e caracterização de filmes biodegradáveis de com própolis vermelha de Alagoas**. Tese de doutorado pelo Programa de Pós Graduação em Materiais da Universidade Federal de Alagoas como requisito à obtenção do título de Doutora em Materiais. f. 50-62, Maceió-Al. 2021.

OLIVEIRA, Ribeiro. **Antimicrobianos naturais: tecnologias seguras e eficazes contra a contaminação em usinas**. 2021. Disponível em: <
<https://fermentecnews.com.br/2021/02/12/antimicrobianos-naturais-tecnologias-seguras-e-eficazes-contra-a-contaminacao-em-usinas/>>. Acesso em 16 de outubro de 2022.

PACHECO, T. F. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator tipo torre com escoamento ascendente**. Dissertação de mestrado pelo programa de pós graduação em Engenharia Química pela Universidade Federal de Uberlândia. Minas Gerais. 94 p. 2010.

PACHECO, Thályta Fraga. **Fermentação alcoólica com leveduras de características floculantes em reator do pio torre com escoamento ascendente.** Dissertação para o título de mestre em Engenharia Química pela Universidade Federal de Uberlândia. 106 f. 2010.

PASCHOALINI, G.; ALCARDE, V. **Estudo do processo fermentativo de usina sucroalcooleira e proposta para sua otimização.** Revista de Ciência & Tecnologia, v.16, n.32, p.59-68, 2009.

PEREIRA, D.A; et.al. **Fatores que afetam a fermentação alcoólica.** Revista Ciência & Tecnologia, v.12, n.1, pag.44-55. 2021.

Piracicaba Engenharia sucroalcooleira. Resumo das formulas de rendimento e eficiência utilizadas na indústria açucareira do Brasil. 2014. Disponível em: <<https://www.piracicabaengenharia.com.br/resumo-das-formulas-de-rendimentos-e-eficiencia-utilizadas-na-industria-acucareira/>>. Acesso em 05 de março de 2024.

REIS H.B; RIBEIRO E.J. **Influência Conjunta do pH, Temperatura e Concentração de Sulfito em Fermentação Alcoólica de Mostos de Sacarose.** IX encontro e XIII seminário de iniciação científica, 2009.

SALVADOR, Murillo. **Colheita de cana-de-açúcar.** Portal Agriconline. 2021. Disponível em: <<https://portal.agriconline.com.br/artigo/colheita-de-cana-de-acucar/>>. Acesso em 15 de outubro de 2022.

SANTOS, G.R; STIER, P.H. **Cana-de-açúcar na produção de etanol.** Trabalho de Conclusão de Curso pelo Centro Universitário Internacional UNINTER. 2021.

SILVA, F.S.G; MIGOT, B.C; SILVA, F.C. **A importância do bioetanol dentro do contexto brasileiro, comparação de sua síntese a partir de cana-de-açúcar e milho e bioetanol de segunda geração.** 8º Jornada Científica e Tecnológica da Fatec de Botucatu. São Paulo. 2019.

SILVA, F.S.G; MIGOT, B.C; SILVA, F.C. A importância do bioetanol dentro do contexto brasileiro, comparação de sua síntese a partir da cana-de-açúcar e milho e bioetanol de segunda geração. 8º Jornada Científica e Tecnológica da Fatec de Botucatu. São Paulo, 2019. EMBRAPA. **LBB- Laboratório de Bioinformática em Bioenergia,** c2023. Disponível em :<<https://lbb.cnpae.embrapa.br/cms/6/>>. Acesso em junho de 2023.

SILVA, L.A.F. **Exigências nutricionais e operacionais para a produção de etanol pela levedura IQ-Ar/45-1 a partir do melaço em batelada alimentada.** Dissertação de mestrado para o título de mestre em Química pela Universidade Paulista. Araraquara. 2010.

SILVA, M. A.C. **Processo de Fabricação do Álcool Hidratado e Anidro da Usina Caeté.** 1995. 37p.

Tecnologia de Alimentos. v.21, n.1, p.63-68. 2001. AQUINO NETO, A. DOS S.; SEIXAS, F. R. M. S.; PEREIRA, F. R. DE A. **Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras.** Química nova, São Paulo, v.25, 2002.

TEIXEIRA, Silvana. **Cana-de-açúcar: Colheita**. CPT Cursos a Distâncias. Disponível em:< <https://www.cpt.com.br/calendario-agricola/cana-de-acucar-colheita>.> Acesso em 15 de outubro de 2022.

TRUSHEVA, B. et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 3, n. 2, p. 249–254, 2006.

USINA CAETÉ S/A. **Fabricação de álcool**. Grupo Carlos Lyra, 2016.

VENTURINI F. W. G. **Bebidas alcoólicas: Ciência e tecnologia**. São Paulo: Blücher, 2010.

VIÉGAS, E. K. D. **Propriedade antibacteriana da própolis verde sobre bactérias contaminantes da fermentação etanólica**. Dissertação (Mestrado em Ciência em Tecnologia em Alimentos) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.